

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Využití sekvenční extrakce na hodnocení vlivu arsenu na
obsah a vazby vybraných prvků v rostlině**

Diplomová práce

Autor práce: Hana Beranová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití sekvenční extrakce na hodnocení vlivu arsenu na obsah a vazby vybraných prvků v rostlině" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. a panu Ing. Milanu Pavlíkovi, CSc. za odborné vedení mé práce a vstřícný přístup.

Souhrn

Diplomová práce se zaměřuje na využití sekvenční extrakce rostlinné biomasy pro hodnocení vlivu arsenu na rostliny špenátu setého. Zemina byla před vysetím špenátu kontaminována arsenem v podobě $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. Pokus zahrnoval 4 varianty a každá z nich měla 3 opakování. První varianta pokusu byla kontrolní, bez kontaminace. Druhá varianta As1 byla kontaminována dávkou 50 ppm. Třetí varianta As2 byla kontaminována dávkou 100 ppm. Čtvrtá varianta As3 byla kontaminována dávkou 150 ppm. Čerstvá biomasa špenátu byla využita pro sekvenční extrakci. V práci jsou popsány účinky arsenu zejména na metabolismus rostlin. Ovlivnění biochemických pochodů v rostlinách arsenem je popisováno skrze ovlivňování příjmu vybraných prvků. Vybrány byly právě takové prvky, které jsou pro rostliny esenciální nebo hrají v metabolických dějích klíčovou roli, a zároveň se jedná o prvky z fyzikálně-chemického hlediska podobné. Ovlivnění metabolických pochodů v rostlině arsenem bylo hodnoceno z korelací u vybraných prvků. Těmito prvky byly fosfor, železo, zinek, měď, vápník, hořčík. Arsen ovlivňoval zejména vápník a fosfor. Úkolem bylo i zhodnotit, zda sekvenční extrakce potvrdí vliv stupňované dávky arsenu na metabolismus rostlin. Provedená sekvenční extrakce poskytla celkem 10 frakcí, z nichž čtvrtá (butanolová frakce z extraktu methanol – voda) měla nejnižší hmotnost a nebylo tedy možno ji analyzovat na obsah prvků. Z analyzovaných frakcí měly nejnižší hmotnost první (petroletherová z methanolového extraktu) a osmá (třetí butanolová frakce z extraktu voda + HCl + methanol). V první frakci byly analyzovány nejméně polární lipofilní sloučeniny. V osmé frakci byly nalezeny kyseliny fenylypropanového metabolismu a jejich soli a estery kyselin. Mezi frakce s nejvyšší hmotností patřila desátá, což byly extrakční zbytky, dále devátá frakce (pátá vodná frakce z extraktu voda + HCl + methanol) a třetí frakce (první vodná frakce z methanolového extraktu). Ve třetí frakci byly stanoveny některé aminokyseliny, organické kyseliny a jejich rozpustné soli. V desáté frakci byly stanoveny proteiny, glykoproteiny a cukerné fragmenty. Na arsen byla nejbohatší frakce první. Naopak nejméně arsenu obsahovala frakce desátá a devátá. Z uvedených korelací je patrné, že arsen je prvkem, který má významný vliv na metabolické děje v rostlině. Bylo vhodné využít sekvenční extrakci, neboť umožňuje rozdělit skupiny sloučenin z rostlinné biomasy pro další analýzu, díky které lze pak stanovit míru ovlivnění metabolických dějů.

Klíčová slova: arsen, fosfor, kontaminace prostředí, rostlina, stres, železo

Summary

The diploma thesis is focused on the use of sequential extraction for evaluation of arsenic effect on plants. The soil before planting spinach was contaminated with arsenic in the form $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. The experiment included four variants, and each of them had 3 repeats. The first option was an attempt to control free from contamination. The second option As1 was contaminated with 50 ppm. The third option As2 was contaminated with 100 ppm. The fourth option As3 was contaminated with 150 ppm. Fresh spinach biomass was used for the sequential extraction.

First, the thesis depicts arsenic effect on plants, in particular their metabolism. The influencing of biochemical processes in plants by arsenic is described through the influencing of selected elements. The chosen elements are either essential for plants or play a key role in metabolic processes in plants, moreover they are similar to each other from the physical and chemical point of view. The evaluation of arsenic influencing of metabolic processes in plants is marked by correlation of the selected elements - phosphorus, iron, zinc, copper, calcium and magnesium. Arsenic influenced mainly calcium and phosphorus.

Second, the thesis is to find out whether the sequential extraction confirms the assumption that the increasing doses of arsenic could have an impact on the metabolism of plants.

The sequential extraction has provided ten fractions in total. The fourth fraction (butane fraction made of methanol and water) was the least, on that account it was not able to be analysed on the content of elements. The least of the analysed fraction for the first one (petroleum ether one made of a methanol extract) and the eighth one (the third butane one of an extract of water + HCl + methanol). The largest fractions were the tenth one, which was the rest of the extraction, and the ninth one (the fifth water fraction of an extract of water + HCl + methanol) and the third fraction (the first water fraction of an extract of methanol). The first fraction were analyzed by the least polar lipophilic compound. The eighth fraction were found phenylpropane metabolism acid and salts and esters thereof. Among the fractions with the highest weight was one tenth, which were extract residues, as well as the ninth fraction (the fifth fraction from an aqueous extract of water + methanol + HCl) and the third fraction (first aqueous fraction from the methanol extract). The third fraction were determined certain amino acids, organic acids and soluble salts thereof. In the tenth fraction were determined proteins, glycoproteins and fragments sugar. For arsenic was the richest fraction first. The least contained arsenic fraction tenth and ninth.

To present the result, the first petroleum ether fraction of the methanol extract was the richest in arsenic. On the contrary, the last ninth and tenth fractions contained the least amount of arsenic.

On the base of the completed correlation, apparently arsenic is apparently the element with a significant impact on metabolic processes in plants. Furthermore, the use of sequential extraction was suitable, because it allows you to split the group of compounds from plant biomass for further analysis, thanks to which you can then determine the degree of influence of metabolic processes.

Keywords: arsenic, phosphorus, environment contamination, plant, stress, iron

Obsah

1 Úvod	7
1.1 Charakterizace arsenu	7
2 Cíl práce	8
3 Literární přehled současného stavu problematiky	9
3.1 Arsen v životním prostředí	9
3.2 Arsen v rostlině	11
3.3 Využívání sekvenční extrakce a vyhodnocování IR spekter	22
3.4 Možnosti hodnocení získaných obsahů z měřených prvků	26
4 Metodika	28
4.1 Nádobový pokus – vypěstování špenátu	28
4.2 Sekvenční extrakce	28
4.3. Jednotlivé analýzy	32
5 Výsledky	33
5.1 Analýza prvků a výskytu sloučenin v jednotlivých frakcích	33
5.2 Shrnutí výsledků obsahu prvků v izolovaných frakcích ve vztahu k jejich možným korelacím	40
5.2.1 Korelace obsahů analyzovaných prvků vyskytujících se v izolovaných frakcích ..	
.....	40
5.2.1.1 Korelace P, As, Ca a Mg	40
5.2.1.2 Korelace kovových prvků (Fe, Cu a Zn) navzájem	41
5.2.1.3 Korelace Fe a Zn s P a As	41
6 Diskuze	42
7 Závěr	45
8 Seznam literatury	46
9 Samostatné přílohy	49

1 Úvod

1.1 Charakterizace arsenu

Arsen je prvek 15. skupiny periodické soustavy prvků. Jedná se o stříbrolesklý polokov, který má velký význam zejména v odvětvích metalurgie a elektroniky. Arsen je prvek, který má nejen toxické účinky na živé organismy, ale je v životním prostředí a v organismech relativně rozšířený. Vyskytuje se přirozeně v zemské kůře jako součást nerostů (zejména sulfidických) a hornin. Z tohoto vyplývá, že arsen najdeme přirozeně i v půdě a v mořské i sladkovodní vodě.

Arsen se ale do životního prostředí dostává hojně i antropogenní činností, např. spalováním odpadu či fosilních paliv, je uvolňován při těžbě nerostných surovin, a nemalé množství uniká i z různých průmyslových odvětví, např. z výroby polovodičů. Dříve byl arsen používán i jako pesticidní přípravek, když pro jeho toxicitu spolu s rtuťnatými přípravky byly tyto pesticidy zakázány.

V organismech se arsen vyskytuje zejména ve vázané podobě v anorganických i organických sloučeninách. Z mnoha výzkumů a pokusů je patrné, že anorganické sloučeniny arsenu jsou pro organismy mnohem toxičtější než formy organické (Shri et al., 2009). Velká část sloučenin arsenu byla nalezena zejména v mořských organismech. Jedná se především o organické sloučeniny arsenu, např. v arsenových analogích cukrů v řasách, v arsenobetainu, arsenocholinu v rybách a korýších. Arsenobetain a arsenocholin jsou považovány za netoxické (Soudek et al., 2006). Podle dostupných informací se zdá, že zatímco v mořských organismech převažují organické sloučeniny arsenu, ve sladkovodních a suchozemských organismech formy anorganické.

Míra toxicity a způsob příjmu formy arsenu závisí na oxidačním stavu tohoto prvku. Arsen najdeme především v podobě trojmocné (As(III)) a pětímocné (As(V)). Tolerance k arsenu závisí samozřejmě i na druhu organismu.

Arsen je tedy prvkem, kterému by měla být z hlediska toxicity věnována pozornost.

2 Cíl práce

Cílem práce je hodnocení vlivu rostoucího obsahu arsenu v půdě na obsah vybraných prvků v rostlině.

Pro hodnocení byla použita sekvenční extrakce rostlinné biomasy, která umožní studovat vazby vybraných prvků na významné látky v rostlině.

Práce se zabývá otázkou, zda stupňovaná kontaminace půdy arsenem ovlivní obsah fosforu a železa v rostlině, a zda sekvenční extrakce rostlinné biomasy potvrdí vliv stupňované dávky arsenu na metabolismus rostliny.

3 Literární přehled současného stavu problematiky

3.1 Arsen v životním prostředí

Arsen je prvek poměrně rozšířený v životním prostředí a organismech. V životním prostředí se vyskytuje přirozeně i jako následek antropogenní činnosti.

Jedná se o dvacátý nejhojnější prvek přítomný v zemské kůře, kde je součástí některých minerálů (Řezanka et al., 2008). Přirozeně se do vody a půdy arsen dostává zvětráváním minerálů a hornin, vulkanickou činností či biologickou aktivitou.

Antropogenní činností se arsen do životního prostředí dostává při spalování tuhého odpadu a fosilních paliv. Při spalování uhlí se do okolí uvolňuje arsen v podobě As_4O_6 . Dále se může arsen uvolňovat těžbou a následně při zpracování kovů či přímým použitím fungicidů, insekticidů, herbicidů a defoliantů obsahujících arsen, likvidací komunálního a průmyslového odpadu. V neposlední řadě lze sloučeniny arsenu používat ve sklářství. Před objevem antibiotik byl arsen používán i v lékařství jako účinná látka pro léčbu řady nemocí (Soudek et al., 2005; Gunes et al., 2009; Patra et al., 2004; Řezanka et al., 2008).

Arsen patří mezi nejintenzivněji studované rizikové prvky z důvodu toxicity pro člověka i ostatní živočichy. Arsen je známý karcinogen a mutagen. Známá je i fytotoxicita tohoto prvku.

V České republice sice arsen nepředstavuje velký problém z pohledu kontaminace půdy jako jinde ve světě, ale přesto je nutno neopomenout oblasti výskytu ložisek barevných kovů, které jsou arsenem často doprovázeny (Száková et al., 2007).

Podobně jako polokov As je na tom i těžký kov Cd. Do životního prostředí se dostává podobným způsobem a spolu s As tvoří díky ochotě kumulovat se v půdě dvojici prvků potenciální hrozby pro člověka a pro všechny součásti ekosystémů. Díky jejich toxicitě si rostliny vůči nim vyvinuly větší toleranci a různé způsoby detoxikace (Verbruggen et al., 2009).

Arsen se v životním prostředí vyskytuje ve velkém počtu organických i anorganických sloučenin, které se vzájemně liší chemickými vlastnostmi, toxikologickými účinky, biopřístupností a chováním v systému půda – rostlina. Nutno podotknout, že mobilita arsenu v půdě je poměrně nízká ve srovnání s mobilnějšími prvky jako je kadmium či zinek (Száková et al., 2007).

Hlavními přirozenými zdroji arsenu v půdě jsou arsenopyrit a další sulfidy obsahující As. Po uvolnění ze sulfidů je As(III) oxidován na As(V) a v závislosti na jeho koncentraci mohou

sloučeniny arsenu koprecipitovat s nově tvořenými hydro-oxidy železa nebo mohou být adsorbovány na povrchu těchto minerálů, nebo se mohou zapojit do obou procesů. Hydro-oxidy železa jsou nejdůležitějšími sorbenty As v půdě. Tento význam mají i oxohydroxidy a jílové minerály (Száková et al., 2007).

Z literatury je známo, že arsen se v půdě vyskytuje zejména ve formě arseničnanů. V redukčních podmínkách se ale arseničnany mohou přeměnit na arsenitany. Byla prokázána i přítomnost malého množství methylovaných sloučenin arsenu, tedy organických forem arsenu.

Důležitou roli při oxidaci a redukci arsenu v půdě, sedimentech, čistírenských kalech, apod. hraje aktivita mikrobiální biomasy. Půdní bakterie jsou také schopné redukovat arseničnany na arsenitany a poté je methylovat na dimethylarsan. Také houby dokážou přeměnit anorganické a organické formy na těkavé methylarsany. Studie se tedy zabývají i možnostmi ztrát arsenu z půdy tvorbou těkavých sloučenin jako je arsenovodík, methylarsan, dimethylarsan a trimethylarsan. Tyto těkavé sloučeniny se často vytváří vlivem mikroflory anaerobních čistírenských kalů či v půdním roztoku v oblasti rhizosféry u rýže (Száková et al., 2007).

Száková et al. (2007); Patra et al. (2004) uvádějí, že na transformaci arsenu a jeho biopřístupnost mají účinek i biologické parametry půdy, čili půdní typ, pH půdy, množství přítomné organické půdní hmoty, výměnná kapacita půdy a zdroj kontaminace. Některé studie např. prokázaly, že anorganické formy arsenu jsou toxičtější na písčitéch než na jílovitých půdách. Výskyt jednotlivých sloučenin arsenu ve vyšších rostlinách a jejich distribuce do vyšších částí rostliny jsou ovlivněny druhem rostliny.

Tripathi et al. (2012) v úvodu své práce připomínají i nezanedbatelné množství arsenu ve vodě. Velké oblasti v Bangladéši, západním Bengálsku a v dalších státech Indie a Vietnamu jsou odkázané při zavlažování hospodářských plodin na podzemní vodu kontaminovanou arsenem. Místní obyvatelé jsou tedy vystavováni expozici As jak prostřednictvím přijímané vody, tak prostřednictvím konzumace hospodářských plodin, které As kumulují. Další riziko pro člověka tkví v příjmu výrobků z hospodářských zvířat. I tato zvířata jsou krmena rostlinami a napájena vodou, ve kterých jsou vyšší obsahy As.

Právě Bangladéš a Indie jsou oblasti, kde koncentrace As v podzemní vodě přesáhly hodnotu 2000 $\mu\text{g/l}$ (Tripathi et al., 2007).

Tripathi et al. (2012) upozorňují, že pochopení, jak je arsen rostlinami přijímán a dále v jejich

rostlinném těle kumulován, je nezbytné pro odhad rizika, které pro celou lidskou populaci představuje půda kontaminovaná arsenem.

3.2 Arsen v rostlině

Neexistuje důkaz, že by arsen byl pro rostliny esenciálním prvkem, přestože v nízkých koncentracích stimuluje růst rostliny (Soudek et al., 2006).

Z hlediska nepříznivých účinků arsenu na rostliny hovoříme o fytotoxicitě. Studie ukazují, že množství As v sušině rostliny 0,01 – 1 mg/kg je považováno za normální, hodnoty 3 – 10 mg/kg za fytotoxické. Ze zemědělských plodin jsou na účinky arsenu nejcitlivější luštěniny. Fytotoxicita arsenu se u rostlin projevuje plasmolýzou pletiv kořenů, žloutnutím listů vedoucím až k nekróze špiček a okrajů listů (Száková et al., 2007). Obecně nejviditelnějšími projevy na rostlinách, které byly vystaveny expozici těžkých kovů, jsou chlorózy na listech, rozpad molekul chlorofylu, pozastavení růstu, změna fotosyntetické aktivity. Změny probíhají i na kořenovém systému, jak bylo uvedeno výše. Membrána kořenových buněk je ničena kontaktem s toxickými kovy, což v konečném důsledku vede k úniku buněčných struktur apod.

U rostlin, které jsou vystavené abiotickému stresu, je velmi běžné studovat mechanismy uplatňující se při zvládnání toxicity pomocí zapojení reaktivních forem kyslíku, které si rostliny v takových situacích vytváří. To se děje především u vodních rostlin. Těžké kovy jako Cd a polokov As ovlivňují aktivitu enzymů jako je superoxiddismutáza nebo peroxidáza (Upadhyay, 2014).

Celkově lze z literatury shrnout, že rostliny si vytvořily několik mechanismů, jak se bránit působení toxických kovů – transport těchto kovů do zásobních orgánů a kořenů, tvorba chelátů či specifických látek k omezení účinků toxických kovů, vyloučení těchto prvků z rostliny. Přičemž vyloučení As buňkou je jasně prokázáno u kvasinek a bakterií, nikoli u rostlin (Verbruggen et al., 2009).

Jako hlavní strategii pro detoxikaci neesenciálních kovů Verbruggen et al. (2009) uvádějí syntézu nízkomolekulárních chelátů, aby se zabránilo navázání kovu na fyziologicky důležité proteiny a usnadnil se jejich transport do vakuol. Preferovanými ligandy As(III) a Cd²⁺ jsou thioly přítomné v glutathionu a fytochelatinech. Těmito látkami se zabývá celá řada studií, viz. níže.

Upadhyay (2014) připomíná, že v literatuře jsou uváděny různé přístupy popisující působení

těžkých kovů na rostliny. Např. uvádí využití bakteriálních enzymů, které se podílí na biosyntéze glutathionu, při kterých byla zaznamenána redukce arseničnanu a výrazné zlepšení akumulace As i tolerance rostliny. V transgenních rostlinách je tolerance vůči toxicitě Zn zajištěna tzv. glutathionovou homeostázou, čili vyrovnáváním poměru oxidované a redukované formy glutathionu. Kovy jako Cd jsou regulovány proteiny jako jsou PrP4, chitináza, proteiny teplotního šoku 71.2, které se objevují pro udržení správného fungování rostlinných hormonů jako je ethylen nebo kyselina jasmonová.

Rostliny bývají nejvíce ohrožené těžkými kovy, protože se jedná o součásti přirozených ekosystémů, které se narozdíl od živočichů nemůžou přemístit na vhodnější stanoviště. Rostliny se většinou setkají s působením esenciálních (Zn, Cu) i neesenciálních (As, Cd, Pb, Hg) kovů, které často pochází z antropogenní činnosti. Nicméně např. Zn a Cu jsou v malých koncentracích esenciálními stopovými prvky, ale ve větších koncentracích jsou toxické, zatímco neesenciální stopové prvky jako Cd, Al, Pb, As, Hg a další jsou známé jen jako toxické. Když rostlina přijme dané množství kovu, ten začne nepříznivě působit na absorpci, transport a celkově na metabolismus, růst a rozmnožování. Každý kov však působí odlišně, na odlišné procesy v rostlině. Zatímco hlavní efekt těžkých kovů je ovlivnění semen a jejich klíčivosti, omezení růstu kořenů a snížení množství celkové biomasy, As narušuje fotosyntézu, omezuje transpiraci a působí elektrolytovou nerovnováhu v buňce. Těžké kovy také velmi často narušují vnitřní struktury rostlinných buněk. Dochází ke zmenšení počtu či velikosti gran a thylakoidů v chloroplastech a mitochondriích. Je prokázáno, že vlivem Cu dochází ke zmenšení chloroplastů a mitochondrií v listech a k rozpadu vakuol. Dále vlivem Cd se zmenšuje množství chlorofylu v chloroplastech. Těžké kovy ovlivňují i fotosyntézu skrze působení na fotosystémy (Upadhyay, 2014).

Verbruggen et al. (2009) upozorňují na podobnost mezi As a Cd, což znamená potenciální toxicitu pro buňky, ve kterých se mohou tyto dva toxické prvky začlenit do metabolických pochodů místo přirozeně se vyskytujících Zn a P. Fosfor se v buňkách většinou vyskytuje jako fosfátová skupina, zatímco arsen jako As(V), což je chemický analog fosfátu, ale také jako As(III), který se v buňkách dokáže chovat jako síra, a poutat ionty kovů, přičemž As(III) z kovů preferuje právě Cd^{2+} . Důležité je ale připomenout, že zatímco As se vyskytuje jak v trojmocné tak pětímocné formě, Cd je vždy jen dvojmocné. Pokud srovnáme biologickou dostupnost těchto dvou prvků, biologicky dostupnější je Cd. Nejspíše i proto, že je podobné esenciálním prvkům, které se také vyskytují pouze v dvojmocné formě (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) a

které dokáže kadmium nahradit v proteinech, čímž omezí nebo zcela inhibuje jejich činnost. V případě arsenu je fytotoxicita do značné míry ovlivněna chemickou formou arsenu (Patra et al., 2004).

As(V) se do rostliny dostává nejčastěji skrze fosfátový transportní systém, což souvisí s výše uvedenou podobností As – P. V tom také spočívá potenciální toxicita, protože se As(V) dokáže začlenit místo fosfátu do dějů jako je fosforylace nebo syntéza ATP, tedy opět do životně důležitých dějů.

As(III) se do rostliny dostává přes integrální membránové proteiny – akvaporiny (např. nodulin 26) v podobě neutrálního As(OH)₃. Tento příjem se odehrává zejména v redukčních podmínkách (Tripathi et al., 2007; Verbruggen et al., 2009).

Příjem As(III) je typický pro rýži, která se pěstuje na zamokřených půdách a jejíž kořeny jsou tím pádem v redukčních podmínkách. Arsenitany mají jistou podobnost s kyselinou křemičitou a to je důvod, proč rýže, která má vysoké nároky na křemík, přijímá ze svého okolí velké množství As(III) (Verbruggen et al., 2009).

Jiné studie zmiňují akvaporiny v souvislosti s transportem organických forem arsenu (methylovaný arsen) do rostliny. Mobilita methylované formy As je větší než u anorganických forem (Kumar et al., 2015).

Reakce rostliny na stres způsobený těžkými kovy lze pozorovat na tvořících se proteinech, signálních molekulách a díky změnám na genetické informaci. Rostliny mají založených několik přístupů, jak přežít na půdách znečištěných těžkými kovy. Rostlina může velké množství kovů akumulovat v kořenovém systému, přesto akumuluje větší množství v nadzemních částech. Jakmile se v sušině nadzemní části nějaké rostliny objeví více než 0,1 % Cu, Co, Hg, Cd, Pb nebo 1 % Zn, je rostlina považována za hyperakumulátor.

Za hyperakumulátor je považována rostlina, která kumuluje vysoké koncentrace toxických prvků (u As nad 0,1 %, u Cd nad 0,01 %), aniž by se u ní objevily nežádoucí symptomy. Mezi hyperakumulátory As patří kapradiny, pro Cd jsou to zejména brukvovité rostliny (*Thlaspi caerulescens*, *T. Praecox*, *Arabidopsis halleri*), rostliny z čeledi tlusticovité (*Crassulaceae*), konkrétně rozchodník (*Sedum alfredii*) (Verbruggen et al., 2009).

Kromě výše zmíněných rostlin vykazují vysokou toleranci k arsenu také tyto druhy – *Silene vulgaris*, *Hydrilla verticillata*, *potamogeton pectinatus*, *Eichhornia crassipes*, *Egeriadensa*, *Ceratophyllum demersum*, *Lepidium sativum*. Ze studií je známo, že rostlina přijímá největší množství arsenu kořenovým systémem. Přesto lze mezi hyperakumulátory zařadit i okřehek

(*Wolffia globosa*), který kořeny nemá. Okřehek je schopný kumulovat a tolerovat až 400 mg/kg As (Kumar et al., 2015).

V různých částech rostliny se působení těžkých kovů projevuje různým způsobem. Toxicita těchto kovů je přisuzována zejména třem mechanismům. Prvním mechanismem je spojitost kovu s proteiny přes specifické funkční skupiny – thiolové, histidinové a karbonylové skupiny, díky tomu může kov ovlivnit vnitřní struktury buňky a řadu procesů. Další možností je podpora tvorby ROS (reaktivní forma kyslíku), což působí rostlině oxidativní stres. Třetí cestou je vytržení nezbytných kationtů z určených vazebných míst. Rostliny často v takových situacích vyrábí ligandy, zejména pro Al, Cd, Cu, Ni, Co, Zn. Ligandy pro těžké kovy jsou např. karboxylové kyseliny, aminokyseliny, dále citrát, malát, oxalát, histidin, nikotinamid, fosfátové deriváty. Tyto látky se pozitivně podílí na tvorbě tolerance a detoxifikaci (Upadhyay, 2014).

Arsen působí celkově na růst rostliny, zejména ve fázi klíčení je tento efekt patrný. Výzkumy ukazují, že přítomnost arsenu prokazatelně snižuje klíčivost. Zvyšující se koncentrace arsenu ovlivňuje jak délku přirůstající hmoty, např. u kořenů, tak celkové množství vytvořené biomasy. Je však rozdíl, zda na rostlinu působí As(III) nebo As(V). Toxičtější z tohoto hlediska je As(III). Pokud porovnáme organické a anorganické sloučeniny arsenu z hlediska fytotoxicity, jednoznačně jsou toxičtější sloučeniny anorganické. Arsen může být přímo v rostlině methylován na organickou formu, což lze považovat za jistý projev detoxikace. Methylované formy arsenu jsou ale mnohem běžnější v živočišných či bakteriálních buňkách než v rostlinných, z čehož lze usuzovat, že methylace nebude pro rostlinu primárním způsobem detoxikace. Ale může to být důležitý mechanismus pouze pro některé rostlinné orgány, např. semena (Verbruggen et al., 2009).

Organické formy arsenu lze zřejmě metabolizovat. Chemická vazba mezi uhlíkem a arsenem je pravděpodobně stabilní v rostlině, ale rychle se rozpadá v půdě (Shri et al., 2009; Patra et al., 2004).

Obecně lze říct, že rostliny přijímají kovy povrchem svých nadzemních částí nebo skrze kořenový systém. Množství přijatých kovů závisí na rostlinném druhu, půdním typu, chemických podmínkách v půdě, koncentraci kovu, způsobu, jak se kov rozpouští v půdním roztoku, jeho pohyblivosti v systému, a ochotě přejít z kořenů do nadzemních částí (Patra et al., 2004; Upadhyay, 2014).

Rostliny často jako toleranci vůči kovům využijí mechanismus, že kovy uloží do nejstarších

listů a ty pak opadnou. Rozlišujeme několik způsobů antioxidační obrany při detoxikaci rostlin a to zejména tvorbu specifických sloučenin – superoxiddismutáza, kataláza, askorbátperoxidáza, glutathion, monodehydroaskorbát, glutathionreduktáza a dehydroaskorbát reduktáza. Tyto sloučeniny, antioxidační enzymy, hrají významnou roli při oxidačním stresu rostliny (Upadhyay, 2014).

Rostliny přijímají arsen zejména ve formě arseničnanů. Ty, když jsou redukovány, zapříčiní značný stres pro rostlinu, pozastavení růstu, fyziologické poruchy až odumření rostliny (Gunes et al., 2009).

Přijatý As(V) se v rostlině nejčastěji redukuje na As(III) pomocí enzymu ACR2 - arseničnanreduktázy (Verbruggen et al., 2009).

Tolerance k arsenu záleží na druhu rostliny a na strategii ne/přijetí arsenu.

Rostliny volí ze dvou strategií obrany proti arsenu – brání příjmu arsenu a omezí jeho transport do nadzemních částí rostliny (strategie nepřijetí arsenu) nebo uplatní metodu akumulace arsenu v rostlině (akumulační strategie). Záleží na rostlinném druhu a na stanovišti, na kterém se rostlina nachází (Soudek et al., 2006).

Jak již bylo uvedeno, arsen působí v rostlině na celou řadu procesů. Arsen, stejně jako i těžké kovy, vedou v rostlině k tvorbě volných radikálů a ke vzniku oxidačního stresu rostliny. Rostlina pak reaguje zvýšením tvorby specifických enzymů, jako jsou např. superoxiddismutáza, askorbátperoxidáza nebo peroxidáza. Tyto látky zmiňuje ve své studii i Upadhyay (2014).

Peroxisomy rostlinných buněk reagují na oxidační stres zvýšenou aktivitou antioxidačních enzymů, které jsou spojeny s askorbát-glutathionovým cyklem, který rostlina efektivně využívá k eliminaci oxidačního stresu způsobeného fyziologicko-biochemickými procesy, abiotickými a biotickými faktory (Smirnoff, 1996; del Río et al., 2003).

Enzymy katalyzují přeměnu volných kyslíkových radikálů na peroxid vodíku, ten je následně v peroxisomech odbourán na vodu (Shri et al., 2009).

Tripathi et al. (2012); Patra et al. (2004) upozorňují na ovlivnění fosfátových metabolismů v rostlinách (např. fosforylace a syntéza ATP) přijatým arsenem v obou anorganických formách. As(III) se váže na krajové thiolové skupiny proteinů a ovlivňují tak jejich strukturu a katalytické funkce.

Významným inhibujícím efektem je působení As(III) na omezení procesu buněčného dýchání v mitochondriích (Patra et al., 2004).

Je prokázáno, že vystavení rostliný expozici anorganické formě arsenu znamená tvorbu reaktivní formy kyslíku (ROS), který souvisí se změnou oxidačního stavu arsenu (z arseničnanu do formy As(III)). Mezi ROS patří superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíku. Jedná se o silná oxidační činidla, která působí značné škody na molekulách jako jsou lipidy a proteiny, a mohou působit i odumření buňky. Tyto formy jsou produkovány jako výsledek abiotického stresu rostliny, aby si udržely normální růst.

V mnoha přirozených podmínkách se těžké kovy stávají limitujícím faktorem pro růst rostlin (Upadhyay, 2014).

Rostliny vyvinuly mechanismy, jak ochránit buňku a buněčné systémy před působením ROS za využití enzymatických antioxidantů jako je superoxidodismutáza, kataláza a askorbátperoxidáza a neenzymatických antioxidantů jako je askorbát, glutathion a α - tokoferol. Změny aktivit těchto enzymů a antioxidantů bývají běžně zaznamenány a mohou být často použity jako indikátory oxidačního stresu v rostlině.

Přestože lze zaznamenat změny v jejich aktivitě při různých typech abiotického stresu, je k dispozici jen málo informací o efektu arsenu na tyto látky. Mimoto nebyl dříve zkoumán efekt interakce As a P na oxidativní stres a antioxidační metabolismus rostliny. Studie týkající se toxicity arsenu byly založeny na zkoumání arseničnanů, protože to je nejběžnější forma As v půdách.

Arsen a fosfor jsou analogy díky shodné elektronové konfiguraci a chemickým vlastnostem. V půdě tedy arseničnany a fosfáty soutěží o sorpční pozice. Znalosti o interakci arseničnanů a fosfátů jsou důležité pro lepší pochopení jejich příjmu a akumulaci rostlinou.

Předchozí studie pracovaly zejména s rostlinami, které jsou vůči arsenu hyperakumulátory, např. kapradina křídelnice (*Pteris vittata L.*), méně pak s hospodářskými plodinami (Gunes et al., 2009; Tripathi et al., 2012).

Dong et al. (2005) ve své studii pracovali právě s kapradinou *Pteris vittata L.* Jedná se o kapradinu, která je hyperakumulátor arsenu a je schopna svým oddenkem extrahovat As z vody a půdy a následně ho kumulovat v listech. Tuto rostlinu lze s výhodou využívat např. k dekontaminaci zamokřených stanovišť. Aby rostlina byla hyperakumulátorem, musí plnit tyto podmínky – efektivní příjem skrze kořeny (oddenek), efektivní přesun přijatého prvku do dalších částí rostliny, výrazně zvýšená tolerance vůči arsenu uvnitř buněk. Výrazně zvýšená tolerance vůči kovům se v rostlině utváří díky schopnosti biosyntézy ligandů obsahujících těžké kovy a v některých případech díky následnému rozčlenění ligand-kovového komplexu.

V rostlinách lze rozeznat dva způsoby vázání kovových ligandů – extracelulární cheláty organických kyselin (jako jsou výše uvedené kyseliny citrátového cyklu) a další možnosti jsou cytoplazmatické peptidové ligandy (včetně methalothioninu a fytochelátů).

Bylo zjištěno, že suchozemské rostliny obsahují zejména anorganické formy arsenu. Ovšem rostlina musí vyvinout takový mechanismus, kterým udrží a zároveň eliminuje určitou koncentraci přijatého toxického arsenu. Velice často se tedy vytváří komplexy. V některých rostlinách pěstovaných v prostředí arsenu tak byly objeveny fytochelatiny.

Fytochelatiny jsou peptidy vytvářené z glutathionu za přítomnosti enzymu fytochelatinsynthasy. Základní struktura fytochelatinů je $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ kde $(n = 2 - 11)$. Enzym nutný pro tvorbu fytochelátů (fytochelátsyntáza) je zdá se aktivován širokou škálou kovů a polokovů, resp. jejich iontů, zejména Cd, Ag, Pb, Cu, Hg, Zn, Sn, Au, As, nejlepší jsou však dvojmocné ionty kadmia. Přítomnost tohoto enzymu se předpokládá u všech vyšších rostlin, většiny řas a byl detekován i u některých hub (Soudek et al., 2006; Schat et al., 2002; Dong et al., 2005; Verbruggen et al., 2009).

Jak již bylo řečeno, fytochelatiny vznikají z glutathionu. Glutathion je prekurzorem fytochelátů. Glutathion je tripeptid tvořený z Glu-Cys-Gly (GSH) a je syntetizován γ -glutamylcysteinsyntetázou (γ -ECS) a glutathionsyntetázou (GS). GSH může vázat kovy a polokovy a je klíčovým metabolitem při tvorbě redoxní rovnováhy v buňce, čímž brání toxicitě kovů a polokovů. Stoupající syntéza GSH v buňce je považována za prostředek, jak zvýšit kapacitu vázaných kovů a polokovů a zároveň za způsob jak zvýšit obranu buňky proti oxidačnímu stresu.

Rozšířená tvorba fytochelátů byla zaznamenána u tolerantní lipnicovité rostliny medyňku vlnatého (*Holcus lanatus*). Vytváření komplexů As – GSH nebo As – PC bylo ověřováno u různých rostlin, jako jsou kromě medyňku (*Holcus lanatus*) i tropická rostlina zmijovice hadovitá (*Rauwolfia serpentina*), slunečnice roční (*Helianthus annuus*), brukev sítinovitá (*Brassica juncea*). V jedné studii, kterou zmiňují Tripathi et al. (2007), bylo determinováno 14 různých komplexů As u medyňku (*Holcus lanatus*). Mezi těmito komplexy byl popsán i jeden novější - methylarsenitan-PC₂. Nicméně Tripathi et al. (2007) zároveň uvádějí, že v rostlinách, které jsou hyperakumulátory As, tedy u různých kapradin (*Pteris vittata*), se As vyskytuje zejména v nenavázané anorganické formě, což naznačuje, že role fytochelátů u hyperakumulujících rostlin má své limity.

Přesto, pouze zvyšování tvorby GSH, resp. fytochelátů (PC), se zdá být nedostatečným

mechanismem k významnému zlepšení tolerance vůči Cd a As či jejich akumulaci. Konjugáty glutathionu mohou být transportovány do vakuol. Např. kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) se nespolehají při detoxikaci na fytocheláty, ale rozhodujícím faktorem jsou vakuolární transportéry (např. YCF1). U rostlin ale zatím není známý podobný homolog jako YCF1 u kvasinek. Nicméně je u rostlin evidována jiná látka, která funguje jako transportér pro arsen a kadmium, jedná se o ABC transportér u As(III)-GS3 a Cd-GS2. Slouží pro transport těchto prvků do vakuol rostlinných buněk (Verbruggen et al., 2009).

Verbruggen et al. (2009) zmiňují ještě methallotioneiny (MT), což jsou malé proteiny bohaté na aminokyselinu cystein. Zdá se, že komplexy kov – methallotionein se vyskytují jako součásti cytosolu. Jejich jasná úloha je známá v živočišných buňkách, kde tvoří komplexy s Cd. U rostlin jejich úloha tak objasněná není, ale velké množství důkazů je spojuje s homeostází mědi v rostlinných buňkách, a některé studie uvádí i souvislost se zvyšující se tolerancí rostliny vůči Cd.

Dong et al. (2005) ve své práci uvádějí, že aktivace enzymu běží pod vlivem kovových iontů do té doby, dokud nejsou tyto ionty navázány jako cheláty. Toto poskytuje mechanismus autoregulace biosyntézy fytochelátsyntázy. Po vytvoření komplexů jsou tyto přesunuty zpravidla do vakuol. Geny kódující tvorbu enzymu fytochelátsyntázy byly nezávisle na sobě izolovány ve 3 laboratořích z rostliny huseníček (*Arabidopsis*), z kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*) a z pšenice (*Triticum aestivum*). Avšak žádný takový gen nebyl do té doby identifikován u výše zmíněné kapradiny *Pteris vittata* L.. Právě o to se snažili ve své studii Dong et al. (2005).

Dong et al. (2005) zároveň uvádějí, že se rozcházejí názory na využití fytochelátsyntázy v rostlinách. Některé studie se přiklání k faktu, že tento enzym slouží pouze k detoxifikaci při setkání s kovem, jiné tvrdí, že hraje významnou roli v toleranci vůči As.

Formou vázání rizikových prvků v rostlině se zabývá i studie Pavlík et al. (2004). Jako rostlina je použita léčivka pocházející ze Sibíře parcha léčivá (*Leuzea carthamoides*). Cílem práce bylo potvrdit, že obsah zdraví škodlivých prvků v rostlině a jejich distribuce v rostlině není důvodem, proč přestat tuto rostlinu využívat jako léčivku. Byla prováděna analýza As, Cd, Cu a Pb. Studie opět dokazuje, že množství kovu vázaného v rostlině je závislé na koncentraci těchto prvků v půdě a na fyzikálně-chemických vlastnostech půdy. U Cd byla touto studií potvrzena vysoká mobilita, na rozdíl od olova, které má vysoké sorpční schopnosti vůči organické hmotě a minerálům.

Shri et al. (2009) uvádějí, že rostliny preferují při detoxikaci arsenu vazbu tohoto prvku v trojmocné formě na glutathion nebo na fytochelatiny. Při detoxikaci musí být arsen transportován do vakuol rostlinných buněk, pravděpodobně jako arsen – fytochelátový komplex.

Totíž detoxifikace arsenu indukovanými fytochelatiny byla potvrzena různými technikami, avšak mnoho experimentálních studií ztroskotalo na pokusu dokázat tvorbu komplexu arsen-fytochelatin, takže role fytochelatinů při akumulaci a detoxifikaci je stále nejasná. Přímá identifikace tohoto komplexu je problematická (Soudek et al., 2006).

Arsen působí nejen změnu metabolických pochodů v rostlině, ale indukuje i stresový metabolismus, aby rostlina mohla efektivně detoxifikovat přijatý arsen. Jednou z metabolických změn je změna metabolismu aminokyselin. Tento jev byl zkoumán např. u rostlin špenátu (Pavlík et al., 2010). Bylo zjištěno, že metabolismus aminokyselin hraje klíčovou roli v odolnosti rostliny v abiotických podmínkách. Pod vlivem působení arsenu na rostlinu dochází ke změnám koncentrací aminokyselin, zejména prolinu, kyseliny glutamové a asparagové, asparaginu a alaninu, a ke změnám aktivity enzymu glutamátkinázy.

Arsen se v rostlině ukázal jako inhibitor enzymu glutamátkinázy. Inhibice glutamátkinázy vede ke zvyšování obsahu kyseliny glutamové v rostlině.

Zároveň výzkum potvrdil zvyšující se množství volné aminokyseliny prolinu, když byla rostlina vystavena působení arsenu. Akumulace prolinu blokuje biosyntézu prolinu, následně dochází k tvorbě kyseliny glutamové, kterou rostlina potřebuje spolu s cysteinem k syntéze fytochelatinů.

Patra et al. (2004) ve své studii srovnávají působení arsenu, rtuti a olova na rostlinné systémy. Vychází z toho, že většina předchozích studií zkoumala míru genotoxicity na živočišných organismech nebo na mikroorganismech. Studií, které by zkoumaly účinky zmíněných třech kovů na vyšší rostliny, je jen málo, ačkoli arsen, olovo a rtuť prokazatelně mají klastogenní a mutagenní účinky na vyšší rostliny. Patra et al. (2004) to dokazují vznikem chromozomových abnormalit a zvýšením rychlosti buněčného dělení právě působením zmíněných kovů.

Jak zmiňují i předchozí studie, genetický efekt závisí na oxidačním stavu daného kovu, jeho koncentraci a délce expozice. Obecně lze říct, že negativní efekty se dostaví při vyšších koncentracích a delší době expozice. Různé rostlinné druhy ale reagují různě na stejné kovy v závislosti na počtu diploidních chromozomů, celkové délce diploidních částí a na množství přítomných metacentrických chromozomů.

Gunes et al. (2009) ve své studii zkoumali interakci As a P a vliv této interakce na růst cizrny, koncentraci As a P a vliv As na vyvolání oxidativního stresu u rostliny a tvorbu obranných mechanismů. Ze studie vyplynulo, že koncentrace arsenu ve výhoncích cizrny byla významně vyšší se stoupající dávkou aplikovaného fosforu. Koncentrace fosforu ve výhoncích byla také vyšší při vyšších aplikovaných dávkách fosforu, bez ohledu na množství aplikovaného arsenu. Ve všech aplikovaných dávkách fosforu došlo vlivem zvyšujících se dávek As ke snížení obsahu P ve výhoncích. Nesnížila se ale koncentrace, nýbrž došlo ke snížení produkce biomasy.

Dále ze studie vyplývá významná souvislost interakce As x P s efektem na lipidperoxidázu (MDA - malondialdehyd) v listech cizrny. Aplikace As zvýšila tvorbu této látky, bez ohledu na množství P, přestože aplikovaný fosfor množství lipidperoxidázy snižuje. Rostliny pěstované s 200 a 400 mg/kg P a 30 mg/kg As měly nižší množství MDA než rostliny pěstované se 100 mg/kg P a stejným množstvím As.

Další ze závěrů dle Gunes et al. (2009) je neprokázaný vliv interakce As x P na množství peroxidu vodíku v listech cizrny. Nicméně, koncentrace peroxidu vodíku byla významně vyšší s vyšší hladinou aplikovaného As a také významně nižší s vyšší hladinou P (větší snížení peroxidu při koncentraci fosforu 400 mg/kg než při 100 mg/kg). Fosfor nemá prokazatelný vliv na superoxiddismutázu. Je zde ovšem patrné zvýšení aktivity katalázy se stoupajícím množstvím arsenu. Dále je významná souvislost vlivu interakce As x P na askorbátperoxidázu.

Gunes et al. (2009) zjistili, že přestože aplikovaný fosfor nemá významný vliv na fytotoxicitu arsenu, byla koncentrace arsenu ve výhoncích cizrny výrazně vyšší po aplikaci fosforu, což je výsledek opačný než závěry některých předchozích studií.

V neposlední řadě jsou arsen a některé kovy (především kadmium) považovány za mutagenní. U živočišných buněk a buněk některých mikroorganismů (např. u kvasinek) studie prokazují, že Cd deaktivuje opravné a kontrolní pochody v DNA. Týká se to zejména procesu „mismatch repair“, což je dočasný kontrolní a opravný mechanismus využívaný při postreplicačních kontrolách nově syntetizované DNA. Předpokládá se, že podobně by Cd mohlo poškodit i genetickou informaci v rostlinných buňkách (Verbruggen et al., 2009).

Existují studie, které se snaží vyvinout rostliny, tzv. super-hyperakumulátory, které by se daly využít k fytoremediaci, protože toxicita As představuje nebezpečí po celém světě. Tato strategie ovšem vyžaduje rostlinný druh, který bude vysoce tolerantní vůči kontaminaci, bude

kumulovat toxické látky v nadzemních částech rostliny, bude mít rychlý nárůst biomasy a bude pěstovatelný v rozmanitých biotopech. Studie se snaží využívat metody genového inženýrství, např. zvýšené exprese genu pro tvorbu fytochelatinů a arseničnanreduktáz. Přesto v některých transgenních rostlinách zůstala nízká akumulární schopnost i přes zvýšenou toleranci k As. Pro srovnání Tripathi et al. (2007) uvádějí příklad přirozeného hyperakumulátoru *Pteris vittata*, který dokáže ukládat arsenitany v listech v koncentracích 10 až 30krát vyšších, než jsou koncentrace v substrátu, kde roste. *P. vittata* roste relativně rychle ve svém přirozeném prostředí, tedy za vyšší teploty a vlhkosti v okolí, ale šíření této rostliny do jiných podmínek je problematické. Pokud by se podařilo určit další podobné druhy, výrazně by se zvýšila pravděpodobnost, kdy půjde použít přírodní hyperakumulátory pro fytoremediace. Metodami genového inženýrství se vědci pokouší alternativní cestou zavést znaky hyperakumulátorů i do jiných rostlinných druhů. Avšak stále zbývá objasnit a vyvinout takové molekulární nástroje, které zcela odhalí mechanismy procesů, které probíhají v rostlinách jako je zmiňovaná *P. vittata*. (Tripathi et al., 2007).

Pathare et al. (2013) ve studii hodnotili působení arsenu na metabolické pochody dvou různě citlivých forem brukve (*Brassica juncea*). Pro nádobový pokus použili dvě formy rostliny – citlivou a tolerantní, a pěstovali je na kontaminované půdě arsenem a kontrolní variantu na písku. Sklizeň se odehrála sedmý a patnáctý den. Studie hodnotila různé metabolity a enzymy metabolismu C, N, S a kyselinu γ -aminomáselnou (GABA). GABA je aminokyselina, kterou rostliny vytváří v reakci na různý abiotický stres a hromadí ji v rostlinných pletivech. Substrátem pro tvorbu této kyseliny je glutamát. U citlivé formy rostliny byly při sklizni sedmý den zjištěny vyšší koncentrace As a výrazně stouply stresové faktory – tvorba superoxidových radikálů, malondialdehydu, odumírání buněk, než ve srovnávané tolerantní formě. V tolerantní formě se ale objevilo více peroxidu vodíku. Množství GABA a aktivita glutamátdekarboxylázy stouply v kořenech i výhoncích tolerantní formy rostliny. Množství fumarátu a sukcinátu bylo zachováno v kořenech a výhoncích tolerantní formy, u citlivé pouze ve výhoncích. Prokazatelná byla i změna metabolismu síranů a dusičnanů a aminokyselin. Nicméně po 15 dnech bylo množství kumulovaného As shodné u obou pěstovaných variant, stejně jako se zvýšilo množství GABA, dusičnanů, a síranů v kořenech i výhoncích (s výjimkou síranů u citlivé formy). Studie tedy dokládá, že reakce metabolismu C, N, S se liší v odrůdě a jsou i časově závislé. Pozorovatelné byly rozdíly v nárůstu biomasy, tolerantní forma byla větší a nevykazovala redukci délky výhonků a kořenů jako varianta

citlivá.

Jiné studie, zmíněné u Pathare et al. (2013) dokládají, že As působí u klíčící rostliny (*Brassica juncea*) narušení metabolismu adeninu a pyridinu. Dále As naruší asimilaci dusíku a způsobí změny v metabolismu esenciálních i neesenciálních aminokyselin. Dobře známý je také vliv na metabolismus síry. Sloučeniny síry (glutathion a fytocheláty) jsou velmi potřebné pro detoxikaci nejen pro navázání As(III), ale také při tvorbě ROS, což jsou již výše zmiňované reaktivní formy kyslíku, které také se uplatňují při detoxikaci As.

3.3 Využívání sekvenční extrakce a vyhodnocování IR spekter

Sekvenční extrakce je běžně pětikrokový proces, který poskytuje pouze základní informace o rozmístění prvků a funkčních skupin na organických sloučeninách.

Pavlíková et al. (2005) tento proces vylepšili přidáním dvou dalších kroků. Došlo k přidání butanolové frakce mezi původní ethylacetátovou a methalovou a dále k přidání vodné frakce po methanolovovodné. Izolované frakce byly charakterizovány pomocí analýzy IR spekter.

Popis IR spekter se využívá zejména pro kvalitativní analýzu, tedy pro určení typu funkčních skupin ve zkoumaném vzorku. Pro identifikaci je nutná tabulka vlnočtů charakteristických vibrací a v neposlední řadě také předchozí znalosti. Některé funkční skupiny jsou charakterizovány několika absorpčními pásy, jiné pouze jedním. Pro určení dané funkční skupiny je třeba vyhledat všechny absorpční pásy, které funkční skupinu určují. Měly by korespondovat nejen hodnoty vlnočtů, ale i intenzity absorpčních pásů. Hodnota intenzity absorpčních pásů může být ale ovlivněna množstvím funkčních skupin ve zkoumaném vzorku.

Lipofilní složky s malým obsahem Cd, Cu a Zn byly separovány v prvních dvou frakcích. Složky s vyšším obsahem As (11,5 – 12,8% celkového obsahu) byly extrahovány v druhé frakci. Tyto dvě frakce tvořily nejmenší podíl ze všech izolovaných frakcí. Ve třetí a čtvrté frakci byly izolovány nízkomolekulární látky sekundárního metabolismu a polární lipidy. Vysokomolekulární látky (především polypeptidy a bílkoviny) byly separovány v páté a šesté frakci. Přidání vodné frakce bylo částečně použito i pro oddělení látek, které mají prokazatelný dopad na množství stopových prvků. V methanolové frakci byla izolována většina As (35,5 – 38,8% celkového množství), Cu (45,0 – 51,6%) a Zn (39,8 – 47,2%). Další frakce obsahovala (po provedení kyselé hydrolýzy) polární látky a většinu Cd. Poslední frakce obsahovala neextrahovatelné zbytky (polysacharidy, proteiny).

Narozdíl od jiných pokusů studie Pavlíková et al. (2005) se snažili separovat skupinu makromolekulárních látek, často specifických proteinů nebo polypeptidů, které vážou stopové prvky (fytochelatiny, methalothioneiny) nebo izolovat a následně identifikovat specifické látky, které rostlina tvoří jako reakci na stres (např. peroxidasy, glutamátkinasy apod.).

Určení těchto látek může pomoci rozšířit znalosti o rostlinném metabolismu.

Pavlíková et al. (2005) ve své studii uvádějí, že proces sekvenční extrakce byl prováděn i dříve za použití jiných extrakčních rozpouštědel. Pavlíková et al. (2005) popsali separaci a izolaci nízkomolekulárních látek v závislosti na jejich polaritě, pak následovala extrakce makromolekulárních látek. Ve své studii uvádějí následující popis IR spekter. Petroletherová frakce obsahovala nepolární lipidové látky, jak ukazuje IR spektrum. Nejdůležitější složkou této frakce byly volné steroly a estery mastných kyselin (glyceridy) a uhlovodíky (α -spinasterol, cholesterol, 7-dehydrostigmasterol, stigmasterol, stigmanol, což jsou rostlinné hormony identifikované v listech špenátu). Celkové množství sterolů stoupá se stoupající koncentrací kadmia v rostlině. Změny koncentrací sterolů v rostlině ovlivňují polaritu a propustnost membrán buněk. Na základě hodnocení IR spekter můžeme předpokládat, že množství solí mastných kyselin a fosforu a sloučenin arsenu vázaných na nepolární fosfolipidy a arsenolipidy je malé.

Druhá frakce (ethylacetátová) obsahovala větší množství arsenu (11,5 – 12,8 %) ve srovnání s jinými prvky. Z IR spektra je patrné, že jsou ve frakci přítomné lipidové látky a produkty sekundárních metabolismů rostliny (steroly a mastné kyseliny vázané na fosfolipidy, např. fosfocholin, monogalaktolipidy, digalaktolipidy). Absorbční pás kolem 1515 cm^{-1} dokazuje přítomnost aromatických sloučenin (flavonoidy, kyselina fenylpropanová a její estery, kyselina kumarová). V oblasti 1659 cm^{-1} byla nalezena kombinace keton – fytoekdysteroid (např. 20-hydroxyekdyson). Ve druhé frakci nalezneme rozdíly mezi variantou kontaminovanou a kontrolní. Rozdíly jsou v oblastech absorpčních pásů 1719 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} a 2852 cm^{-1} . Vysvětlením může být rozdílná velikost nasycených a nenasycených mastných kyselin.

Butanolová frakce v tomto extrakčním postupu oddělí složky, které byly v původním procesu separovány do methanolové frakce. Množství této frakce je prokazatelně větší a tím stoupá i množství stopových prvků v této frakci (z původních 7,4 % na 15,5 %). V této frakci se oddělily aromatické látky (kyselina fenylpropanová vázaná na glukosu, kyselina vinná a její soli, flavonoidní glykosidy). Některé ze silněji vázaných látek, které se neoddělily ve druhé

frakci, se oddělily nyní. Absorbční pás 1631 – 1730 cm^{-1} dokazuje přítomnost čtyř různých karbonylů z rozdílných kyselin a také přítomnost kyselin z citrátového cyklu. Stopové prvky se zde mohou vázat na karboxylové skupiny v přítomných kyselinách. Opět můžeme sledovat rozdíly u kontaminované varianty špenátu a varianty kontrolní. V kontrolní variantě je absorbční pás 1631 – 1730 cm^{-1} slabší a méně diferencovaný než u varianty kontaminované. Další výrazný rozdíl je v oblasti 990 – 1170 cm^{-1} . Toto spektrum je silnější u varianty kontrolní. Výsledky ukazují, že prvky a organické sloučeniny obsažené v aplikovaných kalech ovlivňují látky extrahované ze špenátu v této frakci. Toto je další důkaz důležitosti této přidané frakce.

Methanolvá frakce je největší frakcí pro obě varianty (kontaminovaná i kontrolní). Většina arsenu, mědi i zinku byla určena právě v této frakci. Absorbční pásy jsou výrazné v oblastech 1608 a 1404 cm^{-1} a odpovídají solím různých kyselin. Intenzita je vyšší u varianty kontaminované. V této frakci byly nalezeny např. kyselina jantarová, jablečná nebo mesovinná. V této frakci také najdeme kyseliny, které tvoří speciální chelatační činidla pro Fe^{+3} , Cu^{+2} . Stopové prvky se mohou vázat právě na tyto kyseliny, na jejich karboxylové skupiny, což dokazují IR spektra. Absorbční pás ze vzorku kontrolní varianty v oblasti 1170 cm^{-1} koresponduje s aromatickými sloučeninami.

Dále následuje frakce methanolvodná. Množství této frakce je výrazně větší u kontaminované varianty, množství Cd, Cu a Zn jsou prokazatelně větší. Množství arsenu až tak zvýšené nebylo. IR spektra v této frakci dokazují polypeptidy a bílkoviny. Mezi polypeptidy patří i kalmodulin, významný při metabolismu vápníku, a kalsequestrin, což je polypeptid s vysokou kapacitou a nízkou afinitou k vápenatým kationtům. Proto může kalsequestrin hrát významnou roli při vazbě stopových prvků. V této frakci mohou být extrahovány hůře rozpustné soli kyselin, např. šťavelany. Stejně jako u předchozí frakce, i zde se intenzita absorbčních pásů zvyšuje při kontaminaci.

Další frakcí je vodná frakce. U kontaminované varianty špenátu se v této frakci zvýšil obsah všech stopových prvků. Největší nárůst je pozorován u Cd. Toto jen potvrdilo potřebu přidat vodnou frakci do původní pětikrokové sekvenční extrakce. Dále se ve vodné frakci extrahovaly pektiny, proteiny, kyselina fytoová, přestože některé z těchto látek se extrahovaly již do frakce methanolvodné. V IR spektrech této frakce se objevily velké rozdíly u varianty kontaminované a kontrolní. Důležitými složkami této frakce jsou stopové prvky vázané na methallothionein. Intenzita absorbčních pásů v oblastech 1634 - 1685 cm^{-1} a 3270 cm^{-1} se

výrazně zvyšuje u kontaminované varianty. Takže tato frakce obsahuje vysoké množství pektinu, fytinu a kyseliny fytové.

Mezi posledními dvěma frakcemi nebyly rozdíly mezi variantami příliš patrné. Předposlední frakce je methanol + voda + HCl a poslední frakce jsou neextrahovatelné zbytky. V předposlední frakci bylo nalezeno nejvíce Cd, významné bylo i množství Zn.

V poslední frakci byly zjištěny nízké koncentrace všech prvků a množství stopových prvků byla nižší v biomase špenátu pěstovaném na kontaminované půdě (Pavlíková et al., 2005).

Použití sekvenční analýzy rostlinné biomasy vedlo k lepším výsledkům z hlediska obsažených stopových prvků a metabolitů, na které mají stopové prvky vliv. Tato metoda pomáhá popsat vztah mezi stopovými prvky a biosyntézou stresových metabolitů.

Sekvenční extrakce byla použita i ve studii Pavlík et al. (2004). Tento postup odhalil rozdílná množství prvků v jednotlivých frakcích. Petroletherová a acetátová frakce obsahovaly nejmenší množství prvků, kterými se tato studie zabývala (Cd, Cu, Pb, As). IR spektra ukázala v petroletherové frakci pouze dlouhé uhlíkaté řetězce a malé množství esterů mastných kyselin. V ethylacetátové frakci pak byly přítomné nasycené a nenasycené mastné kyseliny. V butanolové frakci pak bylo přítomno větší množství Cd (3,9% z celkového množství). Předpokládá se vazba tohoto prvku na karboxylovou funkční skupinu kyseliny fenypropanové. V ethylacetátové a butanolové frakci se nacházely také polyacetylenové sloučeniny, což jsou typické produkty sekundárního metabolismu *L. carthamoides*. Tyto sloučeniny souvisí se stresovým metabolismem rostliny. Methanolová frakce obsahovala zejména kyseliny a volné aminokyseliny a největší množství zkoumaných prvků. Bylo zde sice jen malé množství As, Cd a Pb, ale velké množství Cu. To je pravděpodobně zapříčiněno vlivem vazby Cu na karboxylovou skupinu kyselin.

V prvních čtyřech frakcích byly izolovány i léčivé látky, kvůli kterým se rostlina *L. carthamoides* využívá. Zbylé frakce pak obsahovaly největší množství zdraví škodlivých prvků. Sekvenční extrakce poskytuje informace o navázání zdraví škodlivých prvků na hlavní funkční skupiny sloučenin, na enzymy, oligopeptidy, polypeptidy a proteiny (Pavlík et al., 2004).

V dříve prováděném pokusu se špenátem (Pavlíková et al., 2001) byla ve stejných frakcích izolována menší množství Cd a Zn.

3.4 Možnosti hodnocení získaných obsahů z měřených prvků

Jak vyplývá z publikací o sekvenční extrakci rostlinného materiálu (Pavlík et al., 2004; Pavlíková et al., 2002; Pavlíková et al., 2005), existují tři možnosti hodnocení získaných obsahů z měřených prvků. Tyto hodnoty lze pak charakterizovat jako množství analyzovaného kovu na frakci nebo na frakci v přepočtu na sušinu a nebo na čerstvou hmotu, resp. tyto hodnoty převést na %, jak bylo většinou v těchto pracích vyjadřováno (Pavlík et al., 2004; Pavlíková et al., 2002; Pavlíková et al., 2005).

Možnost číslo I je vyjádření obsahu z měřeného prvku v 1 mg izolované frakce. Tento přepočet bude využit pro studium korelací mezi vybranými prvky. Metabolom, resp. obsah všech sloučenin nacházejících se v rostlině, se mění v souvislosti s ontogenetickou fází dané rostliny a je závislý na působení abiotických a biotických faktorů.

Obsah prvků v jednotlivých frakcích souvisí se změnou metabolismu rostliny. Je proto přímá souvislost změny stresového metabolismu, které se odráží přímo v obsahu obsažených rostlinných látek a prvků na ně navázané.

Možnost číslo II je přepočet obsahu prvků na 1 g sušiny pro izolované frakce. Obsah vybraných sloučenin izolovaných v jednotlivých frakcích se mění různě. Zároveň se mění i poměr hmotností těchto frakcí mezi sebou v souvislosti s ontogenetickou fází, a to nezávisle na působení přijatých prvků. Jde především o ty sloučeniny, které zásadně nesouvisí s rezistencí a tolerancí rostliny k zvýšenému příjmu (v našem případě) arsenu. Tyto fyziologické změny jsou důležité pro rostlinu v souvislosti se zachováním rostlinného druhu - tvorba semen. Tyto změny rostlinného metabolismu jsou zároveň ještě modifikovány stresovým metabolismem, který je indukován jak biotickými faktory tak abiotickými faktory včetně studovaného vlivu arsenu.

Možnost číslo III je přepočet obsahu prvků ve studované frakci na výnos rostliny - čerstvé biomasy. Výnos rostliny lze rozdělit podle polaritý obsažených sloučenin do námi izolovaných frakcí, a tak lze sledovat významnost dané frakce v souvislosti s obsahem daného prvku v ní obsaženého. Vliv stupňovaných dávek arsenu mění akumulaci těchto syntetizovaných sloučenin včetně regulace obsahu vody v rostlinách. Tento způsob přepočtu pak zahrnuje celkové významné změny v obsahu zastoupení organických a anorganických sloučenin v rostlinách vlivem stupňovaných dávek arsenu. Stupňované dávky arsenu se promítají proto jak do celkového výnosu rostliny, který je tvořen vodou a sloučeninami obsaženými v izolovaných frakcích, tak prvků na ně vázaných.

Proto v metodice využijeme I. přepočtu, protože budeme moci sledovat vztah jednotlivých prvků obsažených v dané frakci, které jsou modifikovány vlivem stupňovaných dávek arsenu. Právě tento přepočet pomůže ukázat, zda specifické sloučeniny obsažené v konkrétní frakci, jenž vážou studované prvky pomocí vypočítaných korelací, spolu souvisí.

4 Metodika

4.1 Nádobový pokus – vypěstování špenátu

Dle práce (Pavlíková et al., 2005) byl založen nádobový pokus se špenátem (*Spinacia oleracea L.*). Špenát byl zvolen záměrně díky své významné schopnosti kumulovat stopové prvky a krátké době růstu. Zemina byla před vysetím špenátu kontaminována arsenem v podobě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Jako zemina pro tento pokus byla použita modální černozem. Podíl organického uhlíku v zemině, její pH a kationtovou výměnou kapacitu udává tabulka v přílohách (Tab. 11).

Pokus zahrnoval 4 varianty a každá z nich měla 3 opakování. První varianta pokusu byla kontrolní, bez kontaminace. Druhá varianta As1 byla kontaminována dávkou 50 ppm. Třetí varianta As2 byla kontaminována dávkou 100 ppm. Čtvrtá varianta As3 byla kontaminována dávkou 150 ppm.

Čerstvá biomasa špenátu byla využita pro sekvenční extrakci.

4.2 Sekvenční extrakce

Postup extrakce vychází z publikace Pavlík et al. (2010). Sekvenční extrakce byla provedena v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Jednotlivé frakce z rostlinného materiálu byly izolovány dle následujícího bodově strukturovaného postupu:

1. **Úprava vzorku:** Homogenizace + odvážení
- 2.1. **Extrakce methanolem (MeOH):** 11 x 50 ml, ultrazvukováno 40 minut
- 2.2. **Odpařování extraktu k vytřepání:** Odpařeno na 1/100 objemu a rozpuštěno v 150 ml MeOH a 100 ml H_2O
- 2.3. **1. Vytřepávající systém:** Vytřepávání rozpuštěného extraktu. Přesněji jde o extrakci kapaliny (MeOH + voda (3:2)) kapalinou (petrolether)
 - 2.3.1. **Základní vytřepávání:** 12 x 50 petroletherem - získány dvě frakce *a*) petroletherová frakce *Pe/fla* a *b*) vodně methanolvá frakce *VM/fla* (pro závěrečné spojení)
 - 2.3.2. **Odpařování frakce - VM/fla:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrováním je odstraněn MeOH
 - 2.3.3. **Odpařování frakce - Pe/fla:** Zakoncentrováno na 150 ml
 - 2.3.4. **Zpětné vytřepání Pe/fla:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml MeOH + H_2O (1:1) - získány dvě frakce *a*) petroletherová frakce - *Pe/fb1* (pro závěrečné spojení) a *b*) vodně metanolvá

frakce - *VM/f1b*

- 2.3.5. **Závěrečné zpětné vytřepání *VM/f1b*:** Získaná frakce po zpětném vytřepání *VM/f1b* se vytřepala 1 x 50 ml a 1 x 30 ml petroletherem - získány dvě frakce **a)** petroletherová frakce - *Pe/f2* (pro závěrečné spojení) a **b)** vodně methanолоvá frakce *VM/f1c* (pro závěrečné spojení)
- 2.6.1.1 **Úprava petroletherové frakce = I. frakce:** Spojení frakce *Pe/fb1* + *Pe/f2* a odpaření do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 2.6.1.2 **Analýza I. frakce:** HPLC (analýza volných a konjugovaných sterolů, především β -sitosterolu), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 2.3.6. **Úprava vodně MeOH frakcí - *VM/f1*:** Spojení frakcí *VM/f1a* + *VM/f1c* a odpařeno na 1/10 objemu.
- 2.4. **Rozpuštění frakcí - *VM/f1*:** Rozpuštěno pomocí ultrazvuk v 150 ml vody a s 30 ml BuOH
- 2.5. **2. Vytřepávající systém:** Vytřepávání rozpuštěné frakce mezi vodu a butanol. Přesněji jde o extrakci kapaliny (voda) kapalinou (butanol = BuOH)
- 2.5.1. **Základní vytřepávání:** 8 x 30 BuOH - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce - *B/f1a* a **b)** vodná frakce - *V/f1a* (pro závěrečné spojení)
- 2.5.2. **Odpařování frakce *V/f1a*:** Odpařeno na 1/10 objemu - zakoncentrování
- 2.5.3. **Odpařování frakce - *B/f1a*:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 2.5.4. **Zpětné vytřepání *B/f1a*:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml H₂O - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce *B/fb1* (pro závěrečné spojení) a **b)** vodná frakce *V/f1b*
- 2.5.5. **Závěrečné zpětné vytřepání *V/f1b*:** Získaná frakce po zpětném vytřepání *V/f1b* se vytřepala 1 x 50 ml a 1 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce - *B/f2* (pro závěrečné spojení) a **b)** vodná frakce *V/f1c* (pro závěrečné spojení)
- 2.6.2.1. **Úprava 1. BuOH frakce = II. frakce:** Spojení frakcí *B/fb1* + *B/f2* a odpaření do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 2.6.2.2. **Analýza II. frakce:** HPLC (ekdysteroidy), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 2.6.3.1. **Úprava 1. vodné frakce = III. frakce:** Spojení frakce *V/f1a* + *VM/f1c* a odpařeno do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze

podle typu analýzy.

- 2.6.3.2. **Analýza III. frakce: GC-MS** (analýza volných a vázaných aminokyselin), **IR** (metabolomická analýza), **ICP** (stanovení prvků)
- 3.1. **Extrakce MeOH + H₂O (1:1):** 15 x 50 ml, ultrazvukováno 40 minut
- 3.2. **Odpařování extraktu k vytřepání:** Odpařeno na 1/300 objemu a rozpuštěno v 40 ml BuOH a 200 ml H₂O
- 3.3. **2. Vytřepávající systém:** Vytřepávání rozpuštěného extraktu. Přesněji jde o extrakci kapaliny (voda) kapalinou (butanol - BuOH)
 - 3.3.1. **Základní vytřepávání:** 8 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce *a*) BuOH frakce - *B/fla* a *b*) vodná frakce - *V/fla* (pro závěrečné spojení)
 - 3.3.2. **Odpařování frakce *V/fla*:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrování
 - 3.3.3. **Odpařování frakce - *B/fla*:** Zakoncentrováno na 150 ml
 - 3.3.4. **Zpětné vytřepání *B/fla*:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml H₂O - získány dvě frakce *a*) BuOH frakce *B/fb1* (pro závěrečné spojení) a *b*) vodná frakce *V/flb*
 - 3.3.5. **Závěrečné zpětné vytřepání *V/flb*:** Získaná frakce po zpětném vytřepání *V/flb* se vytřepala 1 x 50 ml a 1 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce *a*) BuOH frakce - *B/f2* (pro závěrečné spojení) a *b*) vodná frakce *V/flc* (pro závěrečné spojení)
- 3.6.1.1. **Úprava 2. BuOH frakce = IV. frakce:** Spojení frakcí *B/fb1* + *B/f2* a odpaření do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 3.6.1.2. **Analýza IV. frakce: HPLC** (ekdysteroidy), **IR** (metabolomická analýza), **ICP** (stanovení prvků)
- 3.6.2.1. **Úprava 2. vodné frakce = V. frakce:** Spojení frakce *V/fla* + *VM/flc* a odpařeno do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 3.6.2.2. **Analýza V. frakce: GC-MS** (analýza vázaných aminokyselin), **IR** (metabolomická analýza), **ICP** (stanovení prvků)
- 4.1. **Extrakce H₂O při 25-30°C:** 15 x 50 ml, ultrazvukováno 2x30 minut a 30 minut pauza
- 4.2. **Úprava 3. H₂O frakce při 25-30°C = VI. frakce:** Frakce je odpařená do sucha, zvážená a po odvážení vzorků k analýze jsou připraveny vzorky k analýze podle typu analýzy.

- 4.6. **Analýza VI. frakce:** GC-MS (analýza vázaných aminokyselin), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 5.1. **Extrakce H₂O při 90-95°C:** Systém postupné extrakce H₂O. Vzorky se extrahují postupně při následujících podmínkách; 90-95°C, ultrazvukováno 30 minut s 50 ml a 10 minut vařeno při 100°C, pak necháno 20 minut nad lázní a nakonec 90-95°C ultrazvukováno 30 minut vzorek. Celý systém byl opakován 3 krát. Nakonec byl vzorek extrahován 50 ml H₂O při 90-95°C ultrazvukován 30 minut. Zbylá voda byla ze vzorku odstraněna vypláchnutím vzorku s 50 ml MeOH.
- 5.2. **Úprava 4. H₂O frakce při 90-95°C = VII. frakce:** Frakce je odpařená do sucha, zvážená a po odvážení vzorků k analýze jsou připraveny vzorky k analýze podle typu analýzy.
- 5.6. **Analýza VII. frakce:** GC-MS (analýza vázaných aminokyselin), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 6.1. **Extrakce MeOH+H₂O+HCl (493:493:14):** 5 dnů 1x 100 ml, 60 dnů 20 x 50 ml
- 6.2.1. **Odpařování extraktu:** Do manipulační baňky s 150 ml extraktu, kam se průběžně slívají jednotlivé izolované extrakty bylo přidáno 5 ml BuOH a průběžně je zde odpařováno po každých 150 ml roztoku skoro na 1/50, opět přidat 2 ml BuOH a 5 ml MeOH a odpařit skoro do sucha. Po každém přidání 3 x po 5 ml MeOH vždy odpařit do sucha. Tím se zbavíme zbytkové HCl a pH bude neutrální.
- 6.2.2. **Odpařování extraktu, přenášení a skladování pro vytřepávání:** Vzorek se průběžně z manipulační baňky po odstranění HCl přenášel po rozpuštění do zásobní baňky, kde byl opět odpařen. Po ukončení extrakce byla frakce rozpuštěna v 40 ml BuOH a 200 ml H₂O
- 6.3. **2. Vytřepávající systém:** Vytřepávání rozpuštěného extraktu. Přesněji jde o extrakci kapaliny (voda) kapalinou (butanol - BuOH)
- 6.3.1. **Základní vytřepávání:** 8 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce *a*) BuOH frakce - *B/fla* a *b*) vodná frakce - *V/fla* (pro závěrečné spojení)
- 6.3.2. **Odpařování frakce *V/fla*:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrování
- 6.3.3. **Odpařování frakce - *B/fla*:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 6.3.4. **Zpětné vytřepání *B/fla*:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml H₂O - získány dvě frakce *a*) BuOH frakce *B/fb1* (pro závěrečné spojení) a *b*) vodná frakce *V/flb*
- 6.3.5. **Závěrečné zpětné vytřepání *V/flb*:** Získaná frakce po zpětném vytřepání *V/flb* se

vytřepala 1 x 50 ml a 1 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce - **B/f2** (pro závěrečné spojení) a **b)** vodná frakce **V/flc** (pro závěrečné spojení)

- 6.6.1.1. **Úprava 3. BuOH frakce = VIII. frakce:** Spojení frakcí **B/fb1** + **B/f2** a odpaření do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 6.6.1.2. **Analýza VIII. frakce:** HPLC (? flavonoidy), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 6.6.2.1. **Úprava 5. vodné frakce = IX. frakce:** Spojení frakce **V/fla** + **VM/flc** a odpařeno do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 6.6.2. **Analýza IX. frakce:** GC-MS (analýza vázaných aminokyselin), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 7.1. **Izolace a úprava extrakčních zbytků = X. frakce:** Kvantitativní převedení na Petriho misky a v sušárně vysušeno do sucha při 40°C do konstantní hmotnosti.
- 7.6. **Analýza X. frakce:** IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)

4.3 Jednotlivé analýzy

V jednotlivých frakcích byl po rozkladu ve směsi oxidačních plynů ($O_2+O_3+NO_x$) v přístroji Apion (Tessek, ČR) stanoven obsah As a vybraných prvků (ICP-OES, (Varian VistaPro, Australie)). Stanovení byla provedena na Katedře agro-environmentální chemie a výživy rostlin ČZU v Praze pod vedením prof. Ing. Jiřiny Szákové, CSc. Obsahy analyzovaných prvků ve výsledcích jsou vyjádřeny jako obsah změřeného prvku v 1 mg izolované frakce. Izolované frakce byly charakterizovány pomocí IR analýzy. Analýza IR spekter byla provedena v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR Ing. Soňou Vašíčkovou, CSc.

5 Výsledky

5.1 Analýza prvků a výskytu sloučenin v jednotlivých frakcích

Sledovali jsme, zda zvýšení arsenu dodaného do půdy může ovlivnit obsah analyzovaných prvků v daných frakcích rostlinné biomasy v souvislosti se změnou obsahu arsenu v analyzovaných frakcích a v souvislosti s různou dobou odběru.

Přepočet obsahu z měřeného prvku v 1 mg izolované frakce je ukázán v následujících tabulkách 1 - 9 u jednotlivých frakcí.

IR spektra analyzovaných frakcí jsou uvedena pomocí jejich charakteristických spekter. Ta slouží k velmi stručné charakterizaci sloučenin izolovaných v těchto frakcích.

Vlastní analýza se skládá z 10 frakcí, jak je patrné ze schematického znázornění, viz. přílohy (obr. 1). Z důvodu zvýšení účinnosti byly zařazeny navíc vodné frakce ve srovnání s jinými studii.

1. frakce

I. frakce je petroletherová frakce z methanolového extraktu. Tato frakce obsahovala nejméně polární sloučeniny lipofilního charakteru. Obsah prvků je uveden v tabulce 1. Této frakci odpovídá IR spektrum, obr. 2. V této frakci se nacházelo největší množství As ve srovnání s ostatními. V první frakci lze pozorovat nejvýznamnější korelace u vlivu obsahu vápníku na obsah fosforu, vápníku na hořčík, fosforu na hořčík (a opačně), zinku na fosfor a fosforu na železo. V této frakci je nutno zmínit i vliv obsahu arsenu na obsahu vápníku a železa na obsah fosforu. Korelace jsou doloženy výpočtem koeficientu determinace (přílohy, graf 1 – 22).

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/I(1/1)	Pe	0,192	0,011	0,008	0,891	0,066	0,017	0,333	0,851	1,729
Šp07As1/a/I (5/1)	/	0,220	0,010	0,002	0,241	0,024	0,004	0,017	0,332	0,613
Šp07As2/a/I(6/1)	MeOH	0,341	0,016	0,064	0,376	0,038	0,007	0,042	1,533	1,264
Šp07As3/a/I(4/1)		0,129	0,008	0,001	0,868	0,043	0,016	0,034	0,510	1,181
Šp07As1/b/I (2/1)		0,233	0,010	0,011	0,875	0,072	0,005	0,149	0,937	1,665
Šp07As2/b/I(3/1)		0,113	0,018	0,033	1,100	0,057	0,002	0,164	0,726	1,759

Tabulka 1: Petroletherová frakce z methanolového extraktu

2. frakce

II. frakce je butanolová z methanolového extraktu. Druhá frakce je polárnější. Obsahuje sloučeniny lipofilní i sloučeniny sekundárního metabolismu rostliny, což dokládá IR spektrum na obrázku 3 (přílohy obr. 3). Dříve byly v této frakci stanoveny ekdysteroidy. Změny množství jednotlivých sledovaných prvků uvádí tabulka 2. V této frakci při prvním odběru můžeme sledovat zejména nárůst množství železa při srovnání varianty kontrolní a variant kontaminovaných. Dále se významně mění množství vápníku. Železo i vápník jsou pro rostlinu esenciálními kovy, které se vyskytují pouze v dvojmocné formě. Mezi významné korelace v této frakci patří vliv obsahu zinku na obsah arsenu, vliv železa na arsen, mědi na zinek a arsenu na vápník. Korelace jsou doloženy výpočtem koeficientu determinace (přílohy, graf 23 - 42).

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/II (1/2)	1. BuOH	0,131	0,002	0,017	0,280	0,108	0,003	0,062	0,858	0,386
Šp07As1/a/II (5/2)	/	0,137	0,000	0,011	0,446	0,088	0,002	0,068	0,595	0,428
Šp07As2/a/II (6/2)	MeOH	0,172	0,002	0,015	0,746	0,097	0,001	0,065	1,335	0,640
Šp07As3/a/II (4/2)		0,025	0,004	0,006	1,058	0,083	0,001	0,049	0,840	0,720
Šp07As1/b/II (2/2)		0,175	0,002	0,011	0,322	0,071	0,004	0,075	1,611	0,336
Šp07As2/b/II (3/2)		0,152	0,004	0,012	0,827	0,079	0,005	0,085	1,310	0,359

Tabulka 2: Butanolová frakce z methanolového extraktu

3. frakce

III. frakce je první vodná frakce z methanolového extraktu.

Tato vodná frakce obsahuje již polární lipofilní sloučeniny, řadu organických rostlinných kyselin a jejich rozpustných solí. V této frakci byly již dříve stanoveny některé vybrané aminokyseliny. Této frakci odpovídá IR spektrum obrázek 4, viz. přílohy. Tato frakce patří mezi větší. Z tabulky 3 je patrné zvýšení obsahu téměř všech sledovaných prvků. Nejvýrazněji je nárůst vidět u Cd, Fe, Ca a Mg. Významné korelace sledujeme u vlivu obsahu železa na obsah arsenu, dále u vlivu arsenu na vápník a mědi na zinek. Tabulka byla sestavena pomocí grafů 43 – 64.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/III (1/3)	1. H ₂ O	0,015	0,002	0,021	0,201	0,108	0,017	0,260	0,177	3,184
Šp07As1/a/III (5/3)	/	0,021	0,004	0,025	0,383	0,061	0,011	0,209	0,272	3,144
Šp07As2/a/III (6/3)	MeOH	0,010	0,003	0,011	0,213	0,071	0,005	0,141	0,221	3,332
Šp07As3/a/III (4/3)		0,009	0,003	0,022	0,257	0,072	0,009	0,212	0,239	4,518
Šp07As1/b/III (2/3)		0,012	0,004	0,037	0,280	0,157	0,004	0,237	0,514	3,440
Šp07As2/b/III (3/3)		0,019	0,006	0,027	0,643	0,121	0,019	0,308	0,713	7,018

Tabulka 3: První vodná frakce z methanolového extraktu

4. frakce

IV. frakce je druhá butanolová frakce z extraktu methanol – voda.

Čtvrtá frakce obsahuje polární hydrofóbní sloučeniny. Jde především o analogy ekdysteroidů, resp. jejich konjugáty. Tato frakce byla tak malá, že nebyla vůbec analyzována na obsah prvků. Jedná se o velmi specifickou frakci. IR spektra této frakce jsou na Obr. 5.

5. frakce

V. frakce je druhá vodná frakce z extraktu methanol – voda.

V této frakci jsou zbylé méně rozpustné organické kyseliny a jejich soli, které mají velmi nízkou rozpustnost v alkoholech. Zároveň byly do této frakce izolovány oligopeptidy a polární glykosidy skládající se z několika oligosacharidů a flavonoidního aglykonu. Změny obsahu sledovaných prvků vidíme v tabulce 4. IR spektra pak na obrázku pod číslem 6, viz. přílohy. V této frakci se ve srovnání s ostatními uvolnilo největší množství hořčíku. U Ca a P můžeme pozorovat výrazný nárůst množství v kontaminovaných variantách As1 a As2. Pro tuto frakci je významné množství hořčíku. Významné korelace jsou u vlivu obsahu mědi na obsah zinku (a opačně), dále ve vztahu fosfor – zinek, fosfor – vápník (a opačně), hořčík – arsen, hořčík – fosfor a také vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku. Tabulka byla sestavena pomocí grafů 65 – 86.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/V (1/5)	2. H ₂ O	0,010	0,005	0,055	1,433	0,202	0,009	0,215	2,189	16,000
Šp07As1/a/V (5/5)	/	0,012	0,013	0,071	1,593	17,506	0,005	0,201	4,517	12,210
Šp07As2/a/V (6/5)	MeOH+	0,028	0,014	0,125	1,399	10,671	0,015	0,620	4,478	13,458
Šp07As3/a/V (4/5)	H ₂ O	0,107	0,003	0,035	1,611	0,064	0,016	0,146	2,186	22,047
Šp07As1/b/V (2/5)		0,018	0,005	0,029	0,966	0,236	0,013	0,187	2,539	13,919
Šp07As2/b/V (3/5)		0,039	0,004	0,043	1,286	0,114	0,010	0,221	2,771	14,158

Tabulka 4: Druhá vodná frakce z extraktu methanol - voda

6. frakce

VI. frakce je třetí vodný extrakt, extrakce proběhla při teplotě 25 – 30 °C.

Do šesté frakce se izolují především polypeptidy, enzymy a některé málo rozpustné soli organických kyselin (např. soli kyseliny mukyneoové a její analogy), IR spektrum obr. 7. Zároveň jsou zde rozpuštěny některé ze solí kyseliny oxalové, které nebyly izolovány do předchozích frakcí (frakce III, V), jak vyplývá z chemických tabulek (Weast, 1964). Složení dokládá tabulka 5. V této frakci se výrazně mění množství Fe, P, Ca, Mg, Cu. V šesté frakci sledujeme významné korelace u dvojic zinek – arsen (a opačně), železo – arsen (a opačně), zinek – měď (a opačně), vápník – hořčík. Tabulka byla sestavena pomocí grafů 87 – 108.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/VI (1/6)	3. H ₂ O	0,009	0,010	0,022	0,855	0,086	0,018	0,541	9,579	35,040
Šp07As1/a/VI (5/6)	25-30°C	0,008	0,010	0,045	0,698	3,717	0,007	0,261	12,198	29,596
Šp07As2/a/VI (6/6)		0,052	0,014	0,091	1,143	7,111	0,010	0,564	31,716	46,546
Šp07As3/a/VI (4/6)		0,132	0,057	0,264	2,217	0,278	0,006	0,950	20,835	48,067
Šp07As1/b/VI (2/6)		0,005	0,004	0,014	0,728	0,090	0,015	0,448	20,161	40,776
Šp07As2/b/VI (3/6)		0,012	0,006	0,017	1,422	0,051	0,010	0,305	25,993	47,034

Tabulka 5: Třetí vodný extrakt

7. frakce

VII. frakce je čtvrtý vodný extrakt, extrakce proběhla při teplotě vyšší než 90 °C. Do sedmé frakce byly izolovány některé zbylé proteiny a pektiny, IR spektrum, obr. 8. Z tabulky 6 vyplývají změny v množství As, kterého v této frakci přibývá mezi jednotlivými variantami pokusu. Dále se u varianty As1 a As2 výrazně zvýší množství Cd, P, Ca a Mg. V této frakci je dominantní obsah vápníku. Nárůst Zn, Ca, Mg lze pozorovat významně u druhého odběru. Významné korelace v této frakci sledujeme u vlivu obsahu vápníku na obsah hořčíku (a opačně), u vlivu železa na obsah arsenu, u vlivu arsenu na obsah vápníku a dále i vliv arsenu na obsah hořčíku. Tabulka byla sestavena pomocí grafů 109 – 130.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/VII (1/7)	4. H ₂ O	0,009	0,006	0,020	0,777	0,025	0,013	0,161	14,673	2,186
Šp07As1/a/VII (5/7)	90-95°C	0,017	0,030	0,049	0,702	1,500	0,016	0,296	43,815	8,346
Šp07As2/a/VII (6/7)		0,024	0,045	0,048	1,326	2,472	0,014	0,211	37,510	6,677
Šp07As3/a/VII (4/7)		0,027	0,002	0,009	0,568	0,035	0,016	0,105	18,123	1,568
Šp07As1/b/VII (2/7)		0,011	0,005	0,026	0,990	0,040	0,012	0,453	24,428	5,419
Šp07As2/b/VII (3/7)		0,018	0,002	0,099	0,699	0,024	0,041	0,325	65,163	16,323

Tabulka 6: Čtvrtý vodný extrakt

8. frakce

VIII. frakce je třetí butanolová frakce z extraktu methanol – voda – kyselina chlorovodíková.

Osmá frakce obsahuje kyseliny fenypropanového metabolismu a jejich soli, resp. estery kyselin. Jedná se o malou frakci.

Osmá i devátá frakce obsahují neextrahovatelné sloučeniny, které jsou pevně vázány chemickými vazbami na cytoskelet buňky. Jedná se zejména o vazby esterové, glykosidické a proteinové. Nejprve byla provedena hydrolyza těchto vazeb, jak vyplývá z metodiky.

Hydrolyzou byla získána velice bohatá směs sloučenin, hydrofilních i hydrofóbních. Proto bylo přistoupeno k roztřepání mezi butanol a vodu. Sloučeniny byly rozděleny dle specifické polaritě na vodné a butanolové frakce. Nehydrolyzované sloučeniny byly obsaženy ve frakci

X. Frakci VIII charakterizují IR spektra obr. 9 a tabulka 7. U Cd, Cu, Fe, P a Ca můžeme sledovat výrazný nárůst u varianty As1 a As2. Tato frakce je nejbohatší na významné korelace mezi prvky. Sledujeme zde ovlivnění mezi arsenem – fosforem (a opačně), arsenem – vápníkem, arsenem – železem, arsenem – zinkem (a opačně), fosforem – vápníkem (a opačně), fosforem – železem, fosforem – zinkem (a opačně), vápníkem – hořčíkem (a opačně), mědi – zinkem (a opačně). Tabulka byla sestavena pomocí grafů 131 – 153.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/VIII (1/8)	3. BuOH	0,037	0,042	0,153	1,264	1,812	0,030	0,086	0,979	0,085
Šp07As1/a/VIII (5/8)	/	0,083	0,081	0,623	2,448	3,181	0,038	0,461	3,814	0,171
Šp07As2/a/VIII (6/8)	MeOH+	0,115	0,083	0,553	2,142	5,296	0,084	0,507	19,439	0,656
Šp07As3/a/VIII (4/8)	H ₂ O+HCl	0,039	0,034	0,161	0,957	1,410	0,026	0,117	5,363	0,380
Šp07As1/b/VIII (2/8)		0,038	0,028	0,050	0,494	1,268	0,012	0,056	0,211	0,031
Šp07As2/b/VIII (3/8)		0,080	0,056	0,586	2,559	2,798	0,087	0,382	4,347	0,494

Tabulka 7: Třetí butanolová frakce z extraktu methanol – voda – kyselina chlorovodíková

9. frakce

IX. frakce je pátá vodná frakce z extraktu methanol – voda – kyselina chlorovodíková. Tato frakce obsahuje především vysokomolekulární látky, jako jsou proteiny, glykoproteiny, resp. cukernaté frakgmenty, IR spektra obr. 10. Tyto látky byly extrahovány po hydrolýze. Změny v obsahu sledovaných prvků dokládá tabulka 8. Tato frakce patří mezi větší frakce. V této frakci lze zaznamenat druhé nejmenší množství As, největší množství Ca a výrazný pokles obsahu Mg a Fe při srovnání varianty kontrolní a variant kontaminovaných. Významně se mění i množství P. Devátá frakce disponuje významnými korelacemi mezi arsenem – fosforem, arsenem – vápníkem, vápníkem – fosforem. Tabulka byla sestavena pomocí grafů 154 – 175.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/IX (1/9)	5.H ₂ O/	0,005	0,030	0,355	1,417	0,462	0,035	0,427	83,735	11,298
Šp07As1/a/IX (5/9)	/	0,007	0,032	0,378	1,247	0,811	0,091	0,511	74,540	1,080
Šp07As2/a/IX (6/9)	MeOH+	0,011	0,017	0,306	0,998	0,860	0,065	0,373	66,384	0,650
Šp07As3/a/IX (4/9)	H ₂ O+HCl	0,005	0,047	0,244	0,588	0,729	0,050	0,186	81,402	2,132
Šp07As1/b/IX (2/9)		0,015	0,019	0,212	1,073	1,845	0,032	0,506	108,65	2,887
Šp07As2/b/IX (3/9)		0,012	0,010	0,068	0,213	0,844	0,010	0,112	77,259	10,034

Tabulka 8: Pátá vodná frakce z extraktu methanol – voda – kyselina chlorovodíková

10. frakce

X. frakce jsou extrakční zbytky, jak je patrné i z IR spektra obr. 11. Množství sledovaných prvků dokládá tabulka 9. Při srovnání jednotlivých frakcí se právě v této vyskytují nejmenší množství sledovaných prvků. Na významné korelace mezi prvky je tato frakce poměrně bohatá. Je zde patrný vliv obsahu arsenu na obsah fosforu (a opačně), arsenu na obsah vápníku (a opačně), arsenu na obsah hořčíku (a opačně), fosforu na vápník, fosforu na hořčík (a opačně). Tabulka byla sestavena pomocí grafů 176 – 196.

Označení vzorku	Frakce	As	Cd	Cu	Fe	P	Pb	Zn	Ca	Mg
Šp07K/a/X (1/10)	E.Z.	0,002	0,003	0,004	0,164	0,148	0,002	0,006	0,256	0,018
Šp07As1/a/X (5/10)		0,002	0,002	0,014	0,536	0,133	0,001	0,016	0,008	0,005
Šp07As2/a/X (6/10)		0,002	0,003	0,011	0,197	0,157	0,000	0,021	0,129	0,007
Šp07As3/a/X (4/10)		0,006	0,006	0,021	0,175	0,372	0,002	0,024	0,684	0,090
Šp07As1/b/X (2/10)		0,003	0,003	0,018	0,141	0,177	0,002	0,013	0,601	0,016
Šp07As2/b/X (3/10)		0,004	0,003	0,014	0,131	0,183	0,002	0,018	0,449	0,042

Tabulka 9: Extrakční zbytky

5.2 Shrnutí výsledků obsahů prvků v izolovaných frakcích ve vztahu k jejich možným korelacím

5.2.1 Korelace obsahů analyzovaných prvků vyskytujících se v izolovaných frakcích

Korelace jsou uvedeny v tabulce č. 10. Tabulka byla sestavena z grafů, které jsou součástí příloh (graf 1 – 196). Z grafů byly použity koeficienty determinace, pomocí kterých jsou následně hodnoceny korelace mezi jednotlivými prvky.

	Frakce I	Frakce II	Frakce III	Frakce V	Frakce VI	Frakce VII	Frakce VIII	Frakce IX	Frakce X
As x P	0,098	0,293	0,293	0,14	0,721	0,28	0,983	0,856	0,983
As x Ca	0,724	0,796	0,796	0,188	0,536	0,853	0,928	0,983	0,785
As x Mg	0,079	0,585	0,585	0,887	0,44	0,77	0,575	0,027	0,966
As x Fe	0,518	0,495	0,495	0,283	0,807	0,008	0,9	0,162	0,235
As x Zn	0,15	0,585	0,546	0,27	0,828	0,597	0,982	0,086	0,39
P x As	0,124	0,112	0,112	0,13	0,038	0,196	0,96	0,704	0,928
P x Ca	0,137	0,428	0,428	0,959	0,579	0,081	0,929	0,905	0,856
P x Mg	0,95	0,393	0,393	0,313	0,556	0,018	0,536	0,392	0,922
P x Fe	0,796	0,516	0,516	0,209	0,118	0,746	0,972	0,331	0,689
P x Zn	0,625	0,213	0,597	0,98	0,16	0,049	0,943	0,272	0,381
Ca x As	0,761	0,409	0,409	0,198	0,156	0,08	0,667	0,637	0,794
Mg x As	0,149	0,544	0,544	0,878	0,52	0,006	0,609	0,239	0,929
Fe x As	0,629	0,837	0,837	0,237	0,865	0,91	0,662	0,134	0,153
Zn x As	0,092	0,931	0,266	0,685	0,928	0,234	0,961	0,14	0,45
Ca x P	0,981	0,453	0,453	0,929	0,61	0,723	0,785	0,914	0,717
Mg x P	0,86	0,449	0,449	0,778	0,118	0,558	0,675	0,585	0,974
Fe x P	0,719	0,05	0,05	0,19	0,118	0,615	0,563	0,22	0,15
Zn x P	0,862	0,385	0,535	0,166	0,063	0,331	0,909	0,31	0,702
Ca x Mg	0,952	0,231	0,231	0,104	0,756	0,973	0,862	0,375	0,624
Mg x Ca	0,419	0,231	0,231	0,243	0,694	0,962	0,863	0,548	0,645
Cu x Zn	0,331	0,779	0,779	0,969	0,793	0,235	0,938	0,521	0,563
Zn x Cu	0,092	0,486	0,486	0,858	0,944	0,679	0,987	0,721	0,54

Tabulka 10 – srovnání korelací (červeně jsou vyznačeny korelace nejméně významné, modře jsou označeny středně významné závislosti, černě nejvýznamnější)

5.2.1.1 Korelace P, As, Ca a Mg

Z chemicko – fyzikálních vlastností a z umístění v periodické soustavě prvků vyplývá, že fosfor a arsen se mohou ve sloučeninách vyskytovat ve stejných oxidačních číslech. Jak již bylo uvedeno, fosfor preferuje výskyt ve stavu P(V) a arsen As(III). Tento podstatný rozdíl spolu s výrazným rozdílem obsahu těchto prvků v půdě je příčinou odlišnosti obsahu As a P vázaných do organických sloučenin v izolovaných prvních pěti frakcích a sedmé frakce. Proto byly As a P z výše uvedených vlastností a výsledků (viz. tabulka 1 – 9) vzaty do sledování jejich korelací.

Tabulka 10 ukazuje na jedné straně také míru shody metabolismu fosforu a arsenu a na druhé straně ukazuje, jak souvisí s metabolismem vápníku a hořčíku. Přestože má vápník a hořčík shodný oxidační stav +II, liší se elektronegativitou a atomovým poloměrem. Tyto dvě odlišné vlastnosti mohou determinovat jejich obsah (Ca, Mg) a zásadně odlišit i vazby s organickými kyselinami a to i v souvislosti s obsahem fosforu a arsenu. Z tabulky 10 je patrné, že obsah vápníku ovlivňuje obsah hořčíku i fosforu v rostlině. Ve frakci VII byly pomocí IR spekter detekovány některé proteiny a pektiny, přičemž z literatury je patrné, že právě pektiny jsou bohaté na fosfor a vápník.

5.2.1.2 Korelace kovových prvků (Fe, Cu a Zn) navzájem

Zároveň prvky jako železo, měď a zinek jsou vybrány k výpočtům korelací, protože tyto prvky souvisí přes aktivitu enzymů, kde jsou významnými kofaktory, s oxidačním stresem a se stresovým metabolismem rostliny. Významná závislost u těchto kovových prvků by měla být viděna proto především ve frakci VI a VIII. Z hlediska vzájemného ovlivňování Fe, Cu a Zn se zdá být nejvýznamnější frakce VIII. Pro závislosti kovových prvků (železo, zinek, měď) je zejména významná frakce VI. Je zde možná souvislost s faktem, že do této frakce se izolují i enzymy či soli kyseliny oxalové.

5.2.1.3 Korelace Fe a Zn s P a As

Další korelace, na které byla zaměřena pozornost, byly korelaci mezi arsenem a železem. Železo je přirozenou součástí antioxidantních enzymů (např. cytochrom P450) a tyto enzymy rostlina nutně potřebuje při kontaktu s arsenem, který jak již bylo výše uvedeno působí oxidační stres. Tuto významnou korelaci (As – Fe) nalezneme ve frakcích VI, VIII.

Zinek se také významně podílí na odolnosti rostliny proti stresu, neboť je důležitým kofaktorem enzymu dismutázy. Ve frakcích VI a VIII si můžeme všimnout vlivu obsahu arsenu na obsah zinku v rostlině.

Množství zmíněných kovů (Fe, Zn) je ovlivněno i množstvím přítomného fosforu, jak dokládá korelace ve frakcích I, V, VIII.

6 Diskuze

Z poznatků některých studií (Patra et al., 2004; Shri et al., 2009; Upadhyay, 2014; Verbruggen et al., 2009; a dalších), které byly použity pro sepsání této práce, je patrné, že rostlina odpovídá na kontaminaci půdy arsenem (nebo těžkými kovy) různým způsobem. Způsob reakce dané rostliny závisí na rostlinném druhu, míře kontaminace, vlastnostech půdy a dalších faktorech.

Jedním z úkolů této práce bylo odpovědět, zda stuňovaná kontaminace půdy arsenem ovlivní obsah fosforu a železa v rostlině. Dále pak, zda sekvenční extrakce rostlinné biomasy potvrdí vliv stupňované dávky arsenu na metabolismus rostlin.

Z citovaných studií je patrné, že souvislost mezi arsenem kontaminovanou půdou a změnou metabolických pochodů v rostlině byla ověřována již v minulosti (Gunes et al., 2009; Pathare et al., 2013; Pavlík et al., 2004; Pavlíková et al., 2002; Shri et al., 2009).

Pro nalezení odpovědí byly využity metody sekvenční extrakce rostlinné biomasy, dále metody analýzy prvků a analýza IR spekter jednotlivých získaných frakcí.

Jako rostlinný materiál byl zvolen špenát díky optimálním vlastnostem pro tento pokus (rychlý růst, velká kumulace látek z kontaminované půdy).

Sekvenční extrakce měla více kroků, než kolik bylo použito v jiných studiích, např. Pavlíková et al. (2002; 2004; 2005), aby se dosáhlo co možná nejlepšího rozdělení jednotlivých sloučenin mezi použitá rozpouštědla na základě polaritý těchto látek.

Celkově tedy bylo extrahováno deset frakcí, z nichž čtvrtá (butanolová z methanolvodného extraktu) byla tak malá, že nebyla vůbec analyzována na obsah prvků.

Podle naměřených hodnot byla největší frakcí frakce X (extrakční zbytky), dále pak frakce IX (pátá vodná frakce z extraktu methanol + voda + HCl) a III (první vodná frakce z methanolového extraktu). Nejmenší pak byla frakce I (petroletherová frakce z methanolového extraktu) a VIII (třetí butanolová frakce z extraktu methanol + voda + HCl). Tyto výsledky se neshodují s těmi, které ve své studii publikovali Pavlíková et al. (2005).

