

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Aminokyseliny jako markery stresu rostliny

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Binderová

Vedoucí práce: prof. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Aminokyseliny jako markery stresu rostliny" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 08.04.2016

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) paní prof. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc., vedoucí diplomové práce, za vstřícnost, ochotu, pomoc a rady, které mi pomohly k napsání této diplomové práce, a za milé jednání po celou dobu naší spolupráce. Dále své rodině za trpělivost, pomoc a podporu a také těm, kteří mi dodali cenné rady.

Aminokyseliny jako markery stresu rostliny

Souhrn

Cílem práce na téma Aminokyseliny jako markery stresu rostliny bylo zhodnocení změn v metabolismu N, ke kterým dochází v hyperakumulující rostlině rostoucí na půdě kontaminované As. Dále byly sledovány změny v obsahu arsenu, železa a hořčíku v závislosti na změně obsahu arsenu dodávaného do půdy.

K vyhodnocení výsledků byl založen vegetační pokus se dvěma zástupci hyperakumulátorů - *Pteris vittata* a *Pteris cretica*, kteří jsou schopni ve své biomase akumulovat vysoké koncentrace As. Celkem byly založeny čtyři varianty pokusu s přidavkem arsenu do půdy v koncentracích 0, 20, 100 a 500 mg As/kg půdy. Během růstu rostlin byly provedeny tři odběry nadzemní biomasy.

Z výsledků vyplynulo, že nejvyšší obsah arsenu v půdě má negativní vliv na růst biomasy jak u *Pteris vittata*, tak i u *Pteris cretica*. Čím více arsenu se nachází v půdě, a čím déle na rostlinu působí, tím dochází k menším výnosům. Díky zvyšujícímu se obsahu arsenu v půdě dochází k vyšší akumulaci tohoto prvku v rostlině, platí pro oba druhy. Vyšší akumulační schopnost arsenu má ale *P. vittata*. Obsah železa v biomase je závislý na délce doby růstu, po kterou rostlina roste na půdě s přidavkem arsenu. Vyšší obsahy železa byly naměřeny u *P. cretica*. Obsah dusíku byl též závislý na délce doby růstu rostlin. Čím déle byl pokus prováděn, tím méně dusíku bylo v biomase obsaženo. Potvrdila se tak hypotéza, že vlivem působení arsenu dochází ke změnám metabolismu dusíku. Obsahy hořčíku nebyly významně závislé na zvyšujících se koncentracích arsenu v půdě. Závislost Mg a As u *P. vittata* byla potvrzena jen u prvního a druhého odběru. U *P. cretica* došlo k mírnému zvýšení hladiny Mg. Obsah asparaginu nevykazoval přímou závislost na zvyšujícím se množství arsenu. Více kyseliny asparagové akumuloval druh *P. vittata*. S vyšší dávkou arsenu klesal obsah kyseliny glutamové u obou druhů. Více kyseliny glutamové obsahoval druh *P.vittata*. Obsah glutaminu byl u obou druhů nejvyšší ve 2. odběrech. Stoupající trend vykazovala *P.cretica* v odběru prvním a druhém. U *Pteris vittata* se v 1. a 3. odběru množství glutaminu v závislosti na vyšším obsahu arsenu snižovalo. Více glutaminu obsahoval druh *P. vittata*.

Klíčová slova: arsen, aminokyseliny, dusík, kyselina glutamová, kyselina asparagová, stres

Amino acids as markers of plant stress

Summary

The goal of the Diploma thesis Amino acids as markers of plant stress was evaluation of changes in the N metabolism occurring in hyperaccumulating plant growing on a soil contaminated by As. We also observed the changes in the contents of arsenic, iron, magnesium and amino acids: asparagine, aspartic acid, glutamine and glutamic in relationship with arsenic spiked to the soil.

The results of pot experiment with two hyperaccumulators - *Pteris vittata* and *Pteris cretica*, showed high concentrations of As in their biomass. Experimental plants were cultivated in soil spiked by As (0, 20, 100 and 500 mg As / kg soil). During the growing period plants were sampled free times.

The results showed that the highest content of arsenic in soil has a negative effect on the biomass growth both with *Pteris vittata* and *Pteris cretica*. The higher As content in soil and longer growing period of plants causing lower yield. Due to the increased content of arsenic in soil there is higher accumulation of this element in the plant, which applies to both of the tested plants. However, *P. vittata* shows higher arsenic accumulation. The content of iron in the biomass depends on the growing plant grows in the arsenic contaminated soil. Higher contents of iron were measured in *P. cretica*. The nitrogen content was also dependent on the period of the plant's growth. The longer experimental period showed the less nitrogen in biomass. The hypothesis that due to the effects of arsenic there are changes caused in the nitrogen metabolism was confirmed. The nitrogen contents were not significantly dependent on the increase in arsenic concentration in soil. The relation between Mg and As in *P. vittata* was confirmed solely with the first and second sampling. The content of Mg in *P. cretica* was slightly increased. The content of asparagine did not show direct correlation with the increase in arsenic. A higher content of aspartic acid was accumulated in *P. vittata*. With a higher content of arsenic the content of glutamic acid decreased in both of the tested plants. More glutamic acid was found in *P. vittata*. The content of glutamine reached the peak value at the second sampling in both cases. An increasing trend was observable in *P. cretica* at the first and second sampling period. In *Pteris vittata* the amount of glutamine decreased at the first and third sampling in relation to a higher content of arsenic. *P. vittata* contained more glutamine.

Keywords: arsenic, amino acids, nitrogen, glutamic acid, aspartic acid, stress

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíl práce.....	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Kovy a polokovy kolem nás.....	3
3.2 Arsen.....	3
3.2.1 Vlastnosti arsenu	4
3.2.2 Výskyt arsenu	5
3.2.2.1 Arsen a pedosféra.....	6
3.2.2.2 Arsen a hydrosféra	7
3.2.2.3 Arsen a atmosféra	8
3.2.3 Zdroje arsenu podmíněné lidskou činností.....	8
3.2.4 Synergismus a antagonismus arsenu	10
3.2.5 Arsen a jeho toxicita.....	10
3.2.5.1 Vliv na člověka	10
3.2.5.2 Ekotoxicita arsenu	12
3.2.6 Arsen v rostlinách	13
3.2.6.1 Příjem arsenu rostlinou.....	16
3.2.6.2 Fytotoxicita arsenu	17
3.3 Hyperakumulátory arsenu.....	18
3.3.1 <i>Pteris vittata</i>	20
3.3.2 <i>Pteris cretica</i>	21
3.4 Aminokyseliny	21
3.4.1 Alifatické dikarboxylové aminokyseliny a jejich amidy.....	22
3.4.1.1 Kyselina asparagová a asparagin	22
3.4.1.2 Kyselina glutamová a glutamin	22
3.5 Dusík v rostlině.....	23
4 Materiál a metody	24
4.1 Založení vegetačního pokusu	24
4.2 Stanovení arsenu a dalších vybraných prvků	25
4.3 Stanovení celkového obsahu N.....	25
4.4 Stanovení volných aminokyselin	25
5 Výsledky	27
5.1 Výnos biomasy.....	27
5.2 Obsah arsenu, železa, dusíku, hořčíku	30
5.3 Obsah volných aminokyselin	39

6	Diskuze	48
7	Závěr	54
8	Seznam literatury.....	56

1 Úvod

Arsen je prvek, který se nachází ve všech částech životního prostředí (voda, půda, ovzduší, sedimenty). Jeho toxicita je známa již od dob starého Egypta, avšak v posledních letech se dostal do veřejného zájmu v souvislosti s objevením jeho toxických účinků již při malých koncentracích. Toxicita arsenu souvisí s oxidačním stavem, ve kterém se vyskytuje v prostředí kolem nás. Do prostředí se dostává nejen přírodní cestou společně s lesními požáry, vulkanickou činností, ale hlavně pomocí antropogenní činnosti zahrnující průmysl, zemědělství a důlní činnost. Kolem sebe ho můžeme spatřit jako součást mnoha minerálů. Jedná se o toxický a karcinogenní prvek, který způsobuje po celém světě vážné zdravotní problémy a problémy v životním prostředí.

Z půdy se může následně transportovat do rostliny, ve které se akumuluje jak v kořenech, tak i v listech. Při nižších koncentracích dokáže stimulovat růst rostliny. Příjem a akumulace arsenu rostlinami může mít ale fatální následky pro celý ekosystém. Vysoké koncentrace arsenu mohou v biomase rostliny vyvolat oxidační stres, spojený s nekrózami listů, při extrémních koncentracích může narušit důležité metabolické procesy a způsobit smrt rostliny.

Mezi rostlinnými druhy citlivými na vysoké hladiny arsenu lze také nalézt druhy, prosperující na jeho vyšších koncentracích. Tyto druhy jsou nazývány hyperakumulátory a vyznačují se tím, že ve své biomase dokážou akumulovat vysoké koncentrace arsenu a jiných toxických prvků. Z rostlinných druhů tolerujících extrémně vysoké koncentrace arsenu v půdě se do podvědomí dostali zástupci rodu *Pteris* – *Pteris vittata* a *Pteris cretica*.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem práce je hodnocení změn v metabolismu N, ke kterým dochází v hyperakumulující rostlině rostoucí na půdě kontaminované As. Budou sledovány především změny transportních aminokyselin.

Hypotéza:

Vlivem rostoucí kontaminace půdy arsenem dochází ke změnám v příjmu dusíku rostlinou, a proto i ke změnám v obsahu volných aminokyselin.

3 Literární rešerše

3.1 Kovy a polokovy kolem nás

Kovy nás obklopují po celém světě již od pradávna a i do budoucna nás stále budou obklopuvat. Mezi kovy patří asi osmdesát prvků periodické soustavy, přičemž přibližně třicet jich je označováno jako kovy těžké, případně toxické. Označení toxické kovy nesou ty kovy, které při svých určitých koncentracích negativně působí na lidský organismus a všechny živé části ekosystému. Těžkými kovy označujeme ty kovy, jejichž specifická hmotnost je vyšší než 5 g.cm^{-3} (olovo, kadmium). Mezi stopové kovy se řadí ty kovy, které nalezneme v ekosystémech ve velmi nízkých koncentracích (chrom, zinek), řádově v jednotkách ppm. (Kafka et Punčochářová, 2002). Jak Nagajyoti et al. (2010) uvádí, tyto kovy zaujímají velikou roli ve fyziologických a biochemických funkcích všech rostlin. Často mohou být součástí enzymů nebo se účastní redoxních reakcí. V přírodě nacházíme kovy ve formě solí nebo jako kovy ryzí, zároveň zahrnují veškerá skupenství. Většina z nich je v malých koncentracích nedílnou součástí zemské kůry.

První zmínky o používání těžkých kovů pocházejí již z doby okolo 2000 let př. n. l., v jiných záznamech se dočteme o použití těžkých kovů již v době antiky. Některé těžké kovy byly objeveny mnohem později, avšak samotný arsen, polokov, který je přiřazován ke skupině těžkých a toxických kovů, byl používán již ve starém Egyptě, kde byl přidáván jako aditivum do barev. I škodlivé účinky těchto kovů na lidstvo a ostatní organismy jsou známy velmi dlouho. Můžeme tedy předpokládat, že kovy se řadí k nejdéle známým látkám prokazující se toxickým účinkem.

Těžké kovy se v ekosystémech pohybují specifickými cestami svých biogeochemických cyklů, ze kterých v určité fázi vystupují a kumulují se v půdách či živých organismech. Existuje mnoho zdrojů těžkých kovů a tudíž i mnoho možností jejich úniků do životního prostředí. Za hlavní zdroj lze považovat antropogenní činnost, která zahrnuje různá odvětví průmyslu a zemědělství (Kafka et Punčochářová, 2002).

3.2 Arsen

Arsen je díky své toxicitě pro člověka a další živé organismy jeden z nejvíce studovaných rizikových prvků (Száková et al., 2007). Spolu se rtutí, kadmíem a olovem tvoří

skupinu nejzávažnějších rizikových prvků, které svými vlastnostmi ohrožují životní prostředí (Ust'ak, 2001). Zvýšená hladina koncentrace arsenu v lidském těle pak může vyvolávat karcinogenní a teratogenní příznaky (Vácha et al., 2008).

3.2.1 Vlastnosti arsenu

Arsen má atomové číslo 33. Je to všudypřítomný prvek, který se přirozeně vyskytuje v zemské kůře. Řadí se na 20. místo výskytu v přírodě, na 14. místo v oceánech a na 12. místo v lidském těle (Mandal et Suzuki, 2002). Byl izolován roku 1250 a od té doby byl použit v různých oblastech, jako je například medicína, elektronika, zemědělství a metalurgie (Sharma et Sohn, 2009). Již v minulosti byl arsen hojně využíván např. v lékařství. (Eisler, 2007). Je obsažen ve více než 245 minerálech. Jeho hlavním zdrojem je geologie, lidská činnost, jako například hornictví, spalování fosilních paliv a aplikace pesticidů. Existuje ve čtyřech oxidačních stavech: -III, 0, III, V (Sharma et Sohn, 2009).

Patří mezi amfoterní prvky a má vlastnosti jak kovů, tak nekovů. Proto tvoří rozmanitou škálu sloučenin, které jsou v přírodě všude přítomny.

Jeho nejčastějšími oxidačními stupni jsou trojmocné a pětímocné formy (Ust'ak, 2001). Společně s antimonem, bismutem, fosforem a dusíkem spadá do V. A skupiny periodické tabulky prvků. Elementární arsen se vyskytuje ve čtyřech barevných modifikacích: žlutý, šedý, černý a hnědý arsen (Greenwood et Earnshaw, 1993).

Jedná se o toxický polokov (Soudek et al., 2006). V životním prostředí se také vyskytuje v kombinaci s ostatními prvky, příkladem je kyslík a síra, v této kombinaci je označován jako anorganický arsen, naopak, v kombinaci s vodíkem a uhlíkem je označován jako arsen organický (Greenwood et Earnshaw, 1993). Organické a anorganické formy arsenu se od sebe liší chemickými vlastnostmi, přístupností pro rostliny, toxikologickými charakteristikami a chováním v systému půda – rostlina (Száková et al., 2007). Anorganický arsen je mobilnější než arsen organický a to přináší velké problémy s jeho vyluhováním do povrchových a podzemních vod (Eisler, 2007).

V půdě se arsen obvykle nachází v anorganických formách, tedy jako arsenitan (As^{III}) a arseničnan (As^{V}). Obecně se vyskytuje v pětímocném stavu, protože arsenitan obvykle oxiduje na arseničnan, který je v půdě méně toxický (Weis et Weis, 1991 in Vácha et al., 2008). Arsenitan je nejenom toxicitější než arseničnan, je ale také více rozpustný a více mobilnější (Mandal et Suzuki, 2002). Za nejvíce toxické sloučeniny arsenu jsou považovány arsenitan sodný, oxid arsenitý a sloučeniny arsenu s methylem (Urminská et al., 2002 in Vácha et al., 2008).

Atomové číslo	33
Atomová hmotnost [g/mol]	74,9216
Teplota tání [°C]	816
Teplota varu [°C]	615
Hustota při 25 °C [g/cm ³]	5,778
Elektronegativita	2,18
Elektronová konfigurace	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ² 4p ³

Tabulka č. 1: Atomové a fyzikální vlastnosti arsenu (Greenwood et Earnshaw, 1993).

Arsen patří do stopových prvků s nízkou, ale pozitivní mobilitou závislou na hodnotě pH. Jeho častý transport z půdy do rostlin může nastat také v geochemicky neobvyklých půdách, v případě, že je jeho obsah v těchto půdách velmi vysoký. Obecně platí, že nízká mobilita arsenu v půdě komplikuje jeho odstranění za použití mírných technik, jako je například fytořemediace (Tlustoš et al., 2006 in Vácha et al., 2008).

V životním prostředí ho nalezneme v půdě, vodách i v ovzduší. Často se vyskytuje jako doprovodný prvek v rudách mědi, olova a stříbra a díky získávání těchto kovů z rud se dostává do životního prostředí (Kafka et Punčochářová, 2002).

3.2.2 Výskyt arsenu

Stopy arsenu můžeme najít ve všech půdách, vodách, rostlinách a v ostatních složkách životního prostředí (Ust'ak, 2001). V zemské kůře není zcela hojně rozšířen, ale i přesto je hlavní složkou mnoha minerálů. Jeho obsah v zemské kůře dosahuje hodnot kolem 2 ppm a tím zaujímá 51. místo co se týče obsahu prvků v horninách (Greenwood et Earnshaw, 1993). Právě z litosféry se arsen dostává do dalších sfér země – biosféra, atmosféra a hydrosféra (Pertold, 1998). V půdě je arsen přítomen víceméně ve formě arseničnanu (Száková et al., 2007).

Podle WHO se rozlišuje 6 skupin sloučenin arsenu, běžně se vyskytujících v ekosystémech. Jedná se o anorganické sloučeniny rozpustné ve vodě, anorganické sloučeniny ve vodě málo rozpustné či nerozpustné, organické sloučeniny arsenu, organické sloučeniny arsenu mořských biotopů, organické sloučeniny arsenu sloužící jako přísada do potravin (kyselina arsanilová) a plynné anorganické a organické sloučeniny arsenu - arsin (Ust'ak, 2001).

Mezi přírodní zdroje arsenu lze řadit biologickou a sopečnou aktivitu (Zhang et al., 2002). Je to prvek, který se neustále oxiduje, redukuje nebo jinak metabolizuje. Celkový cyklus arsenu je podobný fosfátovému cyklu, nicméně čas regenerace pro arsen je mnohem pomalejší – řádově o několik měsíců. Z toho všeho vyplývá, že hlavním rezervoárem arsenu je magma, sedimenty, oceánské hluboké vody, půda, oceánské smíšené vrstvy, menší množství se vyskytuje v oceánských částech a v kontinentální a mořské troposféře (Eisler, 2007).

3.2.2.1 Arsen a pedosféra

V přírodě se arsen vyskytuje ve formě sulfidů a je součástí hornin a půd. Obsah běžného arsenu v zemědělských půdách je celosvětově 7 mg/kg. V České republice je norma pro obsah arsenu v zemědělsky obhospodařovaných půdách 30 mg/kg (ppm). Vysoké koncentrace arsenu obsaženého v horninách a půdách jsou zapříčiněny výskytem sulfidických rud olova, stříbra, mědi, železa a kobaltu. Po celém světě je těchto lokalit s výskytem sulfidických rud několik, v ČR mezi ně patří např. Kutná Hora a okolí (Ust'ak, 2001). Za hlavní zdroj tohoto prvku je v této oblasti považován arsenopyrit (FeAsS) a další sekundární metabolity (Száková et al., 2007). Arsenopyrit je považován za nejhojnější primární minerál. Mezi další sulfidické minerály patří auripigment (As_2S_3), kobaltin (CoAsS) a další (Greenwood et Earnshaw, 1993). Zvětráváním arsenopyritu či jiných minerálů, které také obsahují arsen, vznikají sekundární metabolity, nejčastěji to jsou arseničnany. Jejich vznik a stabilita jsou závislé především na geochemickém prostředí lokality, dále na chemickém složení a krystalové struktuře. Pokud se arsenopyrit nachází pod hladinou podzemní vody, je v zemské kůře stabilní. Pokud se ale nachází v zóně, která již není nasycená vodou, tedy výše, dojde k jeho oxidaci a tím se začnou uvolňovat prvky, ze kterých vznikají sekundární minerály (nejčastěji arseničnan železa skorodit). Složky, které se uvolnily z arsenopyritu, se pak dostávají do povrchových a podzemních vod, kde se později vysráží v sedimentech. Oxidaci arsenopyritu, jeho rozpouštění a následnému vzniku nových minerálních fází je v poslední době věnována velká pozornost (Pertold, 1998). Důležitou roli při oxidaci a redukcii arsenu v půdě, sedimentech a čistírenských kalech hraje mikrobiální biomasa a její aktivita. Arseničnany se mohou redukovat na arsenitany a poté se methylovat na dimethylarsan pomocí půdních bakterií. Také houby mohou napomoci přeměnit organické i anorganické sloučeniny arsenu na těkavé methylarsany (Száková et al., 2007).

Podíl arsenu se v jednotlivých horninách liší. V pískovcích a vápencích ho nalezneme kolem 1 mg/kg, kdežto v břidlicích je ho kolem 10 mg/kg. Kromě běžných hornin můžeme

arsen nalézt v ložiskách nerostných surovin. Hlavním rezervoárem arsenu v Českém masivu je hnědé uhlí. Jako průměrný obsah arsenu v uhlí se udává hodnota mezi 12 a 18 mg arsenu na kg (Pertold, 1998). Ve srovnání s mobilnějšími prvky jako jsou zinek a kadmium je mobilita arsenu v půdě velmi nízká (Száková et al., 2007). Sedimentární horniny všeobecně obsahují větší koncentrace arsenu než horniny vyvřelé a metamorfované, zatímco sedimenty usazené na dně ve většině vodních ploch obsahují více arsenu než vody přírodní (Sanyal et Nasar, 2002).

Existuje mnoho faktorů, které mají vliv na adsorpci arsenu v půdě. Koncentrace fosfátů (PO_4) je hlavním faktorem, který negativně ovlivňuje adsorpci arsenu. Organický materiál má také negativní vliv na adsorpci, protože spolu s PO_4 soutěží o adsorpční místo. Adsorpci arsenu v závislosti na typu absorbentu a formě As také výrazně ovlivňuje pH. K pochopení adsorpčních/desorpčních procesů a transportu arzeničnanů v půdě je důležité znát také sorpční kinetiku (Mehmood et al., 2009).