V rámci sekvenční extrakce bylo nutné vyřešit i problém neextrahovatelných sloučenin, které byly pevnými chemickými vazbami (zejména esterovými, glykosidickými a proteinovými) vázány na cytoskelet buňky. Pro sloučeniny z frakce VIII, IX bylo tedy nejdříve nutné použít hydrolýzu, pomocí které se podařilo získat velmi bohatou směs hydrofilních i hydrofóbních sloučenin. Tyto sloučeniny byly následně rozděleny mezi butanol a vodu, což na rozdíl od předchozích studií opět zvýšilo efektivitu celé analýzy. Pouze nehydrolyzované sloučeniny

byly pak součástí poslední frakce.

Největší množství arsenu bylo zachyceno v první frakci (petroletherové z methanolového extraktu). Toto je odlišný závěr od studie Pavlíková et al. (2005), kde největší množství arsenu obsahovala druhá frakce (ethylacetátová). V této práci byla jako druhá frakce použita butanolová frakce.

Jednotlivé frakce pak byly popsány pomocí IR spekter a byla v nich provedena analýza prvků. Důležité bylo zvolit vhodný postup při hodnocení získaných obsahů jednotlivých prvků, aby bylo možné následně tato data použít pro určení vzájemné míry závislosti obsahu studovaných prvků. Byla použita metoda vyjádření obsahu měřeného prvku v 1 mg izolované frakce.

Práce se zaměřila na prvky, které hrají klíčovou roli v metabolických pochodech rostlin. Jedná se následující prvky.

Fosfor – prvek nezbytný pro základní metabolické děje v rostlině. Hraje důležitou roli při syntéze ATP a dalších makroergických látek a při oxidativní fosforylaci (Richter, 2004).

Železo – je jako i další kovy (Zn, Cu) součástí antioxidantních enzymů, které rostlina využívá právě při vyrovnání se s abiotickým stresem, který bývá způsobený kontaminací půdy (Richter, 2004).

Vápník – ovlivňuje propustnost membrán rostlinných buněk, kde je vázán zejména na pektiny, dokáže neutralizovat některé kyseliny, čímž má i detoxikační vliv, a v neposlední řadě ovlivňuje i aktivitu některých rostlinných enzymů jako jsou např. kataláza či nitrátreduktáza (Richter, 2004).

Hořčík – je významný především svou rolí v chlorofylu, kde je centrálním atomem a je zde chelátově navázán v porfyrinovém jádře. Dále je aktivátorem některých enzymů (dehydrogenázy, dekarboxylázy) a má pozitivní vliv na syntézu bílkovin. Některé studie dokazují, že snížené množství hořčíku v rostlině vede k většímu výskytu volných aminokyselin (Richter, 2004).

Zinek – podobně jako železo je součástí antioxidantních enzymů, významně se podílí na fotosyntetických dějích, kde je součástí řady enzymů. Tento kov je zapojený do metabolismu bílkovin, nukleových kyselin i cukrů. Ve vyšších koncentracích má ale i negativní vliv, neboť brání rostlinám v příjmu železa a fosforu (Richter, 2004).

Zjištěné výsledky byly zpracovány pomocí SY bodových grafů a poté statisticky vyhodnoceny pomocí koeficientu determinace.

Z posouzení korelací lze potvrdit shodu metabolismu arsenu a fosforu a shodu metabolismu arsenu a železa. Tato závislost byla dokázána i předchozími studiemi, jak dokládají rešerše v úvodu této práce (Shri et al., 2009; Upadhyay, 2014; Gunes et al., 2009).

Z tabulek, které uvádí všechny sledované korelace, je patrné, že se nejedná o závislost lineární. Toto lze obtížně posoudit i proto, že se při sekvenční extrakci v jednotlivých frakcích uvolňují různě polární směsi, které obsahují rozdílné látky rostlinného metabolismu. Nicméně rozbořením údajů ve vyhodnocovaných tabulkách lze potvrdit, že v látkách uvolňovaných do jednotlivých frakcí byly zkoumané prvky a změny jejich obsahů souvisely se změnou míry kontaminace půdy arsenem.

Soudek et al. (2006) zmiňuje ve své práci různé studie, které dokládají, že interakce mezi arsenem a fosforem není vždy identická. Záleží na podmínkách pěstování a typu rostliny.

Verbruggen et al. (2009) ve své studii upozorňují na chemicko-fyzikální podobnost arsenu a kadmia a na jejich možný vliv na esenciální prvky jako je zinek a fosfor.

V této práci se podařilo pomocí korelací potvrdit souvislost mezi arsenem, zinkem a fosforem. Ve frakcích VIII, IX, X si můžeme všimnout, že obsah arsenu ovlivňuje v rostlině obsah fosforu. Dále ve frakcích VI a VIII vidíme závislost arsenu a zinku.

Rovněž Tripathi et al. (2012); Patra et al. (2004) uvádějí, že přijatý arsen ovlivňuje metabolismus fosforu v rostlině, tedy děje jako je syntéza ATP či fosforylace a buněčné dýchání.

Jak je uvedeno výše, vliv arsenu na fosfor je v rostlinách potvrzen korelacemi téměř ve všech frakcích, nejvýznamněji ovšem ve frakcích VIII, IX, X. Potvrzena je i korelace opačná, tzn. případ, kdy obsah fosforu ovlivňuje obsah arsenu v rostlině. Tato korelace je nejvýznamnější ve frakci VIII a X. Tuto interakci zkoumali ve své studii Gunes et al. (2009) na rostlinách ciziny.

Upadhyay (2014) ve své studii zmiňuje, že těžké kovy, ale i polokov jako je arsen, jsou limitujícím faktorem pro růst rostlin. V této práci jsou registrovány korelace mezi arsenem a fosforem, arsenem a vápníkem, arsenem a hořčíkem, arsenem a železem, arsenem a zinkem. Ze znalostí o základních metabolických pochodech v rostlinách je patrné, že arsen bude tedy ovlivňovat důležité děje, neboť např. hořčík je centrálním atomem v chlorofylu, železo a zinek jsou kofaktorem některých enzymů.

Je tedy zřejmé, že kontaminace půdy arsenem ovlivní obsah fosforu a železa v rostlině.

7 Závěr

Cílem práce bylo potvrdit míru vlivu arsenu, kterým je půda kontaminovaná, na obsah fosforu, železa a dalších prvků hrajících významnou roli v rostlině.

Z naměřených hodnot, které jsou v podobě grafů jako příloha této práce, je zřejmé, že různé dávky arsenu mají různý vliv na metabolické děje v rostlinách. Protože sekvenční extrakce rozdělí sloučeniny do frakcí podle jejich polariry, v každé frakci jsou obsaženy různé typy sloučenin.

Nejvíce arsenu se vyskytovalo v první frakci. Nejvyšších hmotností dosahovaly frakce III, IX a X. Naopak čtvrtá frakce měla hmotnost nejmenší a nemohla být ani analyzována. Další frakce s velmi nízkou hmotností byla frakce VIII.

Potvrdit můžeme míru ovlivnění arsenem u vybraného prvku. Stupňovaná dávka arsenu ovlivnila metabolismus železa a fosforu v rostlině, což můžeme pozorovat na analyzovaných sloučeninách, které se objevovaly v jednotlivých frakcích, a pomocí korelací mezi prvky. Sekvenční extrakce je metoda, která velmi dobře dokazuje, jak kontaminace půdy může ovlivnit metabolické děje v rostlinách.

8 Seznam literatury

- del Río, L. A. , Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Barroso, J. B. 2003. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life*. 55. 71-81.
- Dong, R., Formentin, E., Losseso, C., Carimi, F., Benedetti, P., Terzi, M., Lo Schiavo, F. 2005. Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, PvPCS1, from *Pteris vittata* L.. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 32. 527–533.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A. 2009. Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant Soil*. 314. 211 – 220.
- Kumar, S., Dubey, R. S., Tripathi, R. D., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K. 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environmental International*. 74. 221 – 230.
- Pathare, V., Srivastava, S., Suprasanna, P. 2013. Evaluation of effects of arsenic on carbon, nitrogen, and sulfur metabolism in two contrasting varieties of *Brassica juncea*. *Acta Physiol Plant*. 35. 3377-3389.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 52. 199-223.
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Száková, J., Vašíčková, S., Tlustoš P. 2004. Binding forms of risk elements in root fractions of *Leuzea cartanoides* (Willd.) DC. *Environmental and Experimental Botany*. 54. 239-243.
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Staszková, 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.
- Pavlíková, D., Pavlík, M., Vašíčková, S., Száková, J., Tlustoš, P., Vokáč, K., Balík, J. 2002. The effect of soil properties on cadmium bonds to organicsubstances of spinach biomass. *Applied organometallic chemistry*. 16. 187-191.
- Pavlíková, D., Pavlík, M., Vašíčková, S., Száková, J., Tlustoš, P., Vokáč, K., Balík, J. 2004. Separation of organic compounds binding trace elements in seeds of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. *Applied organometallic chemistry*. 18. 619-625.
- Pavlíková, D., Pavlík, M., Vašíčková, S., Száková, J., Vokáč, K., Balík, J., Tlustoš, P. 2005. Development of a procedure for the sequential extraction of substances binding trace elements in plant biomass. *Analytical and Bioanal Chem*. 381. 863-872.

- Řezanka, T., Sigler, K. 2008. Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry*. 69. 585-606.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P., K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Tuli, R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72. 1102-1110.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P. M. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*. 53. 2381-2392.
- Soudek, P., Víchová, L., Valenová, S., Podlipná, R., Malá, J., Vaněk, T. 2006. Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické Listy*. 100. 323-329.
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 78. 661-669.
- Száková, J., Tlustoš, P., Balík, J., Pavlíková, D., Balíková, M. 2001. Porovnání slabých extrakčních činidel pro stanovení rostlinou přijatého podílu As, Cd a Zn v půdě. *Chemické Listy*. 95. 179-183.
- Száková, J., Mihaljevič, M., Tlustoš, P. 2007. Mobilita, transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a v rostlinách. *Chemické Listy*. 101. 397-405.
- Tremlová, J., Száková, J., Tlustoš, P. 2010. Hodnocení možného vlivu rizikových prvků obsažených v půdě na organismus člověka. *Chemické Listy*. 104. 349-352.
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., Maathuis, F. J. M. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*. 25.
- Tripathi, R. D., Tripathi, P., Dwidevi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K. 2012. Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. *Frontiers in Physiology*. 3.
- Upadhyay, R. K. 2014. Metal stress in plants: its detoxification in natural environment. *Braz. J. Bot.* 37. 377 – 382.
- Verbruggen, N., Hermans, Ch., Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 12. 364 – 372.
- Weast, R. C. 1964. *Handbook of Chemistry and Physics*. Chemical Rubber Co. B169-B265

Richter R. Fosfor. [online]. MZLU Brno. 27. ledna 2004. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/p.htm

Richter R. Železo. [online]. MZLU Brno. 27. ledna 2004. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/fe.htm

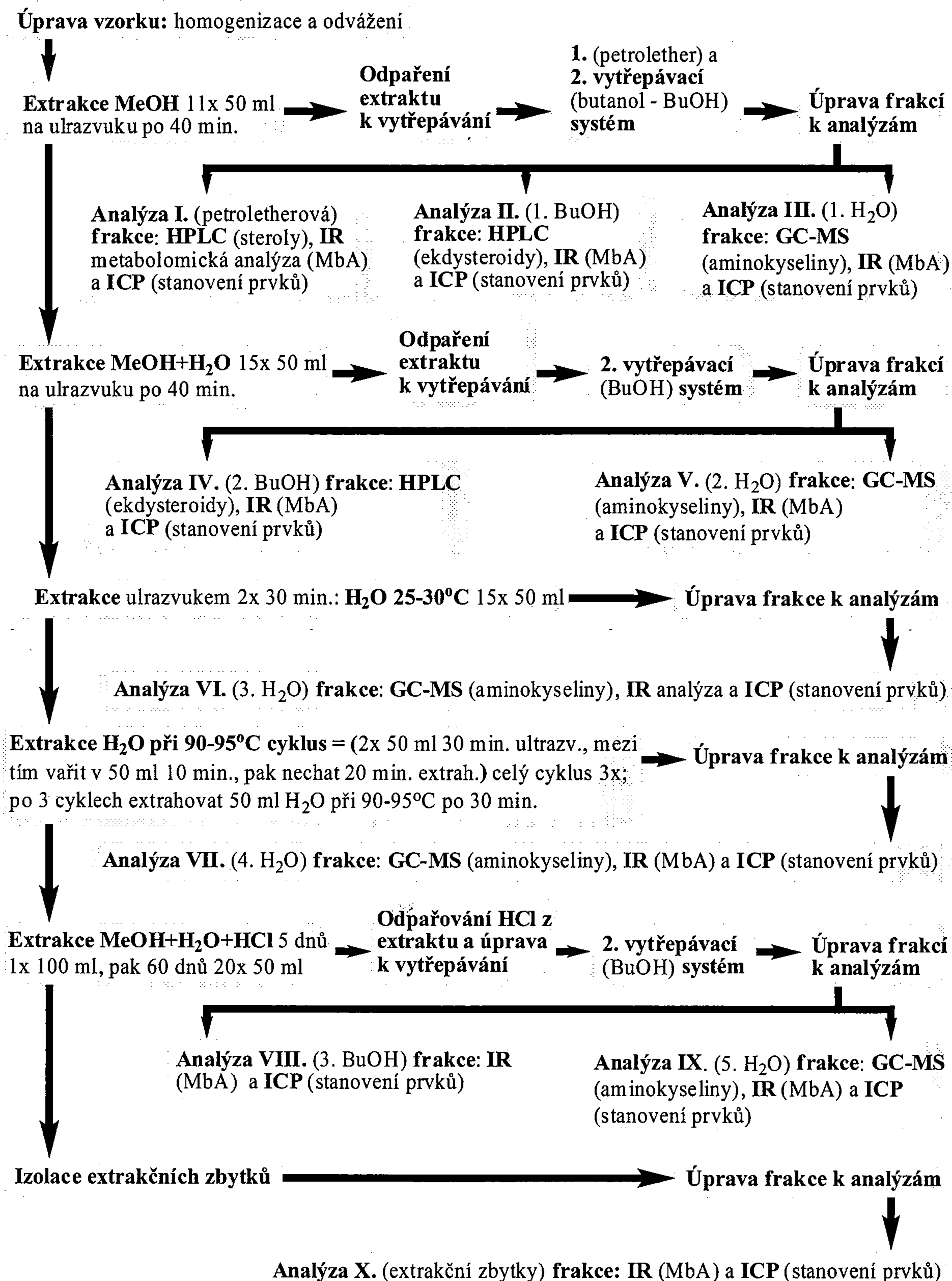
Richter R. Vápník. [online]. MZLU Brno. 6. října 2004. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/ca.htm

Richter R. Hořčík. [online]. MZLU Brno. 27. ledna 2004. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/mg.htm

Richter R. Zinek. [online]. MZLU Brno. 27. ledna 2004. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/zn.htm

9 Samostatné přílohy

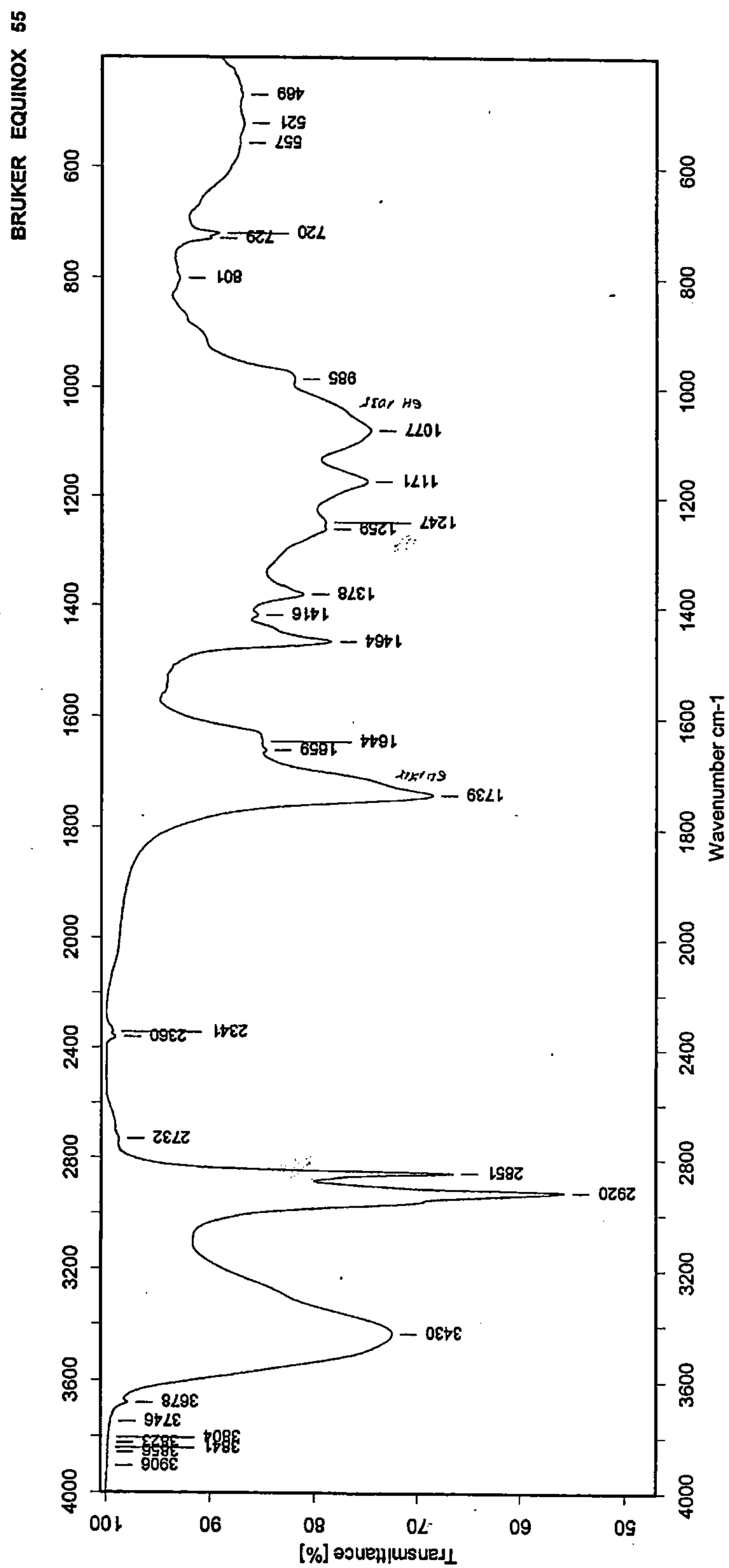
Obr. 1, grafické schéma postupu izolace frakcí (Pavlík et al.)



Tab. 11., charakteristika zeminy použité pro nádobový pokus

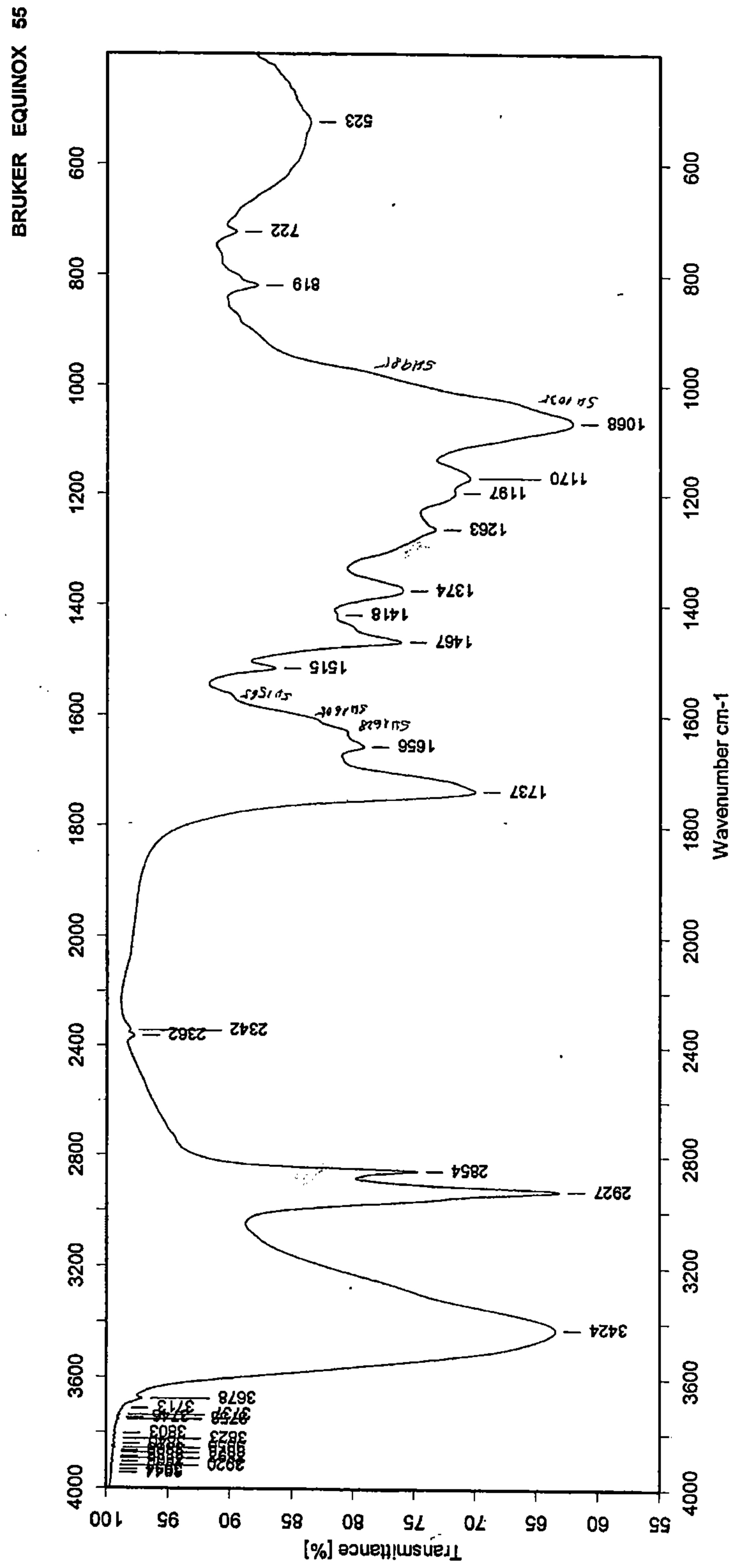
Půdní typ/subtyp	pH_{KCl}	C_{org.} (%)	KVK (mmol₍₊₎/kg)
černozem (CE)/modální	7,2 ± 0,3	3,1 ± 0,7	225 ± 19,5

Obr. 2, IR spektrum – frakce I (Pavlík et al.)



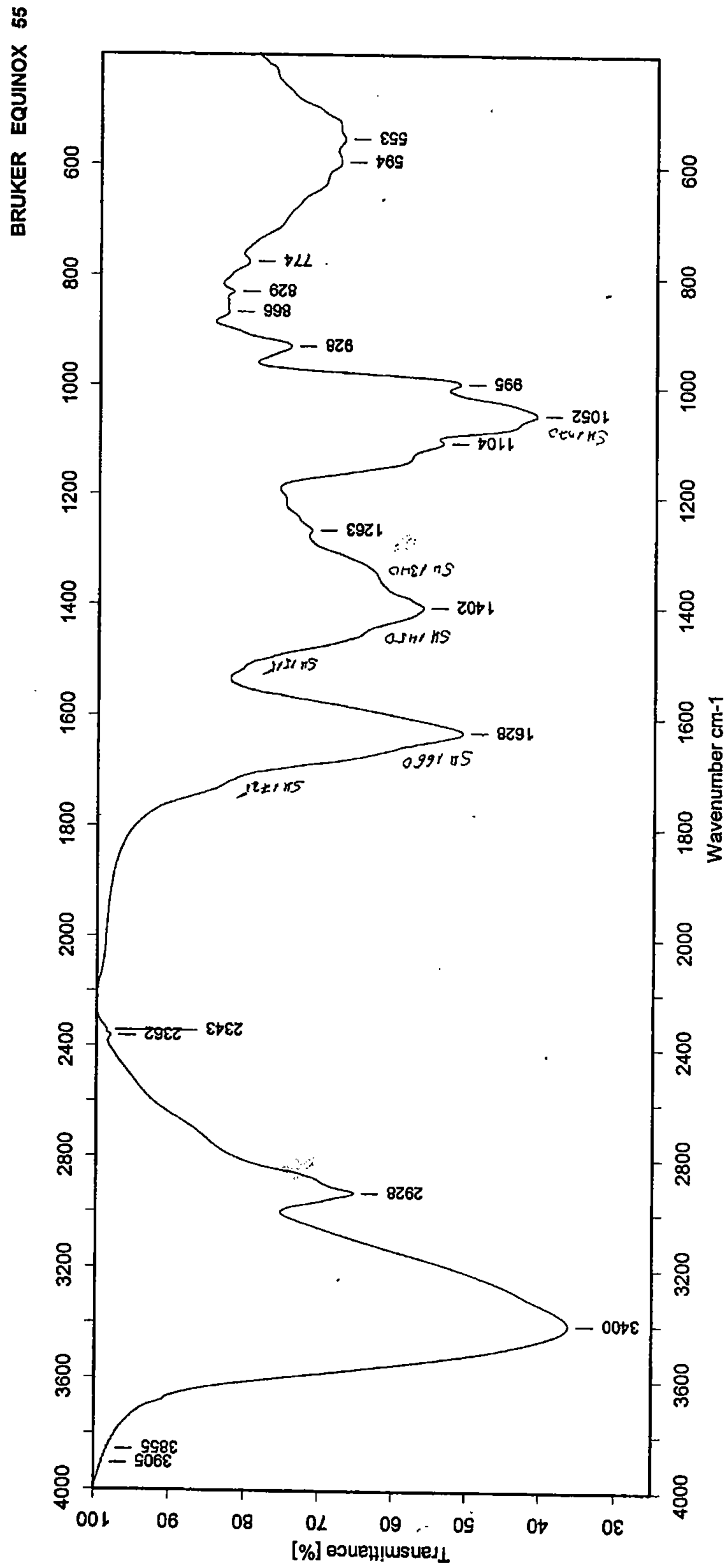
PAVLÍK	19936
VAPA558.0	Sp07K/J/1/1
16/12/2008 08:59:01	KBr 10
SONA	9094

Obr. 3, IR spektrum – frakce II (Pavlík et al.)



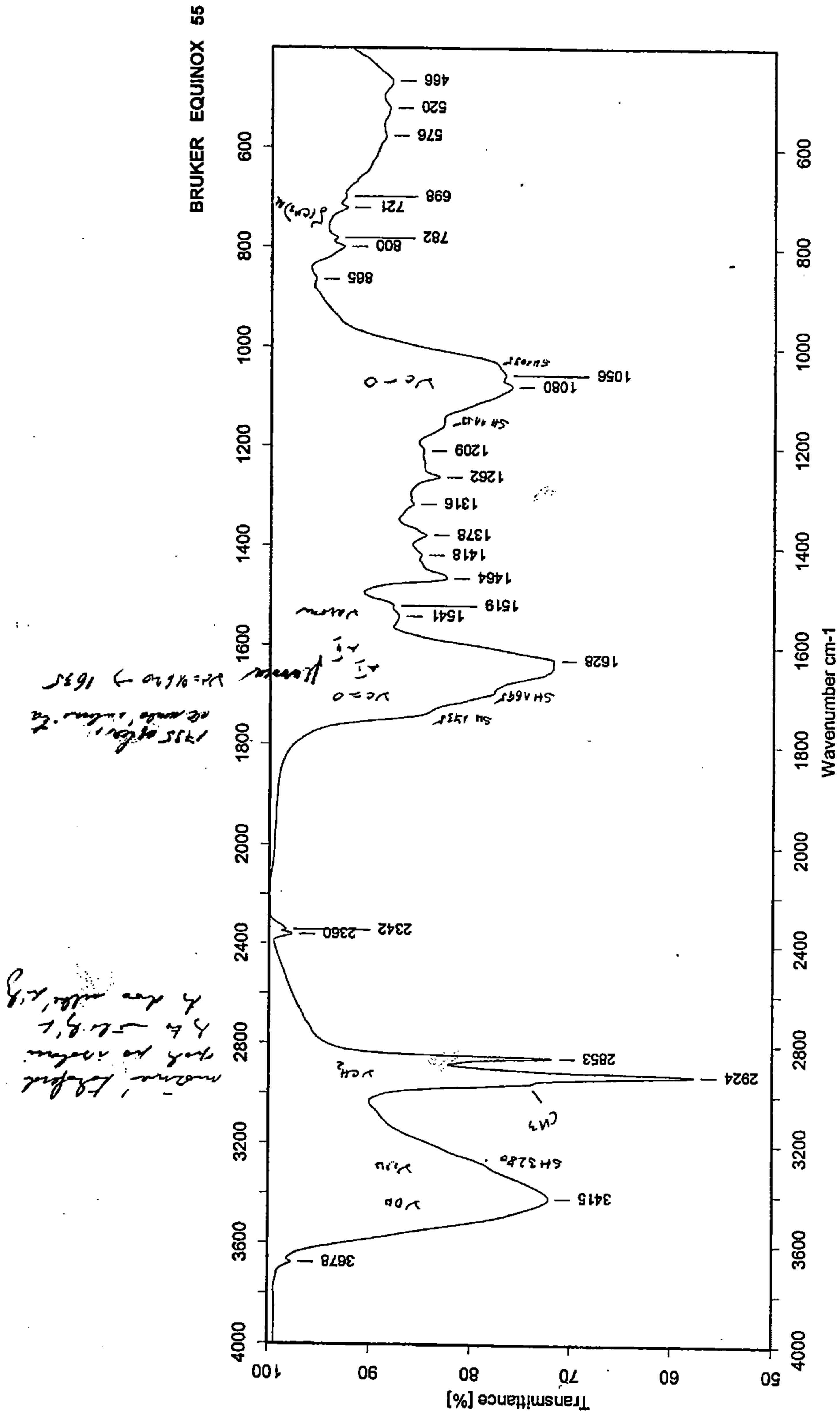
PAVLÍK	19937
VAPA559.0	Sp07K/A/II/1/2
16/12/2008 10:34:29	KBr 10
SONA	9095

Obr. 4, IR spektrum – frakce III (Pavlik et al.)



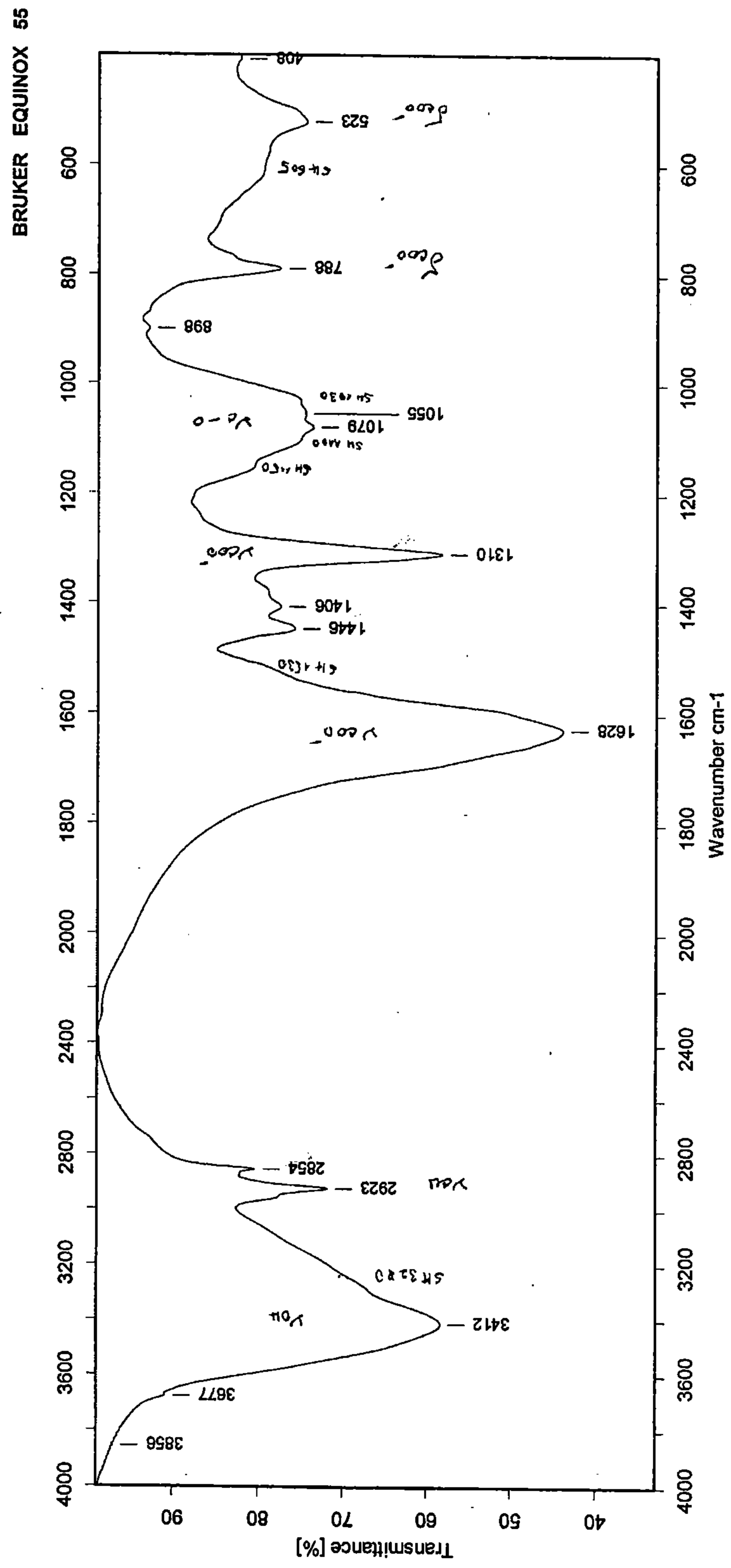
PAVLIK	19938
VAPA560.0	Sp07K/A/III/1/3
16/12/2008 10:59:00	KBr 10
SONA	9096

Obr. 5, IR spektrum – frakce IV (Pavlík et al.)



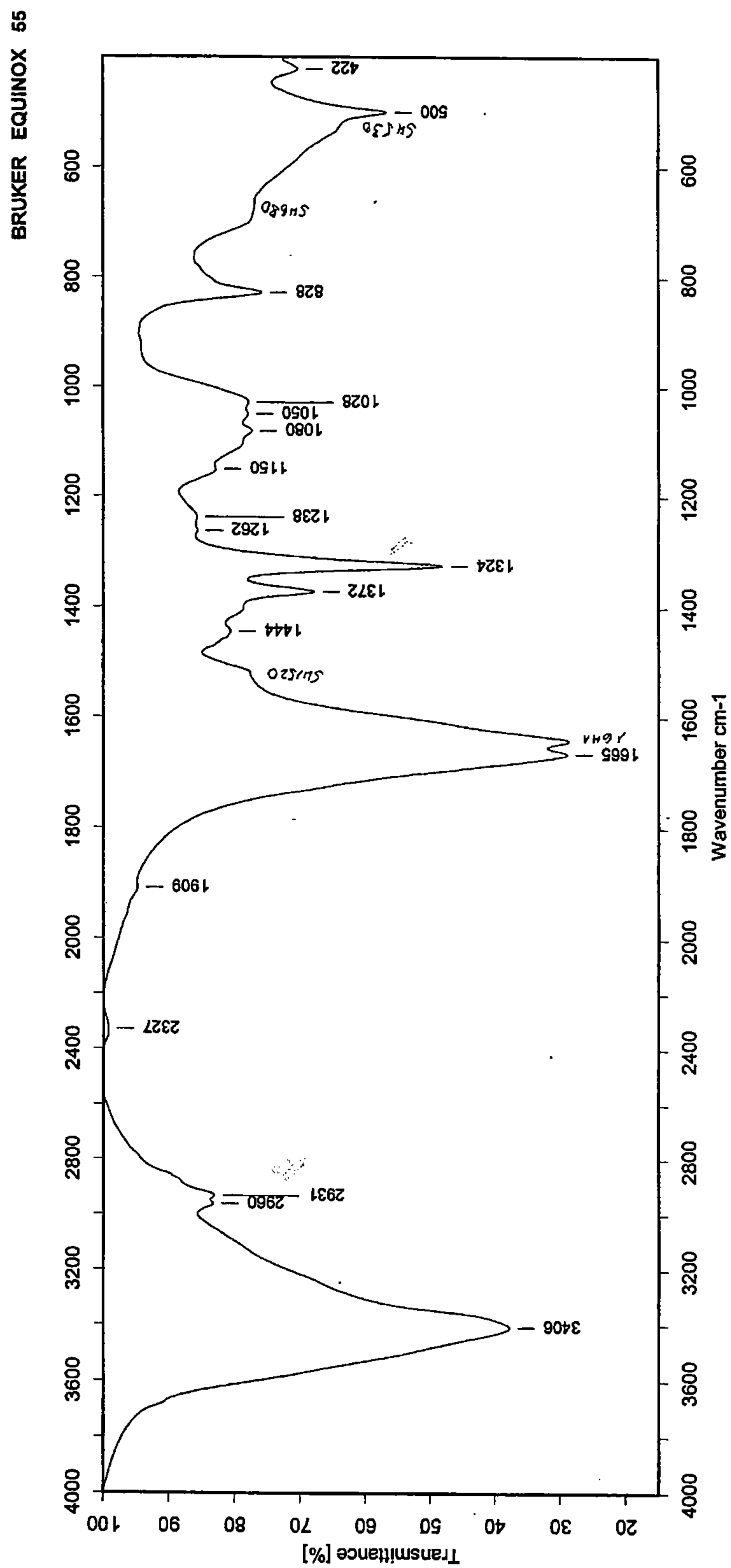
PAVLÍK	20243
VAPA585.0	Sp07 KJA/IV/1/4
09/03/2009 13:20:09	KBr 10
SONA	9523

Obr. 6, IR spektrum – frakce V (Pavlík et al.)



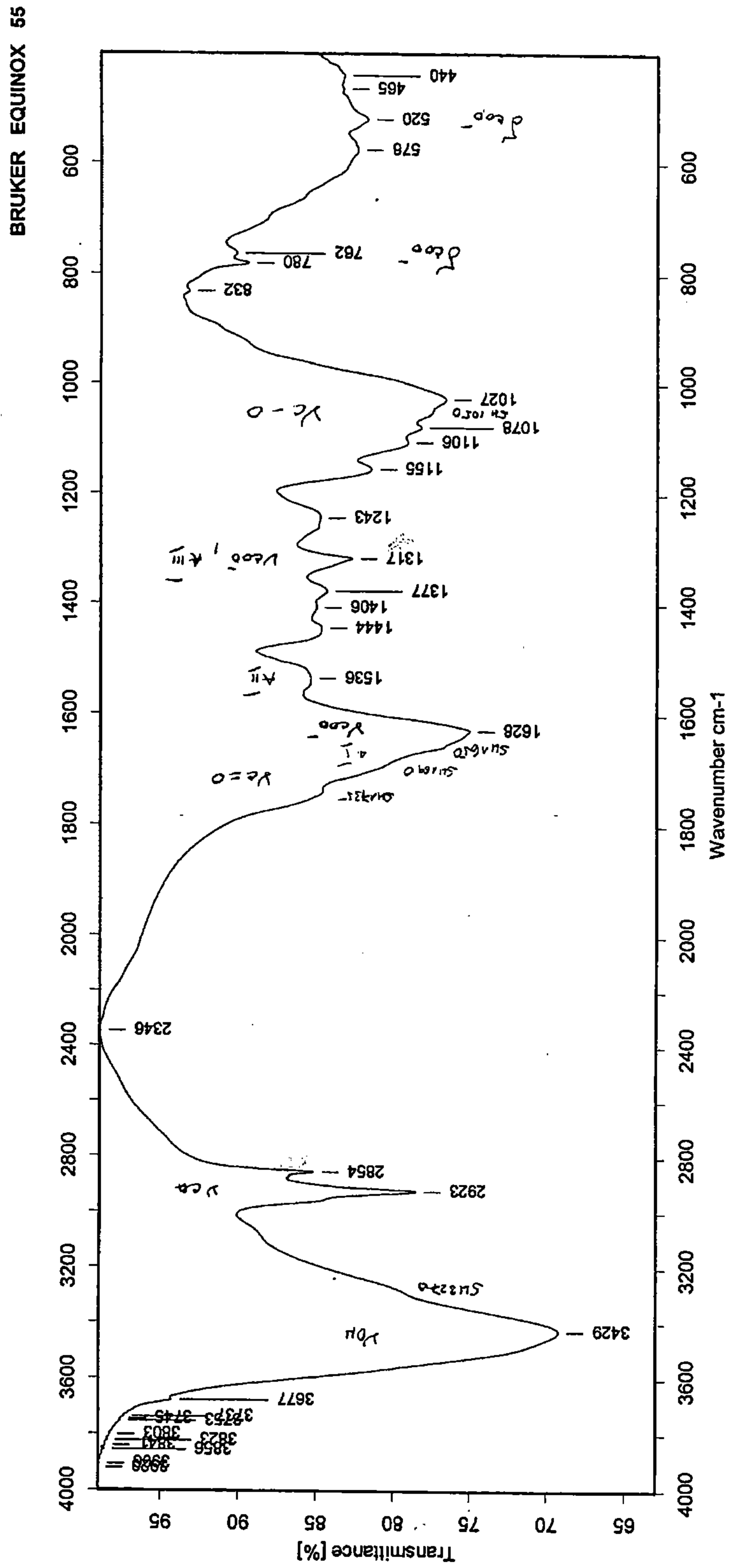
PAVLÍK	19972
VAPA57& 1	Sp07KJAN/1/5
30/12/2008 10:06:24	KBr 10
SONA	9154

Obr. 7, IR spektrum – frakce VI (Pavlík et al.)



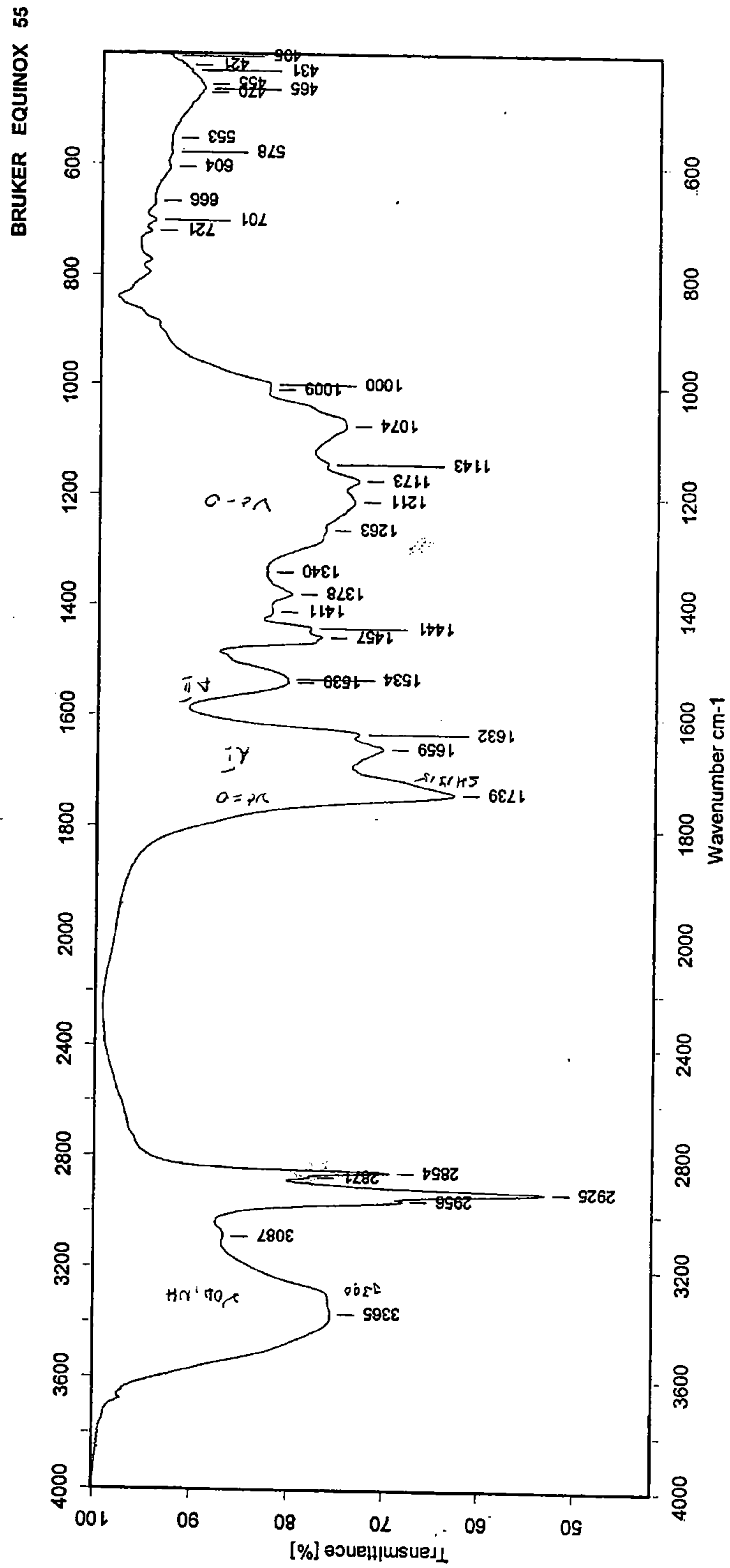
PAVLIK	19939
VAPA561.0	Sp07K/AN/1/6
16/12/2008	11:22:34
SONA	KBr 10
	9097

Obr. 8, IR spektrum – frakce VII (Pavlík et al.)



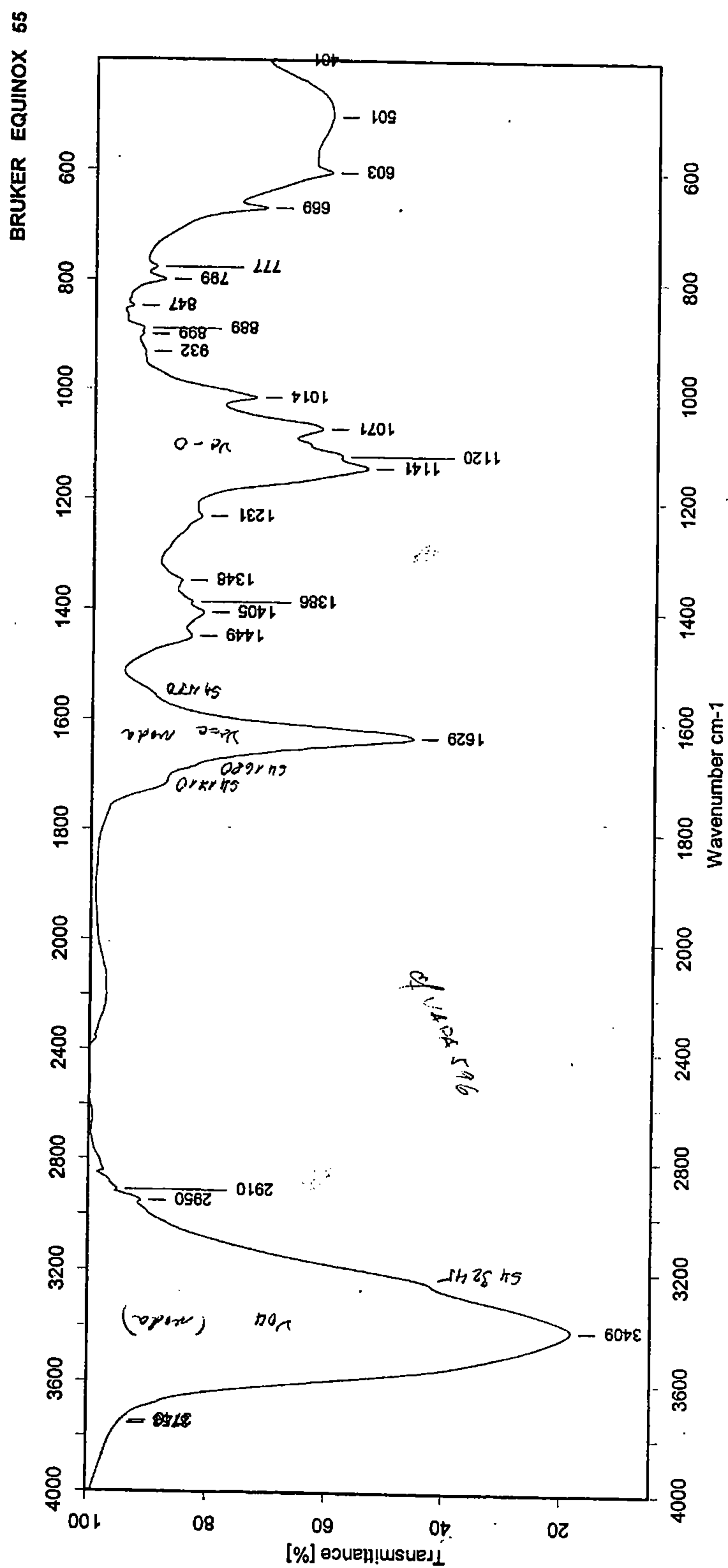
PAVLIK	19973
VAPA579.0	Sp07K/AN/11/17
30/12/2008 10:27:08	KBr 10
SONA	9155

Obr. 9, IR spektrum – frakce VIII (Pavlík et al.)



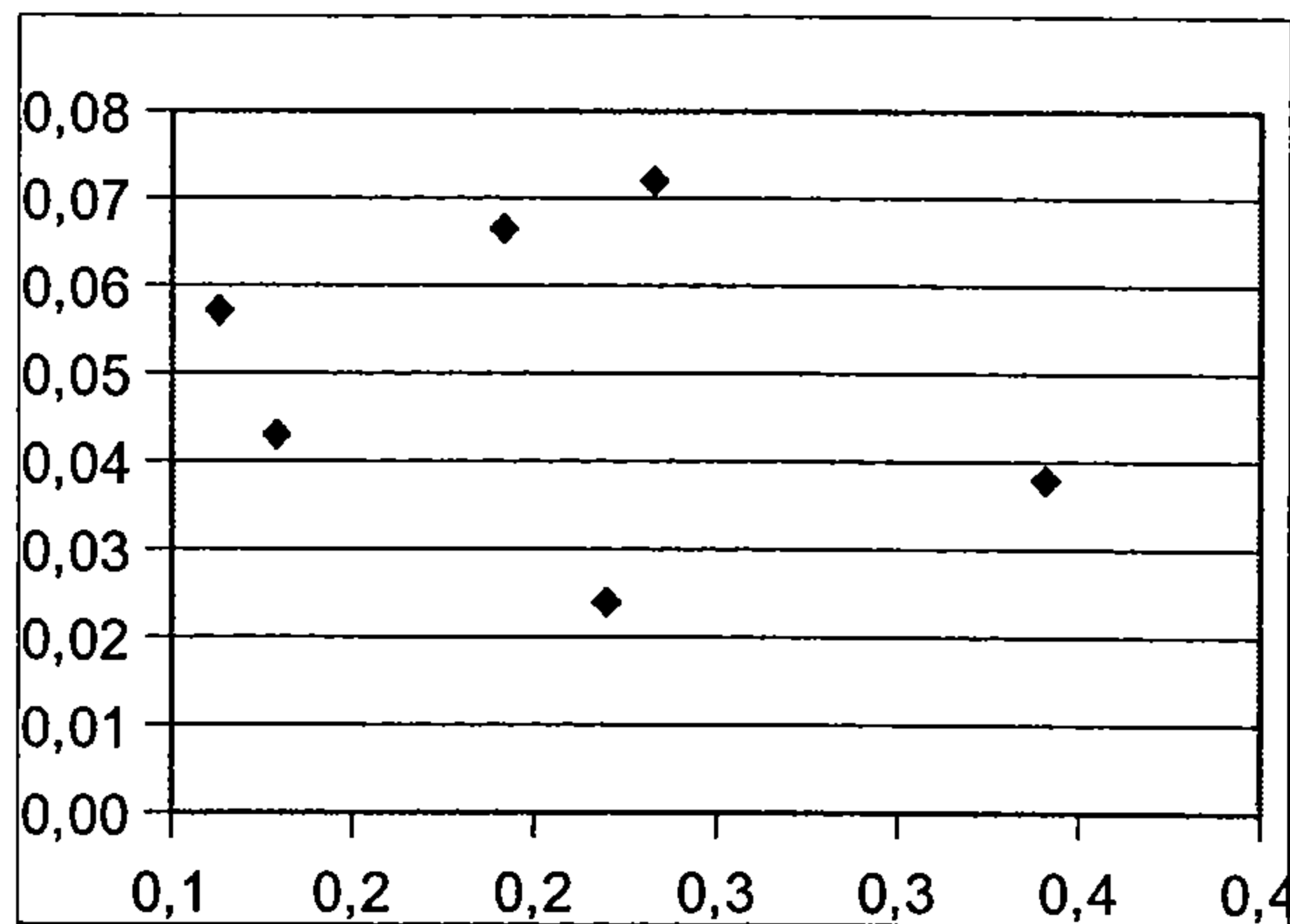
PAVLIK	21123
VAPA592.0	Sp07K/AVIII/1/8
25/11/2009 07:12:28	KBr 10
SONA	10566

Obr. 10, IR spektrum – frakce IX (Pavlík et al.)

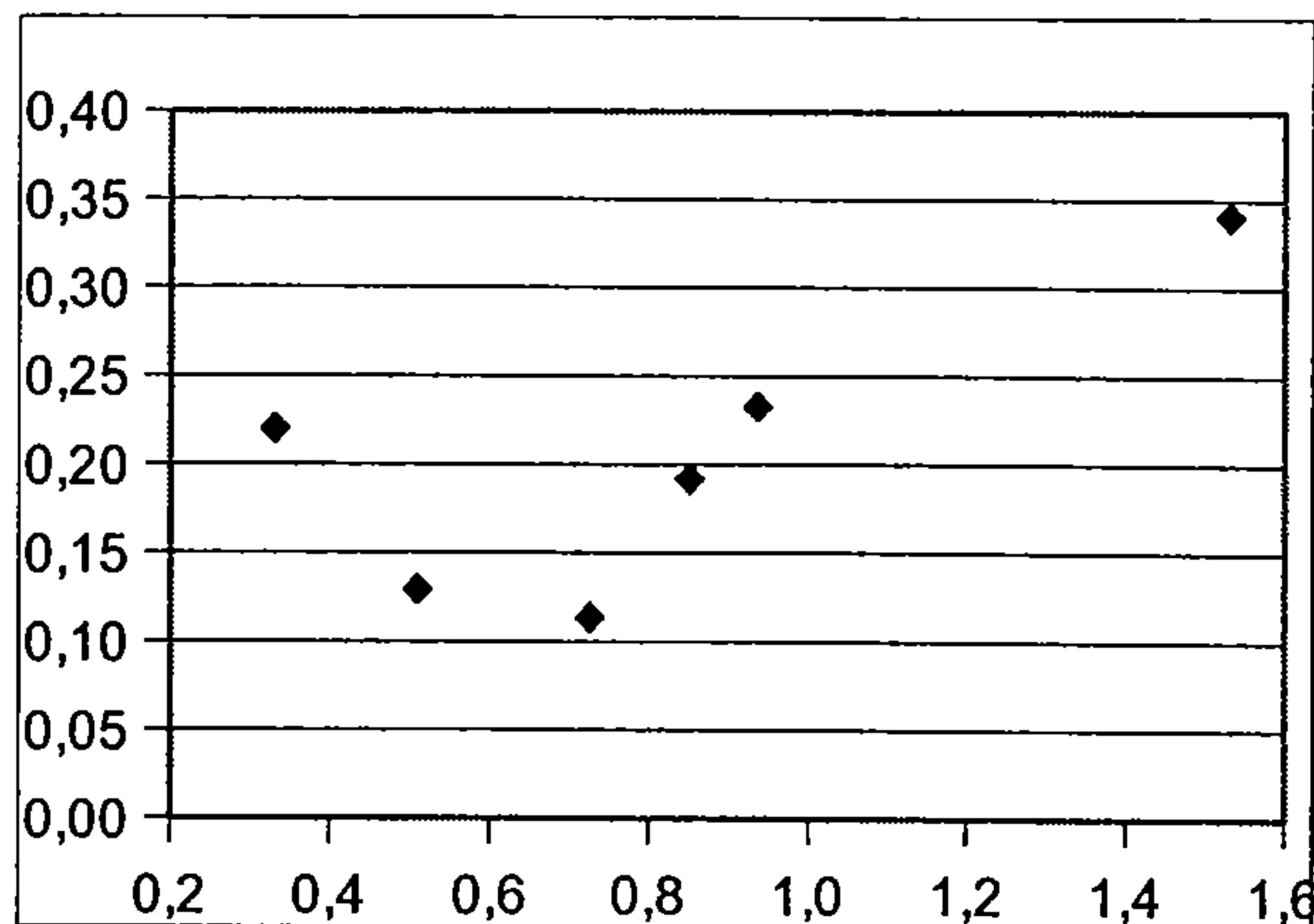


PAVLIK	21124
VAPA593.0	Sp07K/A/IX/1/9
25/11/2009 07:50:12	KBr 10
SONA	10567

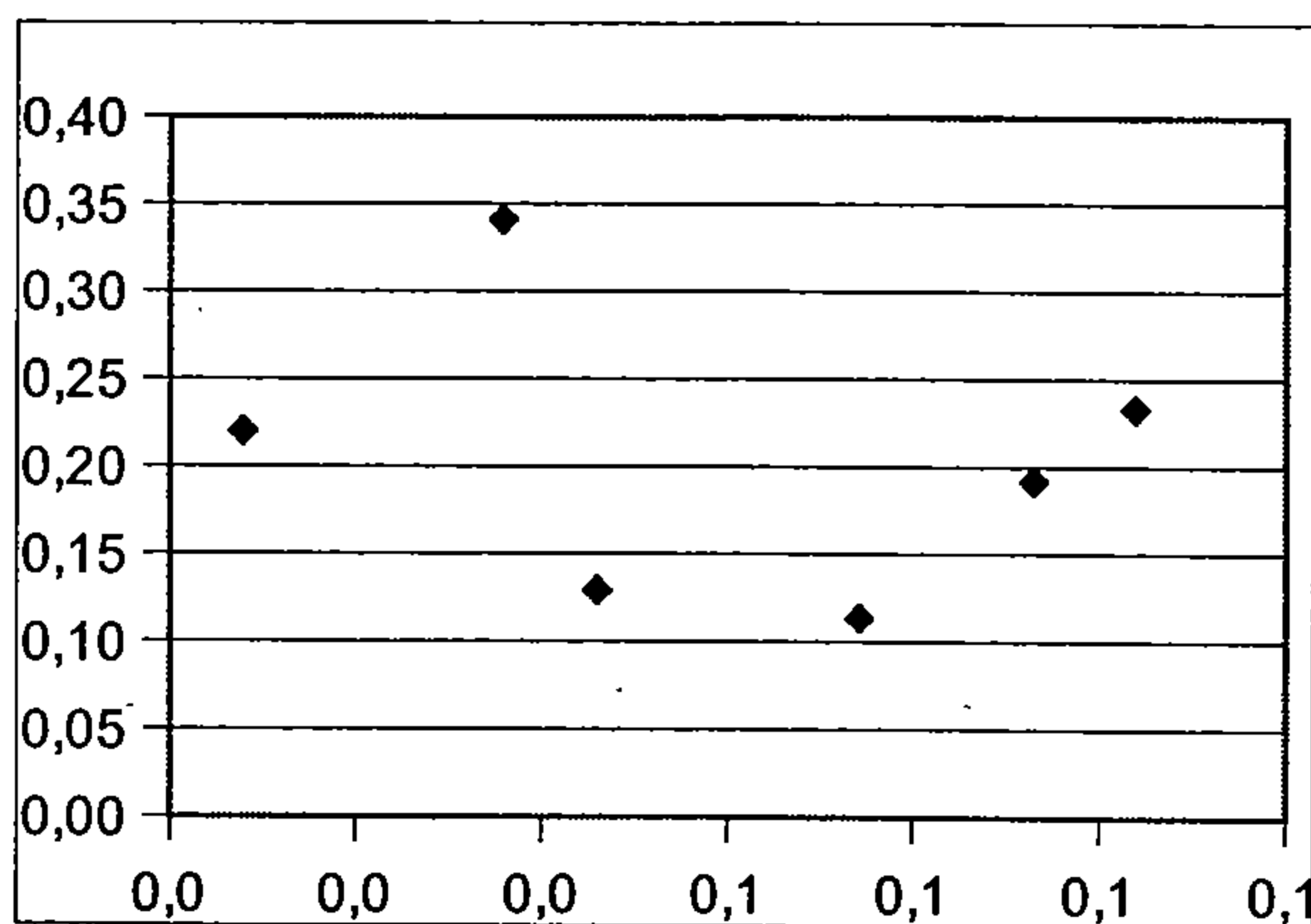
Korelace mezi prvky – frakce I



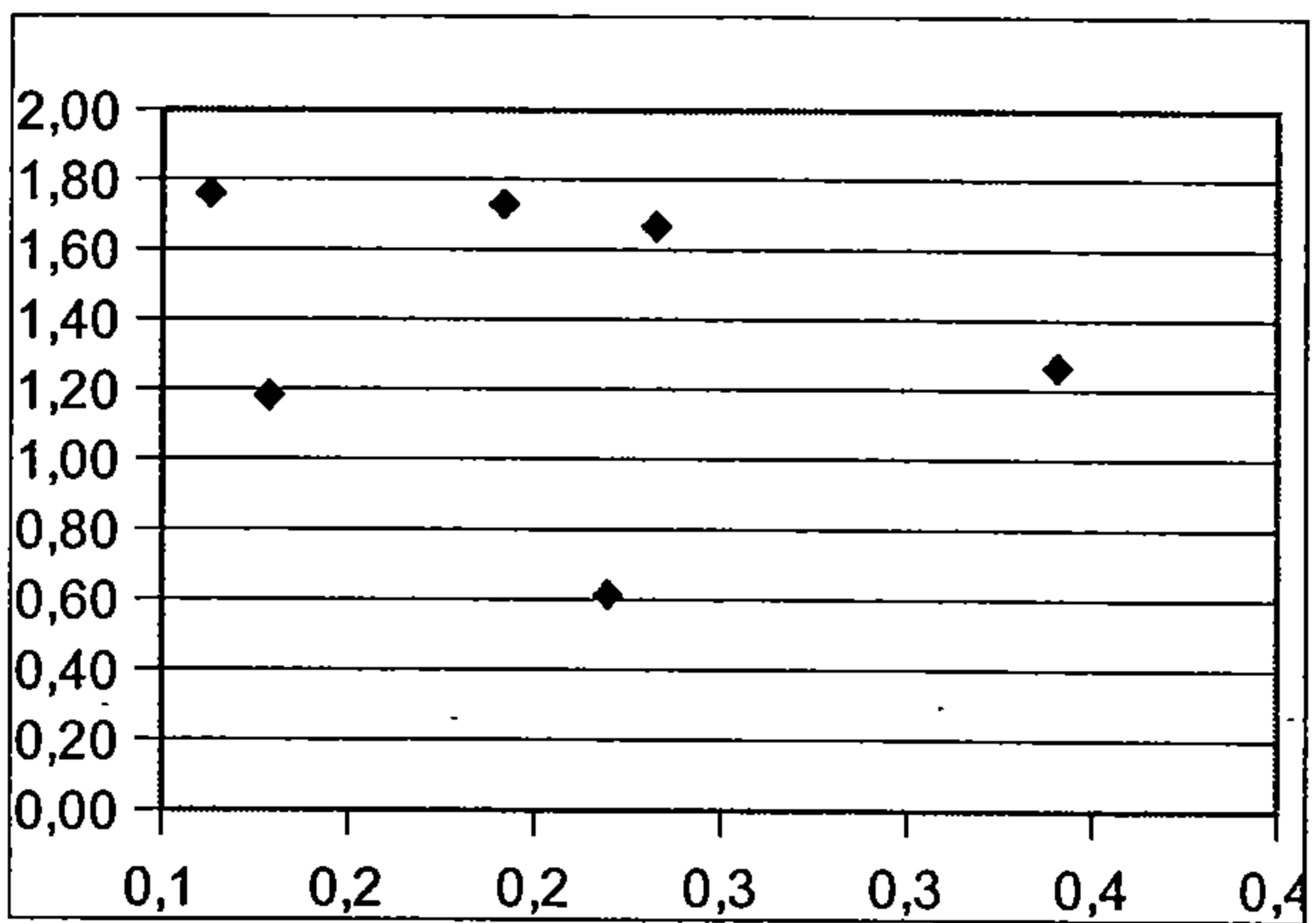
Graf 1: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,0982$



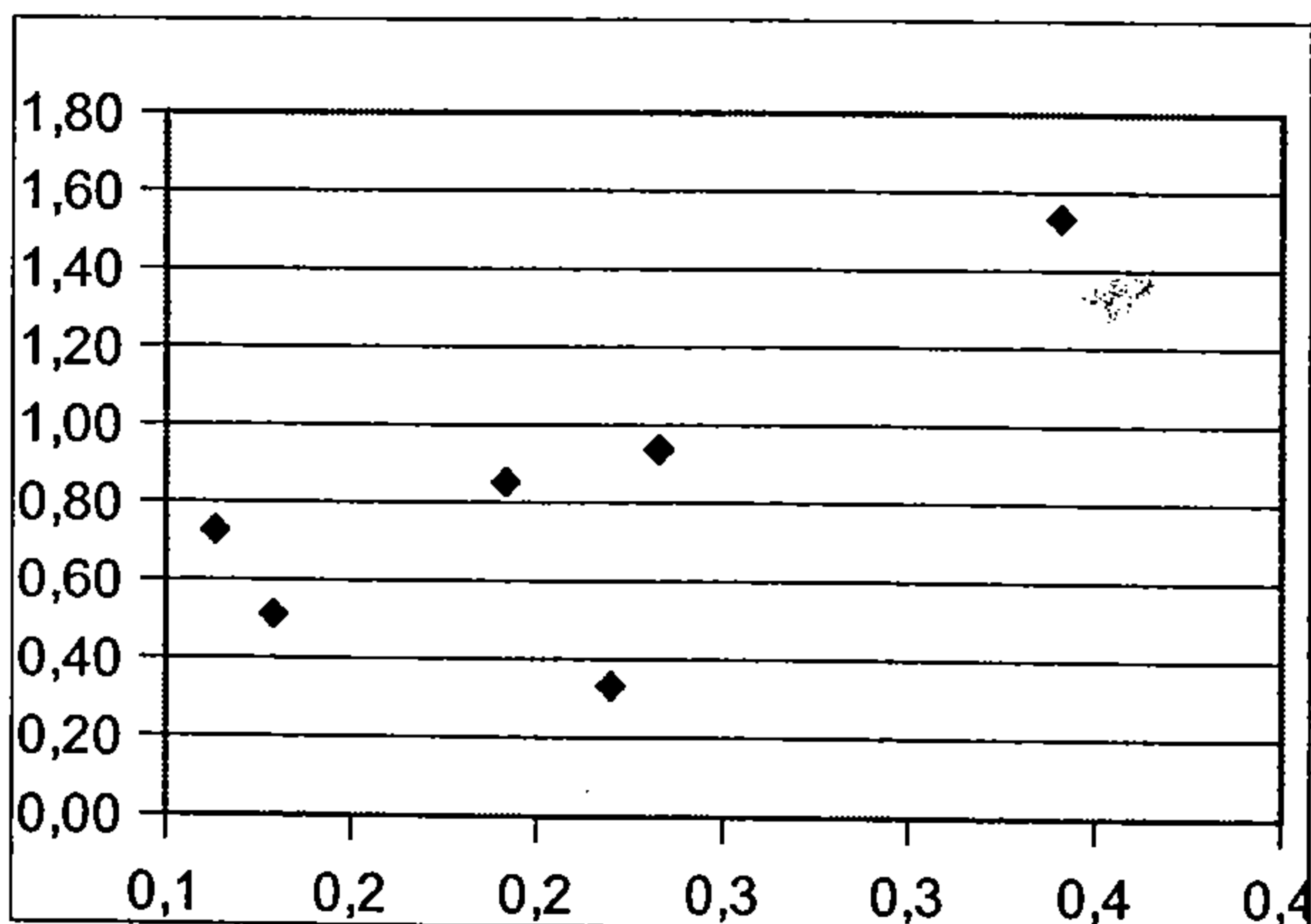
Graf 4: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,7605$



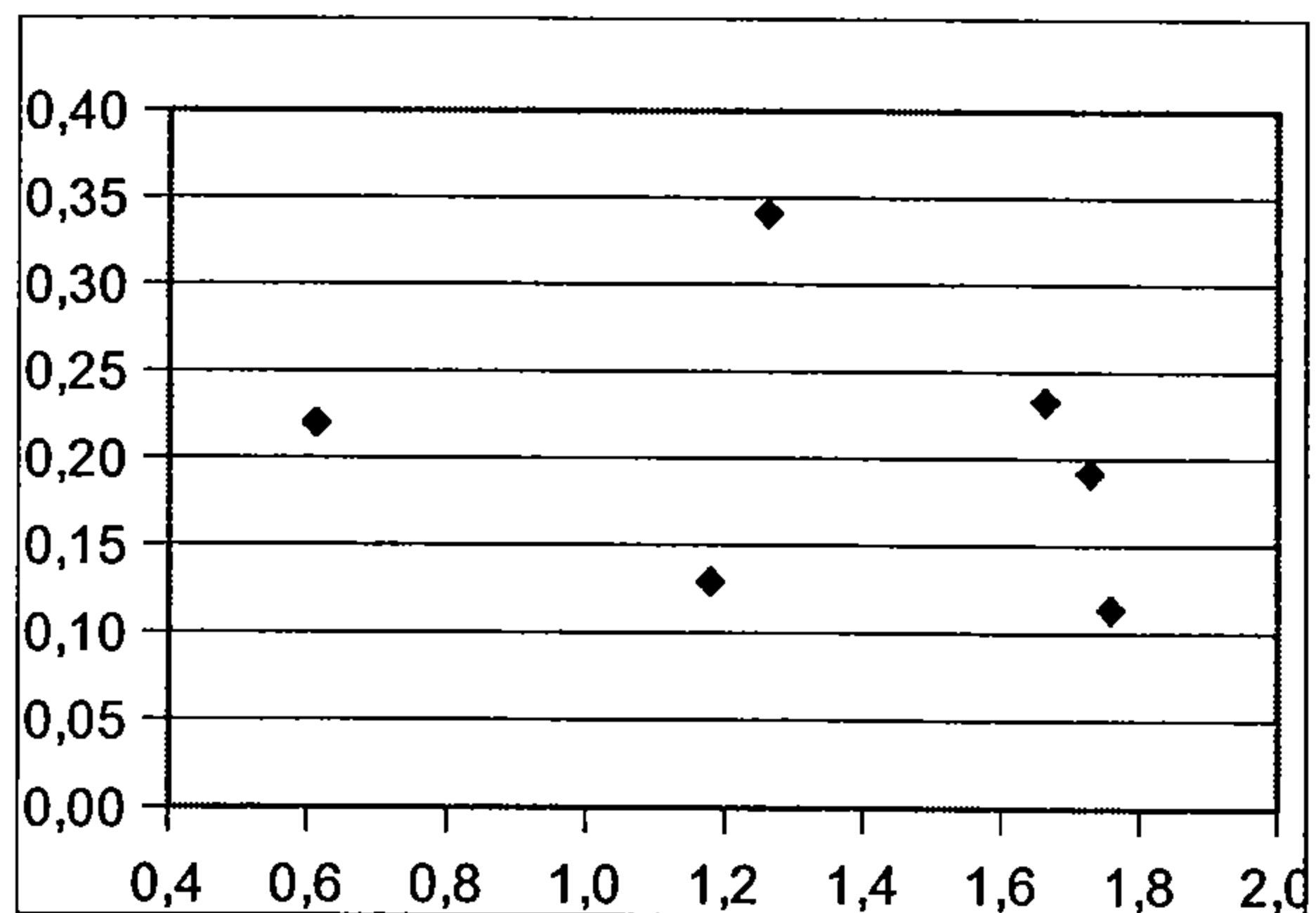
Graf 2: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,1241$



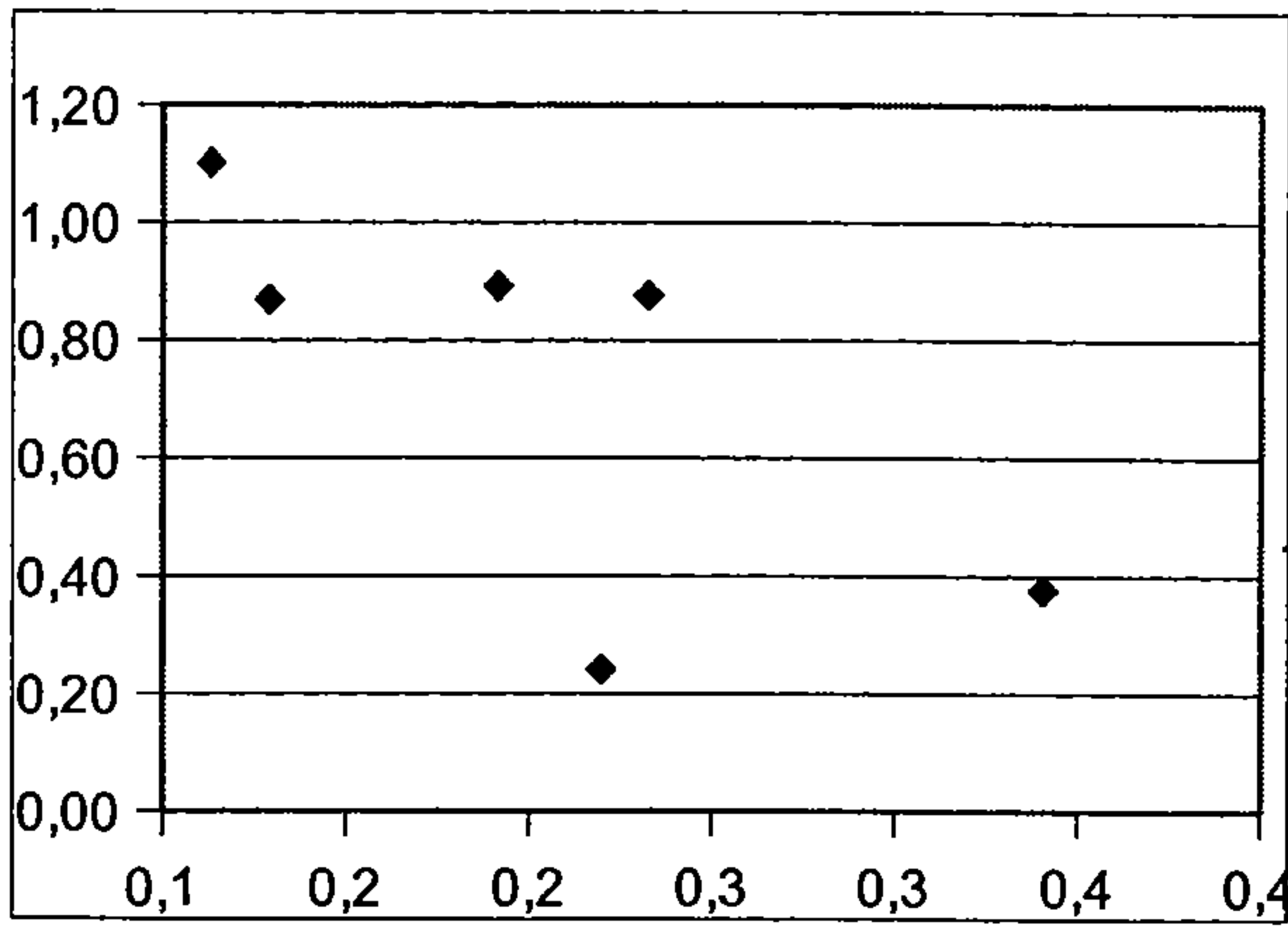
Graf 5: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,0795$



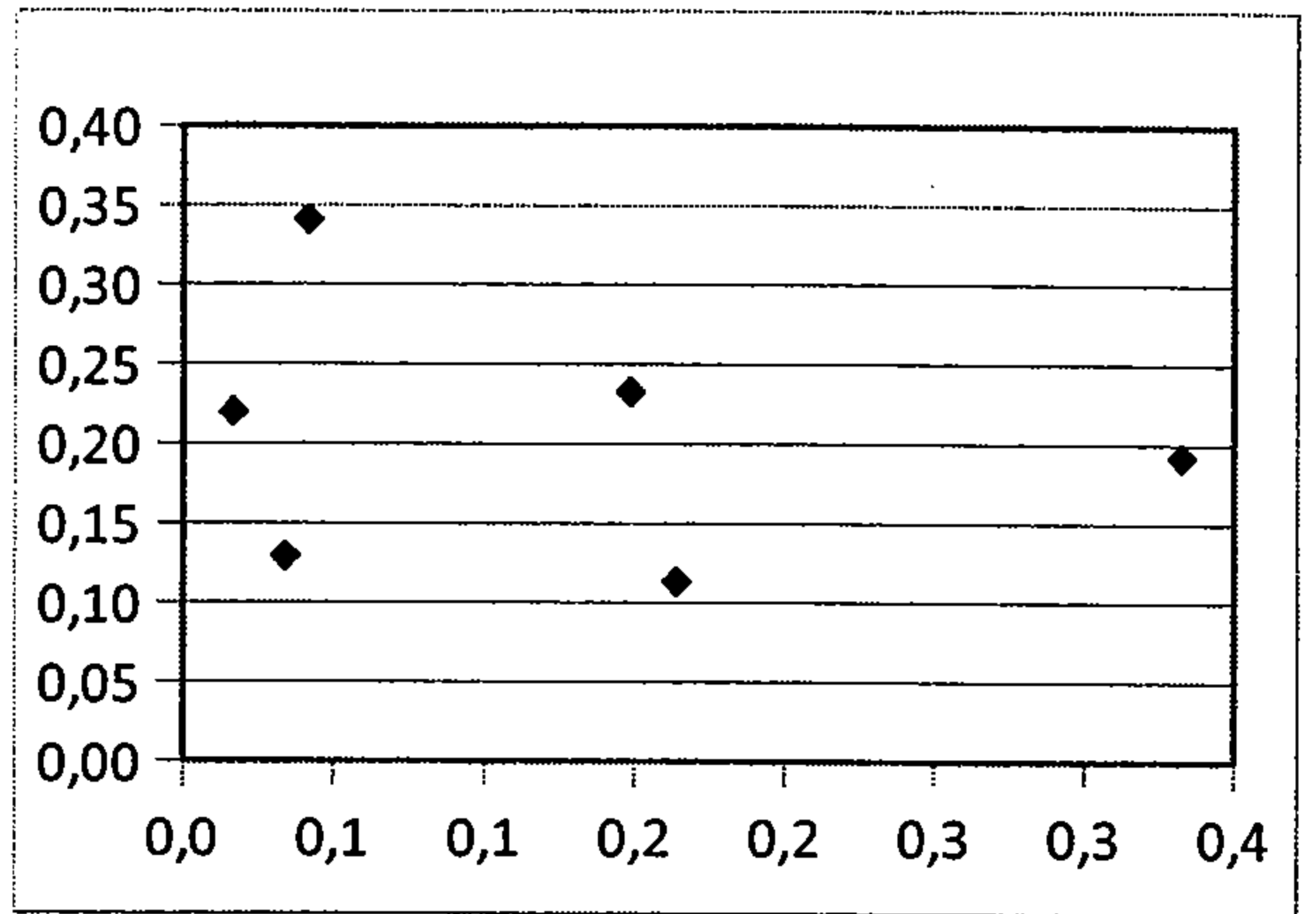
Graf 3: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,7237$



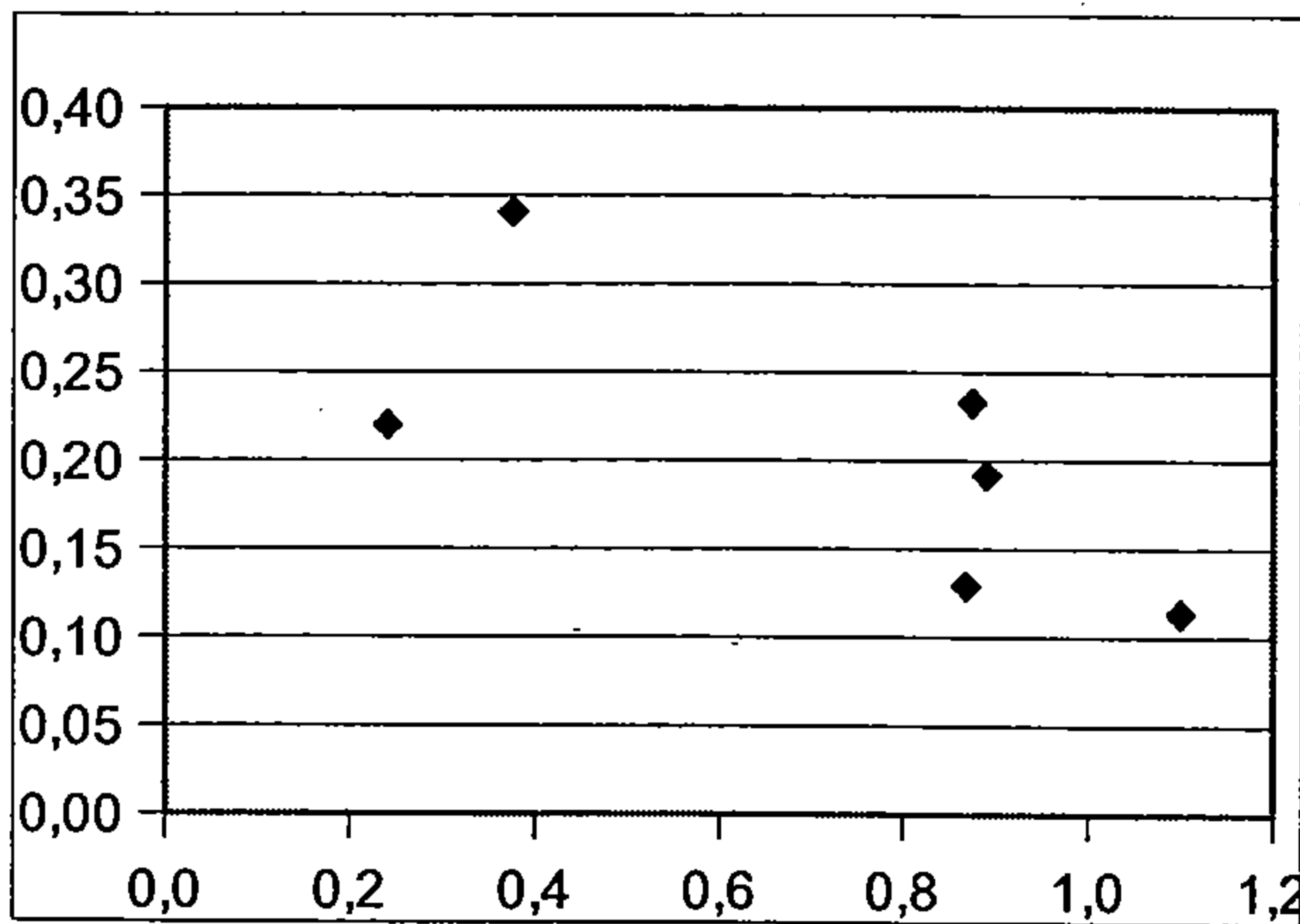
Graf 6: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,1491$



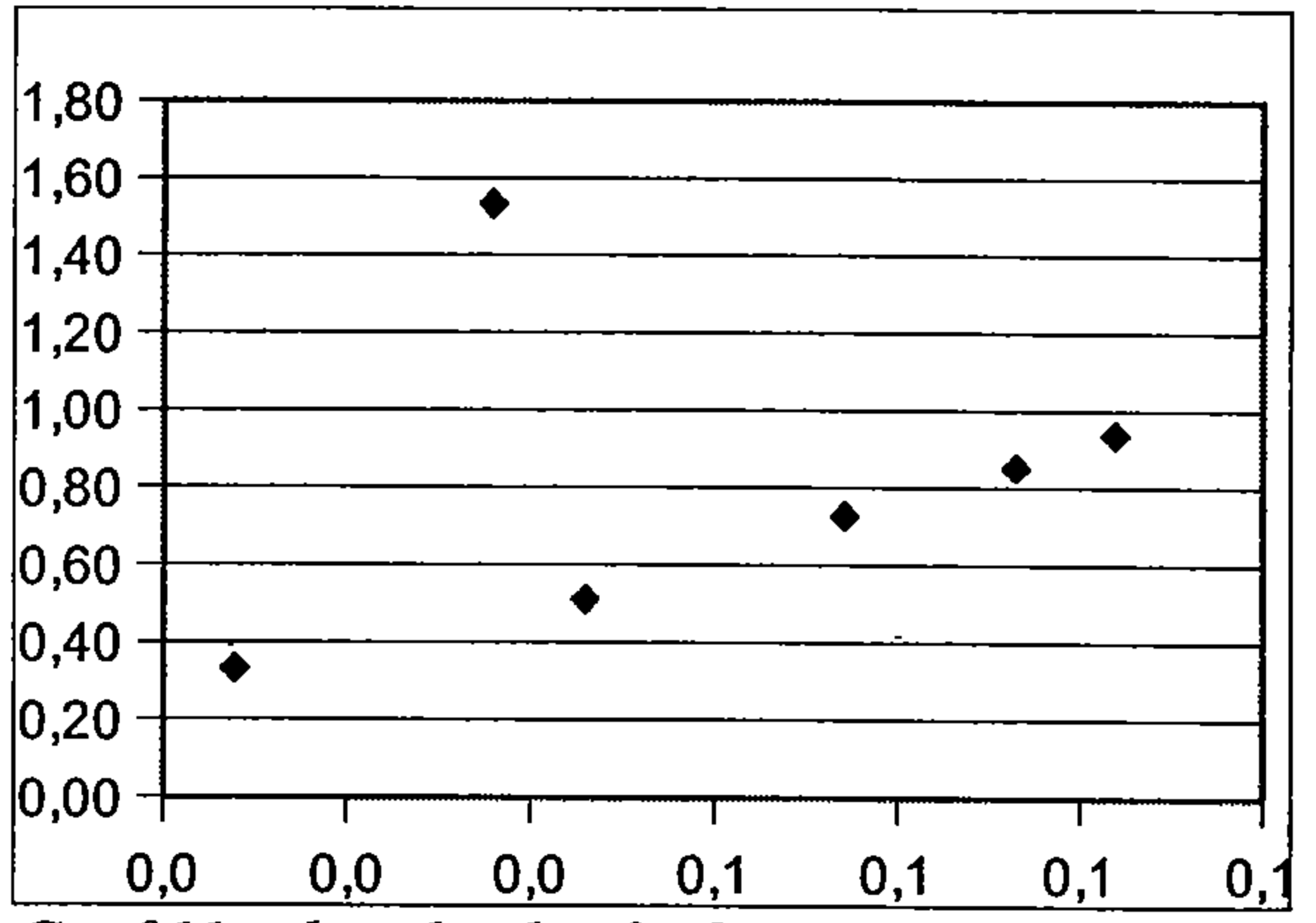
Graf 7: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R^2 = 0,5182$



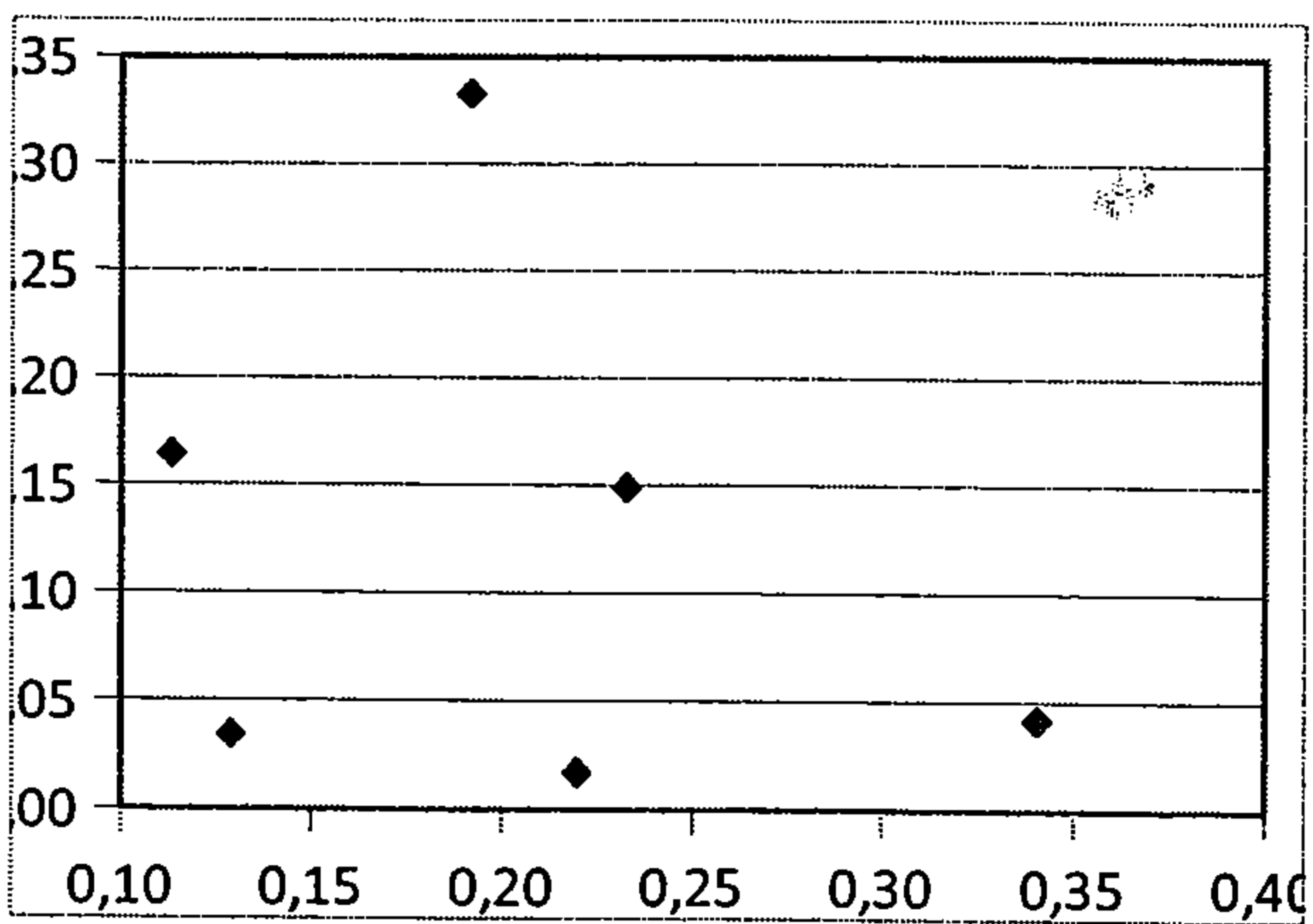
Graf 10: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,092$



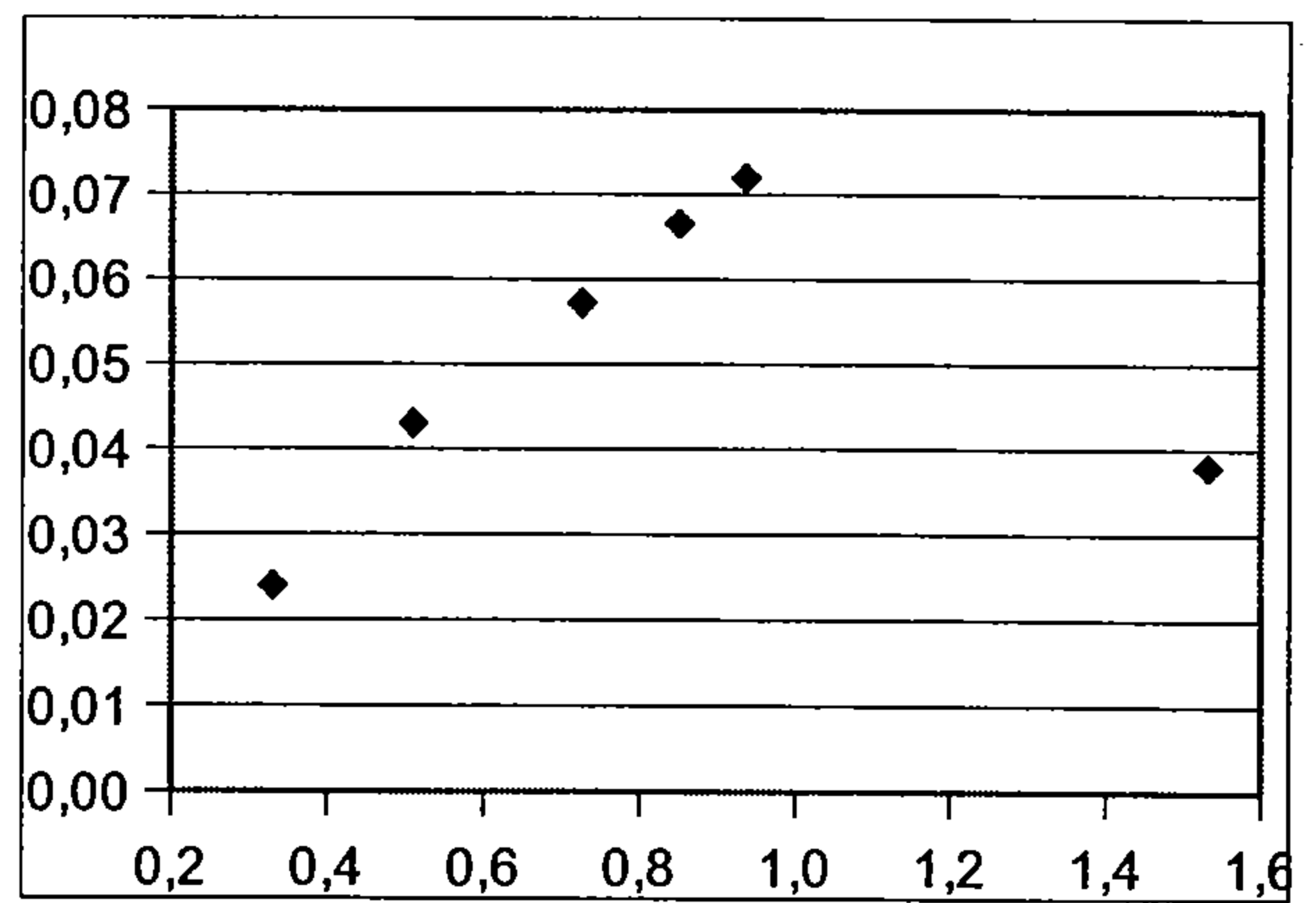
Graf 8: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,6285$



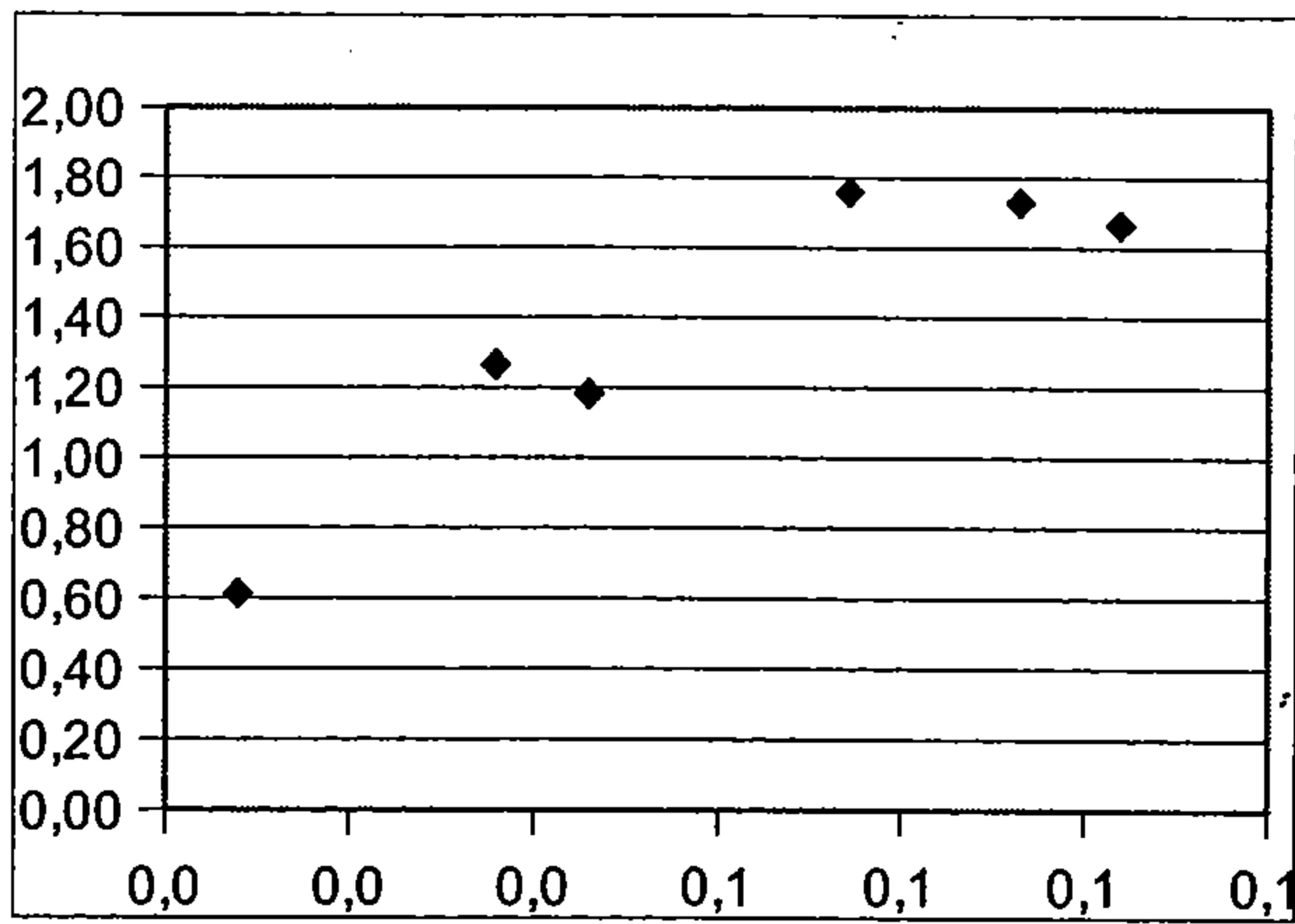
Graf 11: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,1373$



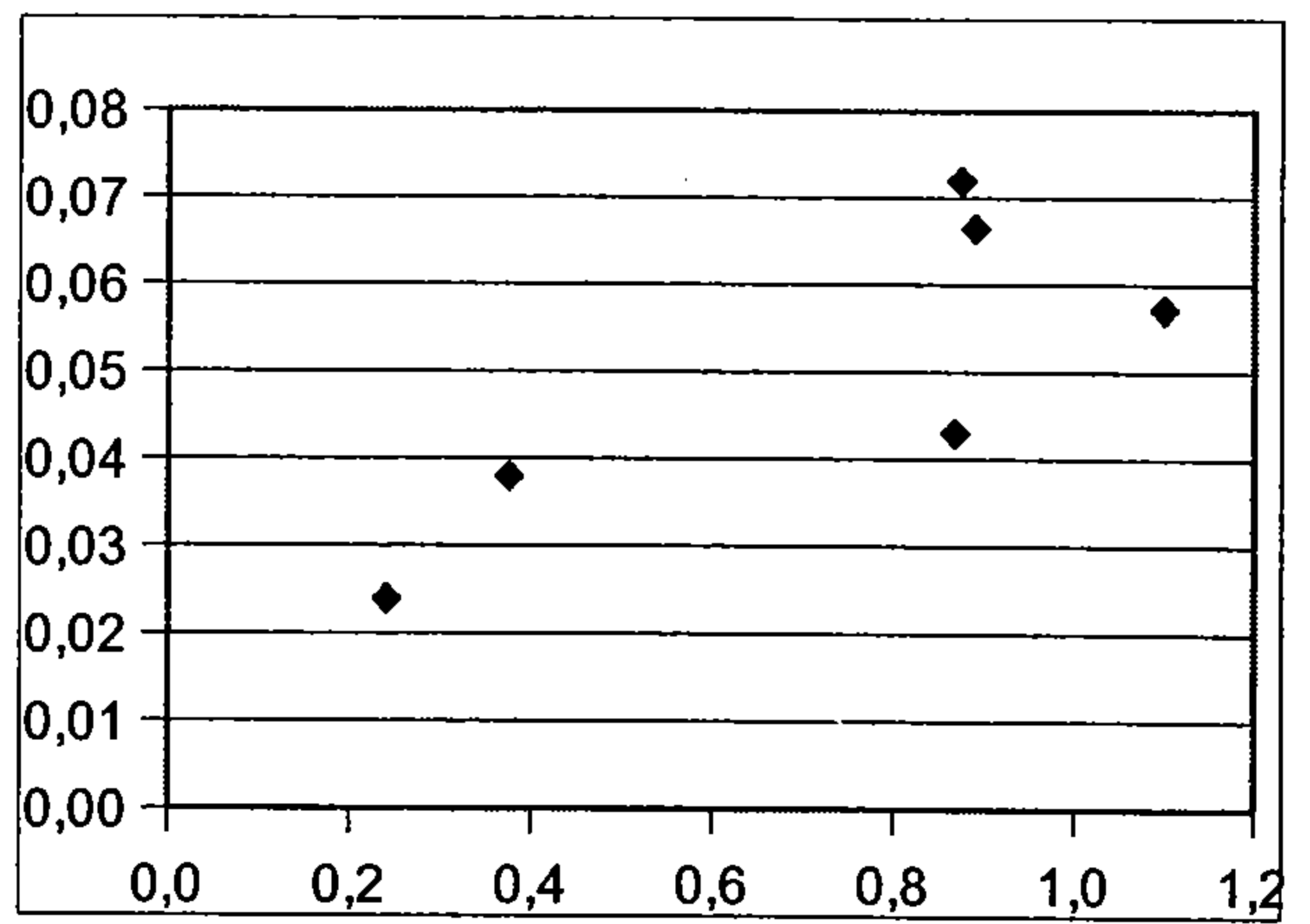
Graf 9: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,150$



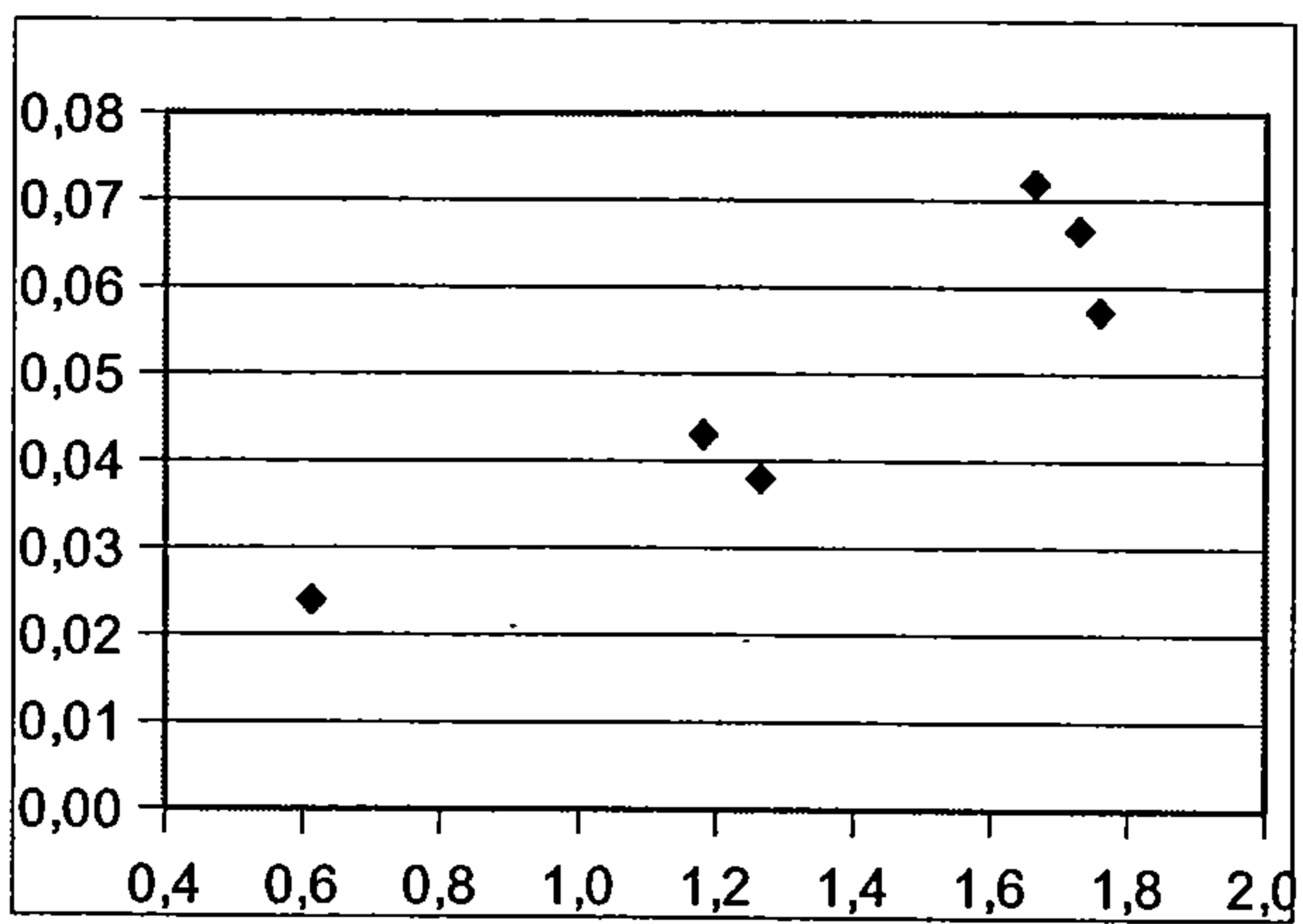
Graf 12: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,981$



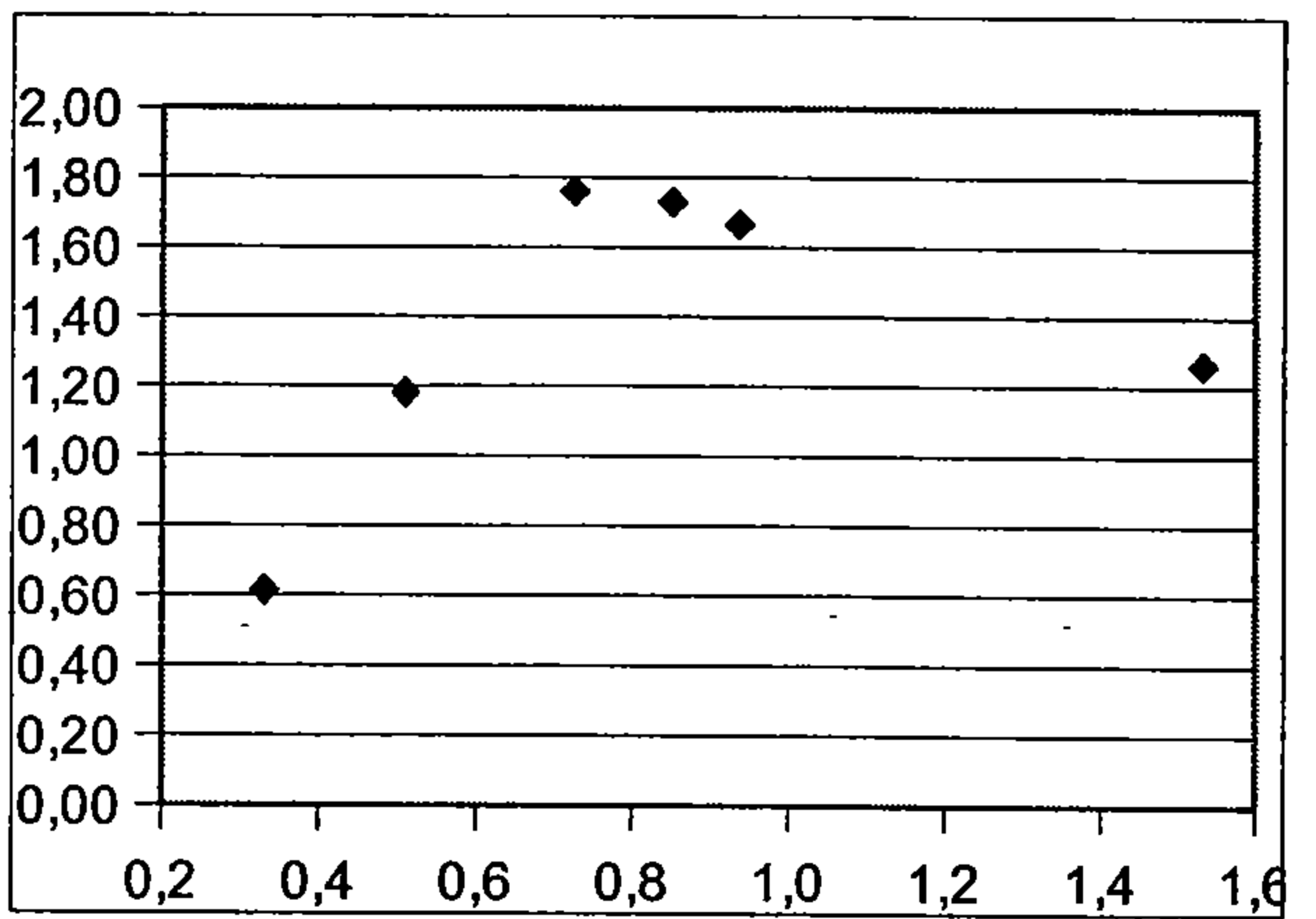
Graf 13: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,9497$



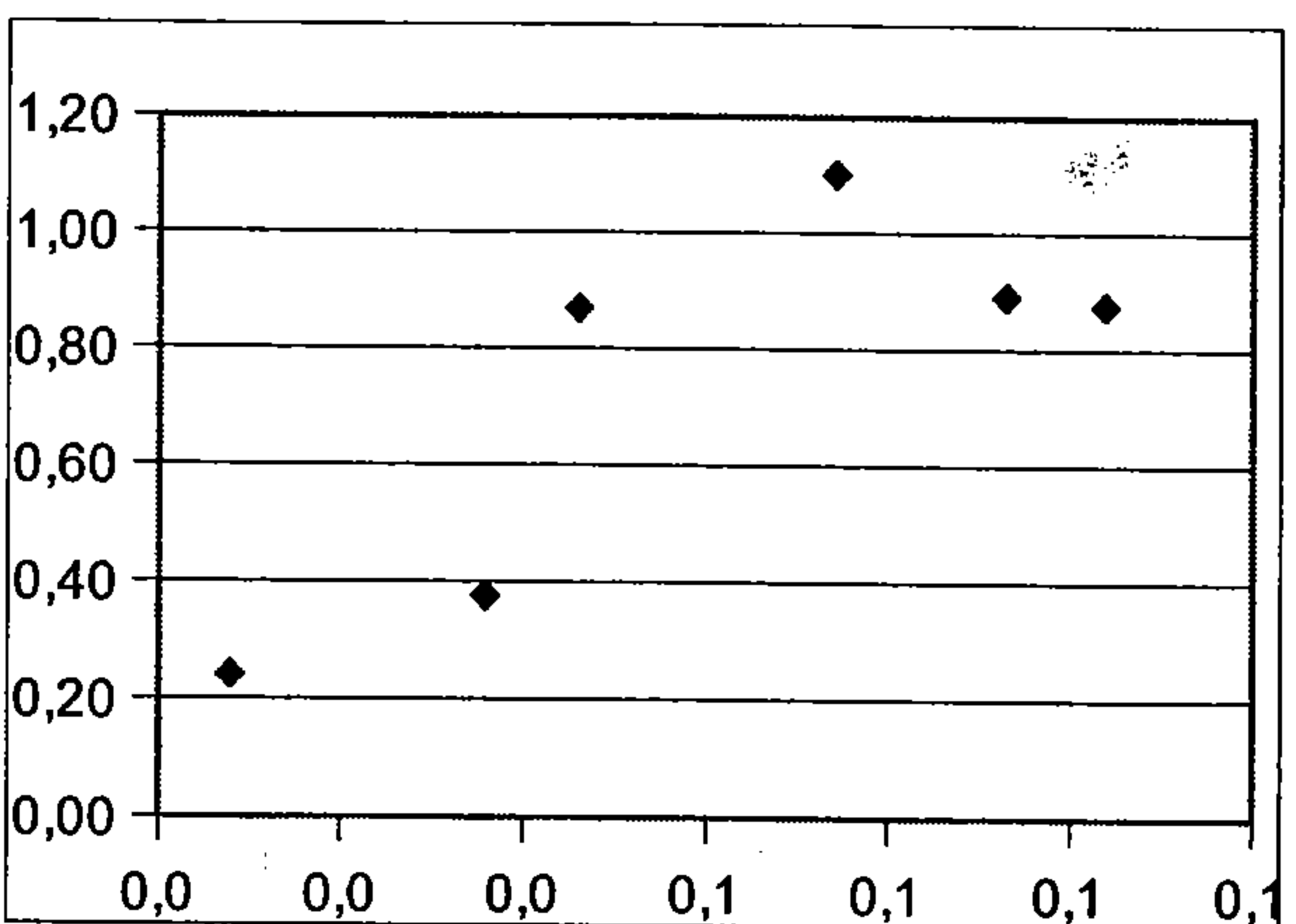
Graf 16: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,7188$



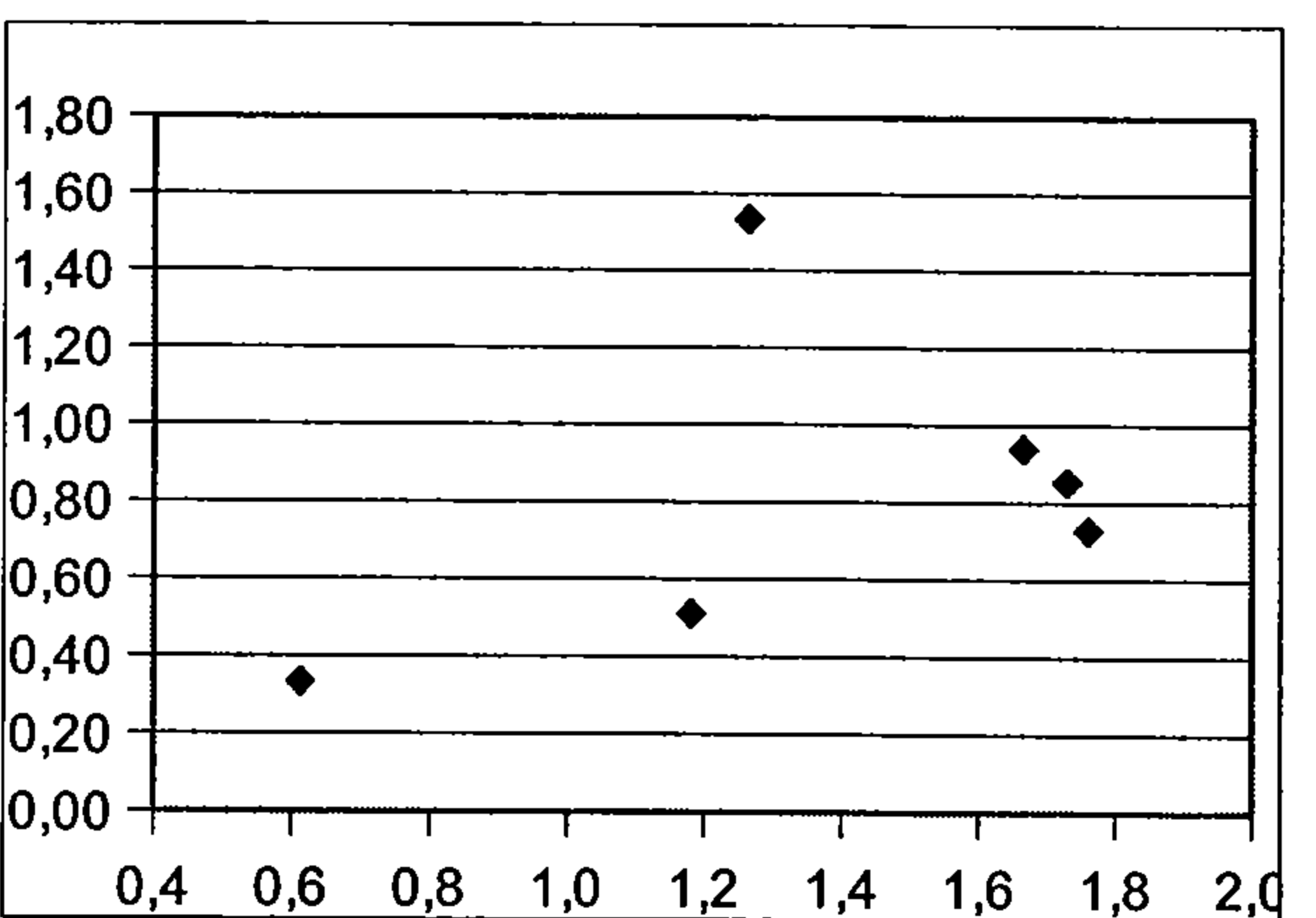
Graf 14: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,8601$



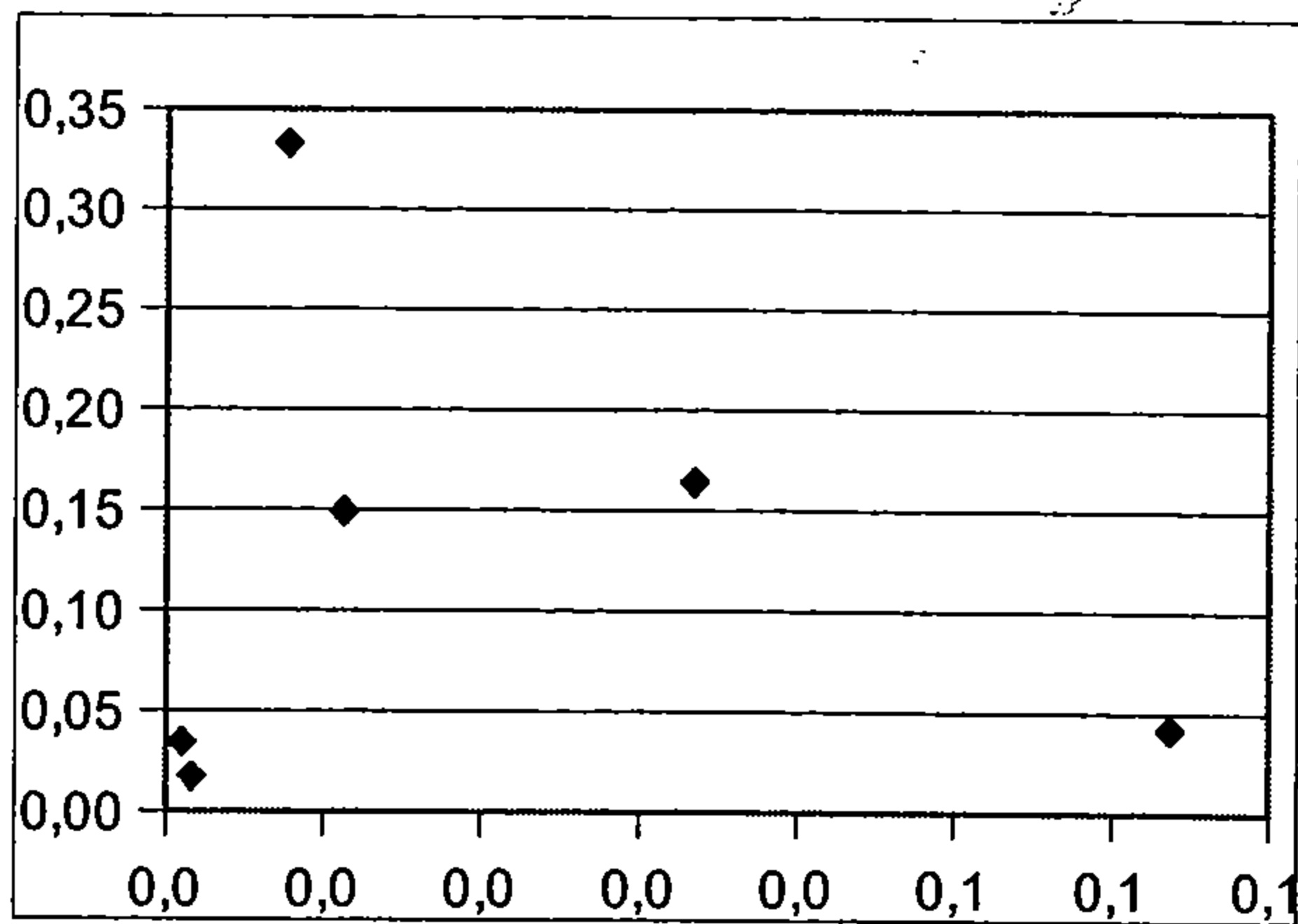
Graf 17: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,9524$



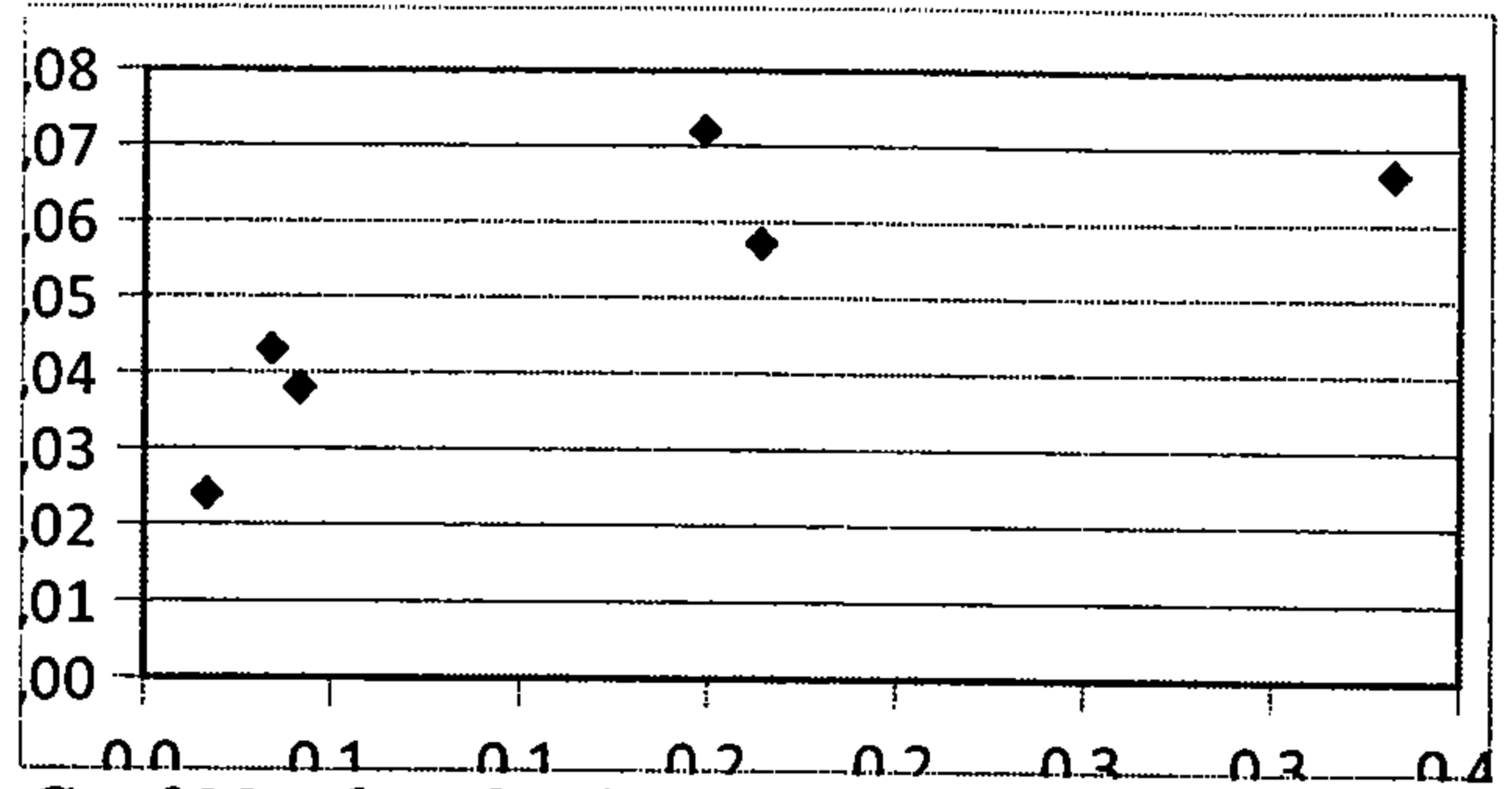
Graf 15: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,7956$



Graf 18: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,4191$

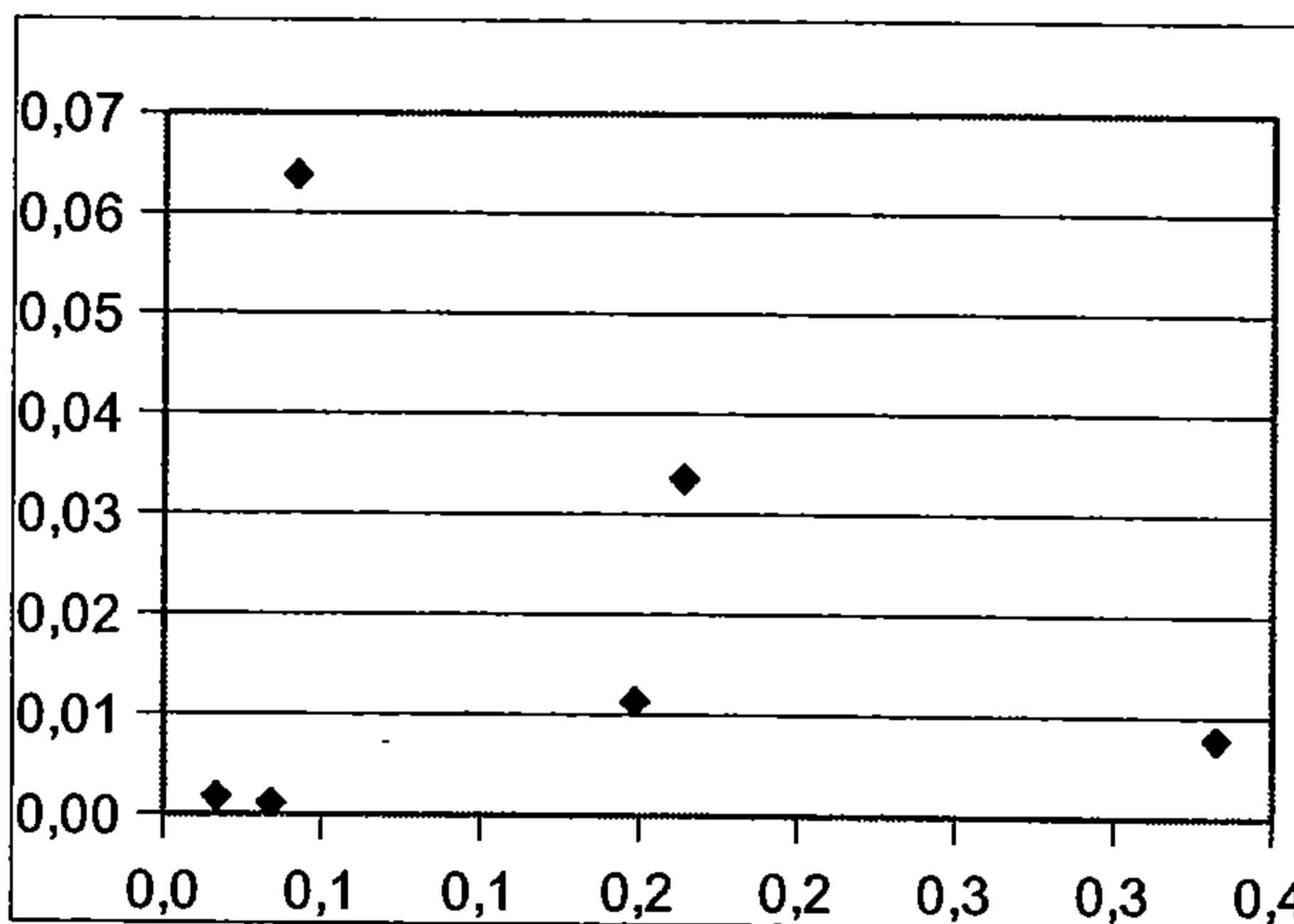


Graf 19: vliv obsahu mědi na obsah zinku,
 $R^2 = 0,3311$

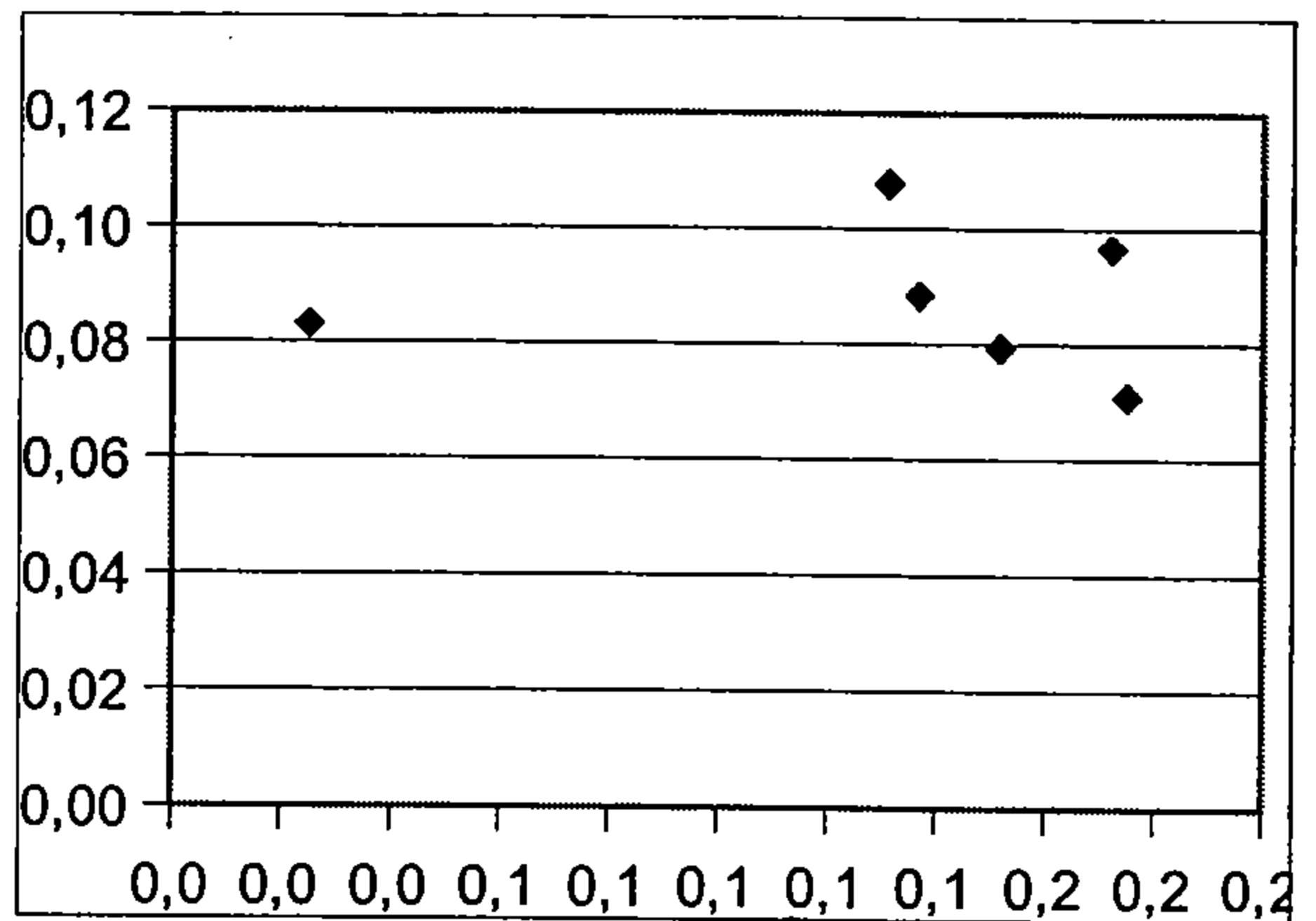


Graf 22: vliv obsahu zinku na obsah fosforu,
 $R^2 = 0,862$

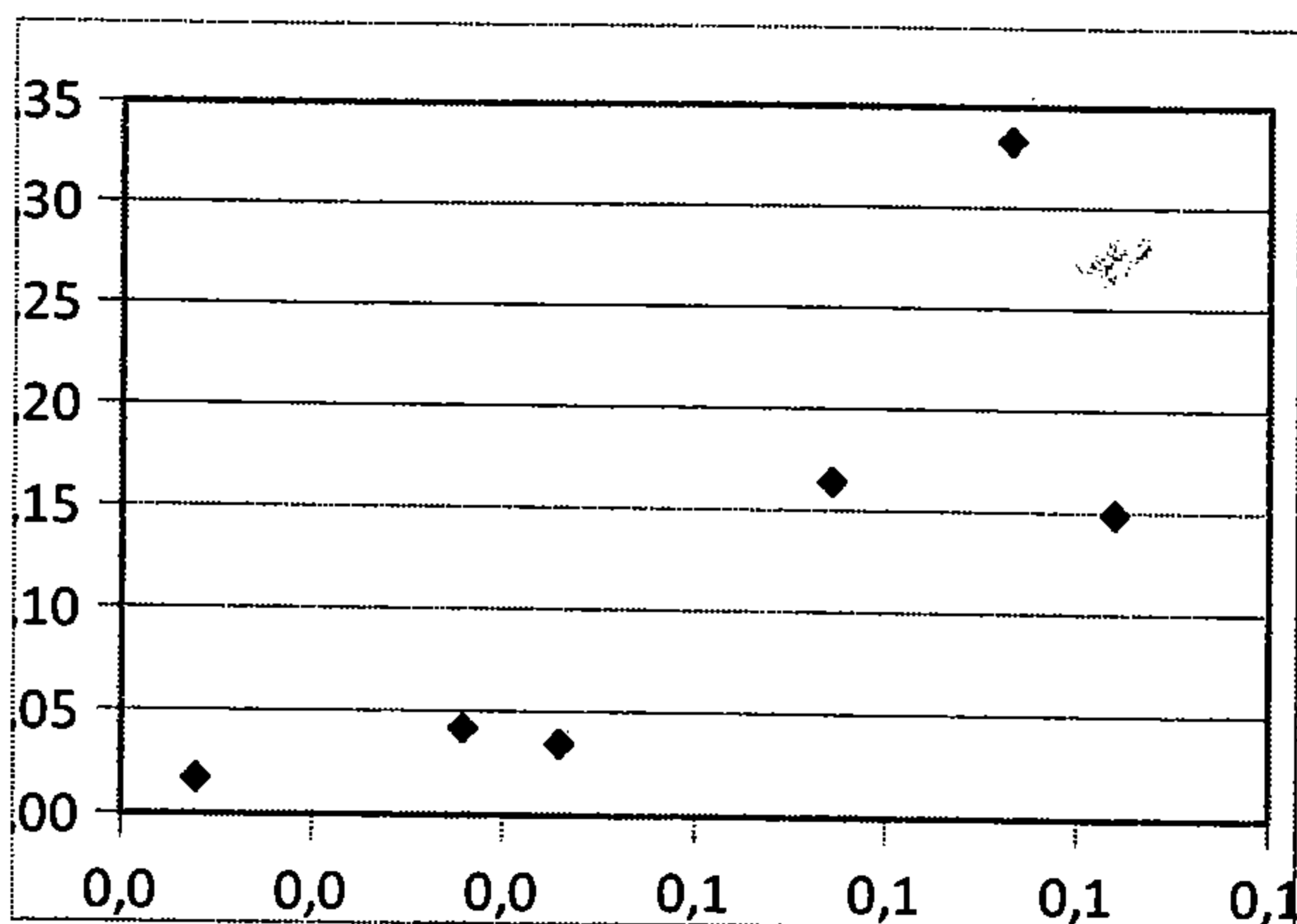
Korelace mezi prvky – frakce II



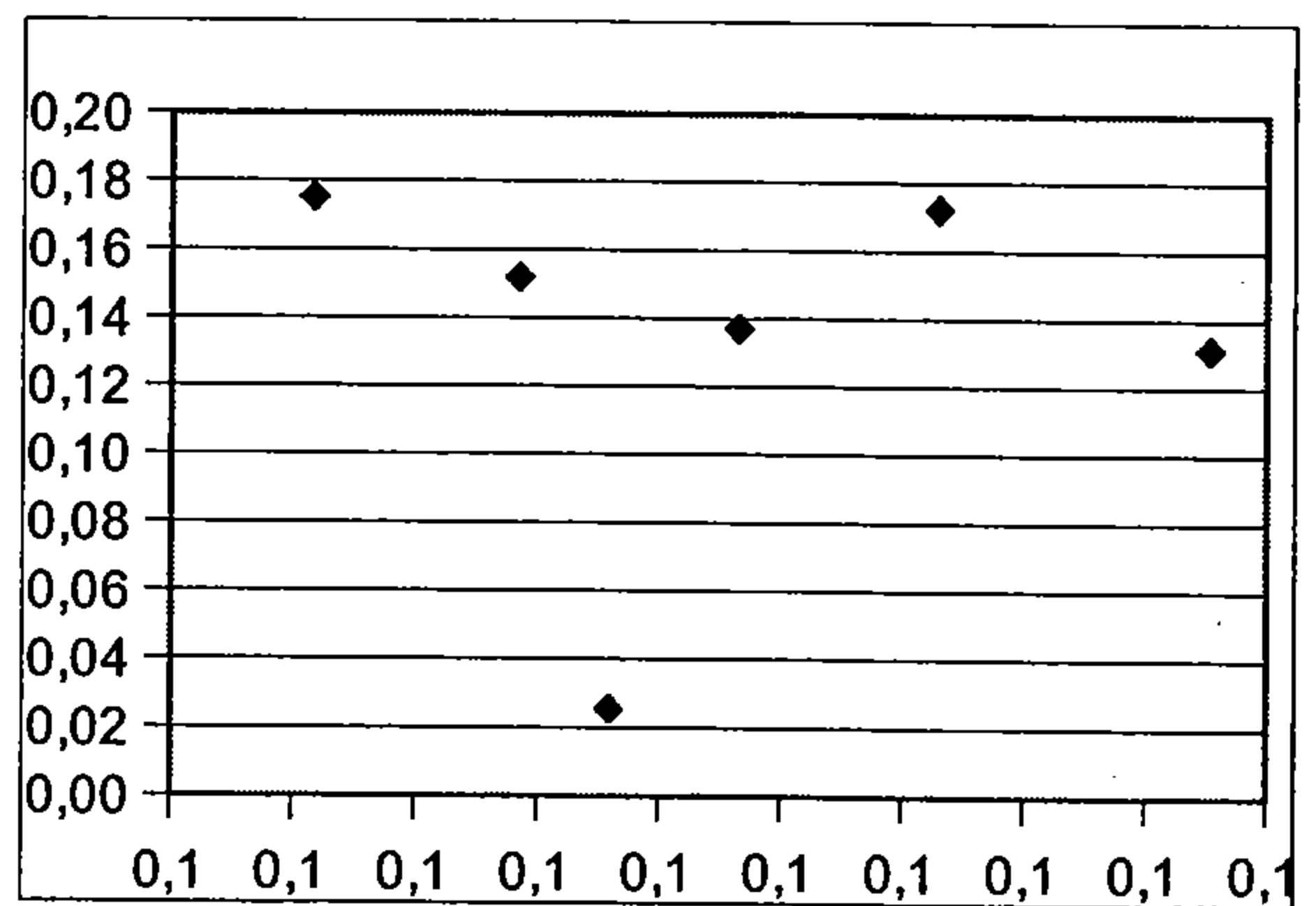
Graf 20: vliv obsahu zinku na obsah mědi,
 $R^2 = 0,0917$



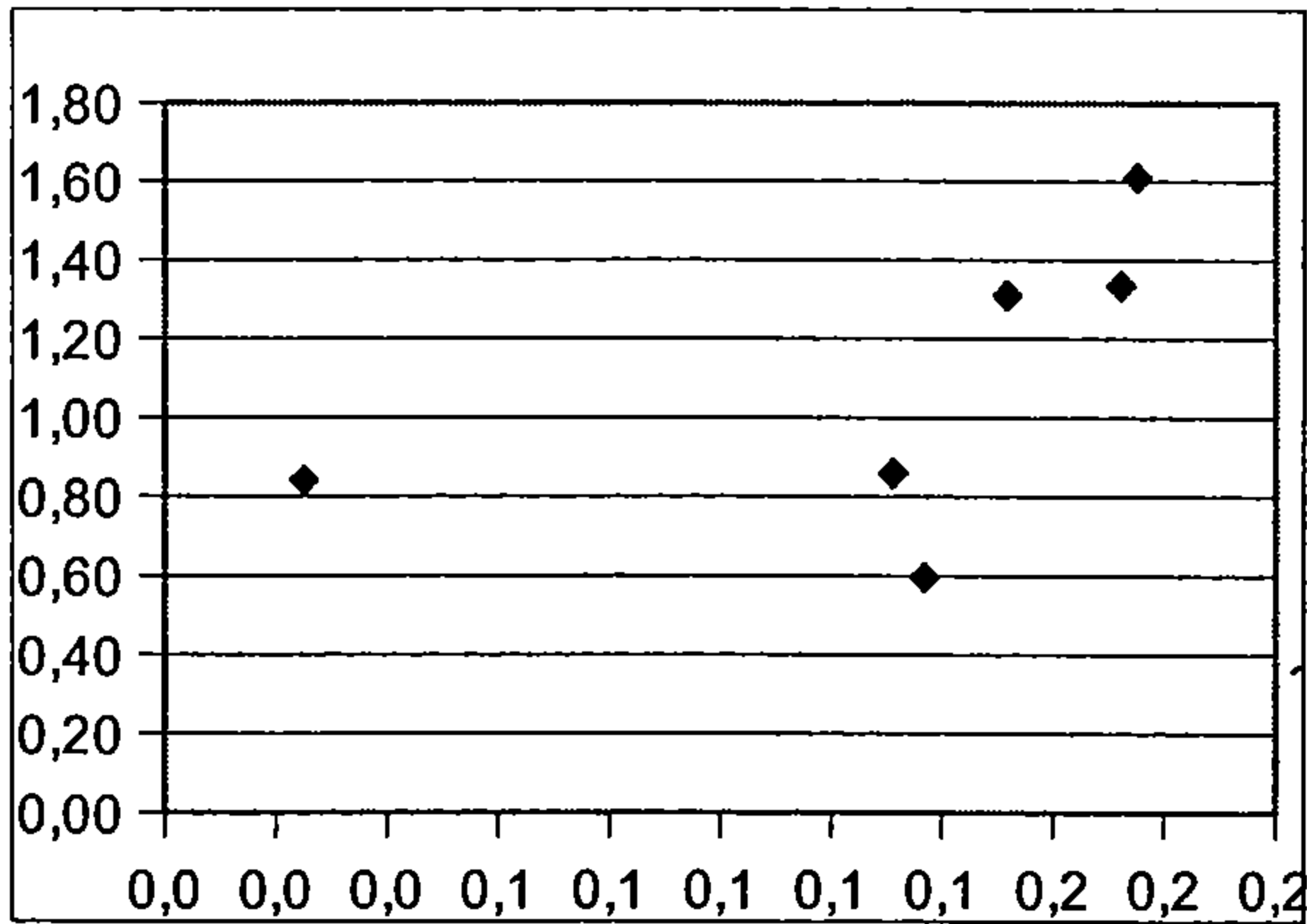
Graf 23: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu,
 $R^2 = 0,293$



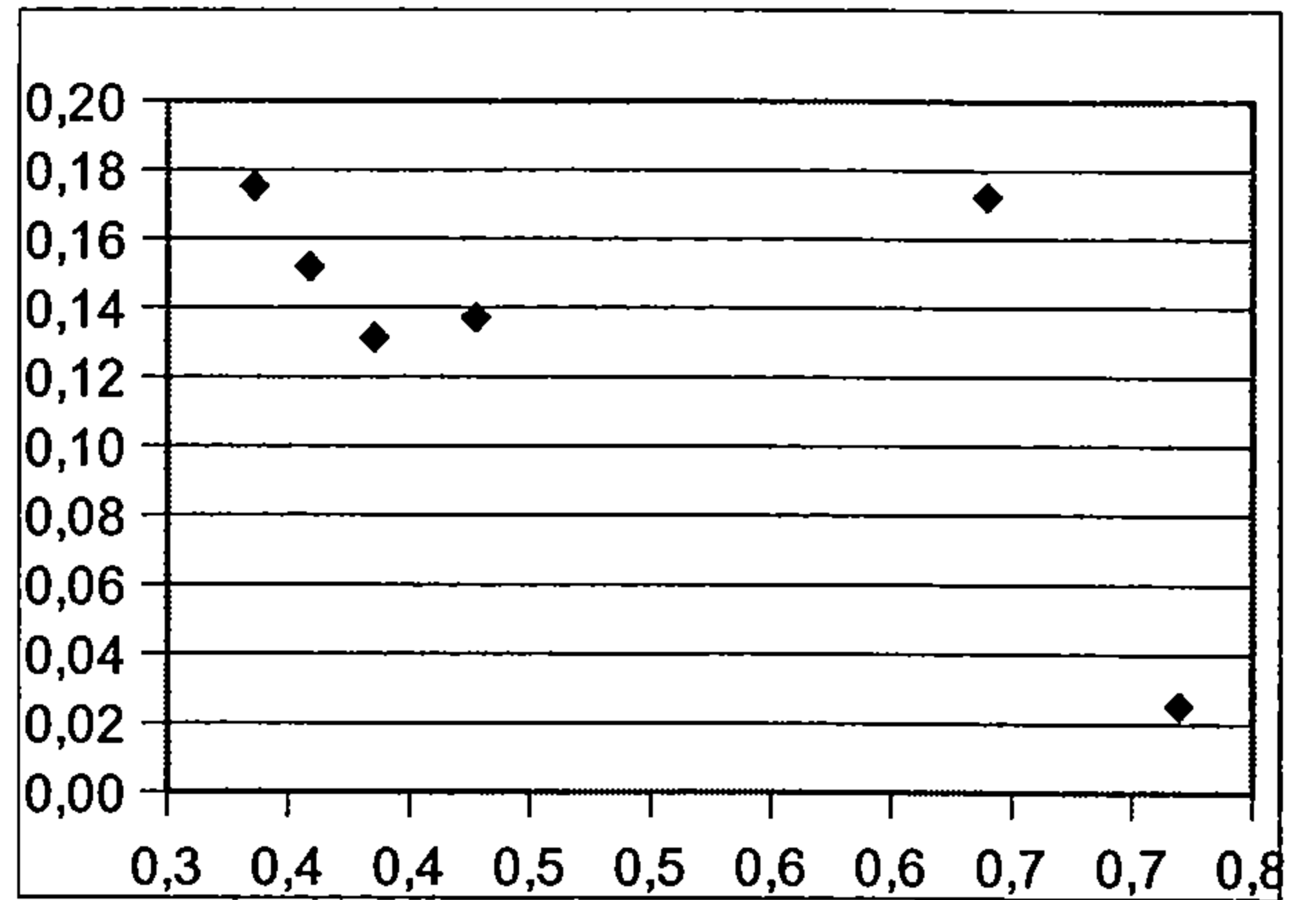
Graf 21: vliv obsahu fosforu na obsah zinku,
 $R^2 = 0,625$



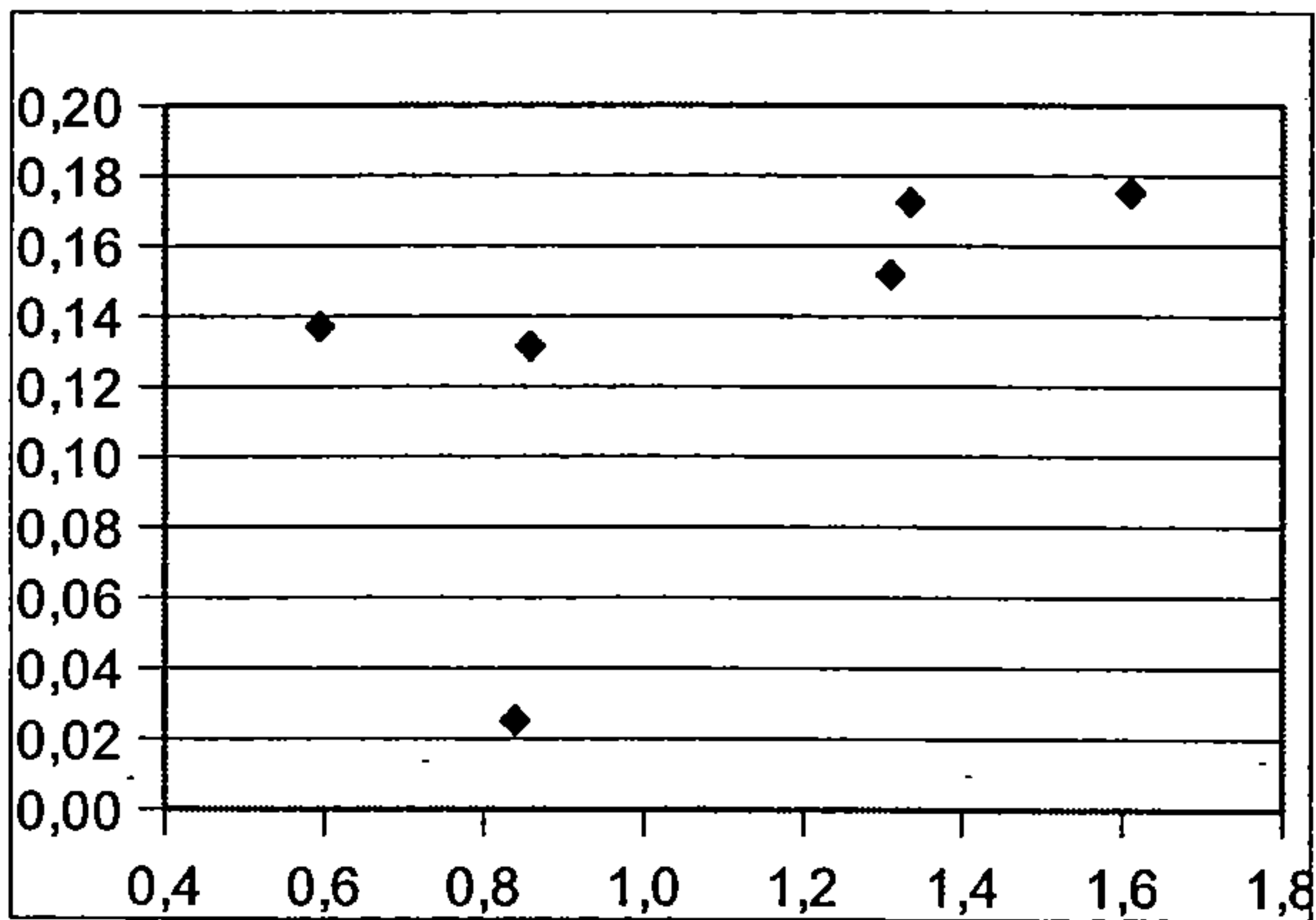
Graf 24: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu,
 $R^2 = 0,112$



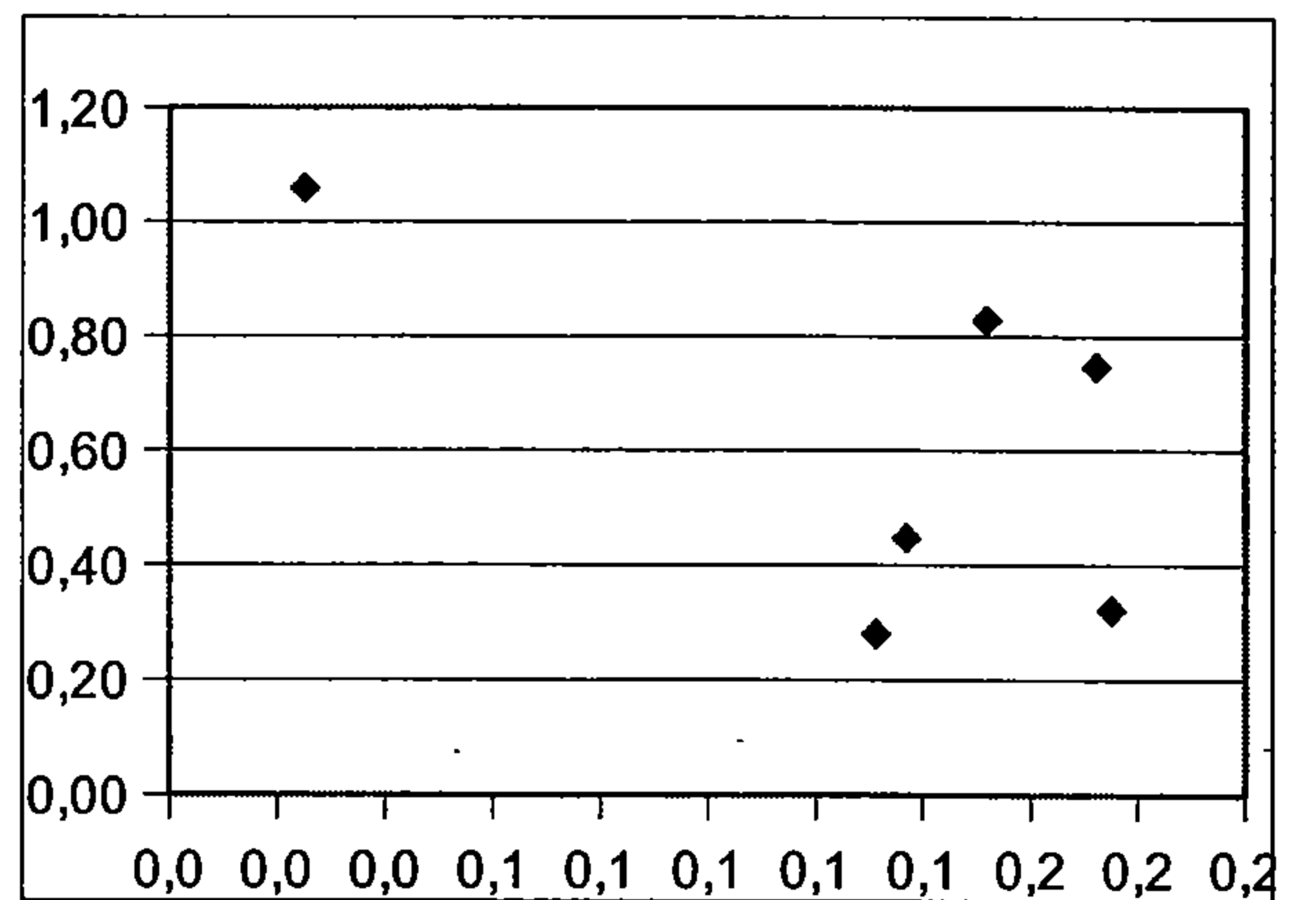
Graf 25: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,796$



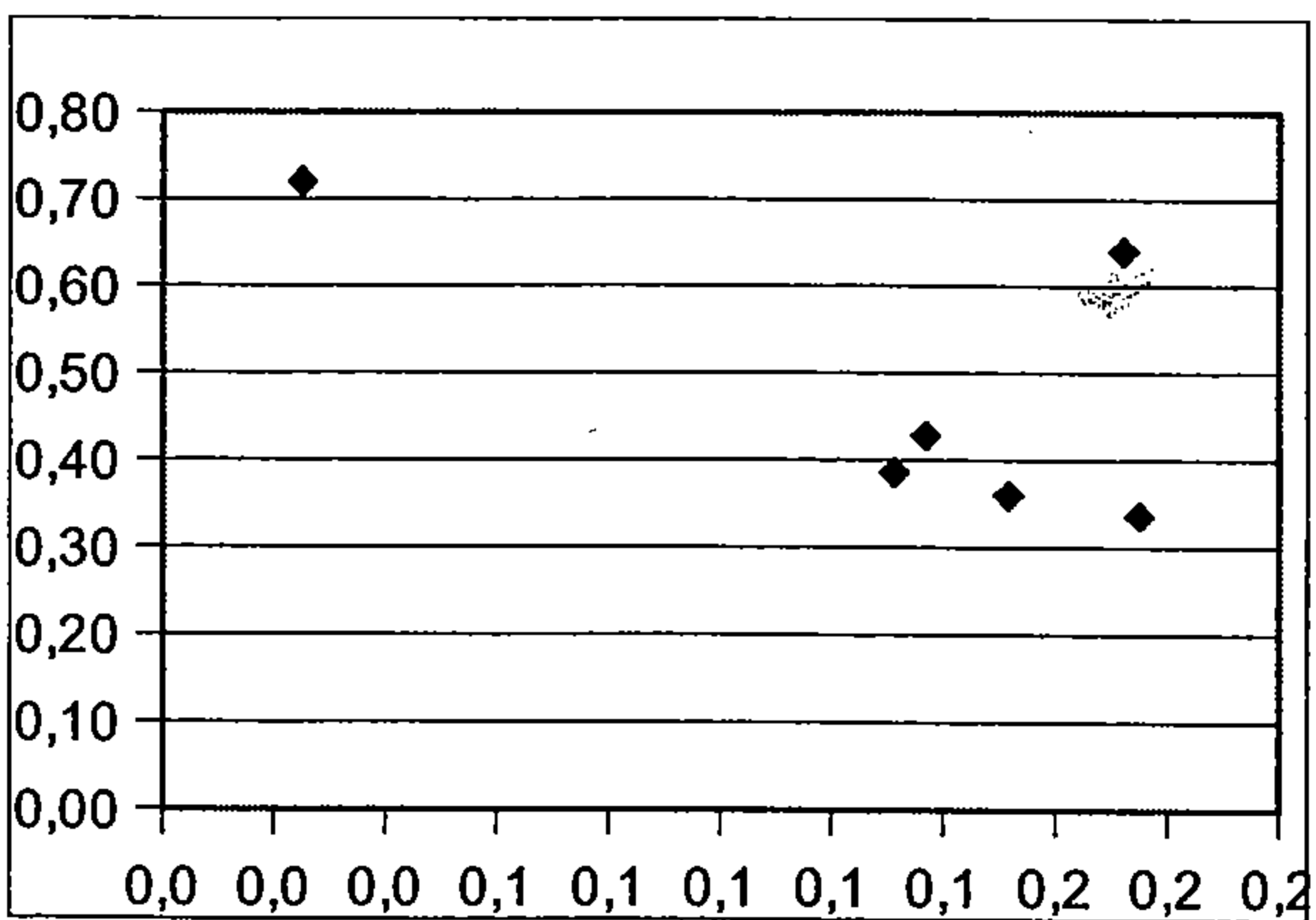
Graf 28: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,544$



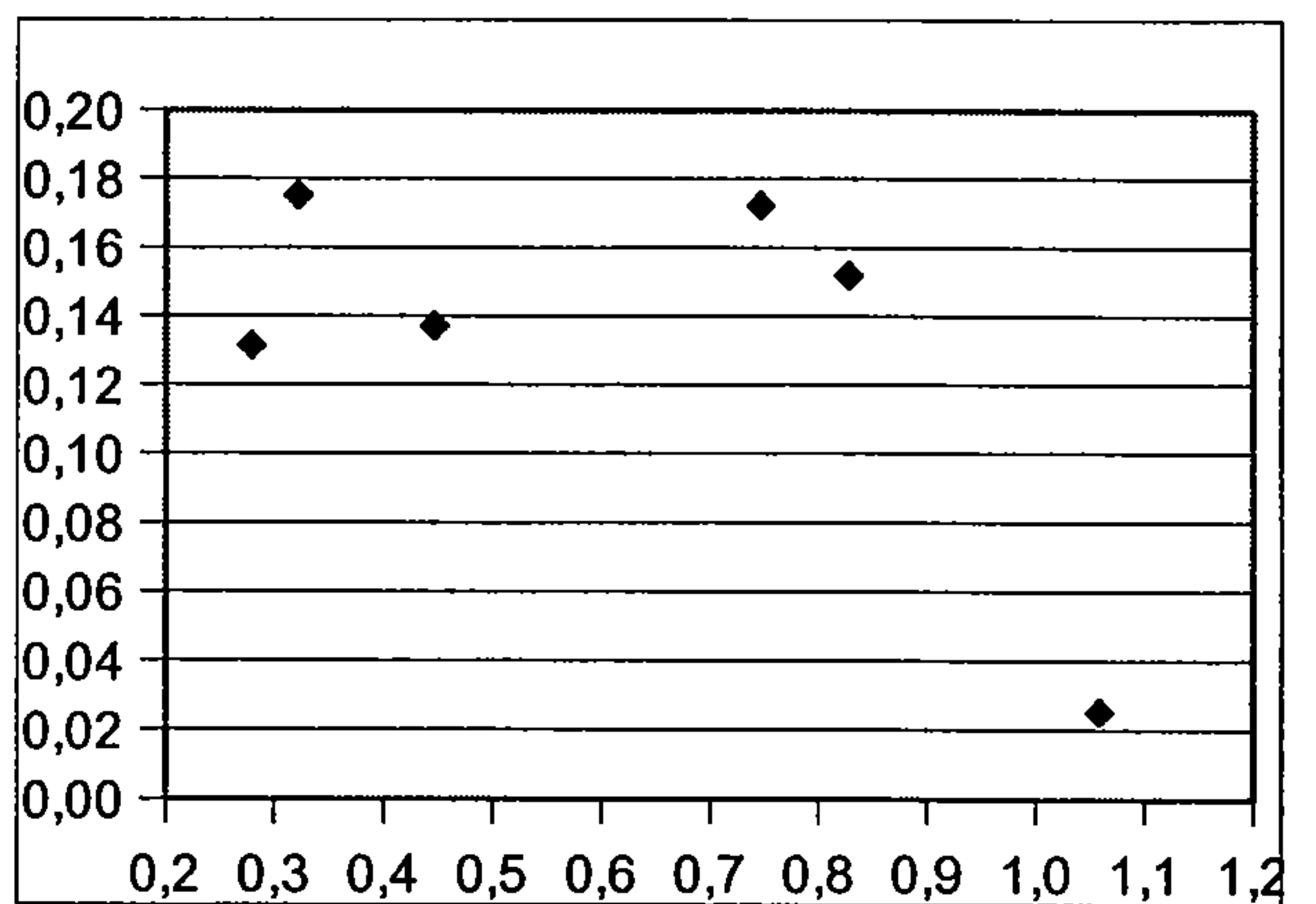
Graf 26: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,409$



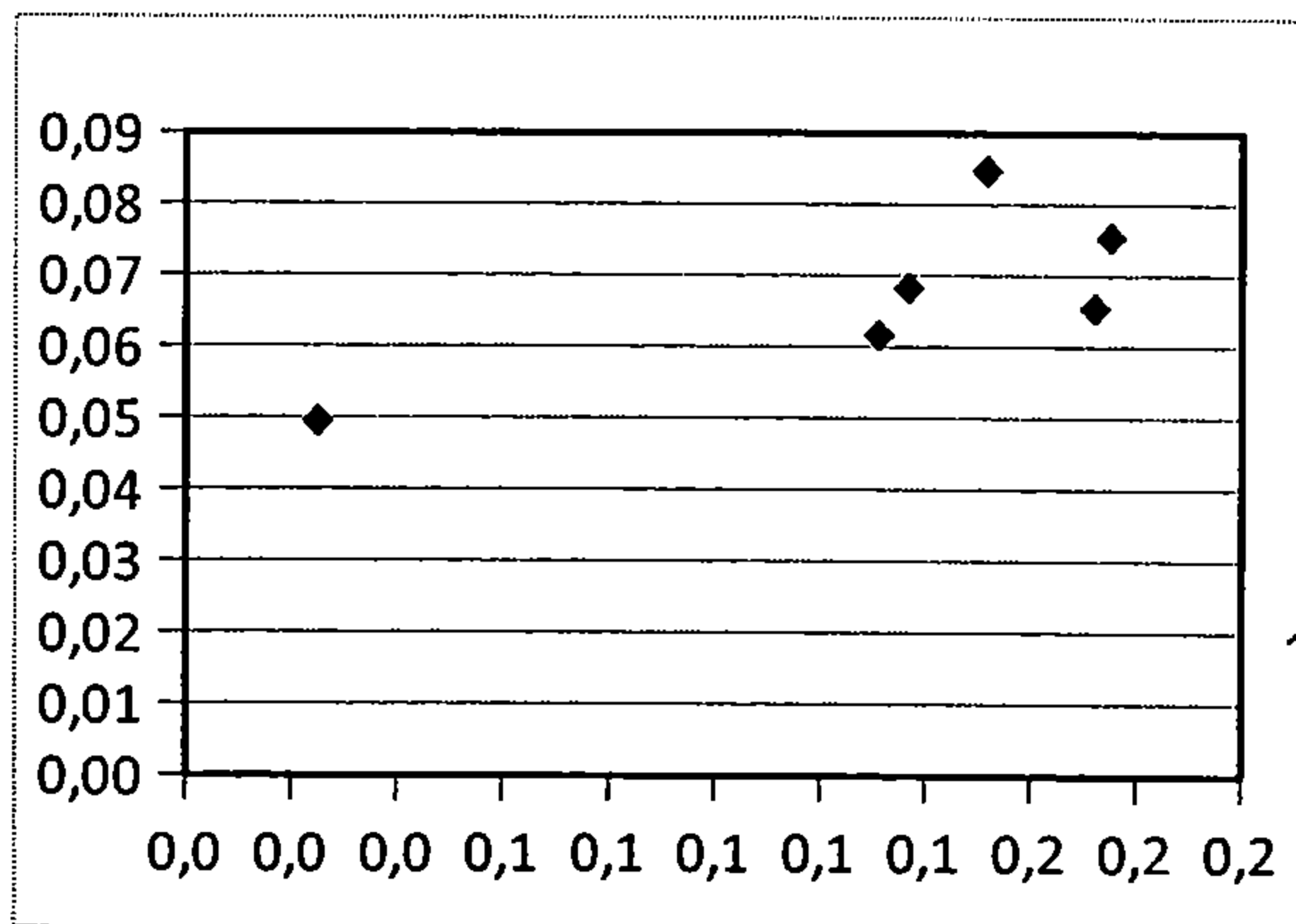
Graf 29: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R^2 = 0,495$



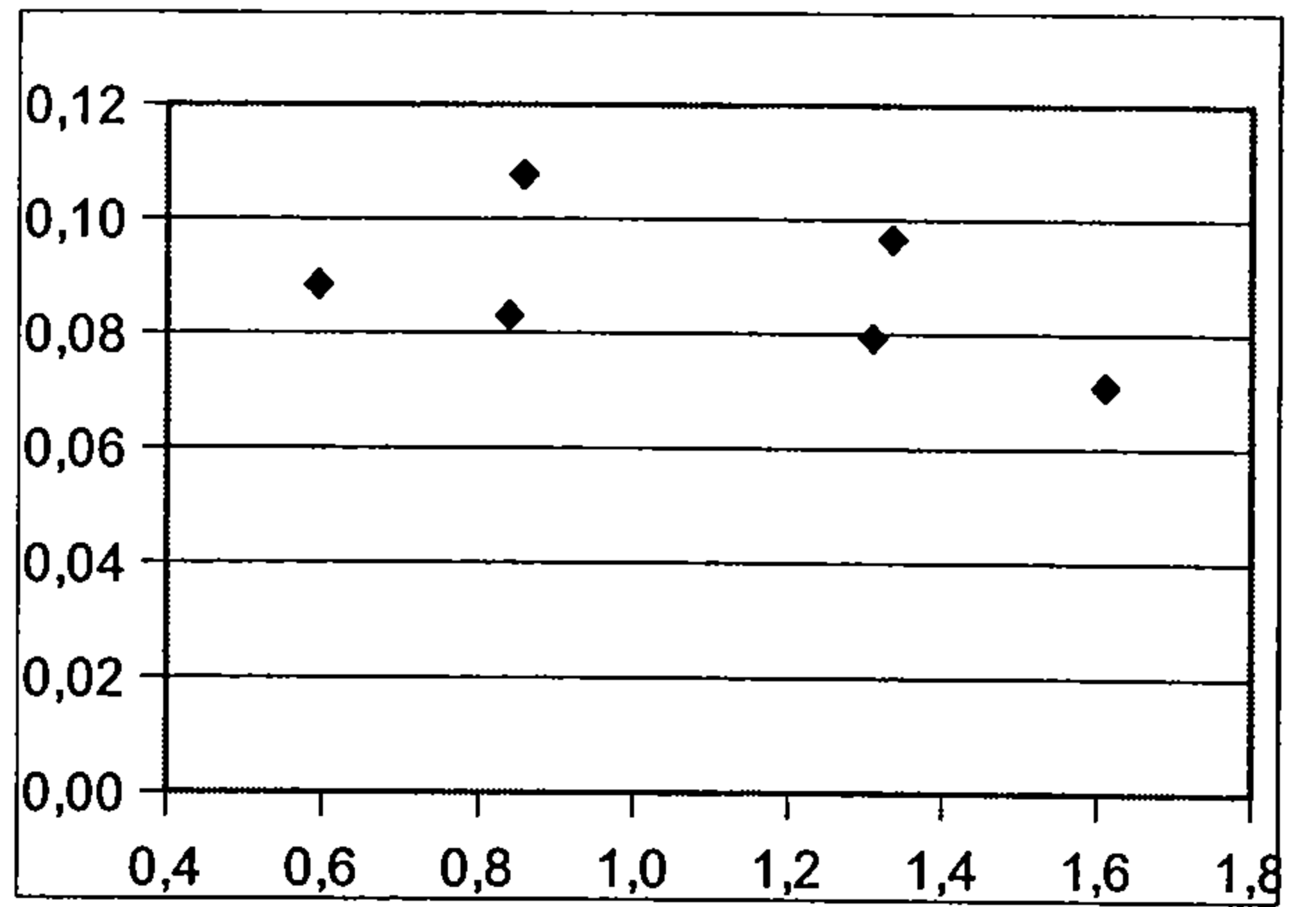
Graf 27: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,585$



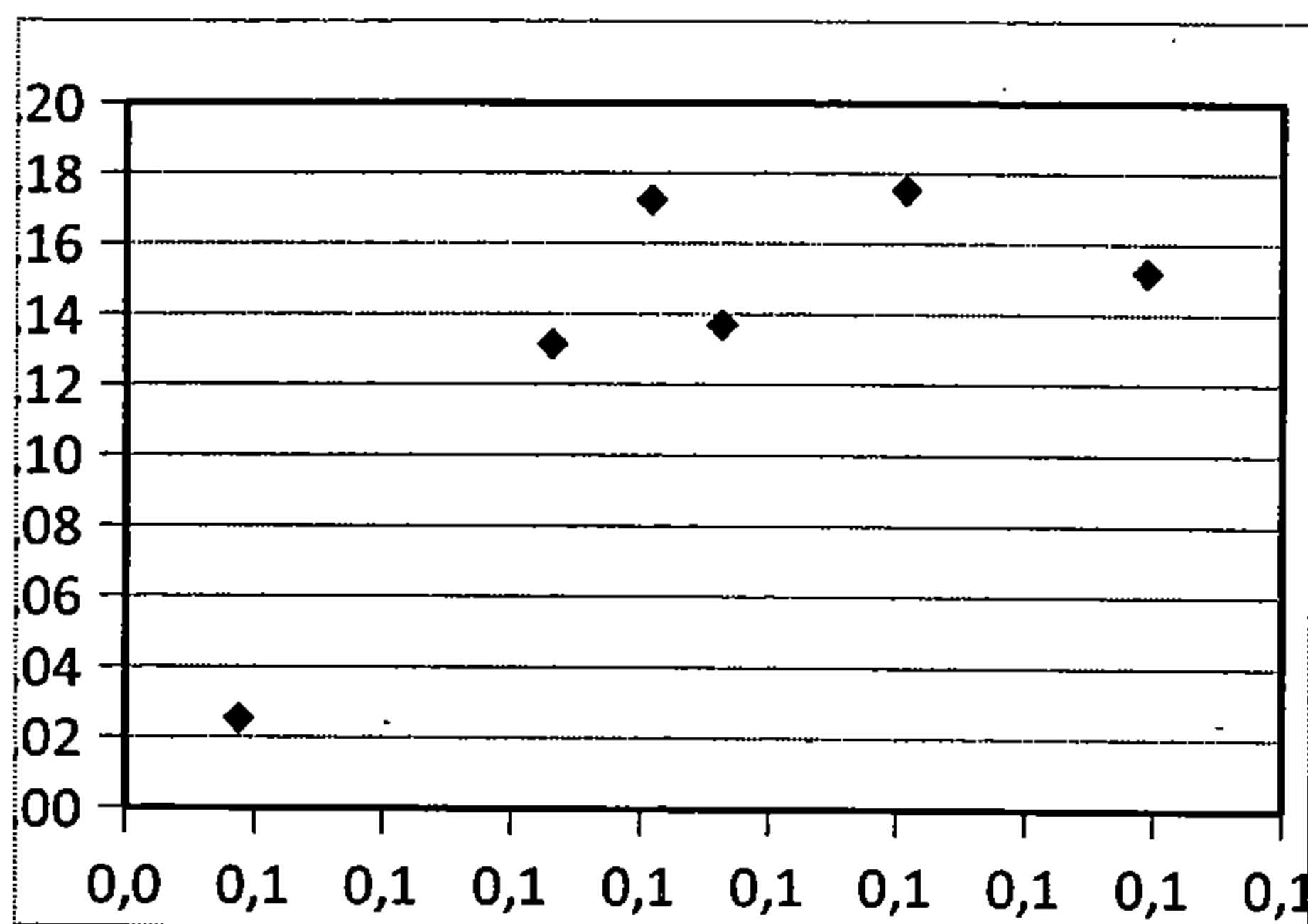
Graf 30: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,837$



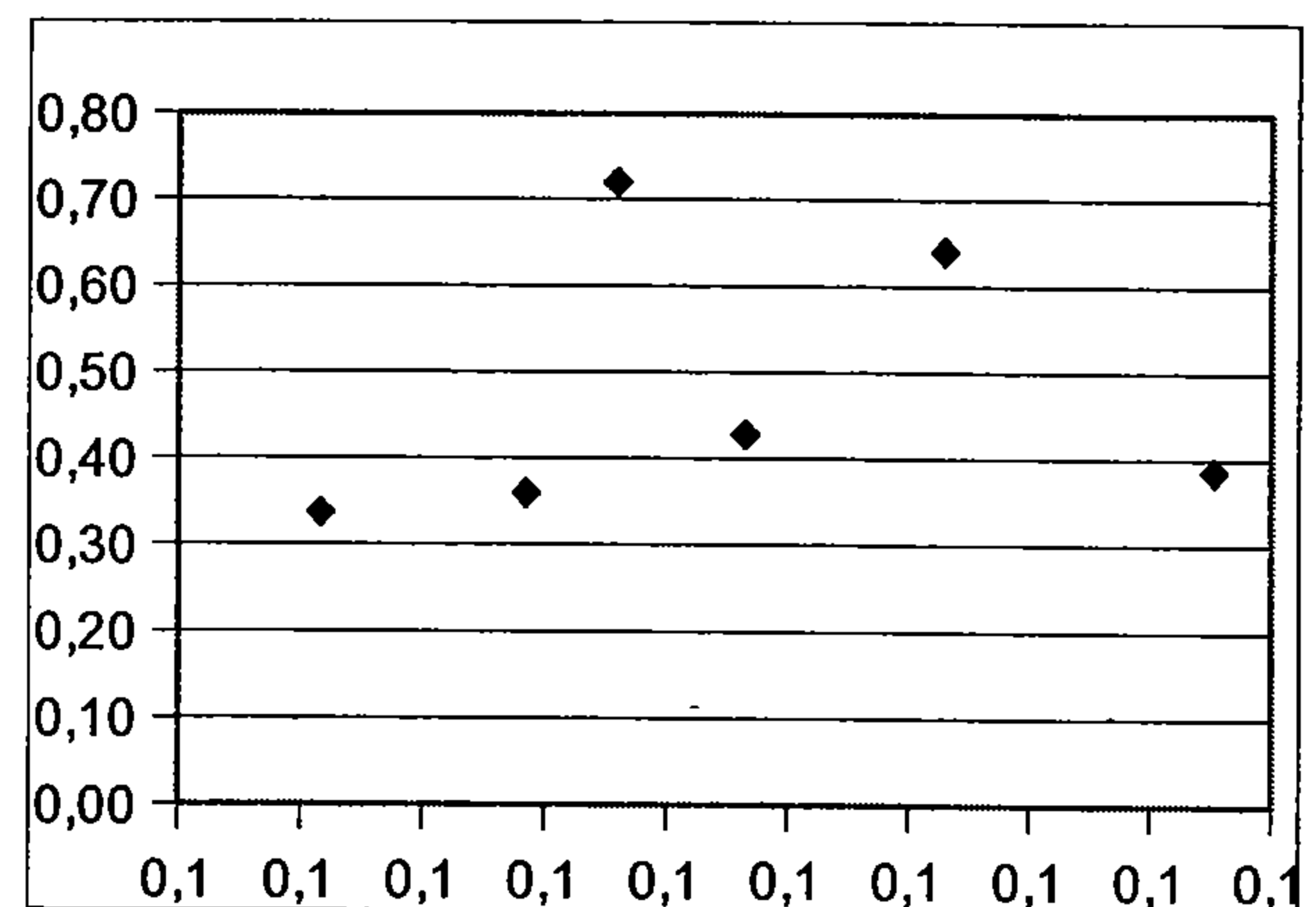
Graf 31: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,585$



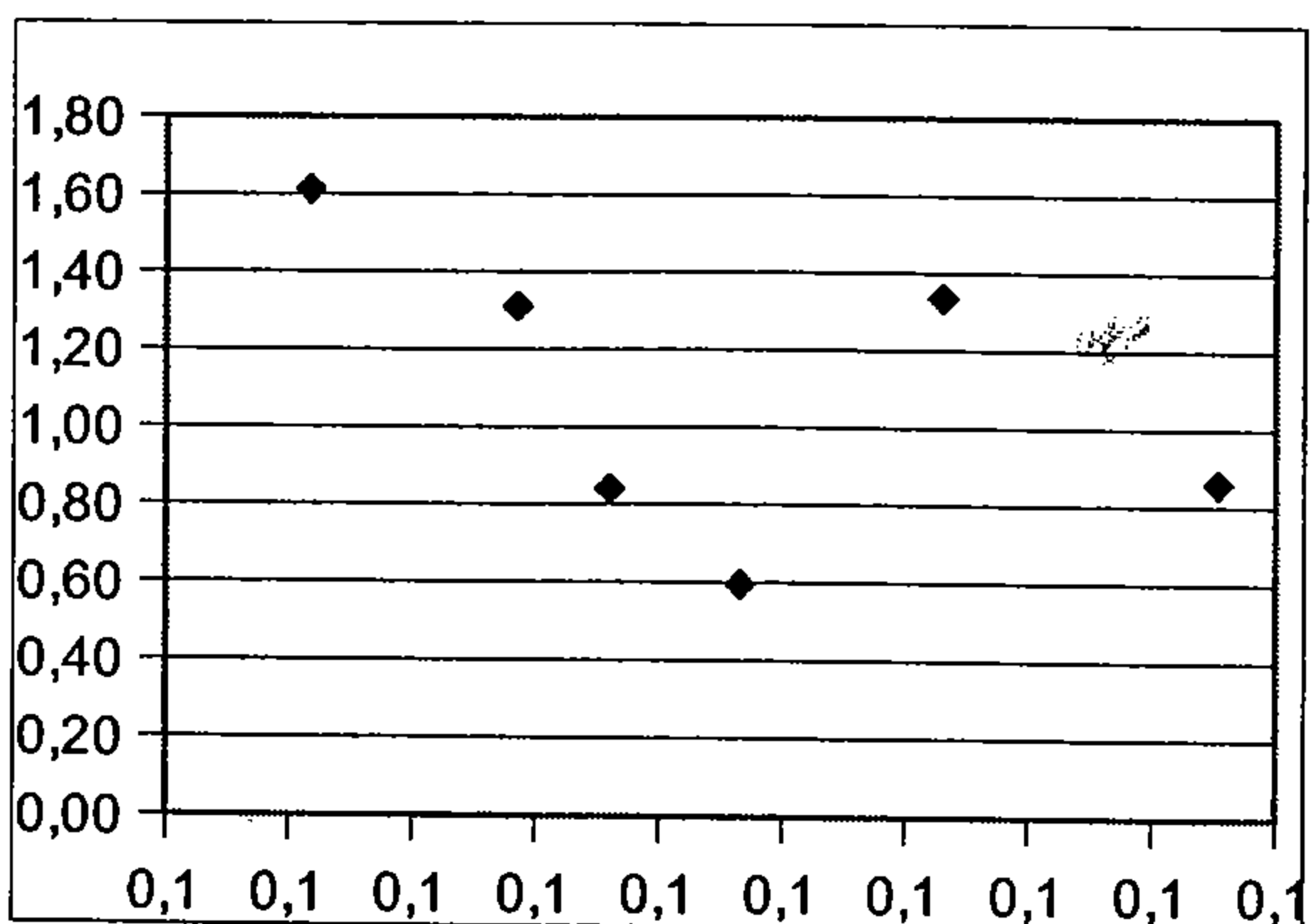
Graf 34: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,453$



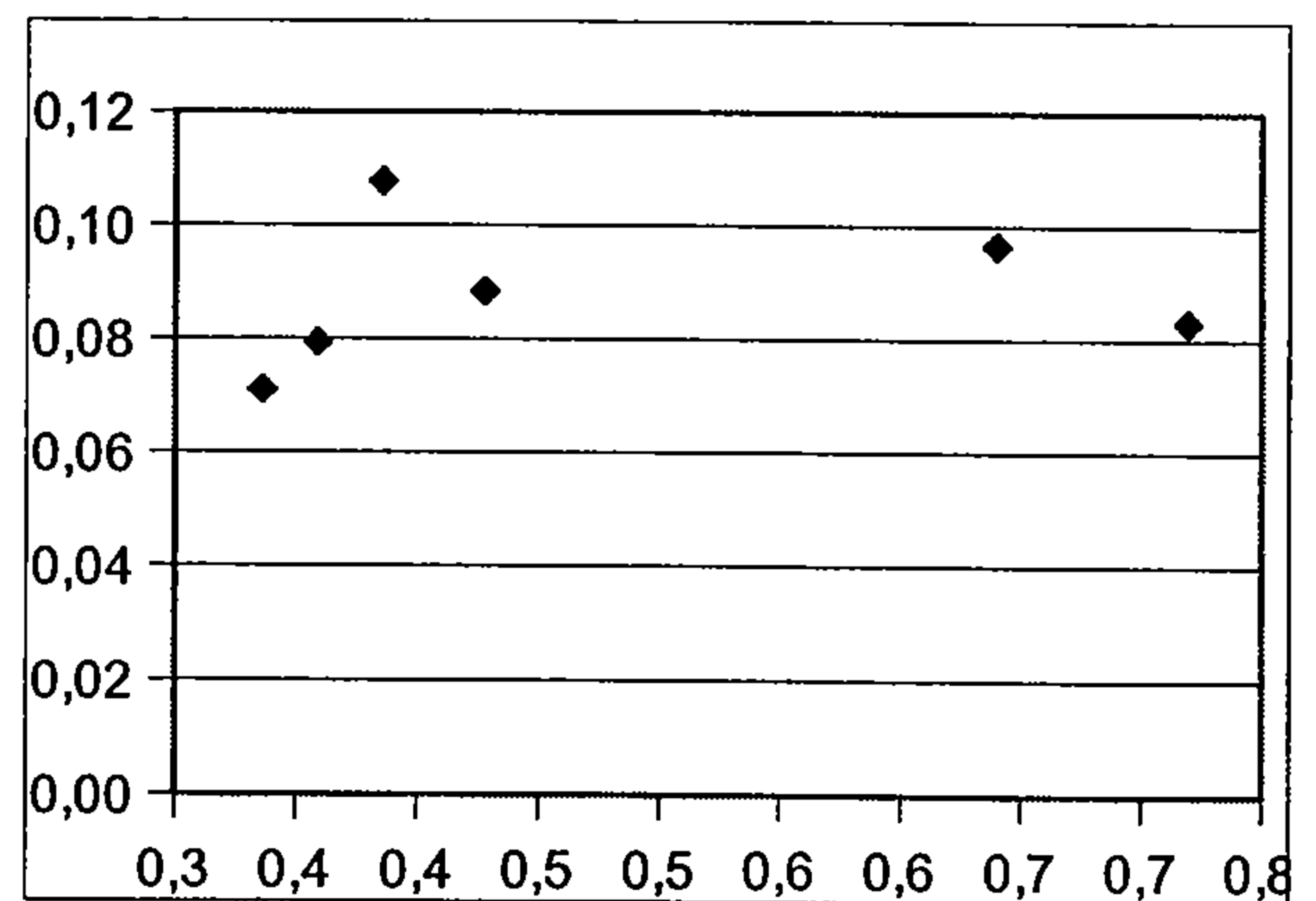
Graf 32: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,931$



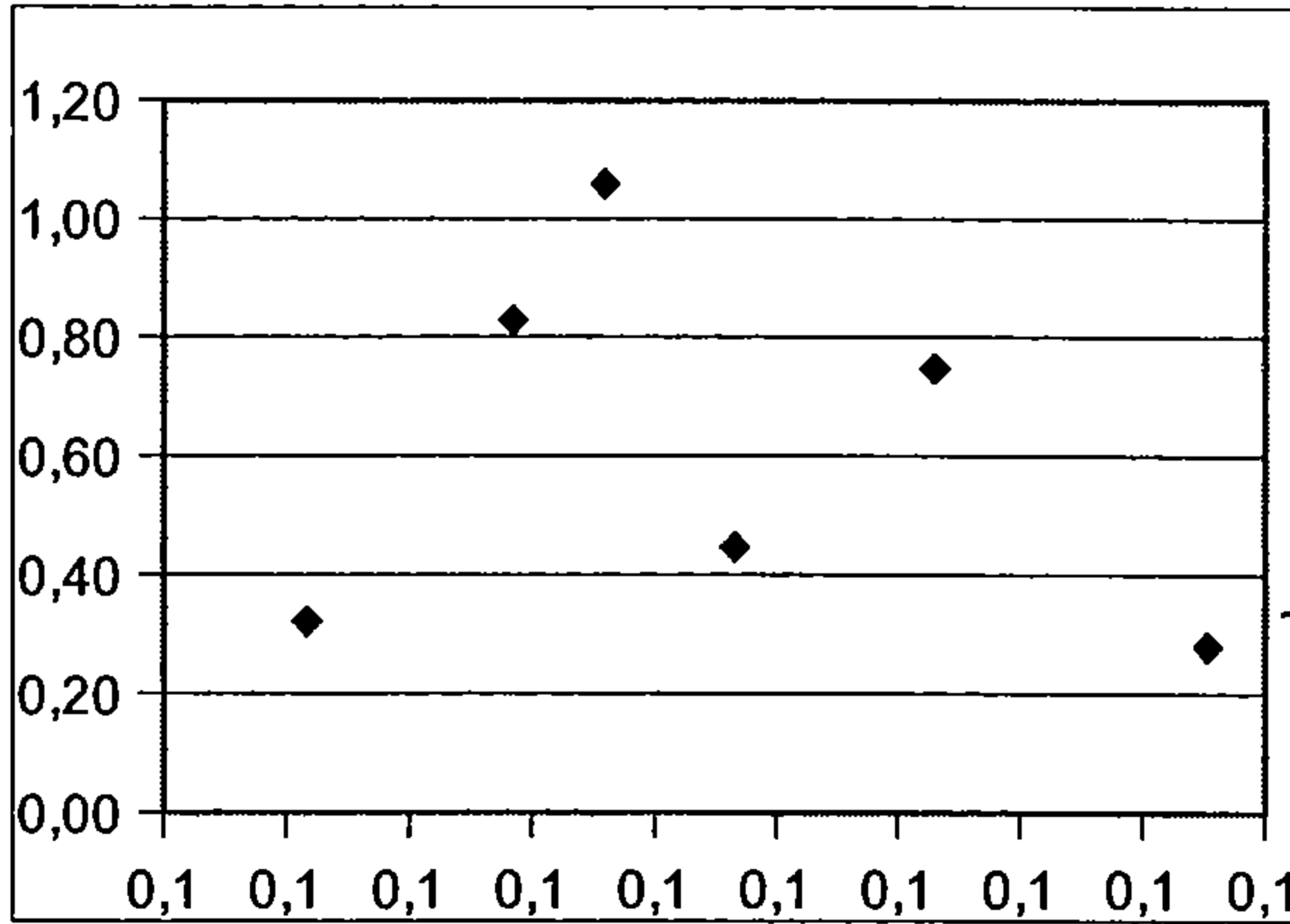
Graf 35: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,393$



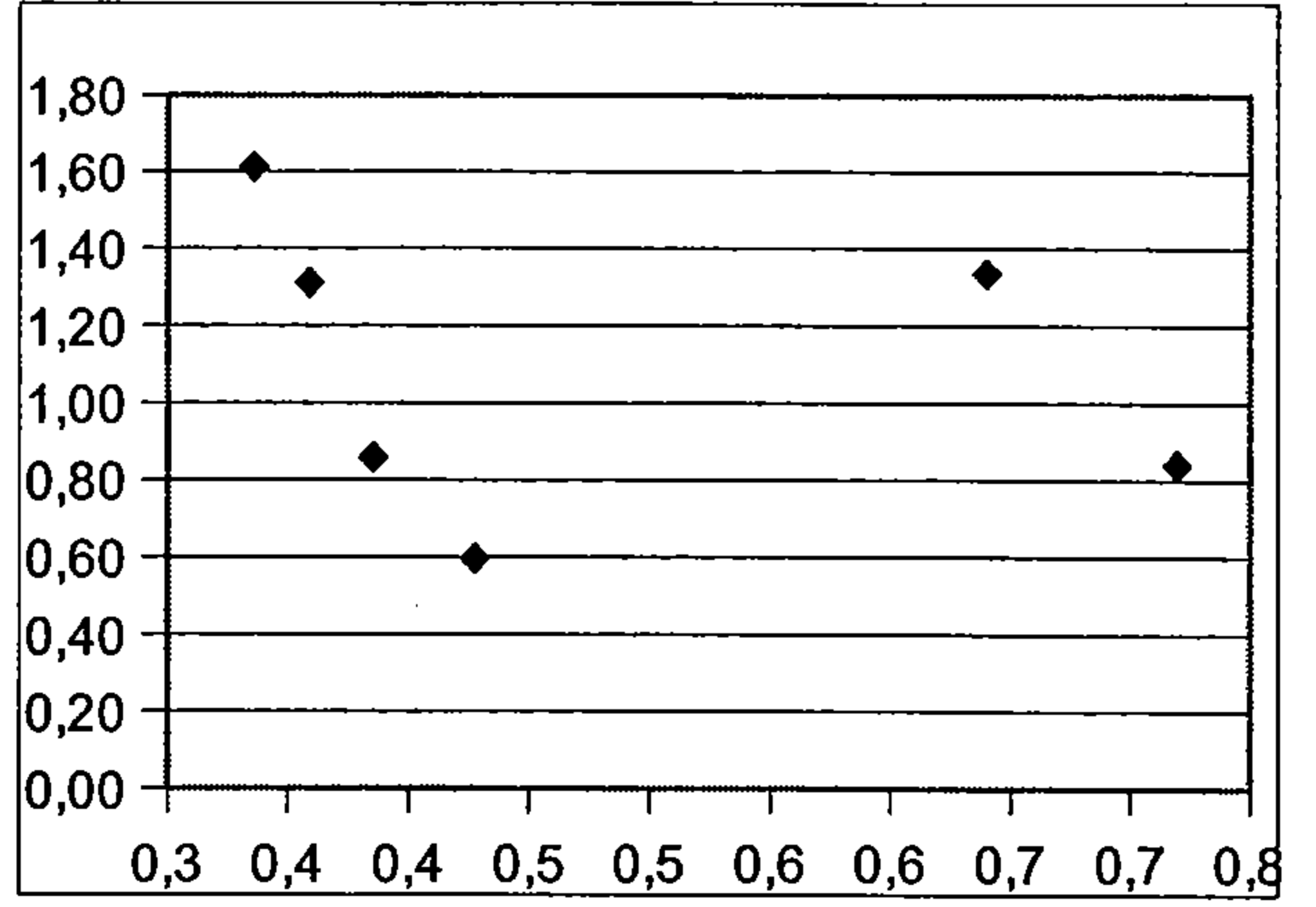
Graf 33: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,428$



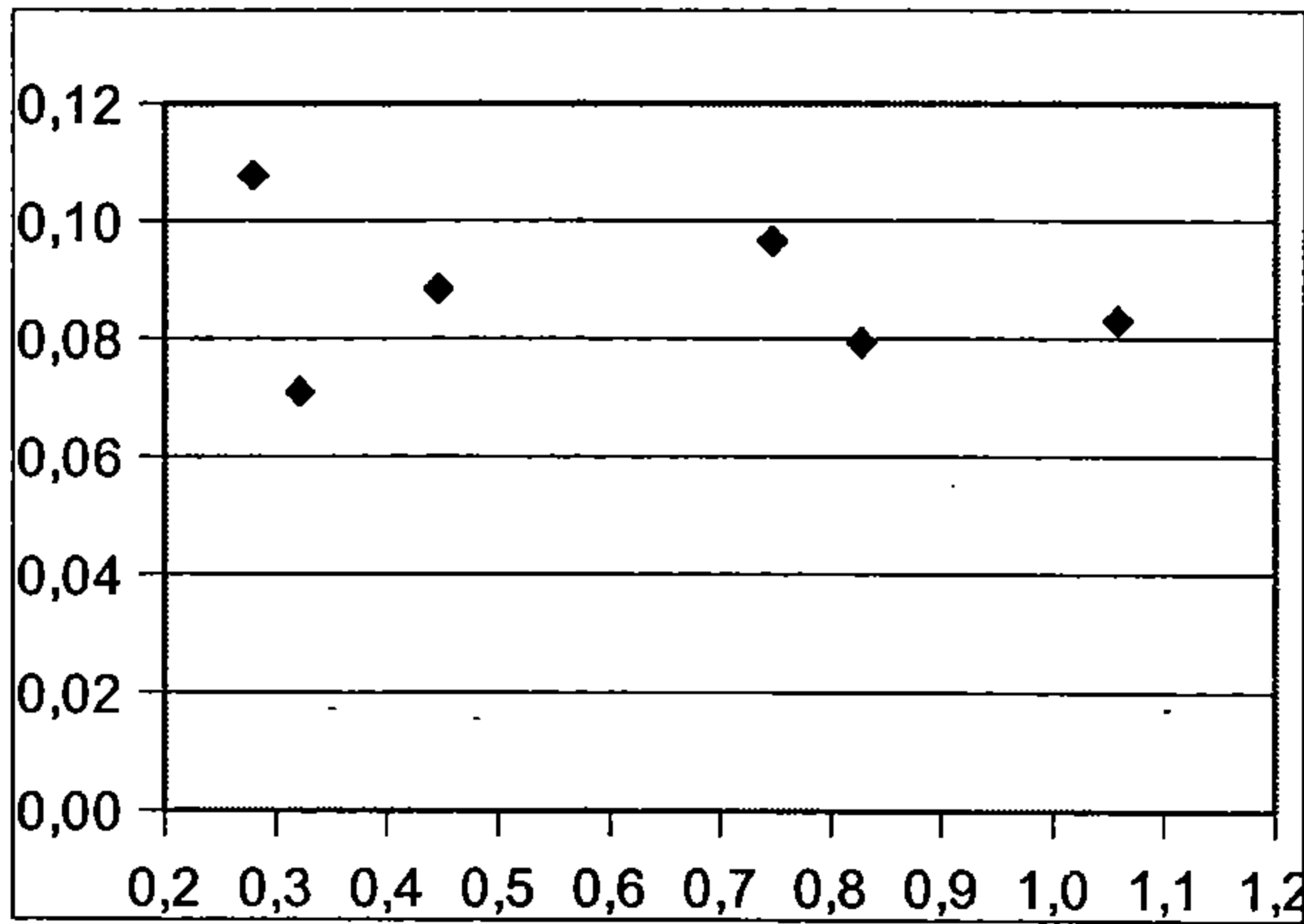
Graf 36: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,449$



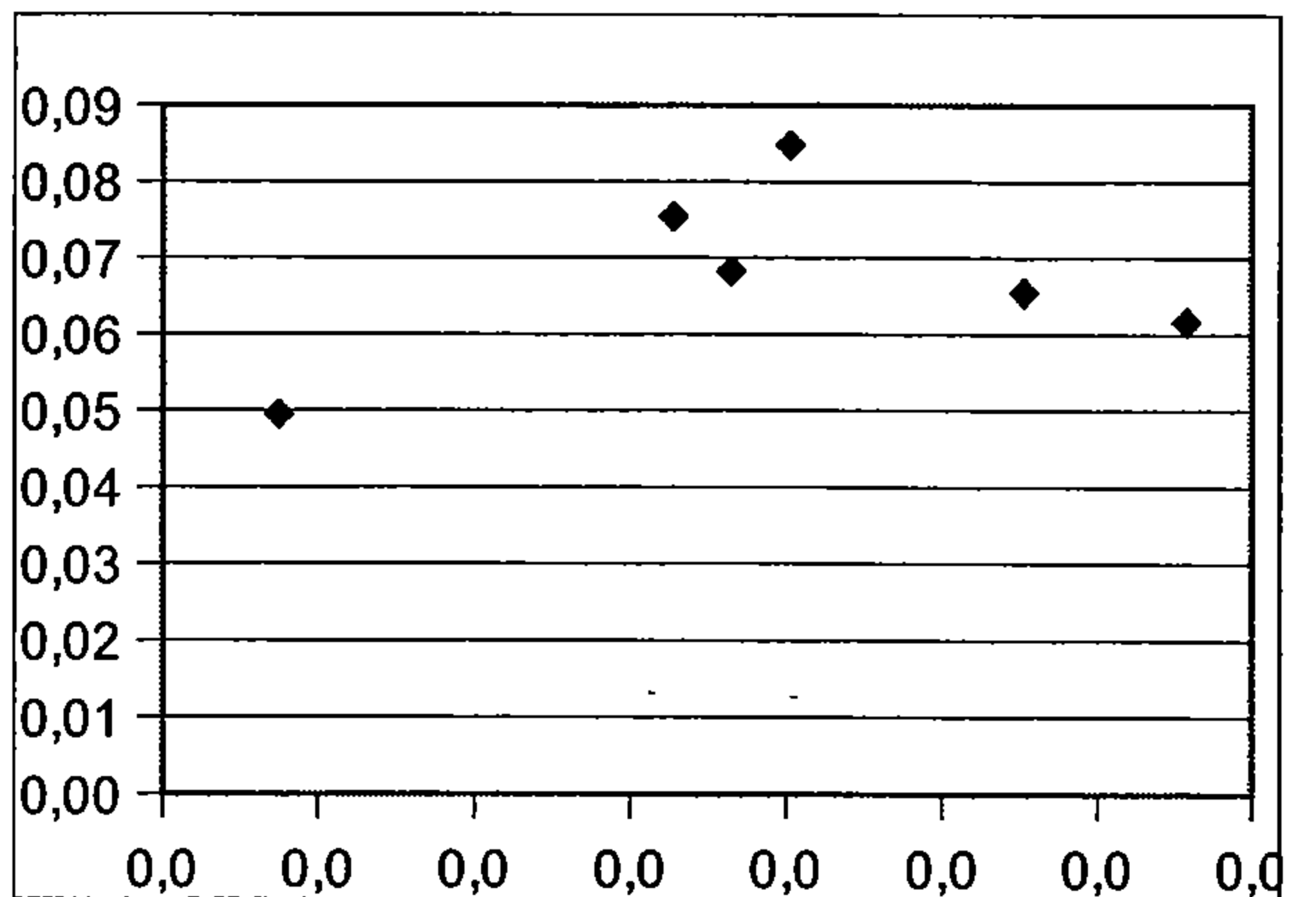
Graf 37: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,516$