3.2.2.2 Arsen a hydrosféra

Do vody se arsen dostává vymýváním z hornin, z odpadních vod a atmosférickou depozicí. Výskyt arsenu v podzemních i povrchových vodách je velmi běžný. Arsen je velice mobilní prvek, vyznačující se značnou schopností akumulace v říčních sedimentech. V povrchových vodách, dobře okysličených, se vyskytuje většinou v pětimocné formě, v podzemních vodách pak za anaerobních podmínek dochází k redukci na As^{III} . Koncentrace arsenu ve vodách se pohybuje v rozmezí 1-2 $\mu\text{g/l}$, v oblastech, kde se nacházejí přírodní zdroje arsenu, může být koncentrace až 12 mg/l (Kožíšek et al., 2008).

Ve vodě se vyskytuje v obou formách - anorganický i organický, rozpuštěný i plynný. Formy arsenu ve vodách značně závisí na pH, obsahu organických nerozpuštěných látek, rozpuštěném kyslíku a dalších faktorech. Ve vodě existuje převážně v rozpuštěné iontové formě, částice představují méně jak 1% z celkového měřitelného arsenu. V elementárním stavu se ve vodě nachází jen vzácně (Eisler, 2007).

Toxicita sloučenin arsenu v podzemních vodách a půdním prostředí do značné míry závisí na jeho oxidačním stavu, na redox stavu a pH (Sanyal et Nasar, 2002).

Sedimenty, převážně oxidy železa, organická hmota a sulfidy představují primární zdroj arsenu v podzemních vodách a za určitých podmínek arsen uvolňují. Tento proces uvolňování zahrnuje abiotické reakce (oxidace, redukce, změna iontů, chemické transformace) a biotické reakce (mikrobiální methylace) (Mok a Wai, 1994).

Ve vodním prostředí byly vysoké koncentrace arsenu zaznamenány v horkých pramenech, v podzemních vodách z oblasti termální aktivity a v oblastech, které obsahují horniny s vysokým obsahem arsenu a ve vodách s vysokým obsahem rozpuštěných solí. Většina dalších vysokých koncentrací v jezerech, řekách a sedimentech je pravděpodobně spojena s antropogenními zdroji, které zahrnují těžební a tavící operace, spalování fosilních paliv, syntetické detergenty, herbicidy, pesticidy a kaly z čistíren odpadních vod (Eisler, 2007).

Kontaminace podzemních vod arsenem byla několikrát zaznamenána v Západním Bengálsku, Argentině, Mexiku, Maďarsku a Finsku. V Západním Bengálsku byla přítomnost arsenu v podzemních vodách přesahující maximální přípustnou koncentraci zjištěna roku 1978, přičemž hodnota maximální přípustné koncentrace arsenu v pitné vodě v těchto zemích byla stanovena na 0,05 mg As/l (Sanyal et Nasar, 2002).

Do oceánů se přírodním zvětráváním hornin a zemin dostává asi 40 000 tun arsenu ročně. Mnoho druhů mořských rostlin a živočichů tak obsahuje vysoké koncentrace arsenu, ty jsou ale většinou přítomny v neškodné formě (Eisler, 2007).

3.2.2.3 Arsen a atmosféra

Arsen se významně mobilizuje ze země do atmosféry jak pomocí přírodních, tak i za pomoci antropogenních procesů. Industriální emise mají za následek cca 30 % dnešní zátěže nacházející se v troposféře (Eisler, 2007).

Koncentrace arsenu ve vzduchu se velmi liší od 0,007 ng.m⁻³ na jižním pólu k hodnotě vyšší jak 50 ng.m⁻³ nacházející se v městských oblastech (Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007). Ve vzduchu je arsen převážně vázán na prachové částice a obvykle se zde nachází jako směs arzenitanů a arzeničnanů (Mandal et Suzuki, 2002).

Mezi přírodní zdroje arsenu v atmosféře spadají sopečné výbuchy, lesní požáry a aerosoly. Sopečné erupce mohou představovat 20-40 % z celkových zdrojů. Arsen a některé jeho sloučeniny jsou velmi těkavé a tak unikají do plynů a aerosolů, které se nachází v atmosféře, také skrz spalování uhlí (Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007).

3.2.3 Zdroje arsenu podmíněné lidskou činností

Existuje celá řada způsobů, díky kterým je lidstvo denně vystaveno tomuto prvku. Díky širokému spektru využití jednotlivých sloučenin těžkých kovů existuje mnoho zdrojů a možností úniků nebezpečných látek do životního prostředí, které mají následek jeho znečištění. Nejedná se pouze o různá odvětví průmyslu, z velké části má velký vliv na

znečištění také zemědělská činnost. Tento zdroj těžkých kovů může být jak lokální, tak také celoplošný (Kafka et Punčochářová, 2002).

Celosvětové emise arsenu, vzniklé na základě lidské činnosti, unikající do atmosféry činí asi 30 tisíc tun za rok, z přírodních zdrojů to je kolem 45 tisíc tun za rok. Mezi nejvýznamnější zdroje kontaminace životního prostředí arsenem, co se týče antropogenní činnosti, patří skoro veškerá odvětví průmyslu. Nejdůležitějšími průmyslovými zdroji znečišťování patří hutě a spalovny fosilních paliv, zejména hnědého uhlí (Ust'ak, 2001).

Koncentrace arsenu v uhlí jsou rozmanité. Větší koncentrace lze nalézt převážně v méně kvalitním hnědém uhlí a lignitu (Henke, 2009). V blízkém okolí hutí může znečištění půd arsenem dosahovat stovek až tisíců ppm (Ust'ak, 2001). Mezi základní zpracování rud patří jejich drcení, mletí, při kterém vzniká a uniká prach, tavení, které způsobuje horečku z kovů či pražení, při kterém vznikají dýmy a páry s negativním vlivem na dýchací soustavu (Kafka et Punčochářová, 2002).

Častým rizikem vstupu organických a anorganických sloučenin arsenu do životního prostředí je zemědělství (Száková et al., 2007). V minulosti nebylo výjimkou, že se jeho sloučeniny hojně využívaly jako herbicidy, insekticidy a defolianty. I dnes se můžeme v některých zemích s používáním těchto přípravků setkat (Ust'ak, 2001). Půdy obsahující vyšší koncentrace arsenu jsou považovány za hlavní zdroje kontaminace potravního řetězce a dodávky vody, což je velmi znepokojující, protože jak je známo, arsen je známý karcinogen a mutagen (Zeng et al., 2011).

Celosvětová produkce As činí asi 75 000 - 100 000 tun ročně, z nichž kolem 21 000 tun produkují Spojené státy americké a využívají kolem 44 000 tun. Velké množství pochází také ze Švédska, které je předním světovým producentem (Eisler, 2007). Mezi další hlavní producenty patřily Čína, SSSR, Francie, Mexiko, Peru, Namibie a Německo. Tyto země se podílely na 90 % světové produkce arsenu. Během roku 1970 cca 80 % spotřeby arsenu připadalo na zemědělské účely. V současnosti jeho využití v zemědělství klesá. V roce 1955 dosáhla produkce bílého arsenu 37 000 tun, z tohoto množství bylo 10 800 tun vyrobeno v USA. Anorganický arsen, především jako arsenitan sodný, byl široce používán jak herbicid na potlačení plevelů. Kyselina arseničná byla po mnoho let využívána k vysoušení bavlny (Mandal et Suzuki, 2002).

Podle Kafky a Punčochářové (2002) jsou dalšími zdroji znečištění výroba léčiv pro zvířata, kouření a výroba ochranných prostředků na dřevo. Velké množství arsenu je dále obsaženo ve výluzích z elektrárenských popílků a v důlních vodách. Asi 74 % z celkové výroby oxidu arsenitého se používá na výrobu přípravků sloužící ke konzervaci dřeva, zbytek

pak spadá na již zmíněné insekticidy, herbicidy, fungicidy, algicidy a růstové hormony pro rostliny a zvířata. Menší množství se pak používá při výrobě skla, v elektronickém průmyslu a na výrobu barviv (Eisler, 2007).

3.2.4 Synergismus a antagonismus arsenu

V současné chvíli jsou dostupné pouze omezené údaje o tom, že by byl arsen pro životní prostředí prospěšný, měl ochrannou funkci či byl dokonce nezbytným prvkem. Neví se toho mnoho ani o jeho interakci s ostatními chemickými prvky.

Arsen je považován spíše za kontaminant životního prostředí, než za nezbytný nutriční minerál. Nicméně, malé dávky arsenu ($< 2,0 \mu\text{d/denně}$) stimulují růst a proměnu pulců v dospělce a zvyšují životaschopnost kokonu bource morušového a jeho přeměnu v housenku. Deficit arsenu byl pozorován u potkanů. Příznaky deficitu zahrnují hrubou srst, nízký přírůstek hmotnosti, rozšíření sleziny a zvýšený rozpad červených krvinek. Podobné výsledky byly zpozorovány u koz a prasat, u kterých krmná dávka obsahovala $< 0,05 \text{ mg As/kg}$. U těchto zvířat byla narušená reprodukční schopnost, zvýšila se novorozenecká úmrtnost, porodní váhy mláďat byly velmi nízké a zároveň byl snížen počet přírůstků druhé generace těchto zvířat.

Ačkoli arsen není nezbytnou živinou pro rostliny, v některých případech, kdy byly nízké hodnoty arsenu obsaženy v půdě, bylo zpozorováno zvýšení výtěžnosti rostlin, speciálně u tolerantních rostlin jako jsou brambory, žito, pšenice a kukuřice. Fytotoxicita arsenu obsaženého v půdě je redukována se zvýšenou hladinou vápníku, organické hmoty, železa, zinku a fosfátů (Eisler, 2007).

3.2.5 Arsen a jeho toxicita

3.2.5.1 Vliv na člověka

Během uplynulých let se význam arsenu pro lidstvo neustále mění. Běžně se můžeme sejit s oblastmi, ve kterých využití arsenu značně klesá (ochranné nátěry dřeva a pesticidy), naopak v jiných oblastech je jeho využití v centru zájmů (Lešková et al., 2012). Sloučeniny arsenu jsou již řadu let známy jako velmi silné jedy a byly i užívány jako vražedné a sebevražedné prostředky. Dokonce i smrt Napoleona Bonaparte je spojována s otravou arsenem (Mandal et Suzuki, 2002). Dále jsou považovány za silně toxické a vyznačují se vysokou kumulativní schopností v organismech. Nejvíce se ukládají v ledvinách a játrech. Další, pro ně typická akumulace, je ve vlasech, kůži a nehtech. Již v počátcích lidského života mohou procházet přes nejzákladnější ochrannou bariéru v těle, kterou představuje placenta.

Touto cestou se mohou dostat do plodu a způsobit teratogenní poškození. Velký vliv mají i na celý nervový systém. Otravu arsenem lze poznat i sensorickým vnímáním. Pro otravu je typické rohovatění kůže a šedozelená pigmentace. Na nehtech lze nalézt bílé proužky a z dechu můžeme cítit zápach po česneku.

Stejně jako u jiných těžkých kovů reaguje i trojmocný kationt arsenu s thiolovými skupinami enzymů. To má za následek rušivé zásahy do metabolismu tuků, cukrů, následně dochází k zablokování tvorby metabolické energie. Arsen můžeme označit také jako protoplazmatický jed, který proniká do protoplazmatického prostoru buněčnými membránami a hluboce postihuje živou hmotu. Označuje se i za kapilární jed, protože má za následek propustnost stěn krevních kapilár.

Akutní toxicita sloučeninami arsenu se projevuje závratěmi, bolestmi hlavy, někdy také silnými zažívacími problémy, které v závažných případech mohou skončit selháním krevního oběhu a následnou smrtí organismu.

Pro chronické otravy jsou typické záněty kůže, trvalé potíže se zažíváním, anémie a poškození nervového systému, které se projevuje mravenčením v končetinách. Nejzávažnější následek chronické otravy je rakovina plic a kůže, která je spojena s působením sloučenin trojmocného arsenu, který je považován za nejvíce nebezpečnou formu. Výjimkou nejsou ani účinky mutagenní a teratogenní (Kafka et Punčochářová, 2002).

V oblastech, kde se k pití používá voda obsahující vyšší koncentrace arsenu, jsou známé chronické otravy, při kterých dochází k poškození kůže. Chronická otrava zahrnuje širokou škálu vlivů, jako jsou neurologické a hematologické změny, kardiovaskulární onemocnění, reprodukční, vývojové a imunitní poruchy, diabetes (Kožíšek et al., 2008).

Celkový obsah arsenu v lidském těle kolísá mezi 3 až 4 mg a s věkem se zvyšuje. Absorpce arsenu v těle je vyšší u aniontových a rozpustných forem a nižší pro nerozpustné druhy. Anorganický arsen má speciální afinitu k vlasům a dalším tkáním bohatých na keratin (Mandal et Suzuki, 2002).

Existuje celá řada způsobů, díky kterým je lidská populace vystavena nebezpečnému působení arsenu. Nejvíce pravděpodobným způsobem je požití arsenu nacházejícího se v pitné vodě nebo v potravinách (Zhang et al., 2002).

Za hlavní zdroj znečištění vody a potravinového řetězce je považována půda, do které se arsen dostává (Gunes et al., 2008). Zásoby vody, půdy a sedimenty, které jsou kontaminované arsenem, jsou hlavním zdrojem kontaminace v pitné vodě a potravním řetězci v několika zemích. To má za následek celosvětové epidemie otravy arsenem, při kterých mají lidé rozvinuté kožní léze, rakoviny a další symptomy. Geochemické zvětrávání hornin a

mikrobiální aktivita také přispívají k rozšíření arsenu v prostředí, nejvíce ale za jeho rozšíření může člověk a lidská aktivita (Tripathi et al., 2007).

Každá z forem arsenu má odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a různou biologickou dostupnost. Biologická dostupnost požitého anorganického arsenu se liší převážně na matrici, se kterou se arsen do těla dostal, na rozpustnosti dané požití sloučeniny arsenu a na přítomnosti dalších složek potravin a živin v zažívacím traktu.

Arsen se vylučuje hlavně močí a stolicí, ostatní způsoby vylučování nejsou tak časté. Jelikož se arsen kumuluje v tkáních obsahující keratin, mohou být vlasy, kůže a nehty také považovány za méně časté způsoby jeho vylučování. Velmi malá koncentrace arsenu se může vylučovat mateřským mlékem. Vlasy, kůže a nehty mohou také posloužit k identifikaci nebo ke kvantifikaci expozice. Arsen se velmi rychle dostává z krve, z tohoto důvodu se krev užívá pouze jako indikátor nedávné nebo relativně vysoké expozice, například v případech otravy arsenem (Mandal et Suzuki, 2002)..

Toxicita závisí také na jiných faktorech, jako je například fyzický stav, velikost částic, rychlost absorpce do buněk, rychlost eliminace, povaha chemických substituentů ve sloučenině a také na zdravotním stavu pacienta. Toxicita arsenu je závislá na jeho formě a oxidačních stavech (Mandal et Suzuki, 2002).

Lidé, kteří vdechují anorganický arsen, trpí laryngitidami, bronchitidami, rýmou, zánětem hltanu, zkráceným dechem, při dýchání mohou vydávat zvuky, může u nich dojít ke zduření nosní sliznice a k perforaci nosní přepážky (Mandal et Suzuki, 2002). Při vdechování arsenu jsou hlavní rozdíly mezi venkovním a městským prostředím. Běžné koncentrace arsenu v ovzduší dosahují na venkově 0,000 2 – 0,010 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Ve městě tyto koncentrace dosahují 0,010 – 0,750 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Jeden člověk při dýchání spotřebuje cca 20 m^3 vzduchu za den a tím tak zachytí asi 1/3 vdechnutého množství škodlivých látek (Ust'ak, 2001).

3.2.5.2 Ekotoxicita arsenu

Arsen nepůsobí svými vlastnostmi pouze na člověka, nýbrž i jeho ekotoxicita je velmi významná. Ve vysokých koncentracích je toxický pro rostliny, na zvířata má trojmocný arsen teratogenní účinky a velmi toxický je především pro včely. Dále na něj velmi citlivě reagují stromy. Na polích, která jsou ošetřovaná pesticidy s obsahem arsenu, se dostává do půdy, kde se zabudovává a následně snižuje výnos kulturních rostlin (Kafka et Punčochářová, 2002).

Arsen je prvek, u kterého je zjištěno, že se často kumuluje v živé tkáni, pokud se jednou dostane do jakéhokoli organismu, zabuduje se v něm a už je obtížně vylučován, v některých případech se ven nedostane už nikdy.

Množství arsenu v rostlině závisí výhradně na koncentraci arsenu, které je samotná rostlina vystavena. Jeho koncentrace v rostlině se pohybuje od 0,01 do cca 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. To znamená, že je zde pouze malá pravděpodobnost, že by se zvířata otráвила spásáním rostlin, které v sobě absorbují zbytky arsenu z kontaminovaných půd, protože ještě před působením toxické koncentrace dojde k poškození rostliny.

Jak již bylo zmíněno, arsen se kumuluje nejenom v živých pletivech rostlin ale i v tkáni zvířat v odlišných koncentracích na základě jeho použití a rozptylu v různých oblastech. U mořských živočichů (měkkýši, korýši) se koncentrace pohybuje od 0,005 do 0,3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Průměrná koncentrace ve sladkovodních rybách je kolem 0,54 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na základě celkové hmotnosti ale někdy mohou hodnoty dosahovat i 77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. U savců bylo zjištěno, že se akumuluje v určitých oblastech ektodermálních tkáních, především v chlupcích. Domácí zvířata a člověk obvykle obsahují z celkové hmotnosti méně než 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ arsenu v těle (Mandal et Suzuki, 2002).

3.2.6 Arsen v rostlinách

Přestože arsen v nízkých koncentracích stimuluje růst rostliny, nejsou doložena fakta, že by byl pro rostlinu esenciálním prvkem. Tolerance k arsenu záleží na druhu rostliny a může vyplývat ze dvou strategií. První strategií je nepřijetí arsenu, kdy dochází k zabránění jeho příjmu nebo omezení jeho transportu do nadzemní části rostliny. Touto strategií je známa *Typha latifolia*, která roste na půdách s vysokou koncentrací arsenu. Druhou strategií pak je akumulační strategie, kdy se arsen silně v rostlině akumuluje, příkladem jsou rostliny rostoucí na haldách po těžbě nerostů. Rostliny pak naakumulovaný arsen ukládají do kořenů nebo ho přemísťují do nadzemní části. Z výzkumů vyplývá, že dvouděložné rostliny do své nadzemní části přemísťují více arsenu než rostliny jednoděložné (Soudek et al., 2006).

Příjem arsenu a jeho toxicita je spojena s oxidačním stavem a druhem sloučeniny, nelze tedy jednoznačně z jeho množství ve vzorku odhadnout, jaké představuje riziko pro okolní prostředí (Soudek et al., 2006). Gonzaga et al. (2006) tvrdí, že rozdíly v množství arsenu přijatého z půdy do rostliny závisí na dostupnosti arsenu v půdě, na fázi růstu rostliny, na počasí a jiných podmínkách, jako je růst rostlin ve skleníku nebo na poli. Z experimentů na kultivarech rýže vyplynulo, že přístupnost arsenu pro rostliny záleží na jeho formě v pořadí DMA^{V} (dimethylarsinová kyselina) < As^{V} < MMA^{V} (monomethylarsonová kyselina) < As^{III} (Marin et al., 1992 in Soudek et al., 2006). Z jiných experimentů prováděných na mokřadních rostlinách vyšlo pořadí DMA^{V} < MMA^{V} < As^{V} < As^{III} (Carbonell et al., 1998). Z obou experimentů však vyplývá, že anorganické formy MMA^{V} se nejvíce naakumulovaly v

kořenech, DMA^V byla transportována do nadzemní části. Rozdílnost v místě, kde se arsen ukládá, ukazuje rozdílné mechanismy transportu a uchování arsenu v rostlině (Soudek et al., 2006).

Jen malý podíl arsenu zůstává v kořenech ve volné formě a přechází do cévních svazků, odkud se dostává do listů. Na rozdíl od fosforečnanů se z kořenů do nadzemní části transportuje jen malý podíl arsenu, který byl rostlinou přijat (Lešková et al., 2012). Arsen, kumulující se v kořenové části lze zaznamenat např. u rajčat, kde může být součástí strategie omezení příjmu arsenu. Pokud je ale větší část arsenu nahromaděna v nadzemní části oproti části kořenové, může být právě transport z kořenů do nadzemní části důležitý pro toleranci rostliny na arsen. Typickým příkladem je *Pteris vittata*. U této rostliny se více arsenu akumulovalo ve starších listech než v mladších. Toto lze vysvětlit tím, že xylém, kterým je arsen transportován do nadzemní části vede přes starší listy po celou dobu vegetace. Transport arsenu z kořenů do starších listů je považován za detoxifikační proces, kdy se rostlina může arsenu zbavit opadáváním listů. Redukce arsenu v rostlině je součástí detoxifikačního procesu (Soudek et al., 2006). Část přijatého arsenu se v chemicky nezměněné formě nebo ve formě metabolizované vyloučí zpět do prostředí (Lešková et al., 2012).

Pokud rostliny přijímají do svého těla arsen, je pro ně dostupný pouze v rozpustné formě a přijímají ho kořeny z půdního roztoku nebo vody. Vlastnosti prostředí, ve kterém se vyskytuje, mají značný vliv na jeho mobilitu. Mezi takové vlastnosti lze řadit pH, stupeň provzdušnění půdy, oxidačně-redukční potenciál, podíl organického materiálu, teplotu a aktivitu rhizosférách mikrobiálních společenstev. Pozitivně na ní však působí organické látky a fosfáty, které ho vytlačují z vazebných míst na půdních částicích.

Elementární formy arsenu se ve vodách a půdách vyskytují jen zřídka, stejně tak jako formy organické, které mají v přírodě mnohem nižší zastoupení než formy anorganické. Přítomnost anorganického arsenu v půdě a vodě je velmi vysoce toxická pro rostliny, jelikož zasahuje do procesů metabolismu rostlin a redukuje jejich růst. Dva nejznámější anorganické druhy arsenu, arsenitan a arseničnan, se chovají velmi odlišně a v odlišných podmínkách, což může často vést k úhynu rostliny (Vithanage et al., 2012). Dále Vithanage et al. (2012) tvrdí, že transport arsenu z půdy do kořenů rostlin závisí převážně na obsahu kyslíku v rhizosféře. Specie arsenu velmi závisí na redoxním stavu v půdě. Příkladem může být arseničnan, který je více dostupný v aerobních podmínkách, kdežto arsenitan zase v podmínkách anaerobních. Také některé mikroorganismy jsou schopny zvýšit transformaci stopových prvků pomocí jednotlivých mechanismů, zahrnující např. metylaci (Vithanage et al., 2012). Chemické a

biologické procesy odehrávající se v rhizosféře ovlivňují speciace arsenu a jeho biologickou dostupnost pro rostliny (Zhao et al., 2009).

Zhang et al. (2002) také uvádějí, že toxicita a biologická dostupnost arsenu je úzce spojena s jeho oxidační formou a druhem sloučeniny. Přijatelnost arsenu z půdy rostlinami je také ovlivněna druhem pěstované plodiny (Száková et al., 2000). K posouzení rizika na životní prostředí nelze stanovit pouze množství arsenu ve vzorku. Speciace arsenu v rostlině může poskytnout důležité informace nápomocné k pochopení mechanismů akumulace arsenu, translokace, transformace a jeho detoxifikace (Zhao et al., 2009).

Nejčastějšími sloučeninami arsenu v půdě jsou kyselina monometylarsonová (MMA) a kyselina dimethylarsinová (DMA). Biodostupnost arsenu v půdě se výrazně snižuje jeho vázáním na oxyhydroxidy železa a jílové minerály, zároveň ji může ovlivnit i mykorhizní houby, které působí jako selektivní bariéra pro jeho příjem.

Díky chemické podobnosti mají arsen a fosfor společné dráhy transportu v rostlině, protože přenašeče fosforu jsou zodpovědné za příjem arsenu. V dnešní době již známe více jak 100 takovýchto přenašečů, které se syntetizují v kořenech.

Mechanismus příjmu As^{III} se liší od příjmu As^V . As^{III} se přenáší do rostlin pomocí akvaporinů, které umožňují transport např. glycerolu nebo amoniaku. Též je možné, že se podílí na vylučování arsenu (Lešková et al., 2012).

Většina rostlin nacházejících se na stanovištích, obsahující zvýšeně koncentrace arsenu, disponuje mechanismy, které mohou za určitých podmínek omezit jeho vstup do rostliny nebo mechanismy, které ho účinně v kořenech detoxikují a dojde tak k minimálnímu přenosu do nadzemní části (Fišer et al., 2014).

Několik studií toxicity arsenu dokazuje, že rostliny, které nejsou rezistentní k arsenu, jsou vystaveny oxidačnímu stresu. Mezi symptomy stresu patří snížený růst kořenů, který má za následek úhyn celé rostliny. Je prokázáno, že působením anorganického arsenu na rostlinu vede k produkci reaktivních forem kyslíku – ROS. To je zapříčiněno nejspíše redukcí arseničnanu na arsenitan, která probíhá v rostlinách a vede k syntéze enzymatických antioxidantů, jako je katalasa a peroxid dismutasa. Dále dochází k syntéze neenzymatických antioxidantů, jako např. askorbát a glutathion (Hartley-Whitaker et al., 2001 in Soudek et al., 2006).

Jedním z mechanismů zodpovědných za toleranci rostliny k těžkým kovům je přítomnost obranného antioxidantního systému (Srivastava et al., 2005 in Singh et al., 2010). Tyto formy mohou poškodit proteiny, aminokyseliny a nukleové kyseliny (Finnegan et Chen, 2012). Zároveň reagují s lipidy, proteiny, pigmenty a nukleovými kyselinami a způsobují

peroxidaci lipidů, poškození membrány a deaktivaci enzymů, což následně ovlivňuje funkce buněk (Srivastava et al., 2005 in Singh et al., 2010).

Při nízkých koncentracích prvků v půdě, dokáže rostlina tyto kontaminanty metabolizovat nebo zlikvidovat, bez jakéhokoli ohrožení. Obecně platí, že při vysoké koncentraci kontaminantu v půdě či vodě, rostlina tyto prvky metabolizovat nedokáže, nicméně, některé druhy dokážou tyto vysoké koncentrace přežít a dokonce jim i vyhovují (Gonzaga et al., 2006).

Chaney (1985 in Száková et al., 2007) považuje za normální hladinu arsenu v rostlinách 0,01-1 mg.kg⁻¹, kdežto hodnoty 3-10 mg.kg⁻¹ jsou již fyto toxické. Rovněž bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace arsenu v rostlinách může mít vliv na snížení absorpce rostlinami vybraných mikroprvků jako je například Cu, B, Zn a Mn (Száková et al., 2007). Tu et Ma (2004) uvádějí, že arsen také ovlivňuje další prvky v rostlině. Koncentrace arsenu významně zvyšují koncentrace N, P, K, Ca a Mg např. u výhonků rostliny *Phaseolus vulgaris* L (Carbonell – Barrachina et al., 1997). Další studie potvrzují, že arsen snižuje příjem makroživin (Ca, Mg, K) a mikroprvků (B, Cu, Mn, Zn) v rajčatech (Carbonell – Barrachina et al., 1994).

3.2.6.1 Příjem arsenu rostlinou

Příjem arsenu rostlinou z půdy do rostliny je pro spousty rostlinných druhů velmi pomalý. Může se tak stát z několika důvodů, jako je např. nízká dostupnost arsenu v půdě, omezený příjem kořeny rostlin, omezená translokace arsenu z kořenů do listů a jeho relativně nízká koncentrace v rostlinném pletivu (Singh et al., 2006). Migraci arsenu ovlivňuje také zrnitostní složení, obsah volných oxidů železa, hliníku a závisí na přítomnosti a koncentraci fosforu a vápníku, který snižuje toxický účinek. V bezkyslíkatých podmínkách dochází k jeho postupné metylaci a k tvorbě toxických alkylových sloučenin (Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007). Řasy jsou v některých případech schopné metylace arsenu, což nelze o suchozemských rostlinách říci, což může být důvodem, že se v nich arsen vyskytuje v anorganické formě (Soudek et al., 2006).

Dle Bakera (1989) můžeme rostliny na základě jejich růstu v kontaminované půdě a podle jejich strategie příjmu rizikových prvků rozdělit do tří základních kategorií na exkludory, indikační rostliny a hyperakumulátory. Exkludory žijí v půdách, které jsou vysoce kontaminované, ale snižují koncentraci přijatých prvků, které transportují do kořenů. Indikační rostliny aktivně akumulují stopové prvky v tkáních a reagují na změny koncentrací

kovů v půdě. Hyperakumulátoři přijímají a přemísťují prvky do kořenů bez toxických symptomů.

Aby rostlina mohla přijmout arsen, využívá tři samostatné systémy. Prvním z nich je pasivní příjem přes apoplast, druhým je přímý transcelulární transport z přírody do rostliny pomocí cév a třetím je aktivní příjem přes symplast (Vithanage et al., 2012). Pro úspěšnou fytoremediaci arsenu musí hyperakumulátor splňovat tři kritéria. Kořeny rostlin musí být schopny arsen přijmout, dále musí být schopna translokace a akumulace arsenu ve výhoncích, které mohou být následně sklizeny a zpracovány a také musí vyvinout mechanismy k ochraně sebe sama před toxicitou způsobenou vysokými koncentracemi arsenu ve svém těle (Xie et al., 2009).

3.2.6.2 Fytotoxicita arsenu

Fytotoxicita arsenu se projevuje morfologickými změnami v rostlinách. Klíčovým ukazatelem toxicity arsenu na rostliny je jejich klíčivost. V počátečním stadiu růstu nemají dostatečně vyvinuté obranné mechanismy a jsou tak vůči arsenu zvláště citlivé. Inhibici klíčivosti můžeme zpozorovat spíše u As^{III} . V mnoha experimentech se potvrdila inhibice růstu kořene a výhonků v přítomnosti arsenu. V některých případech při nízké koncentraci arsenu došlo i ke stimulaci růstu. Dalším důležitým faktorem poukazující na toxické účinky arsenu je produkce biomasy. V některých případech mají nízké koncentrace arsenu blahodárný vliv na tvorbu biomasy, vyšší koncentrace však její tvorbu výrazně redukují a to v pořadí kořeny > stonky > klasy. Bylo potvrzeno, že arsen snižuje obsah vody v biomase, což může následně souviset s propustností cytoplasmatické membrány. Poškození membrány vede k poruše rovnováhy příjmu živin a obsahu vody v buňkách rostlin (Lešková et al., 2012). Fytotoxicitu poznáme u rostlin i díky plazmolýze pletiv kořenů a žloutnutí listů, které vede k nekróze okrajů a špiček listů (Száková et al., 2007).

Arsen může v rostlinných buňkách vyvolat oxidační stres, ten se projevuje zvýšenou koncentrací malondialdehydu (MDA) v rostlinné tkáni. MDA je metabolický produkt peroxidace lipidů v biologických membránách. Arsen také způsobuje chlorózu v listech rostlin, z důvodu indukovaného poklesu hladiny chlorofylu (Moreno – Jimenéz et al., 2012). Snížení celkového obsahu chlorofylu je první z příznaků toxicity několika kovů a metaloidů. Toto snížení je indikátorem oxidačního stresu rostliny. Arsen může mít toxický vliv na fotosyntetické pigmenty, což vede k poruchám fotosyntetického aparátu a změnám fotosyntetické kapacity, což má za následek negativní důsledky, jako je např. snížená asimilace uhlíku, poruchy v růstu, přežití a v reprodukci rostlin (Farnese et al., 2014).

Při velmi vysokých koncentracích může arsen narušovat důležité metabolické procesy, a způsobovat tak smrt rostliny (Finnegan et Chen, 2012). Jak si můžeme všimnout, příjem a akumulace arsenu v rostlinách může mít také za následek kontaminaci potravního řetězce a může představovat vážné riziko pro další jeho články (Lešková et al., 2012).

Citlivost rostlin na arsen je různá. Ze zemědělských plodin jsou na účinky arsenu nejvíce citlivé luskoviny (Száková et al., 2007).

3.3 Hyperakumulátory arsenu

Hyperakumulátory jsou rostlinné druhy, které jsou schopné akumulovat v sobě kovy v hodnotách 100x vyšších než jsou koncentrace stanovené v běžných neakumulujících rostlinách. V nynější době je popsáno asi 450 druhů rostlin, z více než 45 rostlinných čeledí, které jsou schopné hyperakumulovat těžké kovy. Nejvíce druhů je schopno akumulovat nikl (Soudek a Petrová, 2008).

Roku 1977 přišel s pojmem „hyperakumulátor“ R. R. Brooks. První rostlinou definovanou jako hyperakumulátor byla violka žlutá (*Viola calaminaria*) a penízek rolní (*Thlaspi arvense*) (Soudek et al., 2006). Jak Ma et al. (2001) tvrdí, termín hyperakumulátor znamená, že rostlina nejen toleruje vysoké koncentrace kovů, ale také akumuluje kovy ve vysokých hladinách v biomase rostlin.

Rozšíření hyperakumulátorů kovů je po světě velmi rozmanité. Většinou se jedná o endemické druhy, které jsou závislé na geologickém podloží a rostou pouze na půdách, kde bychom našli vysokou koncentraci kovů. Zároveň bychom hyperakumulátory nikdy nenalezli v místech předchozího zalednění, jelikož 10 000 let není tak dlouhá doba, nutná u daných rostlin k vývoji schopnosti hyperakumulovat těžké kovy (Brooks 1998b).

Termín hyperakumulátor byl použit pro rostliny, které akumulují více než 1000 mg kovu na kilogram sušiny. Pro arsen bylo popsáno několik hyperakumulujících rostlin, které rostly na haldách ve Velké Británii, na odpadech z hutí v severovýchodním Peru a jižním Thajsku na odpadech po těžbě cínu. Velké tolerance arsenu jsou schopny akumulovat a tolerovat rostliny z rodu *Agrostis*. Akumulují až 6640 mg.kg⁻¹ ve starých listech. *Pseudosuga taxifolia*, *Pityrogramma calomelanos* a *Pteris vittata* na kontaminované nebo mineralizované půdě mohou akumulovat až 8350 mg.kg⁻¹ arsenu. Dobrou schopnost akumulace mají také řasy, vyskytující se v říčních vodách, kde arsen dosahuje koncentrace 0,03 - 0,08 mg.kg⁻¹ jako důsledek geotermální aktivity (Soudek et al., 2006).

Hyperakumulátory disponují převážně vysokým biokoncentračním (více jak 10) a translokačním faktorem (cca 7), protože převážná část arsenu je v nich transportována z kořenů do listů (Lešková et al., 2012).

Podle Cunninghama et al. (1996) se hyperakumulující rostliny vyznačují pomalým růstem a produkcí menšího množství biomasy. Až na výjimky nenalezneme v přírodě rostlinu, která by hyperakumulovala více jak dva druhy kovů. Nejvíce kovů dokáže hyperakumulovat penízeček modravý (*Thlaspi caerulescens*), až 3 druhy kovů (zinek, olovo, kadmium). Velké tolerance arsenu jsou schopny akumulovat a tolerovat rostliny z rodu *Agrostis*.

Existuje několik mechanismů, jak rostliny tolerují vyšší koncentrace kovů nacházejících se v půdách. Množství kovu, které dokáže rostlina tolerovat je závislé nejen na genetických faktorech rostliny, ale také na vnějších vlivech okolního prostředí. Dalším důležitým faktorem míry tolerance kovů je druh rostliny a druh kovu (Baker et Brooks, 1989). Arsen přijatý kořeny hyperakumulátorů se redukuje na As^{III} a následně putuje ve volné formě do nadzemní části pomocí cévních svazků (Lešková et al., 2012). U hyperakumulátorů se nezabudovává v kořenech, ale místo toho je rychle transportován jako As^{III} xylemem do listů (Finnegan et Chen, 2012). V listech se bez dalších transformací uloží do vakuol. Ven z rostliny se tak vylučuje z kořenů a reprodukčních orgánů (Lešková et al., 2012).

Hyperakumulátory na rozdíl od netolerantních druhů dokážou přežívat v prostředí s vyšší koncentrací arsenu právě pomocí vyššího počtu antioxidantů, které ve svém těle obsahují a nižšího obsahu reaktivních forem kyslíku (Lešková et al., 2012).

Mnoho rostlin dokáže ve svých pletivech akumulovat více jak 1000 mg As/kg sušiny, avšak nemohou být klasifikovány jako hyperakumulátory, jelikož akumulace arsenu v těchto rostlinách trvá velmi pomalu a kromě toho je velká část As izolována v kořenech (Srivastava et al., 2006).

Podle Ust'aka (2001) byl proveden výzkum, při kterém se sledoval přestup arsenu z půdy do ovzduší a rostlin. Závěrem bylo zjištěno, že jednotlivé rostliny a i jejich části se zcela liší, co se týče ukládání arsenu. Nejvíce arsenu v sobě akumuloval hlávkový salát, větší množství se akumulovalo také do natě petržele, celeru a kopru. Naopak nejmenší koncentrace tohoto prvku byla nalezena v ovoci, semenech luskovin, patizonech, cuketách a okurkách. Vyšší množství obsahovaly brambory, ředkvičky, zrna obilovin a sláma obilovin. Nejvíce arsenu, jak už bylo řečeno, obsahovala listová zelenina.

3.3.1 *Pteris vittata*

Jedním z účinných hyperakumulátorů arsenu je *Pteris vittata*, objevená v centrální části Floridy. Američtí a čínští vědci zjistili, že právě křídelnice je jednou z rostlin, která dobře absorbuje arsen z půdy. Zároveň patří mezi první nalezené rostliny, které patří mezi hyperakumulátory arsenu (Drahota, 2004).

Tato kapradina patřící do čeledi *Pteridaceae* roste a je pěstována na mnoha místech, spadajících do mírného podnebí. Je mrazuvzdorná, dobře se přizpůsobuje rozdílným podmínkám, preferuje zásadité prostředí a má ráda slunná místa, což není pro kapradiny zcela typické. Řadí se mezi vytrvalé rostliny s velkým nárůstem biomasy (Soudek et al., 2006). Dle Francesconiho et al. (2002 in Fayiga et al., 2004) může její biomasa dosahovat až do výše 1,7 m.

Dle Kováře (2008) často roste na pobřežních skalách a útesech, lze ji nalézt v okolí silnic, dále na stanovištích, která jsou narušená lidskou činností a na starých zdech. Díky svému vzhledu se také často používá k dekoraci. Má krátký, šupinatý a plazivý oddenek. Řapíkaté listy mohou v některých případech dorůstat až 80 cm, na okraji jsou pilovité a koncový lístek je vždy výrazně prodloužený. Dle Drahoty (2004) dorůstá až do velikosti 90 cm, listy má dlouhé pouze 30-60 cm a široké 10-25 cm. Rozmnožuje se velmi rychle pomocí spor a oddenků.

Podle výzkumu, který probíhal v centrální Floridě, kdy bylo odebráno 14 druhů rostlin rostoucí v této kontaminované oblasti, významně akumulovala arsen pouze křídelnice. Tato rostlina akumulovala arsen úspěšně nejen z kontaminované půdy, nýbrž také z půd, kde koncentrace arsenu byla v normě. Koncentrace arsenu v biomase křídelnice byla tisícinásobně vyšší než u dalších studovaných rostlin.

K podobným výsledkům došli také čínští vědci, kteří zkoumali akumulaci arsenu u téže rostliny na opuštěném sulfidickém ložisku na jihu Číny. Místo toho, aby křídelnice díky akumulaci vysokých koncentrací arsenu strádala a trpěla nemocemi, dosahuje nebývalých rozměrů a velmi jí tento prvek prospívá (Drahota, 2004). Její schopnost přežít v půdě kontaminované jinými kovy je zatím neznámá. Pro efektivní remediaci půd s vyšším obsahem arsenu je důležité, aby křídelnice byla nejenom tolerantní k ostatním kovům, nýbrž aby byla schopná hyperakumulovat arsen z půdy v přítomnosti dalších kontaminantů (Komar, 1999).

Podle Soudka et al. (2006) z výzkumů vyplývá, že nejméně se arsenu hromadí v kořenech kapradiny, střední hodnoty lze nalézt ve stonku a nejvyšší obsahy byly zaznamenány v listech, přičemž ve starších listech bylo arsenu více než v listech mladších. V

nadzemní části křídelnice se uložilo odhadem více jak 95 % přijatého arsenu. Dále z výzkumu vyplývá, že kapradina dokáže akumulovat arsen dokonce i z oblastí, kde je arsen přítomen ve sloučeninách, a to dokonce i z těch méně rozpustných (FeAsO_4 , AlAsO_4).

V rostlině se arsen vyskytuje především v trojmocných toxických anorganických sloučeninách, pouze malé množství je přítomno v organických formách. Do anorganických sloučenin se přeměňuje již během transferu z kořenů do listů (Drahota, 2004).

Bylo zjištěno, že v *Pteris vitatta* se v listech nachází nejvíce trojmocného arsenu. Rostlina přijímá arsen převážně v pětimocné formě a následně je rostlinami konvergován na arsen trojmocný (Soudek et al., 2006).

Ačkoli je většina rostlinných druhů ovlivněná expozicí menší než je 10 mg.l^{-1} arsenu v mediu, *Pteris vitatta* a další kapradiny tolerují až 1000 mg.l^{-1} arsenu v mediu, který akumulují v listech až do 2,3 % hmotnosti jejich sušiny. I přes mimořádně schopnosti *Pteris vitatta* jsou mechanismy související s odolností a hyperakumulací rostliny na arsen nejasné (Sundaram et al., 2008).

3.3.2 *Pteris cretica*

Pteris cretica je dalším známým hyperakumulátorem arsenu (Singh et Ma, 2007). Ma et al. (2001) identifikovali tuto rostlinu jako další druh se schopností akumulovat ve své biomase vysoké hladiny arsenu. Tento druh roste převážně v horských lesích, na okrajích mýtin, narušených nebo umělých plochách a v prostředí, jako jsou například okraje silnic (Martínez et Morbelli, 2009). Odrůdy *Pteris cretica* akumulují nejvíce arsenu ve svých listech (Meharg, 2002).

3.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základní stavební složkou proteinů. Jedná se o sloučeniny, v jejichž molekule nalezneme minimálně jednu primární aminoskupinu $-\text{NH}_2$ a současně také jednu karboxylovou skupinu $-\text{COOH}$. Každá z aminokyselin má nejméně dvě ionizovatelné skupiny: karboxylovou, která může odštěpovat H^+ a aminoskupinu, která zase ionty H^+ přijímá (Holeček, 2006).

Aminokyseliny lze dělit podle jejich náboje při fyziologickém pH 7,4 na zásadité, kyselé a neutrální, přičemž do skupiny kyselých aminokyselin lze řadit kyselinu asparagovou a glutamovou, mezi zásadité pak arginin, lyzin a histidin a za neutrální aminokyseliny můžeme považovat glycin, alanin, leucin, prolin, valin, izoleucin, cystein, metionin, serin,

treonin, fenylalanin, tyrozin, tryptofan a amidy aminokyselin asparagin a glutamin (Holeček, 2006).