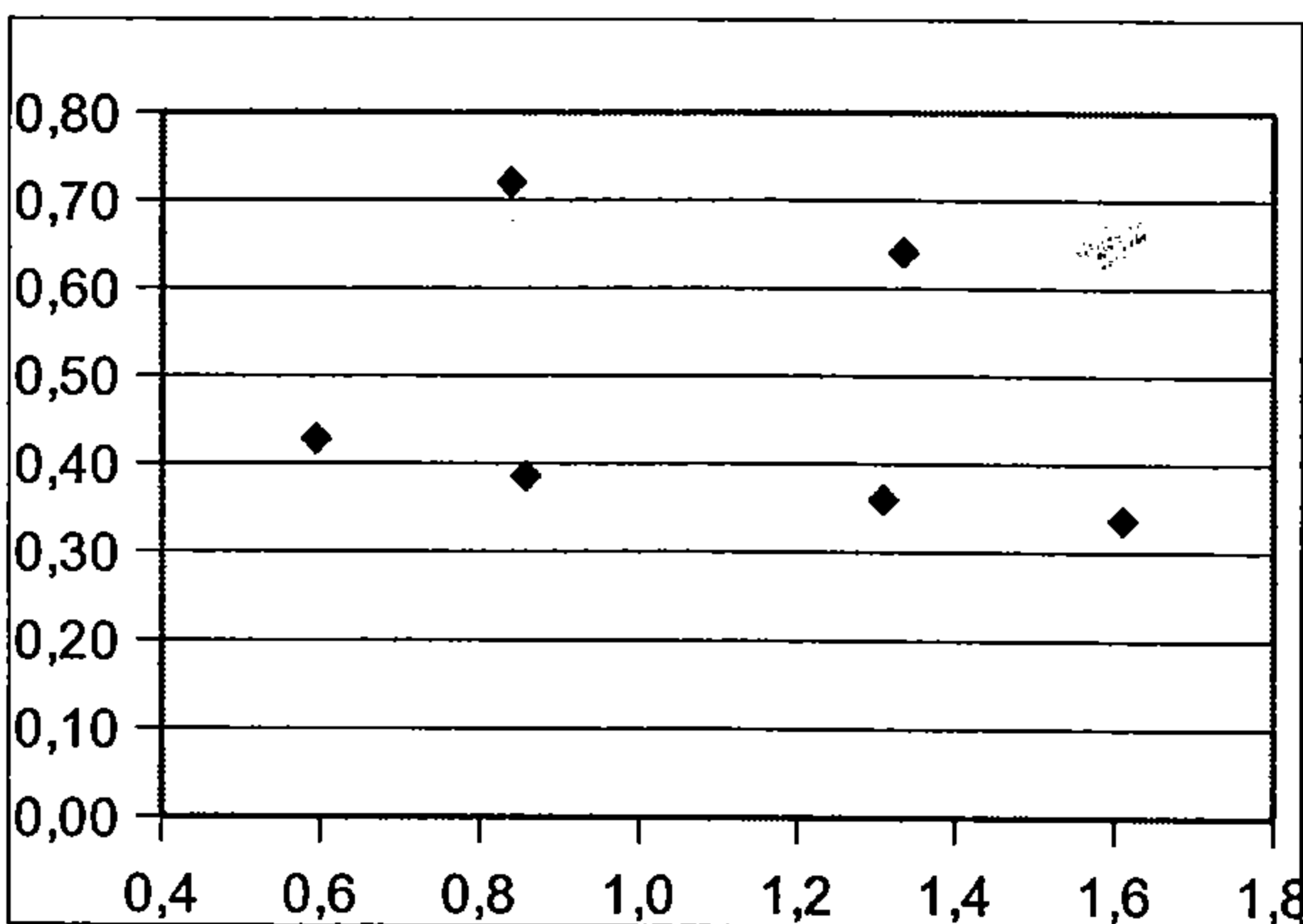
Graf 40: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,231$



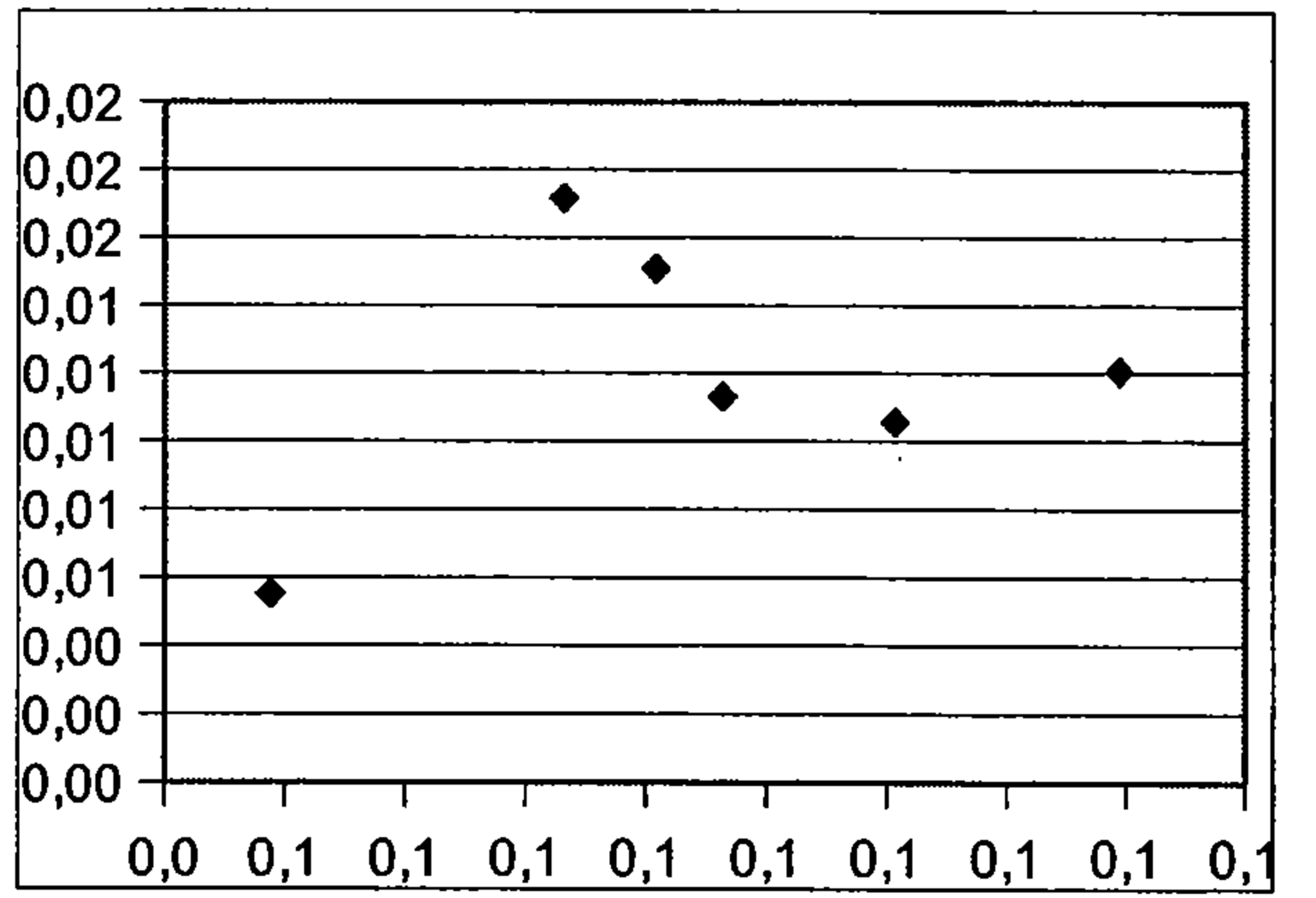
Graf 38: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,05$



Graf 41: vliv obsah mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,779$

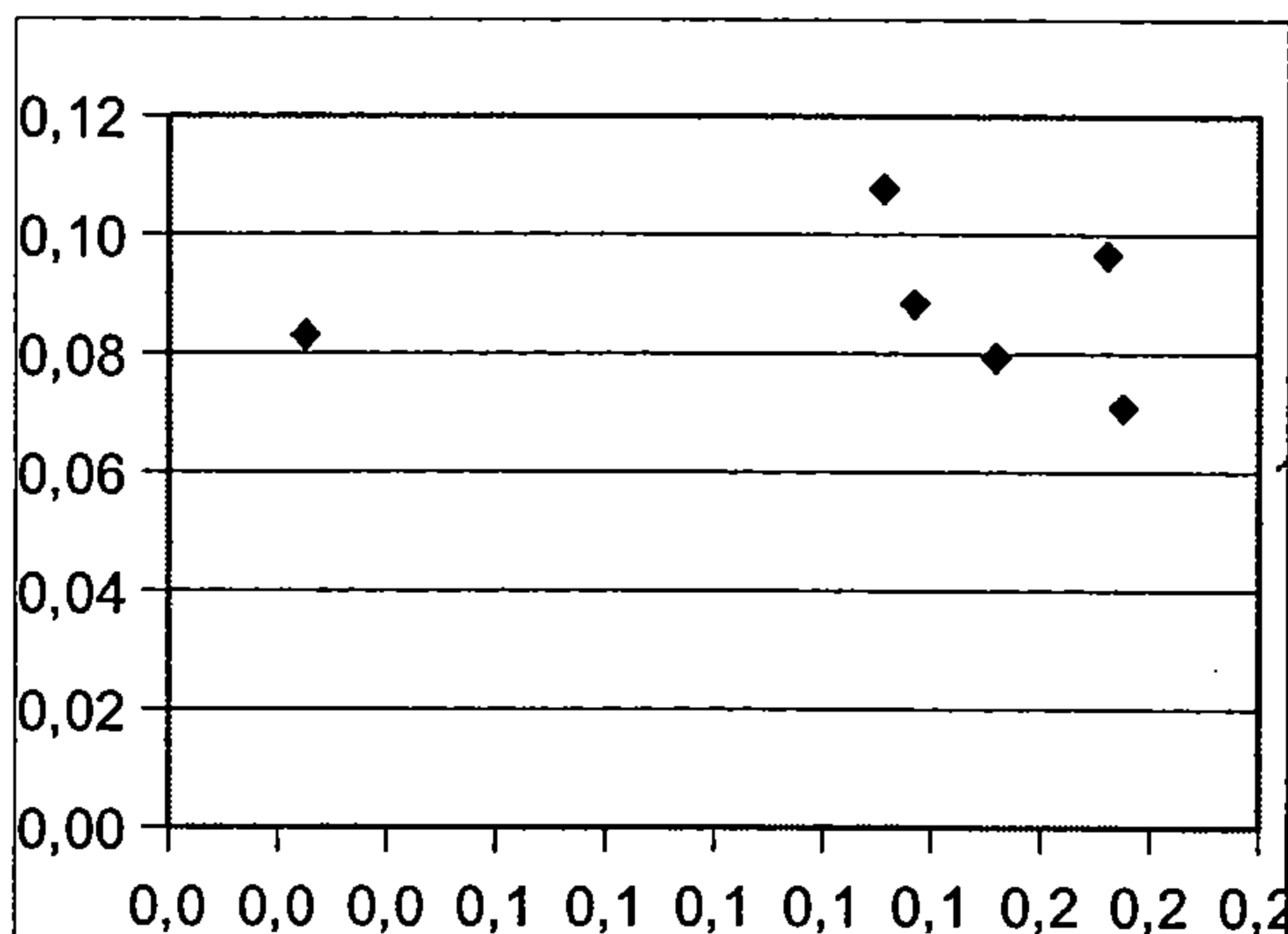


Graf 39: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,231$

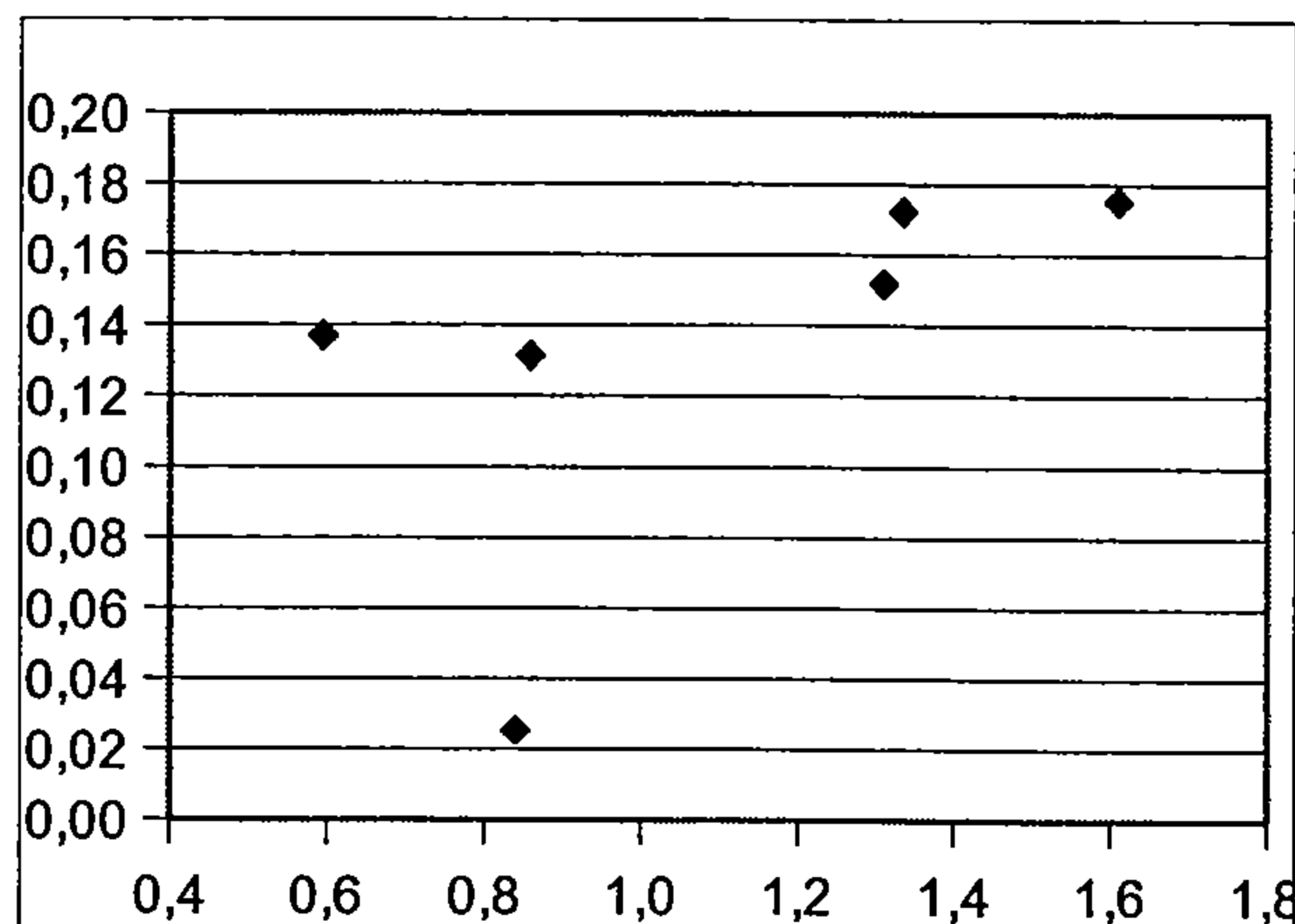


Graf 42: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,486$

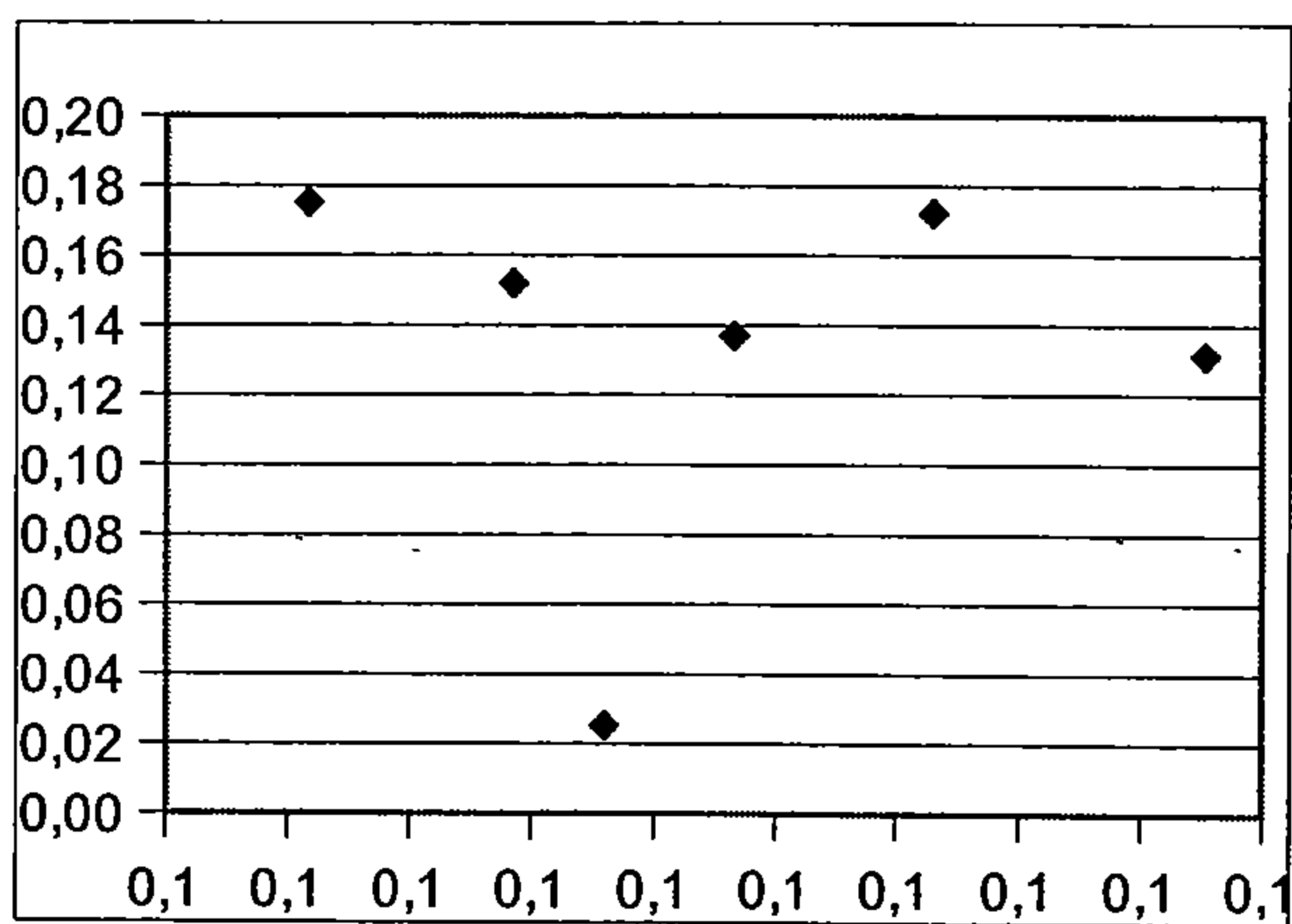
Korelace mezi prvky – frakce III



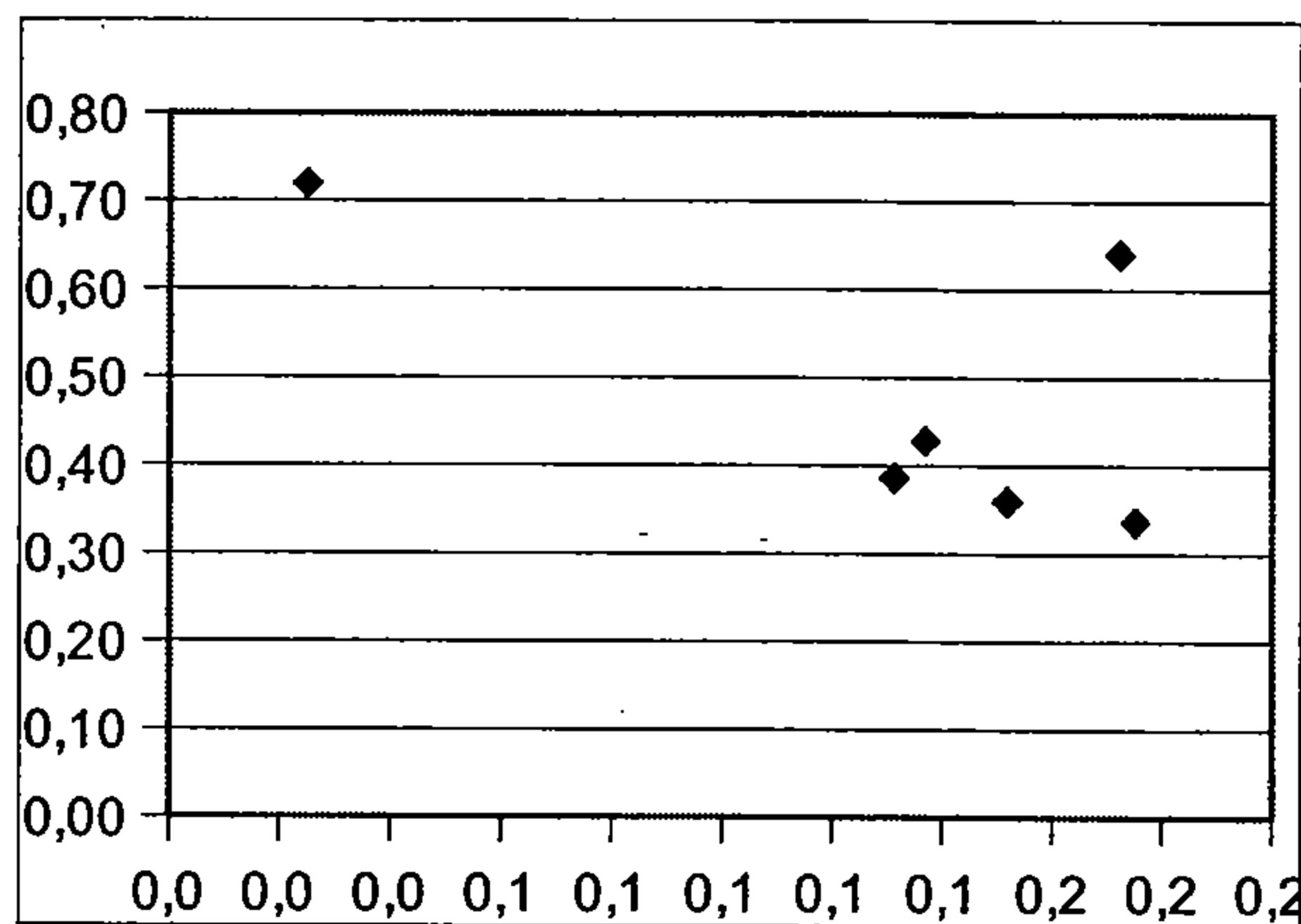
Graf 43: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,293$



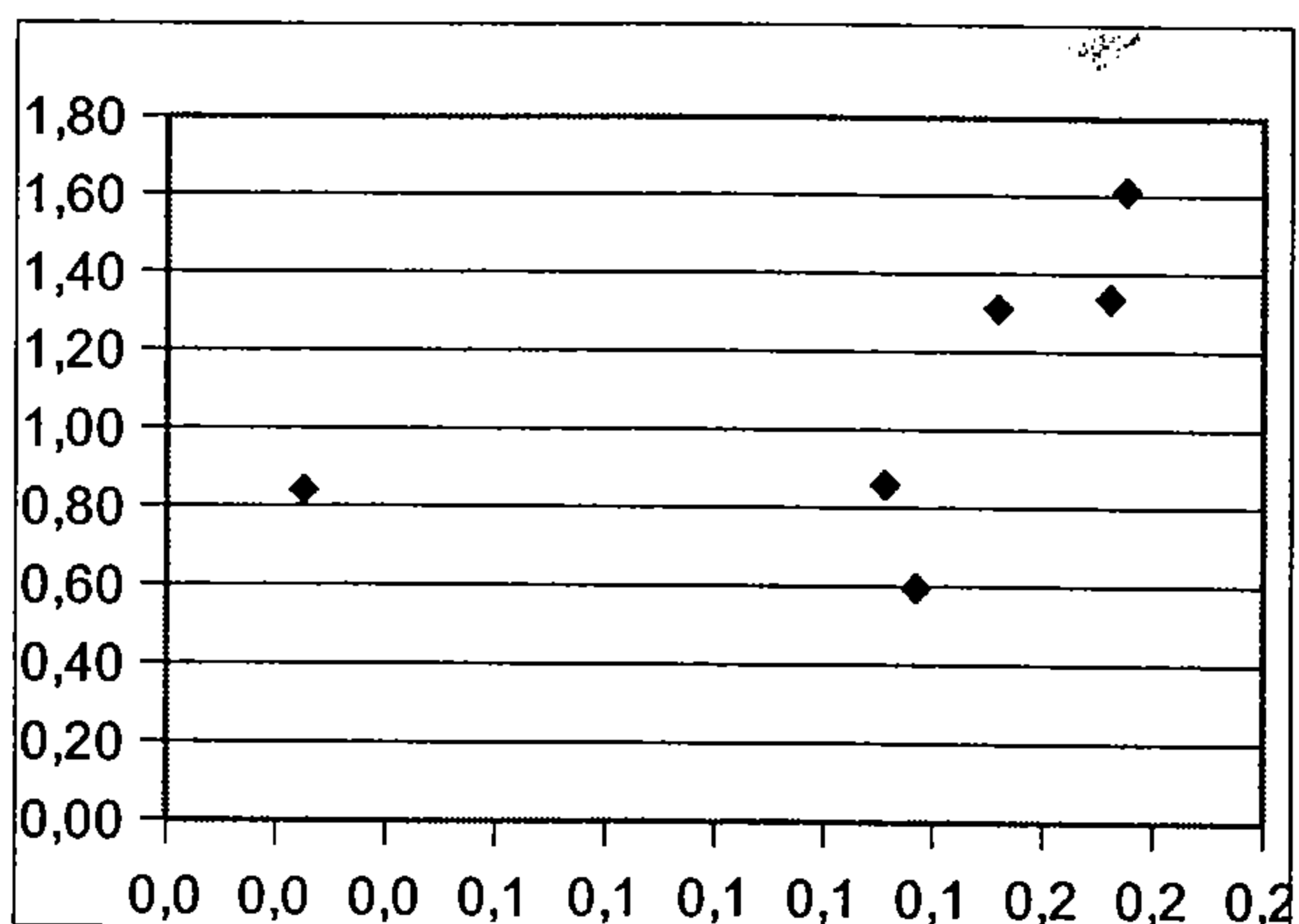
Graf 46: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,409$



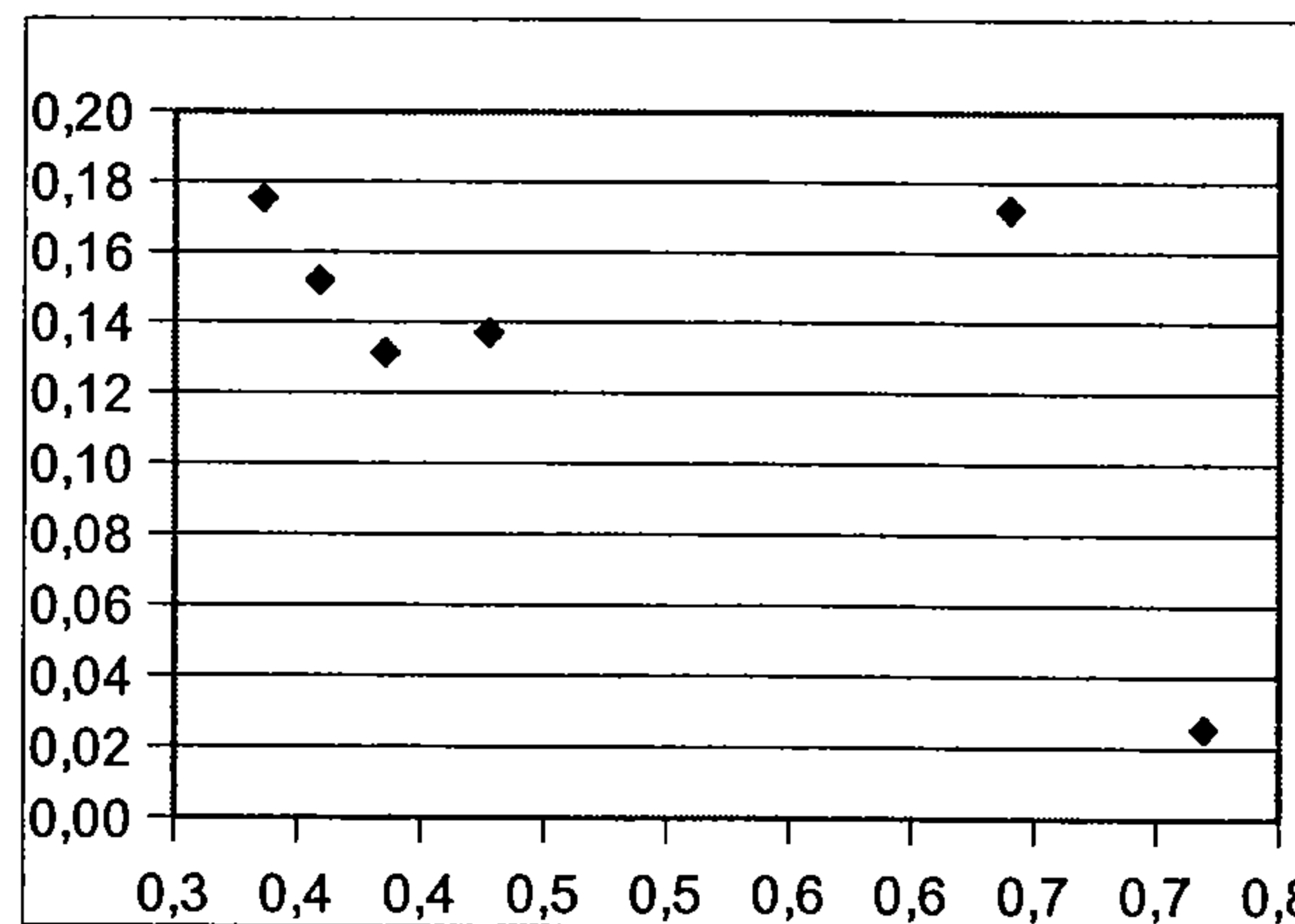
Graf 44: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,112$



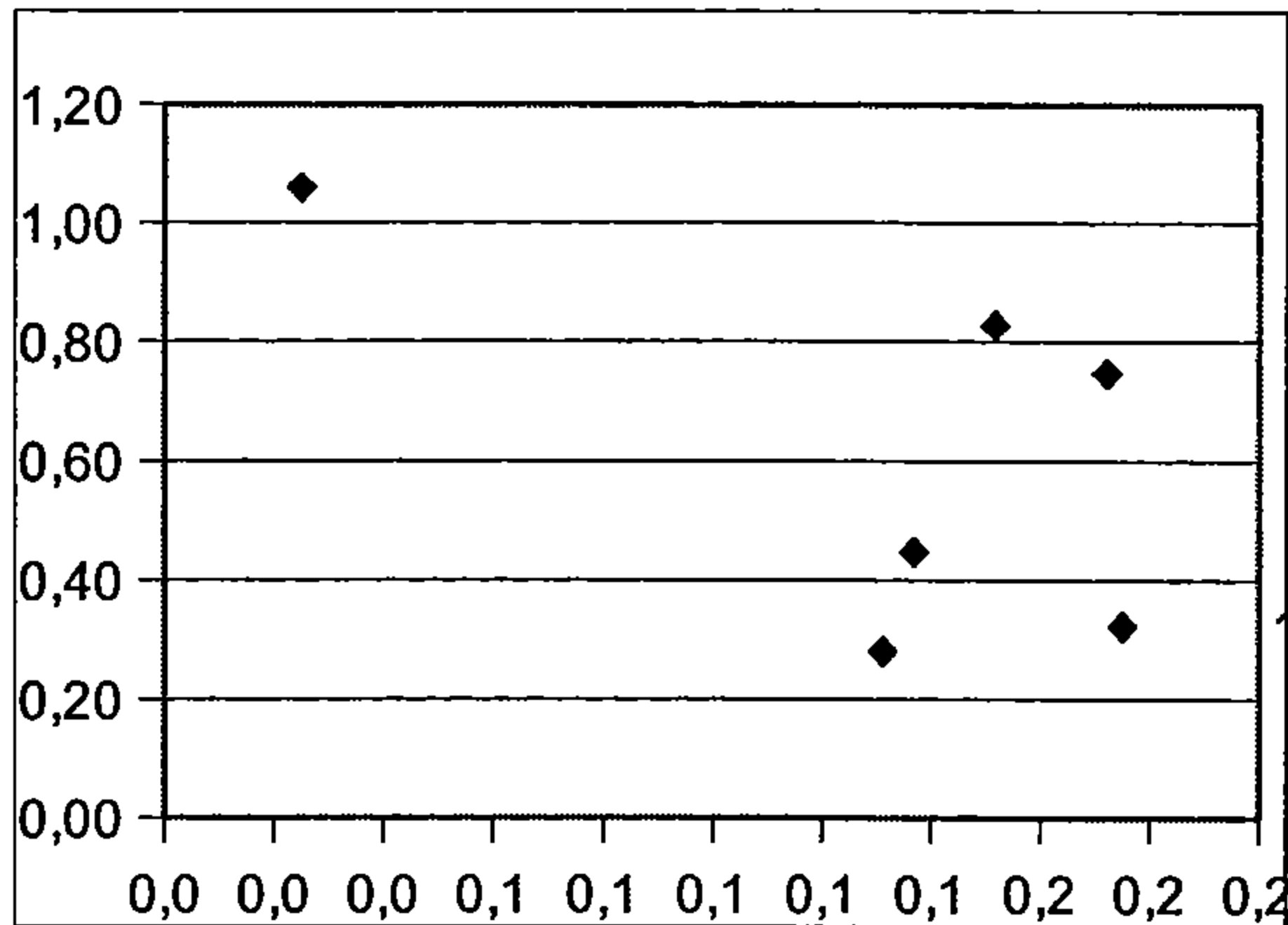
Graf 47: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,585$



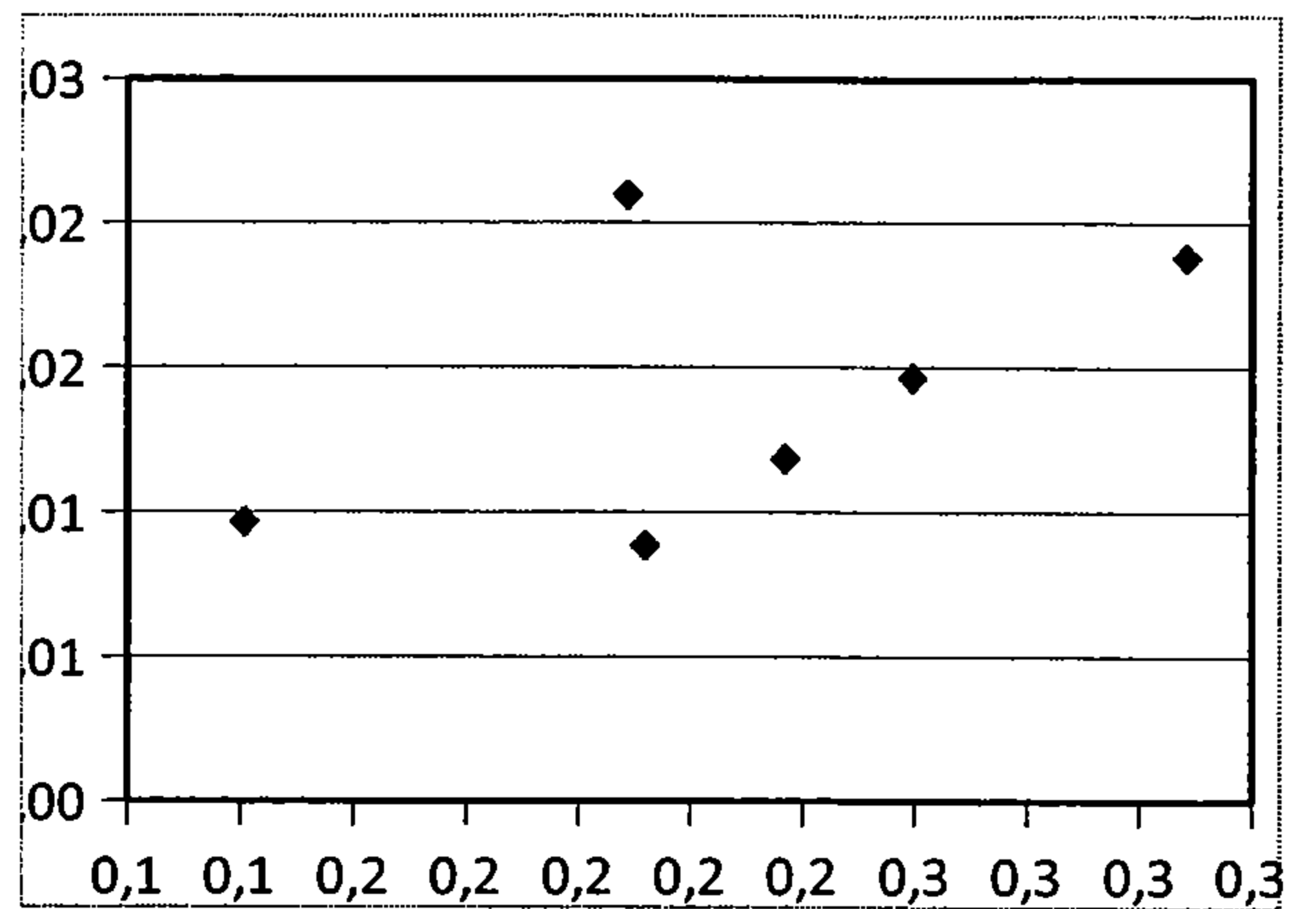
Graf 45: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,796$



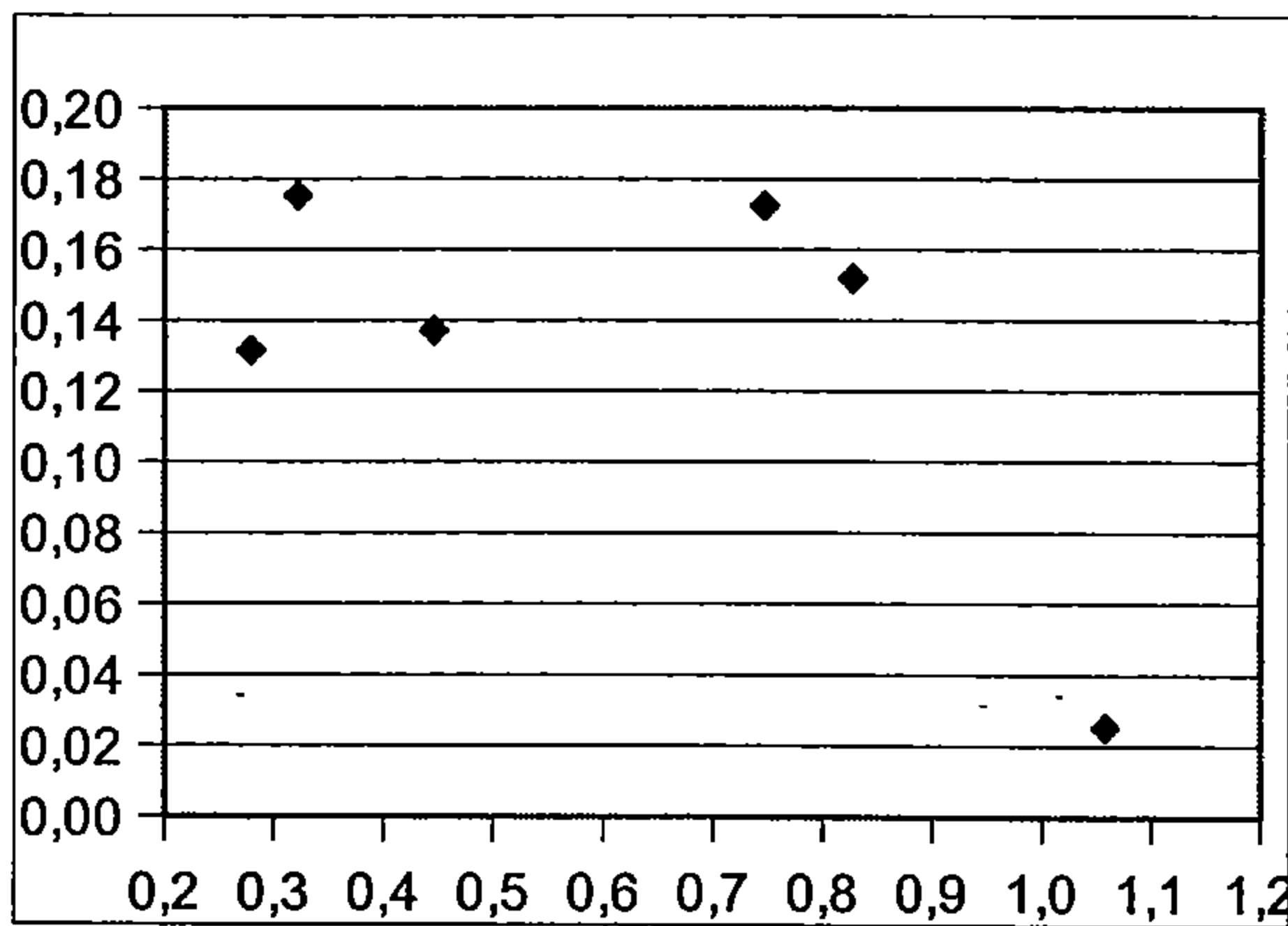
Graf 48: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,544$



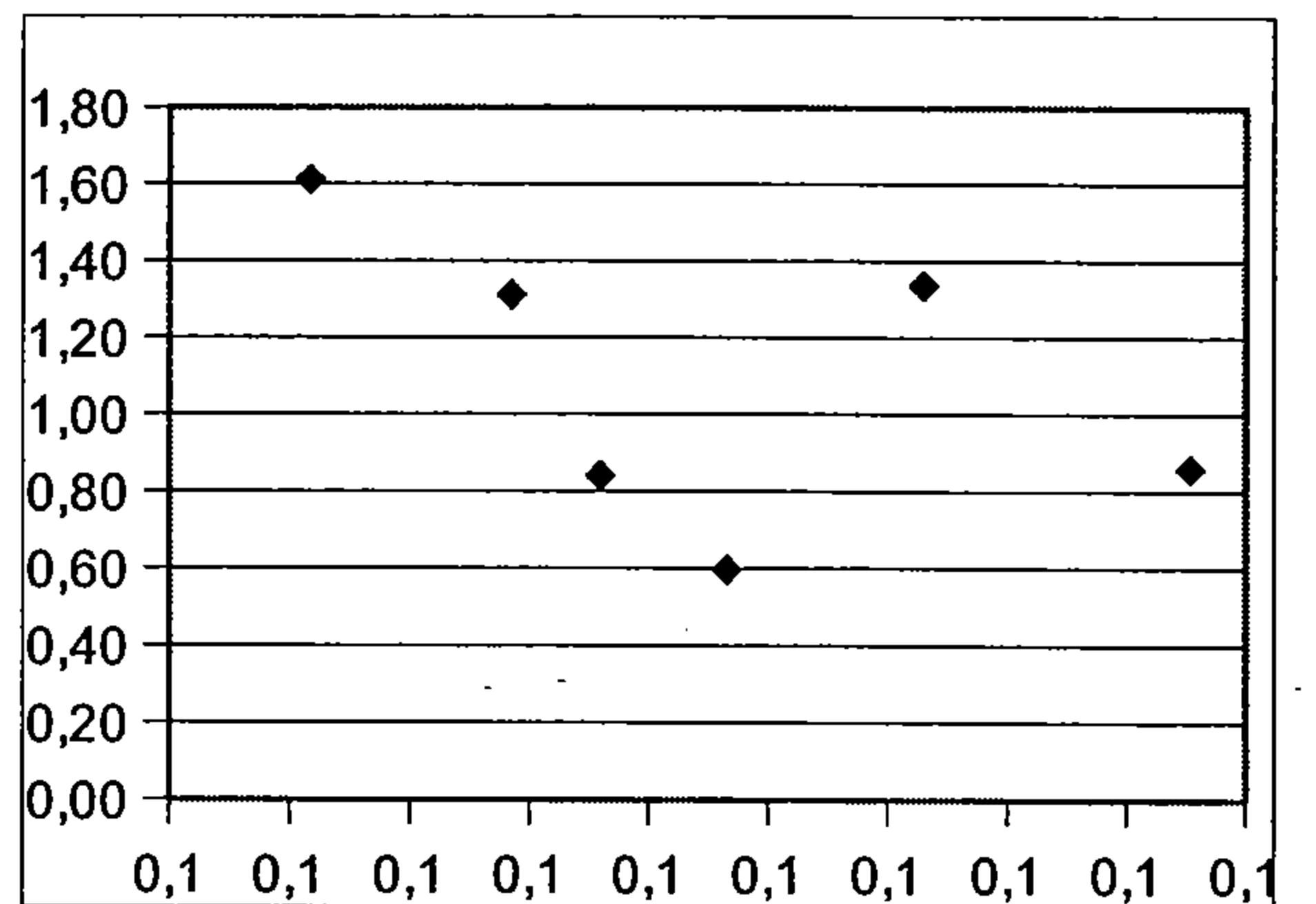
Graf 49: vliv obsahu arsenu na obsah železa,
 $R^2 = 0,495$



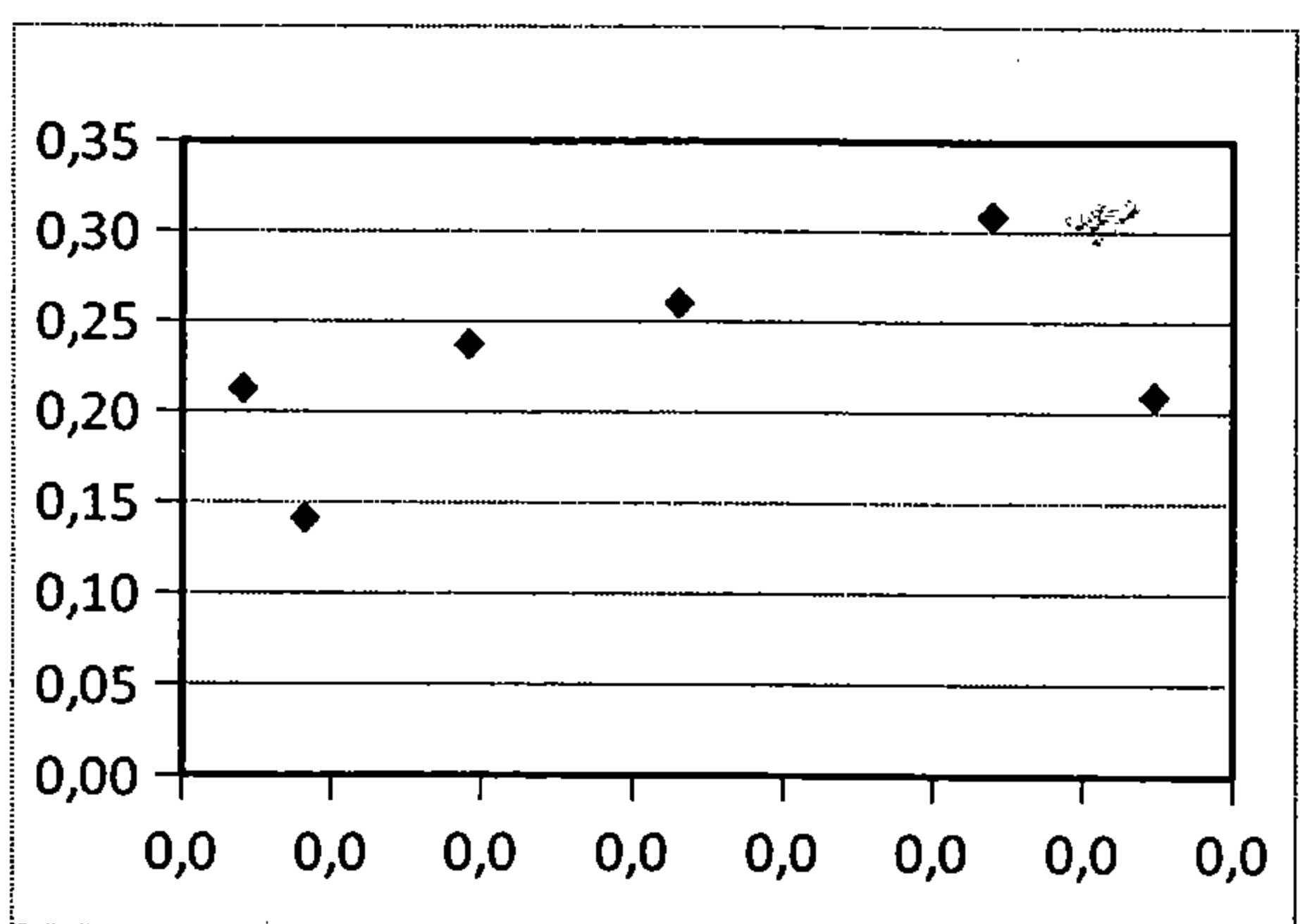
Graf 52: vliv obsahu zinku na obsah arsenu,
 $R^2 = 0,266$



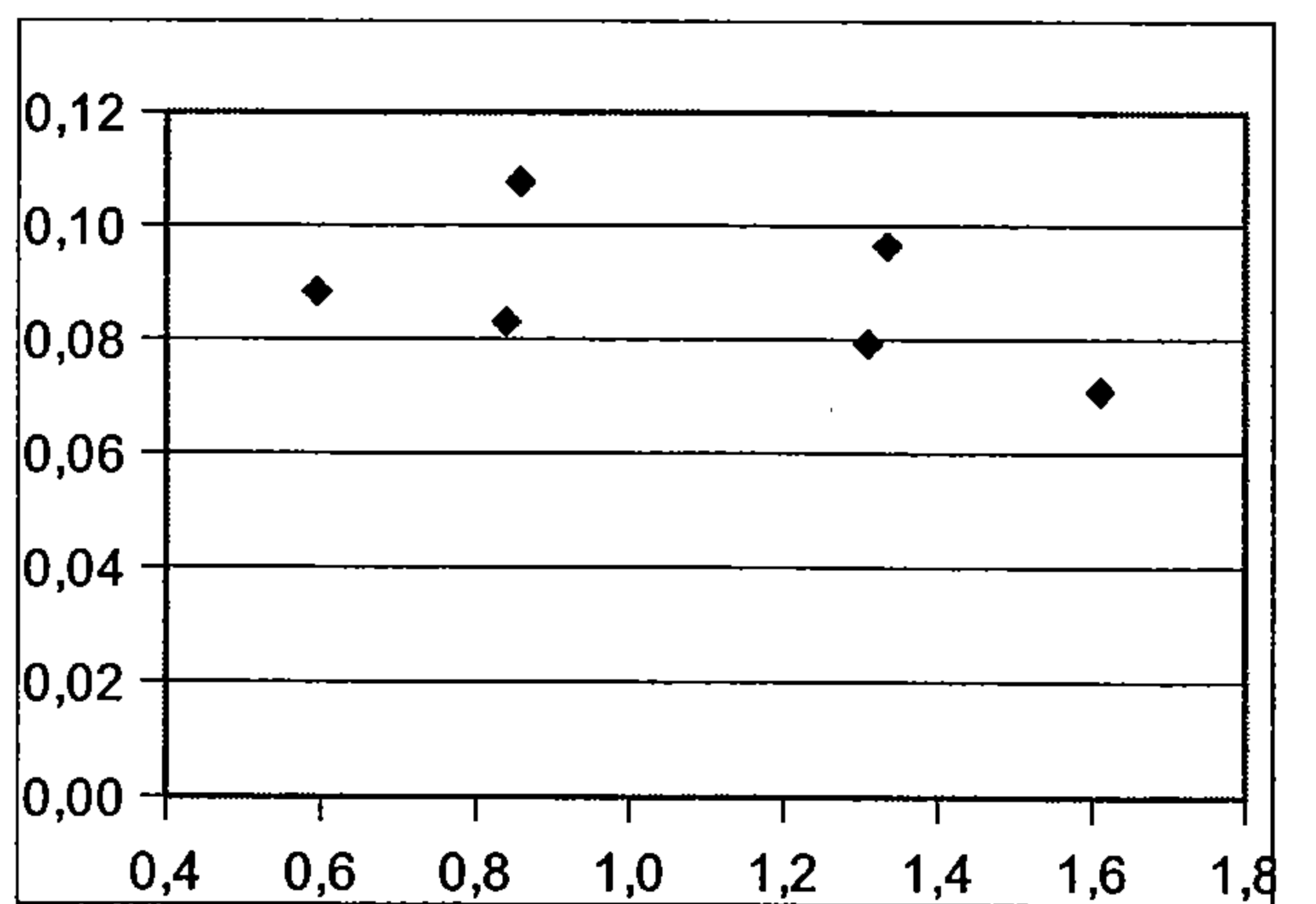
Graf 50: vliv obsahu železa na obsah arsenu,
 $R^2 = 0,837$



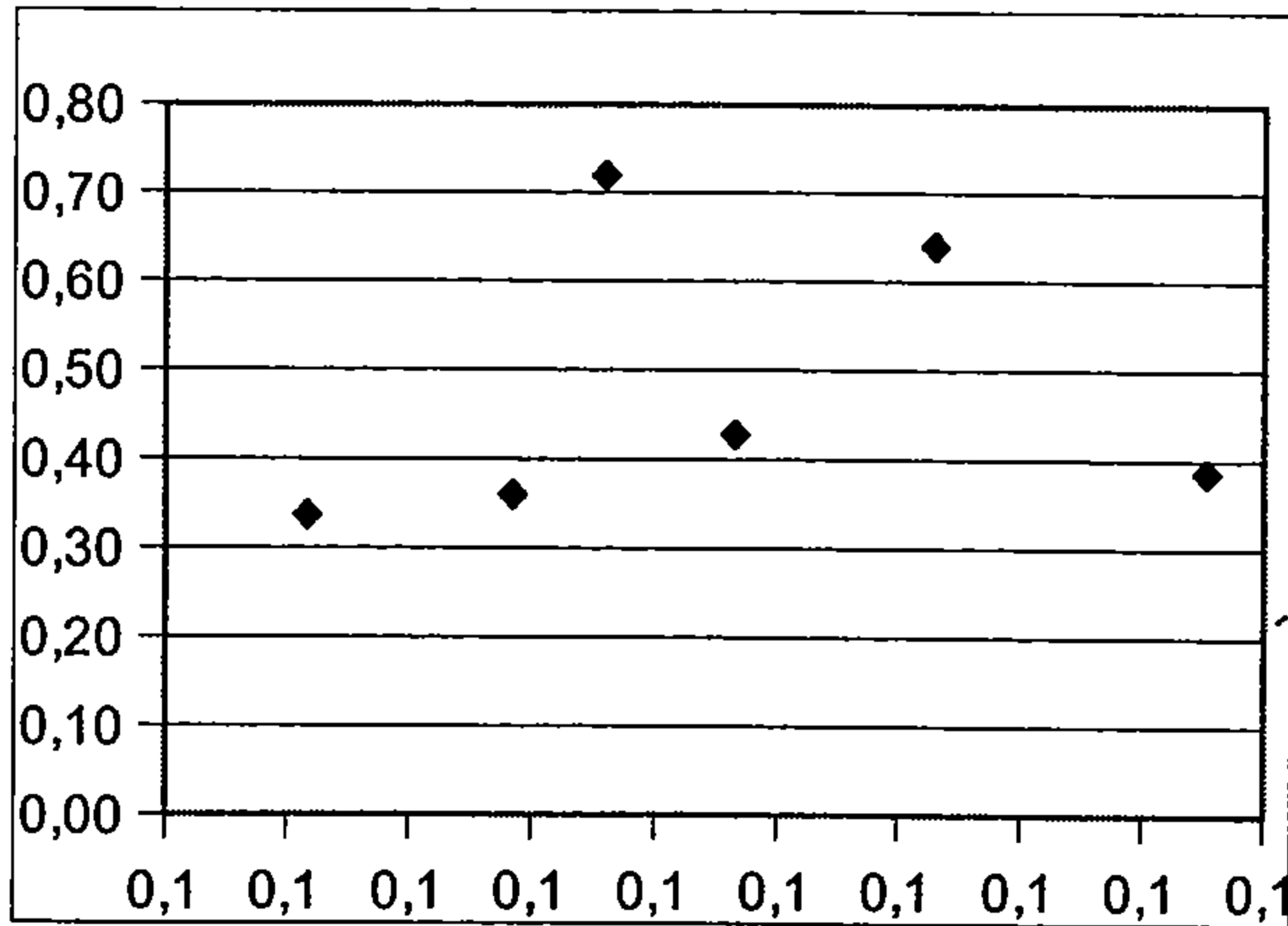
Graf 53: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku,
 $R^2 = 0,4258$



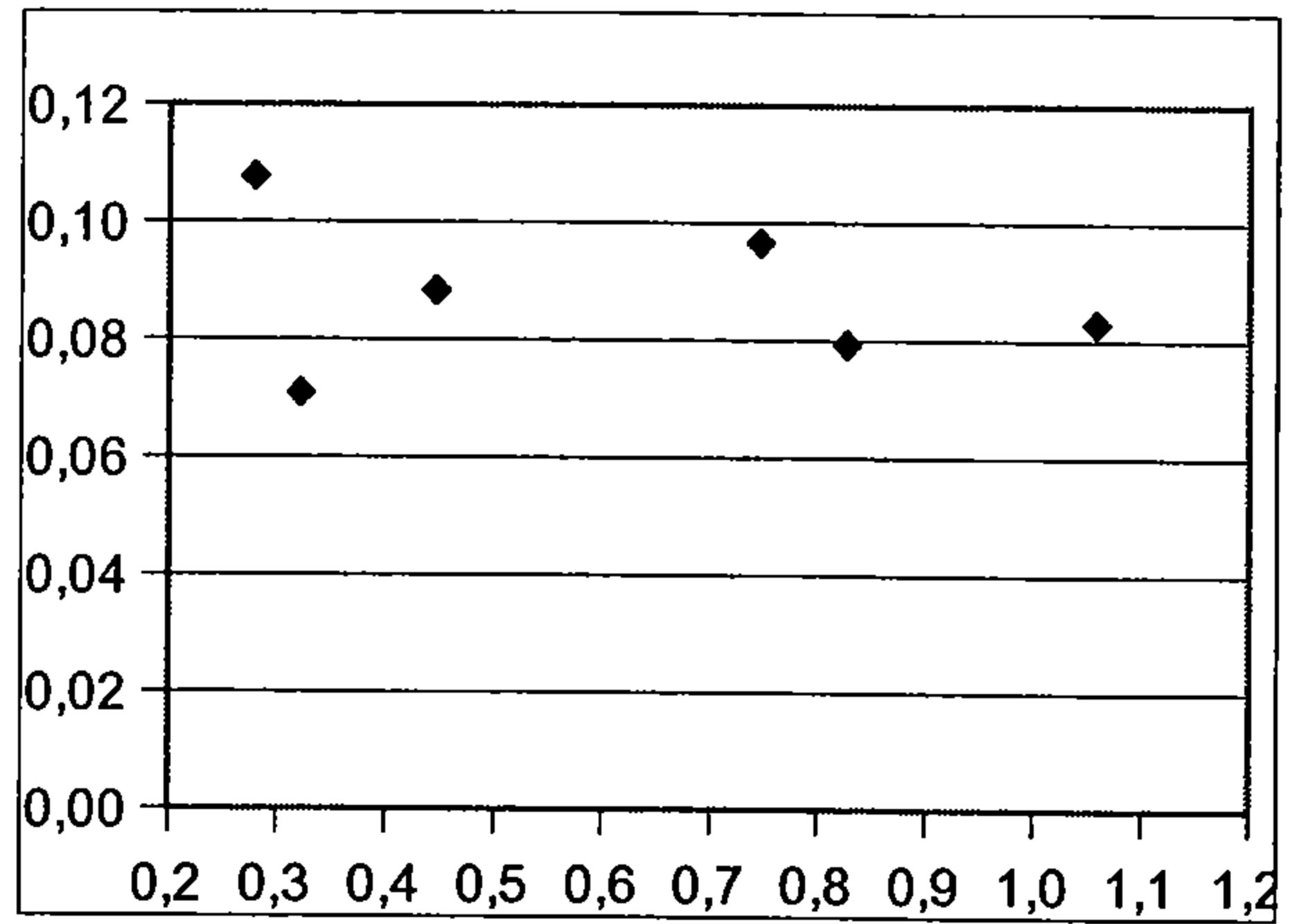
Graf 51: vliv obsahu arsenu na obsah zinku,
 $R^2 = 0,546$



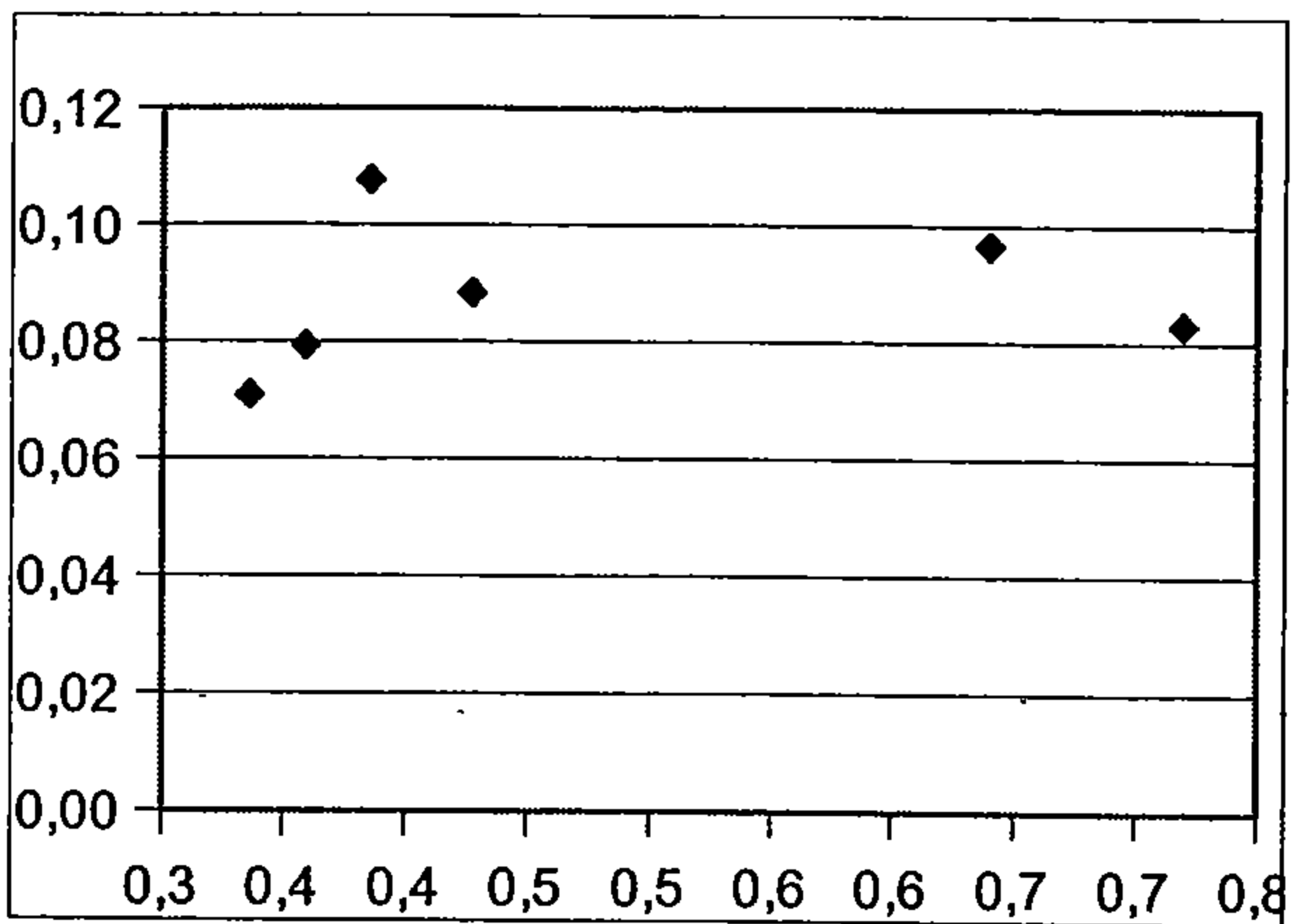
Graf 54: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu,
 $R^2 = 0,453$



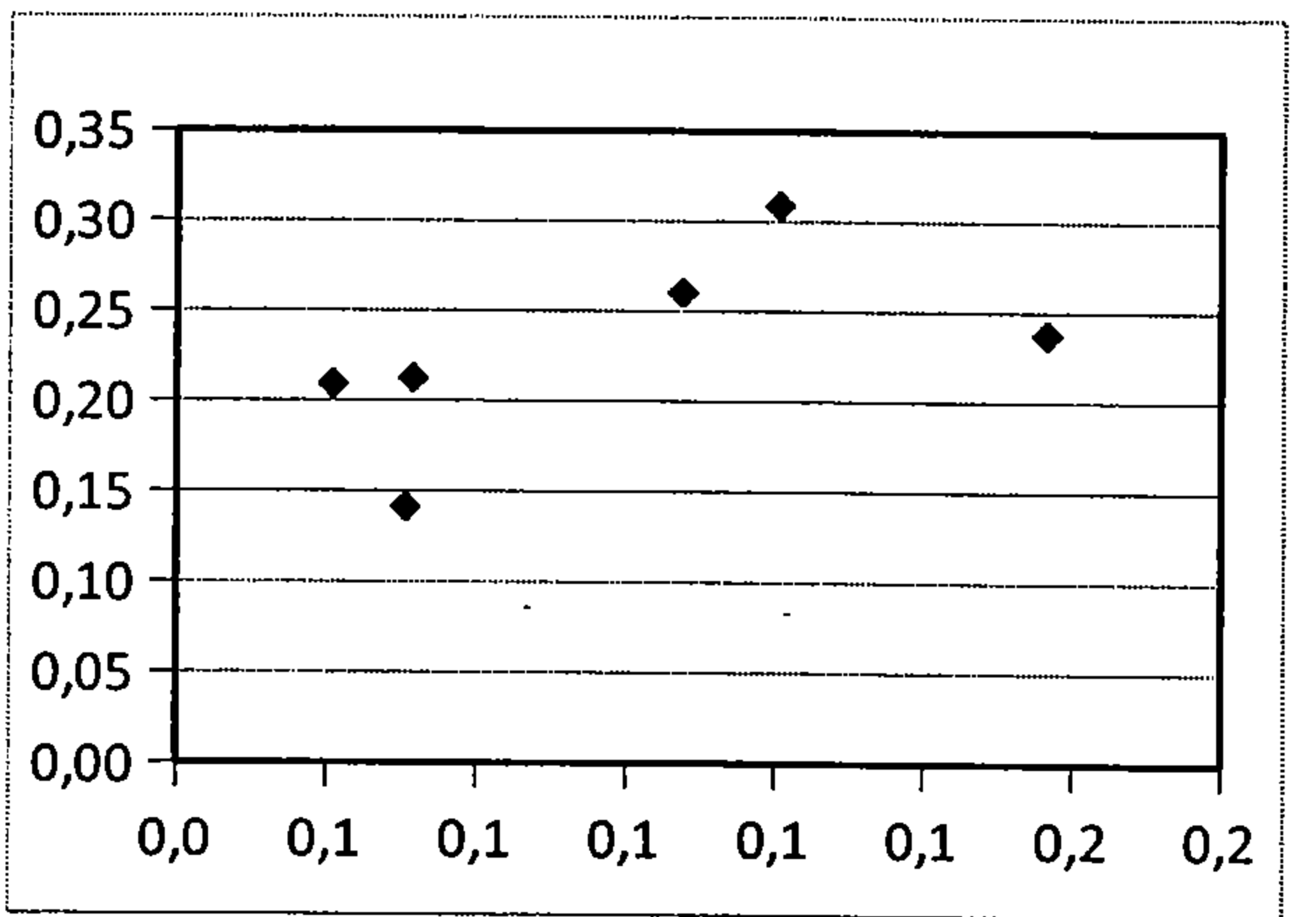
Graf 55: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,393$



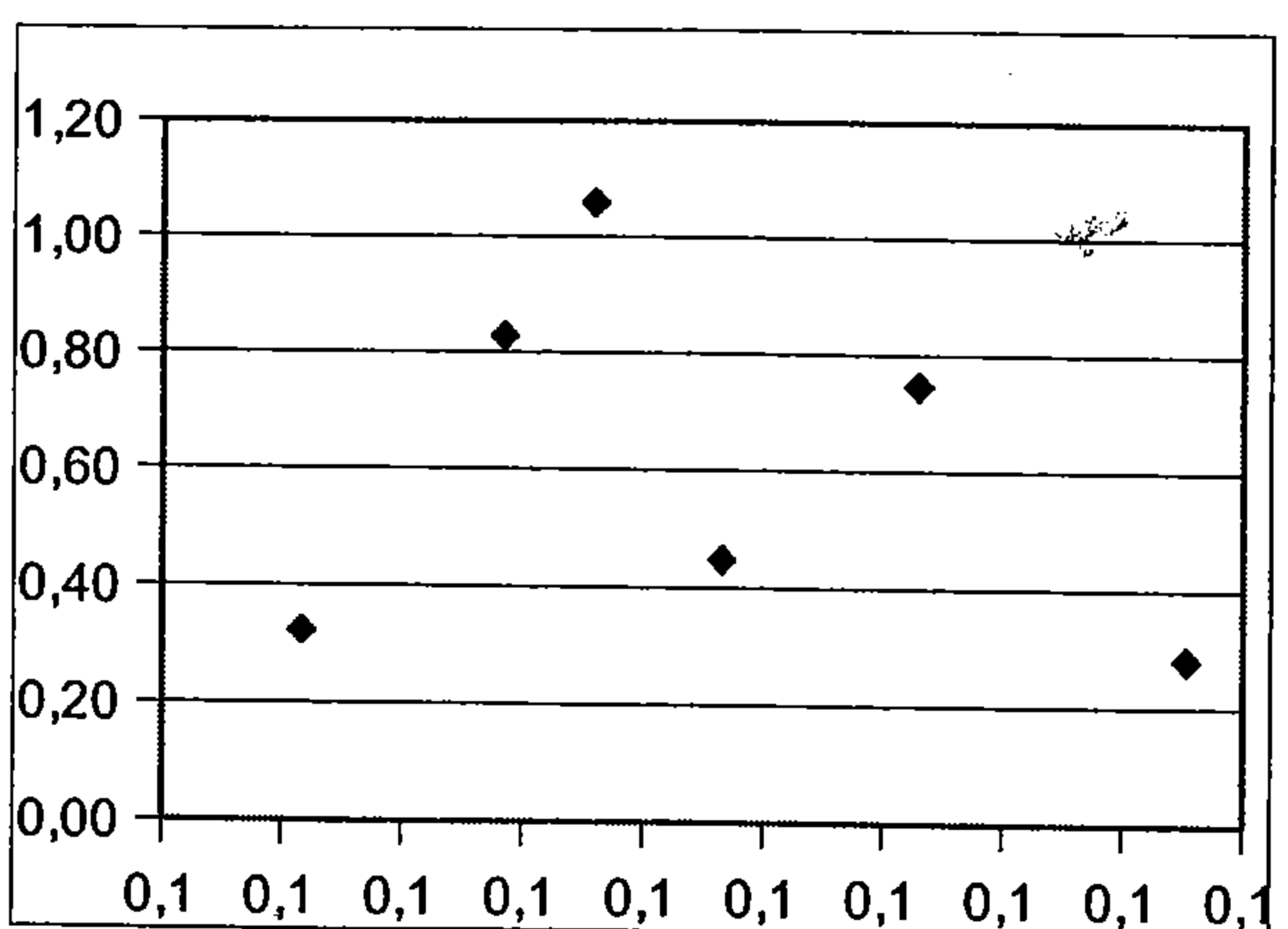
Graf 58: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,05$



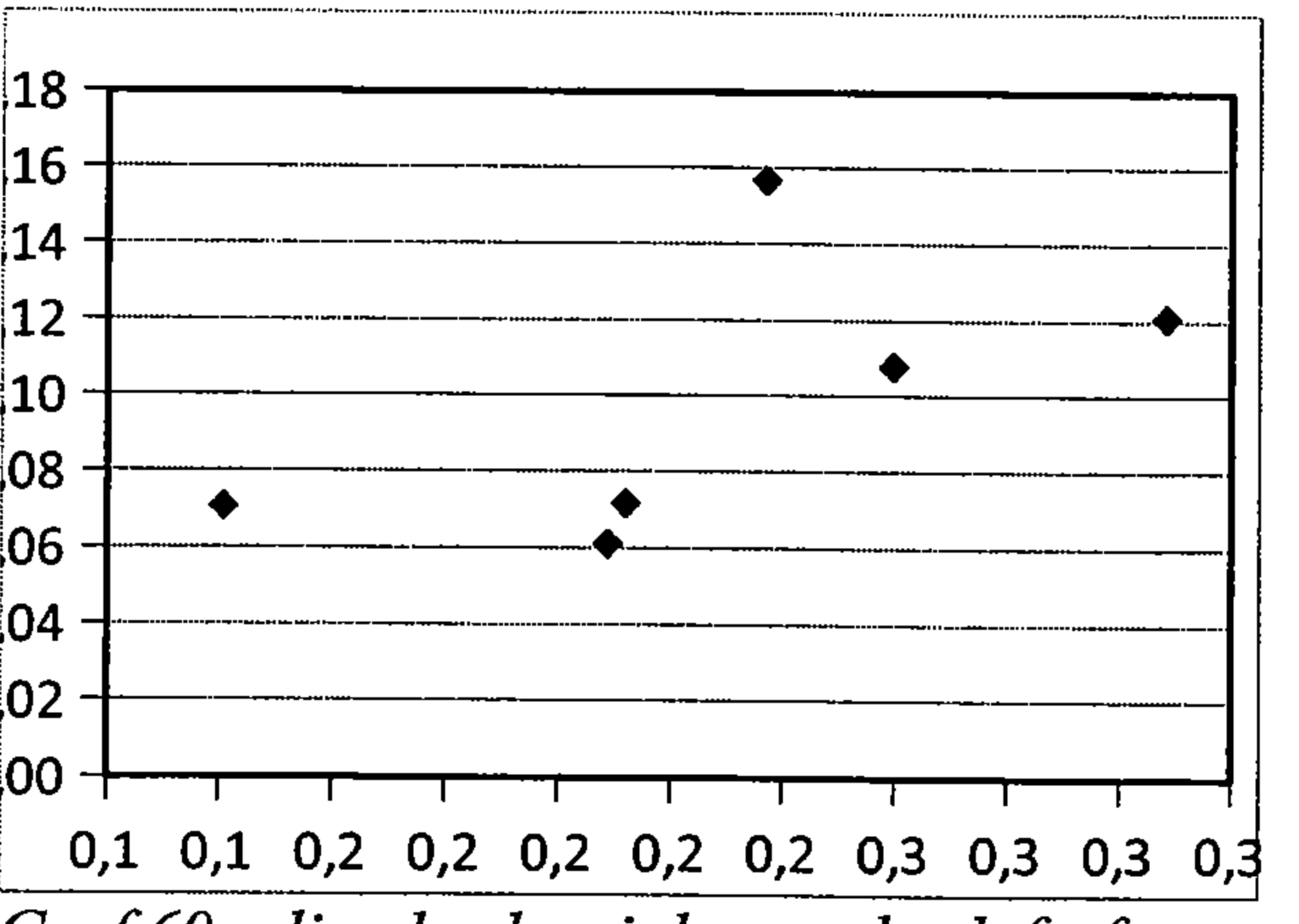
Graf 56: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,449$



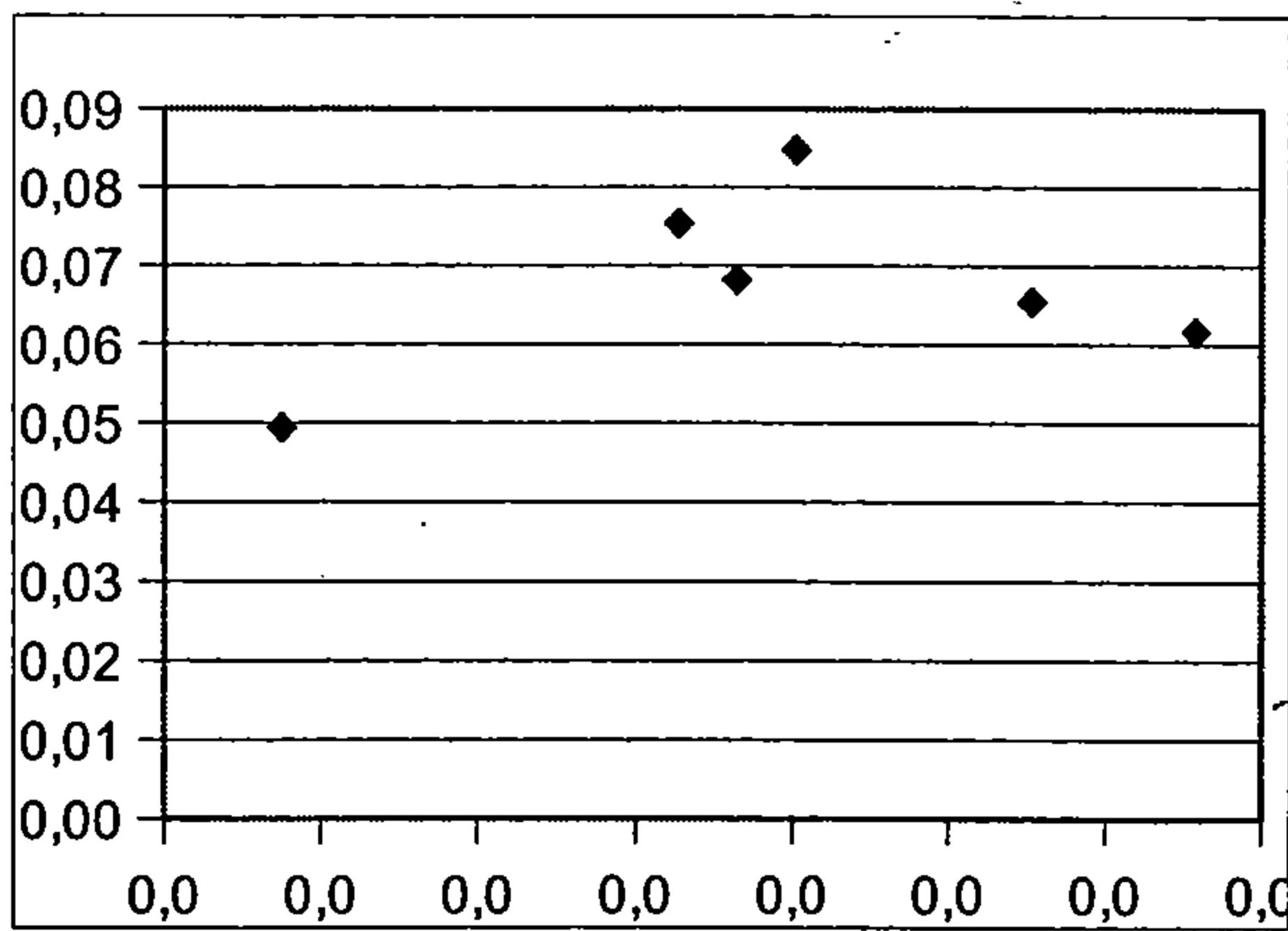
Graf 59: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,597$



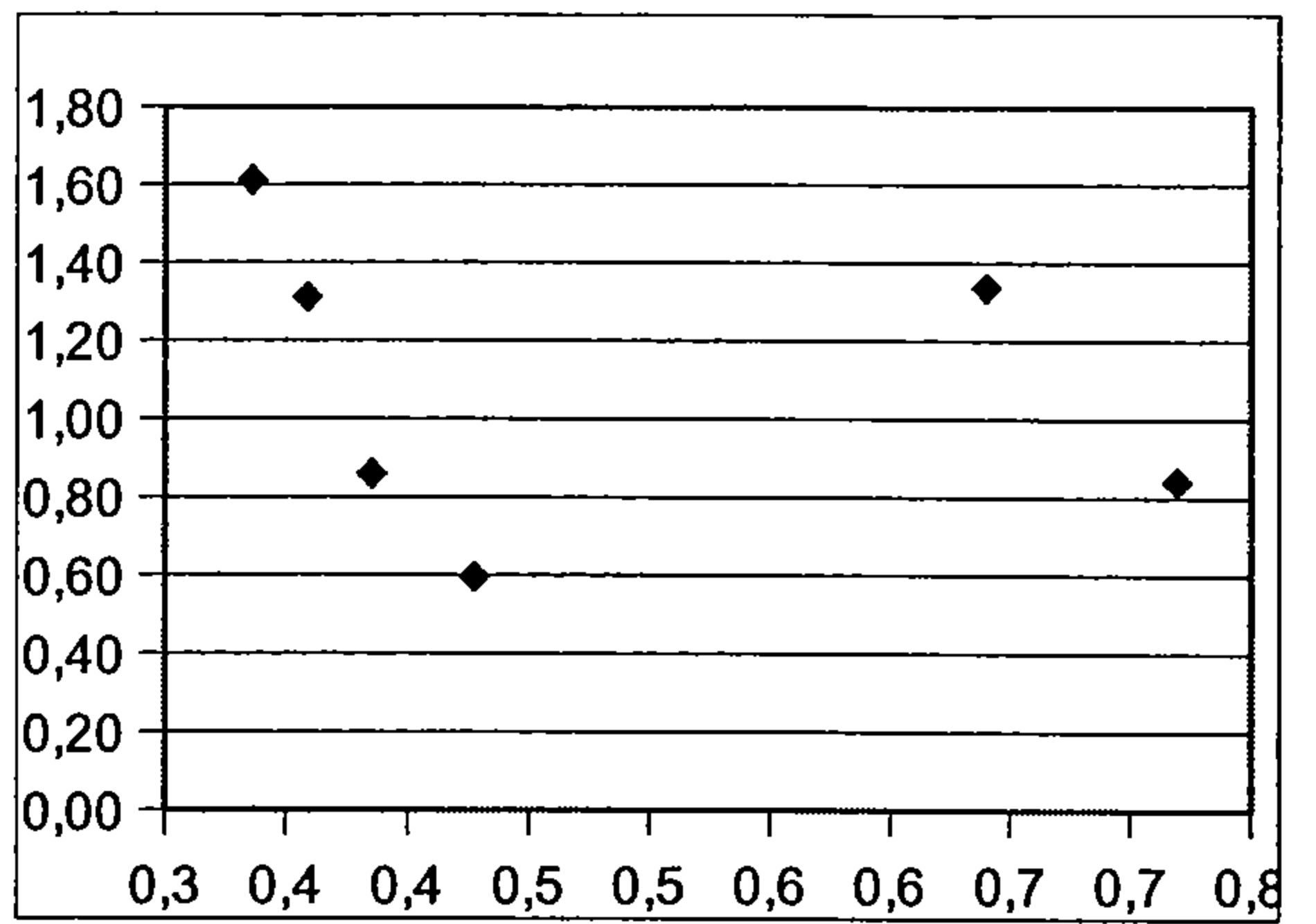
Graf 57: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,516$



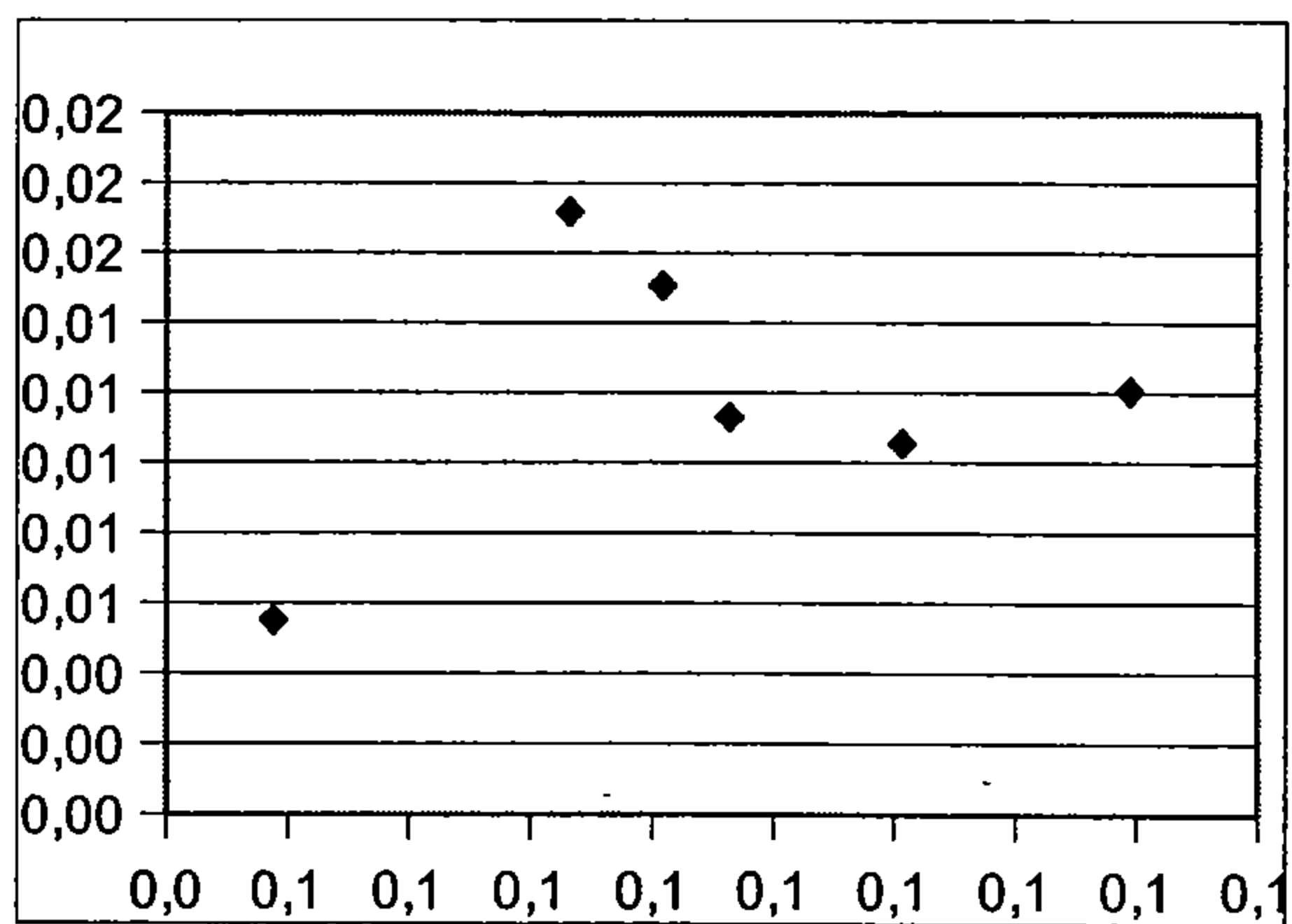
Graf 60: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,535$



Graf 61: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,779$

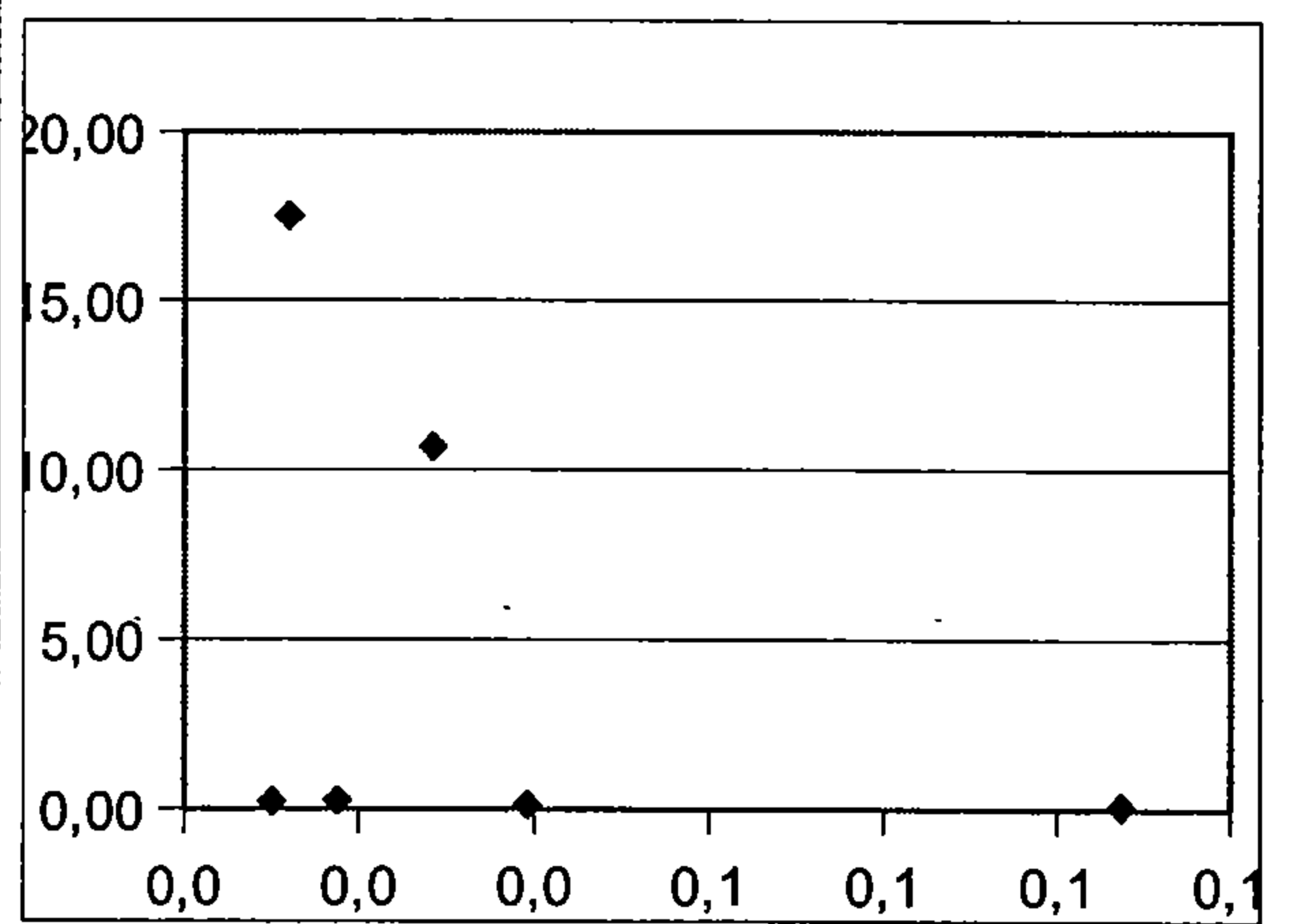


Graf 64: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,243$

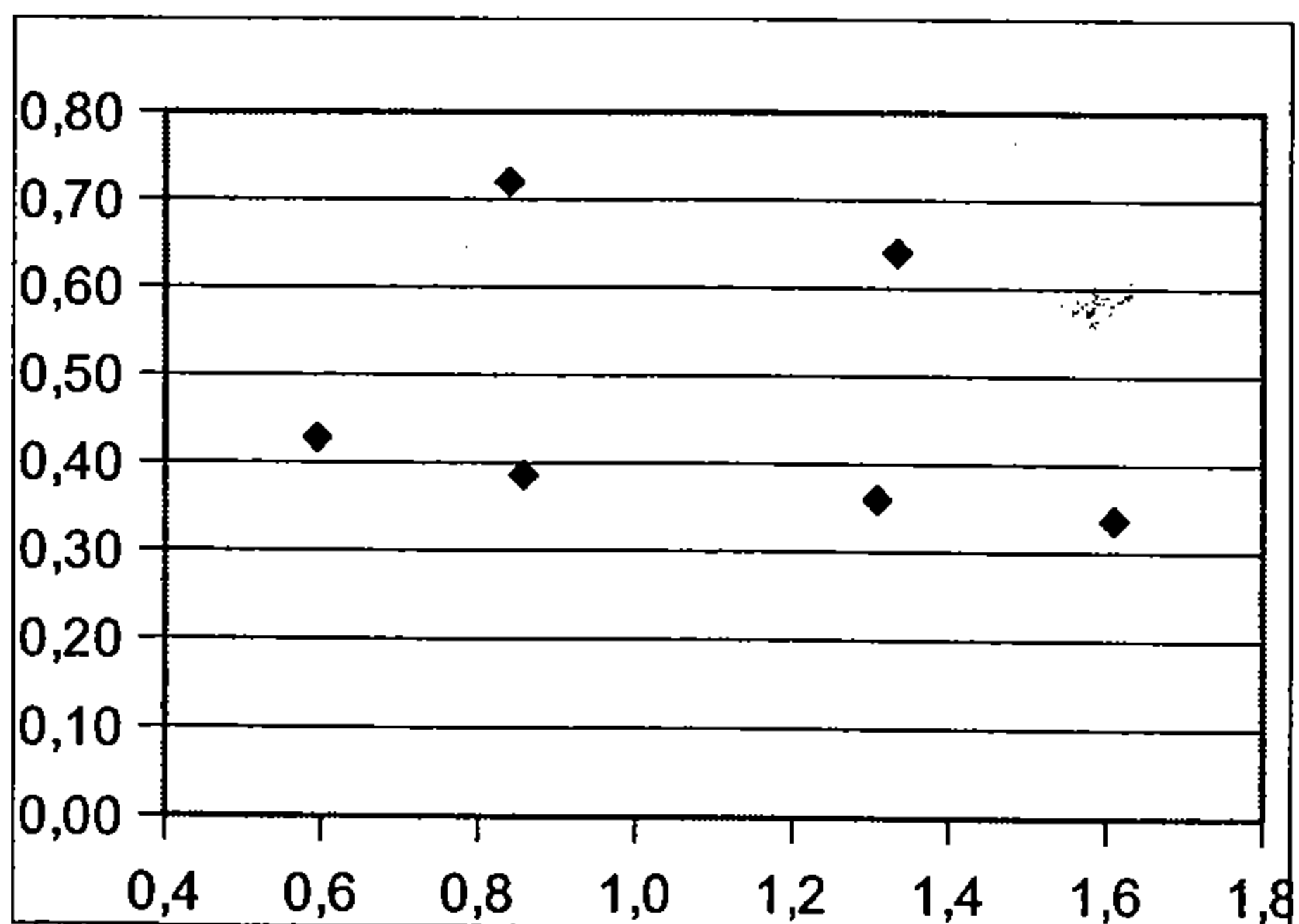


Graf 62: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,486$

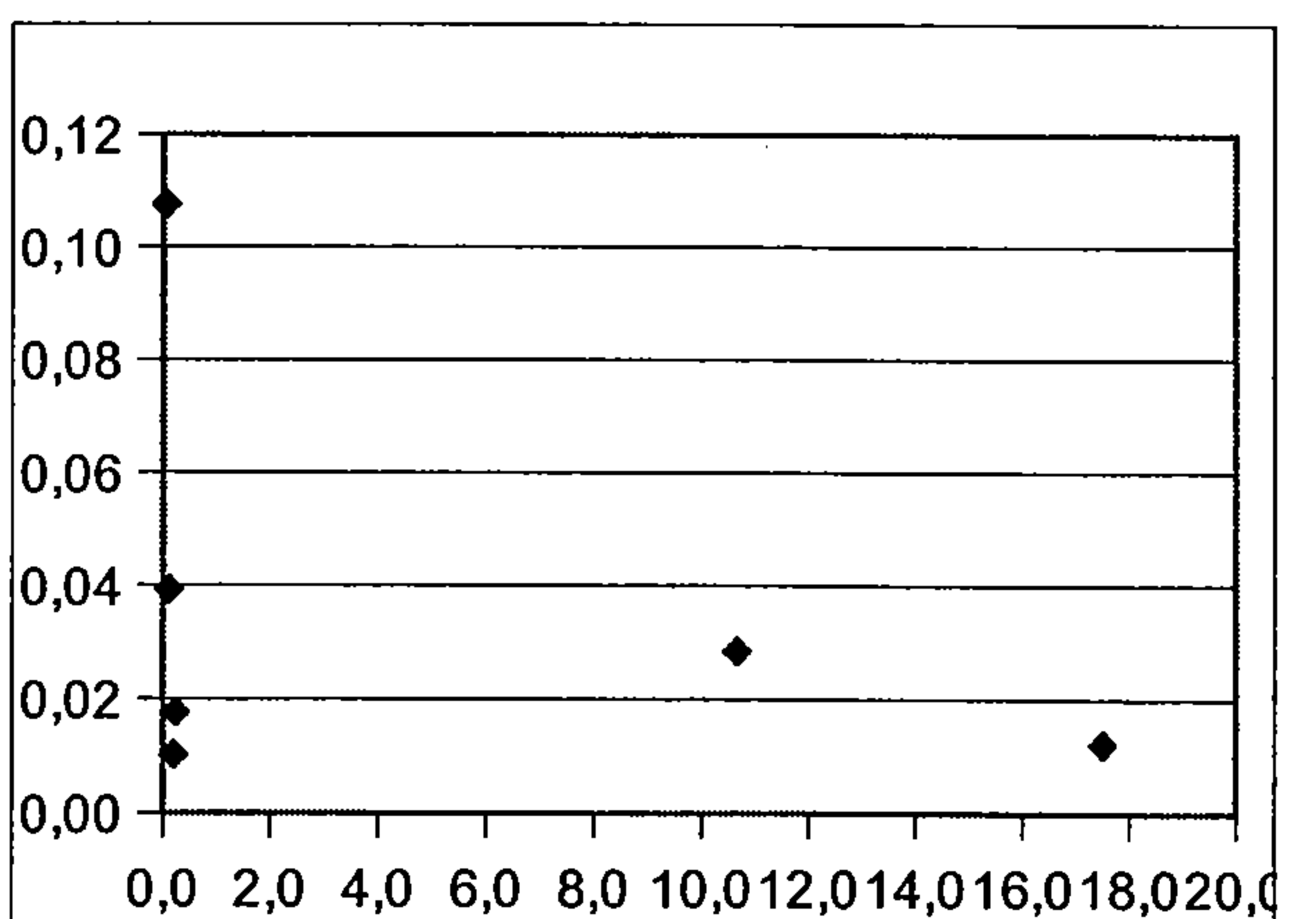
Korelace mezi prvky – frakce V



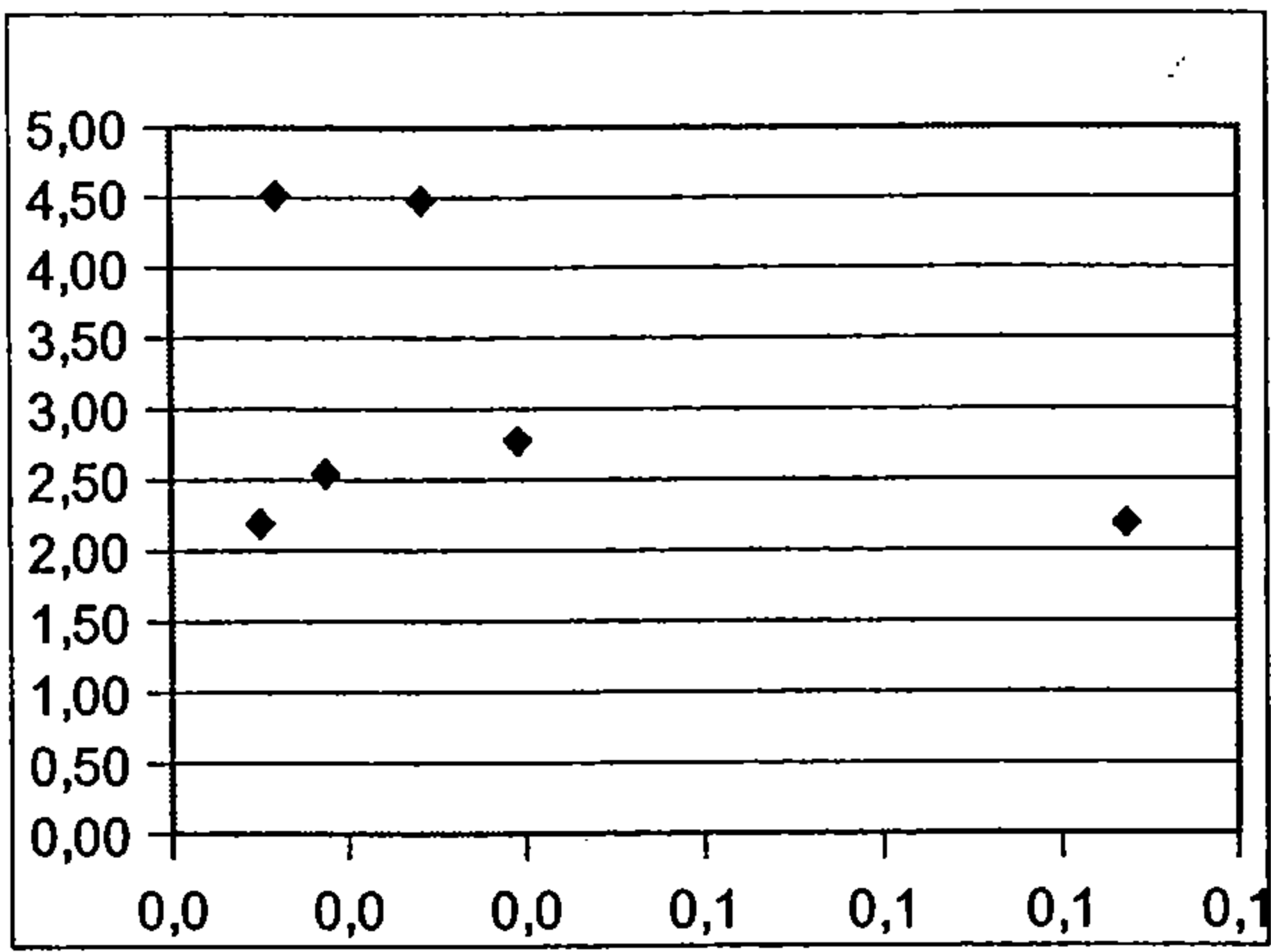
Graf 65: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,14$