U rostlin, které byly vystaveny toxickým kovům, lze jednoznačně předpokládat, že se v jejich těle hromadí specifické aminokyseliny, což pro ně může mít i přínosný význam. Při vystavení rostlin toxickým kovům může docházet ke stresu rostliny, zároveň dochází k akumulaci aminokyselin, které v rostlině hrají rozdílné role, zahrnující usnadnění detoxikace a regulaci transportu jednotlivých iontů (Xu et al., 2012 in Zemanová et al., 2013). Informací o tom, že by aminokyseliny hrály roli při hyperakumulaci těžkých kovů v rostlinách je málo. Asparagin, kyselina asparagová, glutamin a kyselina glutamová hrají roli, co se týče akumulace a transportu dusíku v rostlině (Zemanová et al., 2013).

3.4.1 Alifatické dikarboxylové aminokyseliny a jejich amidy

3.4.1.1 Kyselina asparagová a asparagin

Kyselina asparagová celým názvem 2-aminobutandiová kyselina patří do skupiny neesenciálních glukoplastických aminokyselin společně s jejím amidem asparaginem (4-amid asparagové kyseliny). Ten je označován jako neutrální aminokyselina vznikající z glutaminu a kyseliny asparagové za účasti ATP a asparaginsyntetázy. Kyselina asparagová spadá mezi kyselé aminokyseliny, obsahuje disociovaný karboxyl, a tak dokáže na sebe vázat kationty a podílet se na formaci prostorového uspořádání bílkovin.

Při biosyntéze purinů a pirimidinů je velice důležitá kyselina asparagová. Kondenzací této kyseliny s amoniakem pak vzniká amid asparagin. Ten díky vodíkovým vazbám, které snadno vytváří, zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Jako donor aminoskupiny se účastní mnoha důležitých reakcí. Společně s kyselinou asparagovou zaujímají důležitou roli v metabolismu aminokyselin (Holeček, 2006).

3.4.1.2 Kyselina glutamová a glutamin

Kyselina glutamová dokáže díky zápornému náboji ovlivnit prostorové uspořádání bílkoviny a je důležitým spojovacím prvkem metabolismu aminokyselin a citrátového cyklu. Také je prekurzorem pro biosyntézu glutaminu, glutationu, prolinu a dalších látek.

Glutamin je donorem $-NH_2$ skupiny pro biosyntézu důležitých látek jako jsou pirimidiny a puriny (Holeček, 2006).

3.5 Dusík v rostlině

V rostlinách se dusík vyskytuje v anorganické formě, převážně však ve formě organické. Právě organické sloučeniny plní v rostlině řadu důležitých funkcí, jako jsou funkce stavební, transportní, zásobní a metabolické. V sušině rostlin se množství dusíku v průměru pohybuje v rozmezí 1 - 3 %, omezeně klesá pod 1 %. Zároveň je jeho množství v jednotlivých částech rostliny zcela odlišné a je různými mechanismy (genetika) regulováno. Během růstu rostliny se celkový příjem dusíku rostlinou zvyšuje, ale jeho obsah vztažený na jednotku hmotnosti sušiny rostlin klesá. To je vysvětleno zvyšováním množství celulosy, hemicelulosy a ligninu v celkové hmotnosti sušiny (Zehnálek et al., 2006).

Nedostatek ale i nadbytek tohoto prvku mají zcela zásadní vliv na růst a vývoj rostlin. Při nedostatku se na rostlinách objevují viditelné symptomy deficiencie, zahrnující růstovou depresi a žloutnutí listů. Toxický obsah dusíku má vliv nejen na vznik viditelných symptomů jako jsou nekrózy, opad listů a změna obsahu pigmentů v rostlině, ale i na snížení produkce biomasy (Zehnálek et al., 2006).

Vysoké expozice arsenem mají ostatně jako na další prvky (Mg, Zn, Fe) vliv na celkový příjem dusíku. Biologická fixace dusíku dodává vysoký podíl dusíku do biologických systémů. Bohužel vysoké hladiny arsenu v půdě výrazně snižují fixaci N_2 . As^V obecně narušují asimilaci dusíku. Arsen může mít také vliv na řada genů podílejících se na transportu dusíku (Finnegan et Chen, 2012).

Za hlavní zdroj dusíku pro rostliny jsou považovány nitrátové a amonné ionty, které jsou obsažené v půdě (Zehnálek et al., 2006). Dále Zehnálek tvrdí, že celkový obsah dusíku v ornici je 0,1 - 0,2 % a je poměrně stálý. Z toho 98 – 99 % dusíku se váže organickou formou v živočišných a rostlinných zbytcích, fulvokyselinách, huminových kyselinách a zbylých 1 - 2 % v minerální formě NO_3^- a NH_4^+ .

Příjem dusíku a jeho následný transport je regulován obsahem dusíku v rostlině a mechanismem zpětné vazby. Rychlost příjmu iontu se snižuje při zvýšení jeho obsahu v rostlině a naopak. Při přebytku v nadzemní části je transportován floémem do kořenů, kde se jeho obsah zvýší. Kořeny pak příjem tohoto iontu z vnějšího prostředí omezí. Ve floému je pak transportován ve formě sloučenin se sirnými látkami nebo organickými sloučeninami do vakuoly nebo tam, kde je jeho toxicita snížena (Zehnálek et al., 2006).

V cévním systému je transport a přemístování dusíku realizováno převážně ve formě dusičnanů a aminokyselin. Intenzita metabolismu dusíku společně s biosyntézou bílkovin rozhodují, do jaké části rostliny se dusíkatá sloučenina přemístí (Zehnálek et al., 2006).

4 Materiál a metody

4.1 Založení vegetačního pokusu

Vegetační nádobový pokus sloužící k hodnocení změn metabolismu hyperakumulujících rostlin (především změn v metabolismu dusíku a změn transportních aminokyselin) byl zrealizován katedrou agroenvironmentální chemie a výživy rostlin v pokusném skleníku na území ČZU v Praze - Suchdol. Pro pokus byli použiti zástupci dvou rostlinných druhů z rodu *Pteris*, konkrétně *Pteris vittata* a *Pteris cretica*. Tyto dva druhy jsou známými hyperakumulátory arsenu, kteří narozdíl od ostatních rostlin, dokáží ve své biomase akumulovat velice vysoké koncentrace arsenu.

Rostliny byly pěstovány v nádobách a použitou zeminou byla černozem modální z místní lokality Suchdol. V tabulce číslo 1 jsou znázorněny základní charakteristiky pokusné zeminy.

Půdní typ/subtyp	pHKCl	Corg. (%)	KVK(mmol(+)/kg)	As (mg/kg)
Černozem(CE)/modální	7,1 ± 0,3	3,1 ± 0,7	225 ± 19,5	16 ± 1,7

Pokus byl založen 16. 5. 2015. Do plastových nádob bylo odváženo 5 kg zeminy. Následně byla půda hnojena dávkou NPK. Do každé nádoby bylo přidáno automatickou pipetou ve formě NH_4NO_3 0,6 g dusíku a ve formě K_2HPO_4 0,16 g fosforu a 0,4 g draslíku. Nakonec byly nádoby kontaminovány různými koncentracemi arsenu ve formě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Celkem byly založeny 4 varianty pokusu, přičemž jedna z nich sloužila jako kontrola, obsahující 0 mg As/kg půdy. Zbylé koncentrace arsenu byly 20 mg As/kg půdy, 100 mg As/kg půdy a 500 mg As/kg půdy. Přídavek arsenu do nádob je uveden v tabulce č. 2.

Varianta	Dávka As ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Kontrola	0
As1	20
As2	100
As3	500

Zasazení rostlin do připravených nádob proběhlo dne 22. 5. 2015. Nádoby s rostlinami byly uloženy do skleníku s teplotou 24°C přes den a 20°C přes noc a pravidelně byly zalévány demineralizovanou vodou.

Během nádobového pokusu došlo celkem ke třem odběrům nadzemní biomasy rostlin. První odběr byl uskutečněn dne 25. 6. 2015, tedy po 35 dnech, druhý odběr 12. 8. 2015, po 83 dnech a poslední třetí odběr 19. 10. 2015, po 160 dnech. Varianta As3 u obou druhů rostlin při třetím odběru uhynula, a tak nemohla být odebrána.

Mezi 2. a 3. odběrem byla kontrola s *Pteris cretica* napadena mšicemi, byl použit postřik Pirimor (1g v 1 l).

4.2 Stanovení arsenu a dalších vybraných prvků

Rostlinný materiál byl rozložen na suché cestě v mineralizátoru Apion (Tessek, CZ). Alikvotní podíl ($0,5 \pm 0,05$ g) suché homogenizované biomasy byl navážen do ampulí z borosilikátového skla a rozložen ve směsi oxidačních plynů ($O_2 + O_3 + NO_x$) při 400 °C po dobu 10 hodin. Vzniklý popel byl rozpuštěn ve 20 ml 1,5% HNO_3 (v/v) (chemické čistoty, Analytika Ltd., Česká republika) a uchováván ve skleněných zkumavkách až do analýzy (Miholová et al., 1993).

Obsah vybraných prvků byl stanoven metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES, VarianVistaPro, Austrálie).

4.3 Stanovení celkového obsahu N

Ke stanovení celkového N byla užita sušina biomasy. Pro stanovení celkového N byl rostlinný materiál rozložen roztokem koncentrované H_2SO_4 (1:20 w/v) v mineralizačním bloku topného systému Kjeldatherm (Gerhardt). Vlastní analýza celkového N byla provedena Kjeldahlovou metodou na destilačním přístroji Vapodest 50s (Gerhardt).

4.4 Stanovení volných aminokyselin

Pro stanovení obsahu volných aminokyselin byly vzorky zhomogenizovány v kapalném dusíku. Volné aminokyseliny byly extrahovány z čerstvé biomasy (~0,5 g) 10 ml roztoku

metanolu a redestilované vody (7:3 v/v). Po uplynutí 24 hodin byly vzorky centrifugovány při 9 000 g po dobu 20 min. Derivatizace volných aminokyselin v supernatantu byla provedena sadou EZ:faast firmy Phenomenex (Neuberg et al., 2010).

Obsah volných aminokyselin byl měřen metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) na přístroji Hewlett-Packard 6890N/5975 MSD (Agilent Technologies, USA) s kolonou Zebron ZB-PAA-MS 10 m x 0,25 mm, která je dodávána se sadou (Pavlík et al., 2010). Pro nástřik bylo použito 1,5 - 2 μ l vzorku s poměrem 1 : 10 a v režimu split. Jako nosný plyn bylo použito helium (He, čistoty 5,0) s konstantním průtokem 1,1 ml/min. Teplotní program pece: počáteční teplota 110 °C, rampa 30 °C min⁻¹ do teploty 320 °C. Teplota inletu byla 280 °C. Podmínky detektoru MS: MS zdroj 240 °C, kvadrupól 180 °C, aux 310 °C, energie elektronů 70eV, skenování m/z v rozmezí 45-450 a frekvence 3.5scans⁻¹.

5 Výsledky

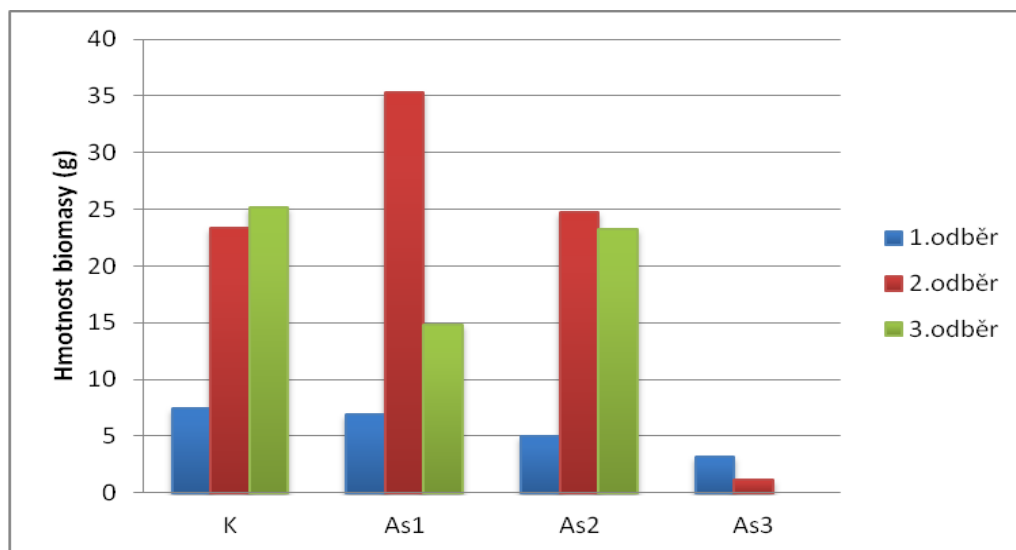
5.1 Výnos biomasy

Jako první parametr byl sledován výnos biomasy obou druhů rostlin *Pteris vittata* a *Pteris cretica* v závislosti na postupném zvyšování dávky arsenu do půdy. Jednalo se o tři opakování (n = 3) z každé varianty, přičemž výsledná hodnota reprezentuje průměr těchto tří opakování.

Odběry biomasy byly provedeny 25. 6. 2015, 12. 8. 2015 a 19. 10. 2015. U obou druhů rostlin byly hodnoceny varianty K (0 mg As/kg půdy), As1 (20 mg As/kg půdy), As2 (100 mg As/kg) a As3 (500 mg As/kg).

Ve třetím odběru u varianty As3 došlo k úhynu rostliny, proto hodnoty nemohly být hodnoceny.

Graf č. 1 – Výnos biomasy u rostliny *Pteris vittata* v závislosti na obsahu arsenu v půdě

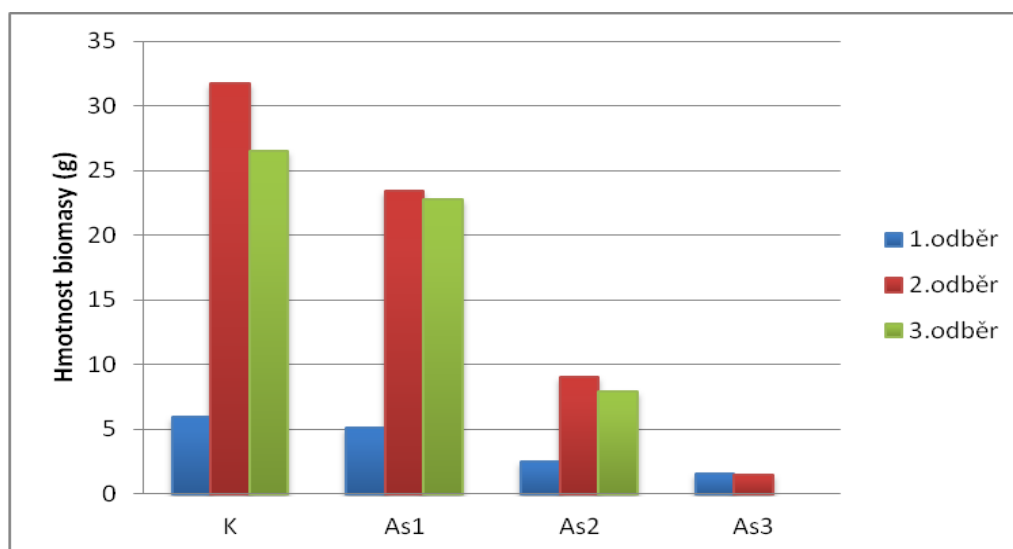


Dle grafu č. 1 je patrné, že nejvyšší produkce biomasy rostliny *Pteris vittata* byla u varianty As1 ve druhém odběru. Odpovídá to i v případě všech provedených odběrů u jednotlivých variant, kdy varianta As1 měla z celkového součtu biomasy pouze o 1 g biomasy více, než varianta K. Nejvíce biomasy narostlo vždy v době mezi prvním a druhým odběrem (neplatí pro variantu As3). Nejnižší výnos nadzemní biomasy vykazuje vždy první odběr. Vzrůstající trend hmotnosti rostlin v závislosti na vzrůstající dávce As nelze, až na variantu bez As, zpozorovat. V období mezi druhým a třetím odběrem množství biomasy vždy kleslo.

Zvyšující se dávka arsenu v půdě měla velký vliv na výnos biomasy až při 3. odběru, kdy pomalu docházelo k úhynu rostliny. Je tedy patrné, že zvyšující se dávka arsenu v půdě má na růst rostlin negativní vliv. Nelze říci, že se výnos biomasy v 1. odběru zvyšoval s rostoucí dávkou arsenu. Spíše naopak. Byla prokázána nepřímá lineární závislost, síla závislosti byla $R^2 = 0,860$. V druhém odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,862$ a ve třetím odběru byla také prokázána nepřímá lineární závislost ($R^2 = 0,801$).

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 6,8 % nižší, v dávce As2 o 32,4 % nižší a v dávce As3 o 56,8 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 50,9 % vyšší, v dávce As2 o 6 % vyšší a v dávce As3 o 94,9 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 41,3 % nižší a v dávce As2 o 7,9 % nižší.

Graf č. 2 – Výnos biomasy u rostliny *Pteris cretica* v závislosti na obsahu arsenu v půdě



Dle grafu č. 2 je patrné, že nejvyšší produkce biomasy rostliny *Pteris cretica* byla oproti kontrole u varianty As1. Nejvíce biomasy narostlo vždy v době mezi prvním a druhým odběrem. Nejnižší výnos nadzemní biomasy vykazuje vždy první odběr. Mezi 2. a 3. odběrem došlo k napadení varianty K mšicemi, jejich následkem může být lehký pokles biomasy u této varianty. V období mezi druhým a třetím odběrem množství biomasy kleslo u každé z variant. Z grafu je také vidět snižující se trend hmotnosti rostlin v závislosti na vzrůstající dávce As v půdě. Vysoká koncentrace arsenu v půdě měla velký vliv na výnos biomasy až při 3.

odběru, kdy pomalu docházelo k úhynu rostliny. U tohoto druhu je tedy patrné, že zvyšující se dávka arsenu v půdě má na růst rostlin negativní vliv. Výnos biomasy se spolu se zvyšující dávkou arsenu nezvyšoval, naopak, s vyšší dávkou arsenu klesal. Ve všech třech odběrech byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi zvyšujícím se obsahem arsenu a výnosem biomasy se silou v 1. odběru $R^2 = 0,680$; ve 2. odběru $R^2 = 0,712$; ve třetím odběru $R^2 = 0,762$.

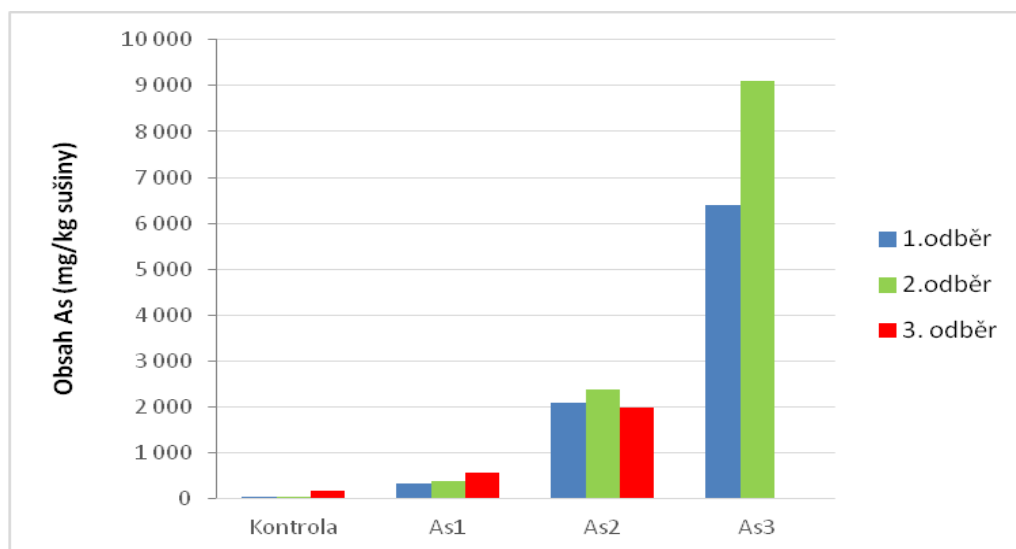
- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 15% nižší, v dávce As2 o 58,3 % nižší a v dávce As3 o 73,3 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 26,2 % nižší, v dávce As2 o 71,6 % nižší a v dávce As3 o 95,3 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl výnos sušiny v dávce As1 o 14 % nižší a v dávce As2 o 70,2 % nižší.

V porovnání *Pteris vittata* a *Pteris cretica* oba druhy měly nejmenší výnos u varianty As3, která obsahovala nejvíce arsenu. *Pteris cretica* měla větší výnos u varianty K, výnosy měly klesající trend, kdežto u *Pteris vittata* výnosy kolísaly a během odběrů se měnily.

5.2 Obsah arsenu, železa, dusíku, hořčíku

V odebrané biomase byly stanoveny obsahy arsenu, železa, dusíku a hořčíku v závislosti na postupném zvyšování dávky arsenu do půdy.

Graf č. 3 – Obsah arsenu v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

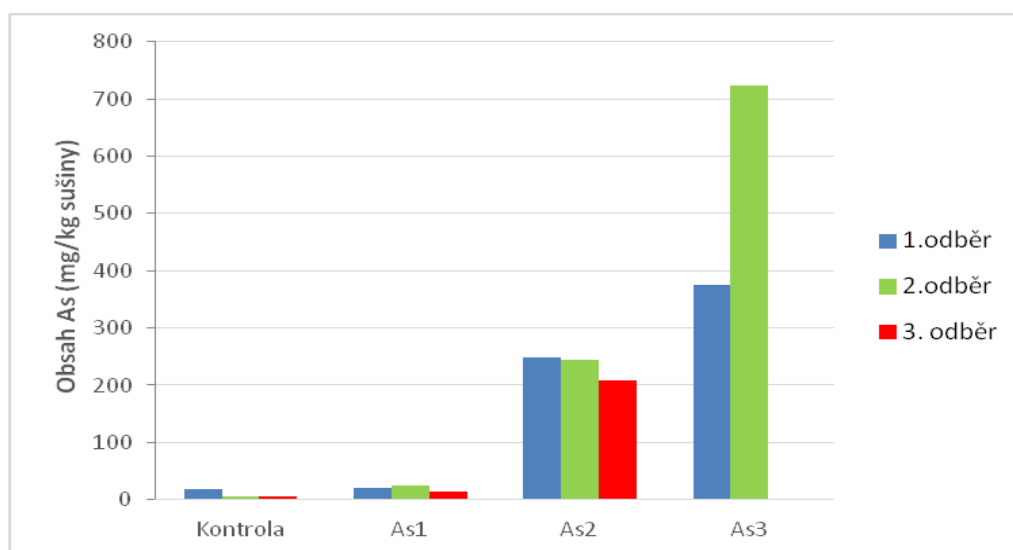


Graf č. 3 znázorňuje obsah As v nadzemní biomase rostlin v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Z grafu je zřejmé, že spolu se zvyšující se dávkou arsenu do půdy zvyšoval i arsen obsažený v biomase rostliny. Nejvyšší obsah arsenu byl zjištěn u varianty As3 (bylo změřeno enormní množství As = 9 095,6 mg As/kg sušiny), která obsahovala největší koncentraci arsenu v půdě, naopak nejméně arsenu bylo u varianty K s obsahem 0 mg As/kg půdy. Ve výsledcích je velmi patrný stoupající trend obsahu arsenu v biomase rostliny v závislosti na obsahu arsenu v půdě. Ve 3. odběru a varianty As3 je hodnota arsenu 0 mg As/kg sušiny, rostlina do třetího odběru tuto vysokou dávku arsenu nevydržela a uhynula. V biomase rostlin se koncentrace arsenu v prvním a druhém odběru lineárně zvyšovala v závislosti na zvyšujícím se obsahu arsenu dodávaného do půdy, byla zjištěna přímá lineární závislost. Síla závislosti byla v 1. odběru $R^2 = 0,983$ a ve 2. odběru = 0,996. Množství arsenu v půdě tedy lineárně ovlivňuje množství arsenu v nadzemní biomase. V třetím odběru byla prokázána minimální nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,108$.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah As v dávce As1 o 1250 % vyšší, v dávce As2 o 8834 % vyšší a v dávce As3 o 27316 % vyšší.

- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah As v dávce As1 o 782 % vyšší, v dávce As2 o 5337 % vyšší a v dávce As3 o 20666 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah As v dávce As1 o 244 % vyšší a v dávce As2 o 1137 % vyšší.

Graf č. 4 - Obsah arsenu v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě

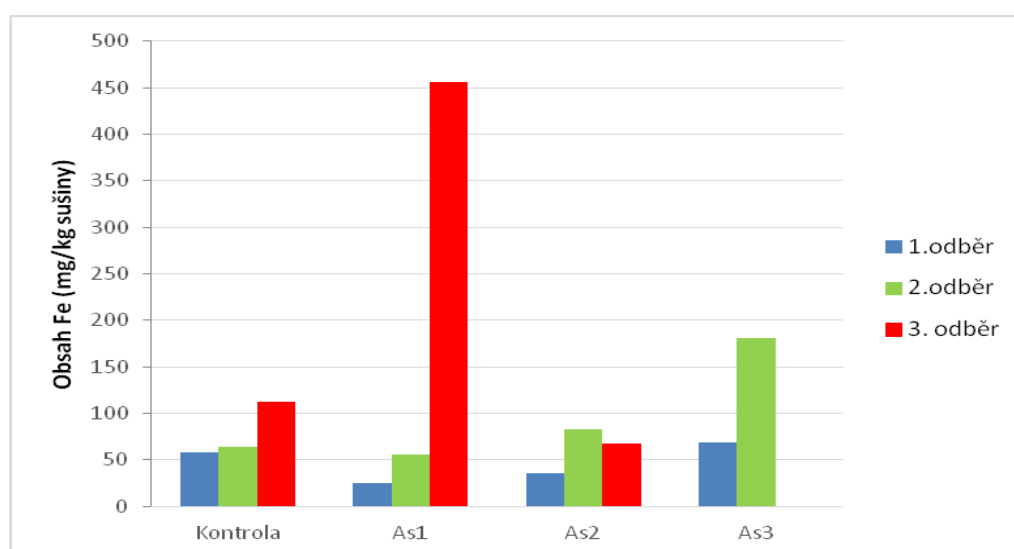


Graf č. 4 znázorňuje obsah As v nadzemní biomase rostlin v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Opět i u této rostliny je zřejmé, že se se zvyšující dávkou arsenu do půdy zvyšoval i arsen obsažený v biomase rostliny. Nejvyšší obsah arsenu byl zjištěn opět u varianty As3 v době 2. odběru, hodnota arsenu v biomase rostliny byla 723,9 mg As/kg sušiny. Ve výsledcích je velmi patrný stoupající trend obsahu arsenu v biomase rostliny v závislosti na obsahu arsenu v půdě. Ve 3. odběru a varianty As3 je hodnota arsenu 0 mg As/kg sušiny, rostlina do třetího odběru tuto vysokou dávku arsenu nevydržela a uhynula. V biomase *Pteris cretica* se koncentrace arsenu v prvním a druhém odběru lineárně zvyšovala v závislosti na zvyšujícím se obsahu arsenu dodávaného do půdy, byla tedy zjištěná přímá lineární závislost. Síla závislosti byla v 1. odběru $R^2 = 0,791$ a ve 2. odběru $= 0,978$. Množství arsenu v půdě tedy lineárně ovlivňuje množství arsenu v nadzemní biomase. Ve třetím odběru byla prokázána malá nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,040$. Je to dáno úhynem rostliny u varianty As3 ve třetím odběru.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah As v dávce As1 o 1250 % vyšší, v dávce As2 o 8834 % vyšší a v dávce As3 o 27316 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah As v dávce As1 o 782 % vyšší, v dávce As2 o 5337 % vyšší a v dávce As3 o 20666 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah As v dávce As1 o 244 % vyšší a v dávce As2 o 1137 % vyšší.

Obsah arsenu v nadzemní biomase rostlin je při srovnání obou druhů ve všech variantách i odběrech vyšší vždy u druhu *Pteris vittata*. Dokazují to výsledky, kdy u *Pteris vittata* se hodnoty pohybují v rozmezí několika tisíc mg As/kg sušiny oproti hodnotám *Pteris cretica*, u kterých hodnoty dosahují pouze několik stovek mg As/kg sušiny.

Graf č. 5 - Obsah železa v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

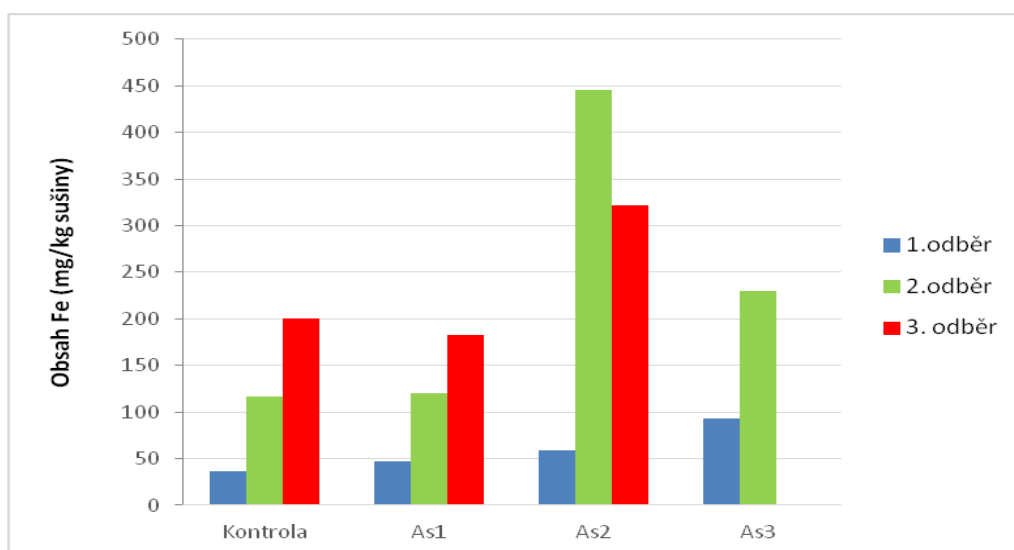


Graf č. 5 znázorňuje obsah železa v nadzemní biomase rostlin v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Nejvyšší obsah železa byl zjištěn u varianty As1 ve 3. odběru, naměřená hodnota byla oproti ostatním hodnotám velice vysoká – 455,6 mg Fe/kg sušiny. Nejméně železa bylo opět u varianty As1 v 1. odběru – 25 mg Fe/kg sušiny. Z výsledků je patrné, že obsah železa se ve všech variantách a odběrech pohybuje v podobných hodnotách (výjimka As1 1. odběr). Rozdíly v obsahu železa jsou tedy málo patrné. U varianty K a As1 se obsah železa v rostlině lineárně zvyšoval s narůstajícím počtem dnů, kdy byl pokus a odběry prováděny, nedosahoval ale hodnot jako u variant As2 a As3. U *Pteris vittata* v 1. odběru byl potvrzen nízký stupeň přímé lineární závislosti ($R^2 = 0,460$)

mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem železa v biomase. Ve druhém odběru je obsah železa ovlivněn zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě. Síla závislosti byla $R^2 = 0,990$. Ve třetím odběru byl prokázán nízký stupeň nepřímé lineární závislosti se silou $R^2 = 0,336$. Je to dáno úhynem rostliny u varianty As3 ve třetím odběru.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah Fe v dávce As1 o 56,8 % nižší, v dávce As2 o 37,5 % nižší a v dávce As3 o 19,7 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah Fe v dávce As1 o 14,4 % nižší, v dávce As2 o 28,7 % vyšší a v dávce As3 o 180 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah Fe v dávce As1 o 306,4 % vyšší a v dávce As2 o 39,3 % nižší.

Graf č. 6 - Obsah železa v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



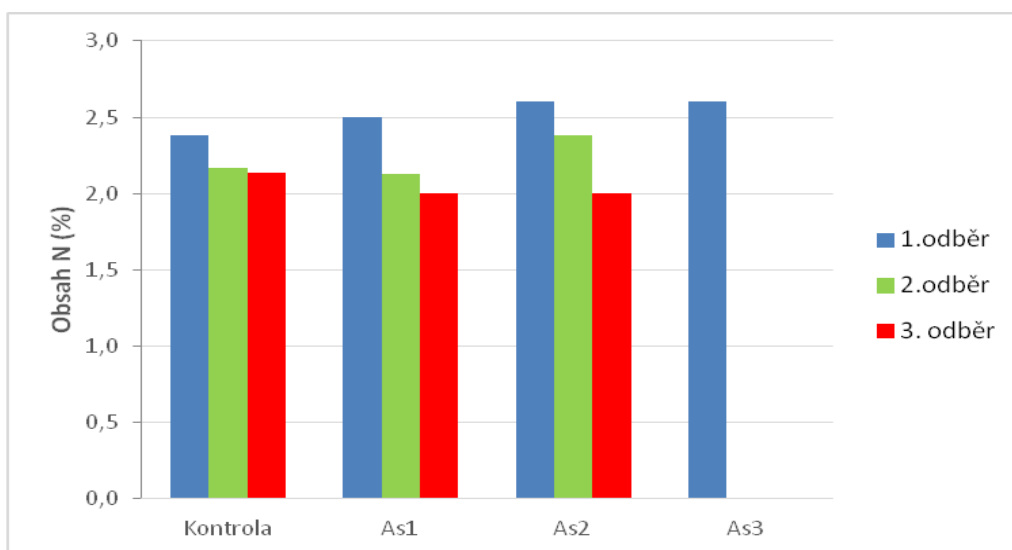
Graf č. 6 znázorňuje obsah železa v nadzemní biomase rostlin *Pteris cretica* v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Nejvyšší obsah železa byl zjištěn u varianty As2 ve 2. odběru – 446 mg Fe/kg sušiny. Nejméně železa bylo naměřeno oproti kontrole u varianty As1 v 1. odběru – 47,3 mg Fe/kg sušiny. Opět se obsah železa ve všech variantách a odběrech pohybuje v podobných hodnotách (výjimka As2 2. odběr). Rozdíly v obsahu železa jsou tedy málo patrné. Až na As2 ve druhém odběru se hodnoty železa v rostlině lineárně zvyšovaly s jednotlivými odběry, nejvíce železa tedy bylo skoro vždy ve 3. odběru. U *Pteris cretica* v 1. odběru byla potvrzena přímá lineární závislost ($R^2 = 0,956$) mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem železa v biomase. Se zvyšující se dávkou arsenu tedy stoupá obsah železa

v biomase. Ve druhém odběru není statisticky zjištělná lineární závislost. Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,621$.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah Fe v dávce As1 o 30,3 % vyšší, v dávce As2 o 62,3 % vyšší a v dávce As3 o 155,6 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah Fe v dávce As1 o 3,2 % vyšší, v dávce As2 o 282,2 % vyšší a v dávce As3 o 96,8 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah Fe v dávce As1 o 9,3 % nižší a v dávce As2 o 60,1 % vyšší.

Při srovnání obou druhů co se obsahu železa v nadzemní biomase rostlin týče, převažuje více železa v *Pteris cretica*, kde se obsahy častěji pohybují v hodnotách několika stovek mg Fe/kg sušiny, kdežto u *Pteris vittata* dosahují obsahy spíše několika desítek mg Fe/kg sušiny.

Graf č. 7 - Obsah dusíku v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

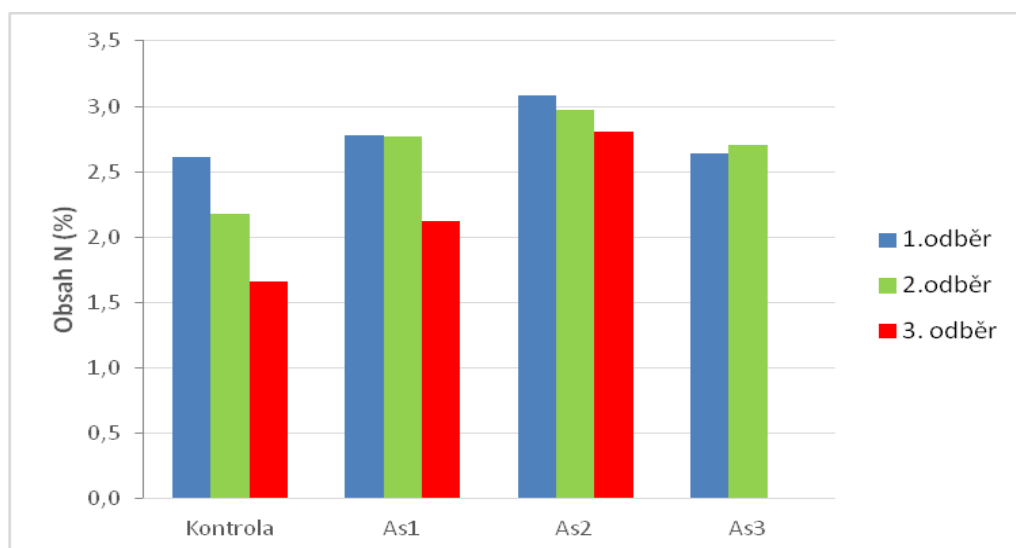


Na grafu č. 7 je znázorněn obsah dusíku (v %) v nadzemní biomase rostlin *Pteris vittata* v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Nejvyšší obsah dusíku dosahovala varianta As2 a varianta As3 v 1. odběru – 2,6 %. Nejméně dusíku dosahovala varianta As1 společně s As2 ve 3. odběru – 2 %. Celkově dosahovaly obsahy dusíku podobných hodnot, pohybovaly se v rozmezí od 2 do 2,6 %. U varianty As3 ve druhém odběru byl obsah dusíku pod hranicí detekce, nelze tedy hodnotit. Co se týče zbylých dvou variant As1 a As2, jedná se u každé varianty o lineárně klesající trend v závislosti na době odběru. U *Pteris vittata*

v 1. odběru nebyla potvrzena lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem dusíku v biomase rostliny. Ve druhém odběru je prokázána nepřímá lineární závislost ($R^2 = 0,923$). Ve třetím odběru byla prokázána také nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,981$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá obsah dusíku v biomase.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah N v dávce As1 o 4,2 % vyšší, v dávce As2 o 8,3 % vyšší a v dávce As3 také o 8,3 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah N v dávce As1 o 4,5 % nižší a v dávce As2 o 9,1 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah N v dávce As1 o 4,8 % nižší a v dávce As2 také o 4,8 % nižší.

Graf č. 8 - Obsah dusíku v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



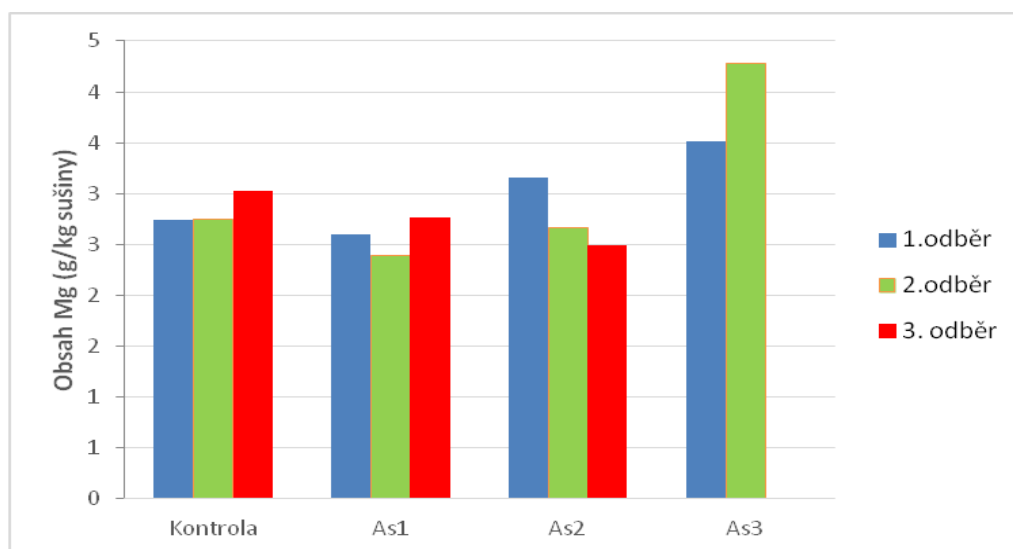
Na grafu č. 8 je znázorněn obsah dusíku (v %) v nadzemní biomase rostlin *Pteris cretica* v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Nejvyšší obsah dusíku dosahovala varianta As2 v 1. odběru – 3,1 %. Nejméně dusíku oproti kontrole dosahovala varianta As1 společně ve 3. odběru – 2,1 %. U variant As1 a As2 je vidět lineárně klesající trend v obsahu dusíku v závislosti na době odběru. Oproti variantě K bylo v ostatních variantách, obsahující As, přibližně o 0,5 % dusíku více. Mírný lineárně stoupající trend lze pozorovat u variant As1 a As2 při srovnání s variantou K. U *Pteris cretica* v 1. odběru není statisticky zjištělá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem dusíku v biomase rostliny. Ve druhém odběru také není statisticky zjištělá lineární závislost mezi

obsahem arsenu v půdě a obsahem dusíku v biomase rostliny. Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,693$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá tedy obsah dusíku v biomase *Pteris cretica* ve třetím odběru.

- Při porovnání s kontrolou v prvním odběru je obsah N v dávce As1 o 7,7 % vyšší, v dávce As2 o 19,2 % vyšší. Dávka As3 dosahuje stejných hodnot jako kontrola.
- Při porovnání s kontrolou ve druhém odběru je obsah N v dávce As1 o 27,3 % vyšší, v dávce As2 o 36,4 % vyšší a v dávce As3 o 22,7 % vyšší.
- Při porovnání s kontrolou ve třetím odběru je obsah N v dávce As1 o 1,7 % vyšší a v dávce As2 o 64,7 % vyšší.

U *Pteris cretica* bylo naměřeno o mnoho více dusíku u varianty As3 při 2. odběru, a to o 2,7 %, u *Pteris vittata* byla tato hodnota pod hladinou detekce. Nepatrně více dusíku bylo naměřeno u druhu *Pteris cretica*.