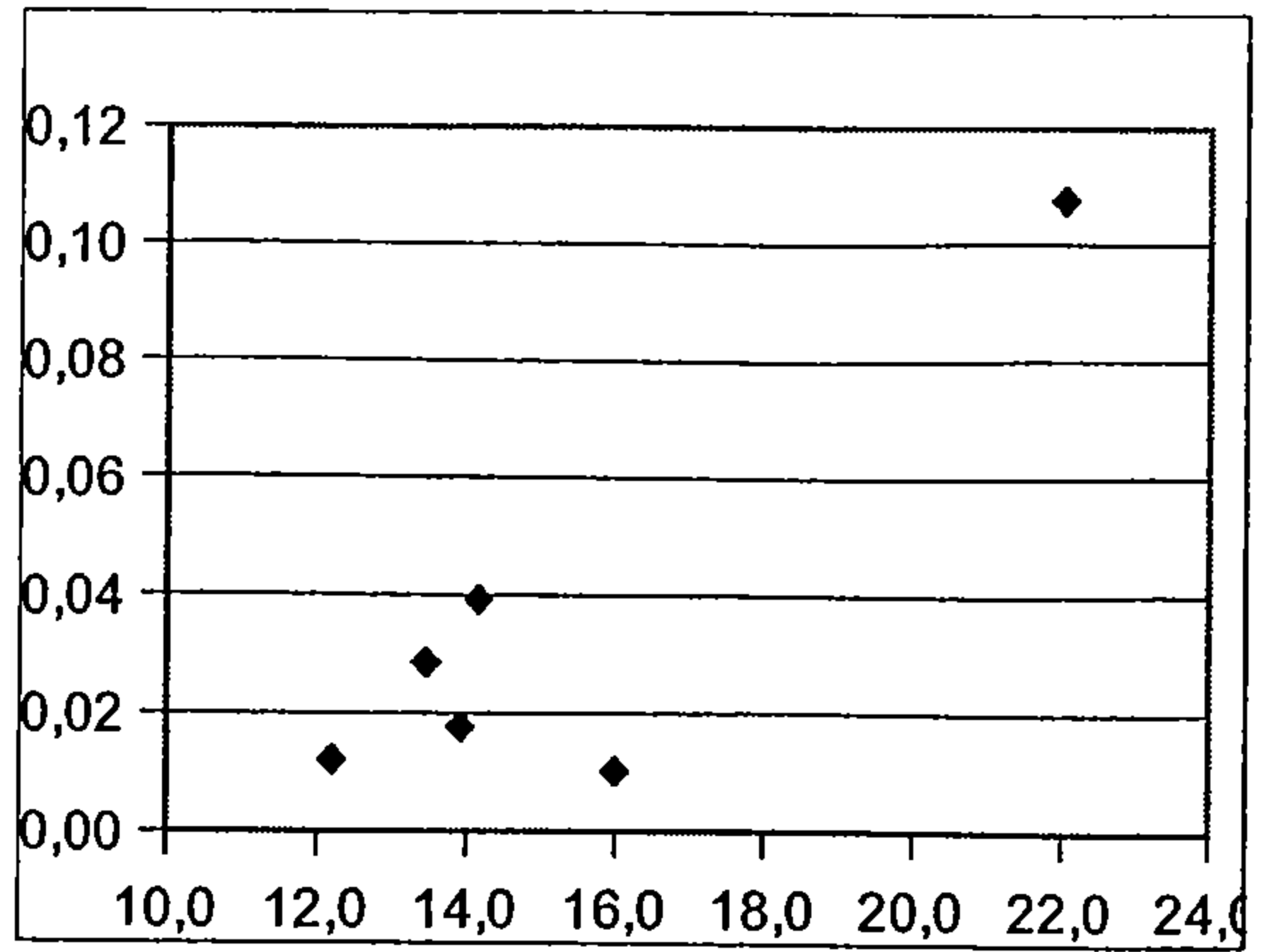
Graf 63: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,231$



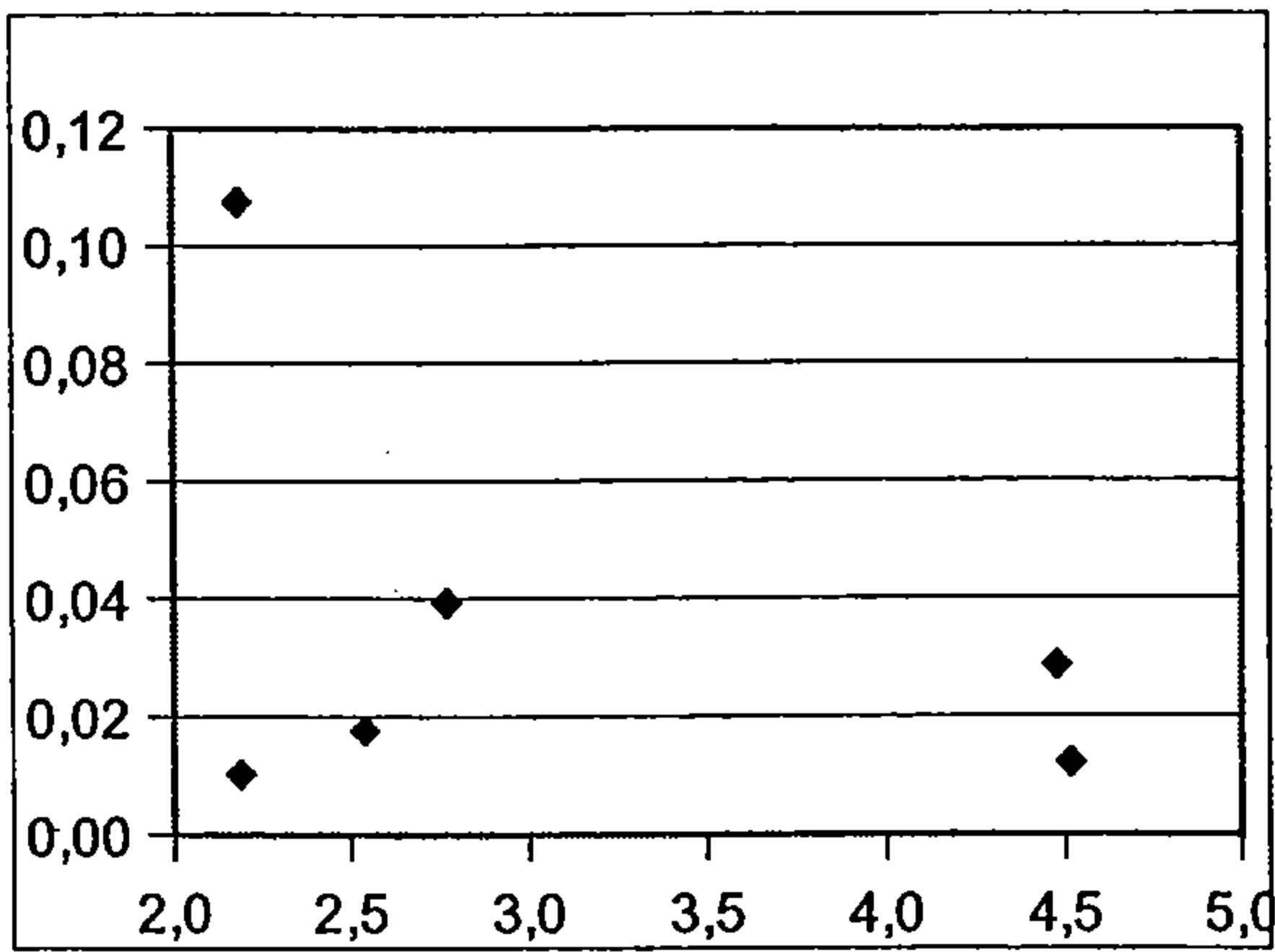
Graf 66: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,13$



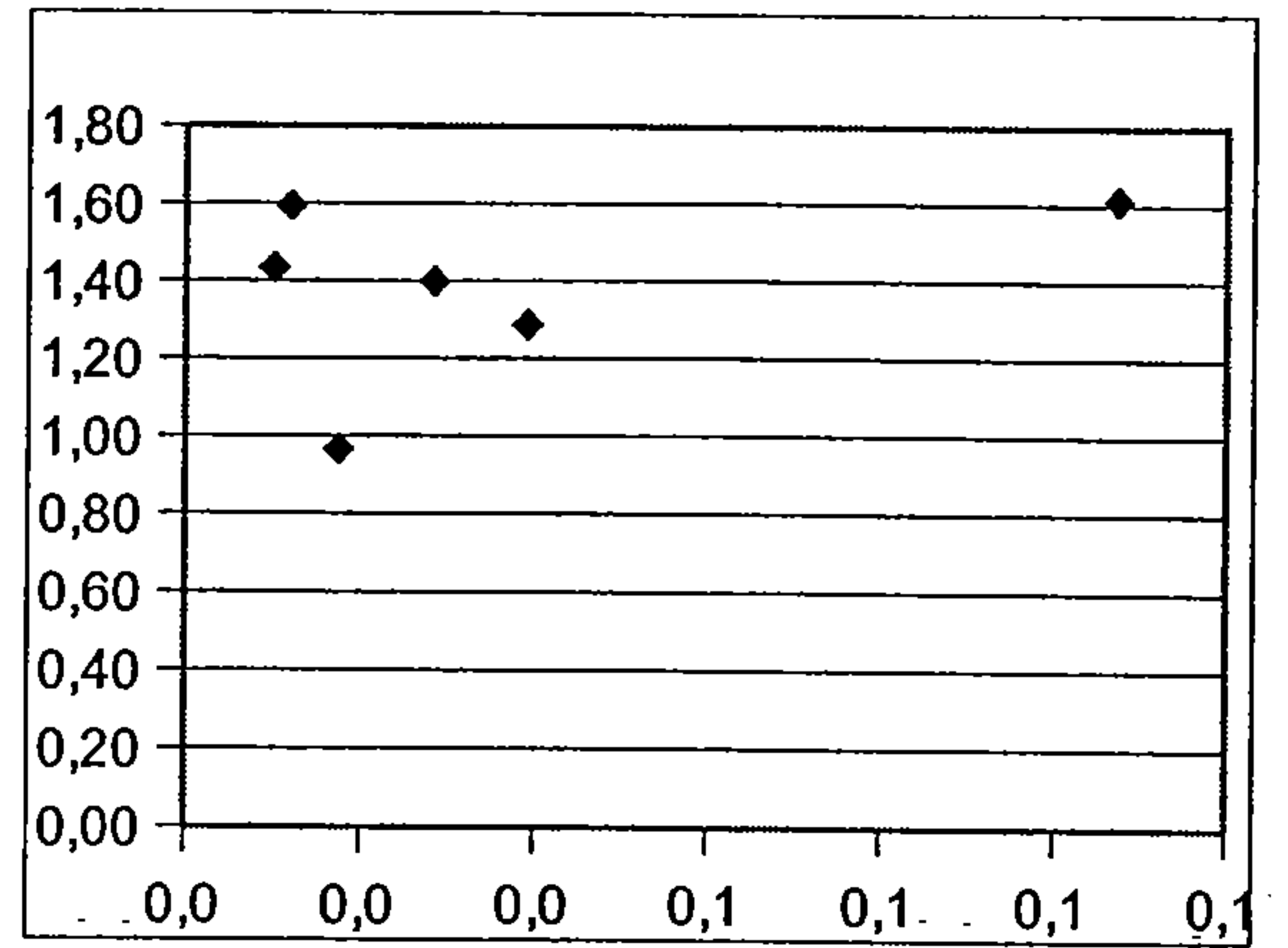
Graf 67: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,188$



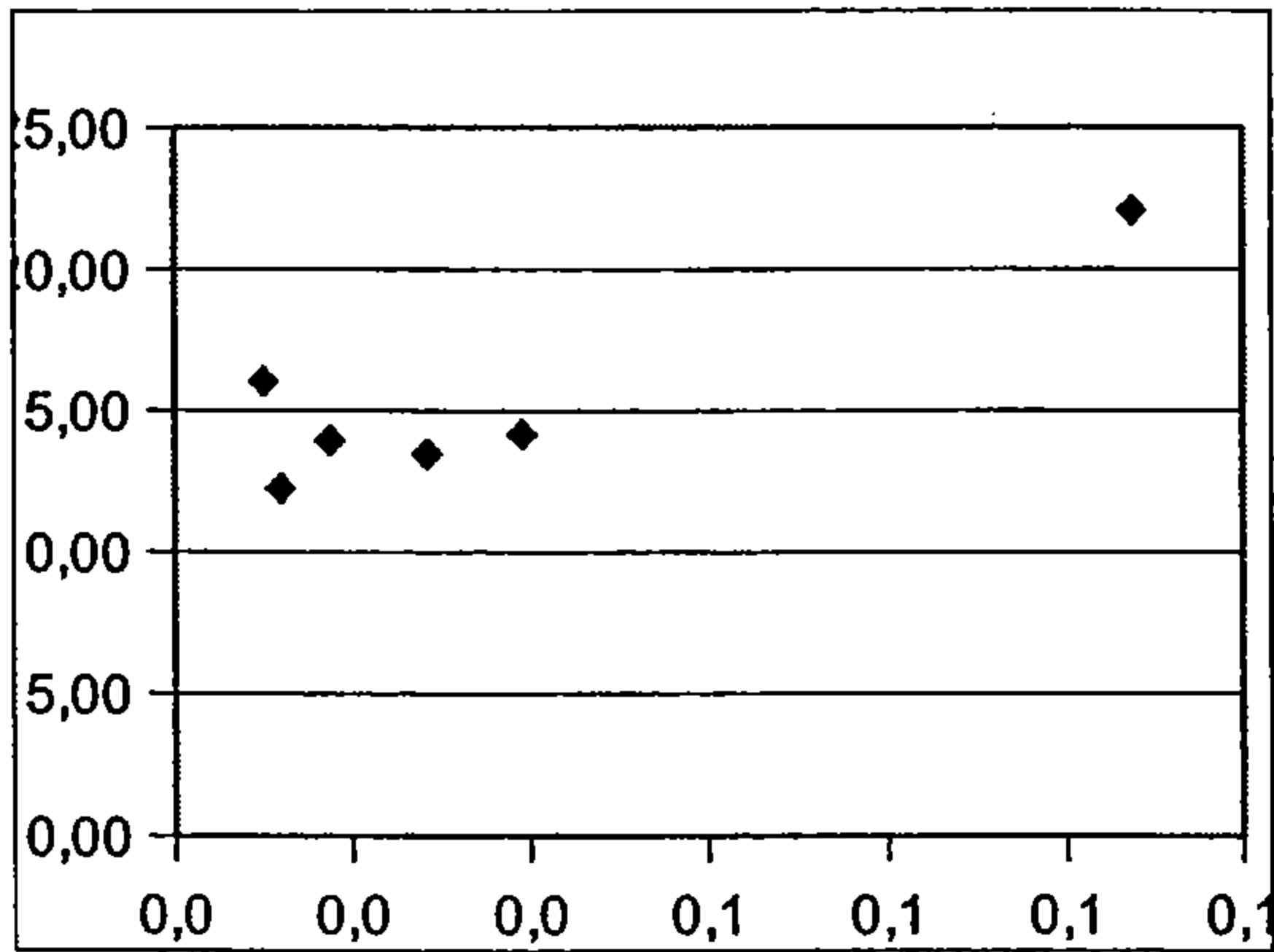
Graf 70: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,878$



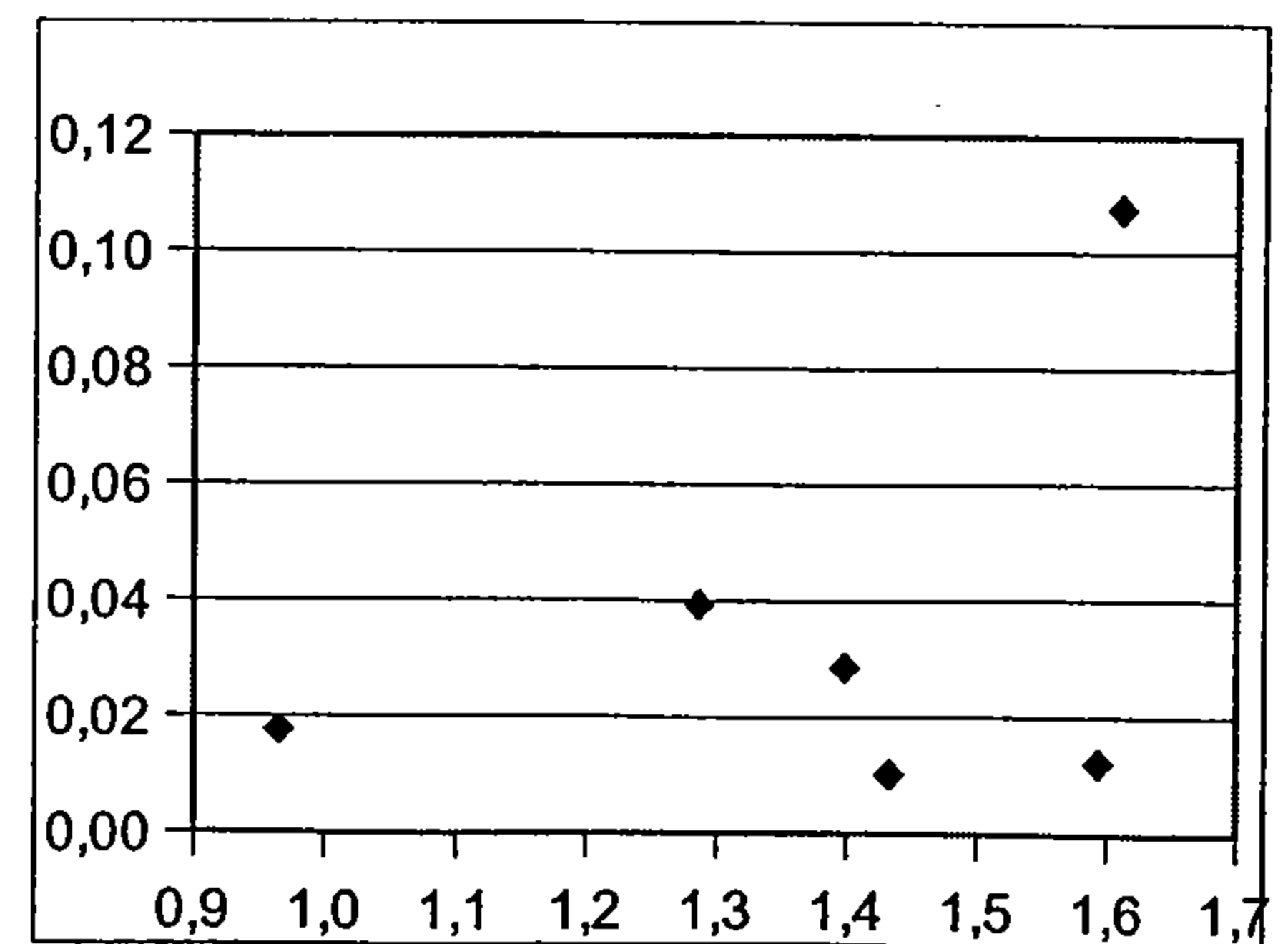
Graf 68: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,198$



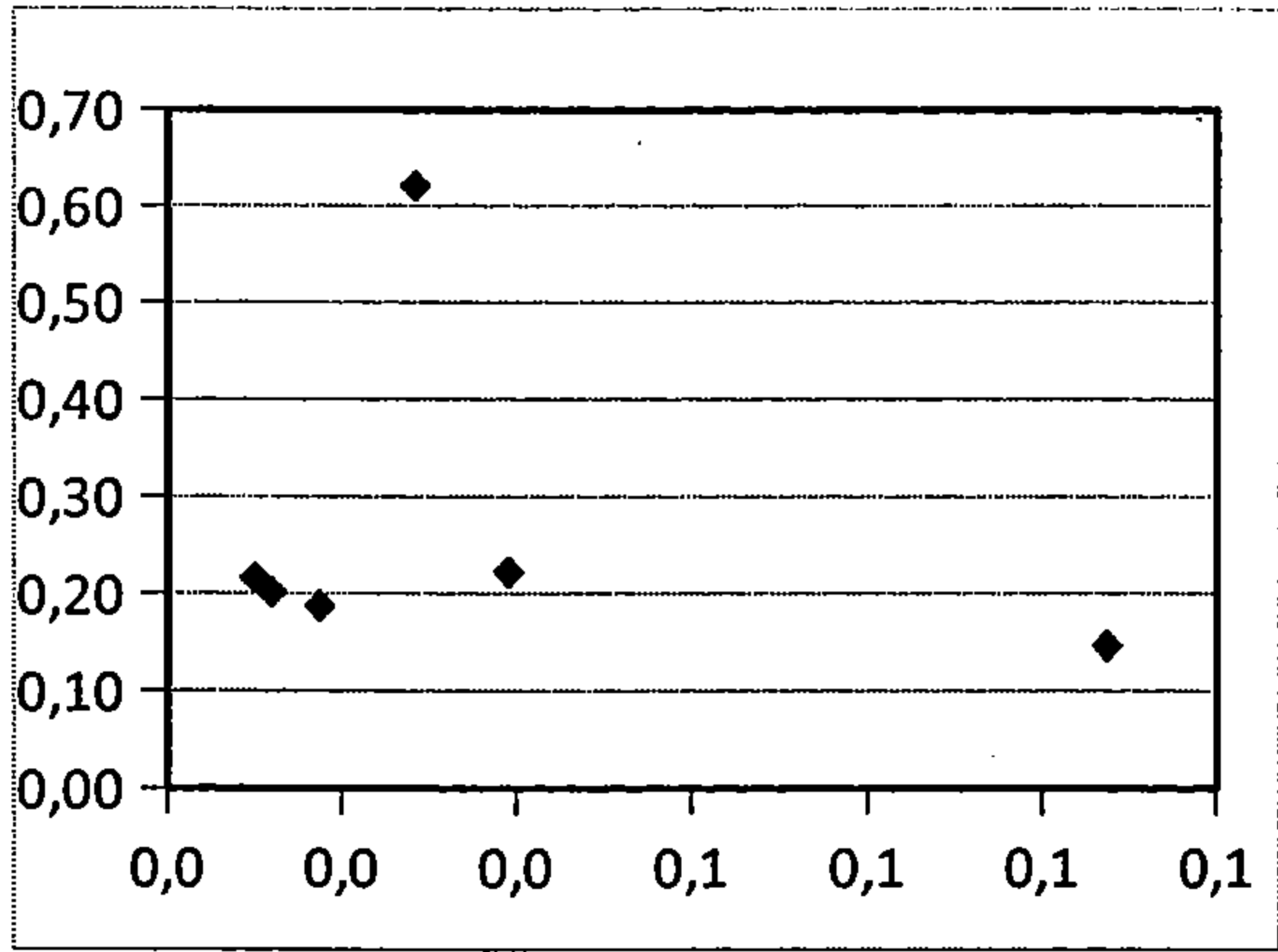
Graf 71: vliv obsahu arsenu na železo, $R^2 = 0,283$



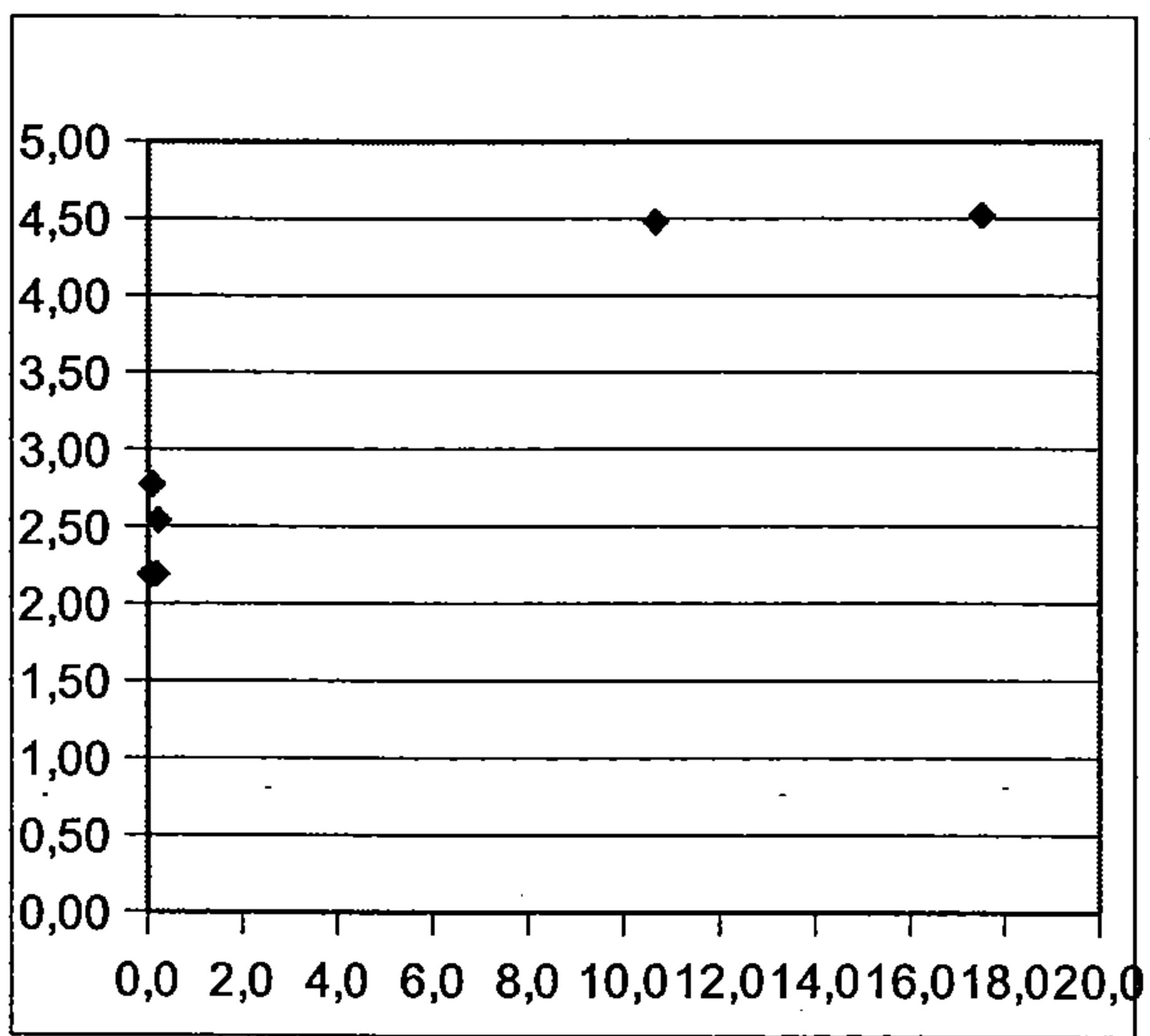
Graf 69: vliv obsahu arsenu na hořčík, $R^2 = 0,887$



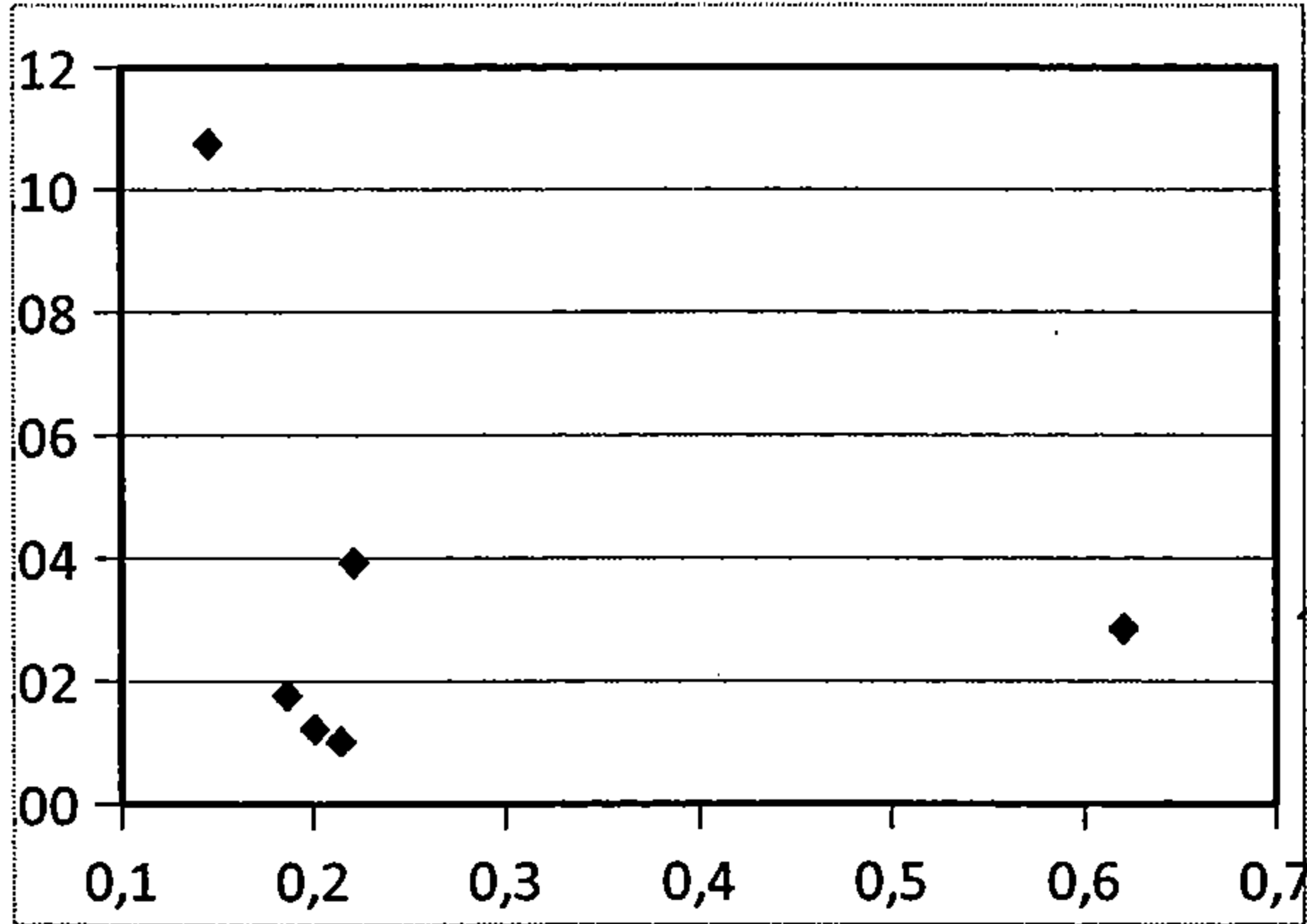
Graf 72: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,237$



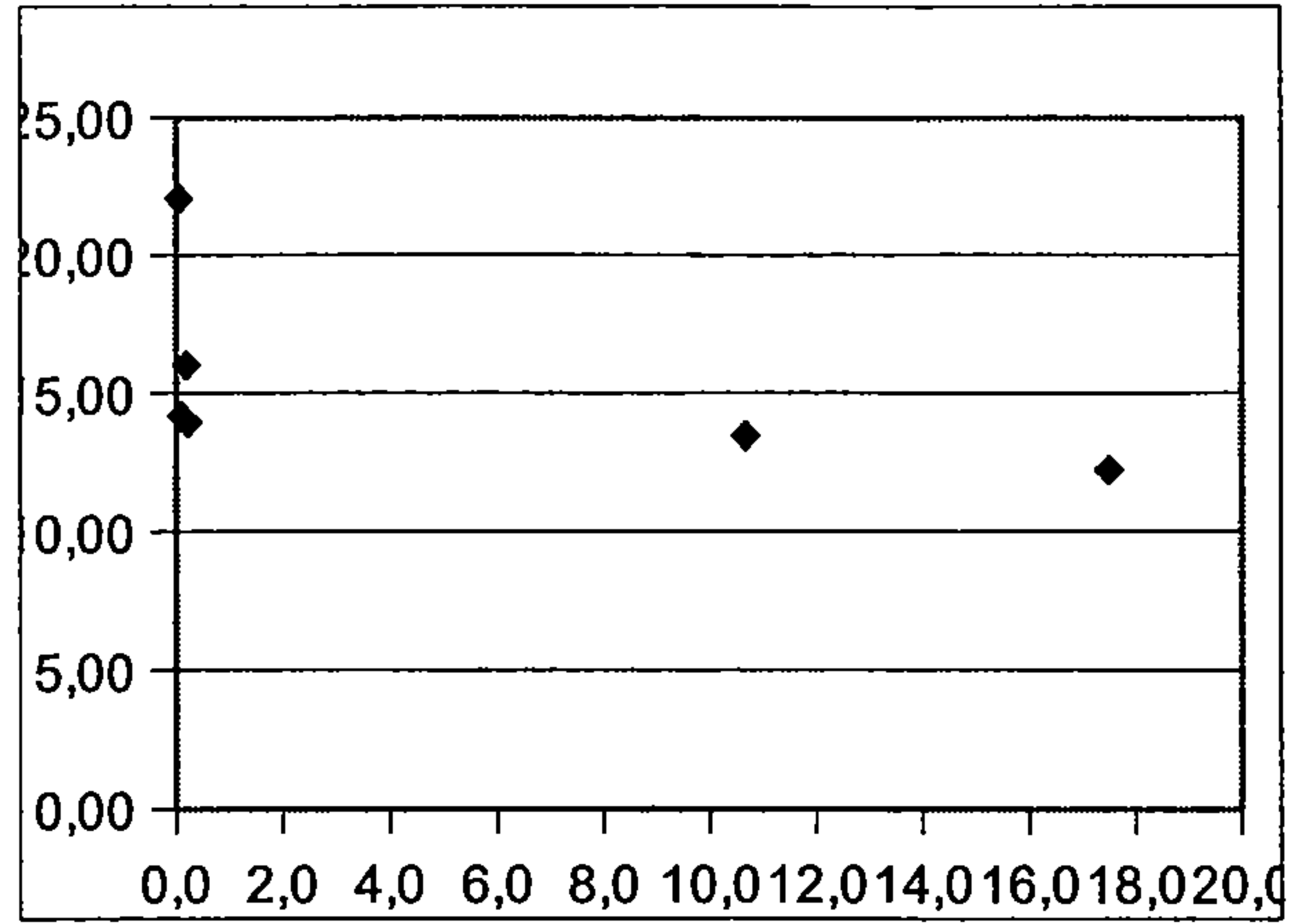
Graf 73: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,27$



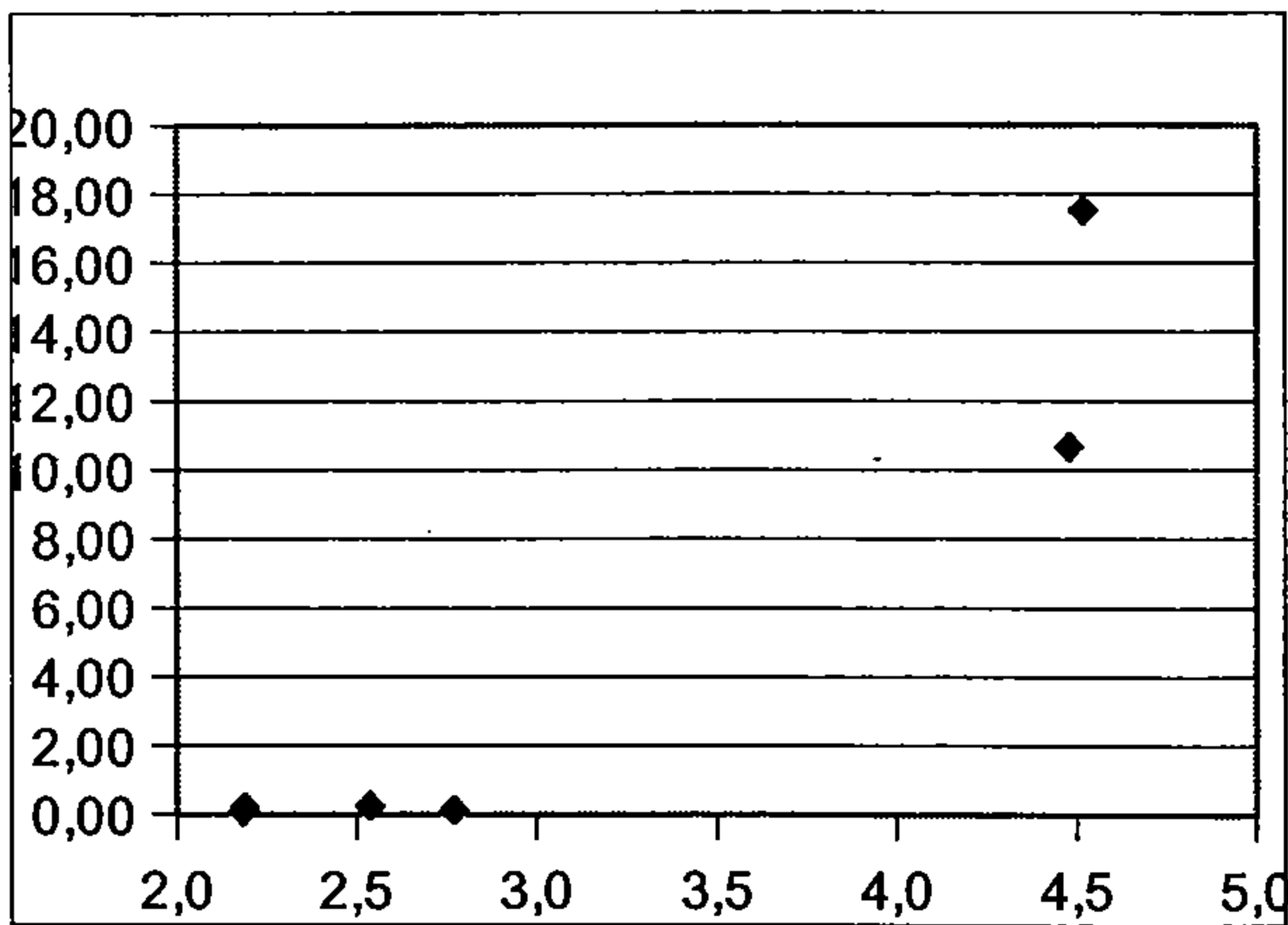
Graf 75: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,959$



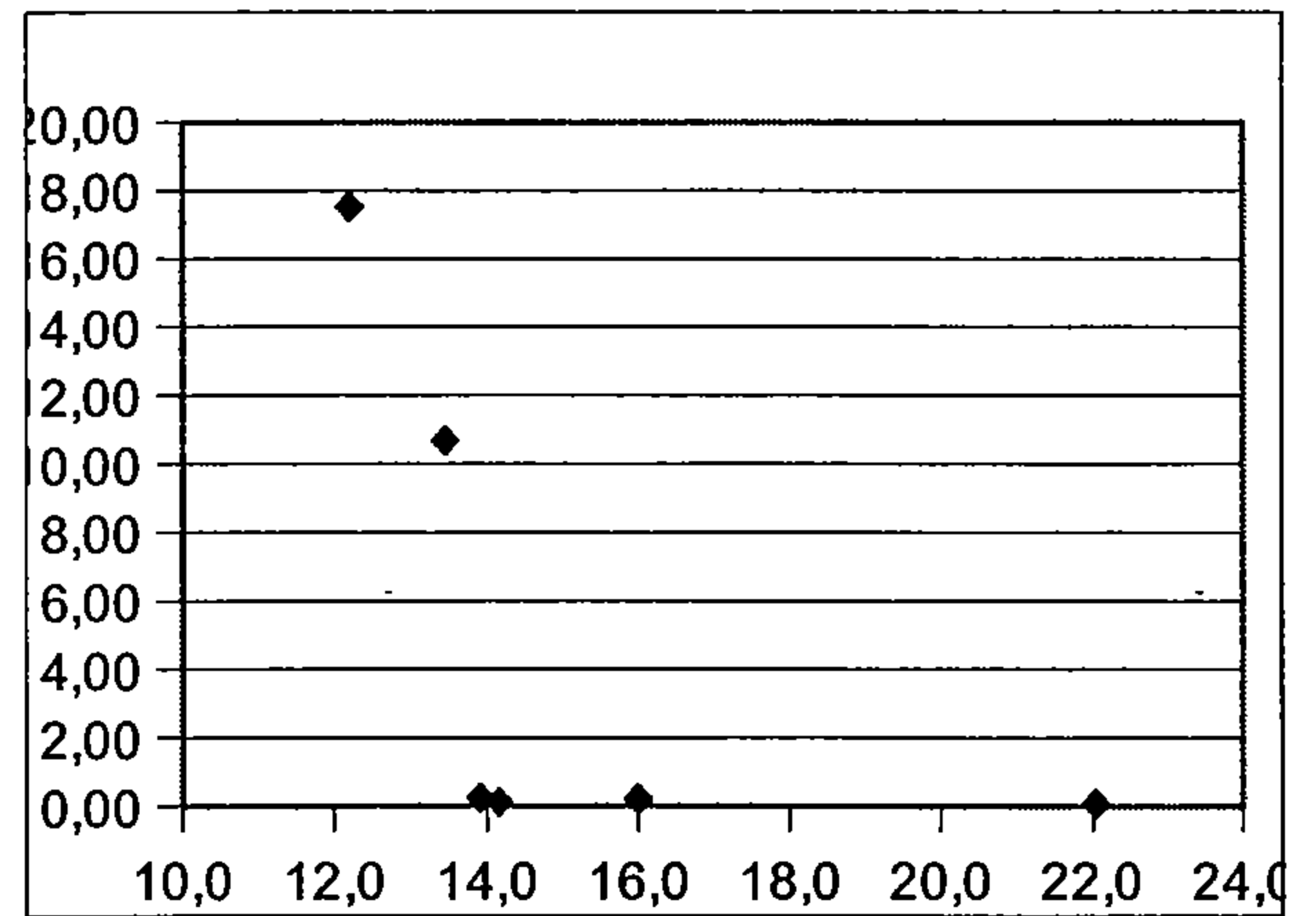
Graf 74: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,685$



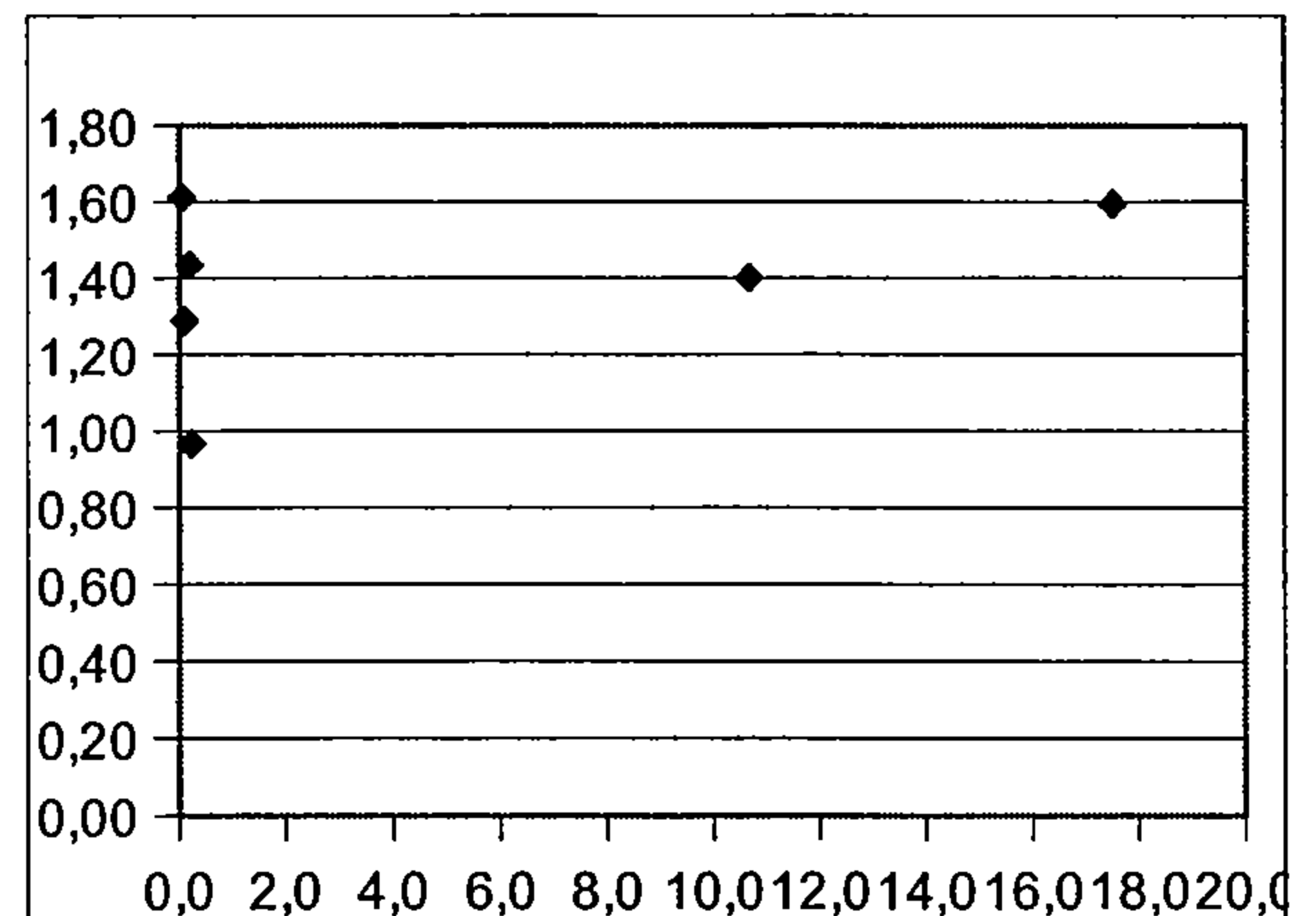
Graf 77: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,313$



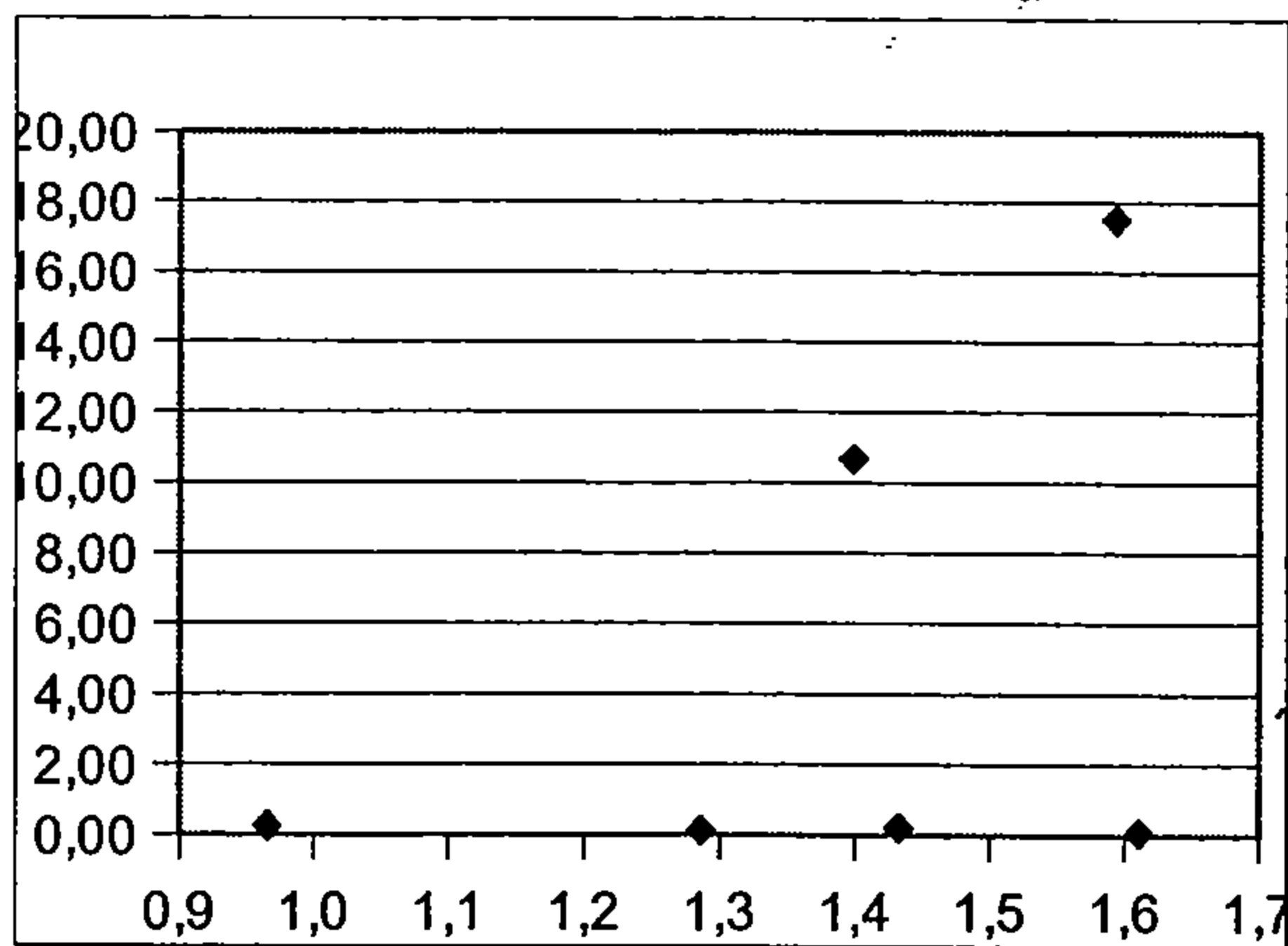
Graf 76: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,929$



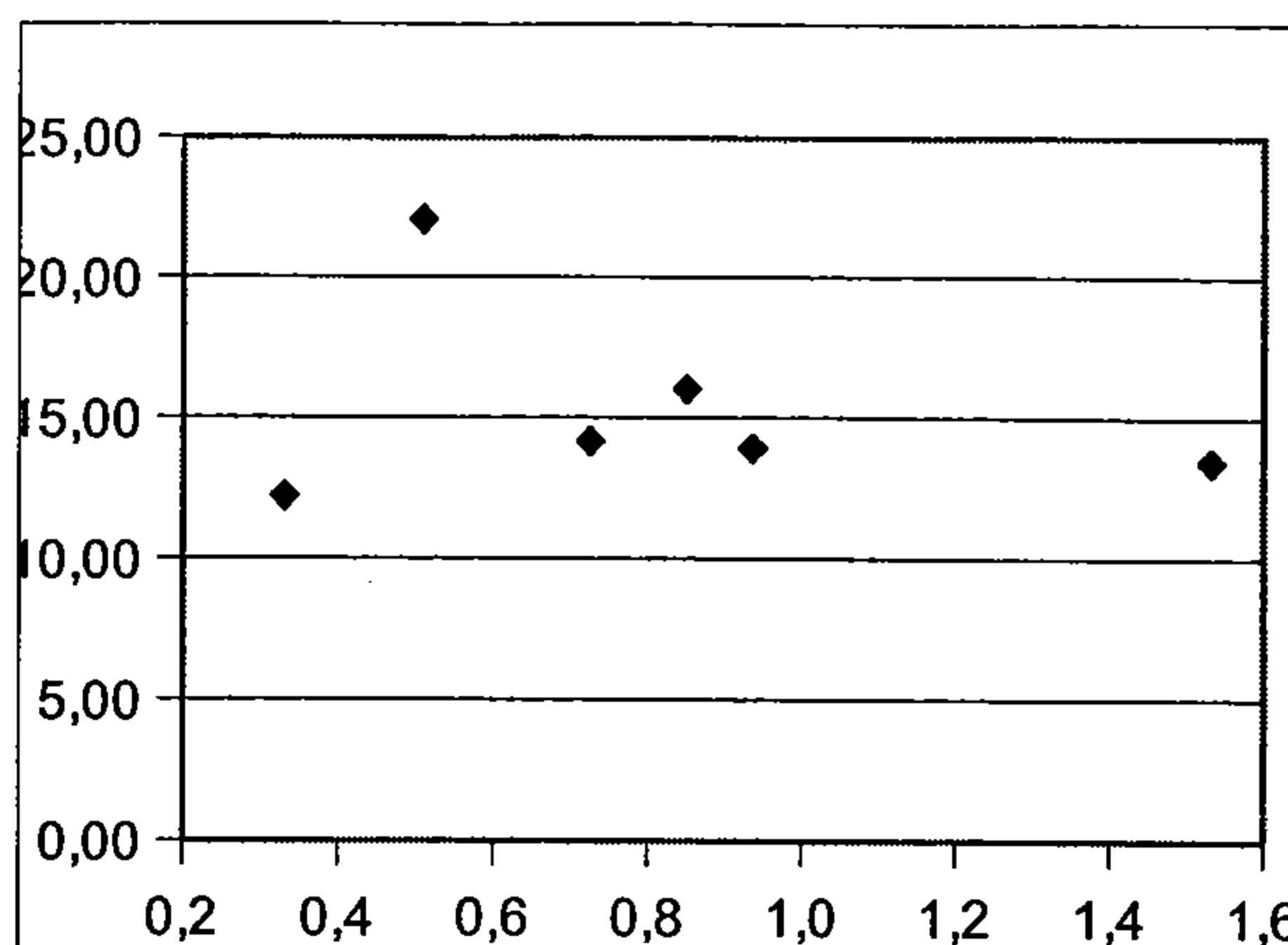
Graf 78: vliv obsahu hořčíku na fosfor, $R^2 = 0,778$



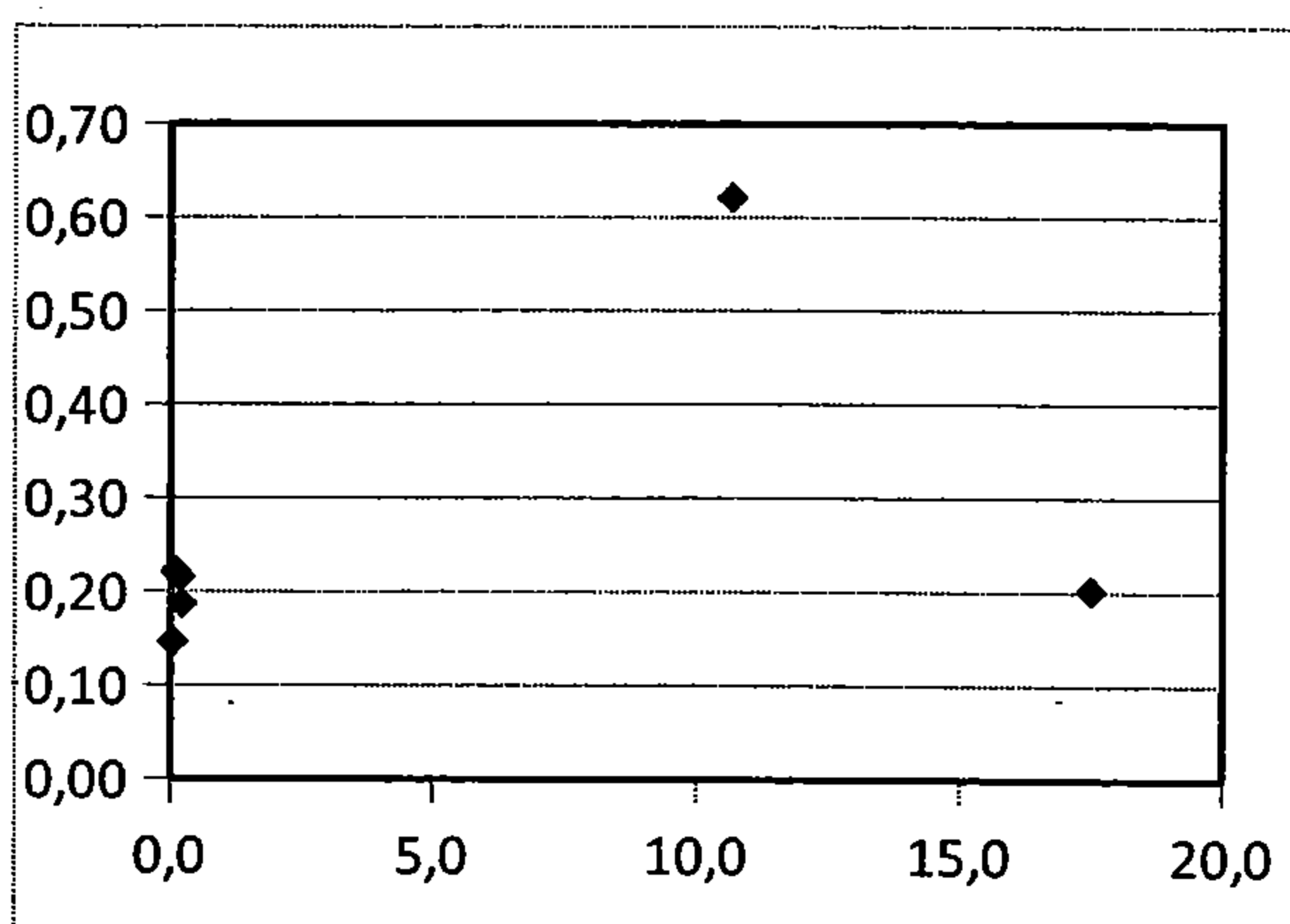
Graf 79: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,209$



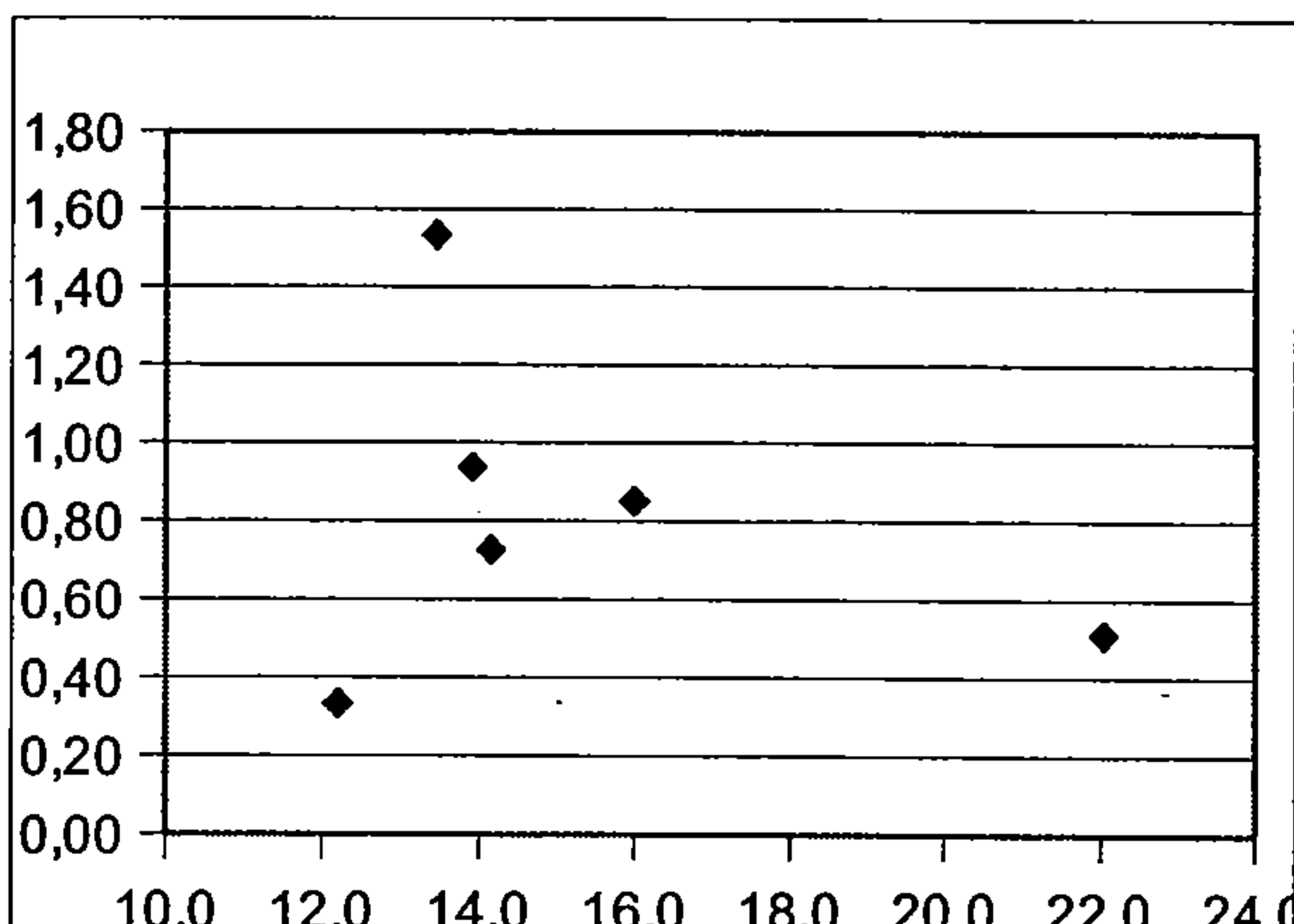
Graf 80: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,19$



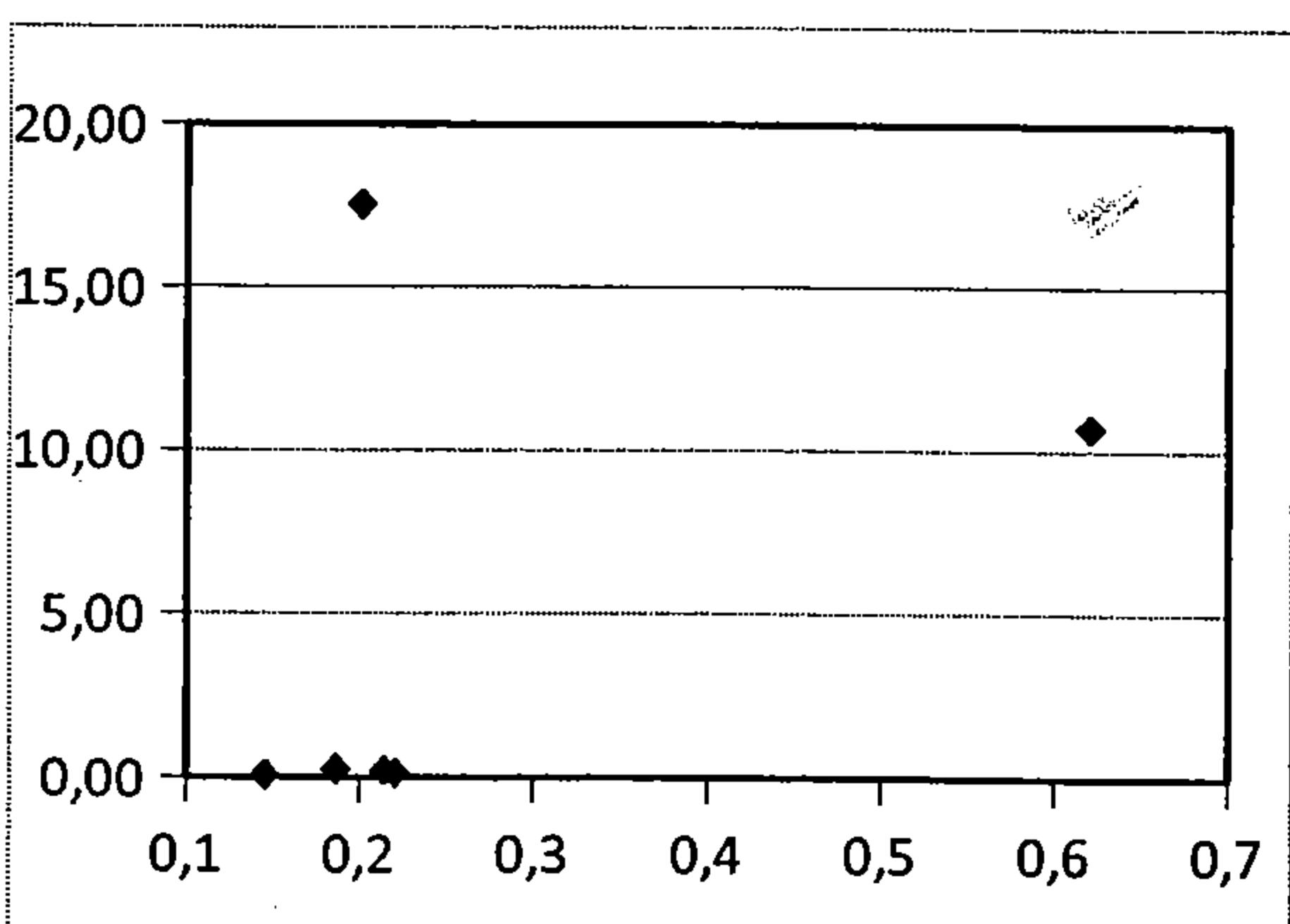
Graf 83: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,104$



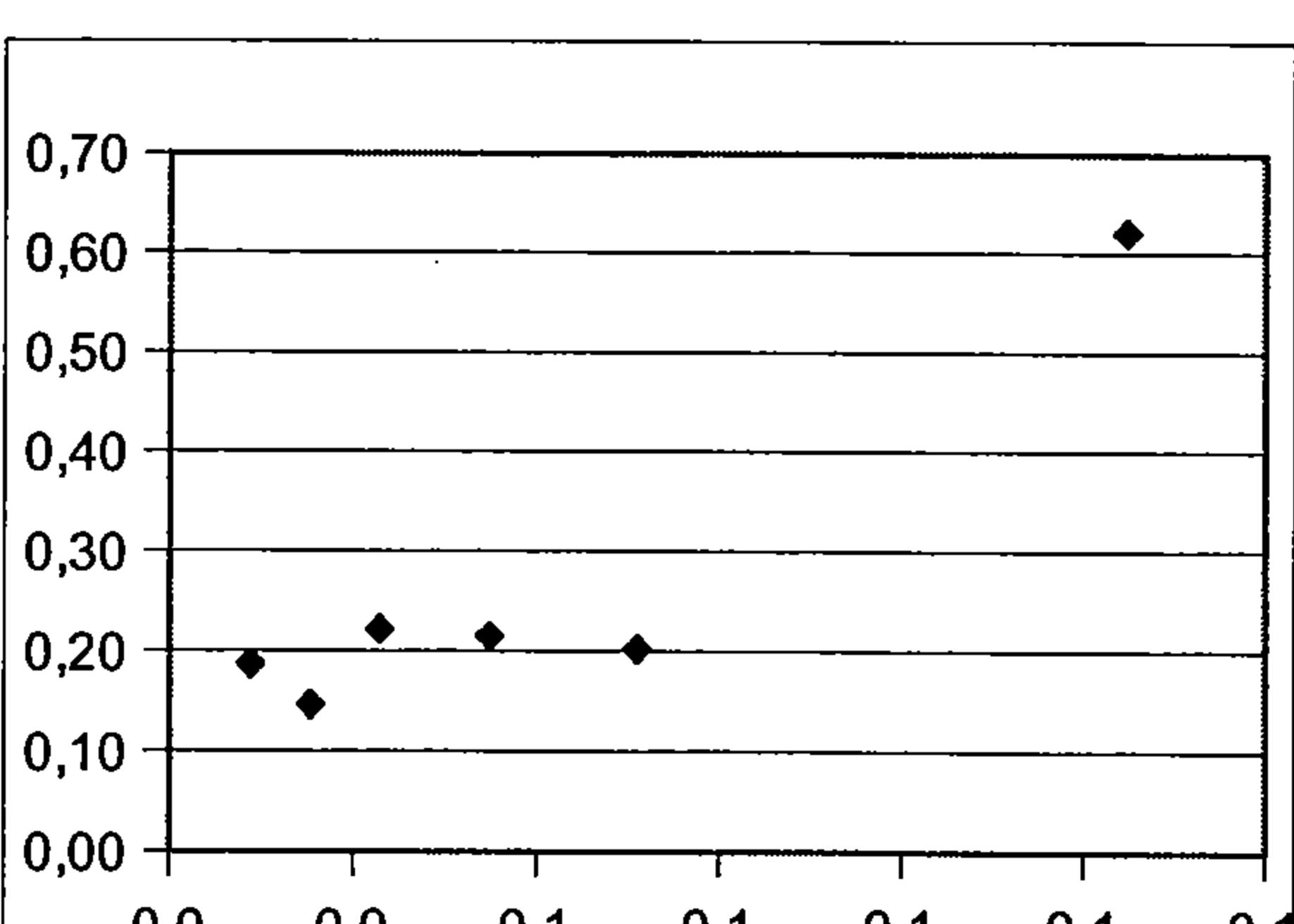
Graf 81: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,98$



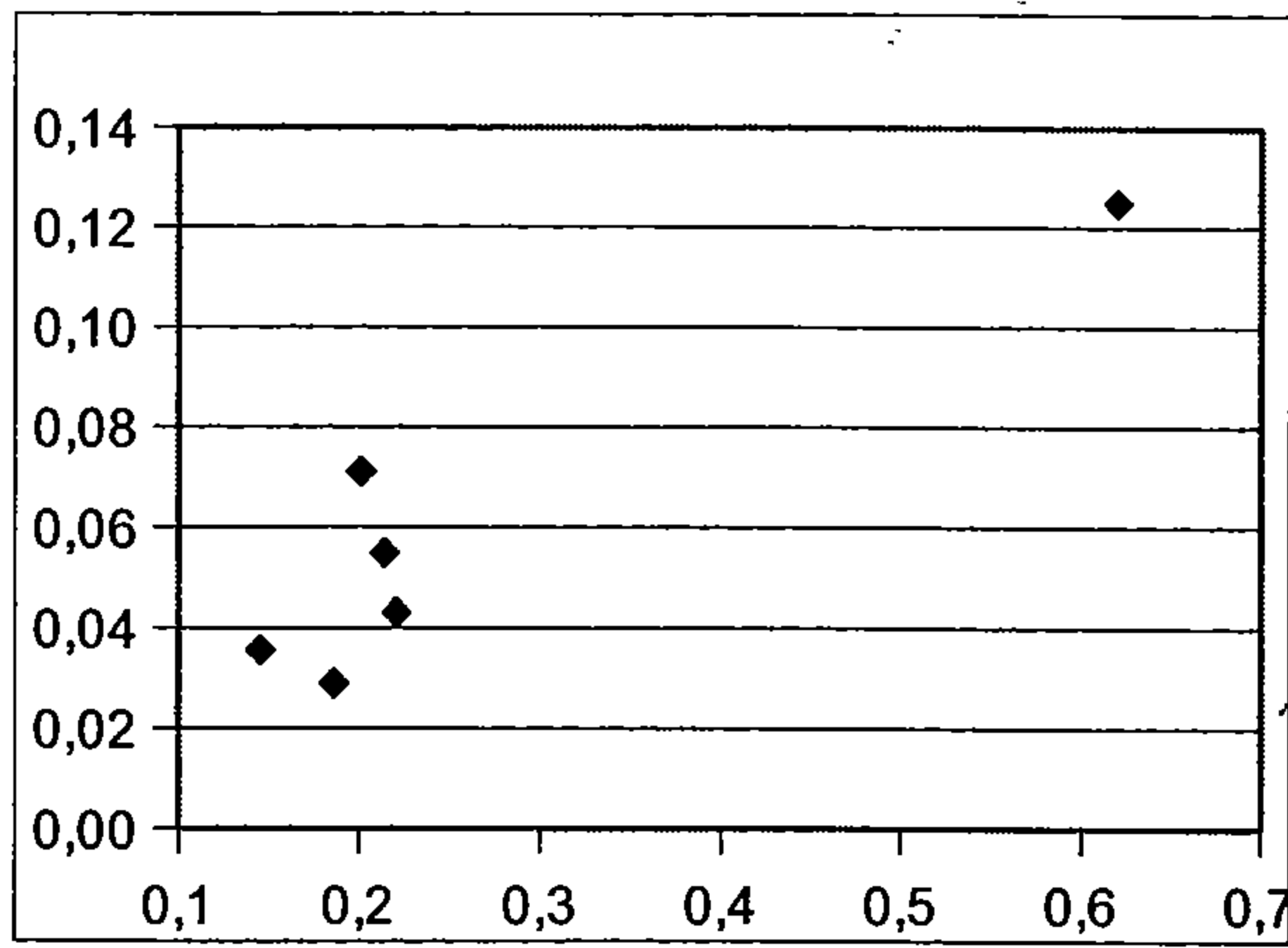
Graf 84: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,243$



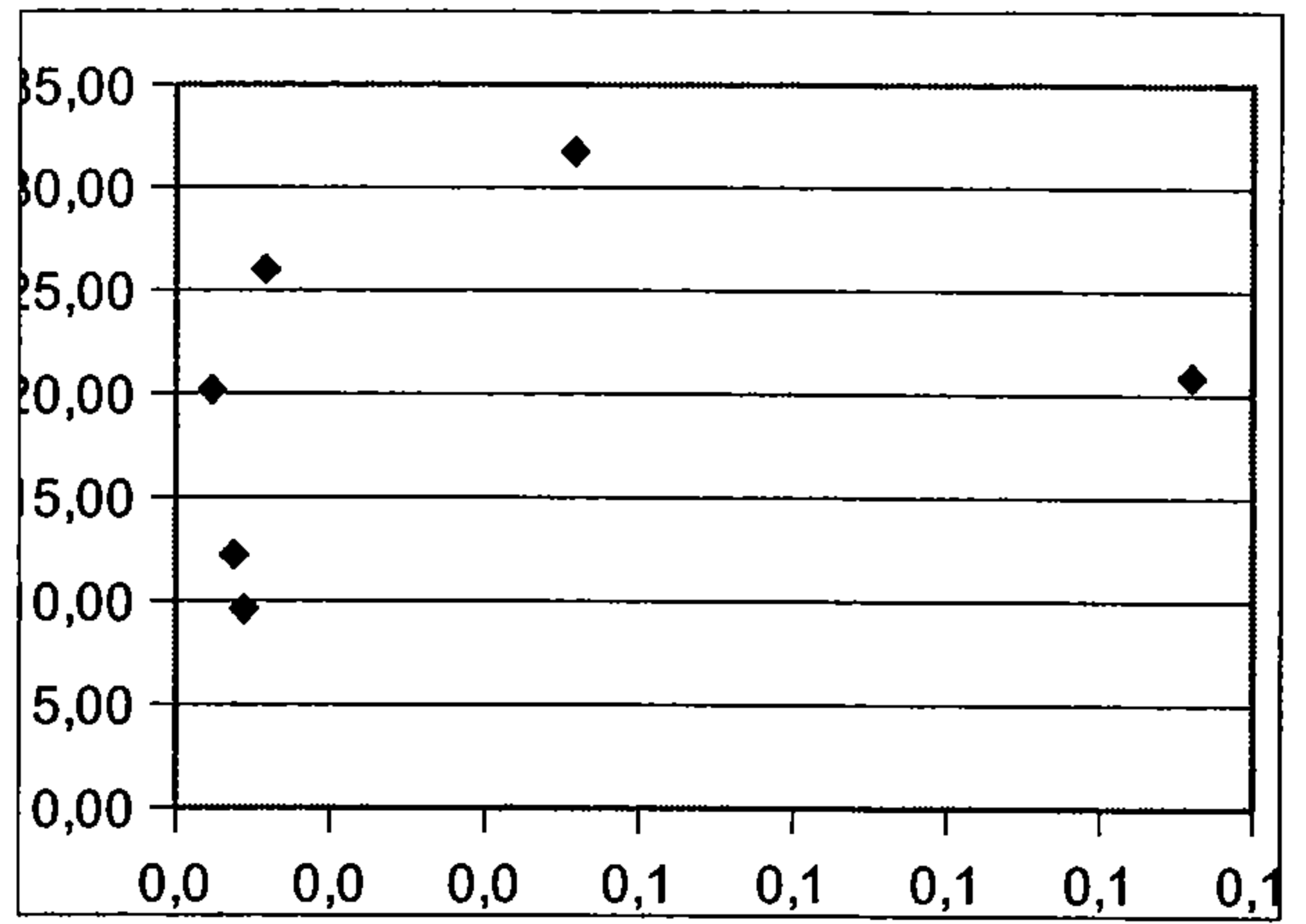
Graf 82: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,166$



Graf 85: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,969$

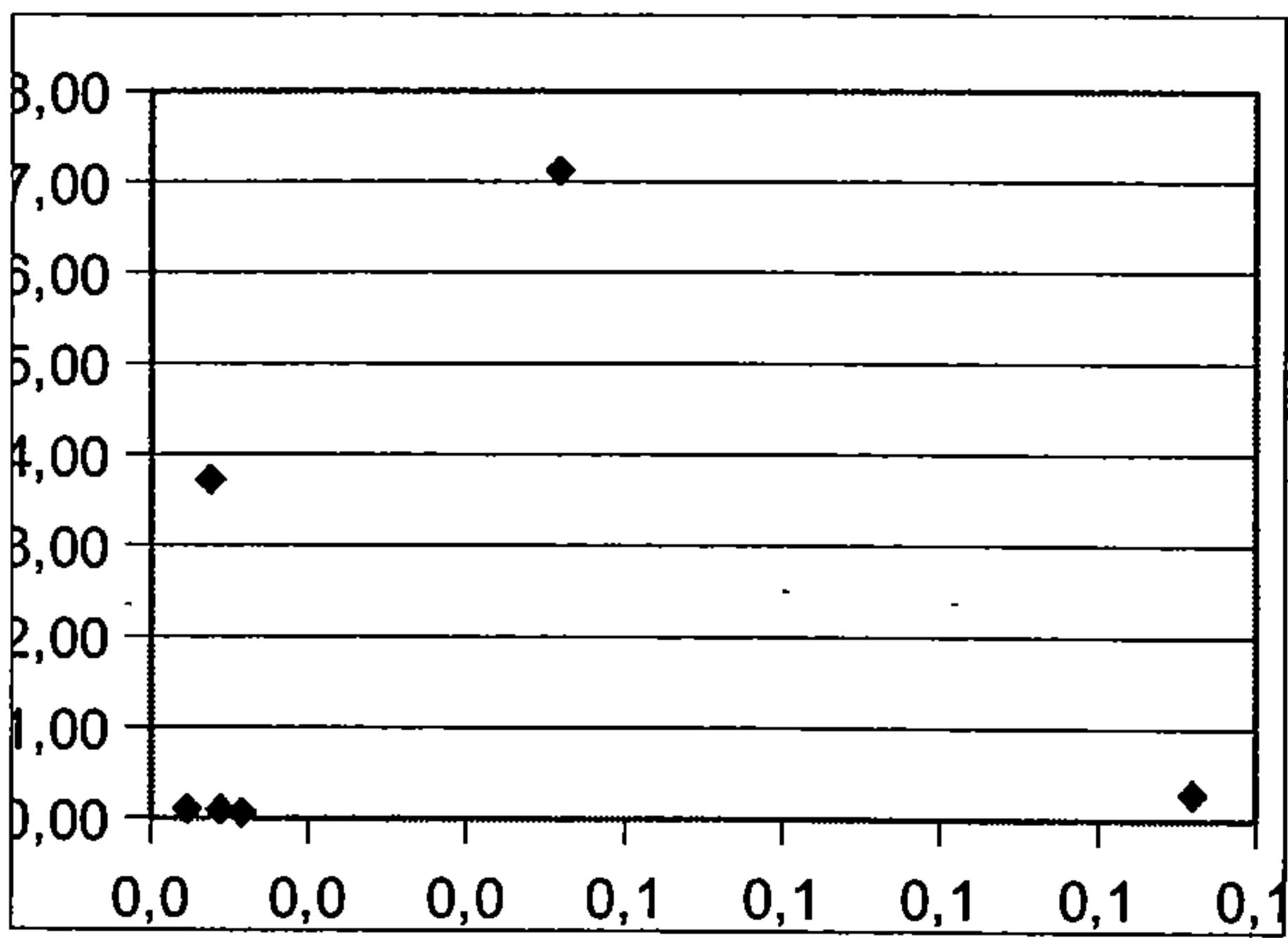


Graf 86: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,858$

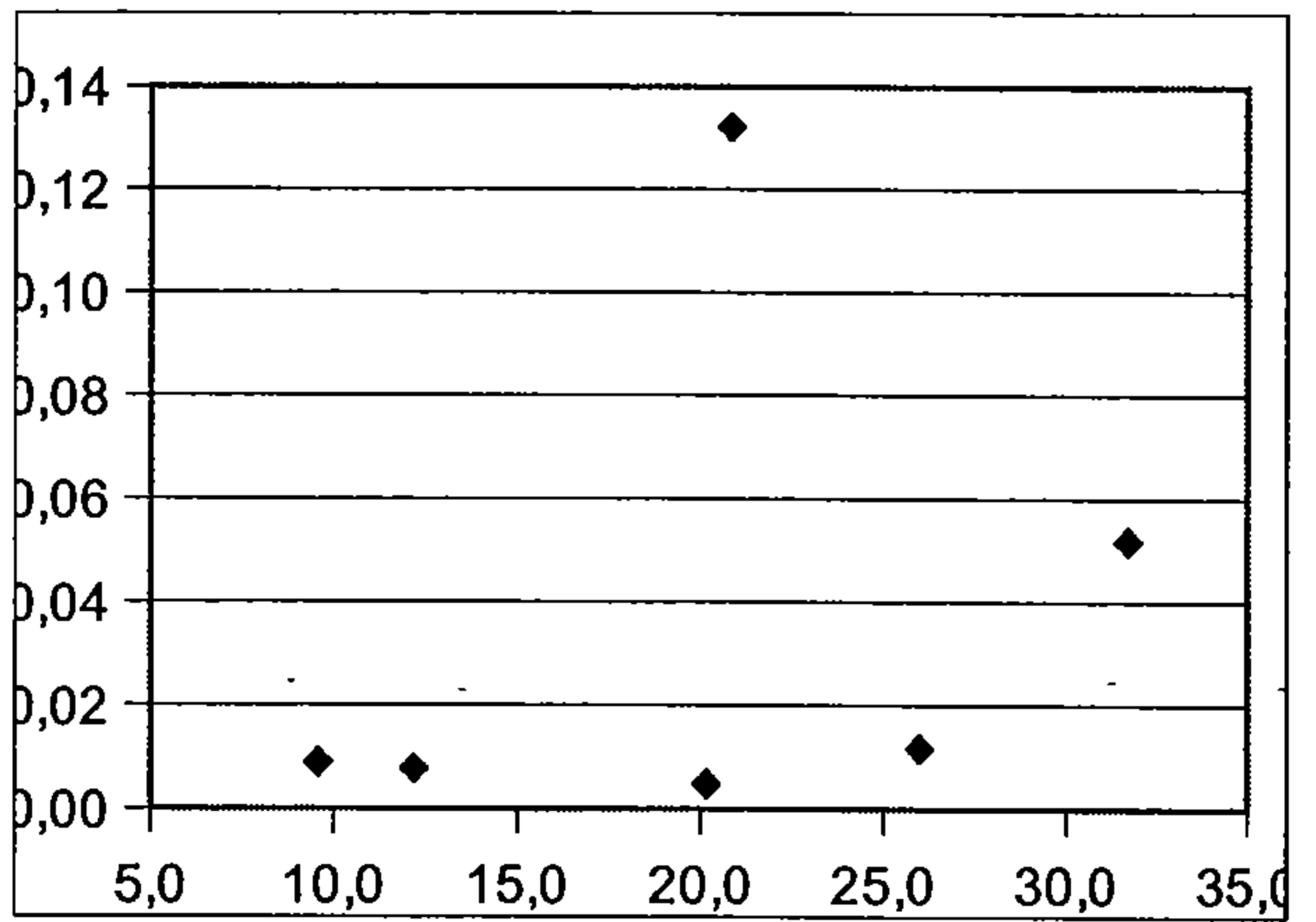


Graf 89: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,536$

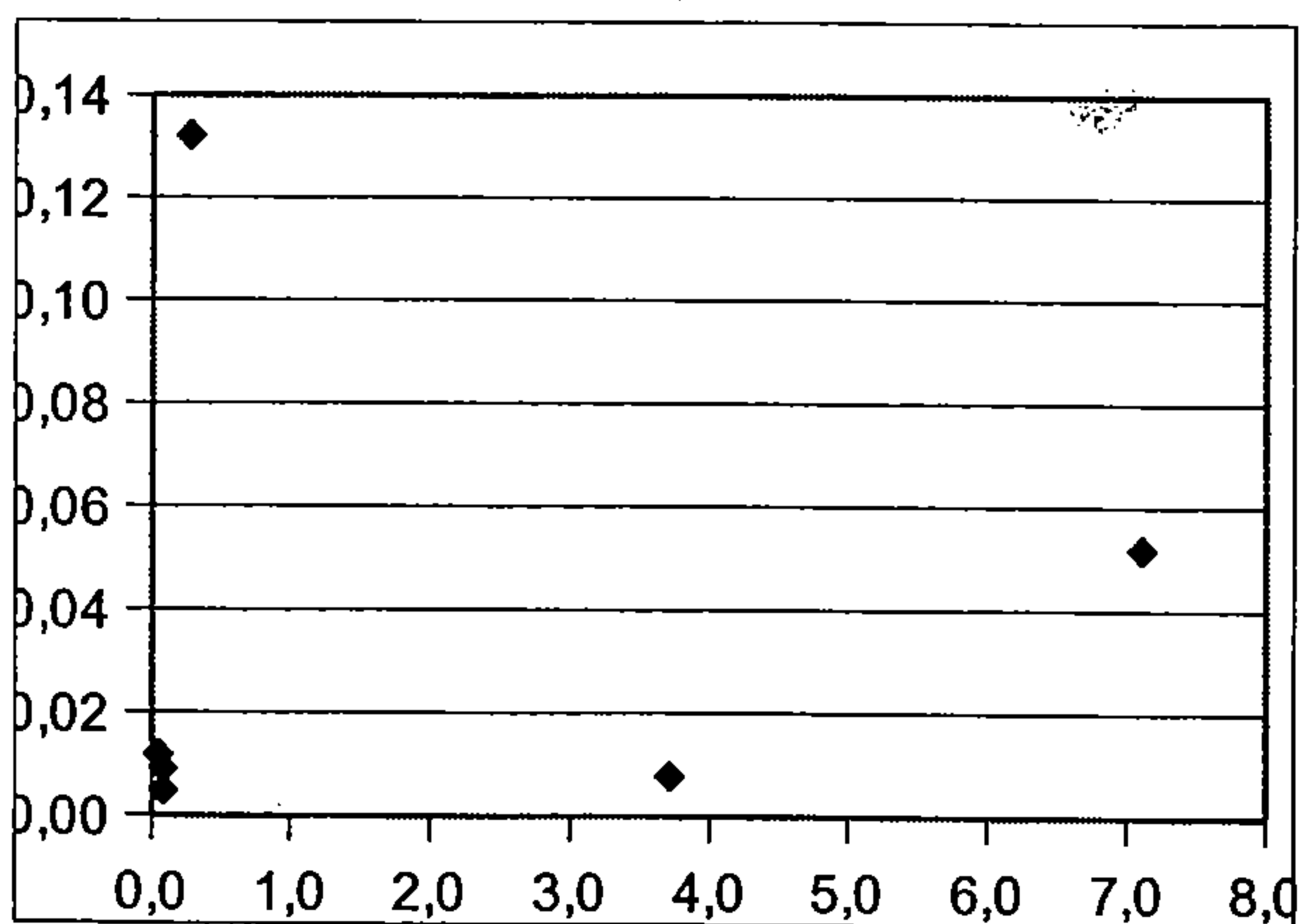
Korelace mezi prvky – frakce VI



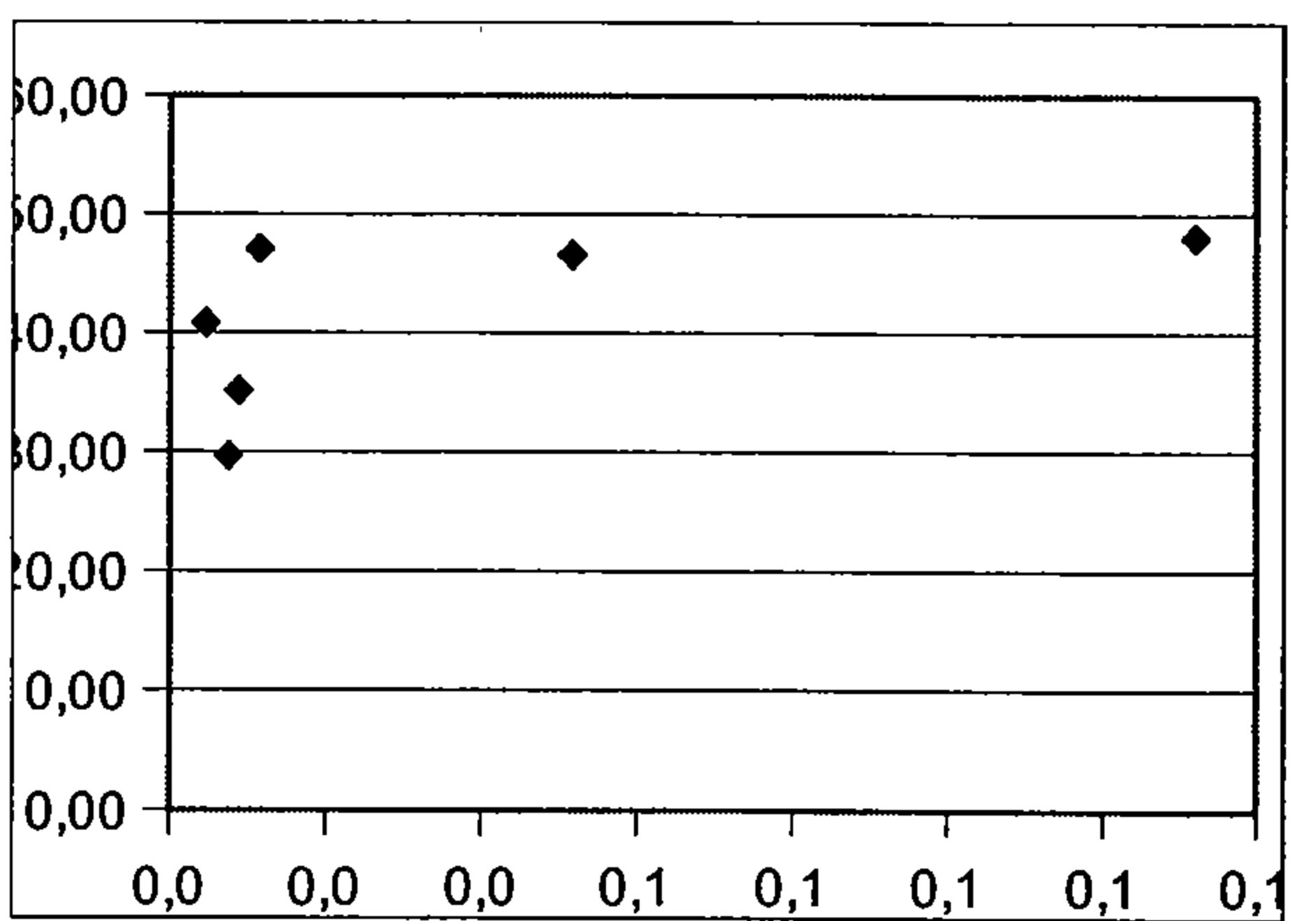
Graf 87: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,721$



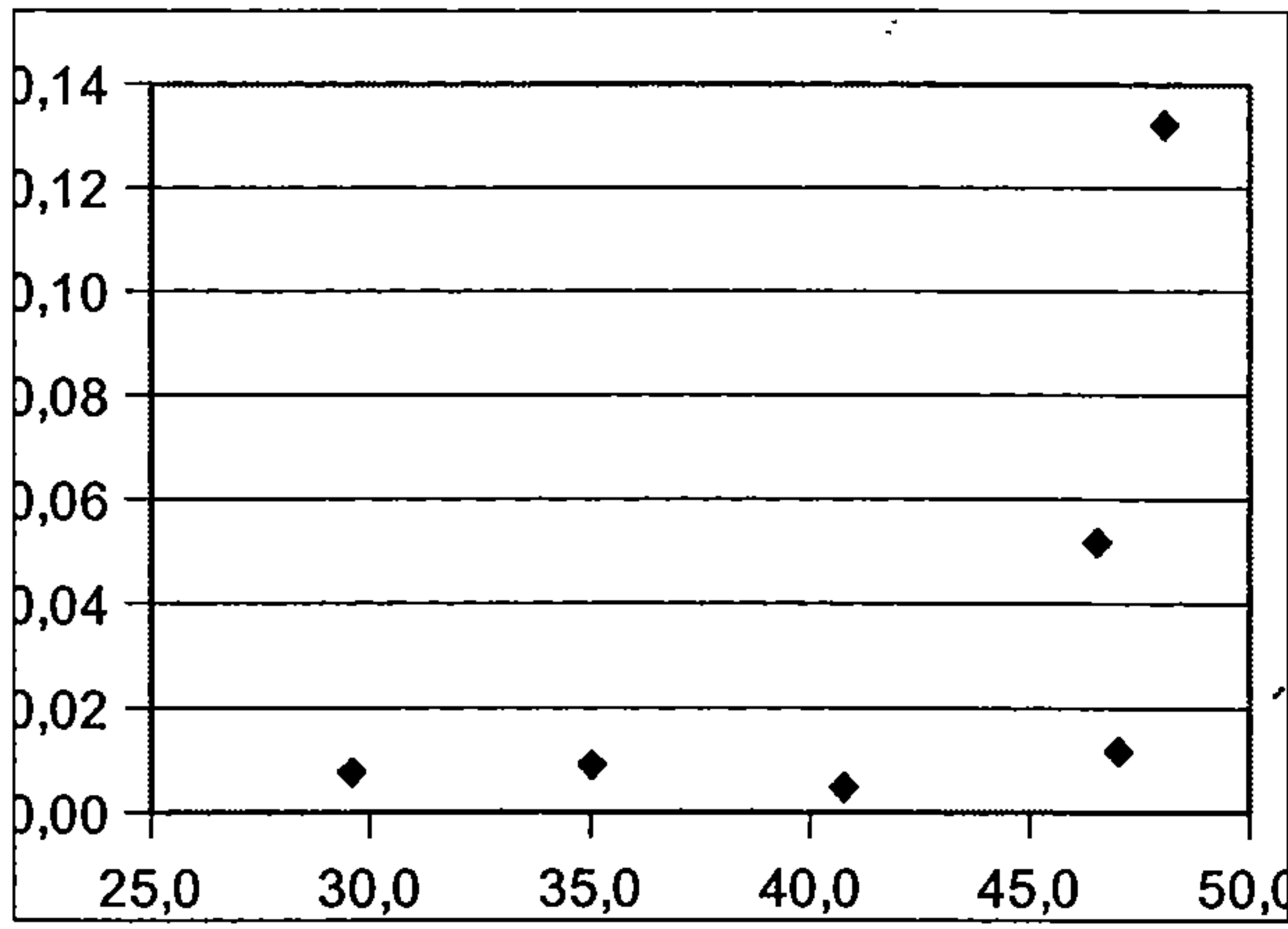
Graf 90: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,156$



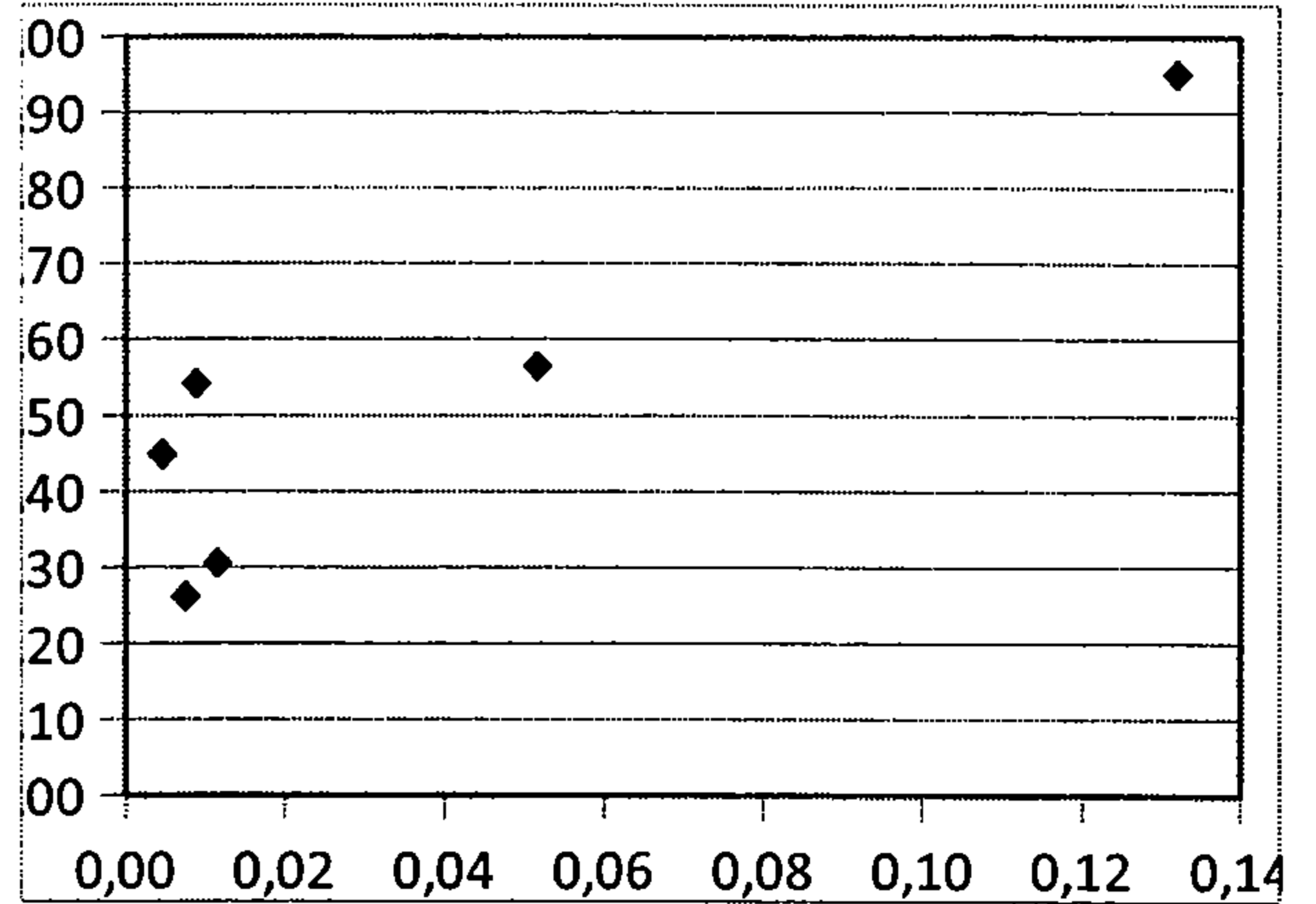
Graf 88: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,038$