Graf č. 9 - Obsah hořčíku v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

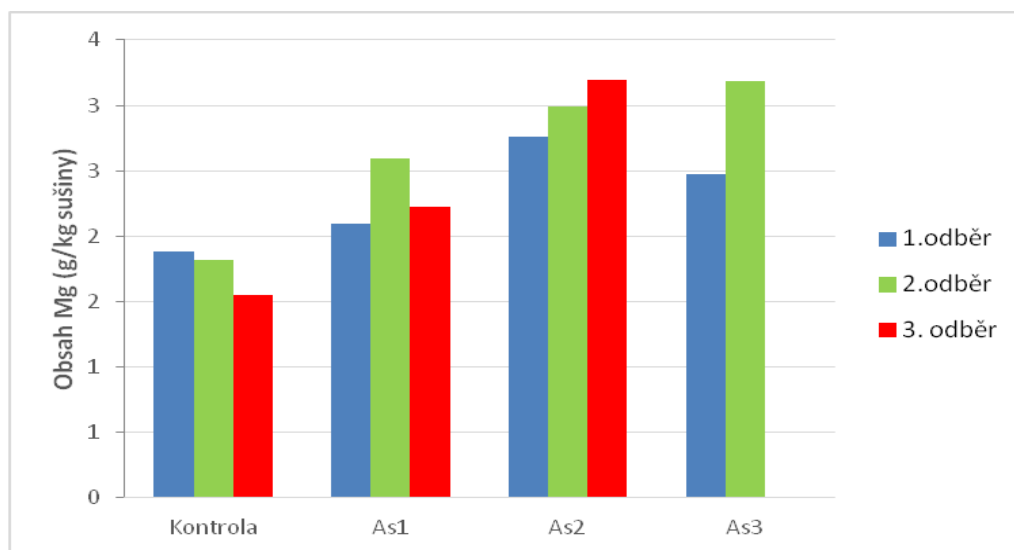


Graf č. 9 znázorňuje obsah Mg v nadzemní biomase rostlin v závislosti na koncentraci As dodávaného do půdy. Nejvyšší obsah hořčíku byl zjištěn u varianty As3 ve 2. odběru. Nejméně hořčíku obsahovala varianta As1 druhý odběr. Patrně jsou rozdíly u variant v jednotlivých odběrech. U kontroly došlo během všech odběrů k nepatrnému růstu obsahu hořčíku v biomase, u As1 při druhém odběru množství Mg kleslo, u dalšího odběru vzrostlo o 0,38 g/kg sušiny. U varianty As2 naopak zase docházelo během odběrů k mírnému poklesu a u varianty As3, kde nebyl proveden třetí odběr, došlo mezi prvním a druhým odběrem

k výraznému nárůstu obsahu Mg v biomase rostliny. U *Pteris vittata* v 1. odběru byla zjištěna přímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem hořčíku v biomase rostliny ($R^2 = 0,809$). Ve druhém odběru se také obsah hořčíku v biomase rostliny zvyšuje úměrně s vyšším obsahem arsenu dodávaného do půdy ($R^2 = 0,941$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost se silou $R^2 = 0,996$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá tedy ve 3. odběru obsah hořčíku v biomase *Pteris vittata*.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 4,8 % nižší, v dávce As2 o 15,8 % vyšší a v dávce As3 o 28,6 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 13,1 % nižší, v dávce As2 o 3,3 % nižší a v dávce As3 o 55,6 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 8,3 % nižší a v dávce As2 o 17,5 % nižší.

Graf č. 10 - Obsah hořčíku v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



Z grafu č. 10 je patrné, že obsah Mg v biomase rostliny *Pteris cretica* se měnil výrazněji, než u *Pteris vittata*. Nejvyšší obsah hořčíku byl zjištěn u varianty As2 ve 3. odběru a totéž u varianty As3 v odběru druhém. Nejméně hořčíku obsahovala varianta K třetí odběr. V těchto výsledcích je patrný významný vzrůst obsahu Mg ve variantě As2 a As3 oproti kontrole. V 1. odběru byl zjištěn nízký stupeň přímé lineární závislosti ($R^2 = 0,214$) mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem hořčíku v biomase rostliny. Ve druhém odběru byla zjištěna přímá lineární závislost ($R^2 = 0,507$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá

lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem hořčíku v biomase se silou $R^2 = 0,576$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá tedy ve 3. odběru obsah hořčíku v biomase *Pteris cretica*.

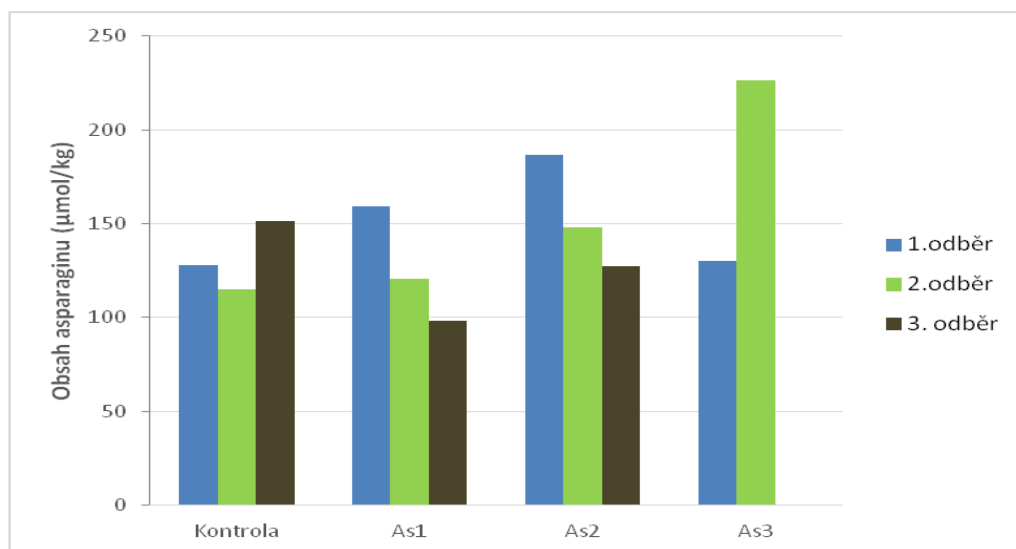
- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 11,7 % vyšší, v dávce As2 o 46,8 % vyšší a v dávce As3 o 31,9 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 43,6 % vyšší, v dávce As2 o 65,2 % vyšší a v dávce As3 o 76,2 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah Mg v dávce As1 o 43,2 % vyšší a v dávce As2 o 105,8 % vyšší.

Při porovnání *Pteris vittata* a *Pteris cretica* co se obsahu Mg týče, varianty As1 a As2 obsahovaly podobné množství hořčíku u obou rostlin. Výrazně se lišila varianta K, která byla vyšší u *Pteris vittata* a varianta As3, který byla vyšší také u *vittata*.

5.3 Obsah volných aminokyselin

Další stanovované charakteristiky byly obsahy volných aminokyselin v rostlinách v závislosti na změně obsahu arsenu v půdě. Sledovanými aminokyselinami byly základní transportní aminokyseliny: asparagin, kyselina aspartová, glutamin, kyselina glutamová.

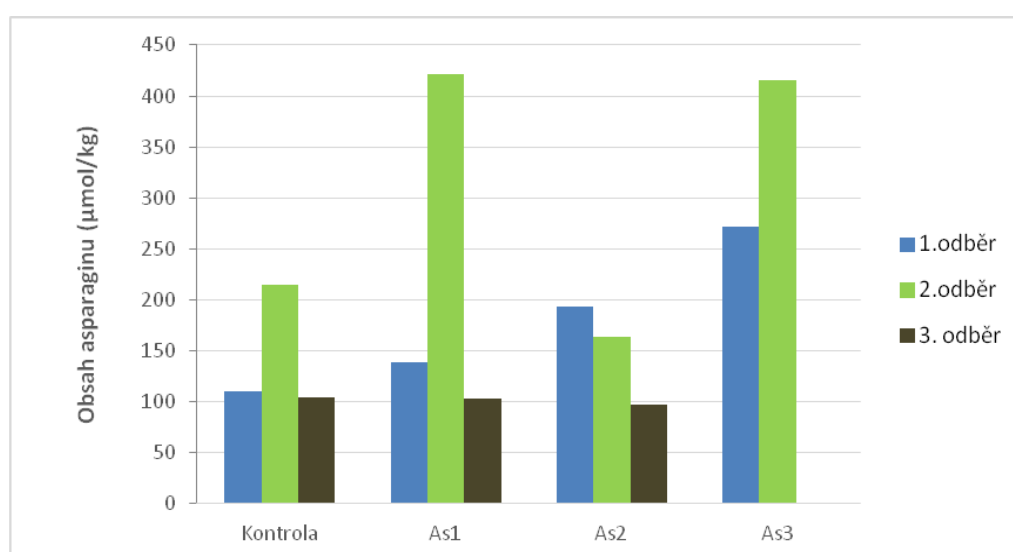
Graf č. 11 - Obsah asparaginu v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě



Graf č. 11 znázorňuje obsah asparaginu v rostlině *Pteris vittata* v závislosti na změně dávky arsenu do půdy. Nejvyšší obsah asparaginu lze nalézt u varianty As3 ve 2. odběru - 226,3 µmol/kg. Nejméně asparaginu obsahovala As1 – 98,3 µmol/kg ve 3. odběru. U variant As1 a As2 je patrné, že nejvíce asparaginu obsahoval 1. odběr, další dva odběry měly klesající trend, u kontroly bylo nejvíce asparaginu naopak v odběru třetím. Hodnoty jsou tak rozdílné, že zde není patrný vliv změny obsahu arsenu v půdě. V 1. odběru u *Pteris vittata* nebyla zjištěna přímá lineární závislost mezi zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě a obsahem asparaginu v rostlině, ale spíše závislost lineárně nepřímá ($R^2 = 0,113$). Ve druhém odběru byla zjištěna přímá lineární závislost ($R^2 = 0,990$). Obsah asparaginu se tedy lineárně zvyšoval se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě. Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem asparaginu v biomase se silou $R^2 = 0,879$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá tedy ve 3. odběru obsah asparaginu v biomase *Pteris vittata*.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 24,7 % vyšší, v dávce As2 o 46,2 % vyšší a v dávce As3 o 2,1 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 5 % vyšší, v dávce As2 o 28,7 % vyšší a v dávce As3 o 97 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 35,1 % nižší a v dávce As2 o 16 % nižší.

Graf č. 12 - Obsah asparaginu v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



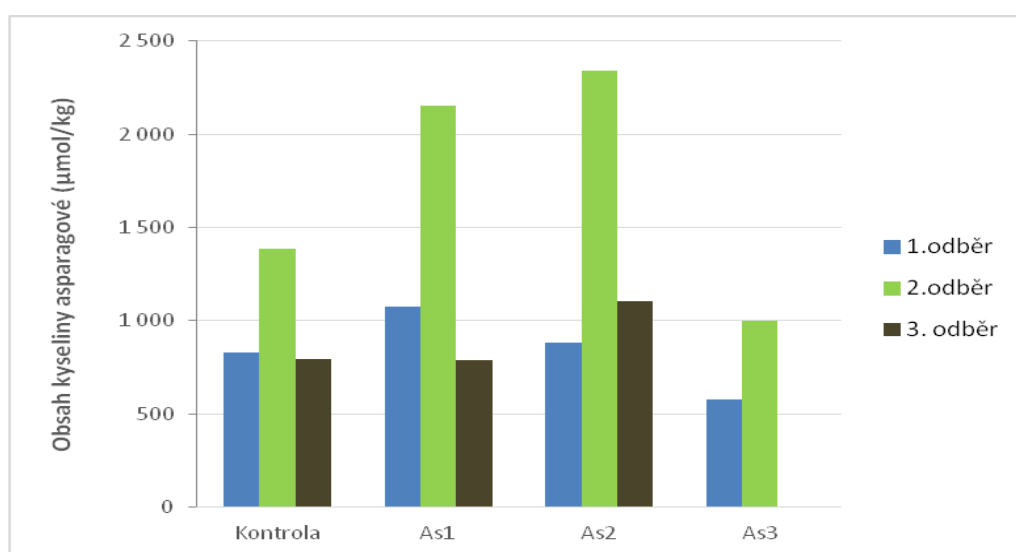
Graf č. 12 znázorňuje obsah asparaginu v rostlině *Pteris cretica* v závislosti na změně dávky arsenu do půdy. Nejvyšší obsah asparaginu lze nalézt u varianty As1 ve 2. odběru – 421,5 µmol/kg, a dále u varianty As3 – 415,5 µmol/kg, také ve 2. odběru. Nejméně asparaginu obsahovaly všechny tři varianty ve 3. odběru – hodnoty kolísaly od 97,5 µmol/kg do 103,6 µmol/kg. Menších hodnot také dosahovaly u K a As1 první odběry. V 1. odběru u *Pteris cretica* byla zjištěna přímá lineární závislost mezi zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě a obsahem asparaginu v rostlině ($R^2 = 0,911$). Obsah asparaginu se tedy s vyšším obsahem arsenu zvyšoval. Ve druhém odběru byl zjištěn nízký stupeň přímé lineární závislosti ($R^2 = 0,221$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem asparaginu v biomase se silou $R^2 = 0,982$. Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesá tedy ve 3. odběru obsah asparaginu v biomase *Pteris cretica*.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 26,2 % vyšší, v dávce As2 o 75,7 % vyšší a v dávce As3 o 146,3 % vyšší.

- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 96,8 % vyšší, v dávce As2 o 23,4 % nižší a v dávce As3 o 94 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah asparaginu v dávce As1 o 0,4 % nižší a v dávce As2 o 5,9 % nižší.

Z výsledků je patrné, že vyšších výkyvů v hodnotách asparaginu dosahovala *Pteris cretica*. *Pteris vittata* měla výsledky vyrovnanější bez větších výkyvů.

Graf č. 13 - Obsah kyseliny asparagové v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě



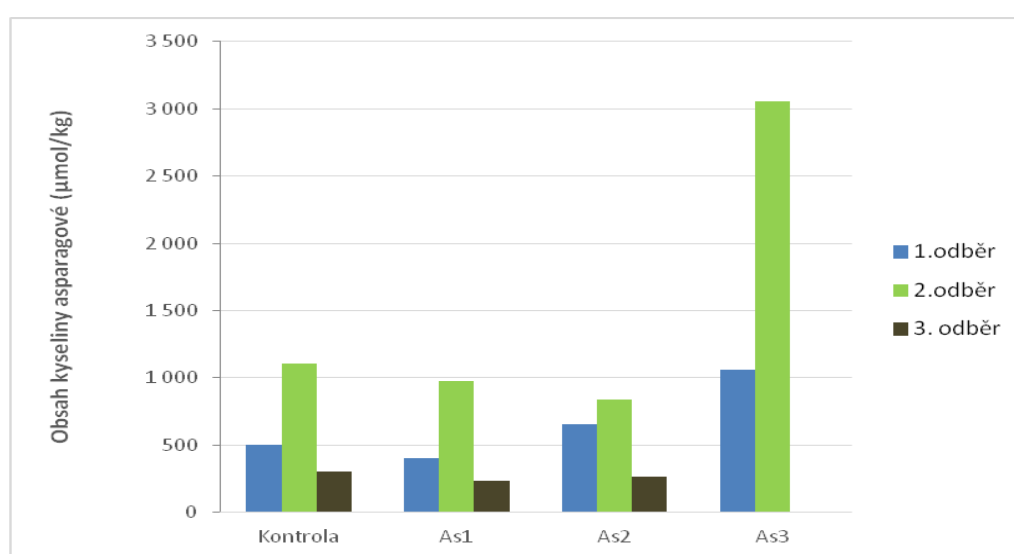
Graf č. 13 znázorňuje obsah kyseliny asparagové v rostlině *Pteris vittata* v závislosti na změně dávky arsenu do půdy. Nejvyšší obsah této kyseliny lze nalézt u varianty As2 ve 2. odběru – 2343 µmol/kg. Nejméně kyseliny asparagové obsahovala As3 – 576,4 µmol/kg v 1. odběru. Velké výkyvy nastaly vždy u druhého odběru. V 1. odběru u *Pteris vittata* byla zjištěna nepřímá lineární závislost mezi zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny asparagové v rostlině ($R^2 = 0,732$). Obsah kyseliny asparagové se tedy s vyšším obsahem arsenu snižoval. Ve druhém odběru byl zjištěn nízký stupeň nepřímé lineární závislosti ($R^2 = 0,423$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny asparagové v biomase se silou $R^2 = 0,768$.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 29,2 % vyšší, v dávce As2 o 5,9 % vyšší a v dávce As3 o 30,6 % nižší.

- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 55,1 % vyšší, v dávce As2 o 68,9 % vyšší a v dávce As3 o 27,9 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 0,9 % nižší a v dávce As2 o 39,1 % vyšší.

Není zde patrný vliv zvyšující se dávky arsenu do půdy na obsah kyseliny asparagové v rostlině.

Graf č. 14 - Obsah kyseliny asparagové v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



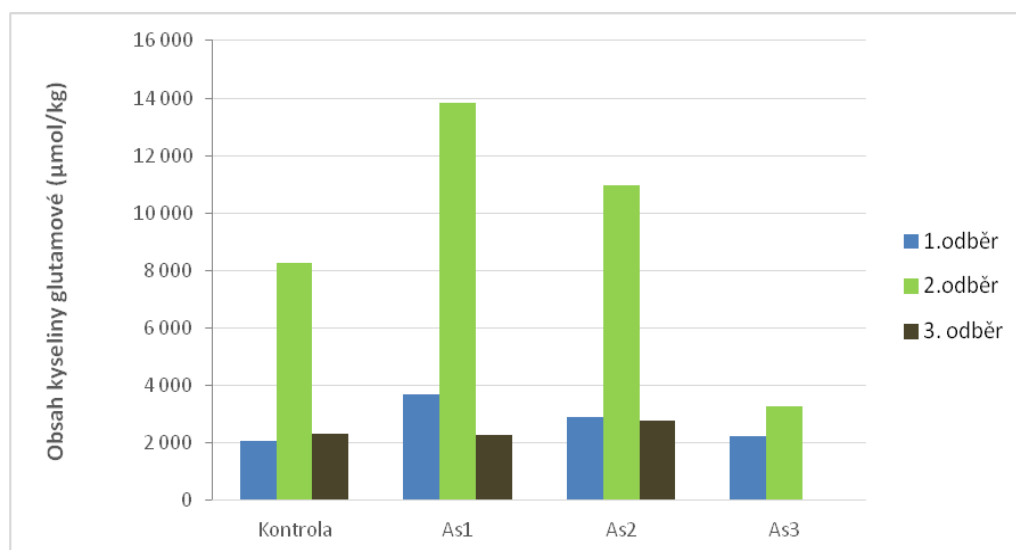
Na grafu č. 14 je znázorněn obsah kyseliny asparagové v rostlině *Pteris vittata* v závislosti na změně dávky arsenu do půdy. Nejvyšší obsah této kyseliny lze nalézt u varianty As3 ve 2. odběru – 3055,4 µmol/kg. Nejméně kyseliny asparagové obsahovala As1 – 233,6 µmol/kg ve 3. odběru. U varianty As3 je značný veliký výkyv ve druhém odběru. Celkově nejvíce kyseliny obsahovaly u všech variant druhé odběry. U třetích odběrů došlo k velmi patrnému poklesu. V 1. odběru u *Pteris cretica* se obsah kyseliny asparagové se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě lineárně zvyšoval ($R^2 = 0,943$), existuje tu přímá závislost. Ve druhém odběru existuje také přímá závislost, obsah kyseliny asparagové se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě také lineárně zvyšoval ($R^2 = 0,920$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny asparagové v biomase se silou $R^2 = 0,942$.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 19,6 % nižší, v dávce As2 o 31,7 % vyšší a v dávce As3 o 111,6 % vyšší.

- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 12,1 % nižší, v dávce As2 o 24,6 % nižší a v dávce As3 o 175,6 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 23,1 % nižší a v dávce As2 o 12,8 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 19,6 % nižší, v dávce As2 o 31,7 % vyšší a v dávce As3 o 111,6 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 12,1 % nižší, v dávce As2 o 24,6 % nižší a v dávce As3 o 175,6 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah kyseliny asparagové v dávce As1 o 23,1 % nižší a v dávce As2 o 12,8 % nižší.

Vyšší obsahy kyseliny asparagové byly jednoznačně u *Pteris vittata*. U tohoto druhu byly také vždy ve druhém odběru zaznamenány vyšší výkyvy hodnot.

Graf č. 15 - Obsah kyseliny glutamové v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

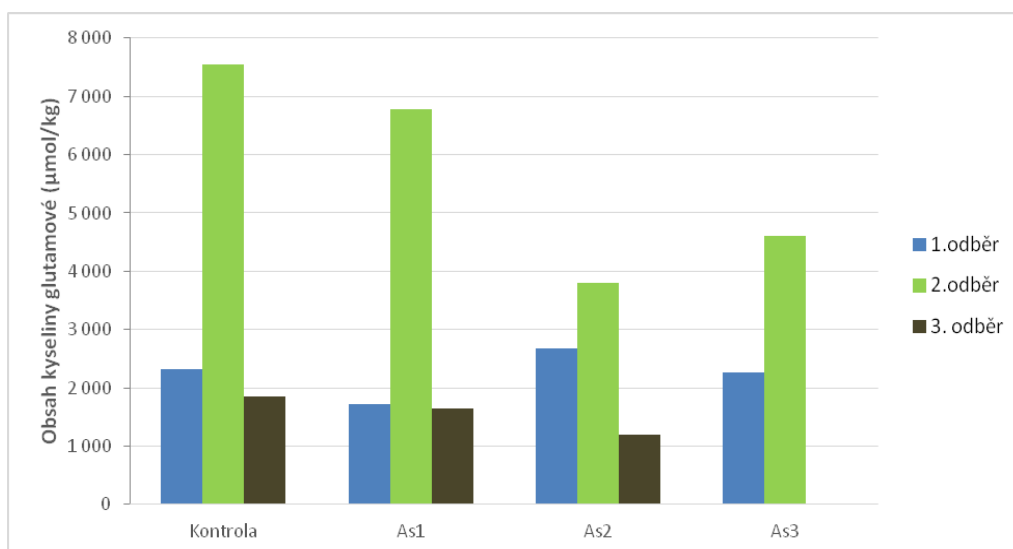


Změny obsahu kyseliny glutamové v *Pteris vittata* znázorňuje graf č. 15. Nejvyšší hodnoty dosáhla varianta As1 ve 2. odběru, a to 13 827,4 µmol/kg. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u třetích odběrů varianty K, As1 a As2. Z výsledků je patrné, že nejvyšší obsahy kyseliny glutamové byly naměřeny vždy ve druhém odběru všech variant, u variant K, As1, As2 tyto obsahy dosahovaly hodnot několik desítek tisíc µmol/kg. První a třetí odběry každé varianty byly vyrovnané. V 1. odběru u *Pteris vittata* nebyla statisticky zjištěná lineární

závislost. Ve druhém odběru byla zjištěna nepřímá lineární závislost, obsah kyseliny glutamové se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě snižoval ($R^2 = 0,693$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny glutamové v biomase se silou $R^2 = 0,866$.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 76,6 % vyšší, v dávce As2 o 40,2 % vyšší a v dávce As3 o 6,9 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 67,1 % vyšší, v dávce As2 o 32,5 % vyšší a v dávce As3 o 60,5 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 2,1 % nižší a v dávce As2 o 20,9 % vyšší.

Graf č. 16 - Obsah kyseliny glutamové v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě

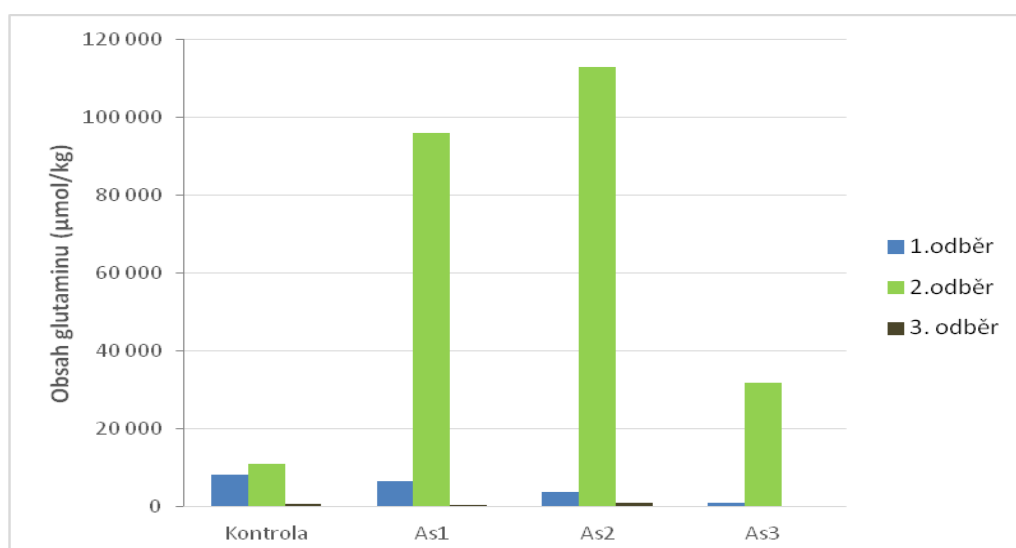


Z grafu č. 16 vyplývá, že nejvyšší obsahy kyseliny glutamové u *Pteris cretica* dosahovaly stejně jako u *Pteris vittata* 2. odběry všech variant. Jednoznačně nejvyšší obsah kyseliny glutamové byl naměřen u 2. odběr varianty K, a poté u varianty As1. Naopak nejméně kyseliny obsahoval 3. odběr varianty As2. Opět jsou zde velké výkyvy mezi prvním a druhým odběrem všech variant. U *Pteris cretica* v 1. odběru nebyla statisticky prokázána lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny glutamové v biomase. Ve druhém odběru byl prokázán nízký stupeň nepřímé závislosti ($R^2 = 0,325$). Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny glutamové v biomase rostliny se silou $R^2 = 0,977$.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 25,8 % nižší, v dávce As2 o 15,5 % vyšší a v dávce As3 o 2,4 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 10,2 % nižší, v dávce As2 o 49,7 % nižší a v dávce As3 o 39,1 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah kyseliny glutamové v dávce As1 o 10,9 % nižší a v dávce As2 o 35,4 % nižší.

Více kyseliny glutamové bylo naměřeno u *Pteris vittata*. U obou druhů vyšších obsahů dosahovaly vždy druhé odběry všech variant.

Graf č. 17 - Obsah glutaminu v biomase rostliny *Pteris vittata* v závislosti na dávce arsenu v půdě

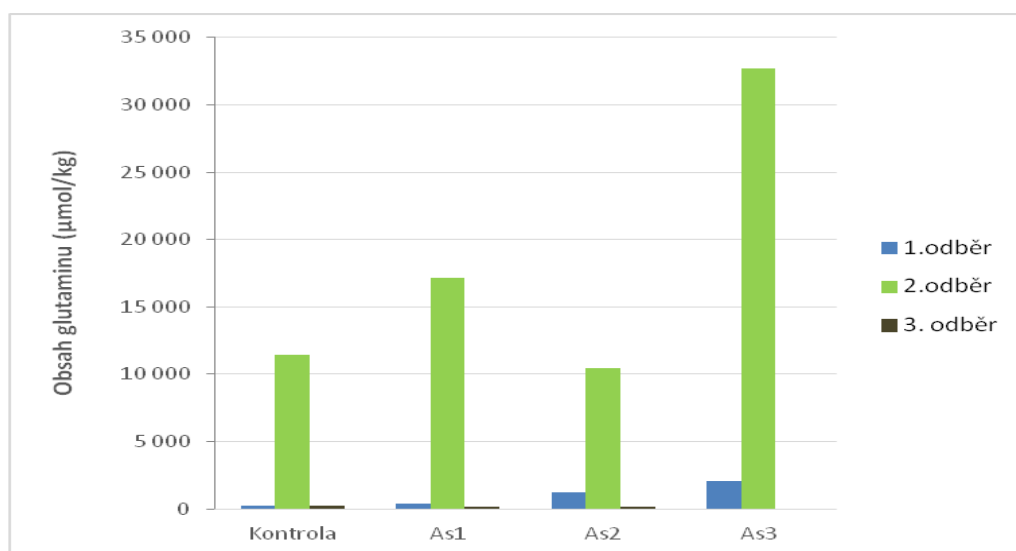


Obsah glutaminu v *Pteris vittata* je porovnáván na grafu č. 17. Jeho největší obsah byl naměřen u varianty As2 ve 2. odběru – celých 113 058,9 µmol/kg. Opět, jako u ostatních sledovaných aminokyselin byly největší obsahy zjištěny ve druhých odběrech všech variant. U prvních odběrů byl obsah glutaminu pouze v rozmezí 931,6 – 8 241,3 µmol/kg, kdežto druhé odběry dosahovaly až několika deseti tisícových hodnot. Nejméně glutaminu celkově obsahovaly 3. odběry všech variant, tam byly hodnoty řádově kolem 1000 µmol/kg. Oproti druhým odběrům to byl veliký skok. V 1. odběru u *Pteris vittata* se obsah glutaminu se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě snižoval ($R^2 = 0,825$), existuje tu nepřímá závislost. Ve druhém odběru nebyla statisticky prokázána lineární závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem glutaminu v biomase rostliny. Ve třetím odběru byla prokázána nepřímá lineární

závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem glutaminu v biomase se silou $R^2 = 0,664$. Obsah glutaminu v biomase se tak se vzrůstajícím obsahem arsenu v půdě snižoval.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 20,2 % nižší, v dávce As2 o 54,4 % nižší a v dávce As3 o 88,7 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 764,6 % vyšší, v dávce As2 o 916,4 % vyšší a v dávce As3 o 187,3 % vyšší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 40 % nižší a v dávce As2 o 19,4 % vyšší.

Graf č. 18 - Obsah glutaminu v biomase rostliny *Pteris cretica* v závislosti na dávce arsenu v půdě



Obsah glutaminu u *Pteris cretica* je znázorněn na grafu č. 18. Jako u předešlého druhu, nejvíce glutaminu obsahovaly druhé odběry všech variant, přičemž nejvíce ho bylo u variant As3 – 32 712,4 µmol/kg. Méně glutaminu pak bylo naměřeno v 1. odběrech a nejméně ho obsahovaly 3. odběry, kdy nebylo ani u jedné varianty naměřeno více jak 1000 µmol/kg glutaminu. V 1. odběru u *Pteris cretica* se obsah glutaminu se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě lineárně zvyšoval ($R^2 = 0,870$), existuje tu přímá závislost. Ve druhém odběru existuje také přímá závislost, obsah glutaminu spolu se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě se také lineárně zvyšoval ($R^2 = 0,842$). Ve třetím odběru nebyla statisticky prokázána lineární závislost.

- Ve srovnání s kontrolou v prvním odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 25,8 % nižší, v dávce As2 o 15,5 % vyšší a v dávce As3 o 2,4 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve druhém odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 10,2 % nižší, v dávce As2 o 49,7 % nižší a v dávce As3 o 39,1 % nižší.
- Ve srovnání s kontrolou ve třetím odběru byl obsah glutaminu v dávce As1 o 10,9 % nižší a v dávce As2 o 35,4 % nižší.

Ve srovnání s *Pteris vittata* lze konstatovat, že více glutaminu bylo obsaženo právě v *Pteris vittata*. U obou druhů bylo nejméně glutaminu naměřeno ve 3. odběrech, více pak v 1. odběrech. U *Pteris vittata* byl glutamin hojně obsažen ve variantě As1 a As2, kdežto u *Pteris cretica* spíše ve variantě As1 a více pak ve variantě As3.

6 Diskuze

Kontaminace arsenem se stále častěji stává globálním problémem, vzhledem ke stálému narůstání znečištění vod, půdy a zemědělských plodin v mnoha oblastech světa (Tripathi a Srivastava, 2007). Jako alternativní technologie k nápravě a obnově životního prostředí byla navržená fytoremediace, použití rostlin pro sanaci kontaminované půdy arsenem.

Vysoká produkce rostlinné biomasy je klíčovým faktorem k použití jednotlivých druhů rostlin pro fytoremediaci. Biomasa může být použita jako indikátor celkového zdravotního stavu *Pteris vittata* rostoucí na kontaminované půdě (Fayiga et al., 2004). V experimentu Fayiga et al. (2004) *Pteris vittata* splňuje veškeré charakteristiky pro použití k fytoremediaci. V pokusu Tu et al. (2005) došlo při koncentraci 50 mg As/kg půdy k nárůstu biomasy *P. vittata* až o 107 %. Po 12 týdnech růstu (při koncentraci 50 a 100 mg As/kg půdy) vyprodukovala *P. vittata* více nadzemní biomasy než *P. vittata* rostoucí na nekontaminované půdě. To potvrzuje i tento pokus, při kterém měla *P. vittata* nejvyšší výnos biomasy u kontaminace arsenem 20 mg As/kg půdy a 100 mg As/kg půdy. U zbylých variant nebyl nárůst biomasy až takový. Značný nárůst biomasy potvrzuje i Soudek et al. (2006).

Tu et al. (2005) potvrzují, že ve skutečnosti může být pro *P. vittata* kontaminace arsenem, do jisté výše prospěšná. Také dodávají, že pokud koncentrace arsenu v půdě dosáhne 200 mg As/kg půdy, dojde k poklesu výnosu biomasy. To opět potvrzuje tento pokus, kdy při stále se zvyšujících koncentracích arsenu dochází k menšímu výnosu biomasy *P. vittata*. Zvyšující se dávka arsenu v půdě měla negativní vliv na výnos biomasy až při 3. odběru (500 mg As/kg půdy), kdy pomalu docházelo k úhynu rostliny. Z výsledků je patrné, že zvyšující se dávka arsenu v půdě měla v našem případě na růst rostlin negativní vliv. V 1. odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost ($R^2 = 0,860$). V druhém odběru byla prokázána nepřímá lineární závislost ($R^2 = 0,862$) a ve třetím také ($R^2 = 0,801$). *P. cretica* měla nejvyšší výnos biomasy při růstu na nekontaminované půdě (0 mg As/kg půdy). Z výsledků je vidět snižující se trend hmotnosti rostlin v závislosti na vzrůstající dávce As v půdě, zvyšující se množství arsenu mělo na výnos biomasy negativní vliv. U tohoto druhu je tedy patrné, že zvyšující se dávka arsenu v půdě má na růst rostlin negativní vliv. Výnos biomasy se spolu se zvyšující dávkou arsenu nezvyšoval, naopak, s vyšší dávkou arsenu klesal. Při nejvyšší dávce arsenu rostlina uhynula. Ve všech třech odběrech byla prokázána nepřímá lineární závislost mezi zvyšujícím se obsahem arsenu a výnosem biomasy se silou v 1. odběru $R^2 = 0,676$, ve 2. odběru $R^2 = 0,705$, ve třetím odběru $R^2 = 0,756$. Vyšších výnosů dosahovala *Pteris vittata*. Možným vysvětlením pro snížení rostlinné biomasy při extrémně

vysokých koncentracích arsenu v půdě, může být souvislost s růstem rostliny a vysokou akumulací arsenu ve svém těle, protože rostlina musí použít energii na to, aby se vypořádala s vysokými koncentracemi arsenu v tkáních (Cao et al., 2004).

Pteris vittata a *Pteris cretica* jsou známými hyperakumulátory arsenu, mající schopnost akumulovat více jak 1000 mg As/kg ve své biomase (Wang et al., 2006). Akumulace kovů v rostlině je často doprovázena vyvoláním různých buněčných změn, z nichž některé přímo přispívají k růstu rostliny. U *Pteris vittata* došlo se zvýšenou koncentrací arsenu v půdě k hojnému růstu výhonků, kořenů a listů (Singh et al., 2010). To potvrdil i vegetační pokus. U druhu *Pteris vittata* bylo naměřeno více jak 1000 mg As/kg sušiny. U obou druhů *Pteris vittata* a *Pteris cretica* došlo se zvyšující se dávkou arsenu v půdě k vyšší koncentraci arsenu v rostlinách. U *Pteris vittata* byla zjištěna přímá lineární závislost, dávka arsenu v půdě tedy ovlivnila koncentraci arsenu v biomase rostlin, v 1. odběru $R^2 = 0,983$, ve 2. odběru $= 0,996$. U *Pteris cretica* byla také zjištěná přímá lineární závislost. Síla závislosti byla v 1. odběru $R^2 = 0,791$ a ve 2. odběru $= 0,978$. K podobným výsledkům došel i pokus Zhao et al. (2002), kde byly použité podobné koncentrace arsenu. Koncentrace arsenu se v listech všech testovaných druhů rodu *Pteris* lineárně zvyšovaly se vzrůstajícími koncentracemi arsenu přidávaného do půdy. Koncentrace arsenu v listech při koncentraci arsenu v půdě 500 mg As/kg půdy dosáhly hodnot 6200 až 7600 mg As/kg sušiny. Nebyl zde zaznamenán žádný rozdíl mezi druhy, co se týče hyperakumulace arsenu v listech rostlin. V tomto pokusu byl zaznamenán rozdíl v množství arsenu naakumulovaného v rostlině. Zatímco u *Pteris vittata* dosahovala akumulace u varianty As3 (500 mg As/kg půdy) ve druhé odběru necelých 10 000 mg As/kg sušiny, u *Pteris cretica* to bylo pouze necelých 800 mg As/kg sušiny. Akumulaci arsenu v rostlině při vyšších dávkách arsenu do půdy potvrzují i Singh et Ma (2006).

Tu et Ma (2002) zároveň ale dodávají, že při vyšší koncentraci arsenu dodávaného do půdy (> 500 mg As/kg půdy) může mít arsen na rostlinu toxický vliv. V pokusu Singh et al. (2009 in Pavlík, 2010) došlo při koncentraci As 300 mg /kg půdy k příznakům nekróz na listech a kořenech druhu *Pteris ensiformis*. Toto tvrzení je evidentní i z pokusu, kdy varianty As3 (500 mg As/kg půdy) obou druhů po 160 dnech od založení pokusu uhynuly. Ze všech kapradin má arsen na *Pteris vittata* a *Pteris cretica* nejmenší vliv co se týče toxicity (Luongo a Ma, 2005). Schopnost druhu *Pteris vittata* akumulovat ve své biomase vysoké koncentrace arsenu potvrzují i ostatní autoři (Lešková et al., 2012; Gonzaga et al., 2006; Ma et al., 2001, Luongo a Ma, 2005). Luongo a Ma (2005) uvádějí, že ze všech 13 kapradin, které studovali, nejvíce arsenu ve své biomase akumuluje *Pteris vittata* a poté *Pteris cretica*. Tento pokus

potvrzuje, že *Pteris vittata* je nejúčinnějším hyperakumulátorem, *Pteris cretica* ve své biomase akumulovala mnohem méně arsenu. Soudek et al. (2006) dále uvádějí další významné hyperakumulátory arsenu (rostliny z rodu *Agrostis*, kapradina *Pityrogramma calomelanos*) se schopností akumulovat a tolerovat vysoké hodnoty arsenu v rozmezí 6640 – 8350 mg As/kg sušiny. *Pityrogramma calomelanos* dokonce prosperuje na půdě kontaminované arsenem daleko lépe než *Pteris vittata*. Srivastava et al. (2005 in Singh et al., 2010) uvádějí, že veškeré enzymatické a neenzymatické procesy hrají důležitou roli v akumulaci a detoxifikaci arsenu. Zatímco enzymy hrají důležitou roli, když je rostlina vystavená nízkým koncentracím arsenu, molekulární antioxidanty jsou důležitější při vyšších expozicích arsenem. Při koncentracích arsenu < 50 mg/kg, byly vyšší koncentrace As nalezeny v mladých listech, zatímco při vysokých koncentracích arsenu v půdě > 550 mg/kg se více arsenu akumulovalo ve starších listech (Tu et Ma, 2002). Dále Tu et Ma (2002) dodávají, že při nízkých hladinách arsenu v půdě je tento prvek přednostně transportován do aktivně rostoucích částí (mladé listy) rostliny. Při dostatečně vysokých hladinách arsenu v půdě je arsen translokován do všech listů s menší preferenční diskriminací listů ostatních, což vede k vyšším koncentracím As ve starších listech. Tomuto tvrzení odpovídá i tento pokus, ve kterém byly nejvyšší koncentrace arsenu (při koncentraci As v půdě 500 mg/kg) naměřeny vždy u 3. odběrů, tedy po 160 dnech růstu, kdežto v mladších listech (1. a 2. odběr) bylo arsenu méně.

Pteris vittata dokáže akumulovat arsen z půdy i v přítomnosti dalších kovů, které snižují jeho akumulační schopnost (Fayiga et al., 2004). Ve Velké Británii na různých místech těžby byla zjištěna významná korelace mezi arsenem a železem v mnoha rostlinách tolerantních k arsenem. U hyperakumulátorů lze celkově říci, že příjem železa a arsenu na sobě může být závislý (Porter et Peterson, 1975). Tu et Ma (2002) uvádějí, že vyšší koncentrace arsenu redukuje koncentrace železa ve všech listech. V tomto pokusu u *Pteris vittata* se obsah železa v rostlině na základě zvyšující se dávky As lehce zvyšoval jen v 1. odběru ($R^2 = 0,460$) a více poté ve 2. odběru ($R^2 = 0,990$). Ve 3. odběru obsah železa klesal ($R^2 = 0,336$). U *Pteris cretica* v 1. odběru se obsah železa díky zvyšujícímu se množství arsenu v půdě zvyšoval ($R^2 = 0,956$). Ve 2. odběru tato závislost potvrzena nebyla. Ve 3. odběru se obsah železa snižoval s vyšší dávkou arsenu ($R^2 = 0,621$). Skoro ve všech odběrech byly vyšší obsahy železa zjištěny u *Pteris cretica*. Cao et al. (2004) uvádějí, že mladé listy obsahují více železa než listy starší, což náš pokus potvrzuje. Podle Marschnera (1995) jsou mikroprvky spojeny s různými enzymovými systémy a jsou považovány za

meziprodukty při mobilitě. Proto se železo častěji u rostlin hromadí více v mladších listech, než ve starších.

V pokusu Cao et al. (2004) byl sledován vliv zvyšujícího se množství arsenu v půdě na koncentraci hořčíku v biomase *Pteris vittata*. Koncentrace hořčíku v každé části rostliny většinou v přítomnosti As poklesla. Mladé listy obsahovaly nižší koncentrace Mg než listy starší. Hořčík se koncentroval především v kořenech. V našem pokusu se u *Pteris vittata* množství hořčíku se zvyšující dávkou arsenu zvyšovalo v 1. odběru ($R^2 = 0,809$) a ve 2. odběru ($R^2 = 0,941$). Ve 3. odběru došlo k poklesu množství Mg ($R^2 = 0,996$). U *Pteris cretica* se množství hořčíku v 1. odběru mírně zvyšovalo s vyšší koncentrací arsenu v půdě. Ve druhém odběru byla potvrzena přímá lineární závislost ($R^2 = 0,507$). Ve třetím odběru na základě zvyšujícího se obsahu arsenu v půdě klesl obsah hořčíku v biomase. Na 100 % se nepotvrdilo tvrzení, že by obsah hořčíku v přítomnosti As významně klesl. Nelze ani jednoznačně potvrdit, že vyšší obsah Mg byl v listech mladších. Hladina hořčíku v rostlině se snižuje, pokud se zvyšuje koncentrace metaloidu. Hořčík v rostlině působí jako kofaktor enzymů, které aktivují fosforylační procesy a zároveň slouží jako centrální atom molekuly chlorofylu. Snížení příjmu hořčíku je pravděpodobně způsobeno tím, že arsen může omezit oxidativní fosforylaci a snížit obsah chlorofylu, takže rostlina nemá vysoké požadavky na příjem Mg, proto jeho příjem snižuje. Kromě toho, snížení příjmu Mg může být výsledkem toxického působení arsenu v kořenech (Farnese et al., 2014).