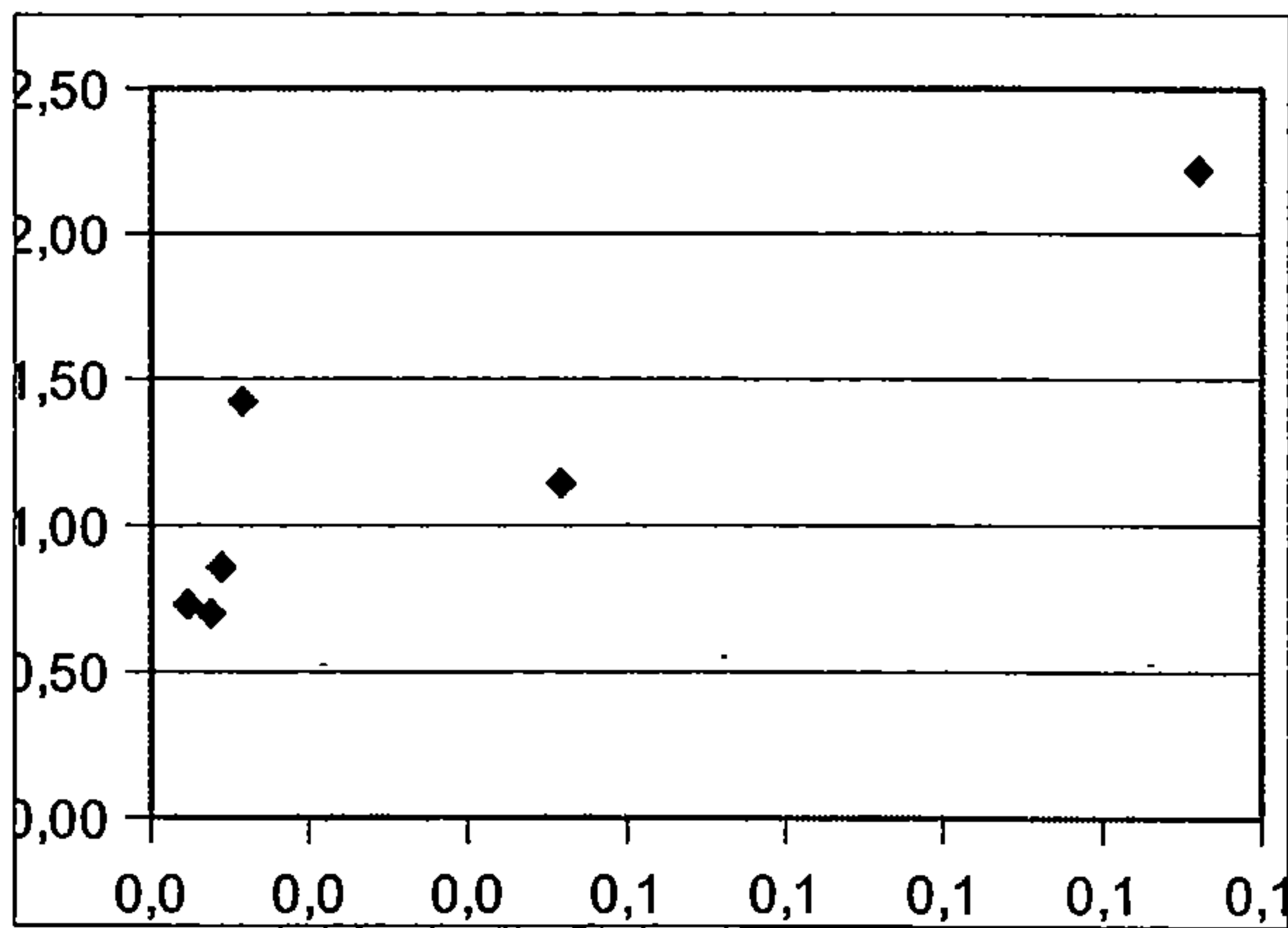
Graf 91: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,44$



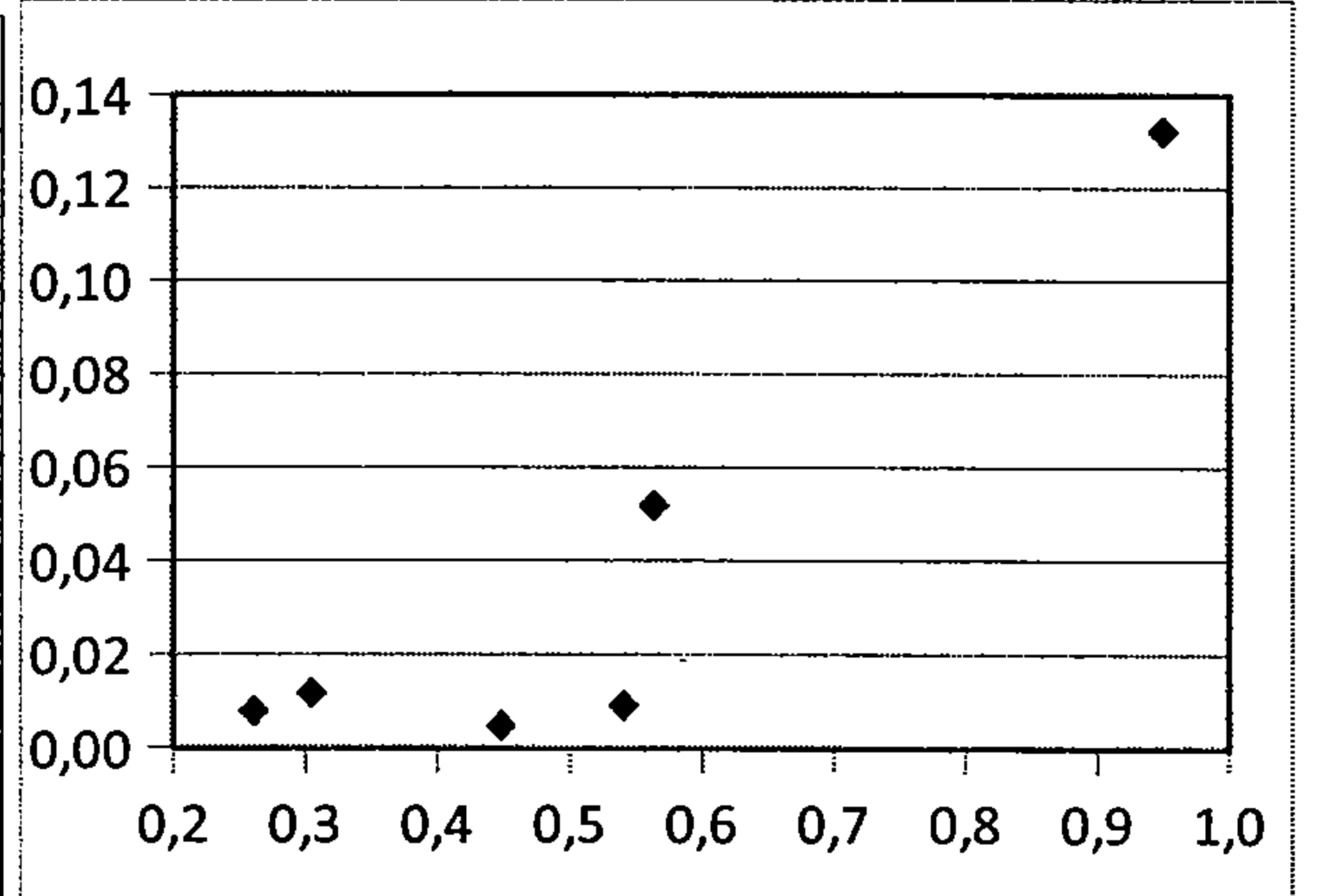
Graf 92: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,52$



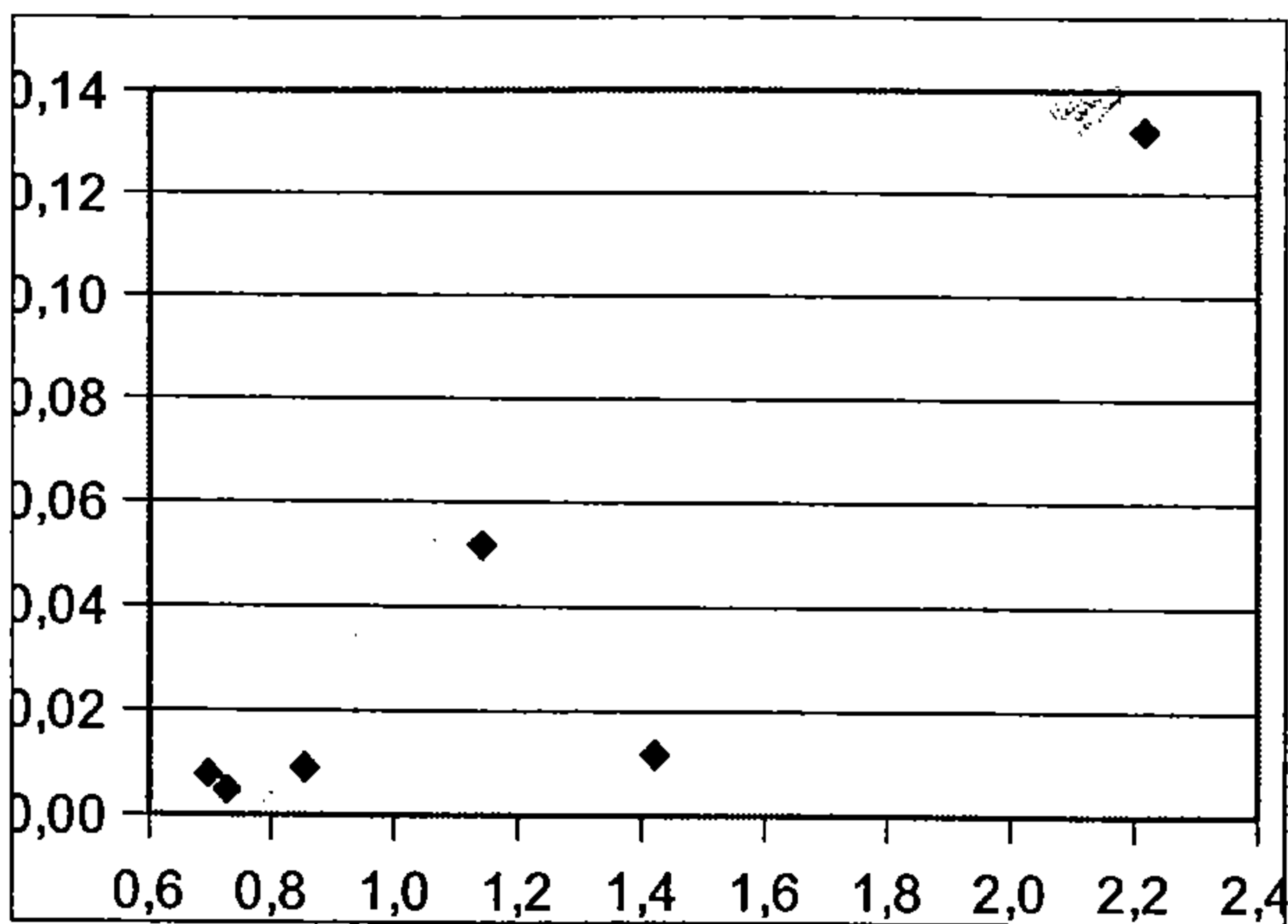
Graf 95: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,828$



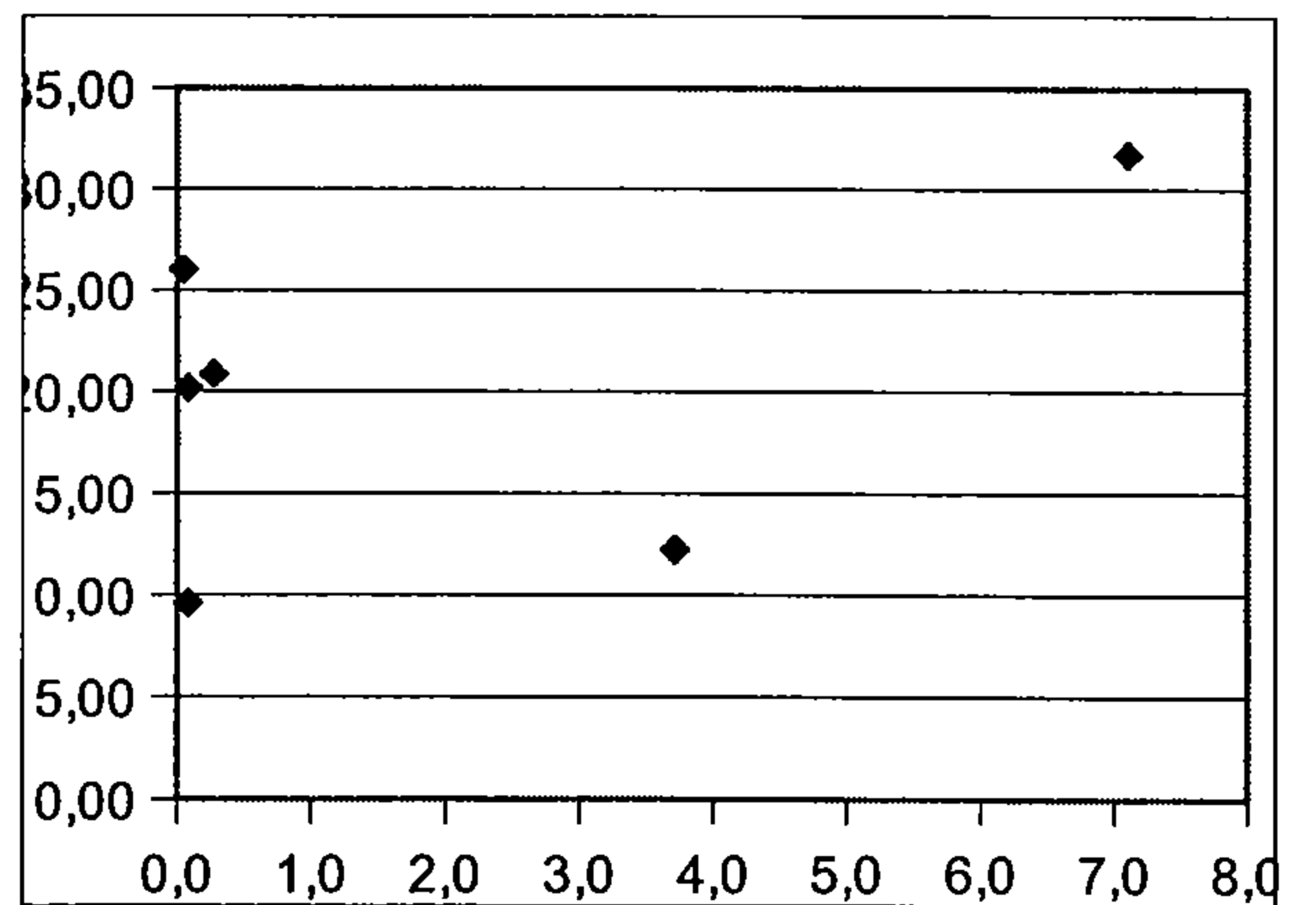
Graf 93: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R^2 = 0,807$



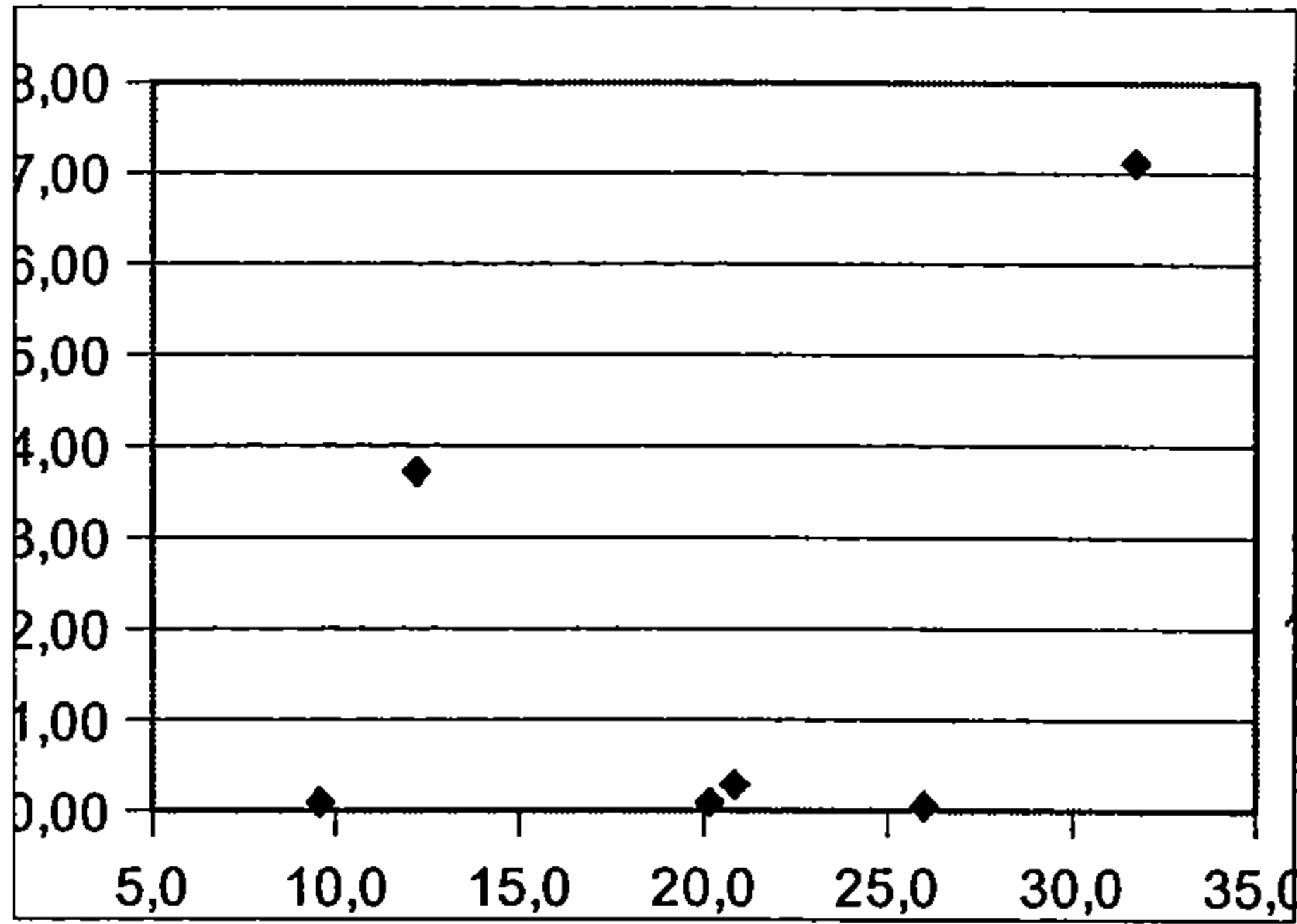
Graf 96: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,928$



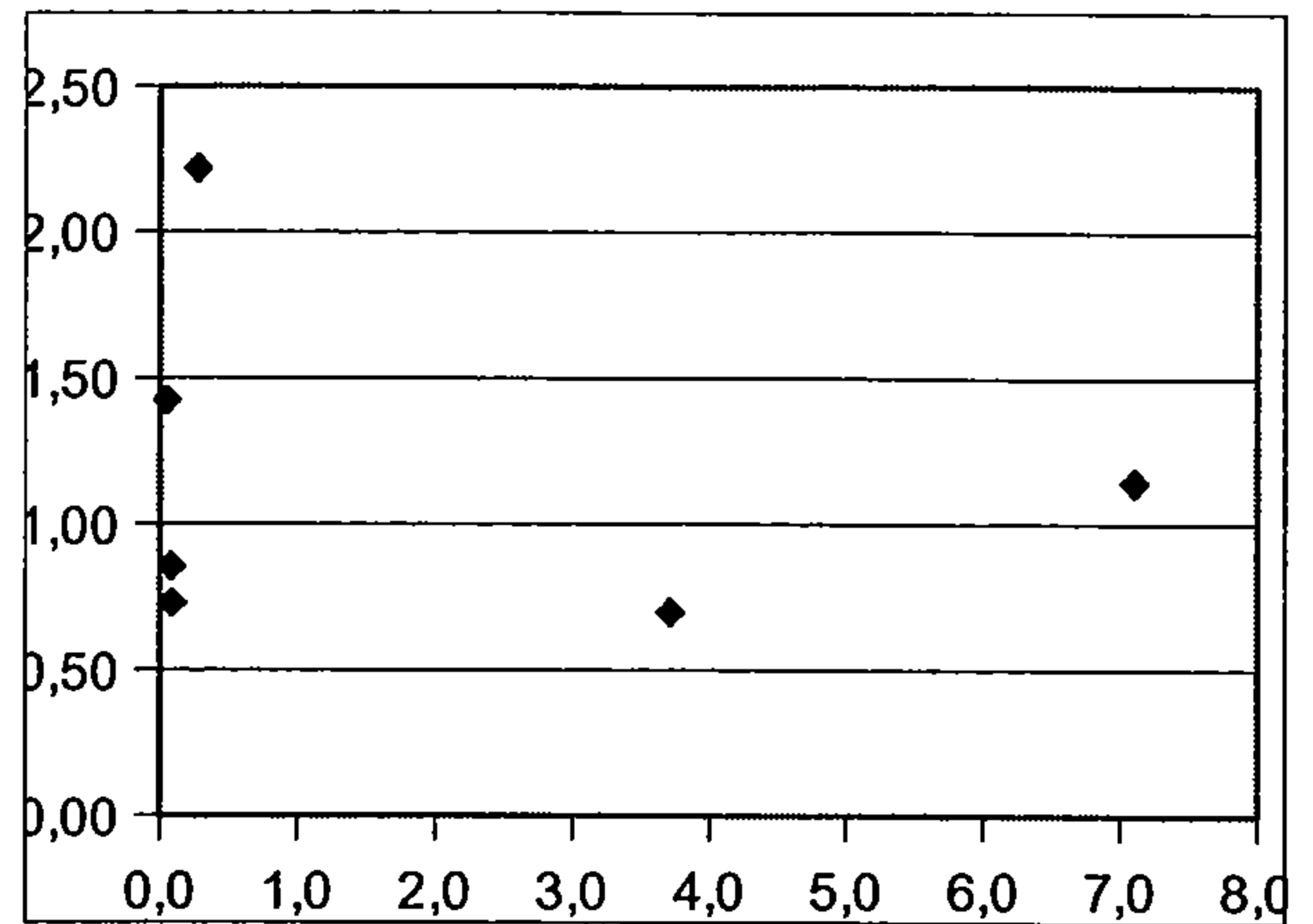
Graf 94: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,865$



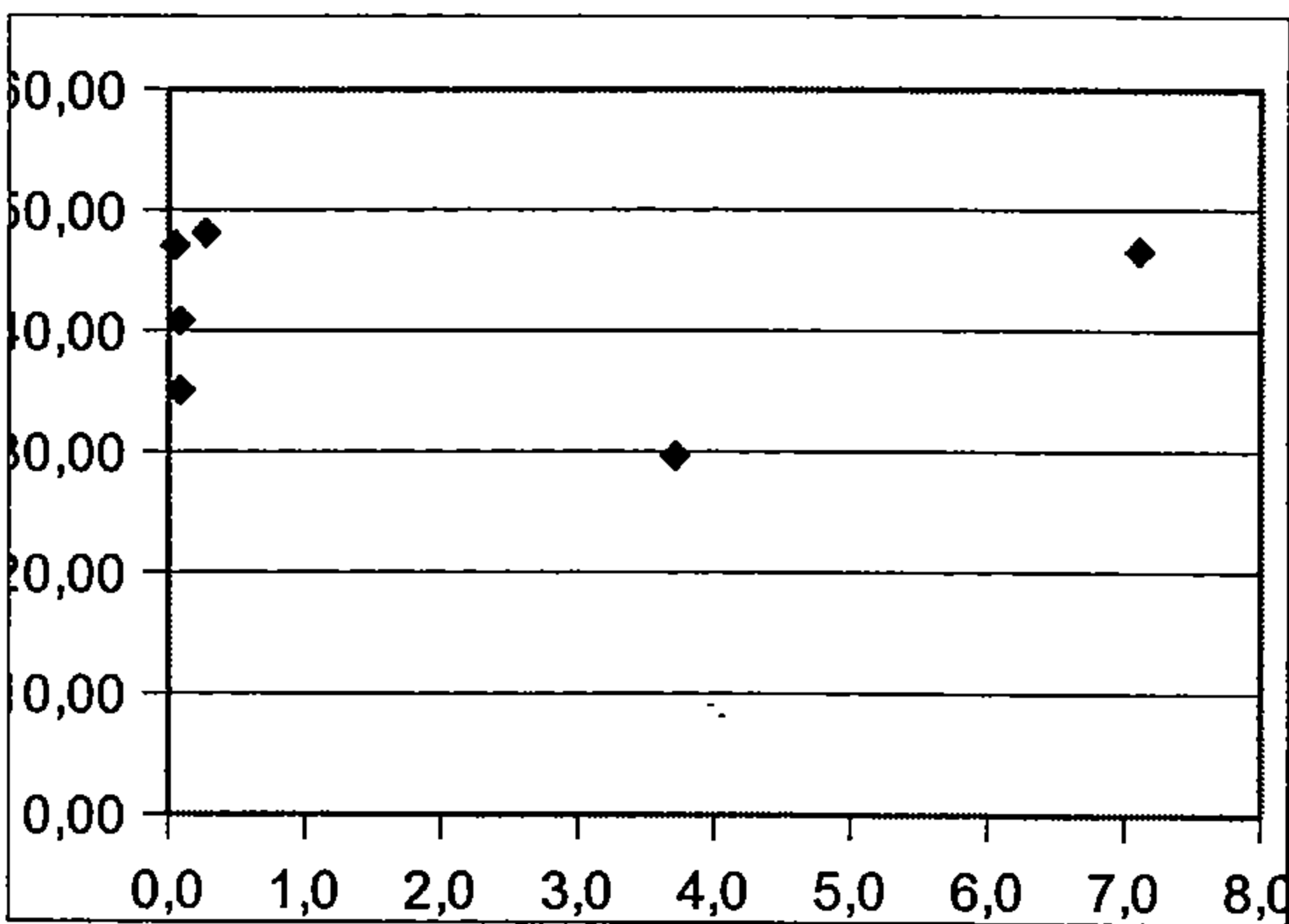
Graf 97: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,579$



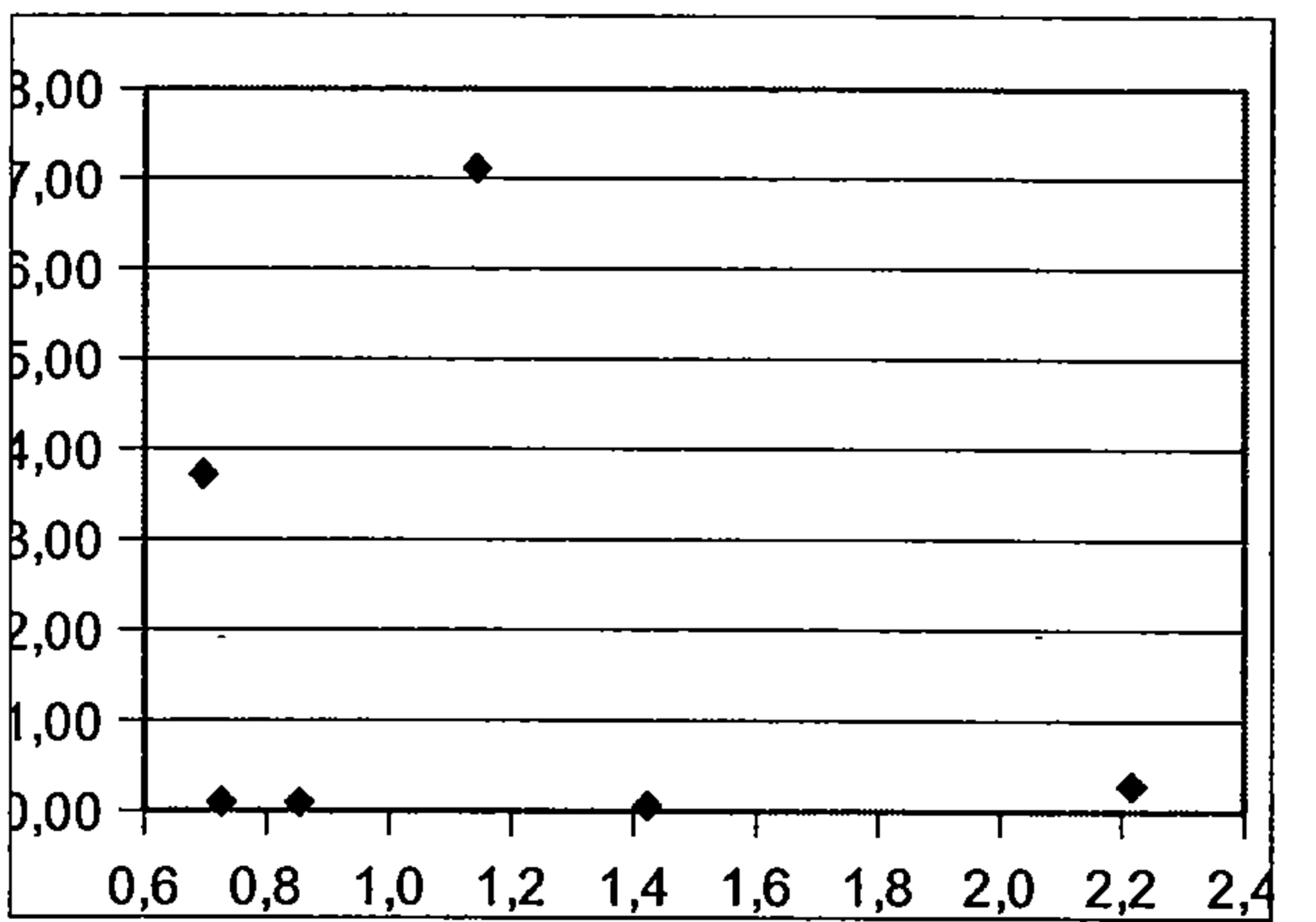
Graf 98: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,61$



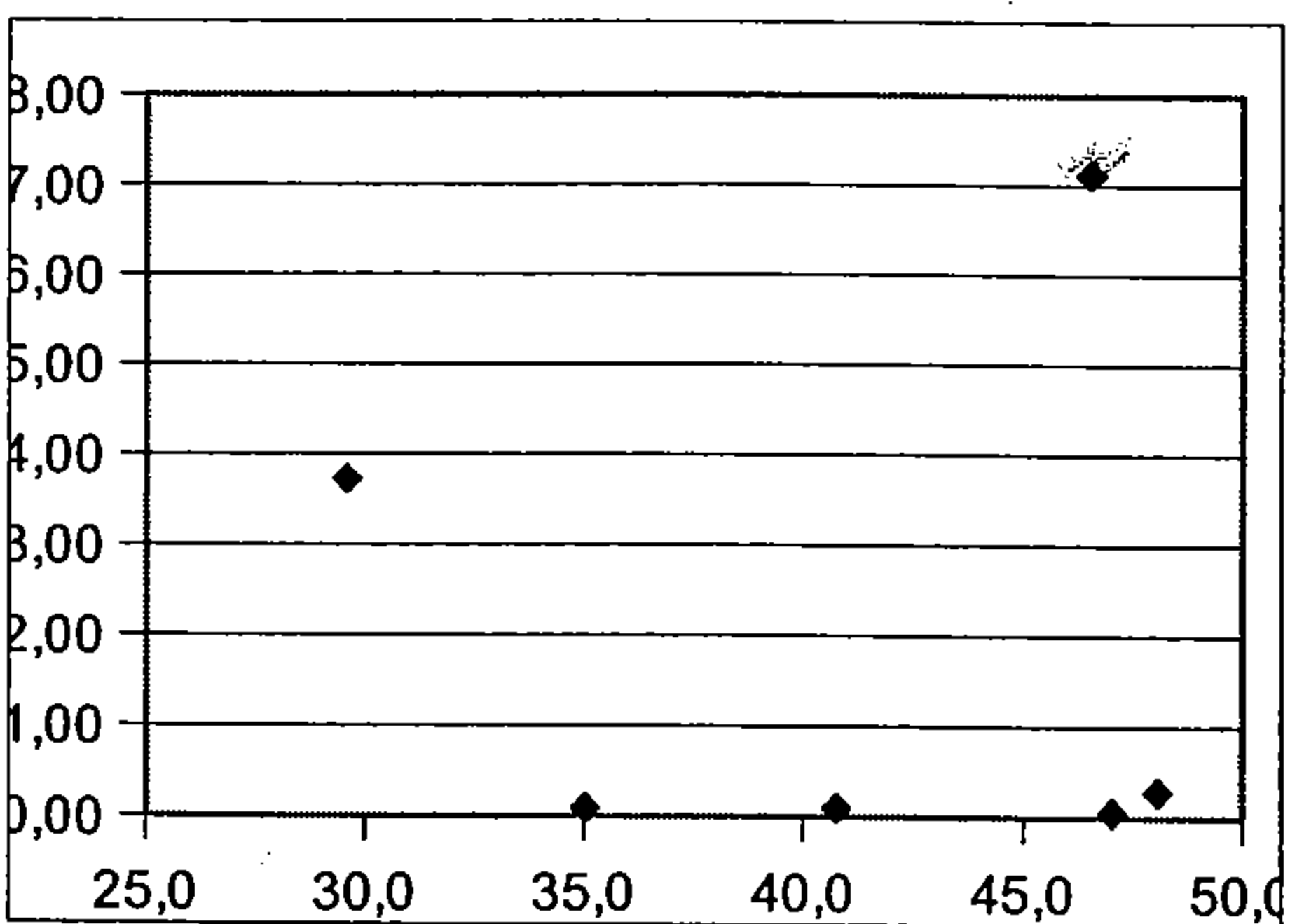
Graf 101: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,118$



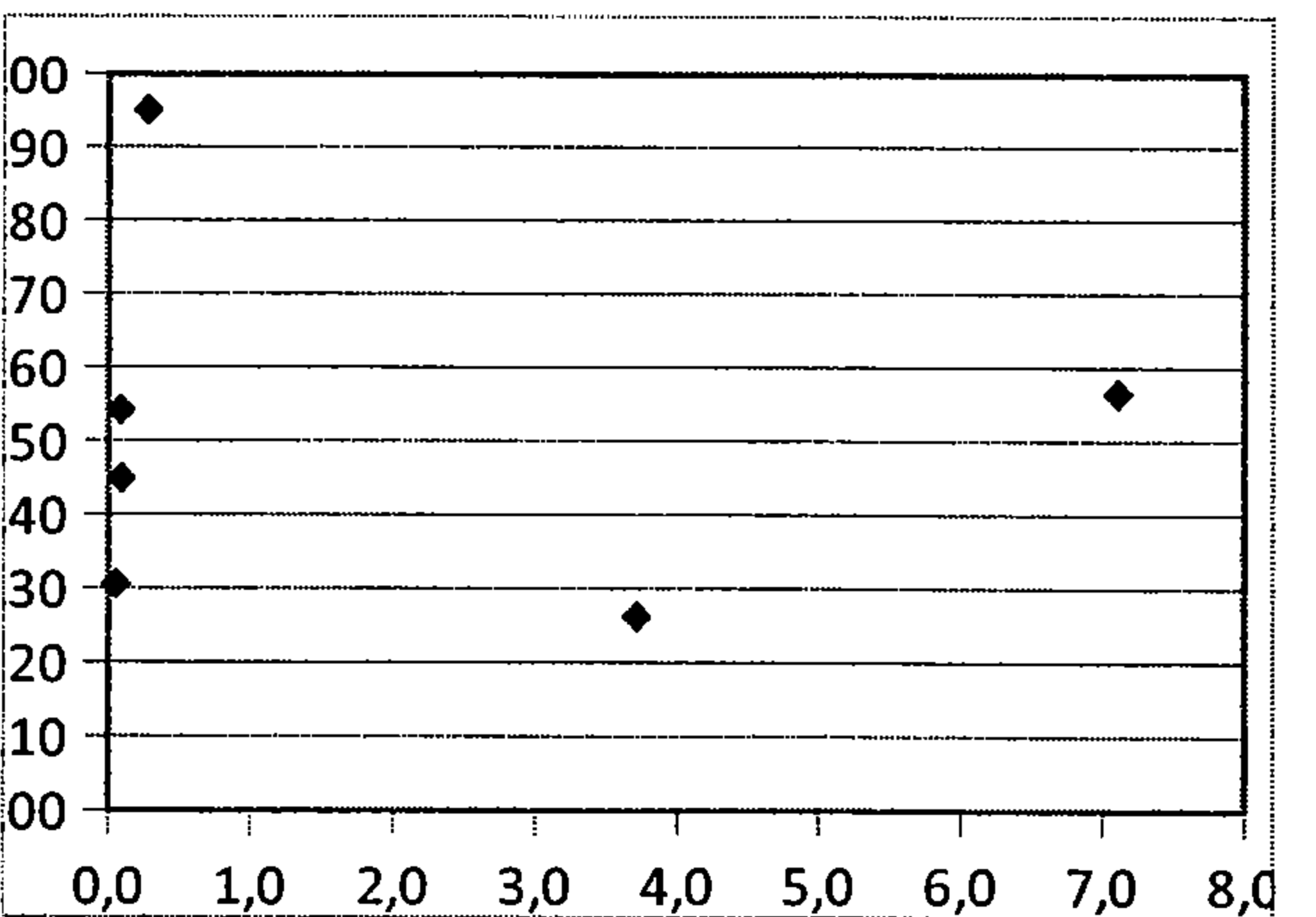
Graf 99: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,556$



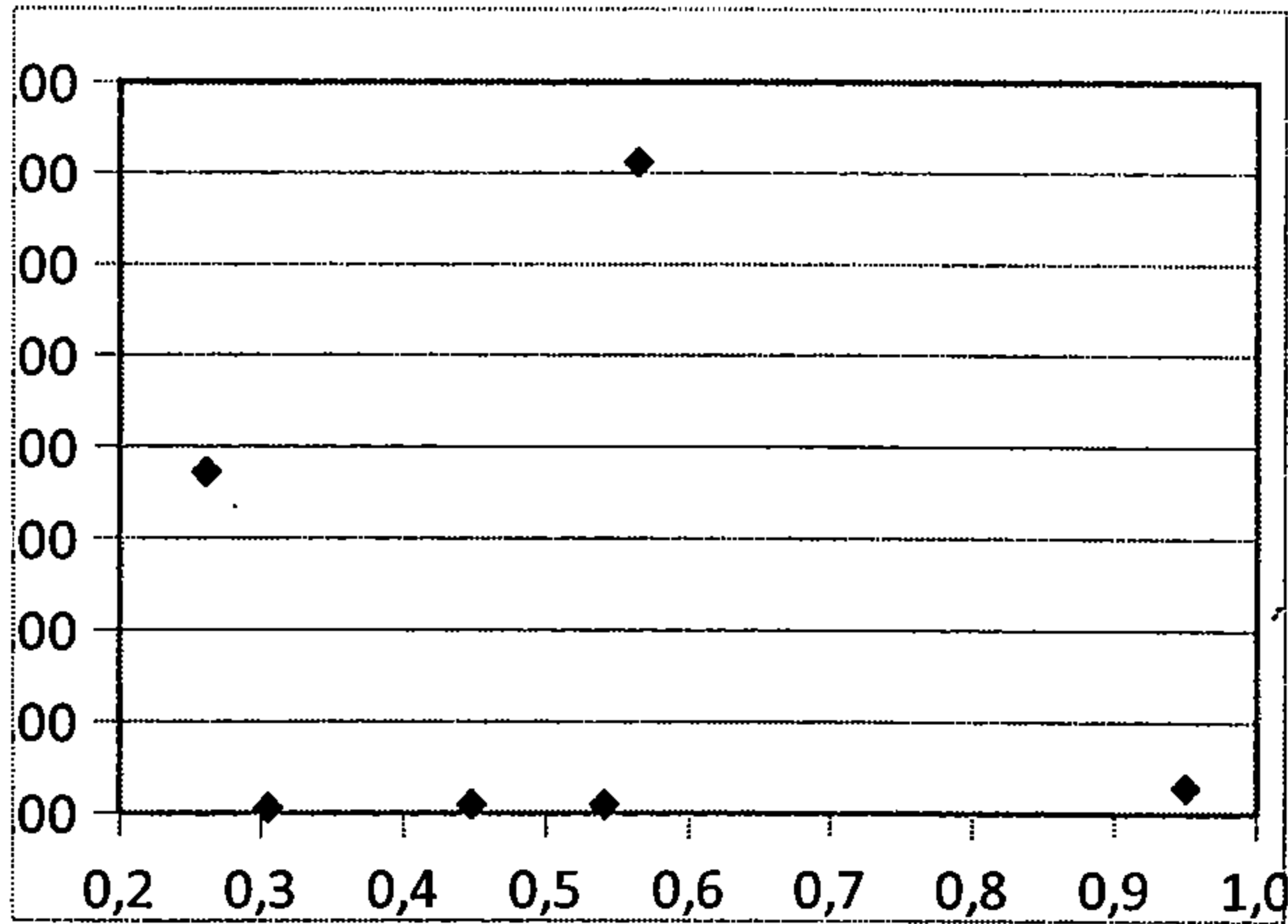
Graf 102: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,118$



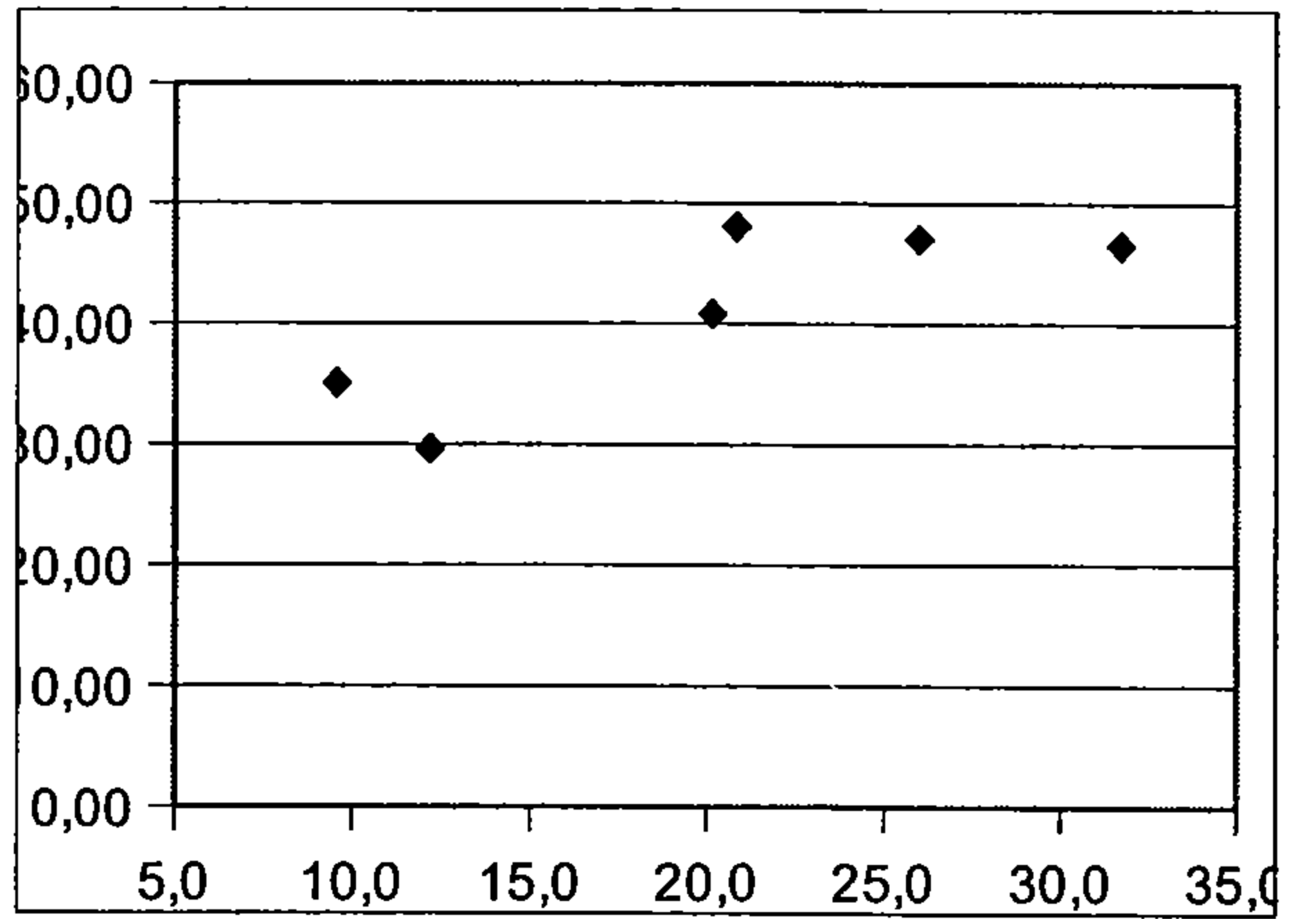
Graf 100: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,118$



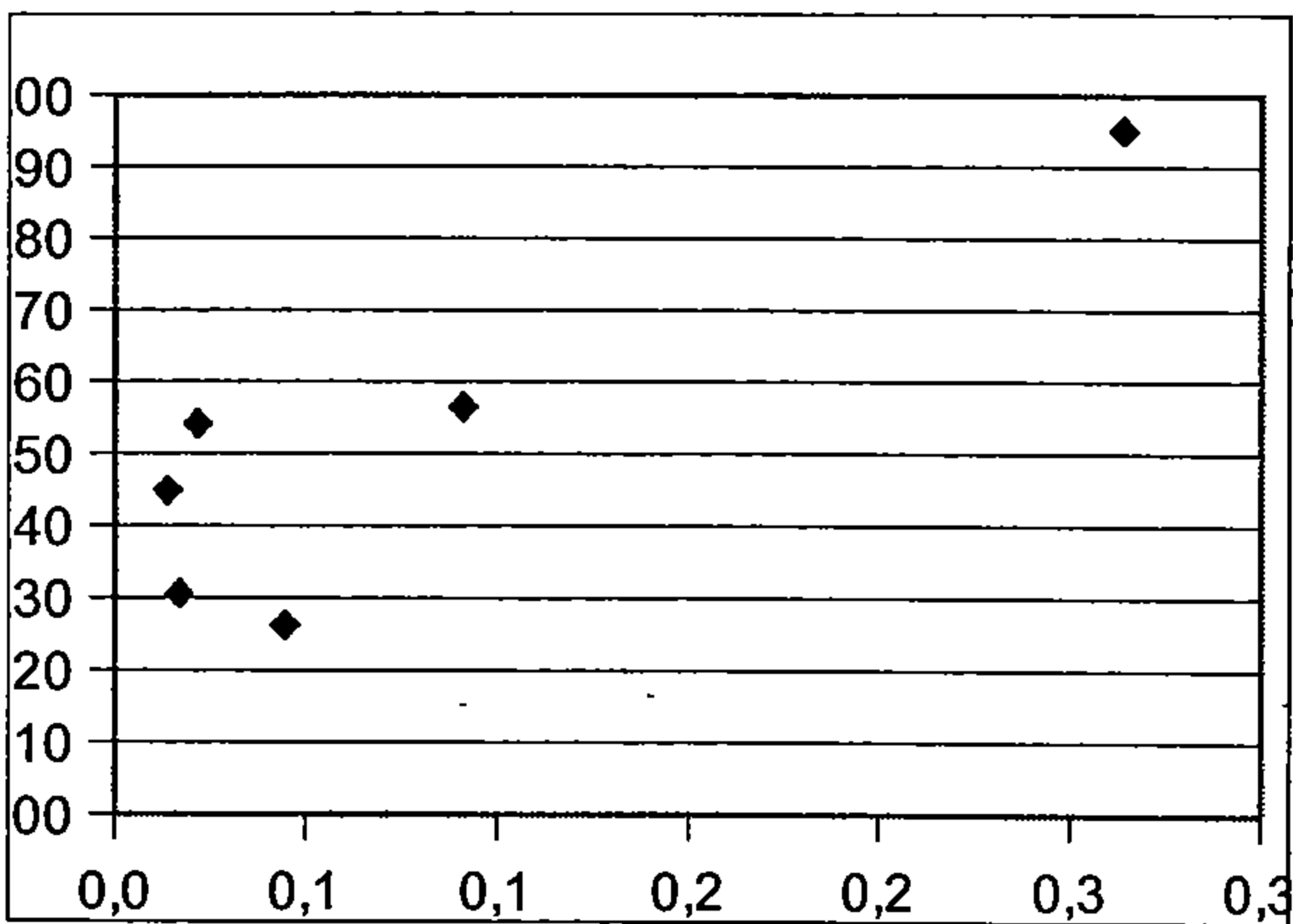
Graf 103: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,16$



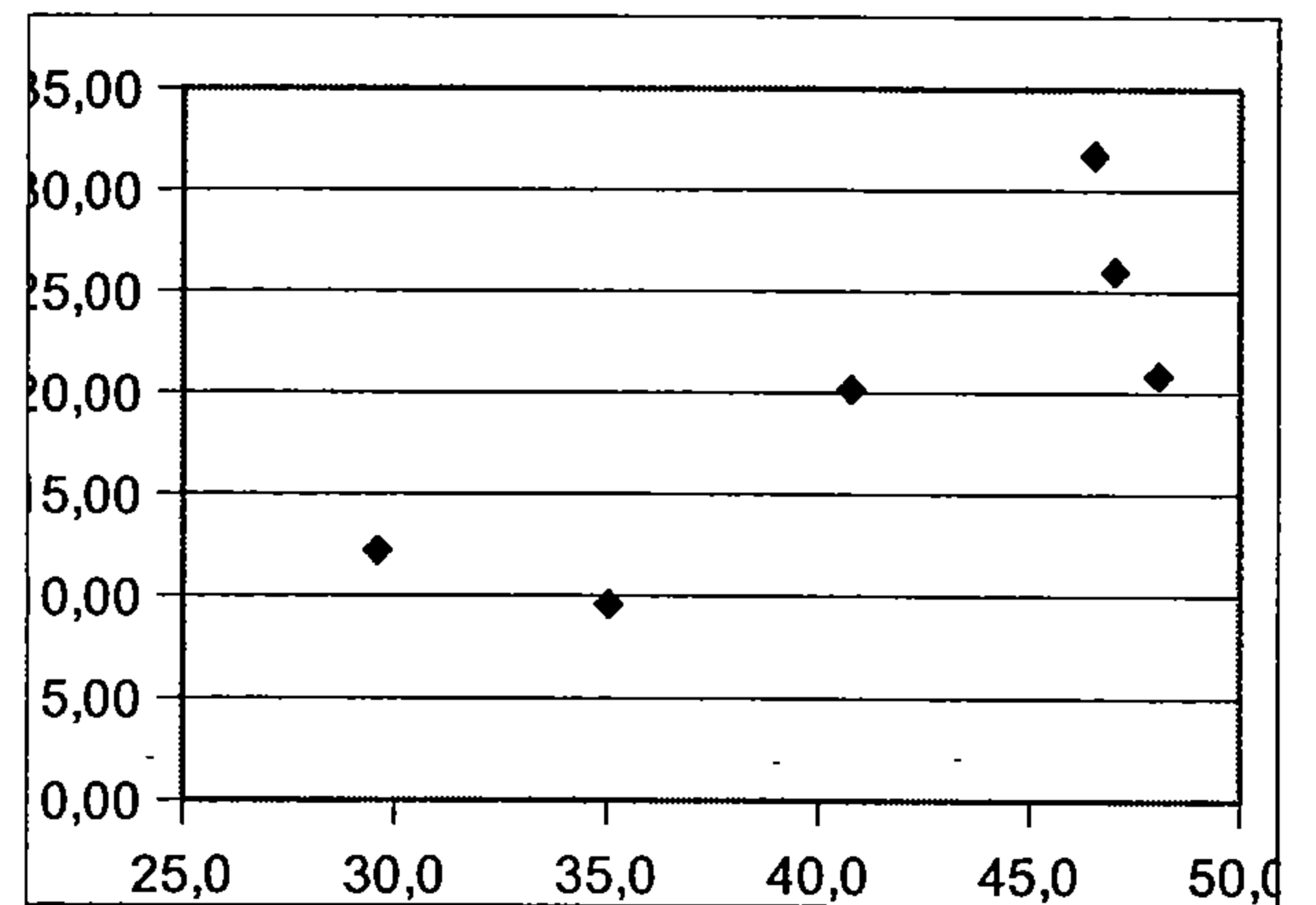
Graf 104: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,063$



Graf 107: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,756$

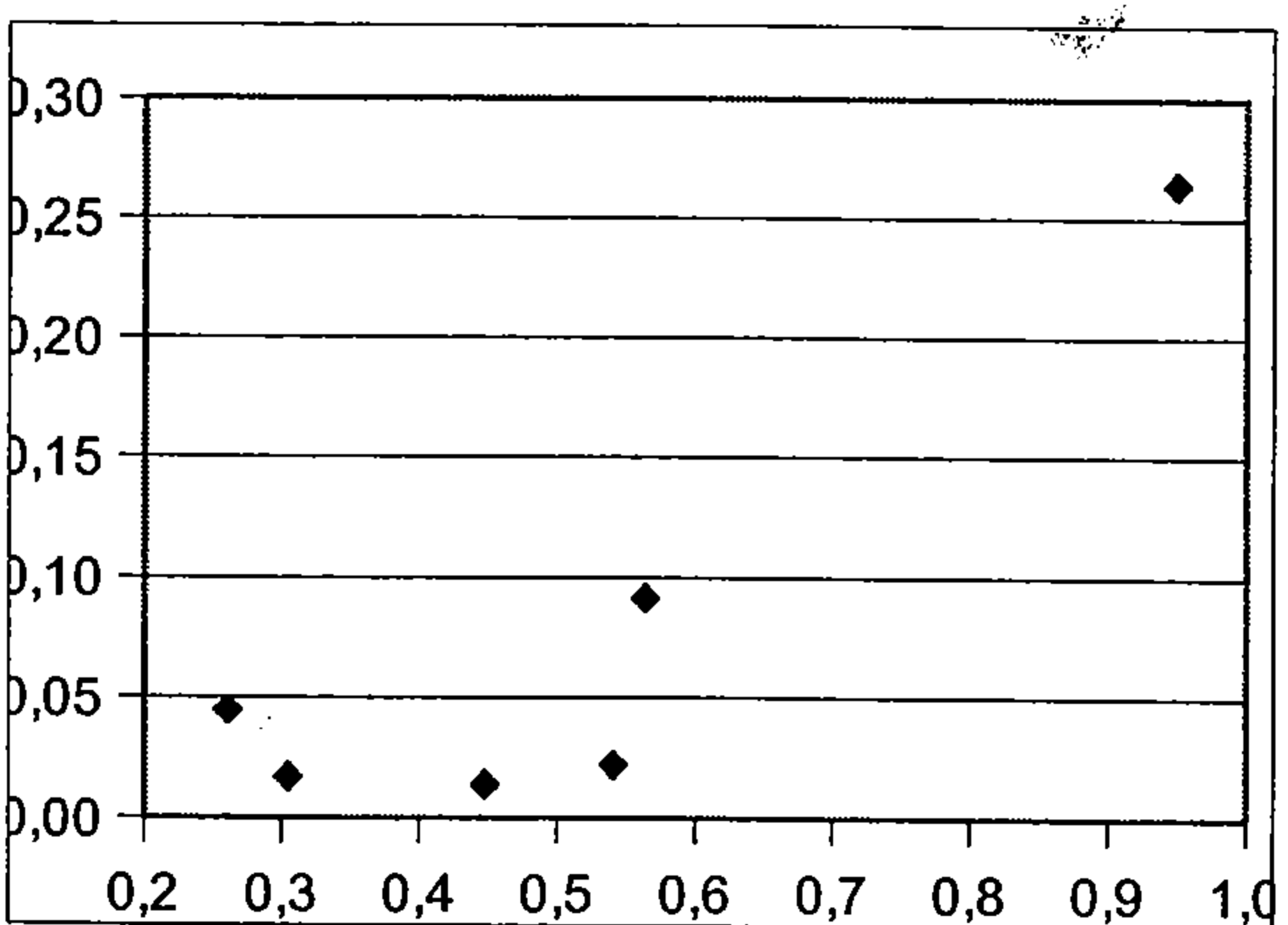


Graf 105: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,793$

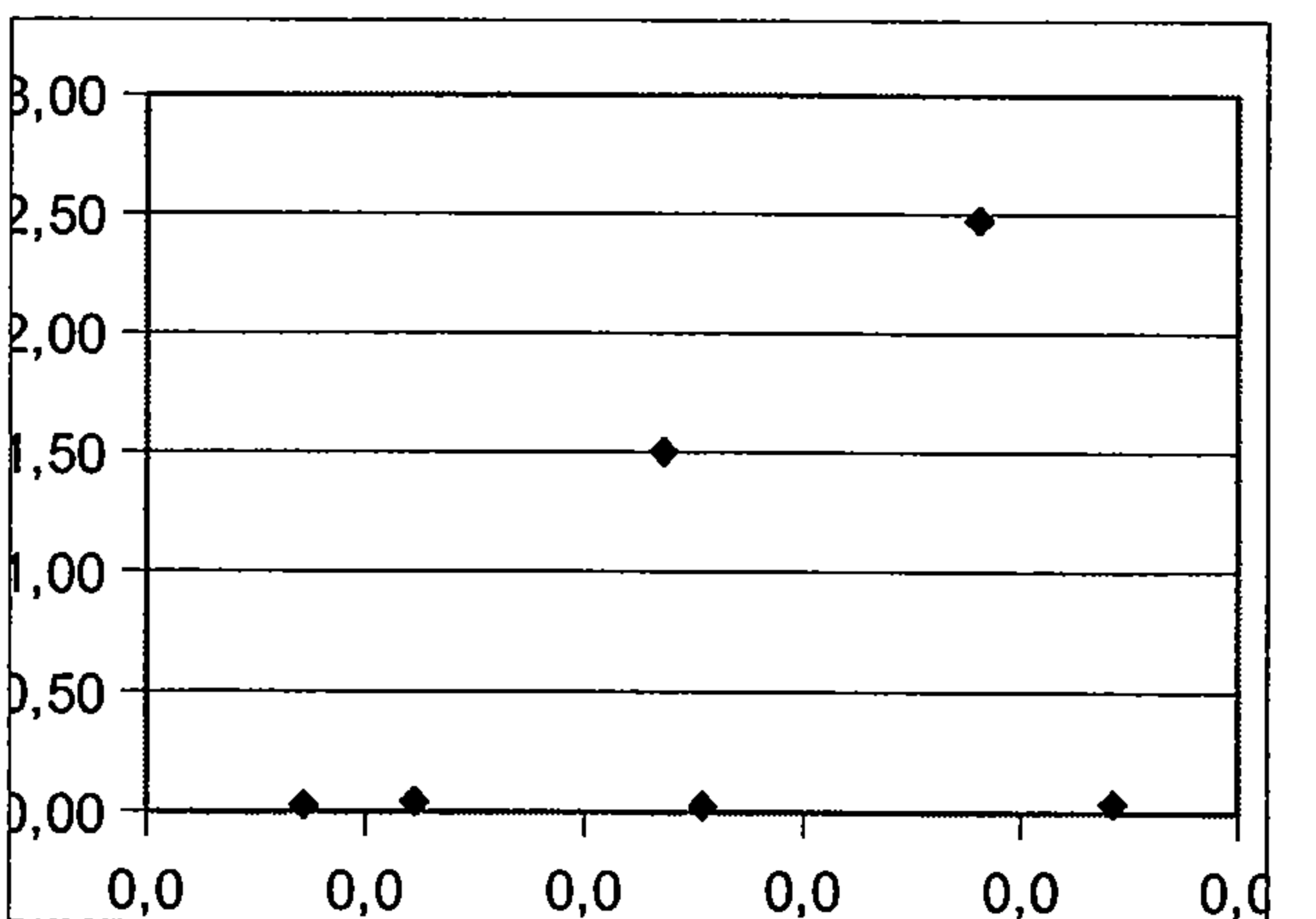


Graf 108: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,694$

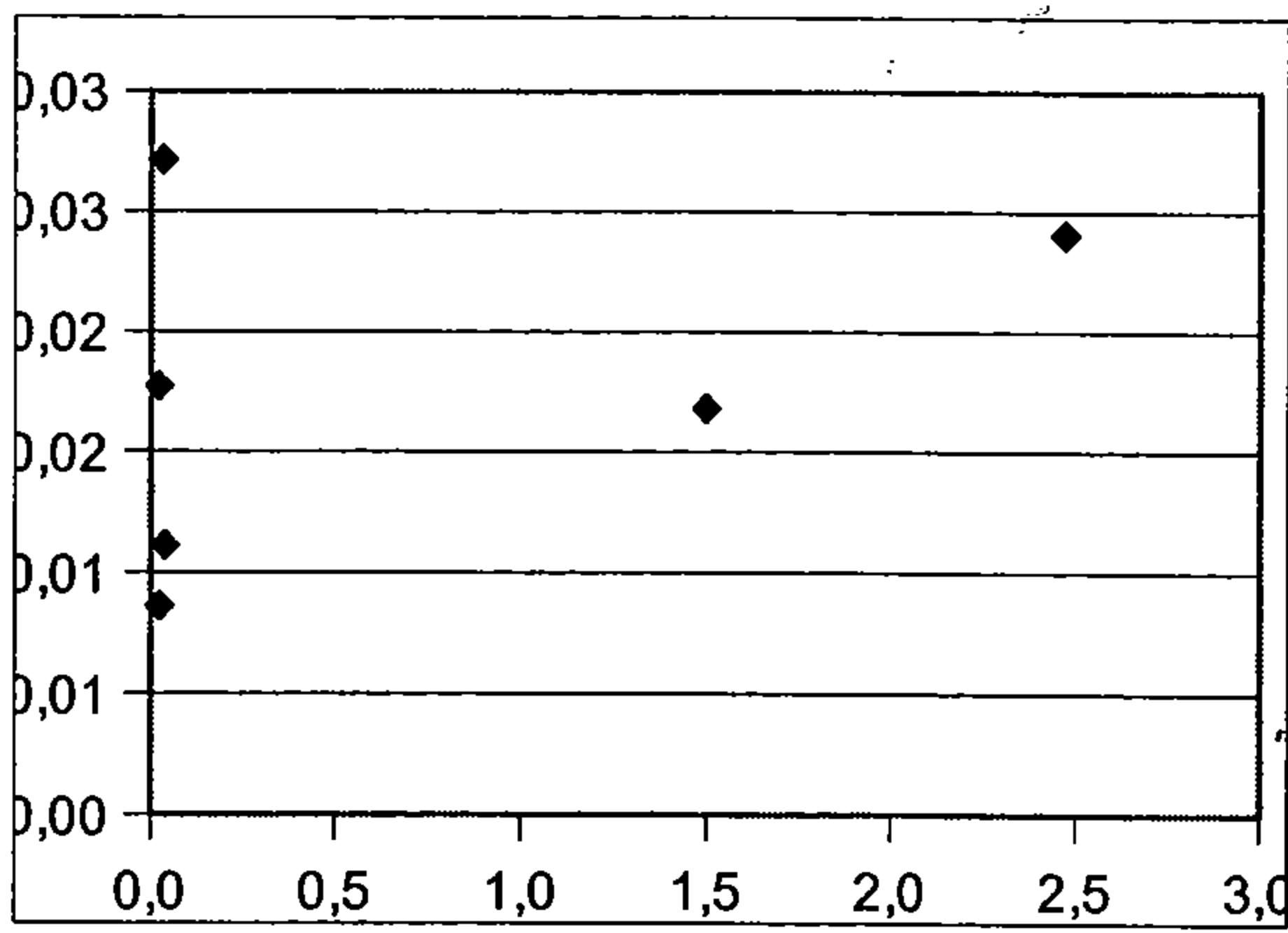
Korelace mezi prvky – frakce VII



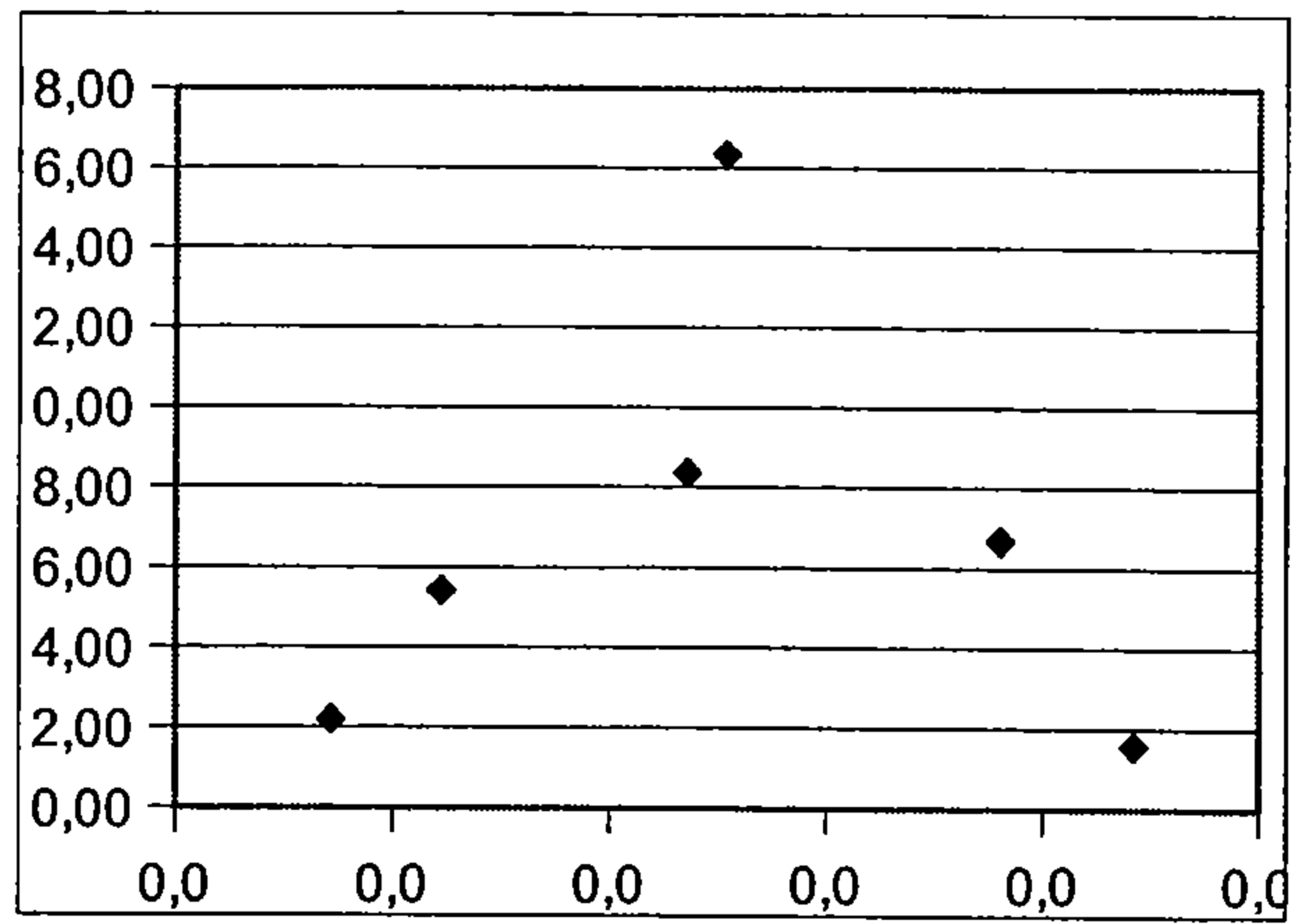
Graf 106: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,944$



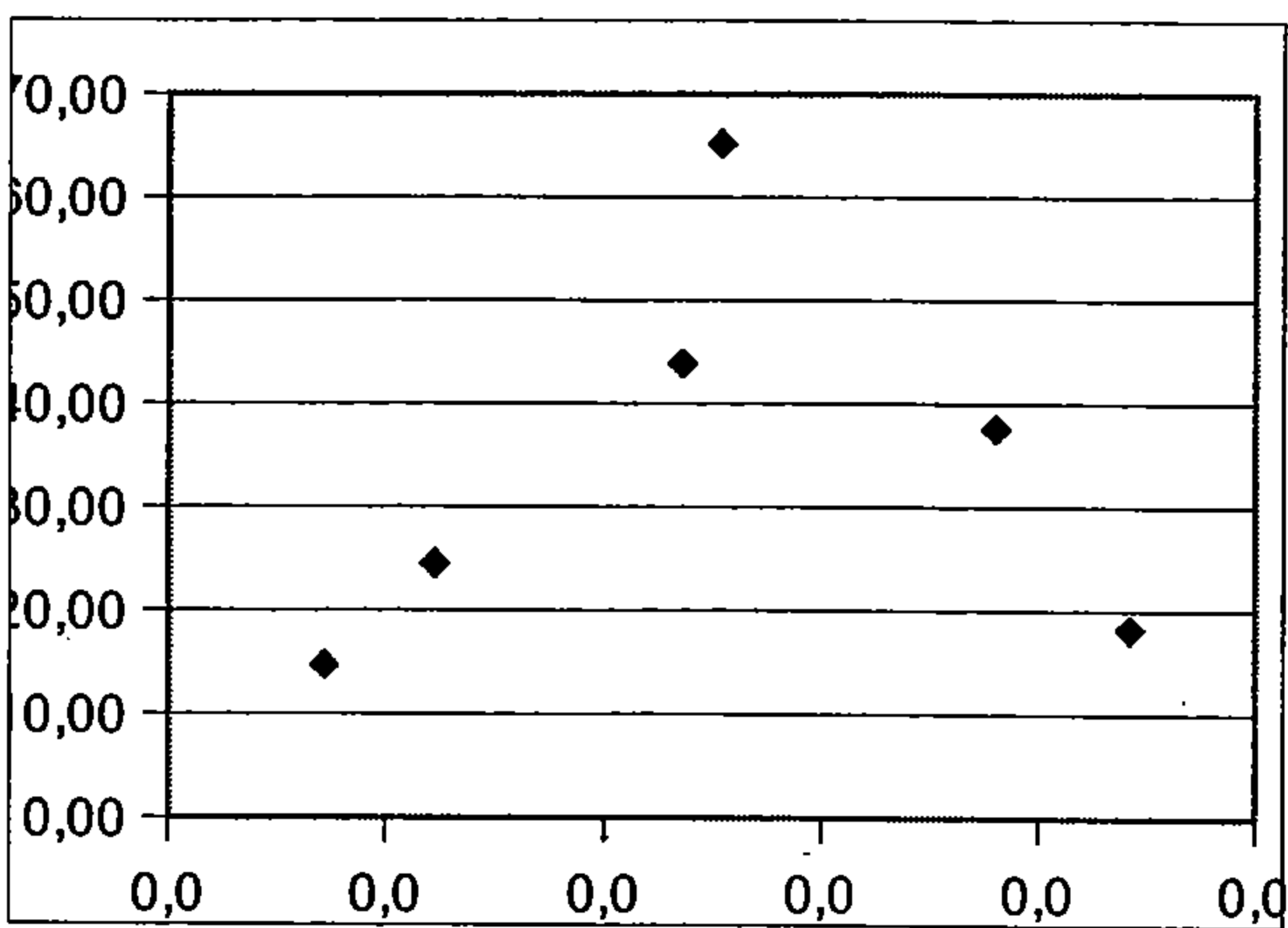
Graf 109: vliv obsahu arsemu na obsah fosforu, $R^2 = 0,28$



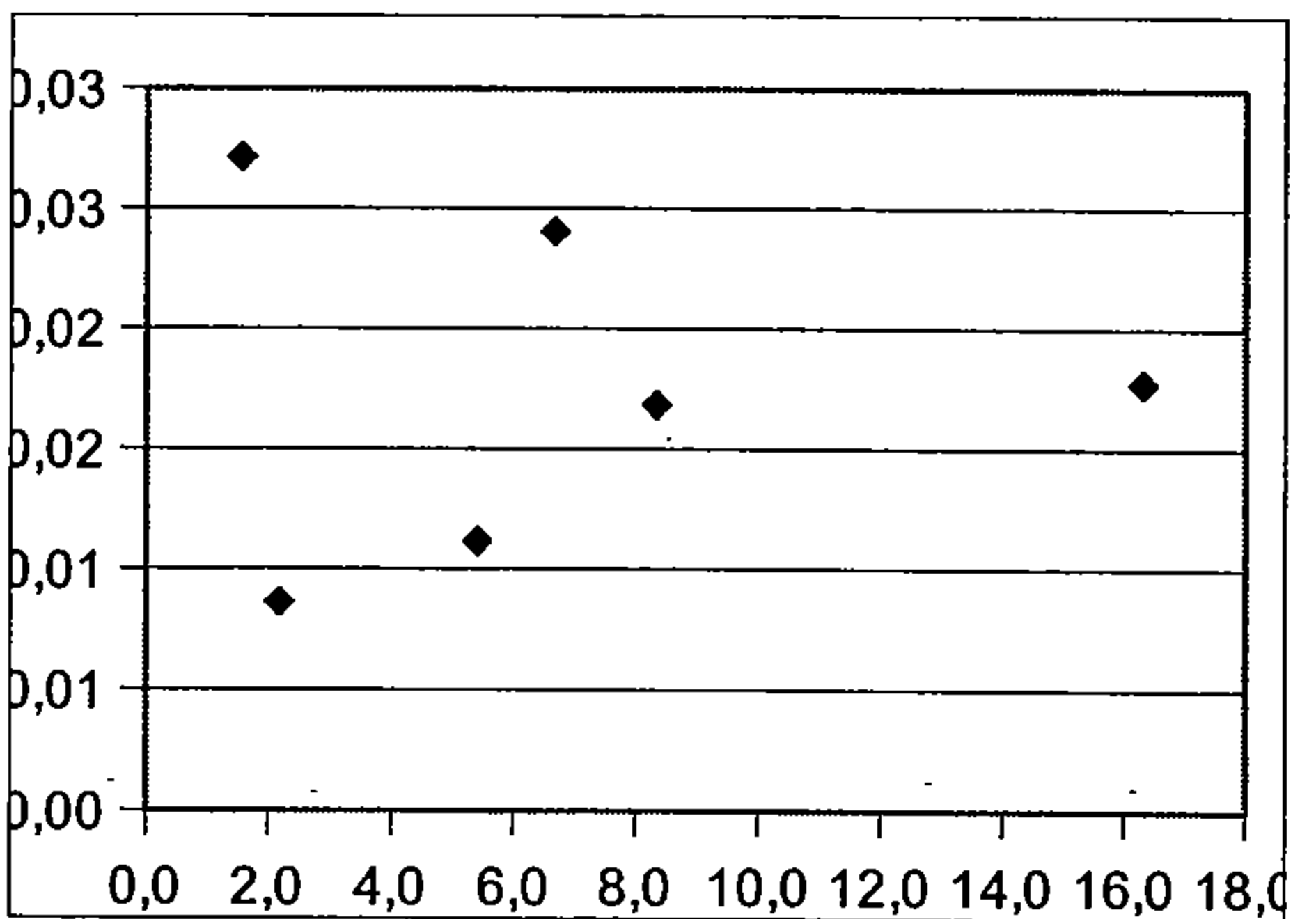
Graf 110: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,196$



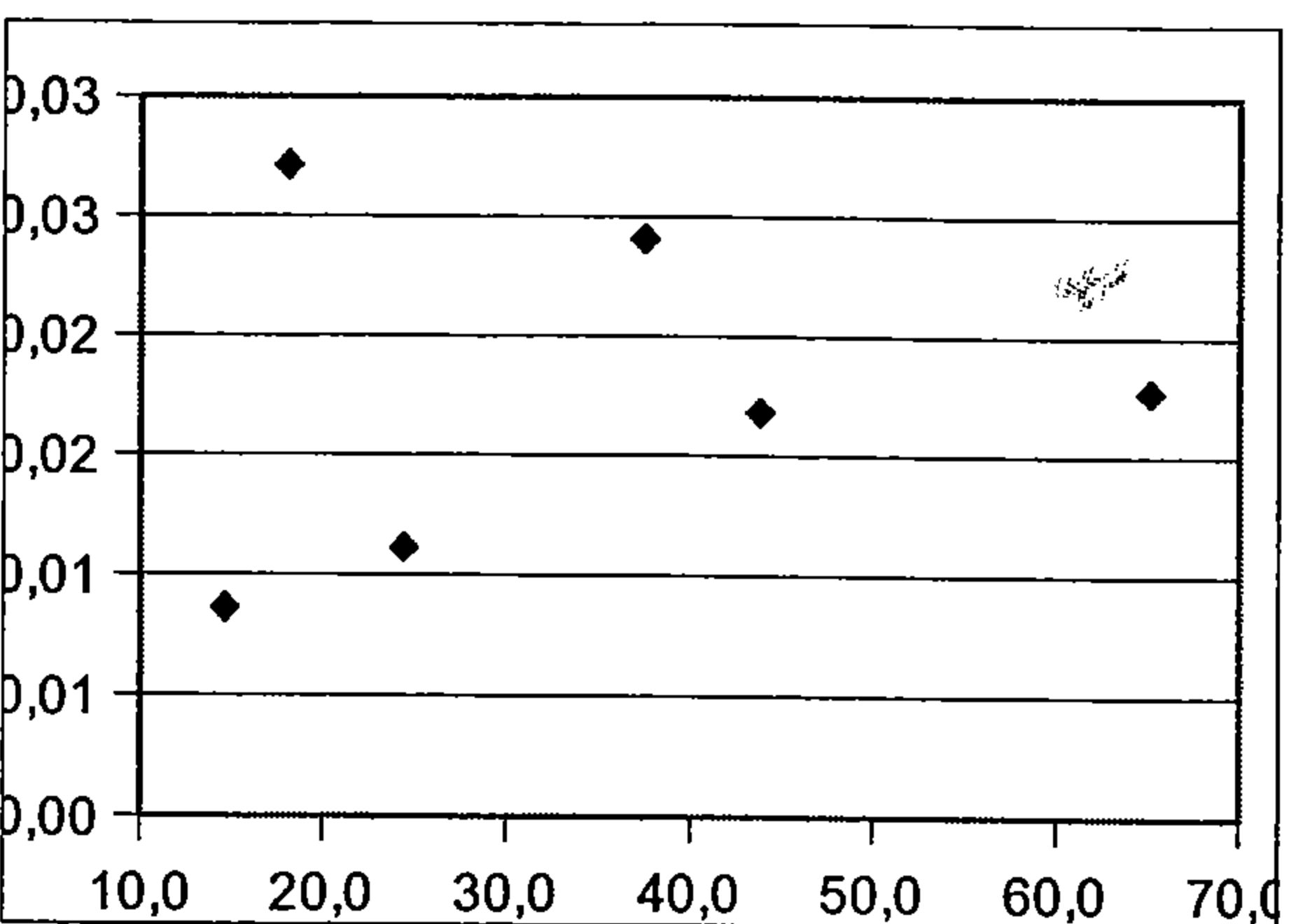
Graf 113: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,77$



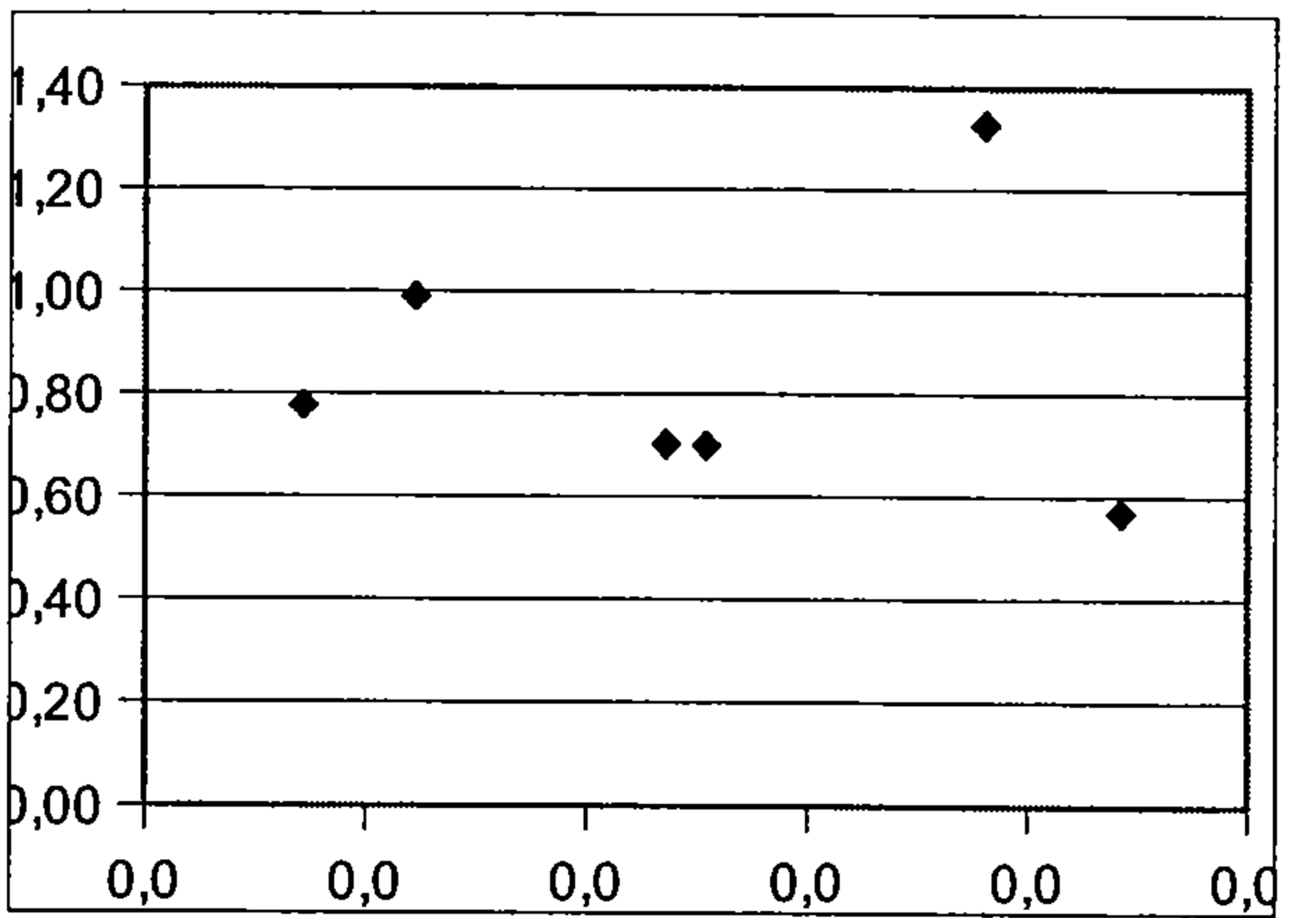
Graf 111: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,853$



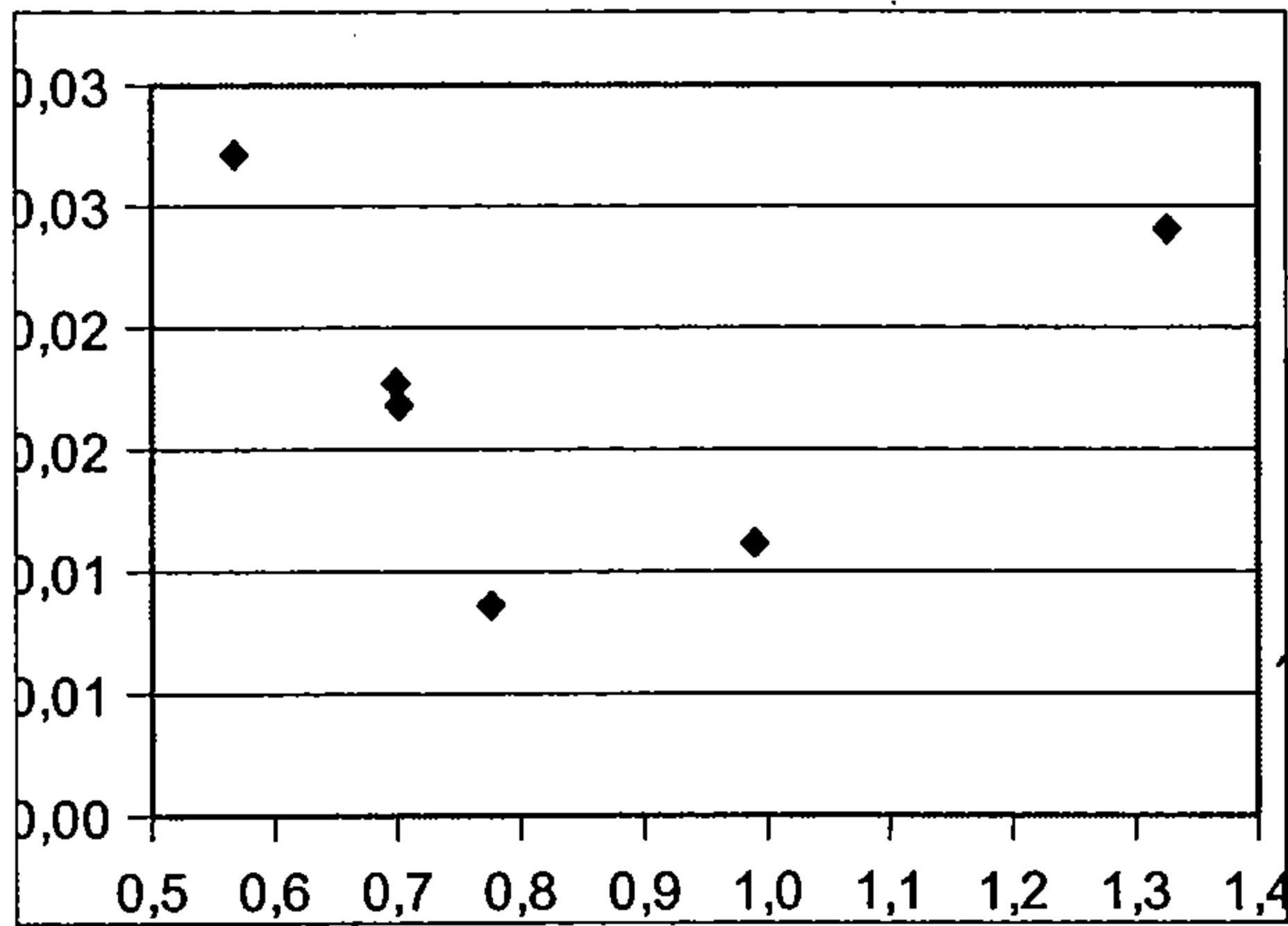
Graf 114: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,006$



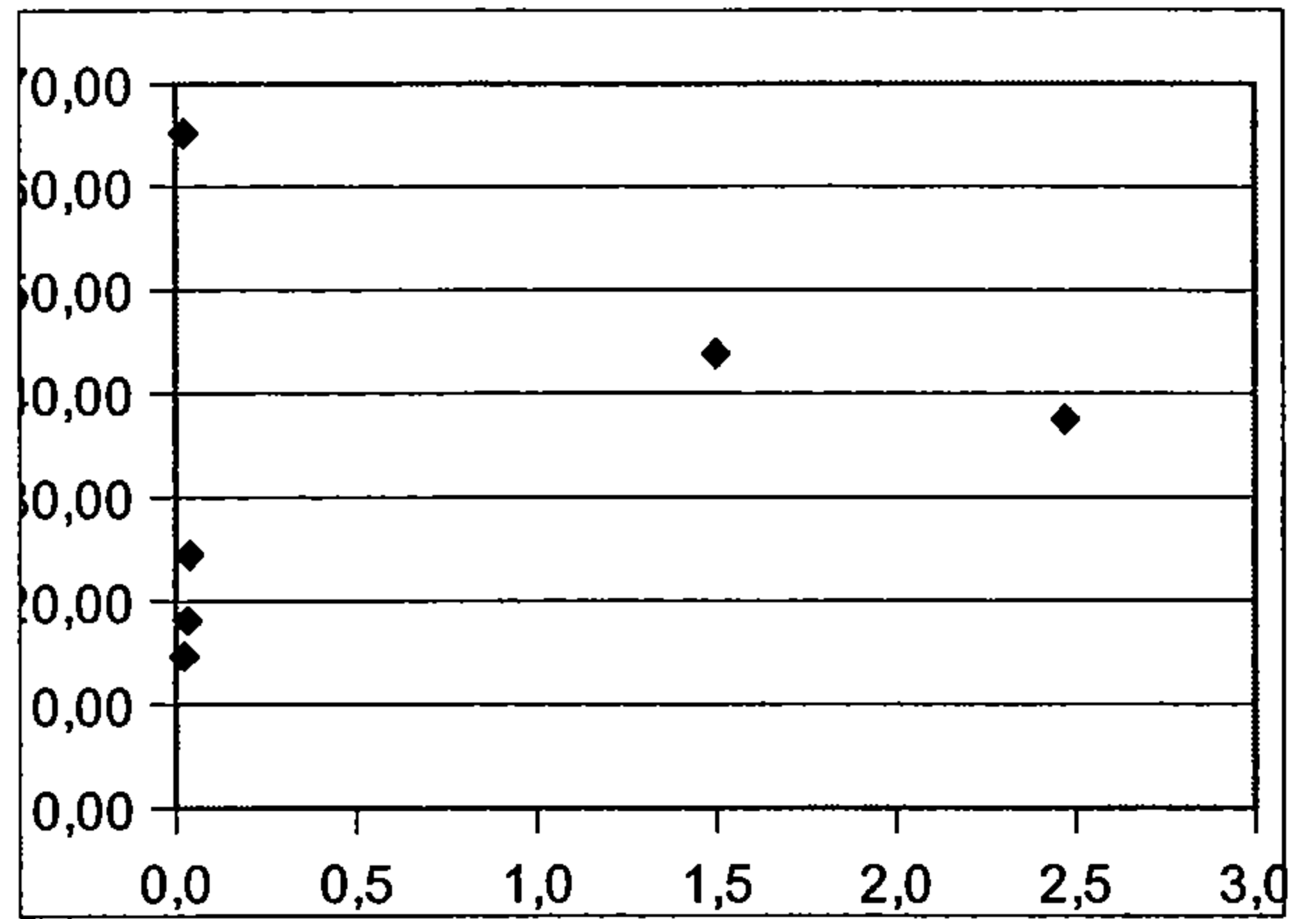
Graf 112: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,08$



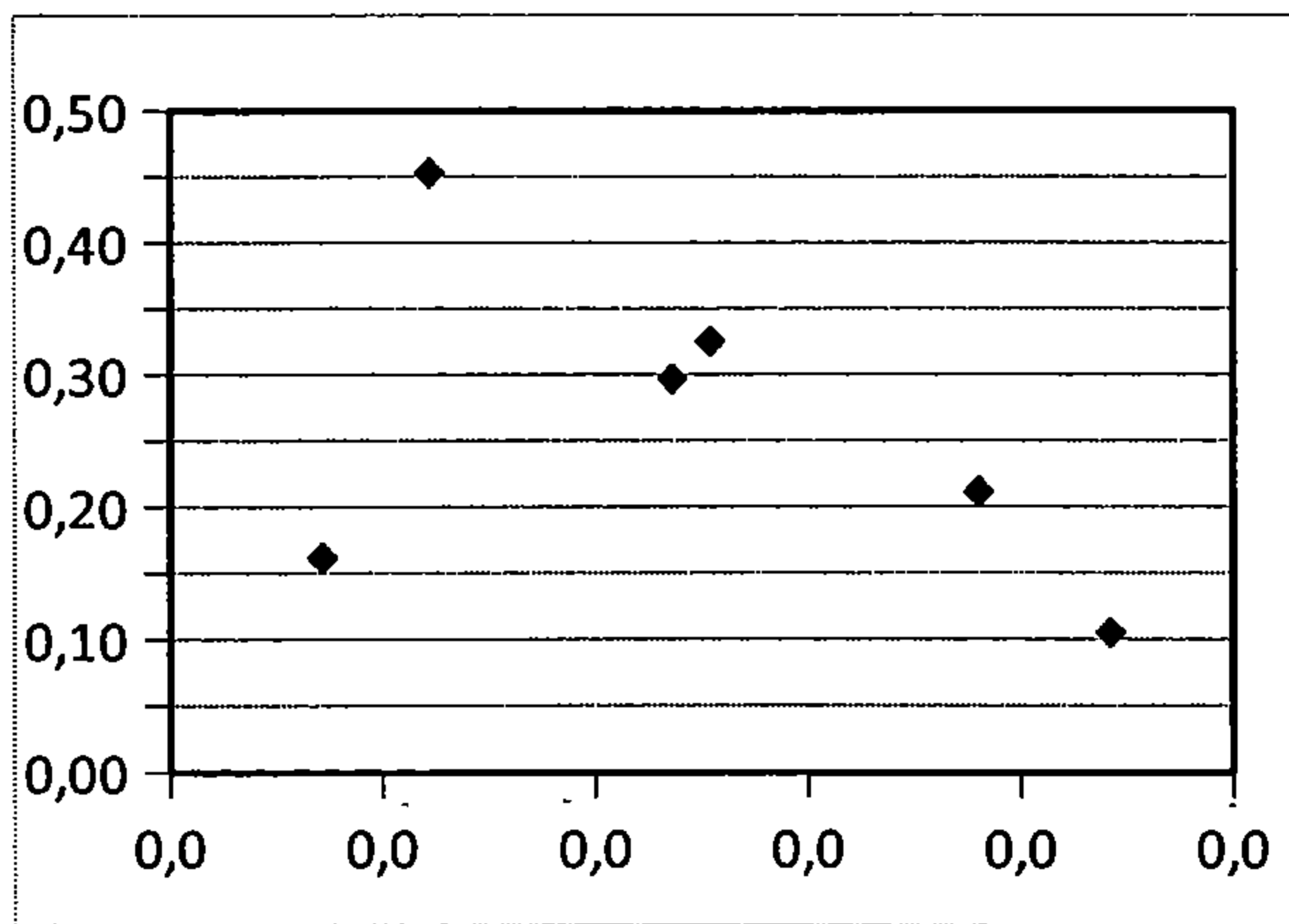
Graf 115: vliv obsahu arsenu na obsah železo, $R^2 = 0,008$



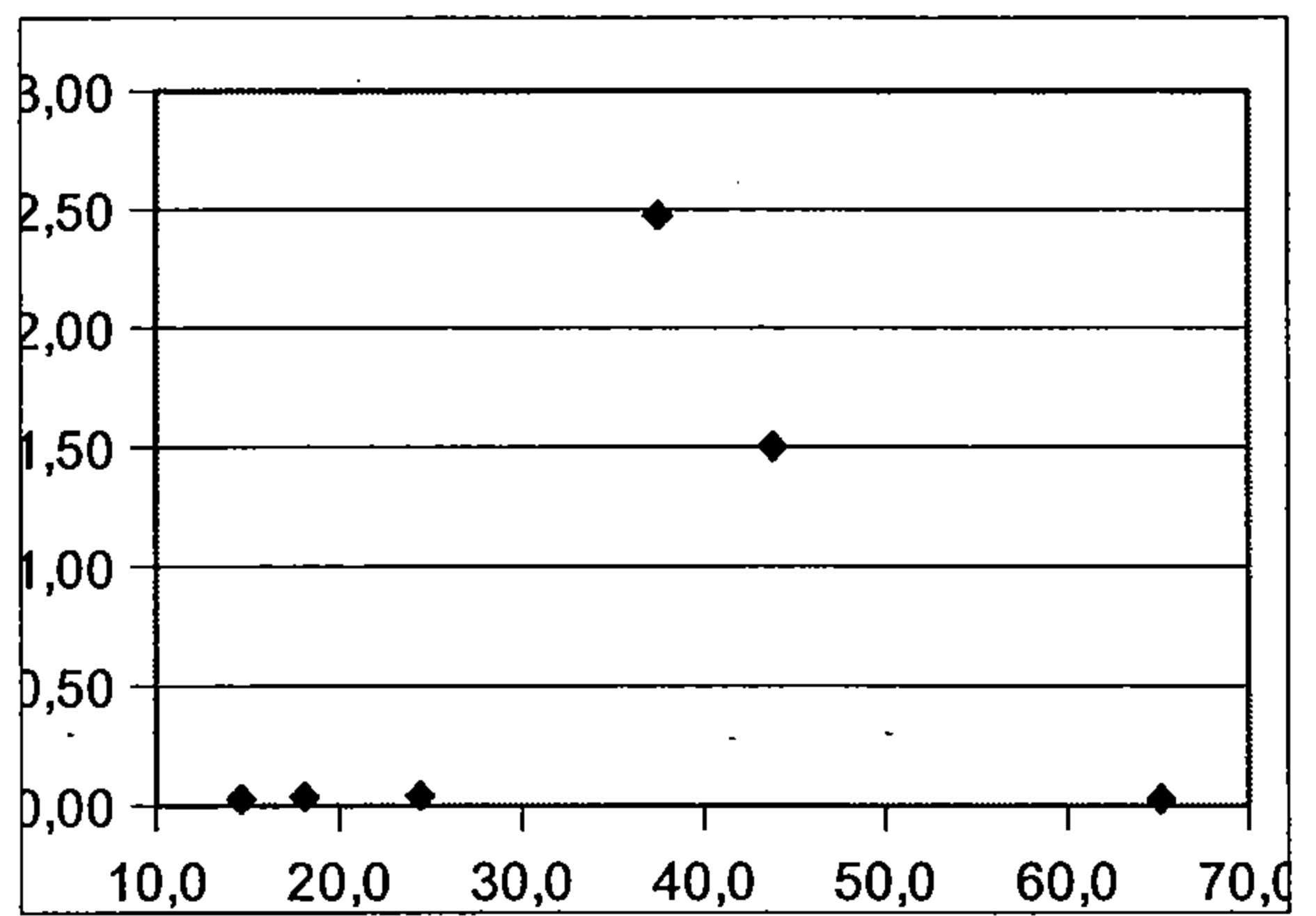
Graf 116: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,91$



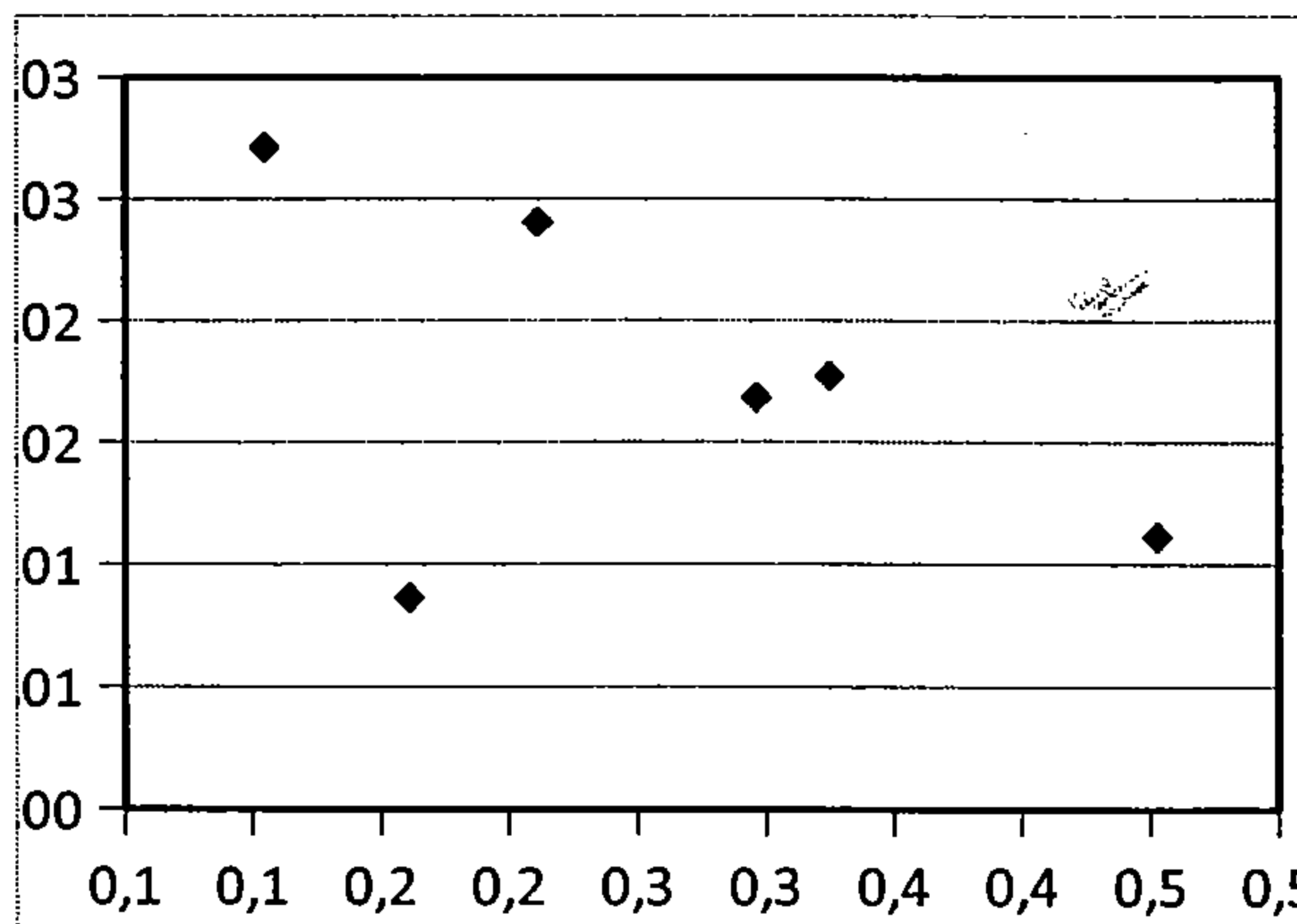
Graf 119: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,081$



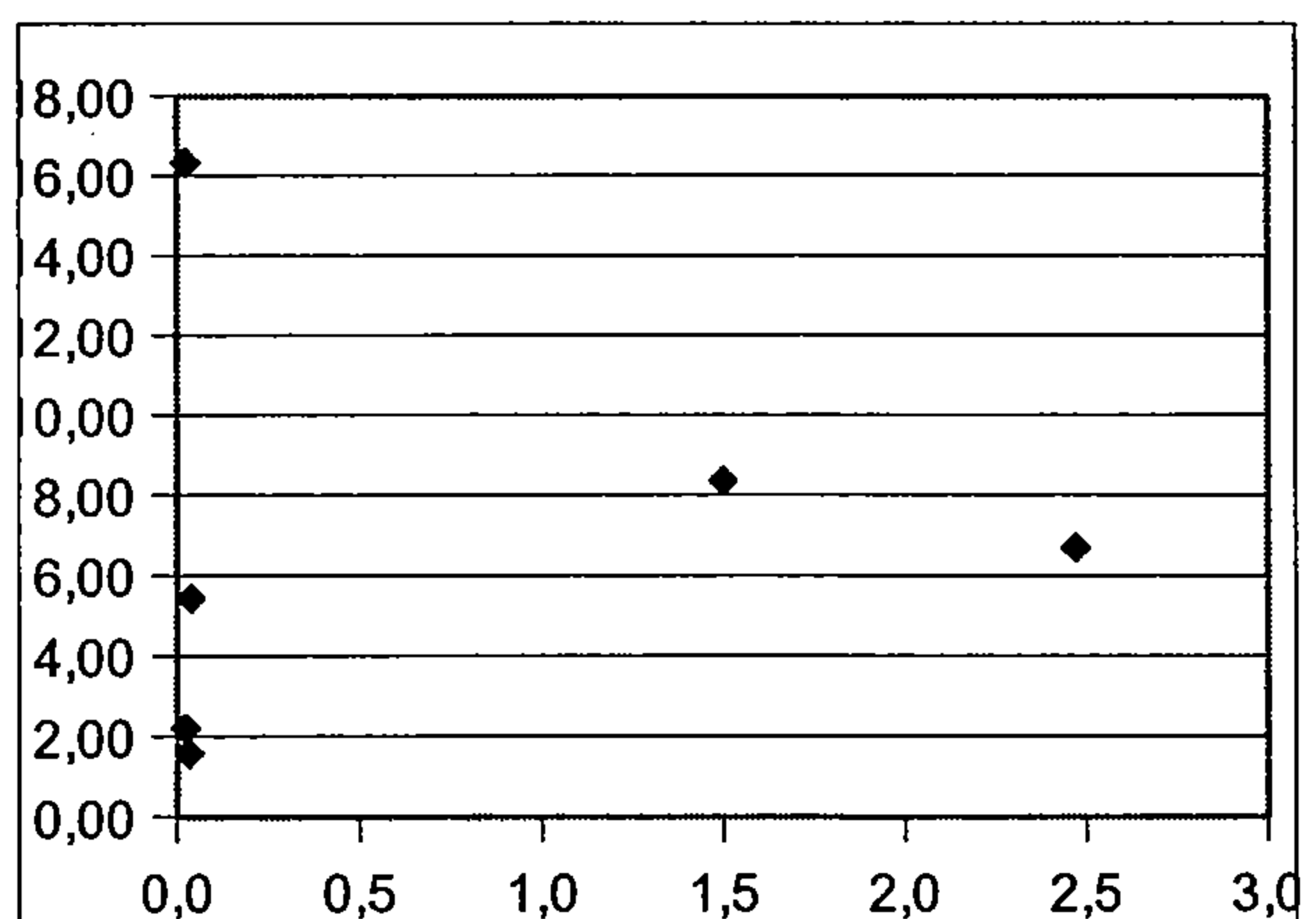
Graf 117: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,597$



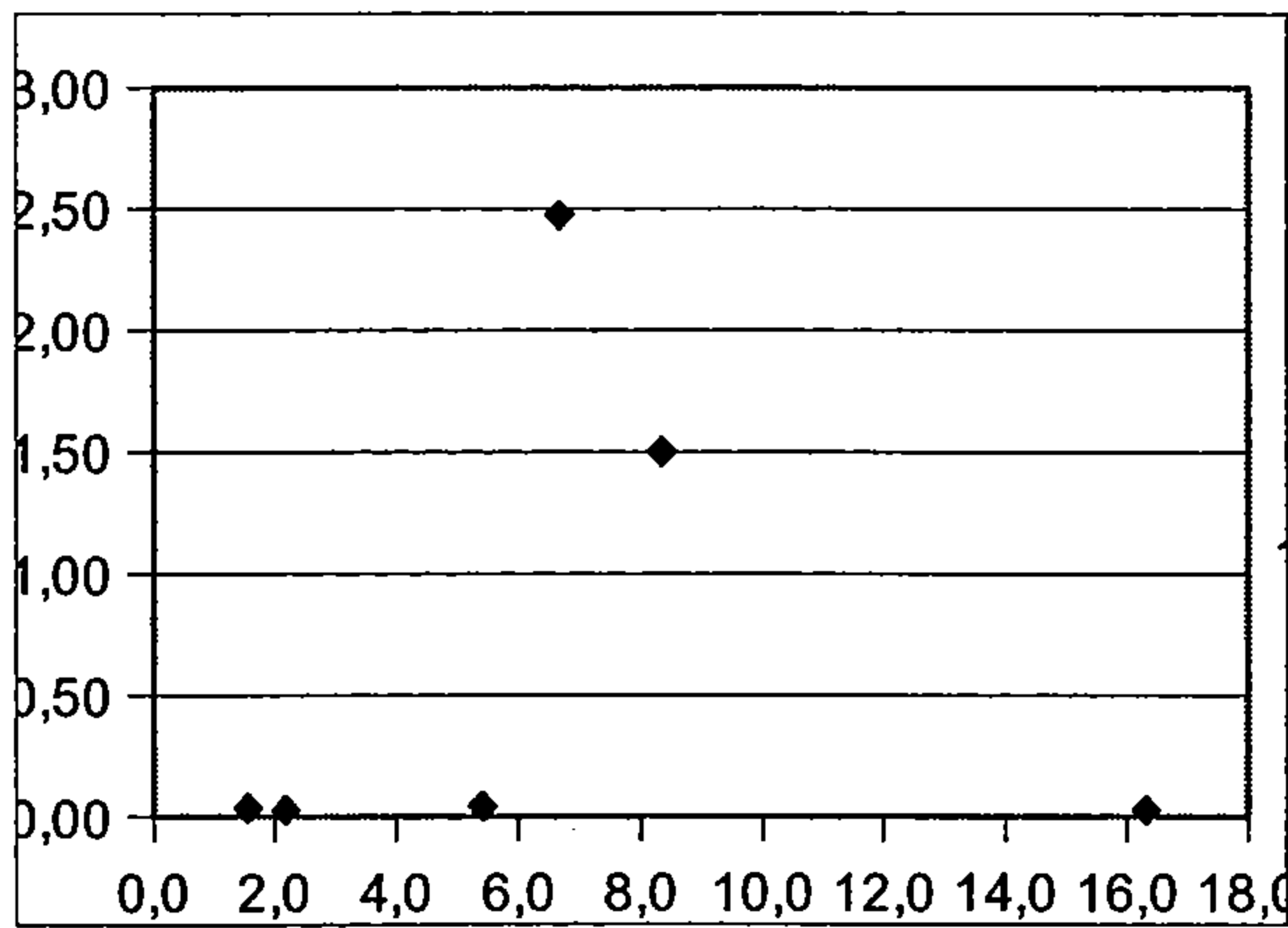
Graf 120: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,723$



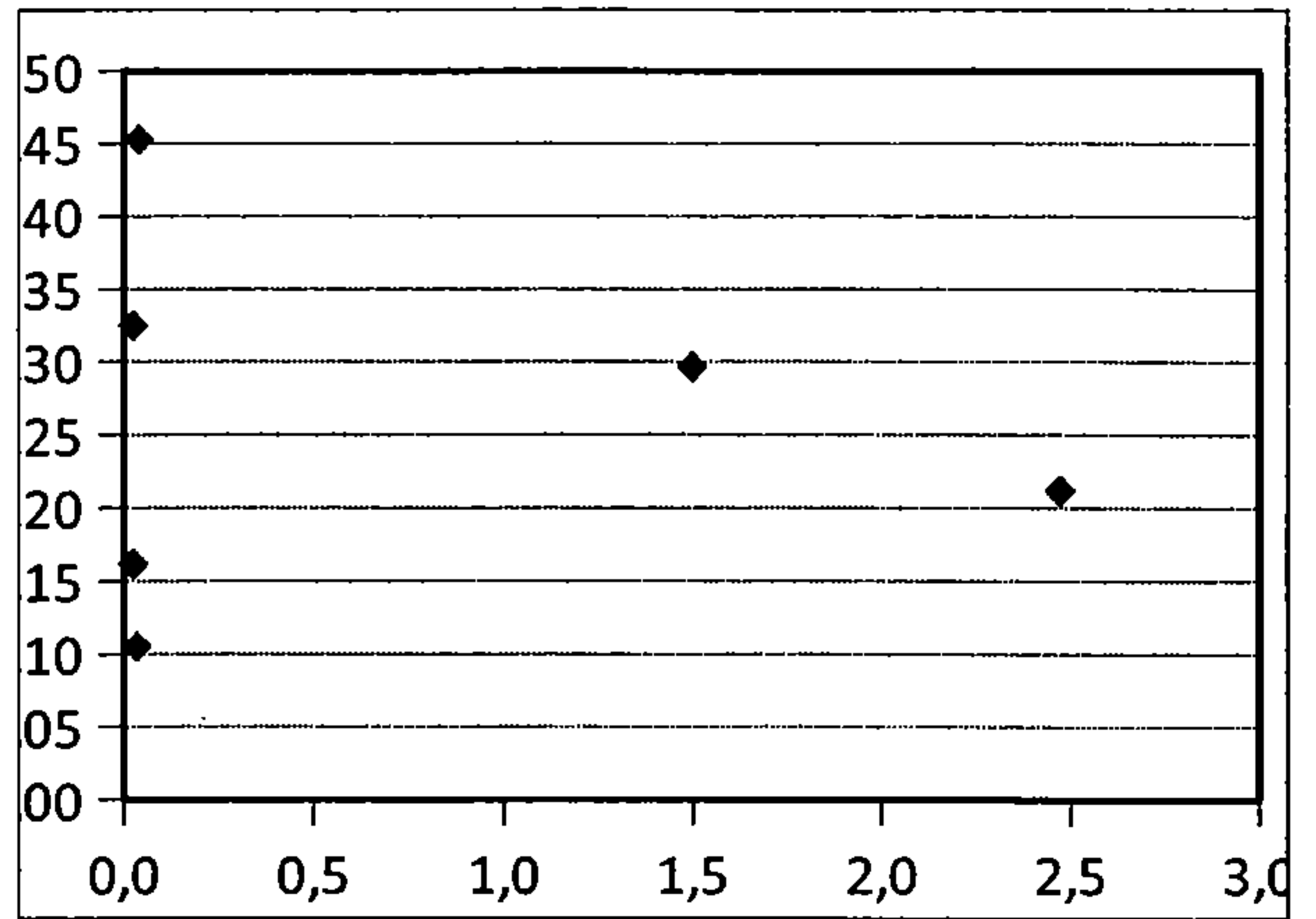
Graf 118: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,234$



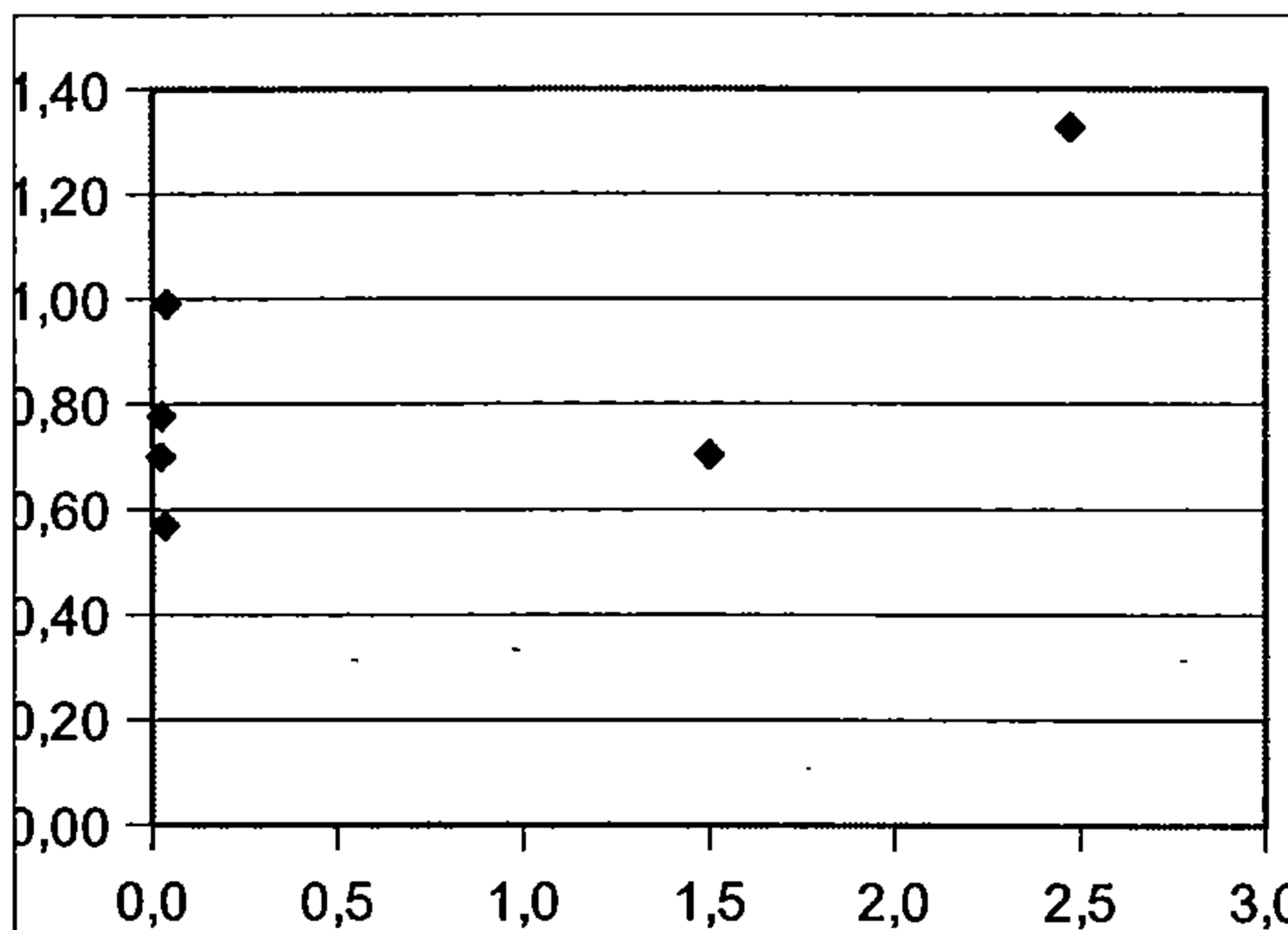
Graf 121: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,018$



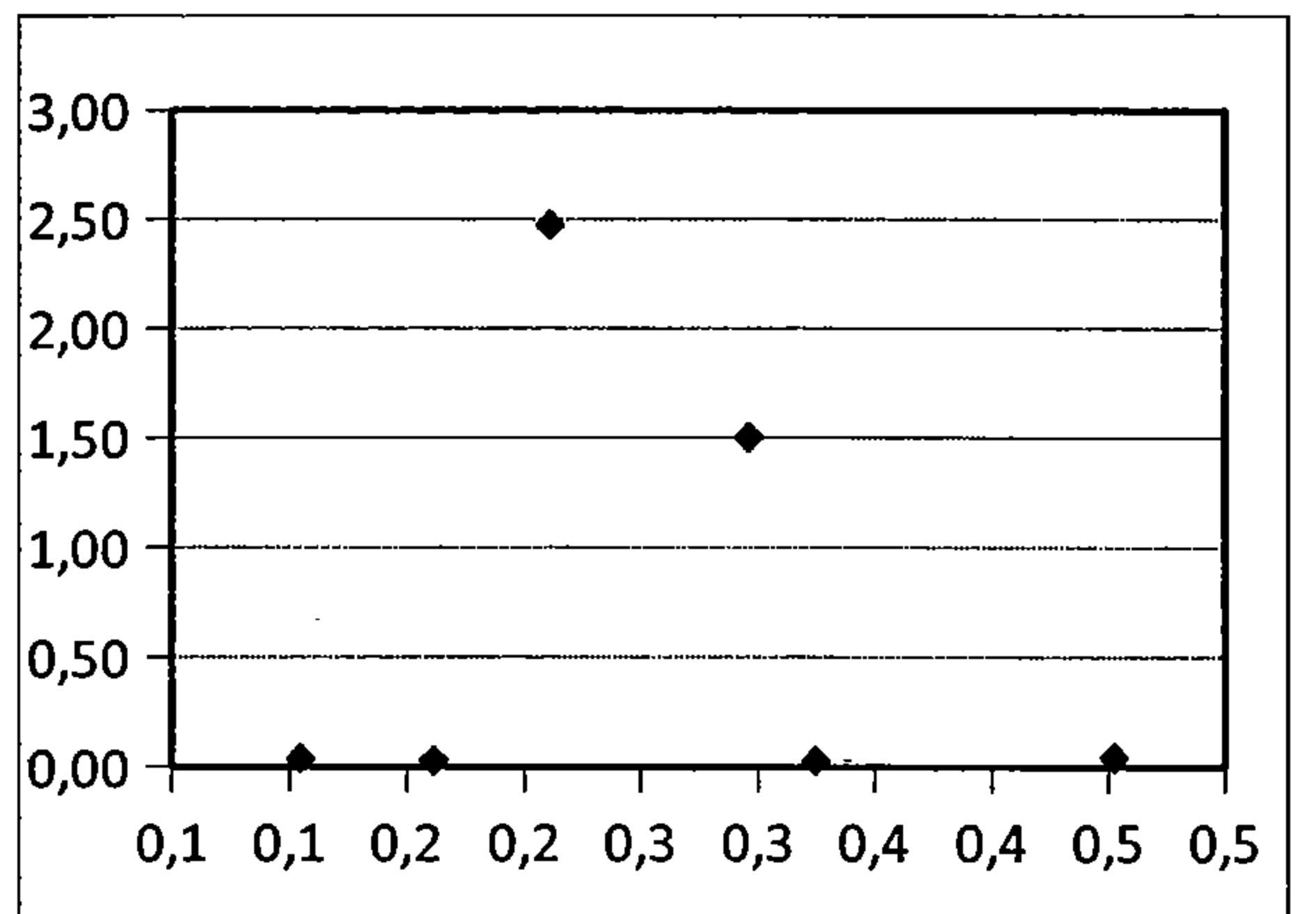
Graf 122: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,558$



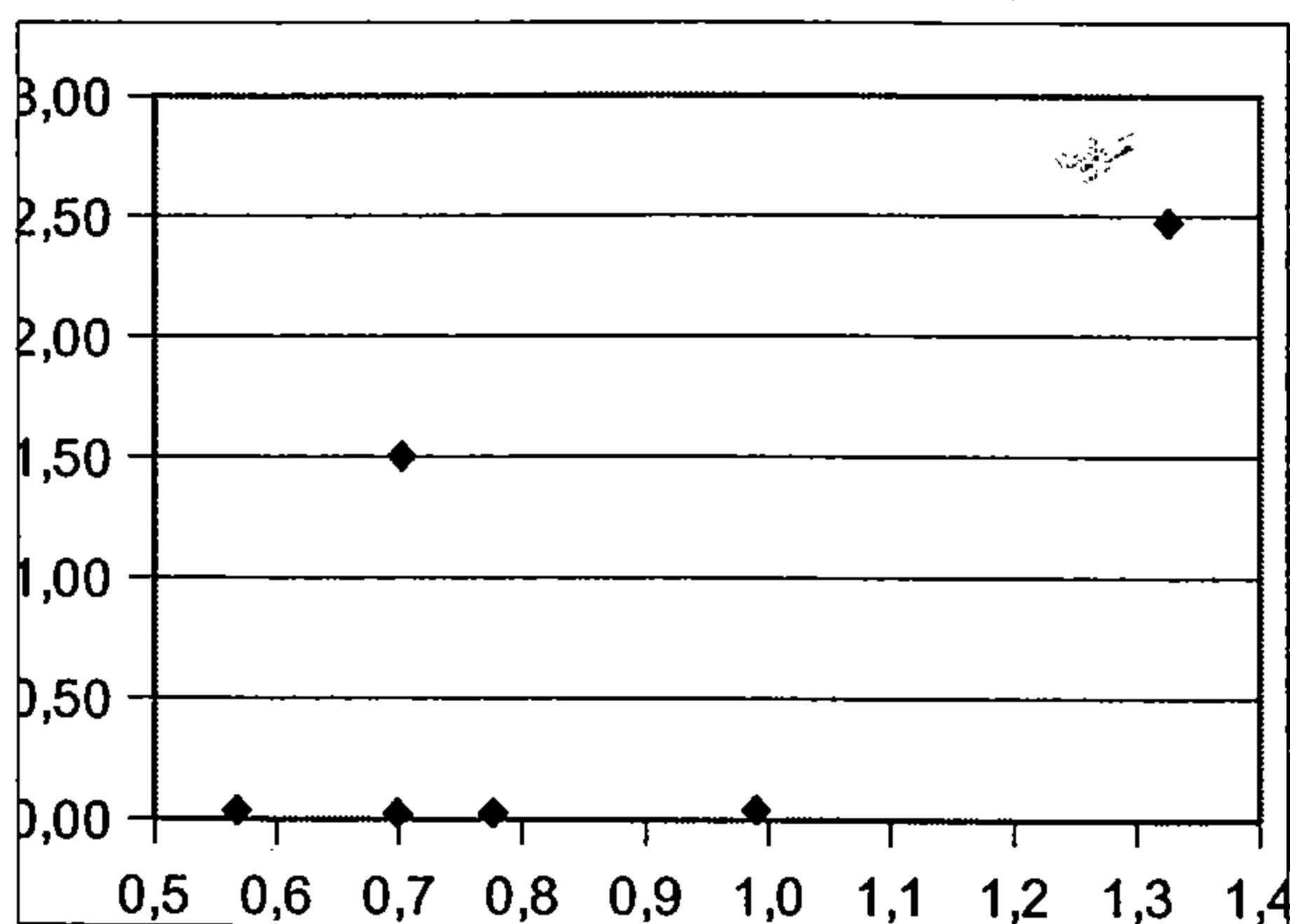
Graf 125: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,049$



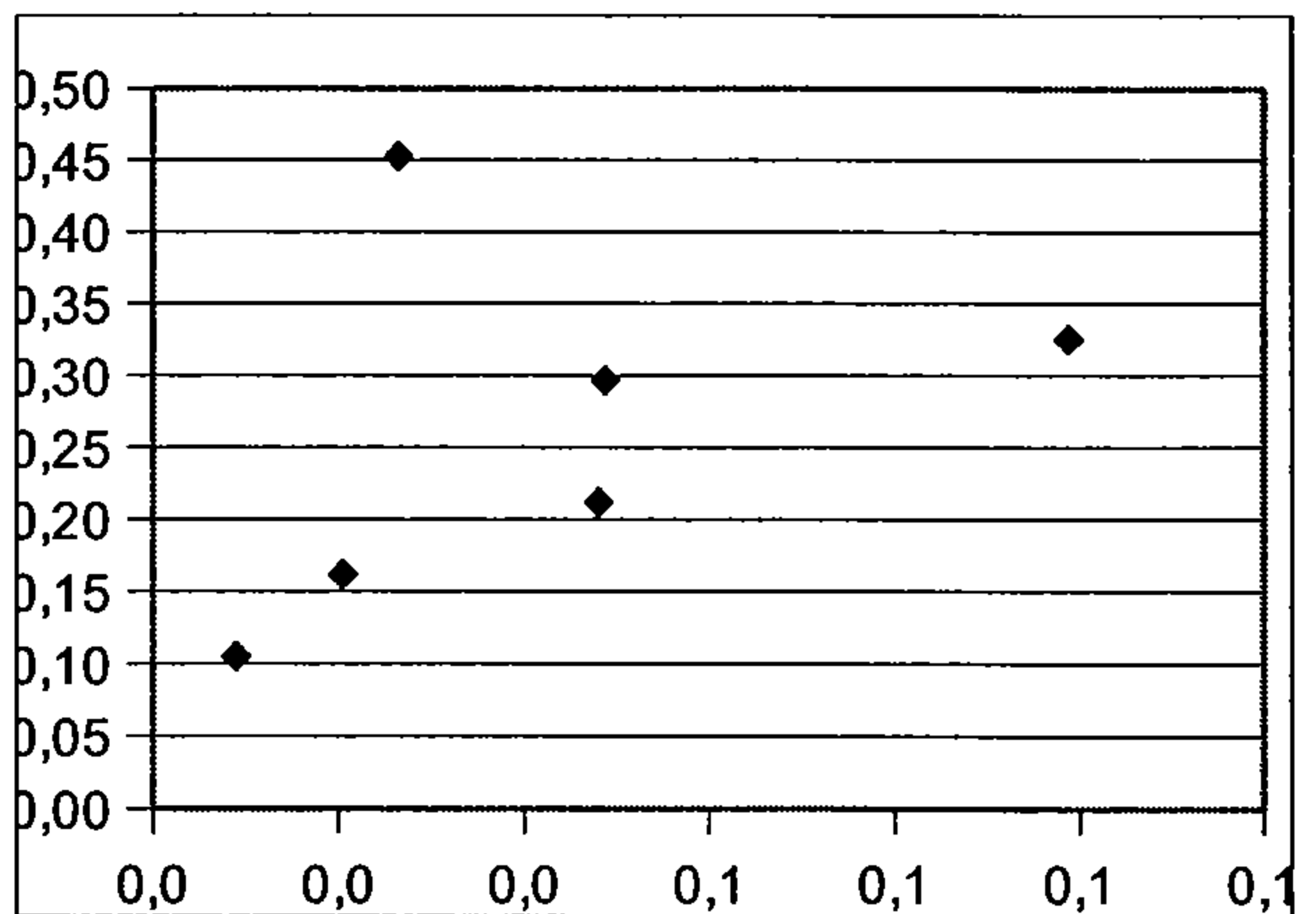
Graf 123: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,746$



Graf 126: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,331$

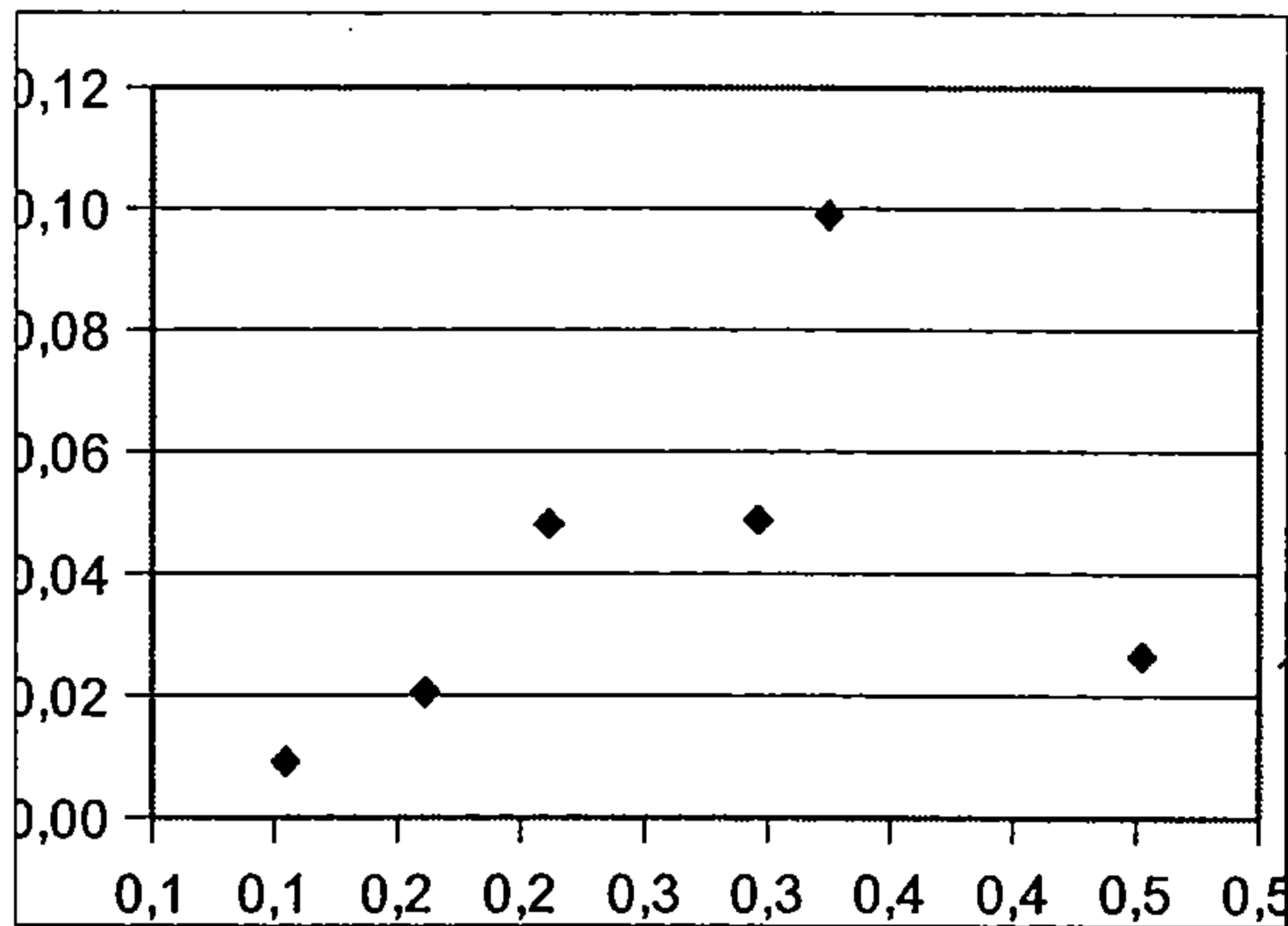


Graf 124: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,615$

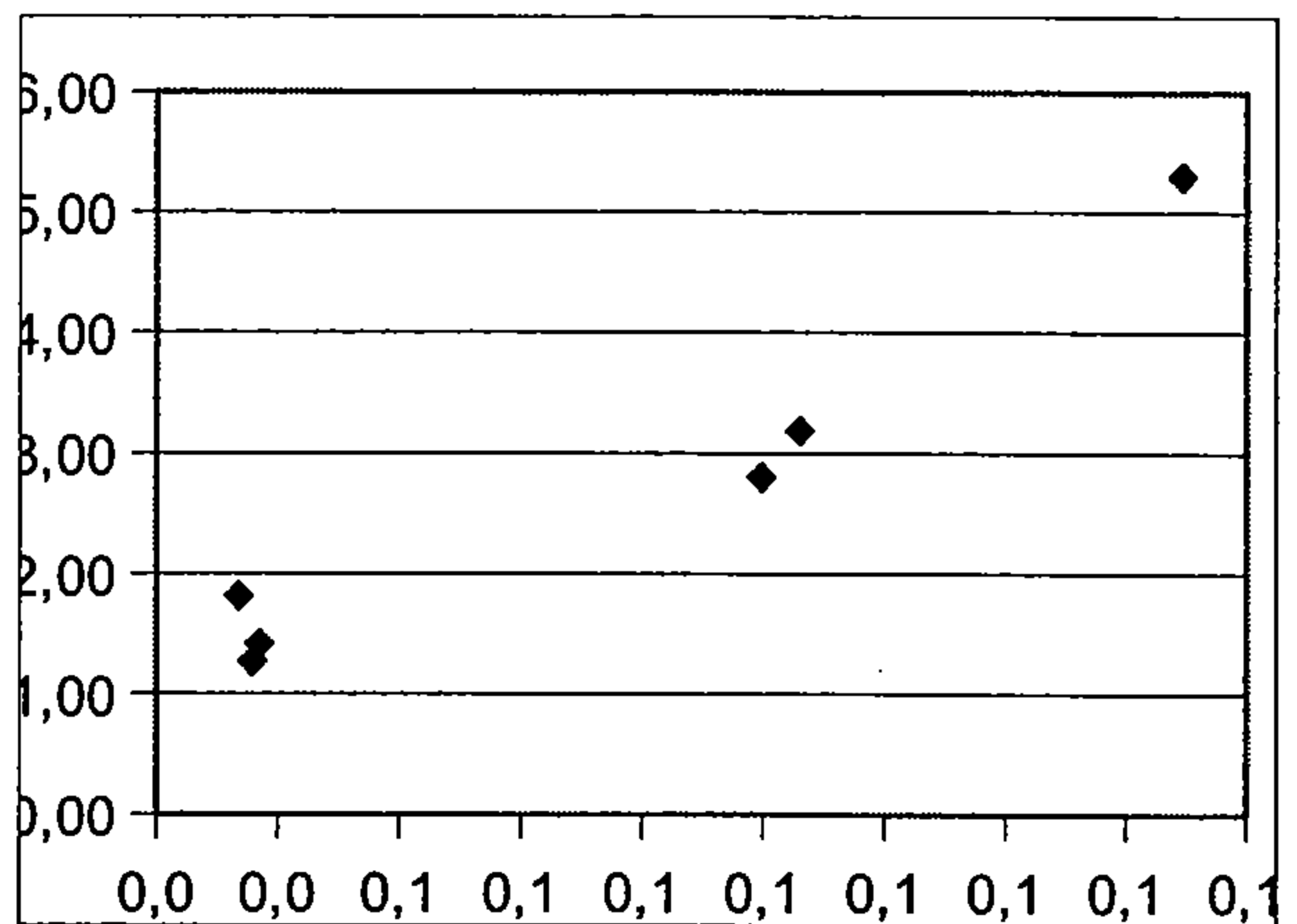


Graf 127: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,235$

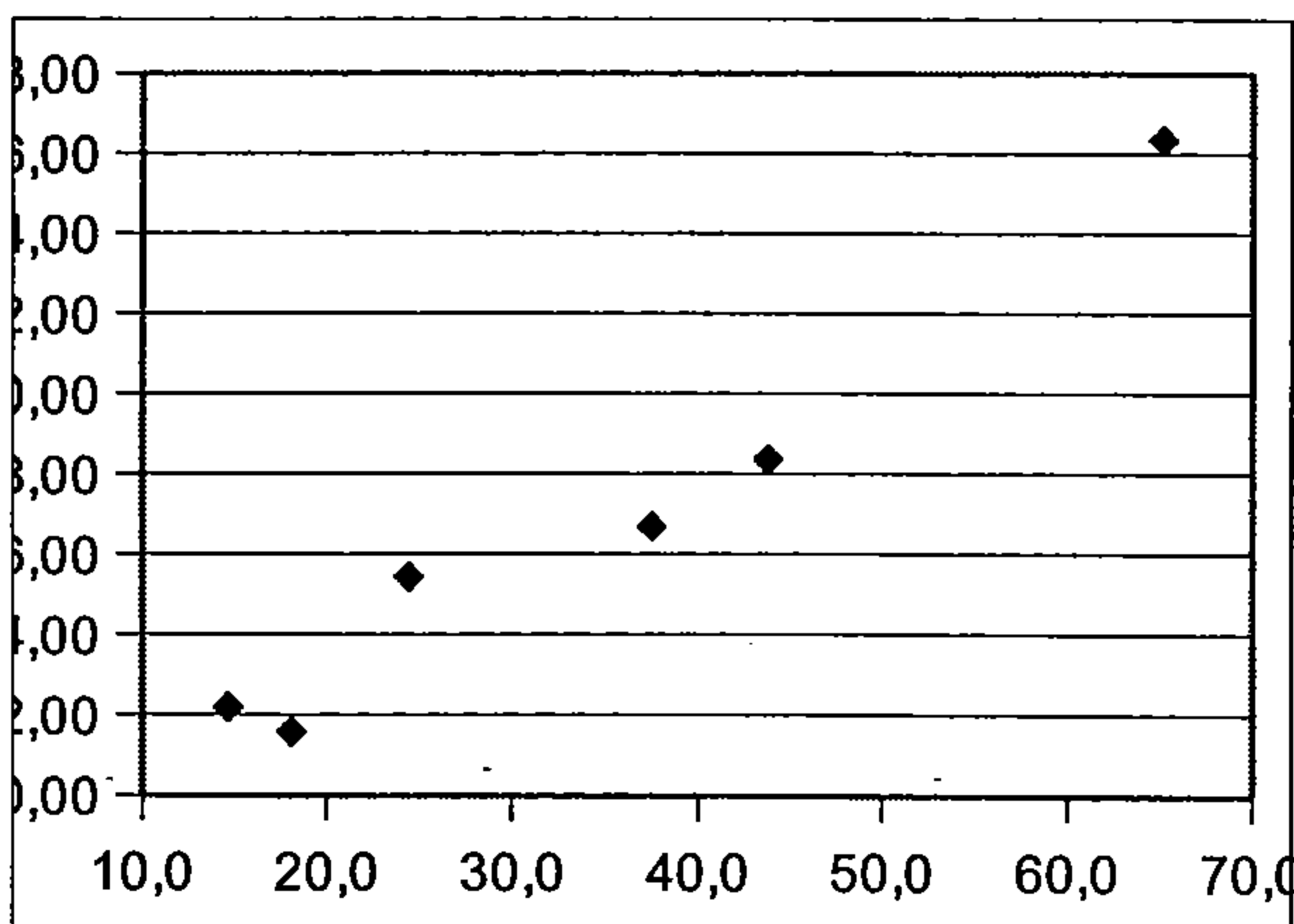
Korelace mezi prvky – frakce VIII



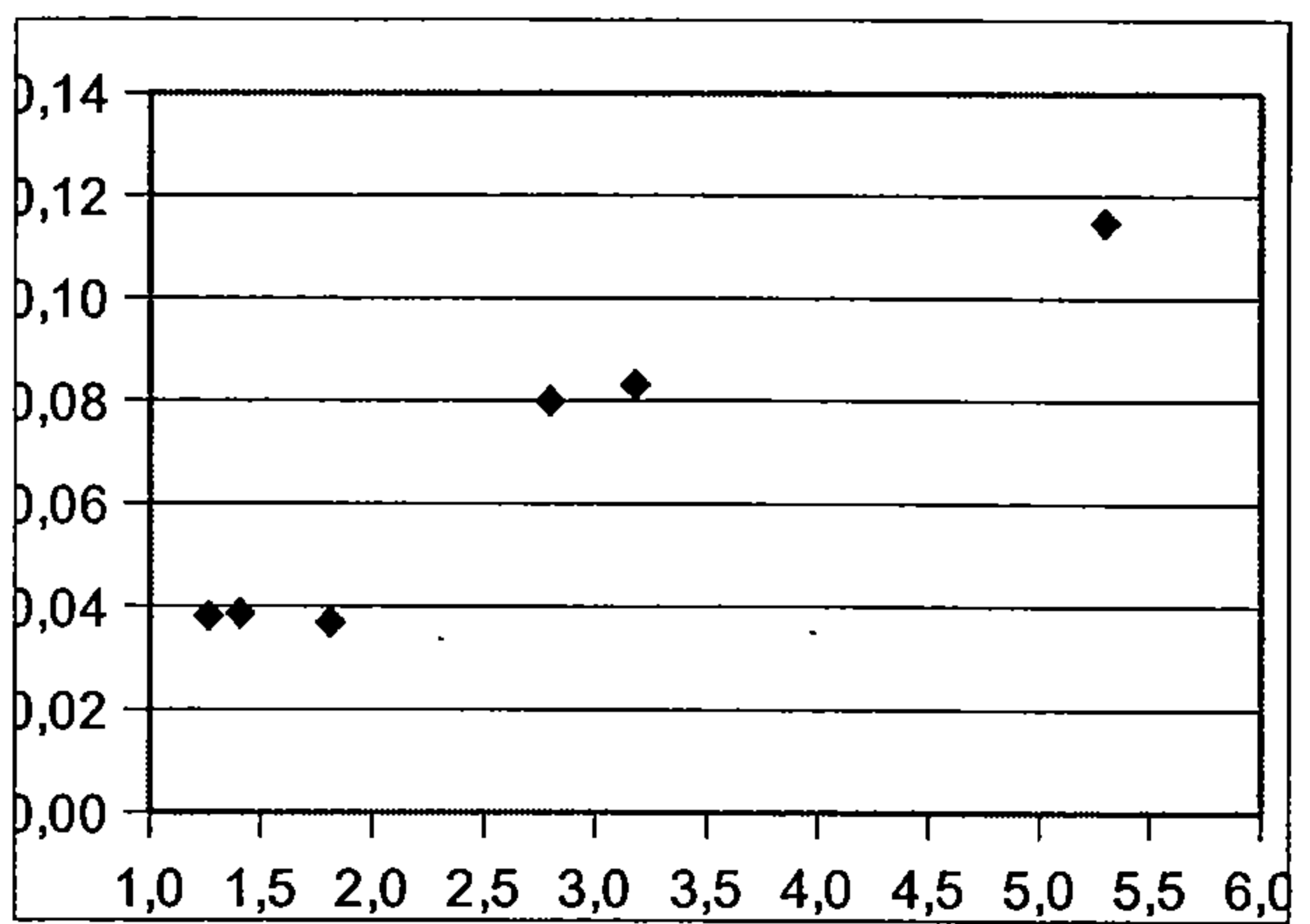
Graf 128: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,679$



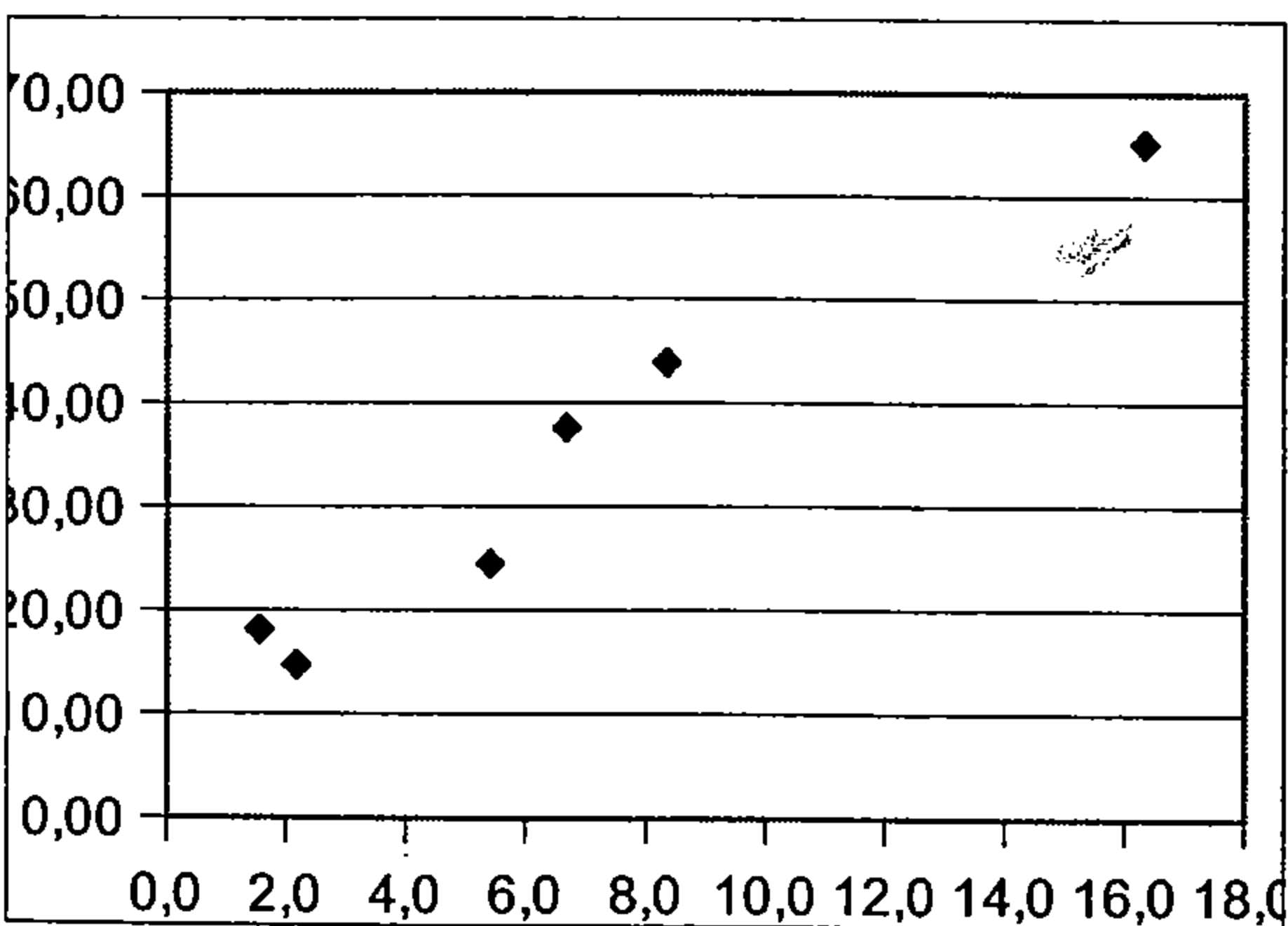
Graf 131: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,983$



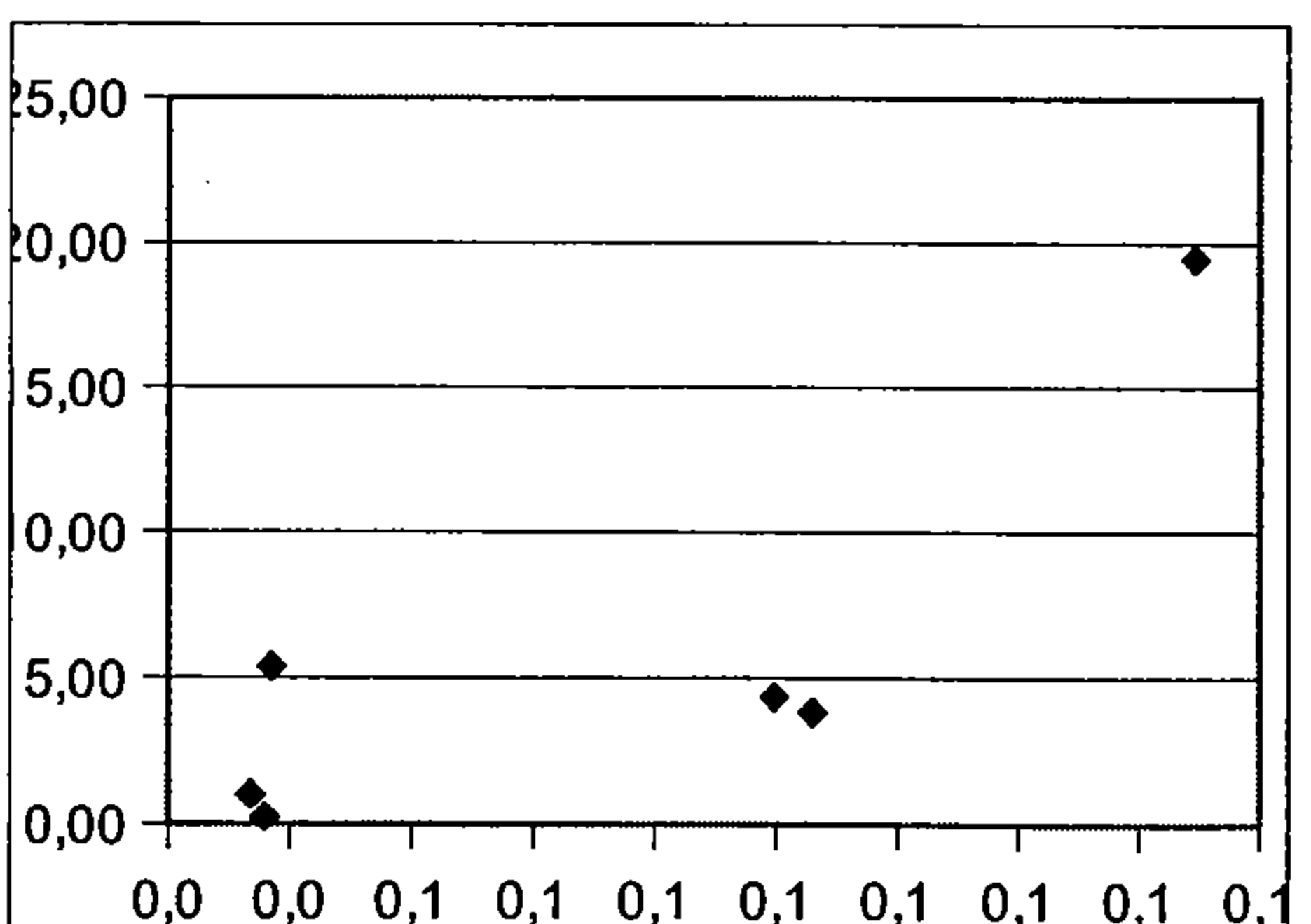
Graf 129: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,973$



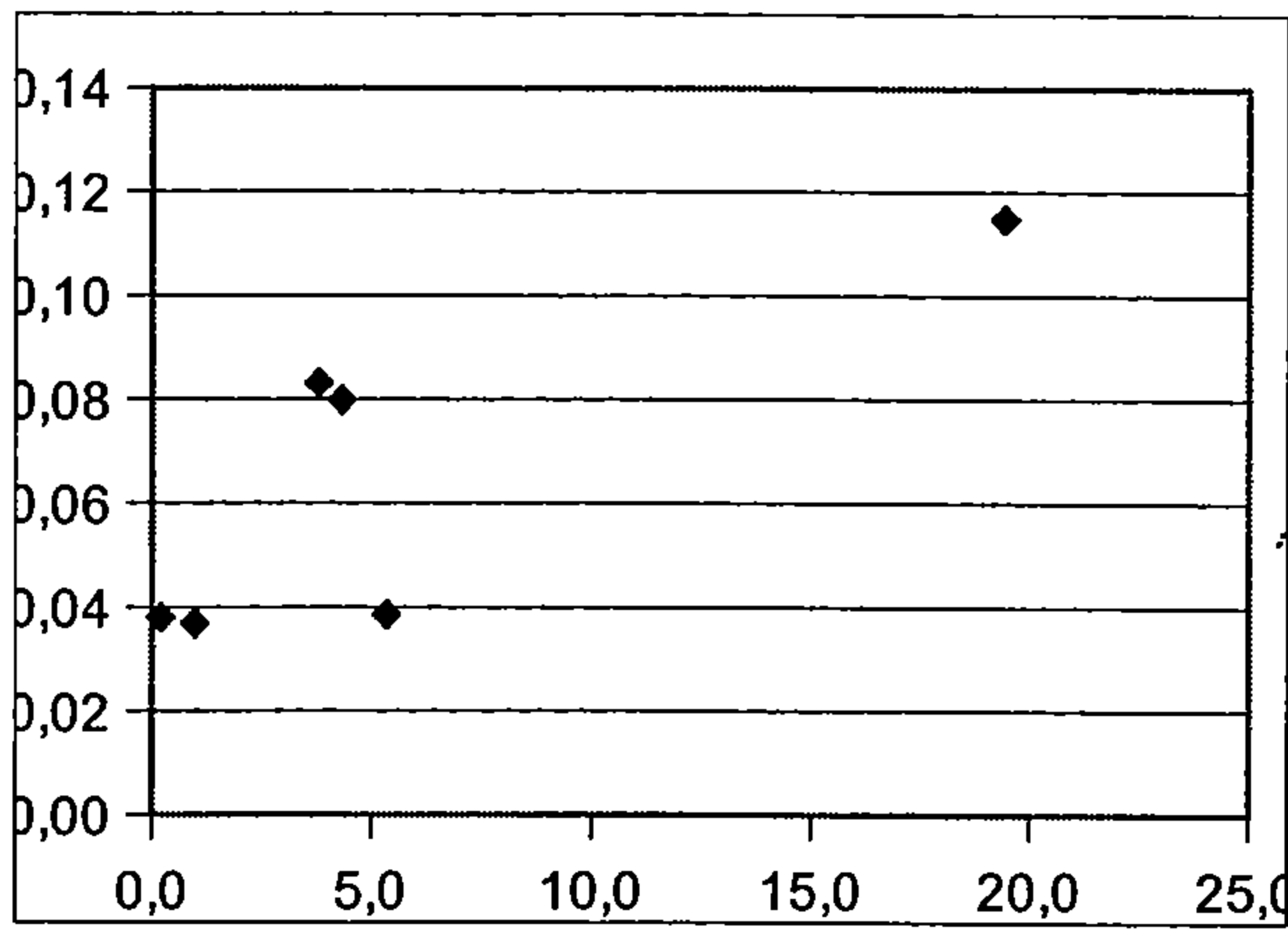
Graf 132: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,96$



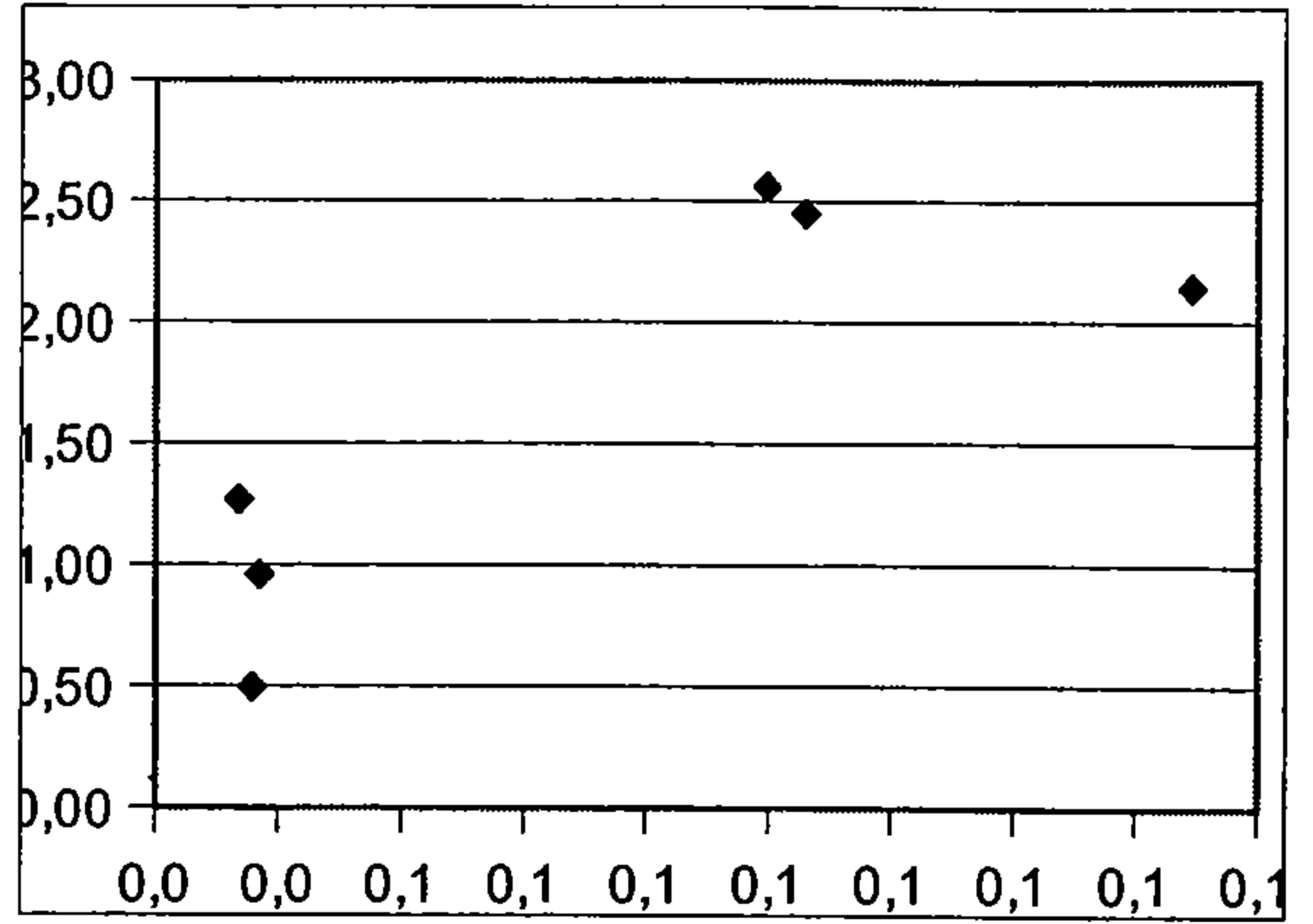
Graf 130: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,962$



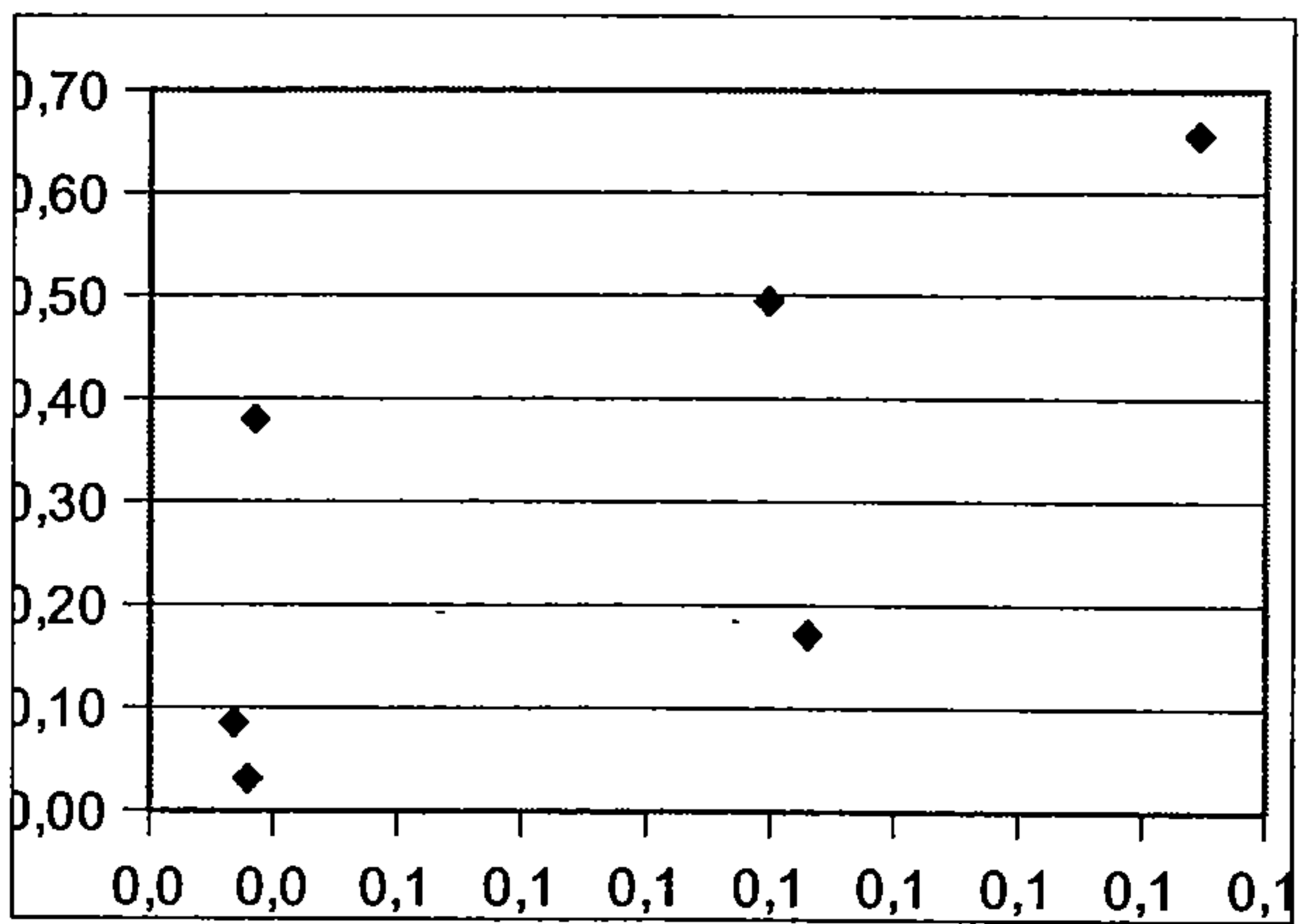
Graf 133: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,928$



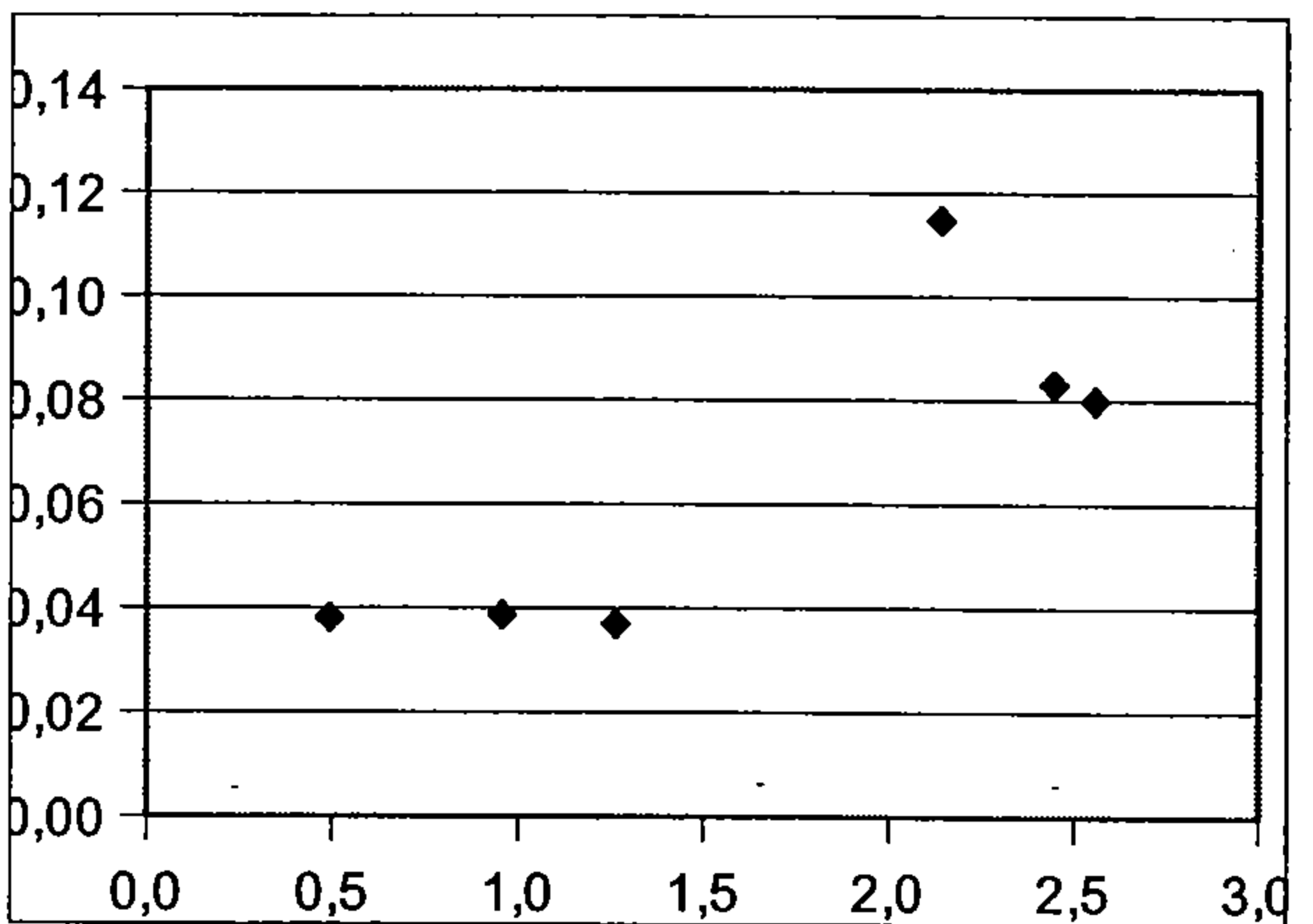
Graf 134: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R2 = 0,667$



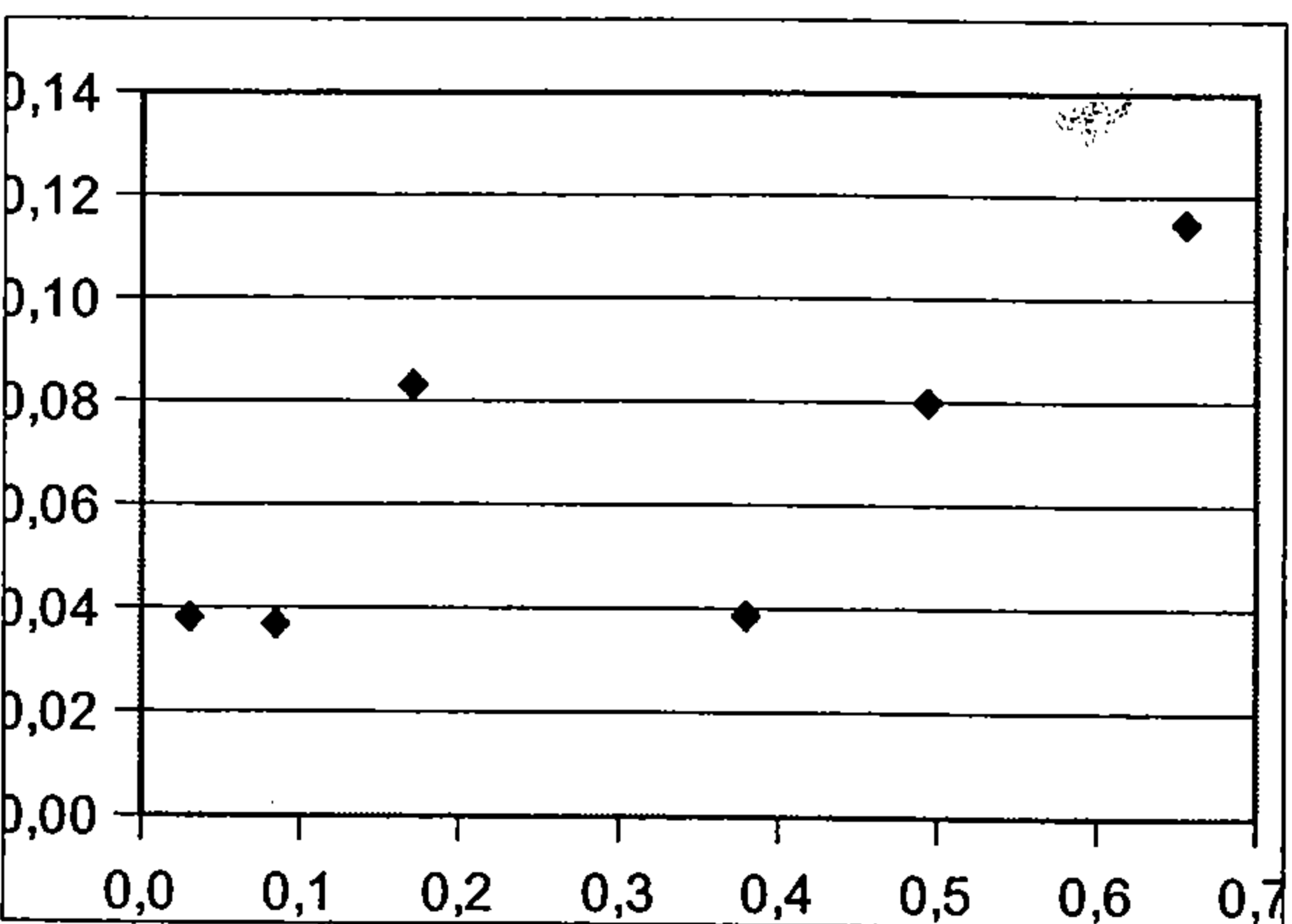
Graf 137: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R2 = 0,9$



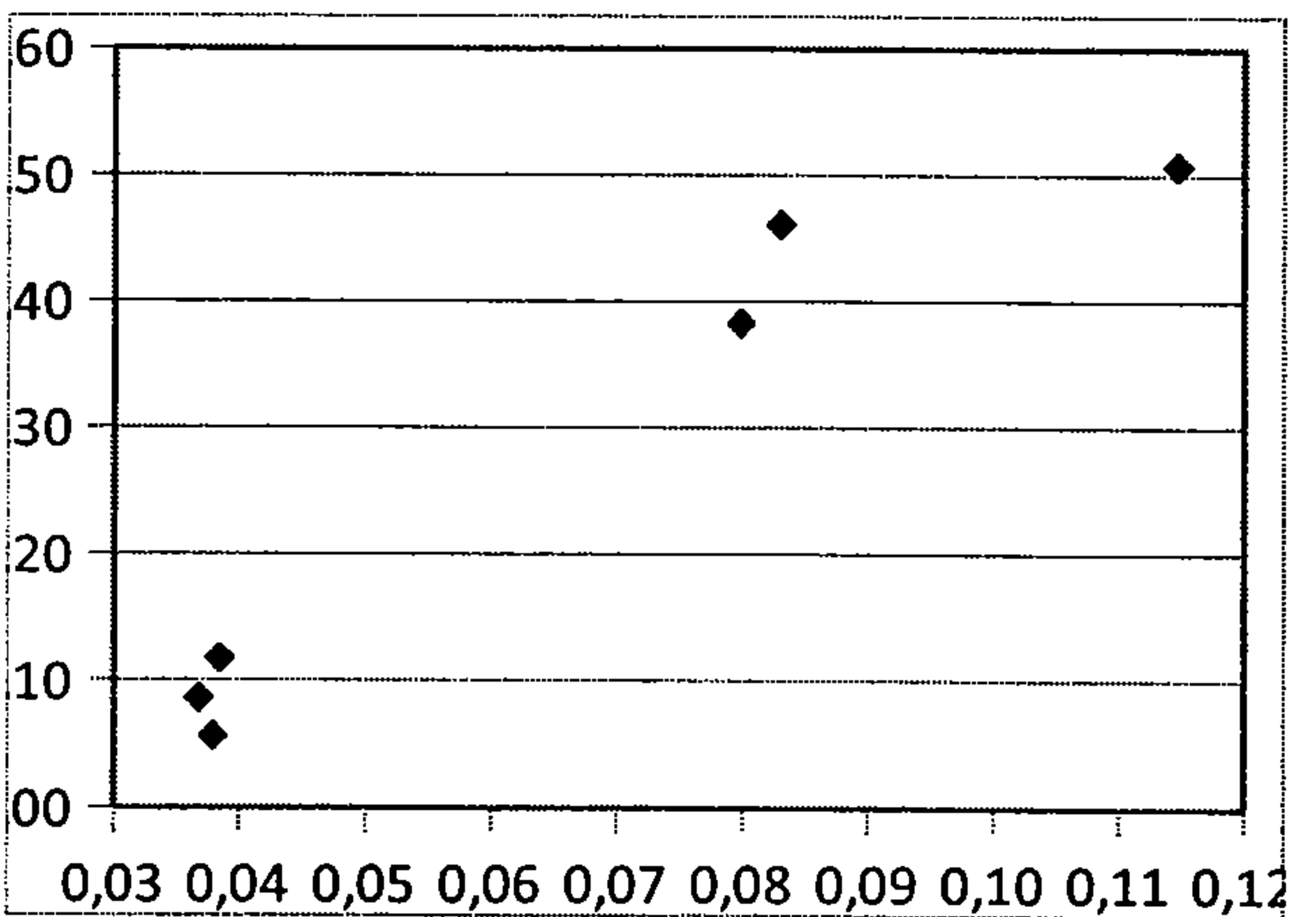
Graf 135: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R2 = 0,575$



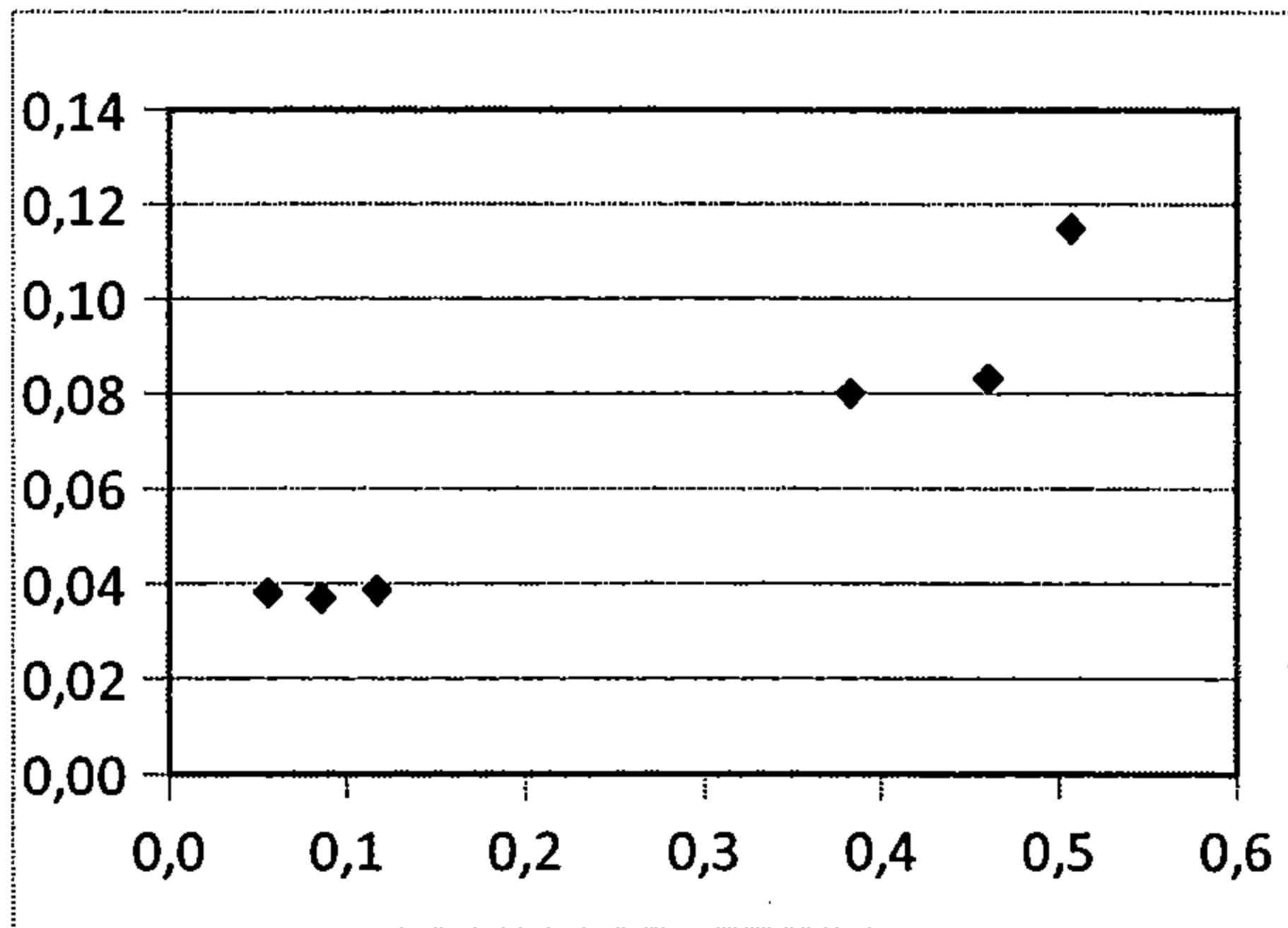
Graf 138: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R2 = 0,662$



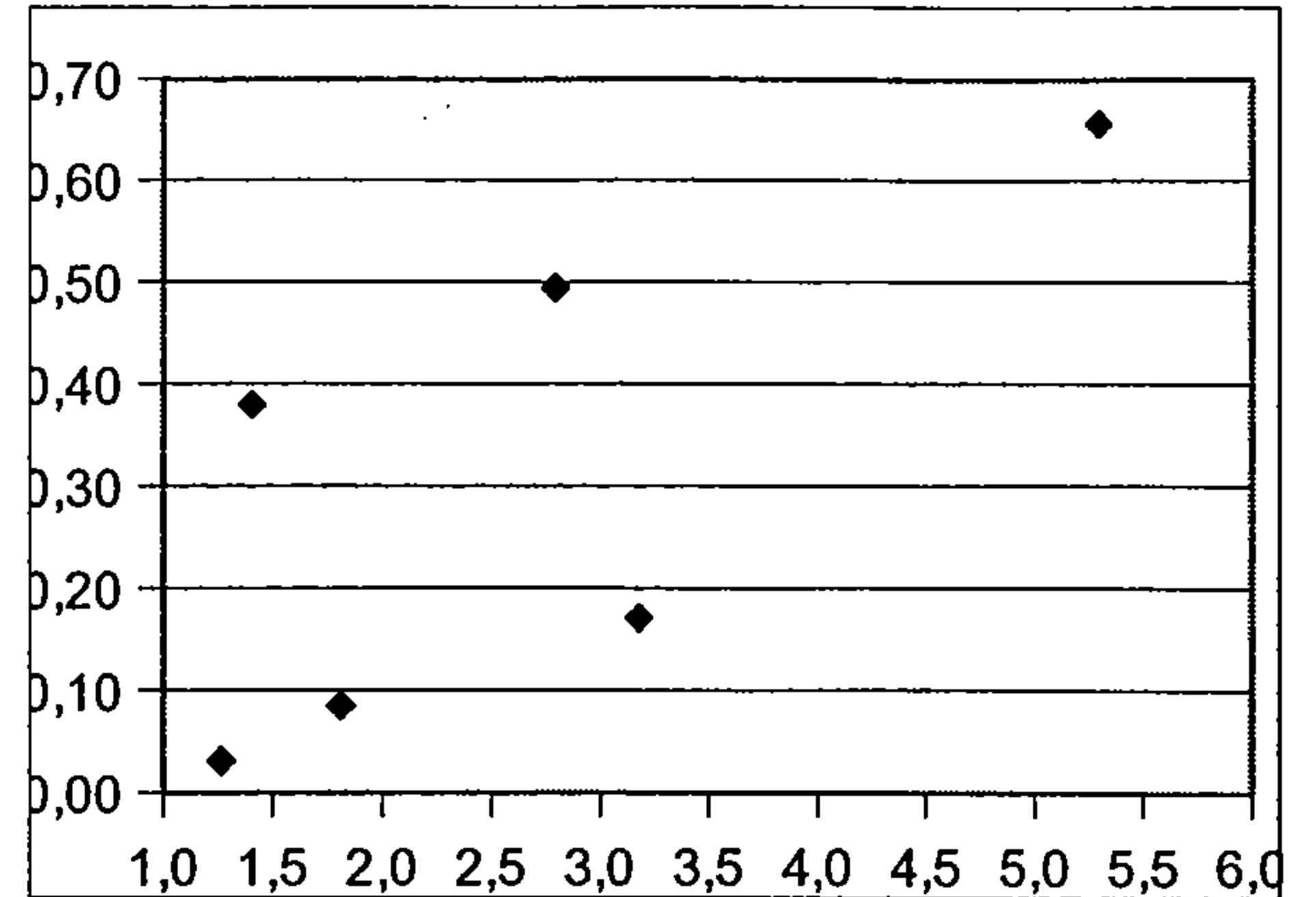
Graf 136: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R2 = 0,609$



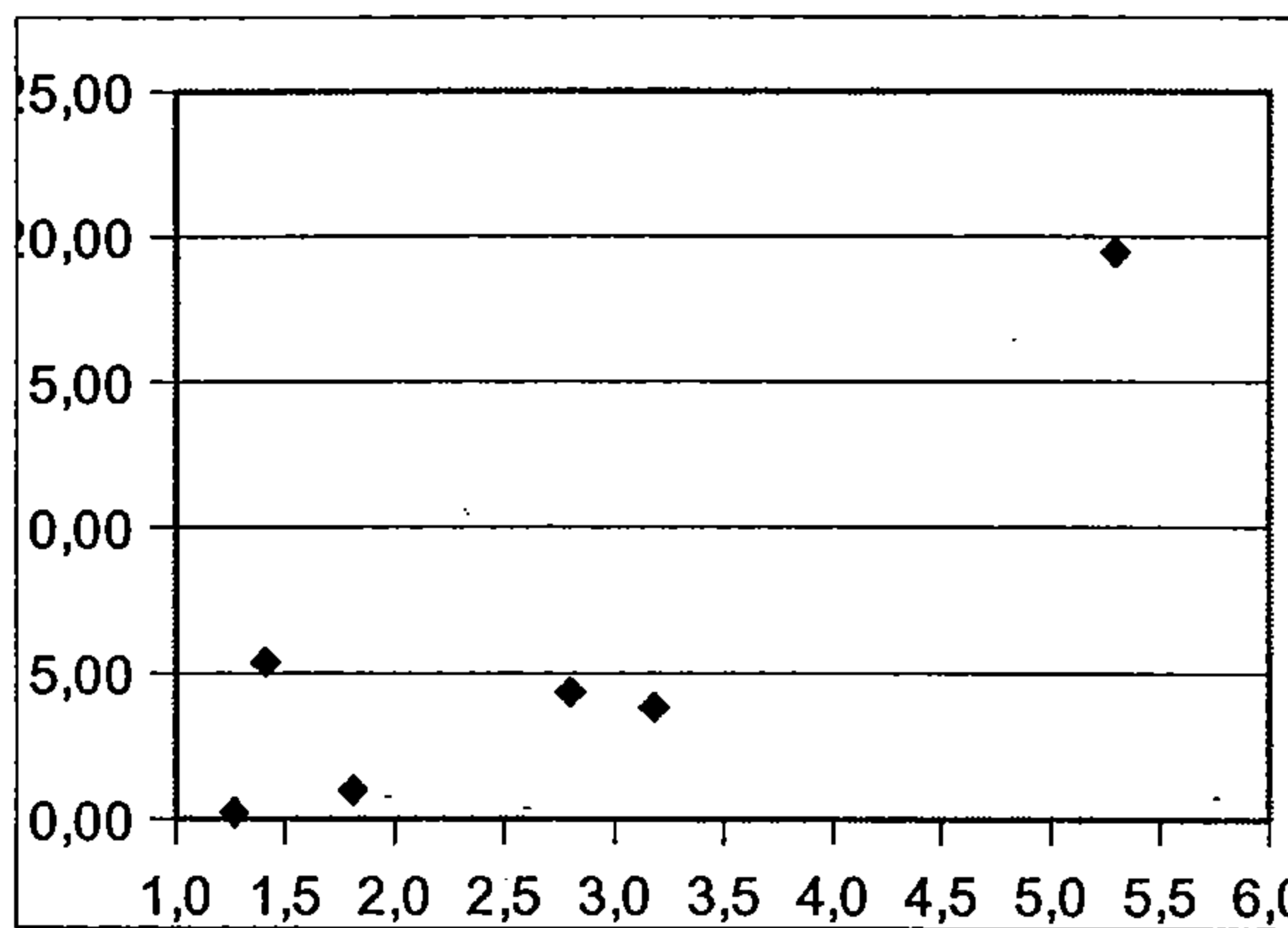
Graf 139: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R2 = 0,982$



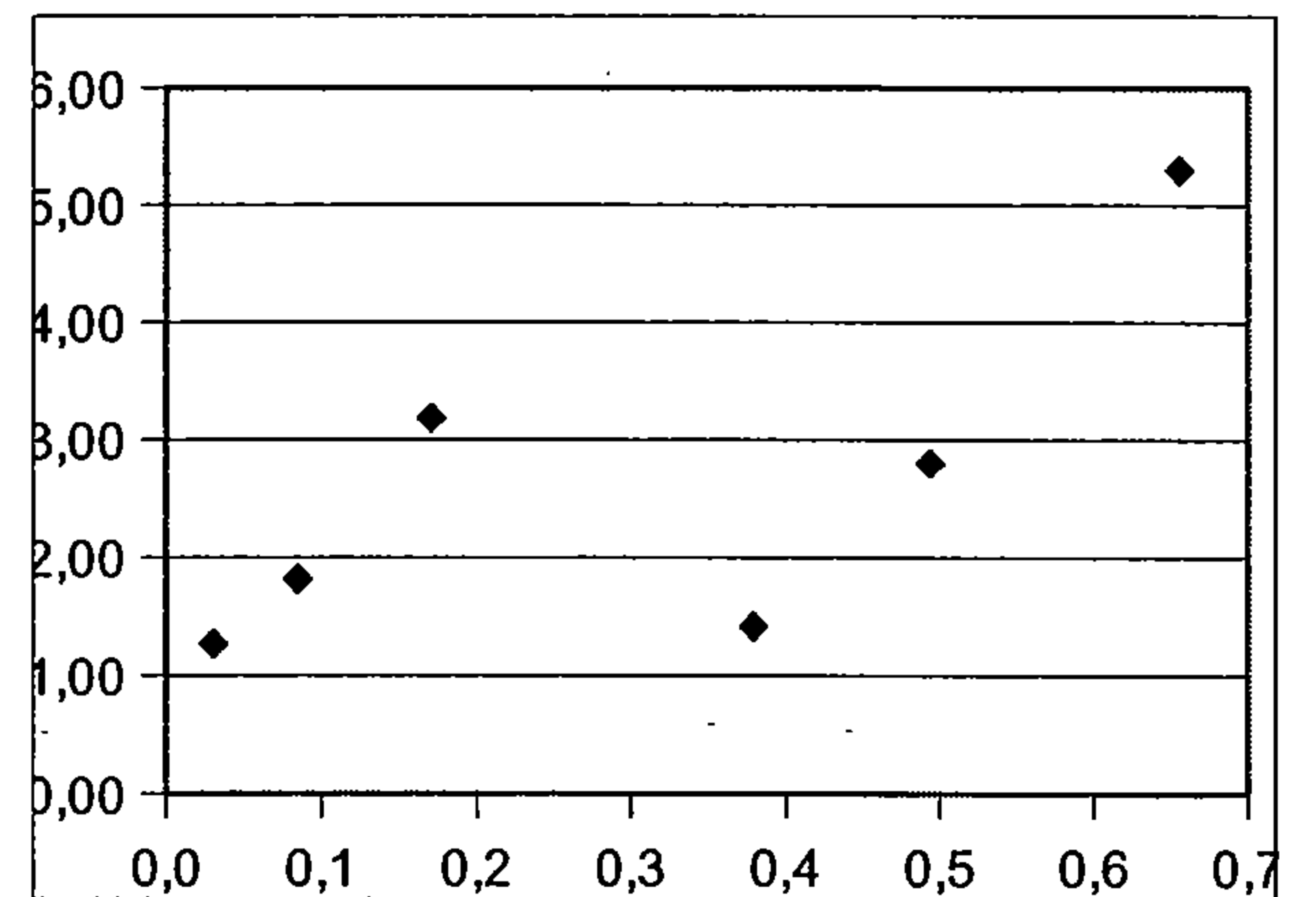
Graf 140: vliv obsahu zinku na obsah arsemu, $R^2 = 0,961$



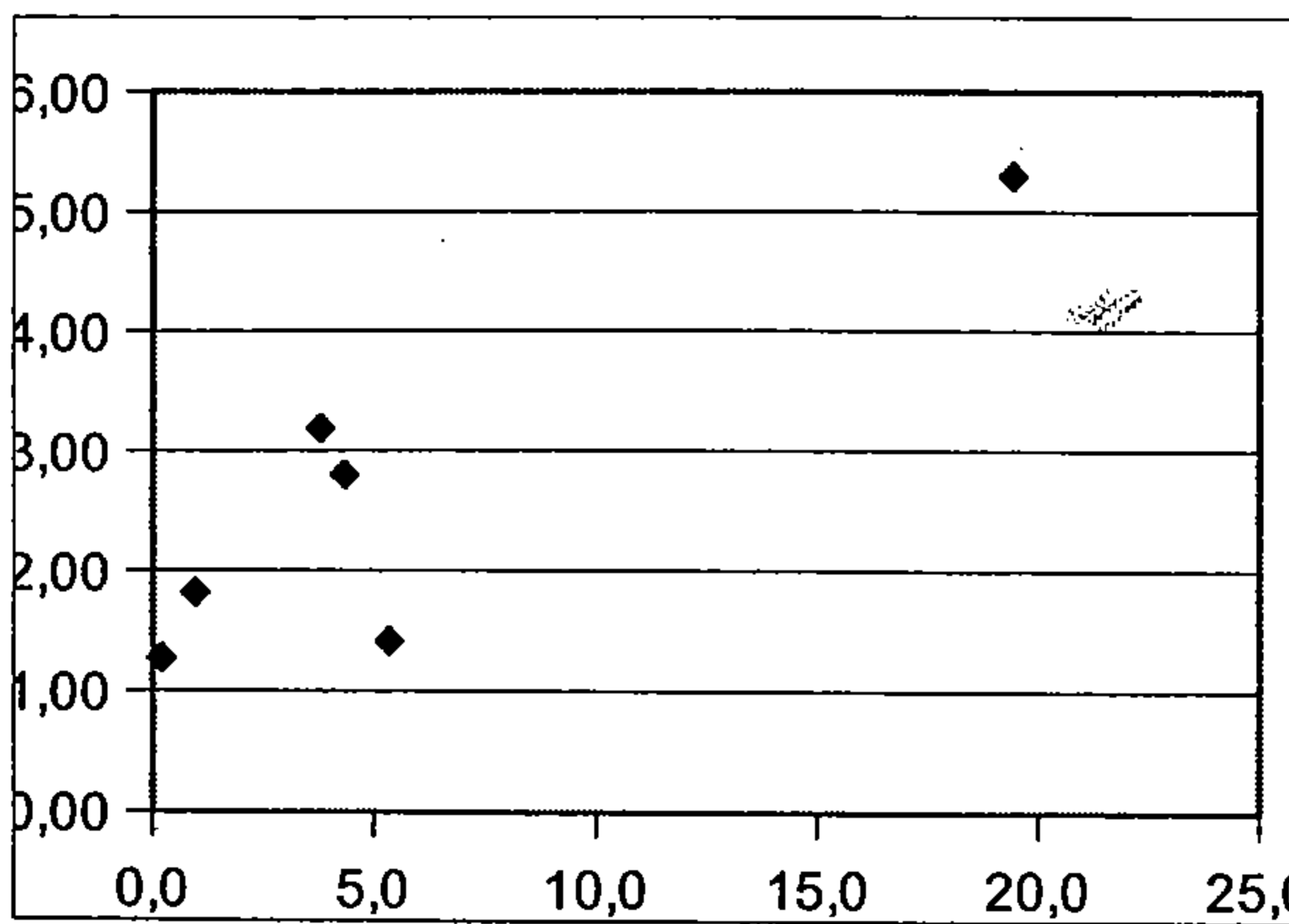
Graf 143: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,536$



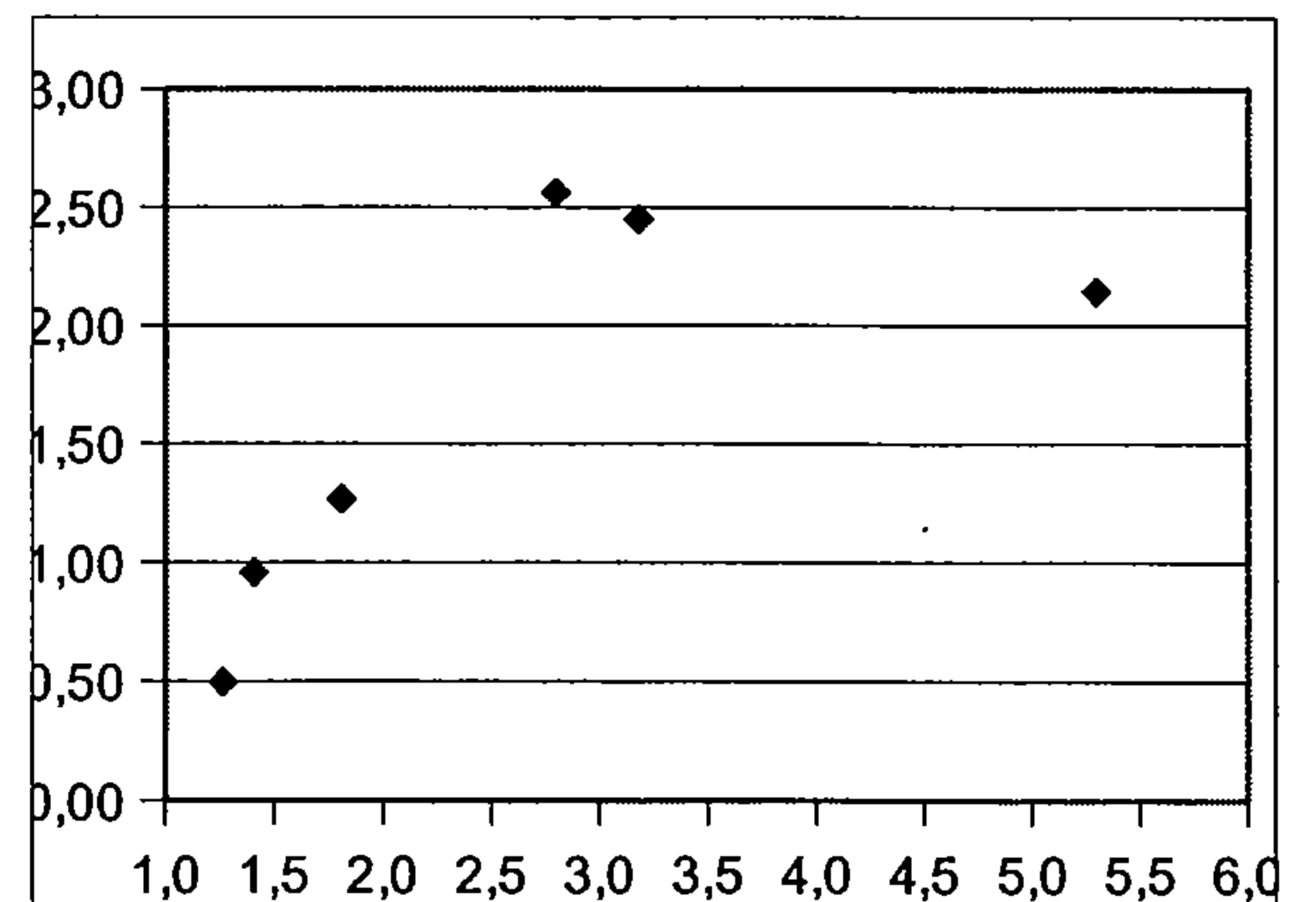
Graf 141: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,929$



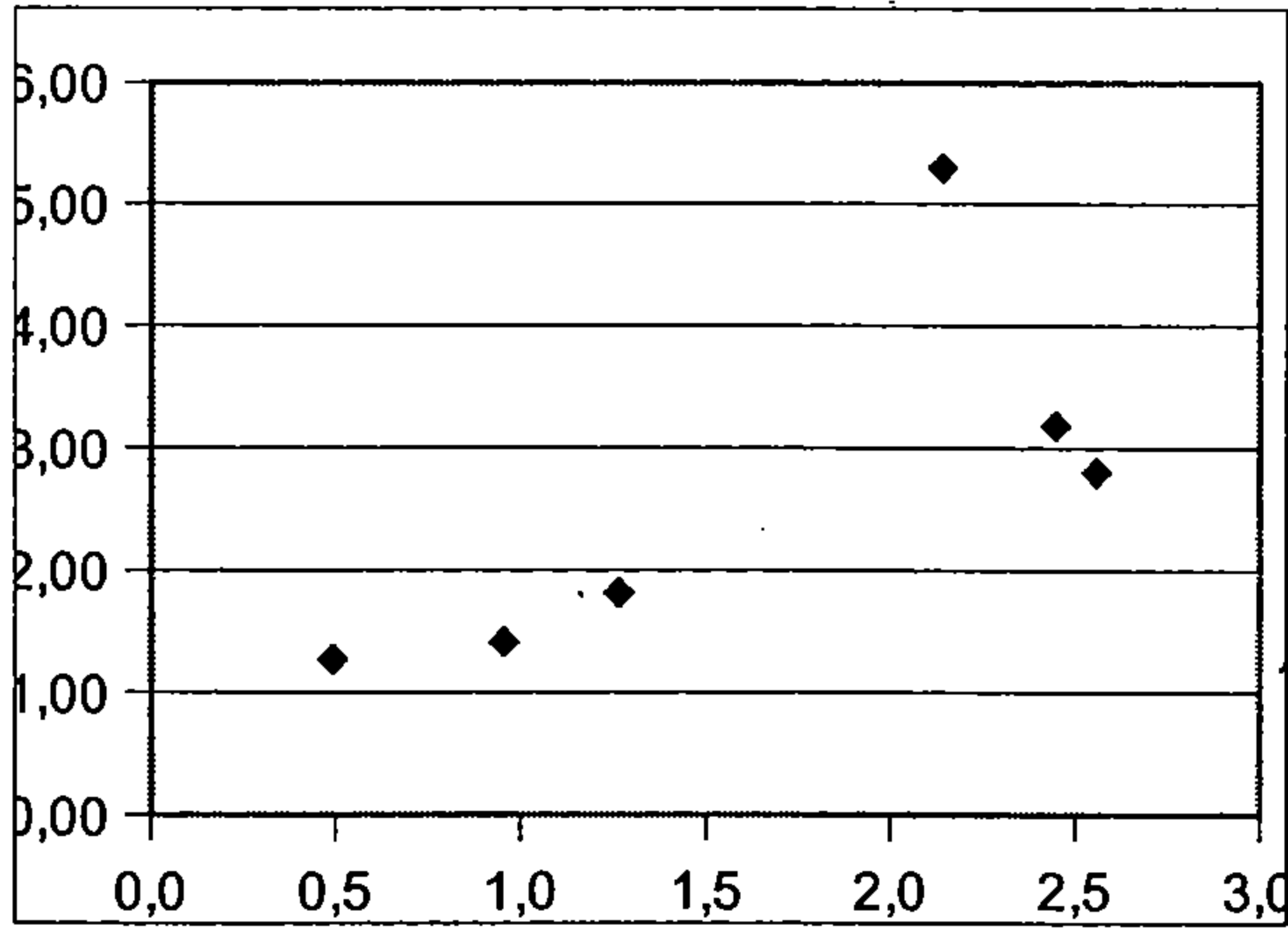
Graf 144: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,675$