Na asimilaci dusičnanů do aminokyselin se v rostlinách podílejí tři hlavní reakce. Dusičnan se nejprve redukuje na amonium pomocí nitrátreduktázy a nitritreduktázy, což je klíčový stupeň k regulaci konverze $N - NO_3^-$ do organického dusíku (Campbell, 1999). Amoniak se pak začlení do glutaminu a glutamátu a následně se asimiluje do aminkyselin, nukleových kyselin, proteinů, chlorofylů a dalších metabolitů (Marschner, 1995).

V tomto pokusu expozice arsenem vedla k nízkému obsahu dusíku u obou druhů rostlin. Akumulace arsenu má odlišný vliv na růst rostlin, na obsah proteinů, dusičnanů a dusitanů v rostlinách (Oaks, 1994). V tomto pokusu nebyla u *Pteris vittata* v 1. odběru potvrzena závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem dusíku v biomase rostliny. Ve 2. a 3. odběru byla prokázána nepřímá závislost ($R^2 = 0,923$; $R^2 = 0,981$). Se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesal obsah dusíku v biomase. U *Pteris cretica* v 1. a 2. odběru nebyla prokázána závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem dusíku v biomase rostliny. Ve 3. odběru se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě klesal obsah dusíku v biomase ($R^2 = 0,693$). Pokles dusíku v biomase rostlin z našeho pokusu odpovídá výsledkům

z ostatních pokusů, ve kterých také došlo k poklesu dusíku v biomase v závislosti na vyšší koncentraci As v půdě.

Aminokyseliny jsou považovány za části proteinů a také za jejich prekurzory. Hrají významnou roli v metabolismu a vývoji rostlin (Ježek et al., 2011 in Zemanová et al., 2013). Aminokyseliny, které se v rostlině hromadí na základě stresu způsobeného působením těžkých kovů na rostlinu, hrají v rostlině různé role. Mohou se chovat jako signální molekuly a osmolyty, regulují transport iontů a usnadňují detoxikaci (Xu et al., 2012 in Zemanová et al., 2013). Asparagin a kyselina glutamová, stejně tak jako kyselina asparagová a glutamin se podílejí na asimilaci dusíku, na transportu a transaminačních procesech v rostlině. Ve vyšších rostlinách se anorganický dusík před začleněním do organických forem nejprve redukuje na amoniak. Ten je pak asimilován do organické formy jako glutamin a kyselina glutamová, což jsou donory N v biosyntéze všech aminokyselin a sloučenin obsahující dusík (Sánchez – Pardo et al., 2012). Metabolismus aminokyselin hraje podstatnou roli v odolnosti rostlin na abiotický stres (Pavlík et al., 2010).

Výsledky tohoto pokusu ukázaly, jak kontaminace arsenem ovlivnila obsah zmiňovaných aminokyselin v nadzemní biomase obou druhů *P. vittata* a *P. cretica*. Obsah aminokyselin v nadzemní biomase byl skoro vždy vyšší u všech variant v porovnání s kontrolou. Celkový obsah volných aminokyselin v nadzemní biomase byl vyšší u *P. vittata*.

Obsah volné kyseliny glutamové v biomase *P. vittata* oproti kontrole výrazně narostl. V 1. odběru nebyla potvrzena lineární závislost arsenu a kyseliny glutamové. Ve 2. odběru a 3. odběru se obsah kyseliny glutamové se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě snižoval ($R^2 = 0,693$; $R^2 = 0,866$). U *P. cretica*. v 1. odběru nebyla prokázána závislost mezi obsahem arsenu v půdě a obsahem kyseliny glutamové v biomase. Ve 2. a 3. odběru se obsah kyseliny glutamové se zvyšujícím se obsahem arsenu v půdě snižoval ($R^2 = 0,325$; $R^2 = 0,977$). Jiných výsledků dosáhl pokus Pavlíka et al. (2010), ve kterém došlo na základě vyšších koncentrací arsenu ke zvýšení hladiny kyseliny glutamové u rostliny *Spinacia oleracea* L..

Glutamin je považován za klíčový metabolit, působící jako donor aminoskupin pro ostatní volné aminokyseliny. Společně s kyselinou glutamovou mohou být použity pro tvorbu asparaginu a kyseliny asparagové. Slouží také jako zásobárna metabolicky aktivního dusíku (Mokhele et al., 2012 in Zemanová, 2013). Glutamátdehydrogenáza hraje základní roli v katabolismu aminokyselin a je klíčovým enzymem v metabolismu dusíku (Devaraju et al., 2010). Koncentrace glutaminu byly podstatně nižší u *P. cretica* ve srovnání s *P. vittata*. Druh *P. cretica* potvrdil vztah mezi obsahem glutaminu a vyššími koncentracemi As v půdě. Obsah glutaminu se s vyšší koncentrací As v půdě zvyšoval. Tento fakt nebyl upozorován u

P. vittata, zde se obsah glutaminu, stejně jako obsah dusíku s rostoucím obsahem arsenu v půdě snižoval. Pokles glutaminu může mít za následek nižší výnos biomasy.

Nárůst koncentrace kyseliny asparagové na základě působení vyšších koncentrací As byl zaznamenán u *P. cretica*. U *P. vittata* došlo ve všech třech provedených odběrech k poklesu kyseliny asparagové v závislosti na zvýšené koncentraci arsenu v půdě. Vyšší obsahy kyseliny asparagové byly ale naměřeny u *Pteris vittata*.

Díky amidaci aspartátu (soli kyseliny asparagové) pomocí glutaminu vzniká asparagin, aminokyselina sloužící převážně k ukládání N a jeho transportu. Asparaginsyntetáza katalyzuje přenos aminoskupiny z glutaminu na aspartát za tvorby asparaginu a glutamátu (Pavlík et al., 2010).

Asparagin má vysoký poměr C:N, je substrátem pro některé enzymatické reakce a za fyziologických podmínek má malý náboj. Proto vytváří ideální skladovací sloučeninu. Stejně tak je hlavním transportérem dusíku, zejména v luskovinách. V xylému a floému je to hlavní transportní sloučenina. Dobře se akumuluje v podmínkách stresu. V některých případech to může být přímá biologická odpověď na stresové stavy, například tím, že přispívá k udržení osmotického tlaku, může to být ale také nepřímý důsledek omezení syntézy proteinů během stresových podmínek (Lea et al., 2006).

Koncentrace asparaginu na základě působení vyšších koncentrací As se mírně zvyšovala pouze u *P. cretica*, spíše ale docházelo k mírnému poklesu hladiny asparaginu, což by znamenalo, že rostlina netrpěla do značné míry stresem, jelikož se asparagin hromadí převážně ve stresových podmínkách. Pokles hladiny asparaginu může být výsledkem zvýšené aktivity asparaginázy, která hydrolyzuje amidové skupiny asparaginu k produkci aspartátu a amoniaku. Katalýza asparagin - syntetázy může také inhibovat arsen, tato inhibice může následně vyvolat pokles koncentrace asparaginu (Pavlík et al., 2010).

Tento pokus zaznamenal pokles koncentrace asparaginu u rostlin rostoucích ve stresu. Nebyly zde zaznamenány významné změny související s rostoucí koncentrací As v půdě u *P. vittata*. K podobným výsledkům došel i Pavlík et al. (2010), v jehož pokusu došlo také k poklesu koncentrace asparaginu působením Cd u rostliny *Spinacia oleracea* L..

7 Závěr

- Byly zhodnoceny obsahy arsenu, železa, dusíku, hořčíku a obsahy volných aminokyselin nacházející se v hyperakumulujících druzích *Pteris vittata* a *Pteris cretica*.
- U *Pteris vittata* i *Pteris cretica* má zvyšující se obsah arsenu vliv na výnos biomasy obou druhů rostlin. Při nejvyšší dávce arsenu do půdy vykazovaly oba druhy nejmenší výnos biomasy. Obsah arsenu v půdě má na *Pteris vittata* odlišný vliv, kdežto u *Pteris cretica* se potvrdilo, čím více arsenu, a čím delší doba jeho působení, tím menší výnos biomasy. Byla zde zjištěná nepřímá lineární závislost. Vyšší akumulární schopnost tohoto prvku vykazuje *Pteris vittata*.
- Obsah arsenu v biomase obou druhů se lineárně zvyšuje se zvyšující se dávkou arsenu do půdy. V obou případech byla zjištěná přímá lineární závislost obsahu arsenu v biomase rostlin v závislosti zvyšujících se dávek arsenu do půdy.
- Obsah železa vykazoval stoupající trend u obou druhů kromě variant As2. Čím delší doba růstu rostlin, tím více železa biomasa obsahovala. Nelze ale jednoznačně říci, že zvyšující se obsah arsenu měl vliv na zvyšující se obsah železa v biomase rostlin.
- Obsah dusíku vykazoval u všech variant obou druhů klesající trend při všech provedených odběrech. Čím déle rostliny rostly, tím méně obsahovaly dusíku. U *Pteris cretica* se obsah dusíku, kromě varianty As3, mírně zvyšoval se zvyšující se dávkou arsenu, statisticky však závislost prokázána nebyla.
- Obsah hořčíku se u *Pteris cretica* v závislosti na zvyšující se dávce arsenu, kromě varianty As3, mírně zvyšoval. U *Pteris vittata* byla potvrzena přímá lineární závislost jen u prvních dvou odběrů.
- Obsah asparaginu lehce stoupal u *Pteris vittata* pouze ve druhých odběrech a u *Pteris cretica* pouze v prvních odběrech. Jinak nebyla prokázána přímá lineární závislost mezi obsahem asparaginu a zvyšující se dávkou arsenu.
- Obsah kyseliny asparagové vykazoval stoupající trend u *Pteris vittata* a *Pteris cretica* pouze v prvních a druhých odběrech. Vyšší obsah kyseliny asparagové byl prokázán u *Pteris vittata*.
- Obsah kyseliny glutamové vykazoval klesající trend u *Pteris vittata* pouze ve druhých a třetích odběrech. S vyšší dávkou arsenu tak klesal obsah kyseliny glutamové v biomase rostliny. U *Pteris cretica* byl mírně klesající trend potvrzen také ve druhých a třetích odběrech. Jinak nebyla prokázána přímá lineární závislost mezi obsahem

kyseliny glutamové a zvyšující se dávkou arsenu. Nejvyšší obsah této aminokyseliny u obou druhů byl vždy prokázán ve 2. odběrech oproti ostatním odběrům. Více kyseliny glutamové obsahoval druh *Pteris vittata*.

- Obsah glutaminu byl u obou druhů nejvyšší ve 2. odběrech oproti ostatním odběrům. Stoupající trend nevykazoval u *Pteris vittata* v žádném odběru, u *Pteris cretica* v odběru prvním a druhém. Množství glutaminu se tedy s vyšším obsahem arsenu u *P. cretica* mírně zvyšovalo. U *Pteris vittata* se v 1. a 3. odběru množství glutaminu v závislosti na vyšším obsahu arsenu snižovalo. Celkově více glutaminu obsahoval druh *Pteris vittata*.

8 Seznam literatury

Baker, J. A. M., Brooks, R. R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1. 81-126.

Brooks, R. R. 1998. Geobotany and Hyperaccumulators. *Plant that Hyperaccumulate Heavy Metals*. 3. 55-94.

Campbell, W.H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50. 277-303.

Cao, X., Ma, L. Q., Tu, C. 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution*. 128. 317-325.

Cunnigham, S. D., Ow, D. W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*. 110. 715-719.

Devaraju, T., Sujatha, K., Madhava Rao, S., Jayantha Rao, K. 2010. Impact of sodium arsenate on selected enzymes and histopathological studies in albino mice. *International Journal of Pharma and Bio Science*. 1. 1-7.

Drahota, P. 2004. Kapradina milující arsen. *Vesmír*. 83. 256-258.

Eisler, R. 2007. *Eisler's encyclopedia of environmentally hazardous priority chemicals*. Elsevier. Amsterdam. 950 s. ISBN 9780444531056.

Farnese, F. S., Oliviera, J. A., Farnese, M. S., Gusman, G. S., Silveira, N. M., Simon, G. S. 2014. Uptake arsenic by plants : Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. *IDESIA (Chile)*. 32. 99-106.

Fayiga, A. O., Ma, L. Q., Cao, X., Rathinasabapathi, B. 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*. 132. 289 – 296.

Finnegan, P. M., Chen, W. 2012. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Frontiers in Physiology*. 3. 182.

Fišer, J., Nováková, M., Macek, T. 2014. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. *Chemické listy*. 108. 566-571.

Gonzaga, M. I. S., Santos, J. A. G., Ma, L. Q. 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Scientia Agricola*. 63. 90-101.

Greenwood, N. N., Earnshaw, A. 1993. *Chemie prvků, Sv. 2*. Jursík, Fr. a kol. Informatorium. Praha. 789-821.

Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A. 2009. Effect of arsenic – phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant and Soil*. 314. 211-220.

- Henke, K. R. 2009. In: Henke, K. R. 2009. Environmental Chemistry. Health Threats and Waste Treatment. 70-198. ISBN 9780470027585.
- Holeček, M. 2006. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha. Grada Publishing. 286. ISBN 8024715627.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B. 2007. Trace elements from soil to human. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. 550 s. ISBN 9783540327134.
- Kafka, Z., Punčochářová, J. 2002. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. Chemické listy. 96. 611-617.
- Komar, K. M. 1999. In: Fayiga, A. O., Ma, L. Q., Cao, X., Rathinasabapathi, B. 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. Environmental Pollution. 132. 289 – 296.
- Kovář, L. 2008. *Pteris vittata* L.- křídelnice [online]. Botany.cz. 5. ledna 2008. [cit. 2016-01-13]. Dostupné <<http://botany.cz/cs/pteris-vittata/>>.
- Kožíšek, F., Pomykačová, I., Weyessa, D., Němcová, V., Nešpůrková, L. 2008. Problematika arsenu v pitné vodě v České republice. Kovy a související látky v pitné vodě. Zdravotní ústav. Ostrava. 14 s.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A. J., Shewry, P. R., Halford, N. G. 2006. Asparagine in plants. Annals of Applied Biology. 150. 1-26.
- Lešková, A., Molnářová, M., Fargašová, A. 2012. Biochemický pohľad na príjem, metabolismus a toxické účinky zlúčenín arzenu na rastliny. Chemické listy. 106. 1110-1115.
- Luongo, T., Ma, L. Q. 2005. Characteristic of arsenic accumulation by *Pteris* and non-*Pteris* ferns. Plant and Soil. 277. 117-126.
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E. D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature. 409. 579.
- Mandal, B. K., Suzuki, K. T. 2002. Arsenic round the world: a review. Talanta. 58. 201-235.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. London. Great Britain. 888 s. ISBN 0124735426.
- Martínez O. G., Morbelli, M. A. 2009. The spore of *Pteris cretica* komplex (Pteridaceae-Pteridophyta) in America. Grana. 48.
- Meharg, A. A. 2002. Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies. New Phytologist. 157. 25-31.
- Mehmood, A., Hayat, R., Wasim, M., Akhtar, M. S. 2009. Mechanisms of Arsenic Adsorption in Calcareous Soils. Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1. 59-65.

- Miholová, D., Mader, P., Száková, J., Slámová, A., Svatoš, Z. 1993. Czechoslovak biological certified reference materials and their use in the analytical quality assurance system in a trace element laboratory. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 345. 256-260.
- Moreno-Jiménez, E., Esteban, E., Peñalosa, J. M. 2012. The Fate of Arsenic in Soil-Plant Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 215. 1-29.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8. 199-216
- Neuberg, M., Pavlíková, D., Pavlík, M., Balík, J. 2010. The effect of different nitrogen nutrition on proline and asparagine content in plant. *Plant, Soil and Environment*. 56. 305-311.
- Oaks, A. 1994. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Canadian Journal of Botany*. 72. 739-750.
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Balík, J., Neuberg, M. 2010. The contents of amino acids and sterols in maize plants growing under different nitrogen conditions. *Plant, Soil and Environment*. 56. 125-132.
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Stazsková, L., Neuberg, M., Kaliszová, R., Száková, J., Tlustoš, P. 2010. The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L.. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73. 1309-1313.
- Pertold, Z. 1998. Arzen v životním prostředí. Přírodní i jiné zdroje arzenu a způsoby, jak jej zneškodnit. *Vesmír*. 77. 323-325.
- Porter, E. K., Peterson, P. J. 1975. Arsenic accumulation by plants on mine waste (UK). *Science of the Total Environment*. 4. 365-371.
- Sanyal, S. K., Nasar, S. K. T. 2002. Arsenic contamination of groundwater in West Bengal (India) : Build-up in soil-crop systems. Paper presented to the International Conference on Water Related Disasters. Kolkata. 5. Decemer 2002.
- Sharma, V. K., Sohn, M. 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations and remediation. *Environment International*. 35. 743-759.
- Singh, N., Ma, L. Q. 2007. Assessing Plants for Phytoremediation od Arsenic-Contaminated Soils. *Methods in Biotechnology*. 23. 319-336.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., Rathinasabapathi. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L.. *Plant Science*. 170. 274-282.
- Singh, N., Ma, L. Q., Vu, J. C., Raj, A. 2009. Effects of arsenic on nitrate metabolism in arsenic hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ferns. *Environmental Pollution*. 157. 2300-2305.

- Singh, N., Raj, A., Khare, P. B., Tripathi, R. D., Jamil, S. 2010. Arsenic accumulation pattern in 12 Indian ferns and assessing the potential of *Adiantum capillus-veneris*, in comparison to *Pteris vittata*, as arsenic hyperaccumulator. *Bioresource Technology*. 101. 8960-8968.
- Soudek, P., Petrová, Š., Benešová, D., Kotyza, J., Vaněk, T. 2008. Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy*. 102. 346-352.
- Soudek, P., Víchová, L., Valenová, Š., Podlipná, R., Malá, J., Vaněk, T. 2006. Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické listy*. 100. 323-329.
- Srivastava, M., Ma, L. Q., Santos, J. A. G. 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Science of the Total Environment*. 364. 24-31.
- Sundaram, S., Rathinasabapathi, B., Ma, L. Q., Rosen, B. P. 2008. An Arsenate-activated Glutaredoxin from the Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. Regulates Intracellular Arsenite. *The Journal of Biological Chemistry*. 283. 6095-6101.
- Szaková, J., Mihaljevič, M., Tlustoš, P. 2007. Mobilita transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a rostlinách. *Chemické listy*. 101. 397-405.
- Szaková, J., Tlustoš, P., Balík, J., Pavlíková, D., Balíková, M. 2000. Stanovení rostlinou přijatelného arsenu v půdě v závislosti na vybraných půdních vlastnostech [online]. Praha. Agrární www portál Agris. 30. listopadu 2000. [cit. 2015-12-19]. Dostupné z <<http://www.agris.cz/clanek/118391/stanoveni-rostlinou-prijatelneho-arsenu-v-pude-v-zavislosti-na-vybranych-pudnich-vlastnostech>>.
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., Maathuis, J. M. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*. 25. 158-165.
- Tu, C., Ma, L. Q. 2002. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *Journal of Environmental Quality*. 31. 641-647.
- Tu, C., Ma, L. Q. 2005. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*. 135. 333-340.
- Tu, C., Ma, L. Q., Bondada B. 2002. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese Brake (*Pteris vittata* L.) and its utilization potential for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*. 31. 1671-1675.
- Tu, C., Ma, L. Q., Bondada, B. 2002. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*. 31. 1671-1675.
- Ust'ak, S. 2001. Doporučení pro pěstování zemědělských plodin v podmínkách vysoké kontaminace zemědělských půd arsenem. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 3s.
- Vácha, R., Macurová, H., Skála, J., Havelková, M., Čechmánková, J., Horváthová, V. 2008. Possibilities of some methods for risk assesment of arsenic load in soils. *Plant, Soil and Environmental*. 54. 279-287.

- Vithanage M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., Bhattacharya, P. 2012. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental Chemistry Letters*. 10. 217-224.
- Wang, H. B., Wonh, M. H., Lan, C. Y., Baker, A. J. M., Qin, Y. R., Shu, W. S., Chen, G. Z., Ye, Z. H. 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. *Environmental Pollution*. 145. 225-233.
- Xie, Q. E., Yan, X. L., Liao, X. Y., Li, X. 2009. The Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. *Environmental Science and Technology*. 43. 8488-8495.
- Zehnálek, J., Adam, V., Kizek, R. 2006. Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin. *Chemické listy*. 100. 508-514.
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P. 2013. The changes of contents of selected free amino acids associated with kadmium stress in *Noccea caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Plant, Soil and Environmental*. 59. 417-422.
- Zeng, X., He, Q., Bai, L., Li, L., Su, S. 2011. The arsenic speciation transformation in artificially arsenic-contaminated fluvo-aquic soil (Beijing, China). *Plant, Soil and Environment*. 57. 108-114.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L. Q. 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the Total Environment*. 300. 167-177.
- Zhao, F. J., Dunham, S. J., McGrath, S. P. 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist*. 156. 27-31.
- Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A., McGrath, S. P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*. 181. 777-794.