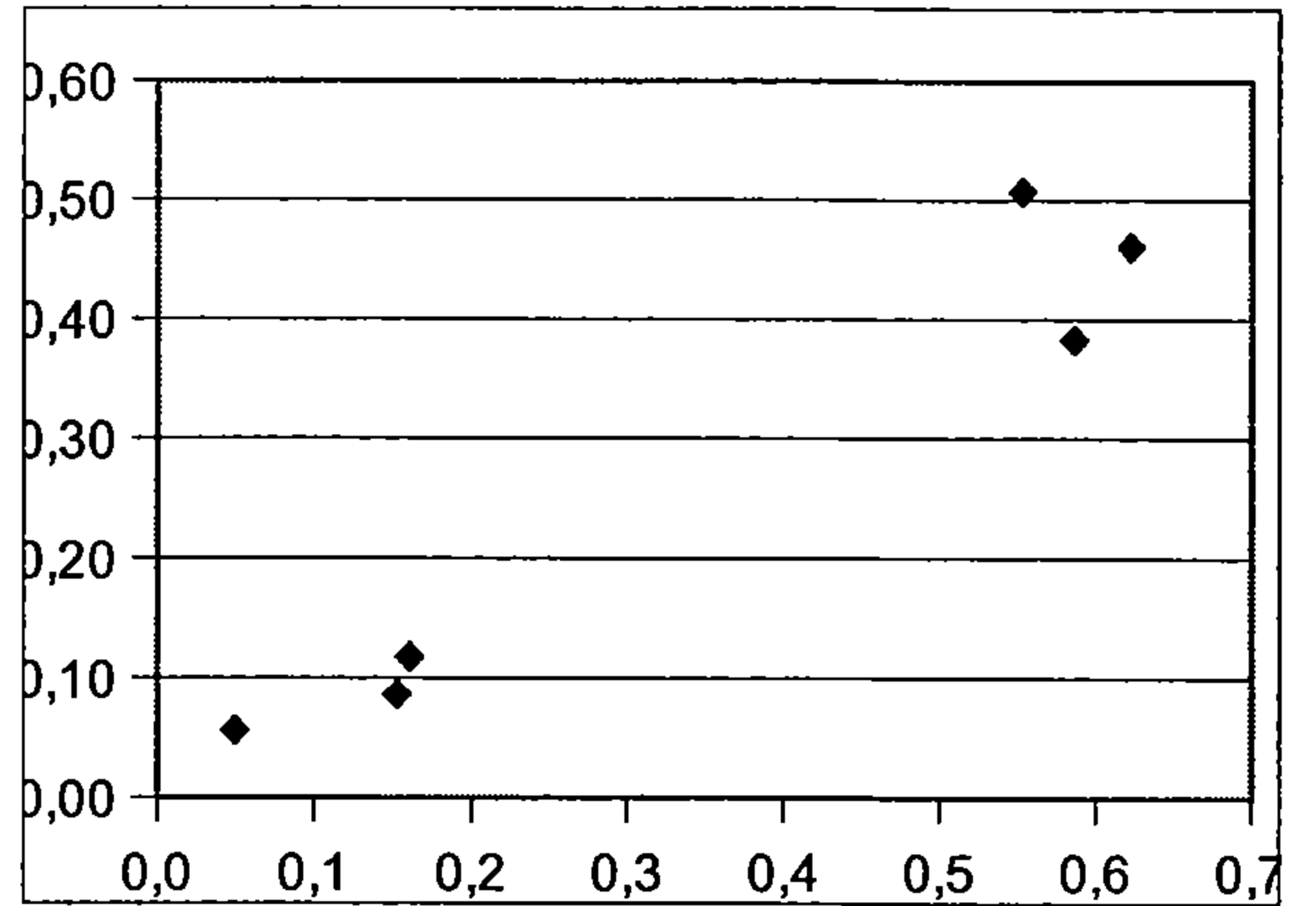
Graf 142: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,785$



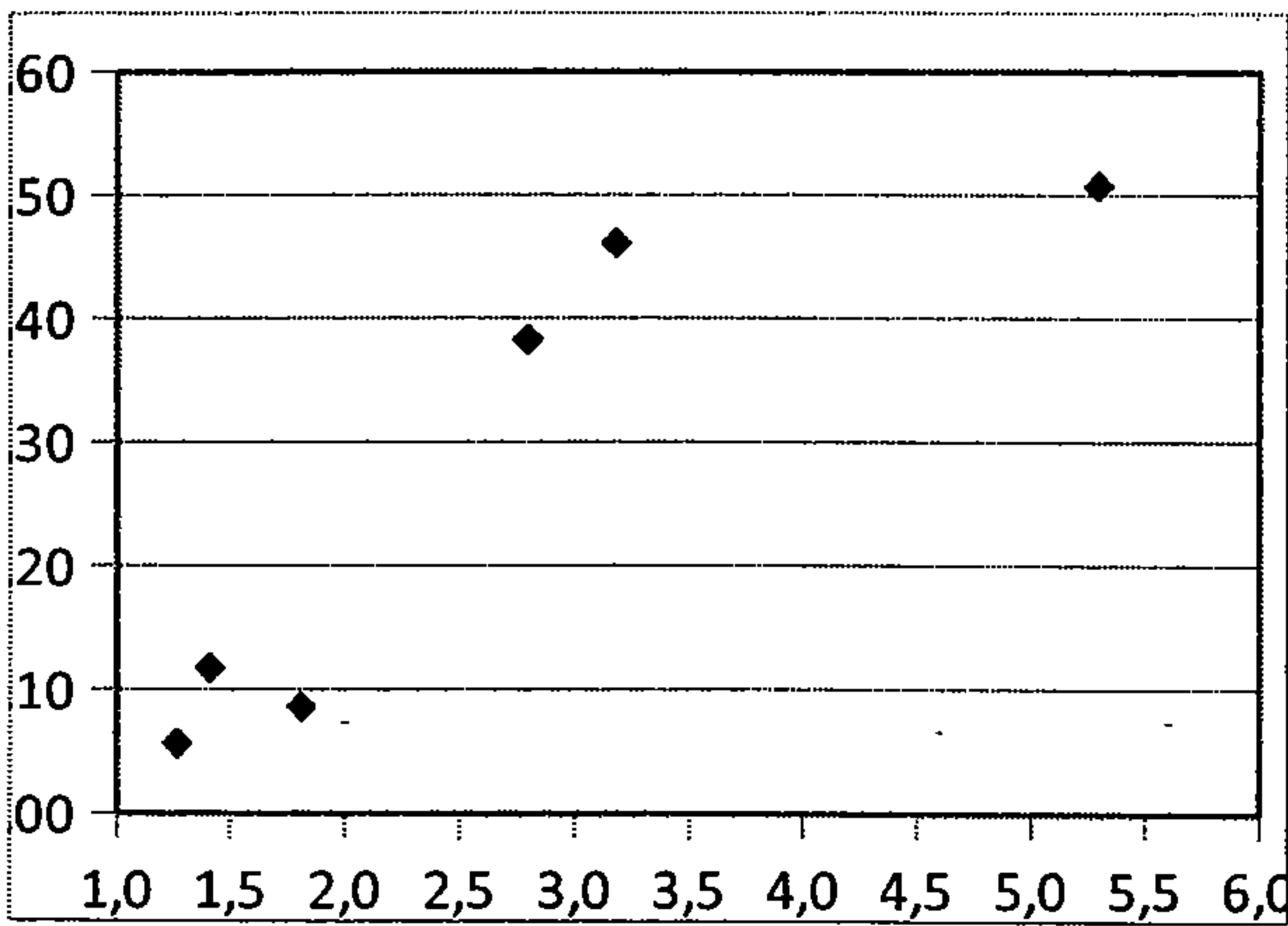
Graf 145: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,972$



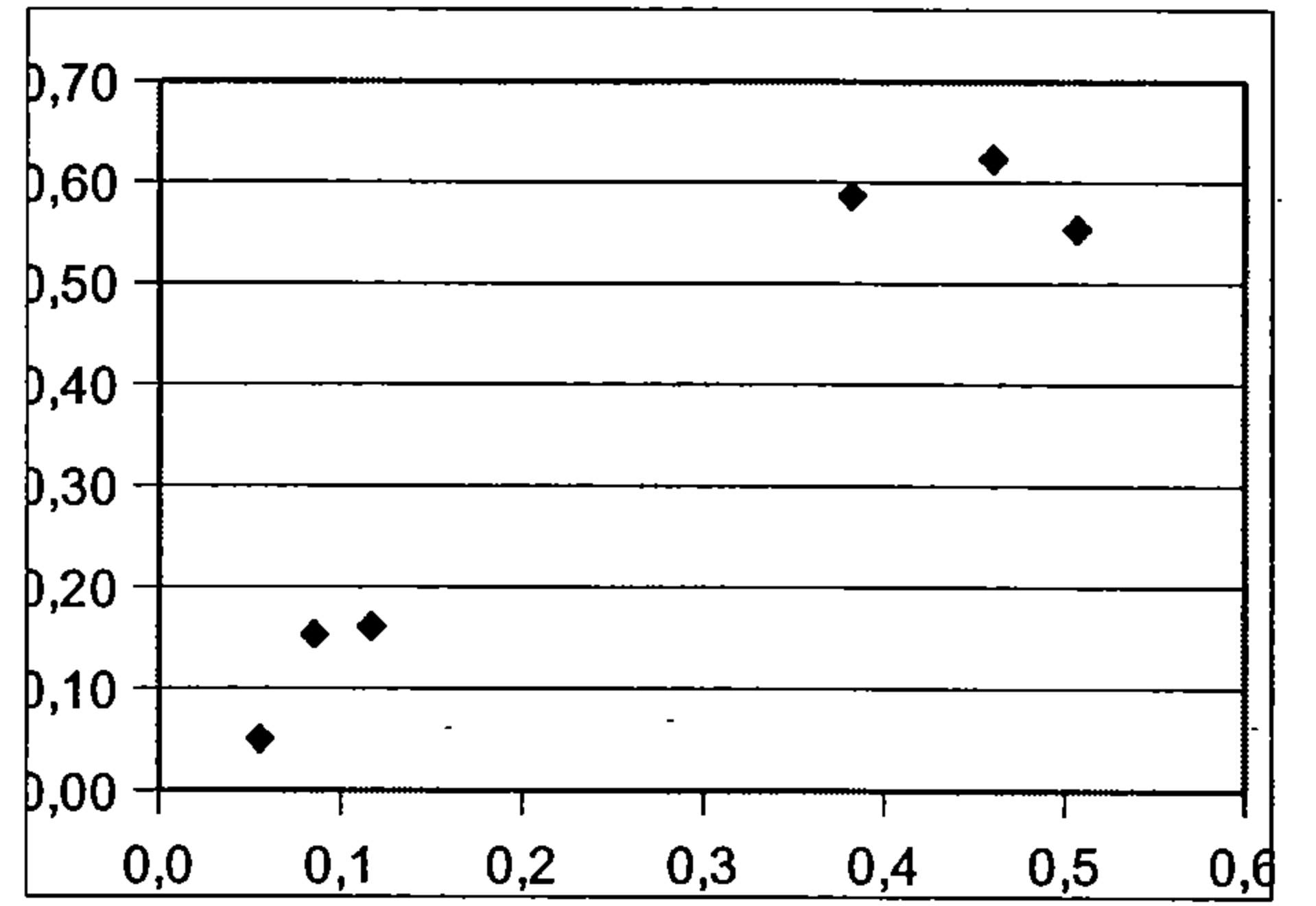
Graf 147: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,563$



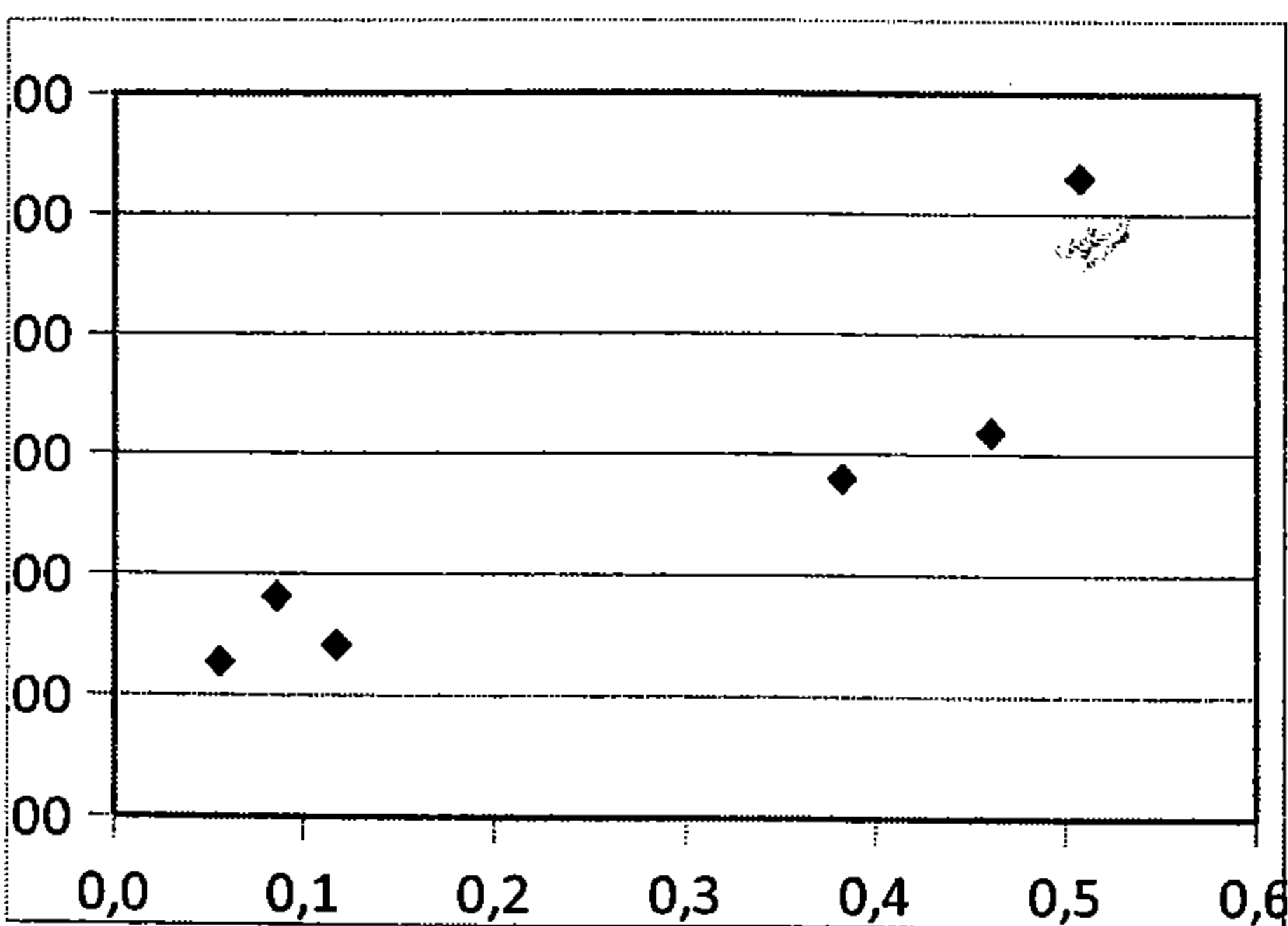
Graf 150: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,938$



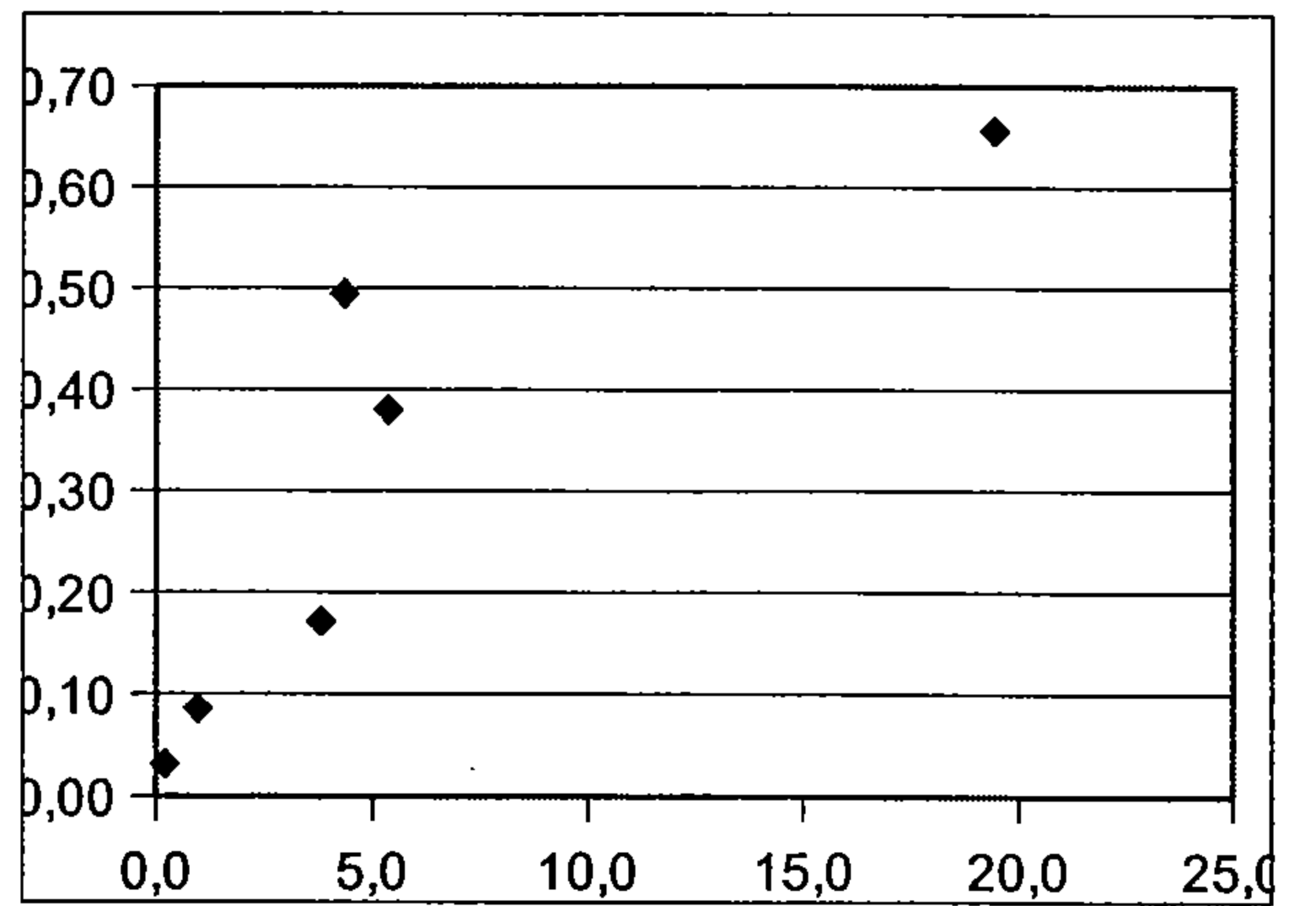
Graf 148: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,943$



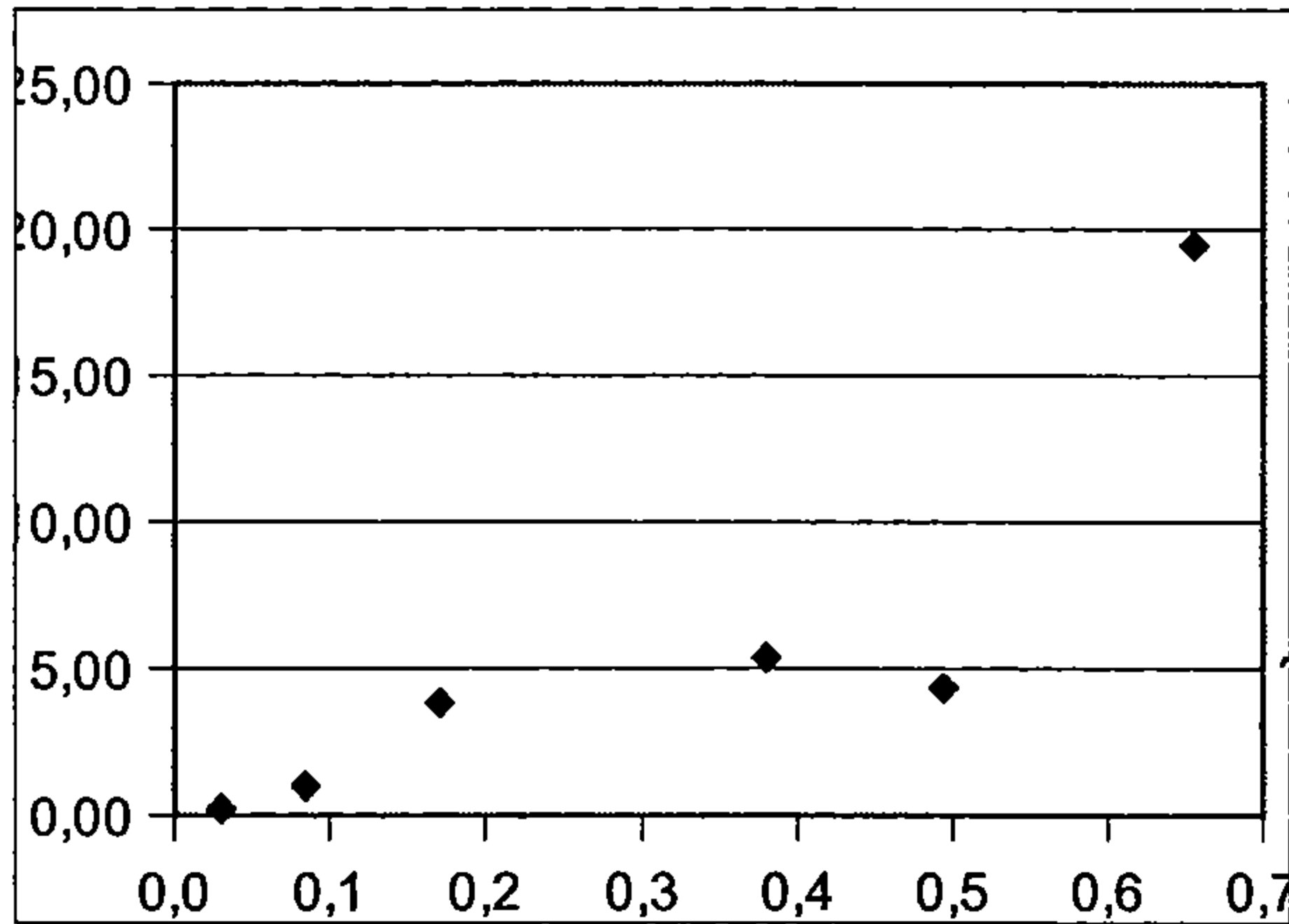
Graf 151: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,987$



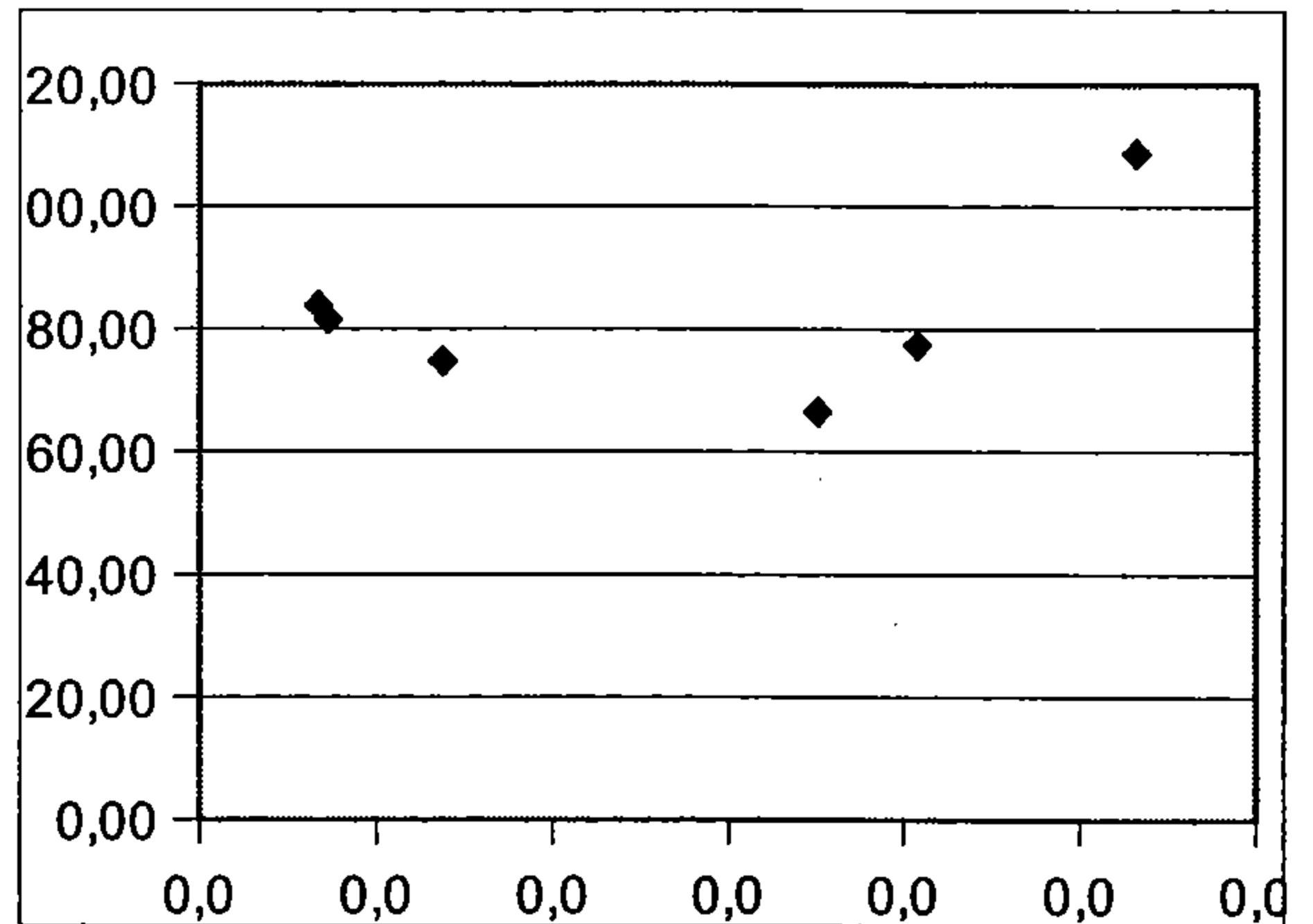
Graf 149: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,909$



Graf 152: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,862$

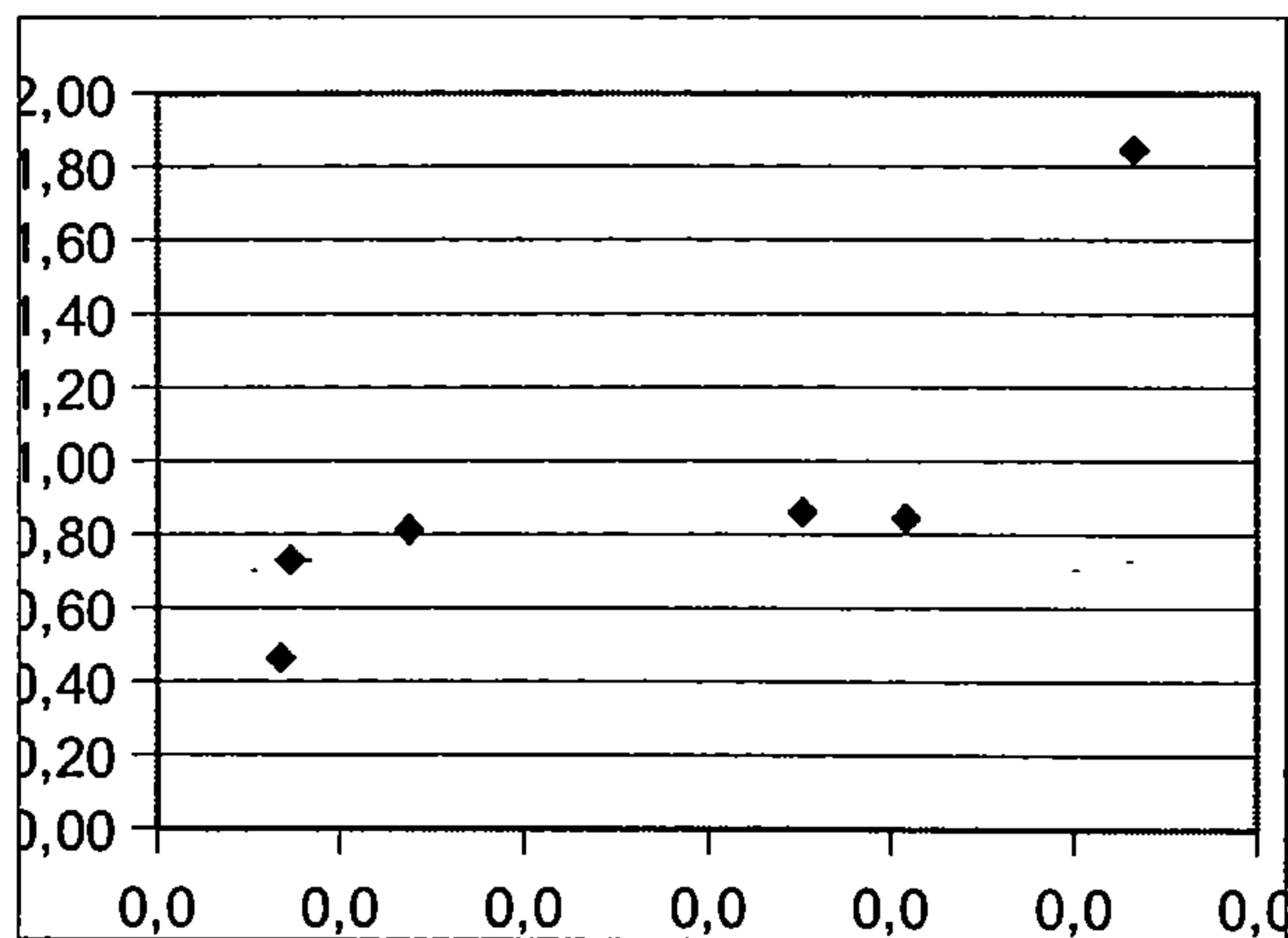


Graf 153: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,863$

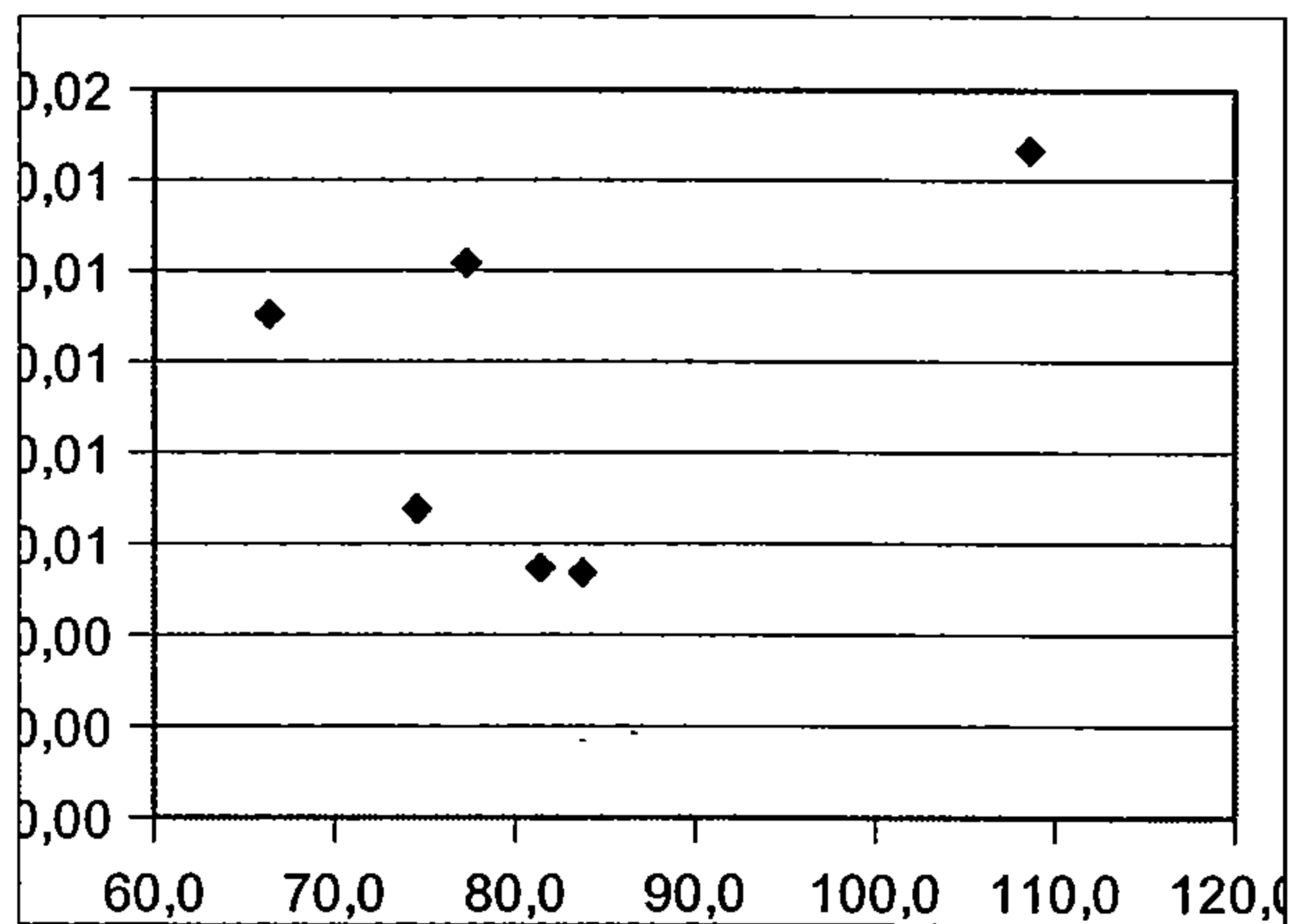


Graf 156: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,983$

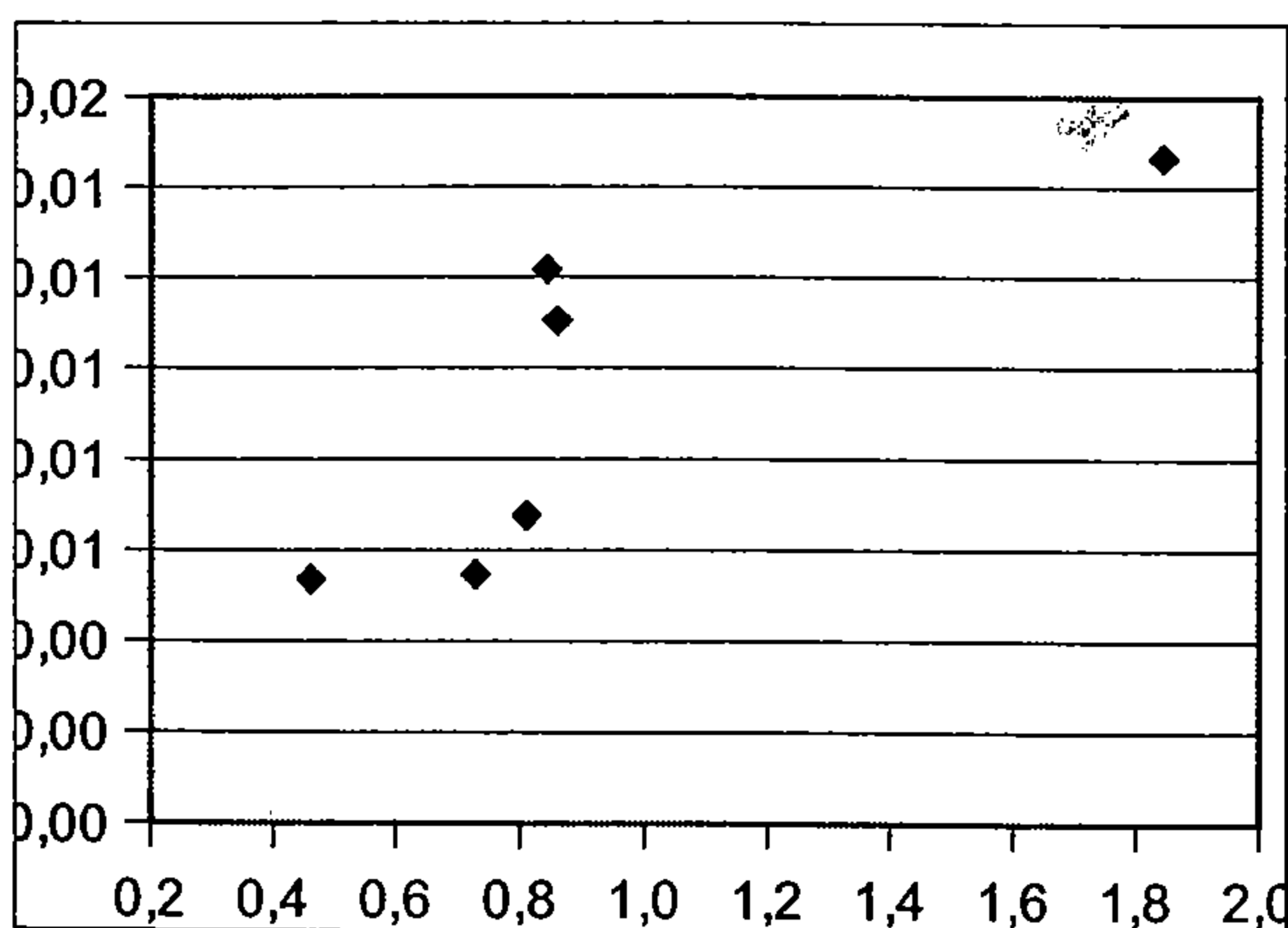
Korelace mezi prvky – frakce IX



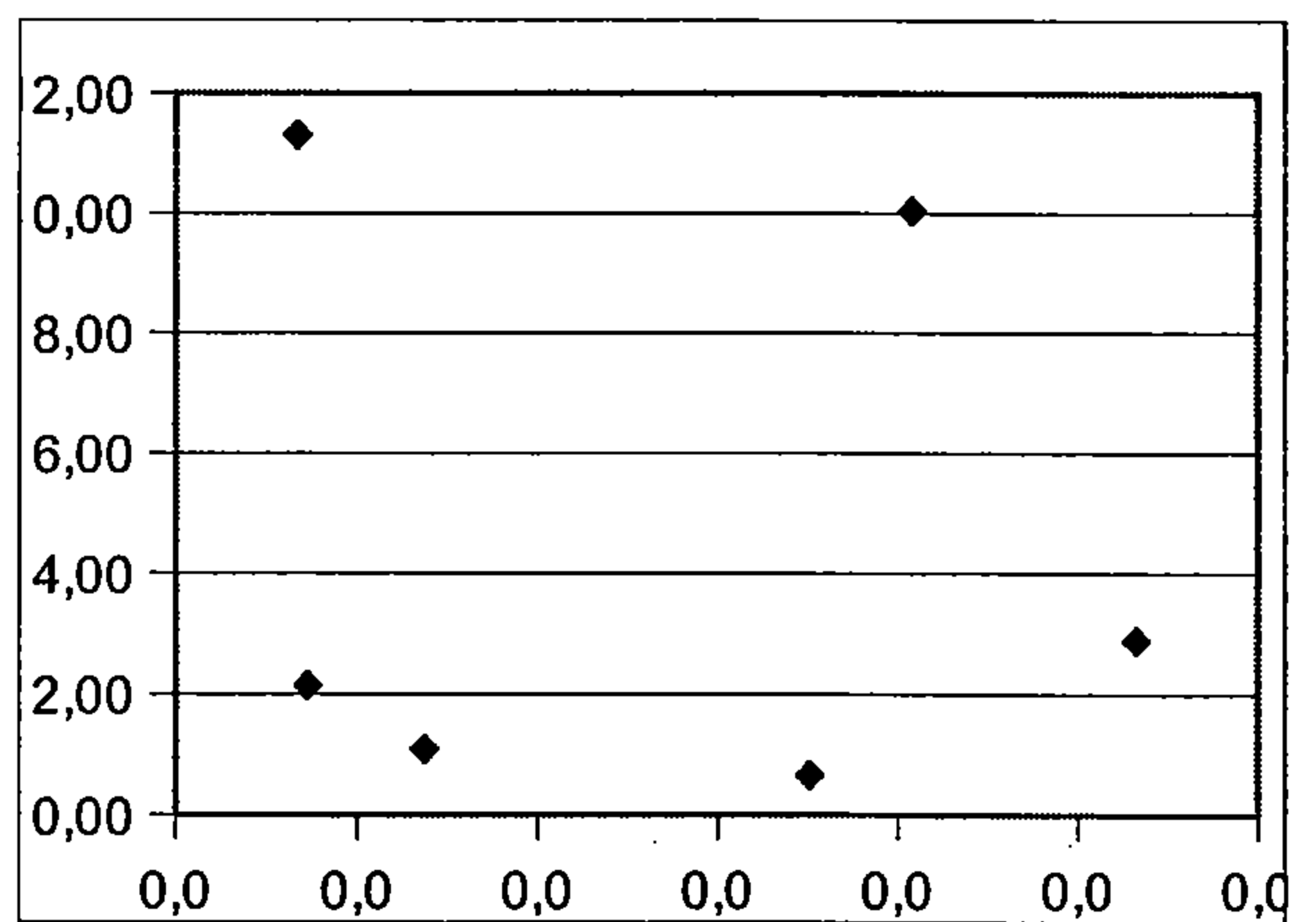
Graf 154: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,856$



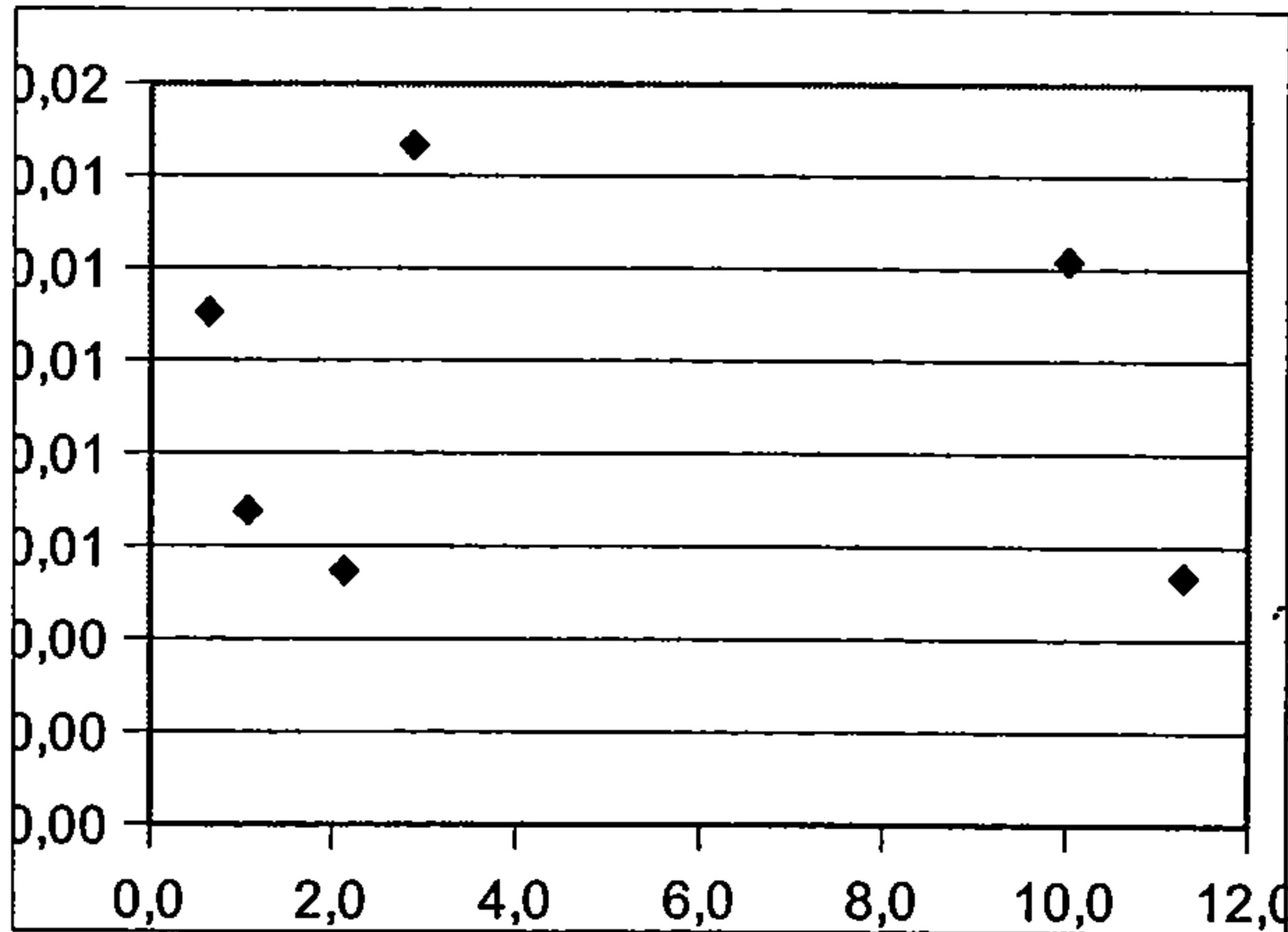
Graf 157: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,637$



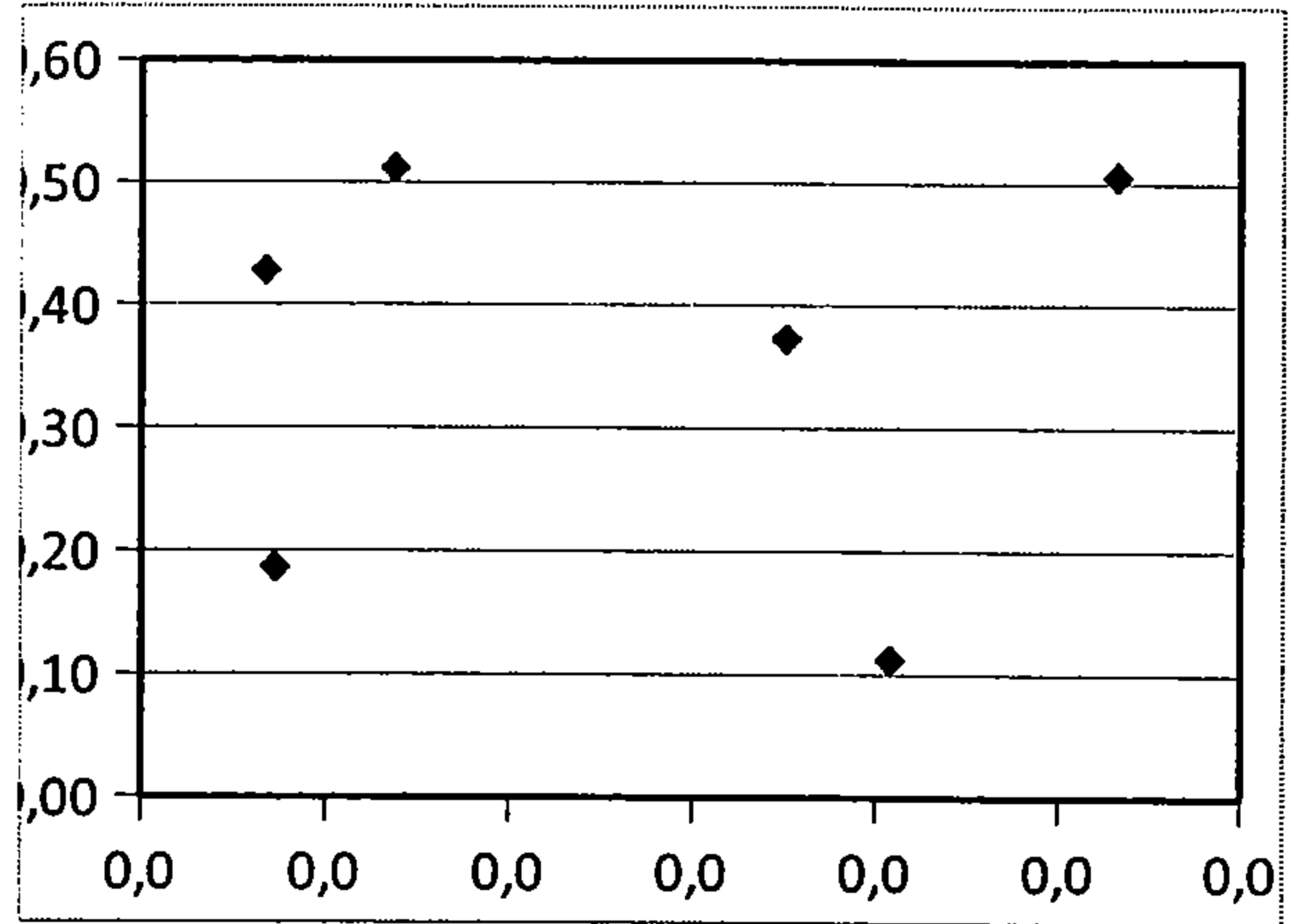
Graf 155: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,704$



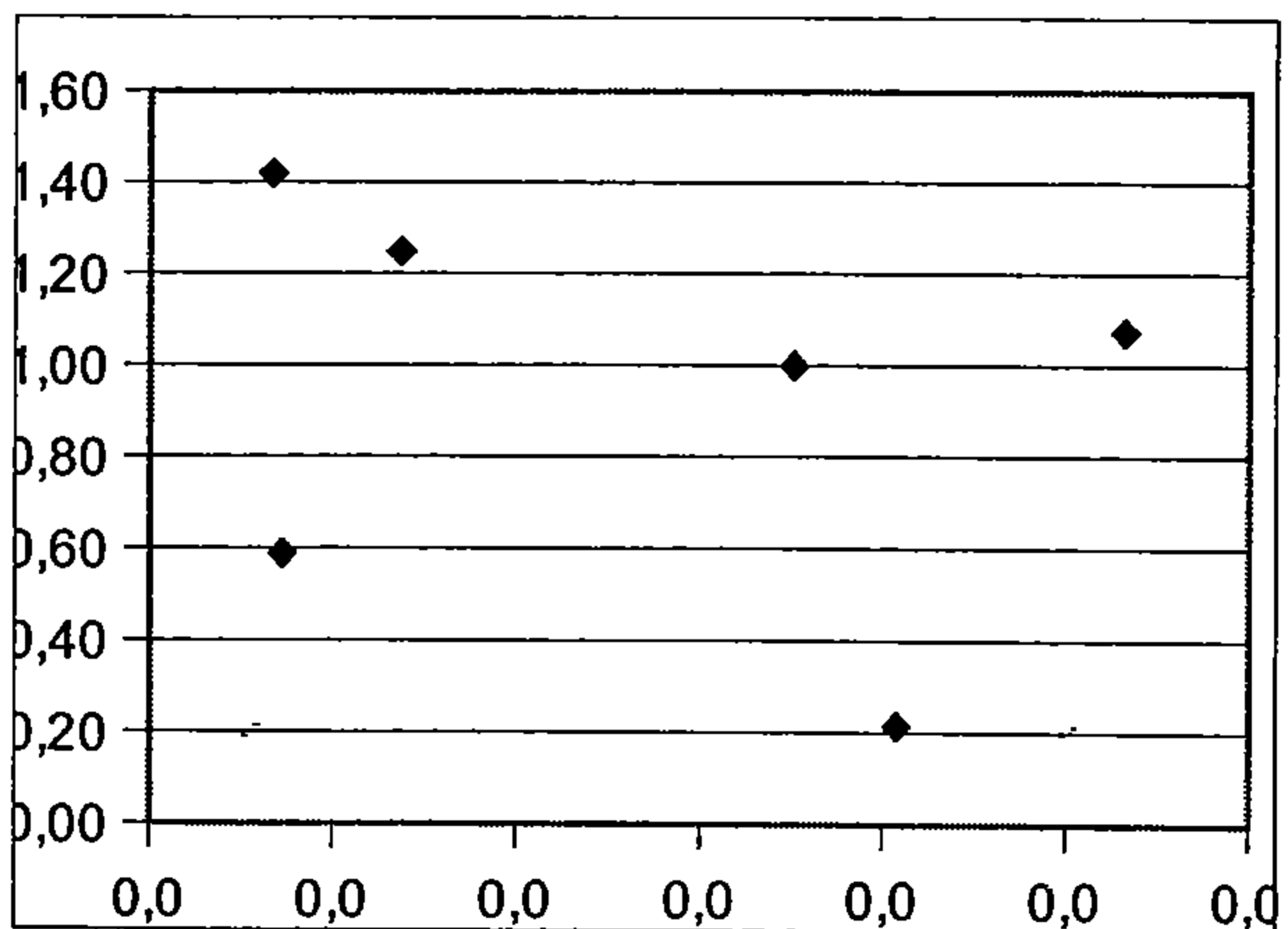
Graf 158: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,027$



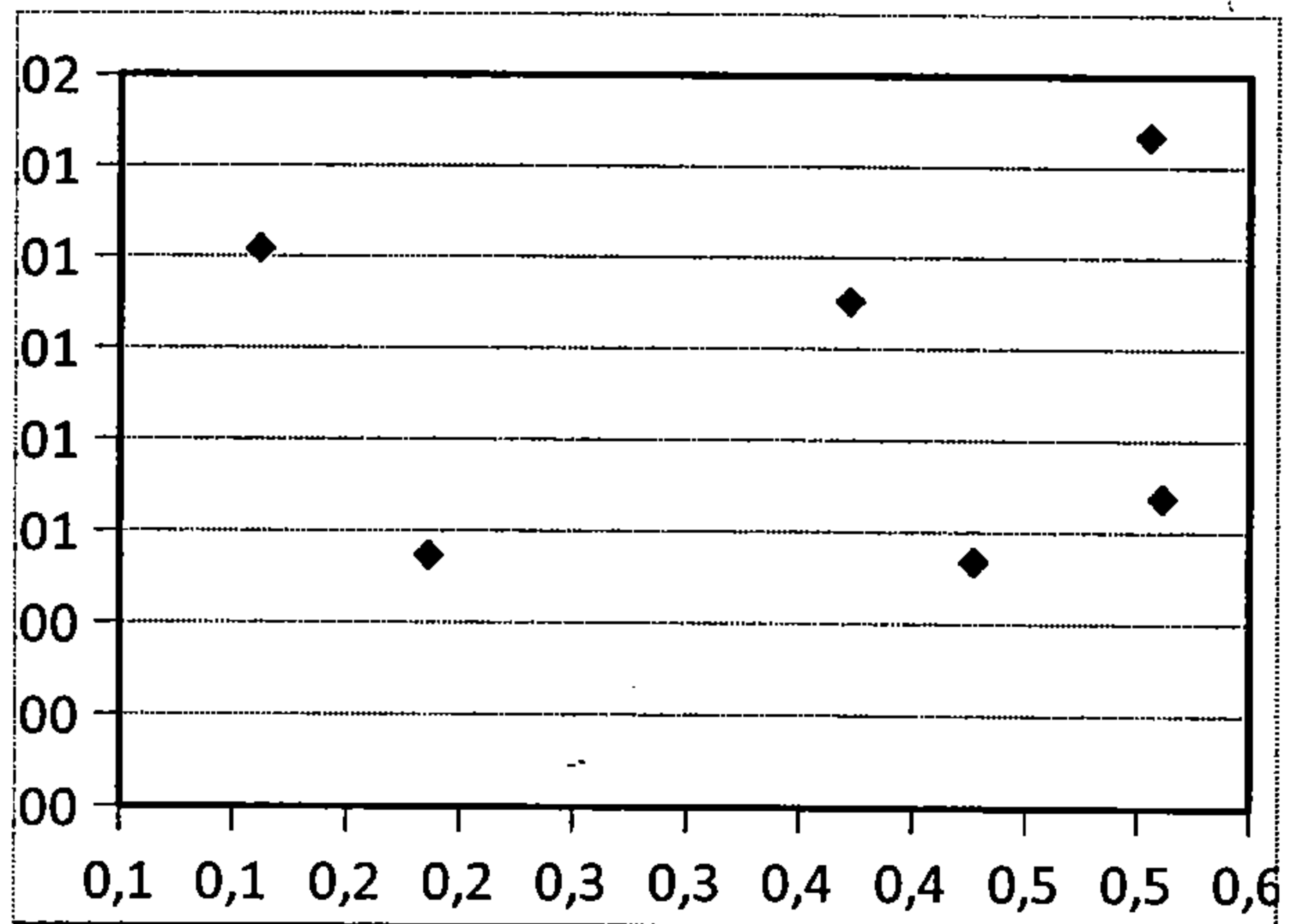
Graf 159: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,239$



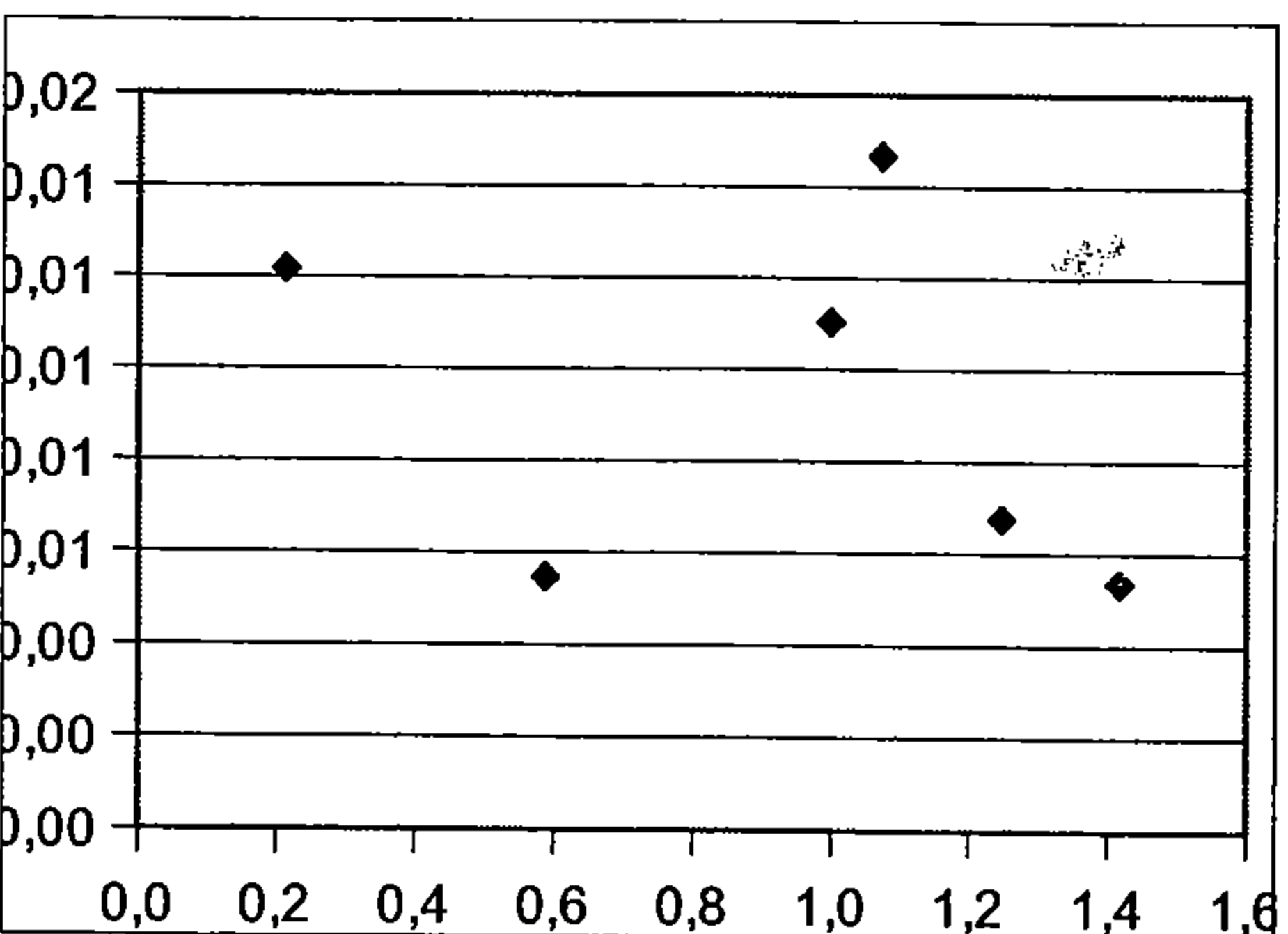
Graf 162: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,086$



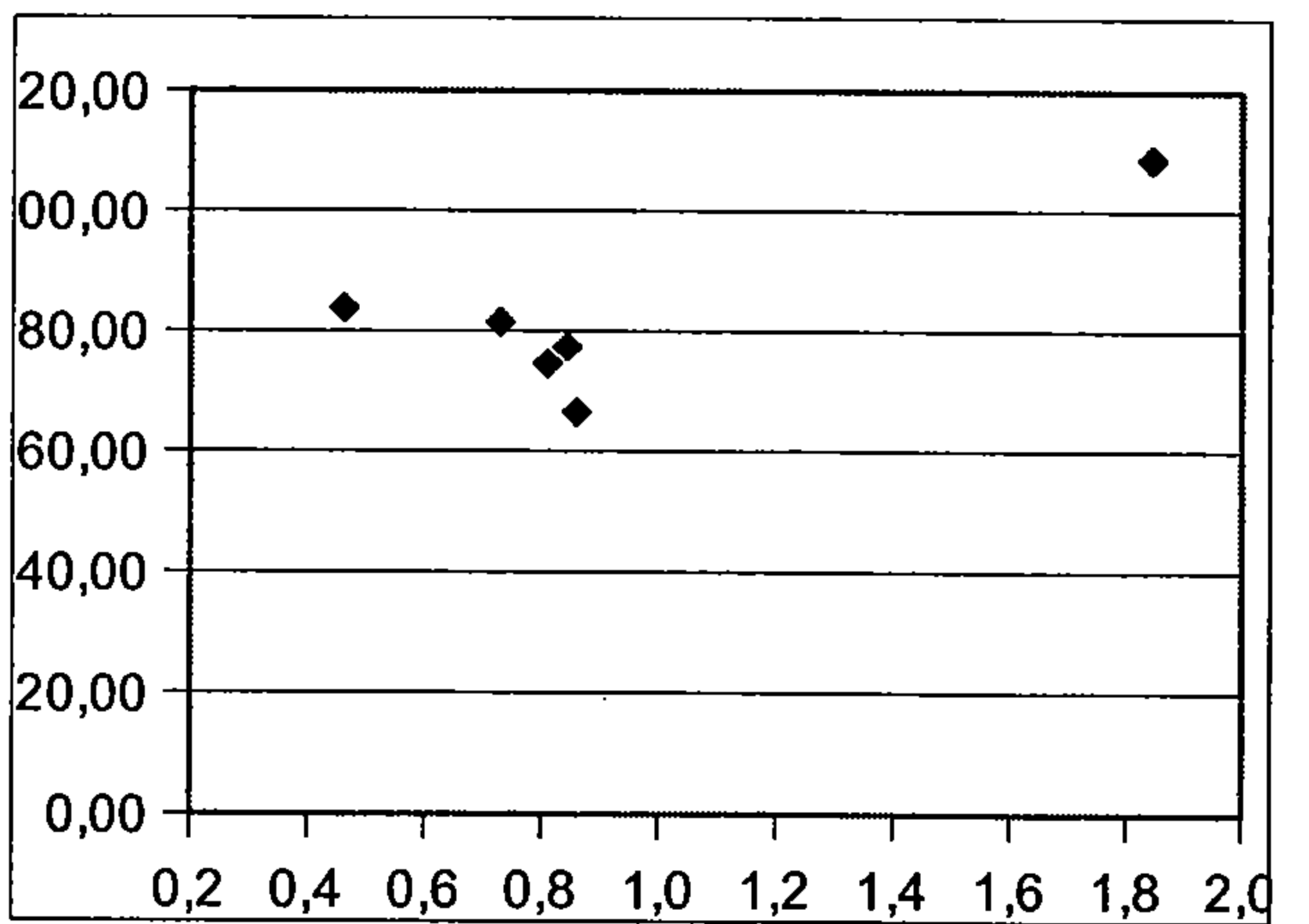
Graf 160: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R^2 = 0,162$



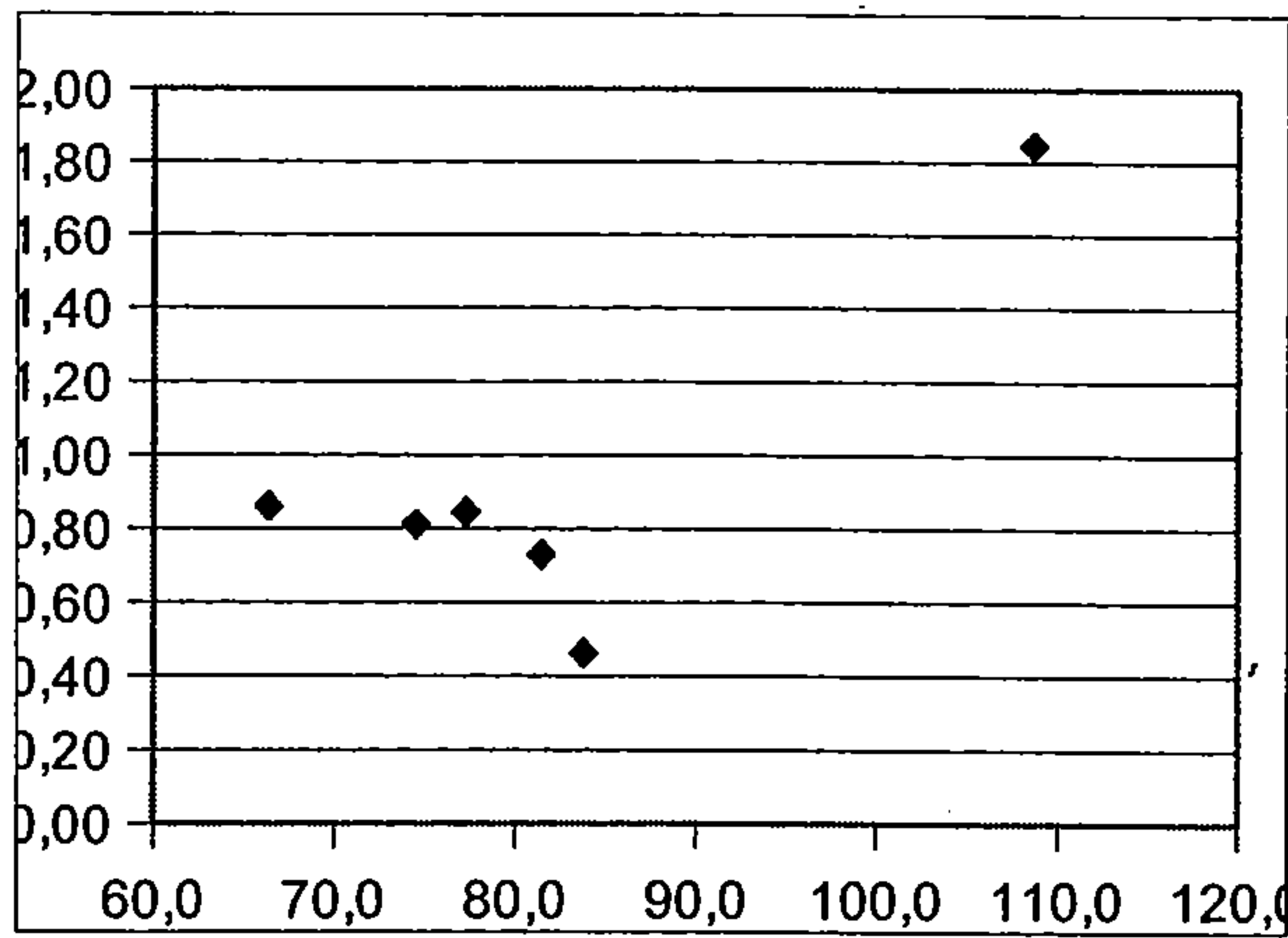
Graf 163: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,14$



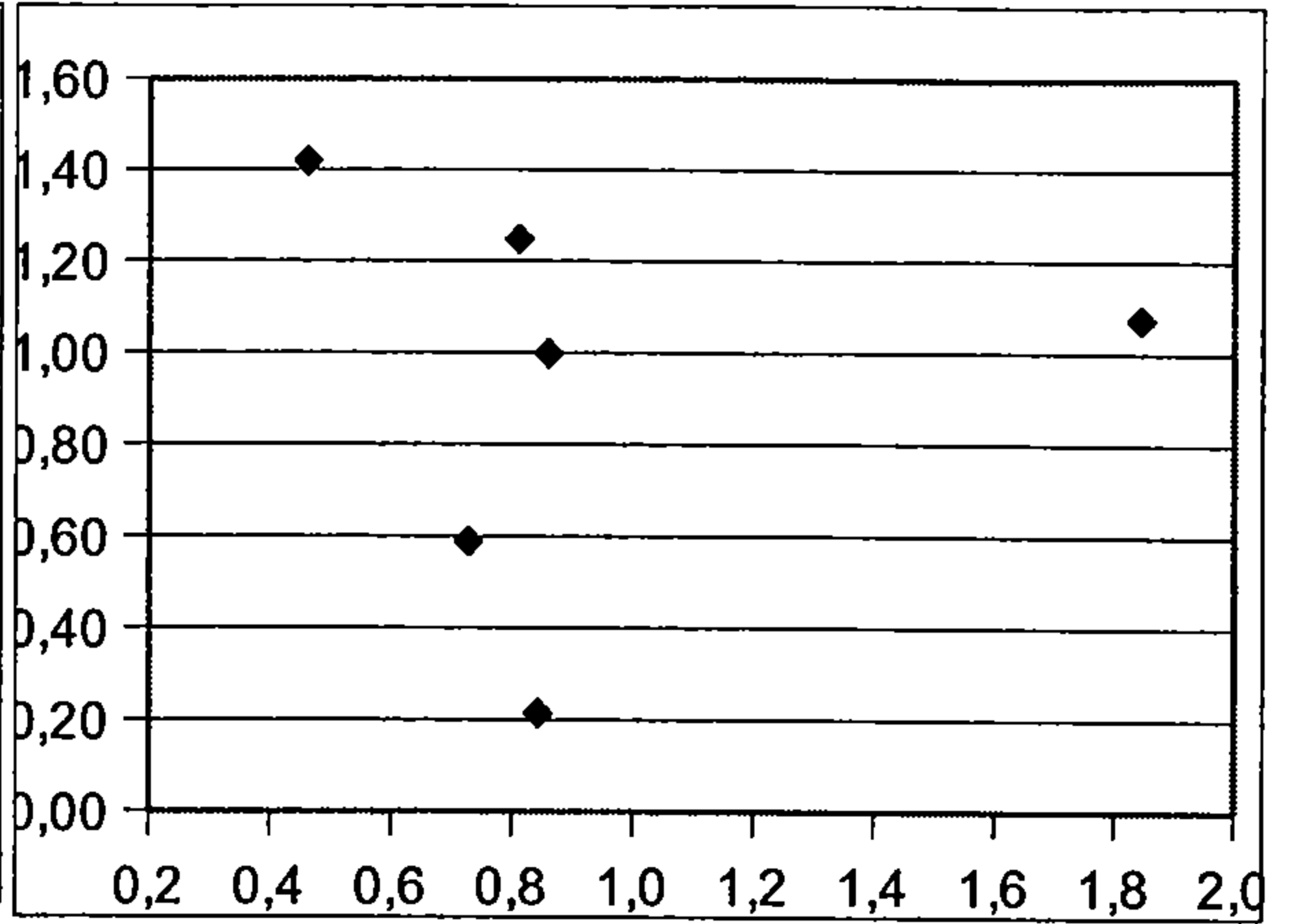
Graf 161: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,134$



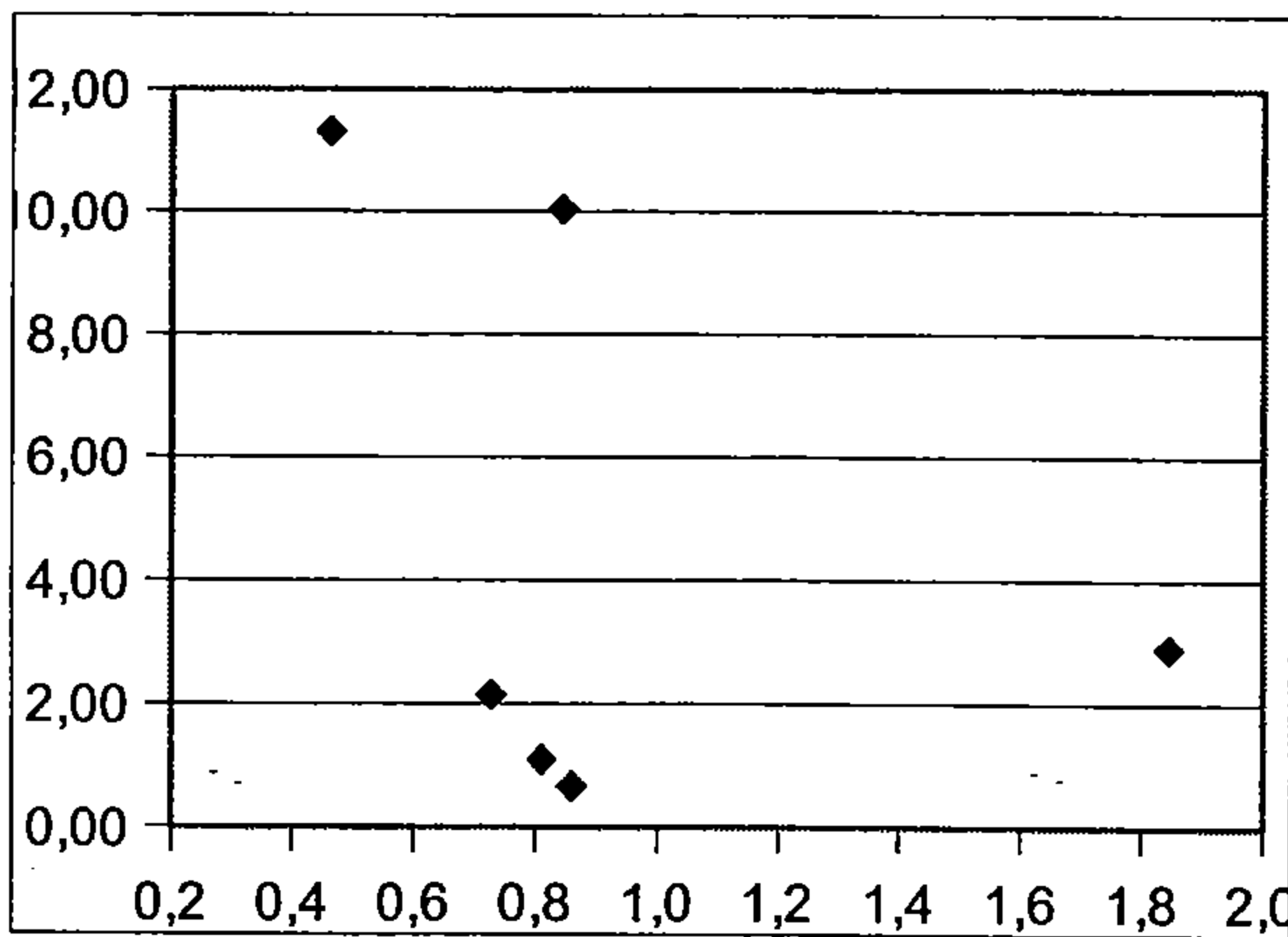
Graf 164: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,905$



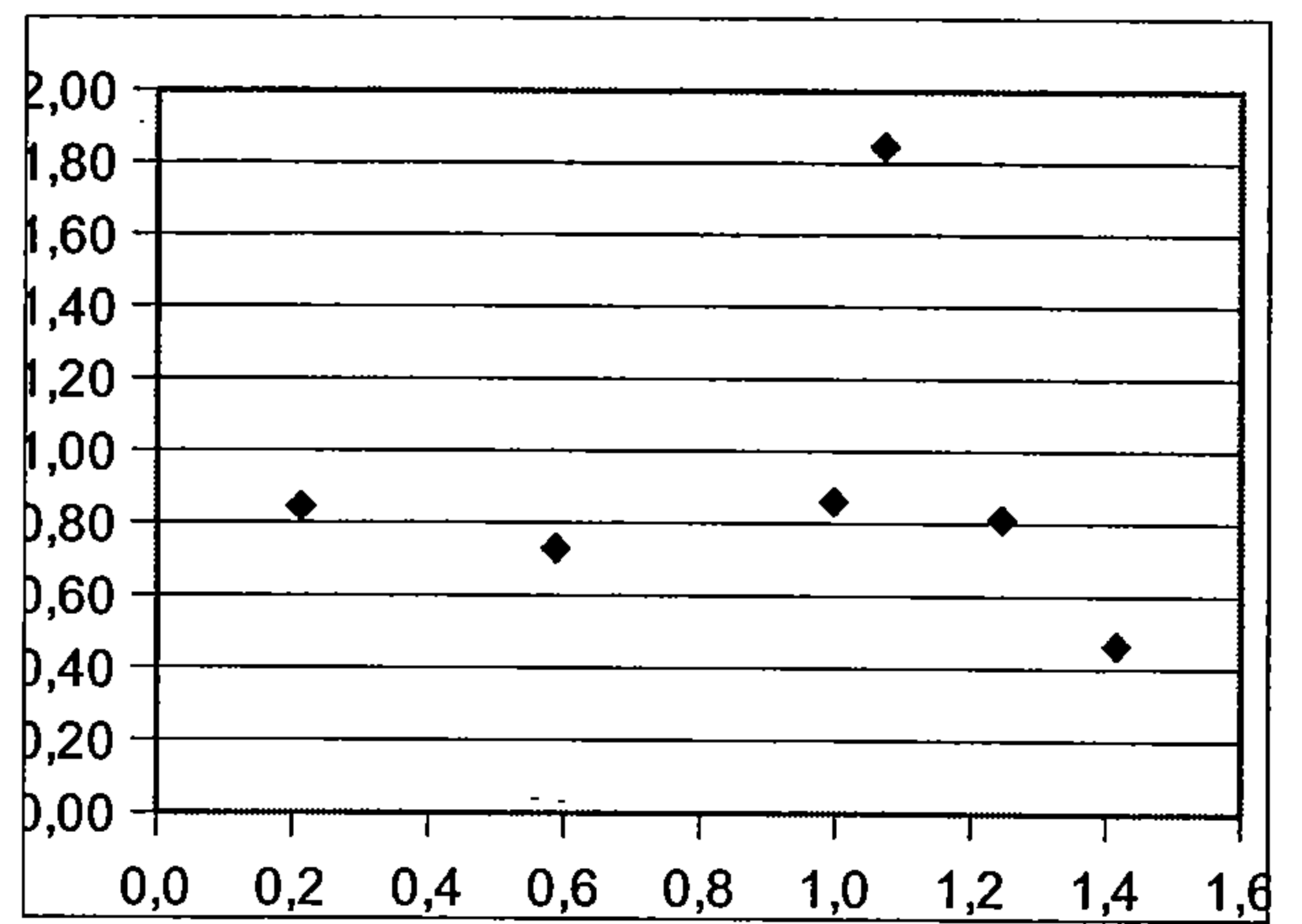
Graf 165: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,914$



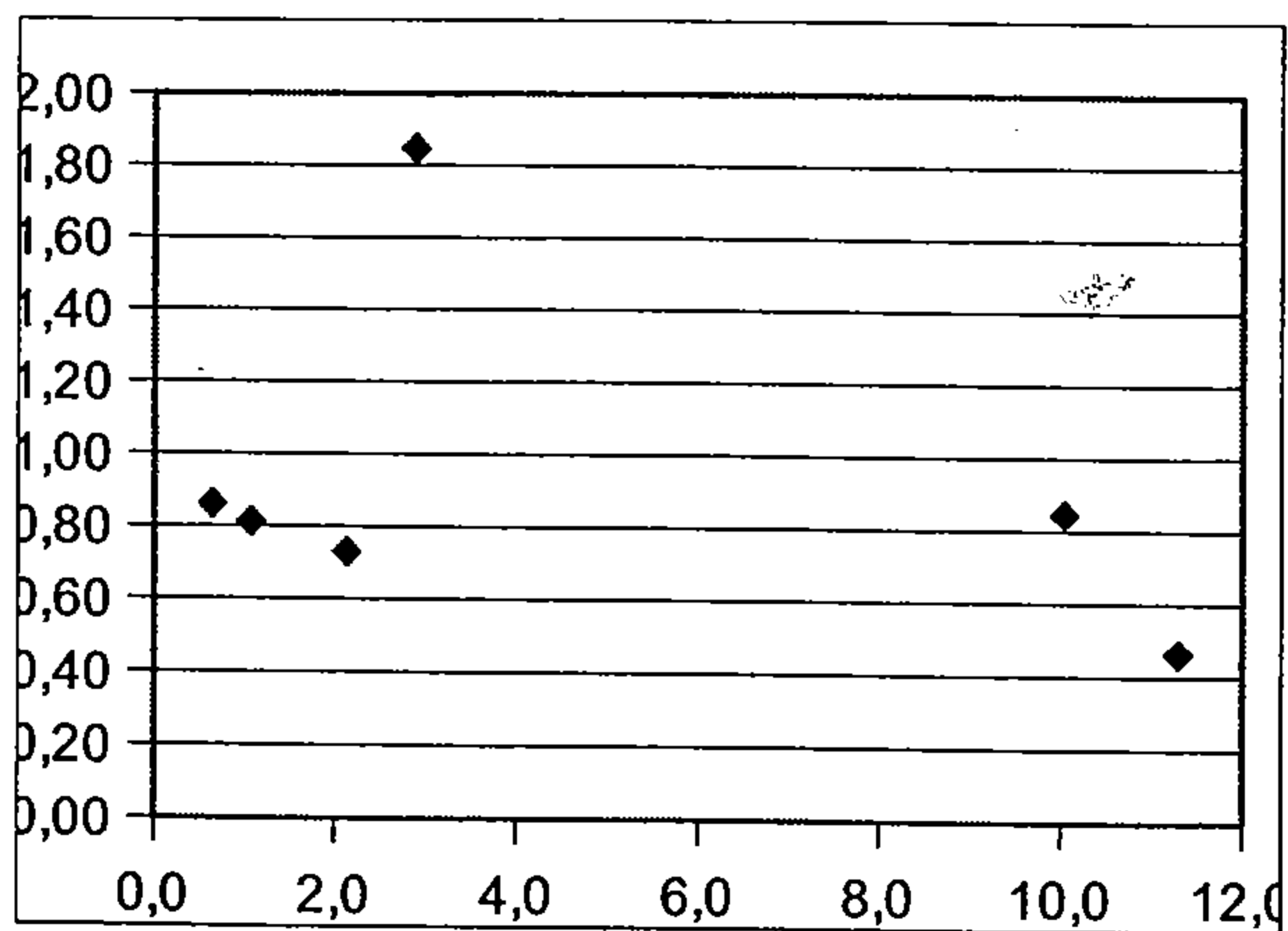
Graf 168: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,331$



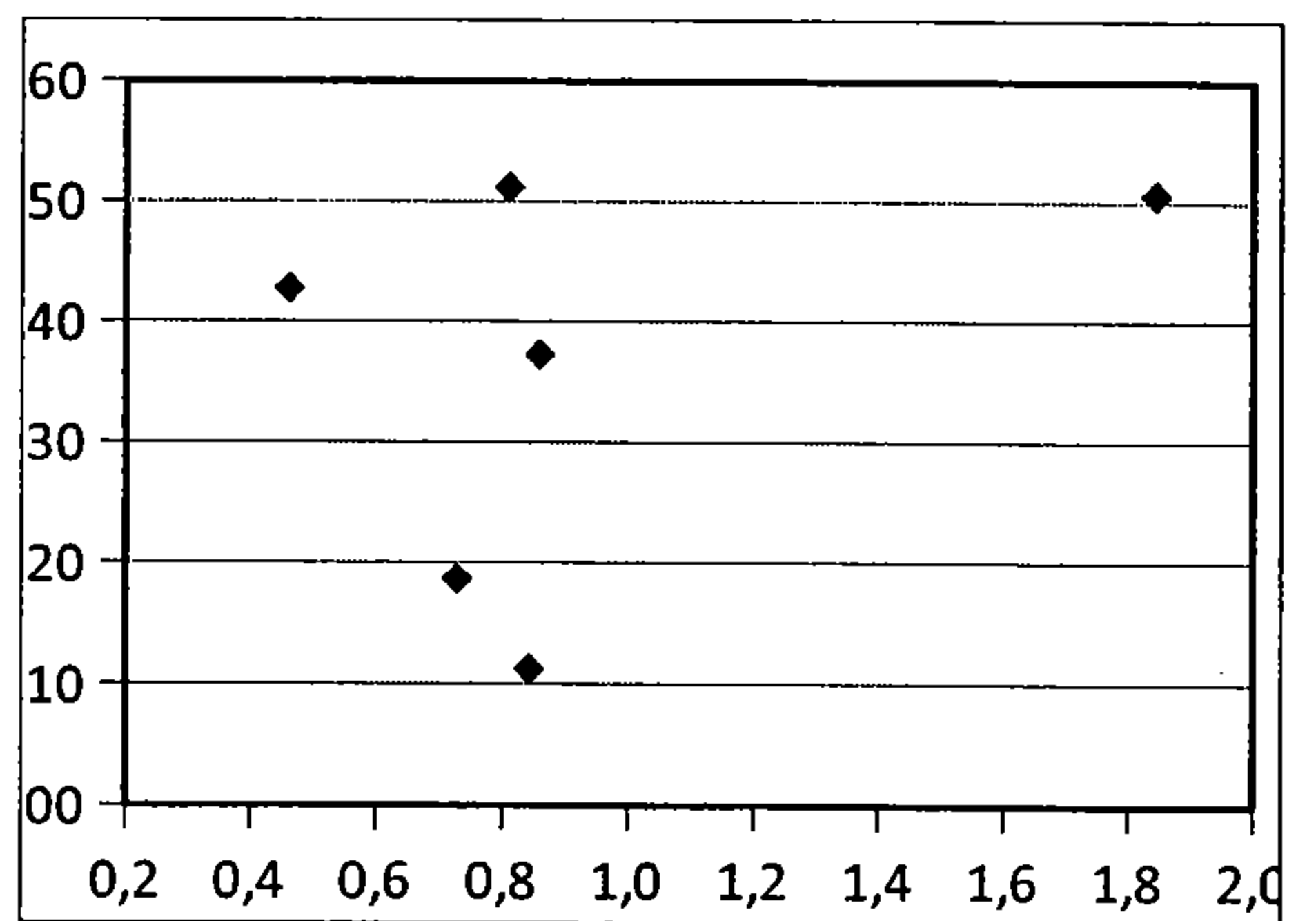
Graf 166: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,392$



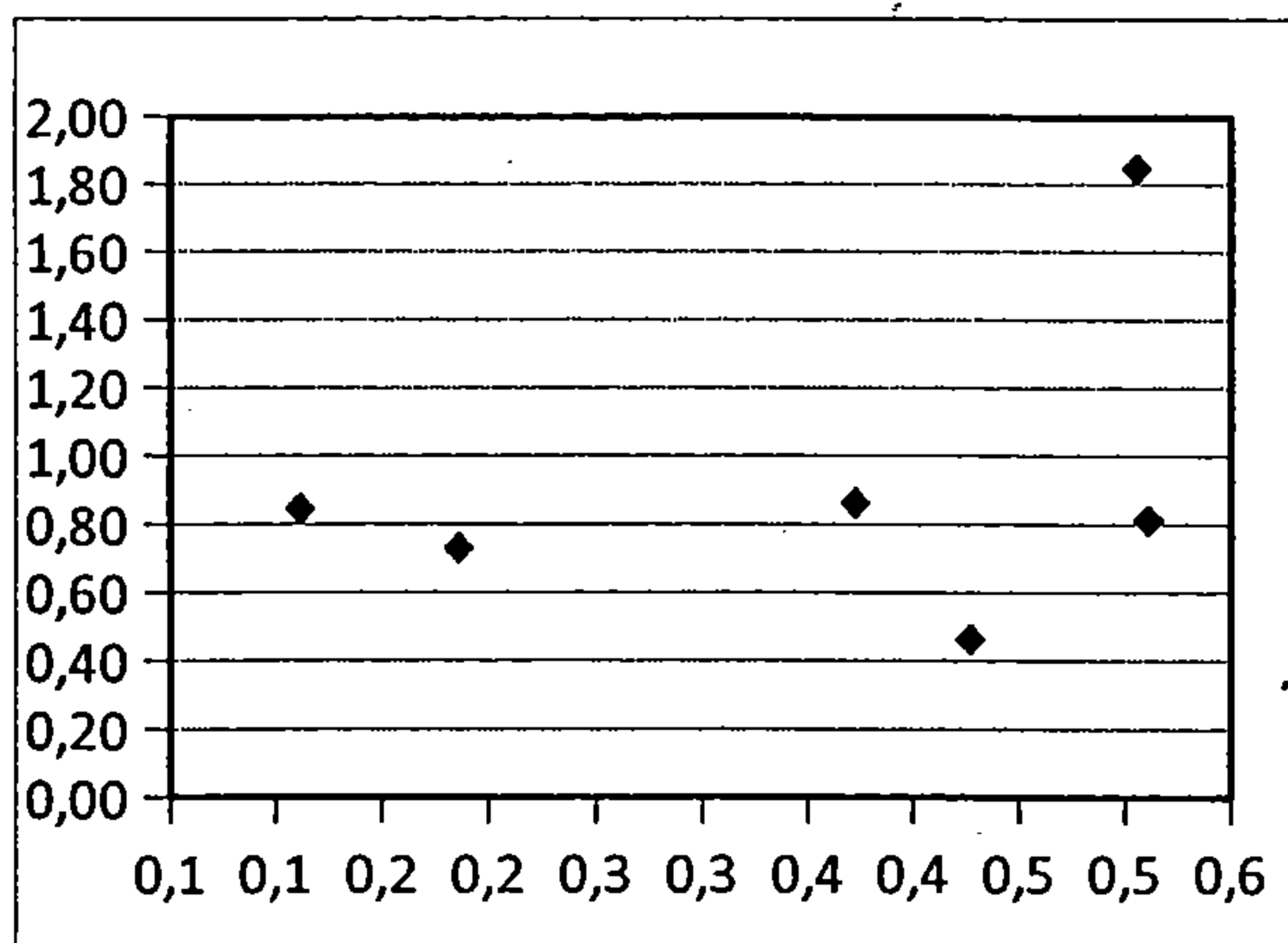
Graf 169: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,22$



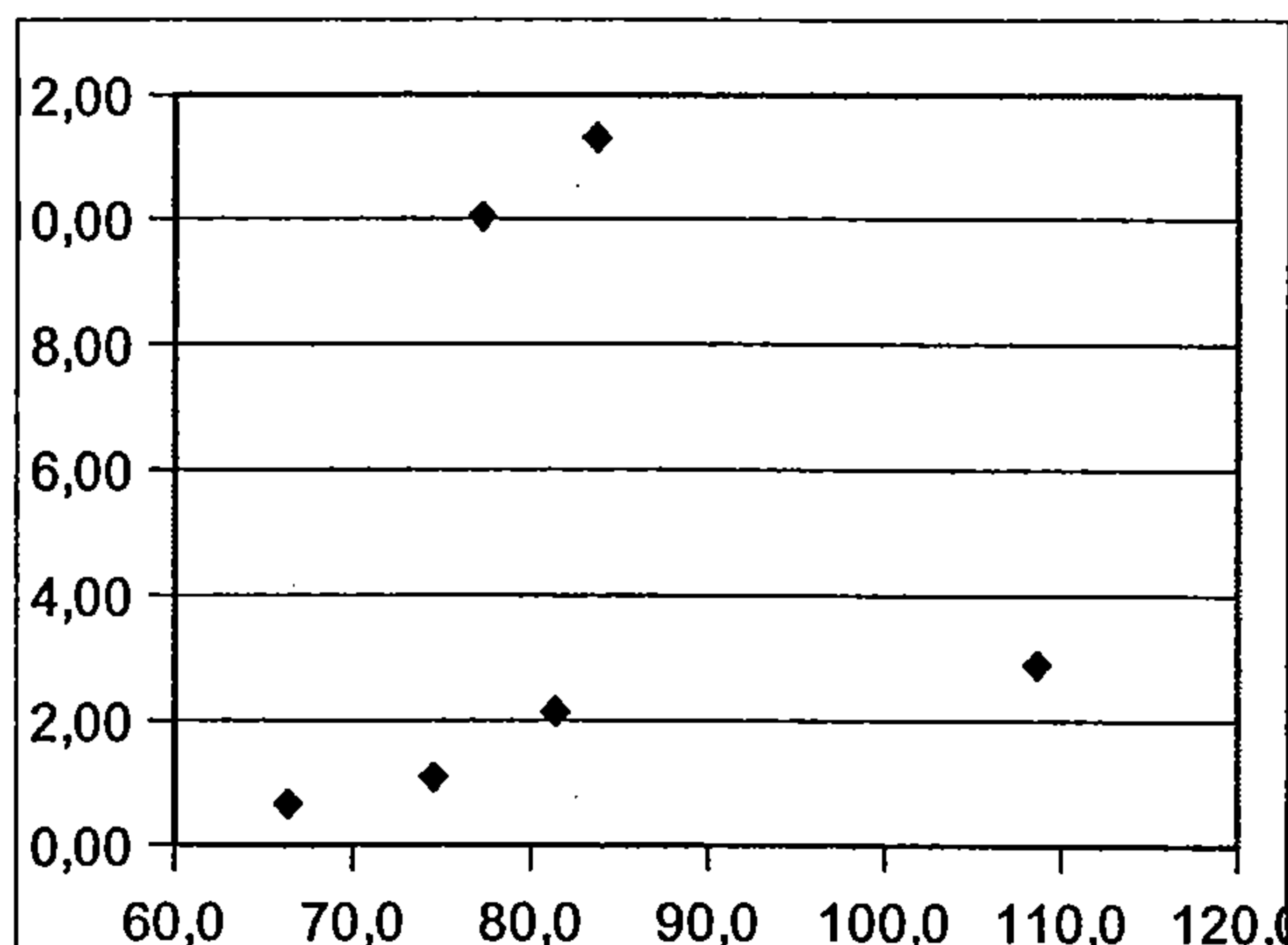
Graf 167: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,585$



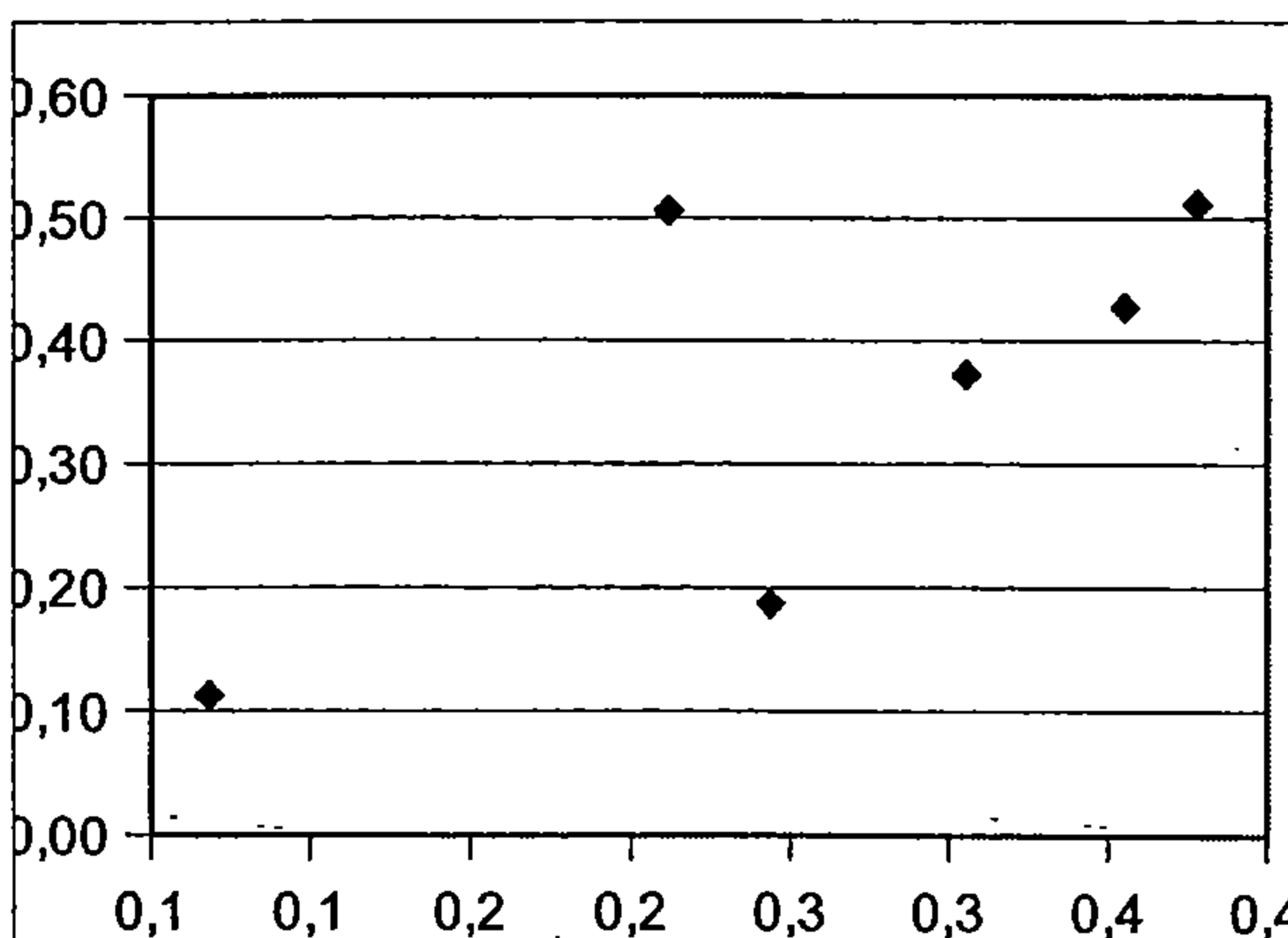
Graf 170: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,272$



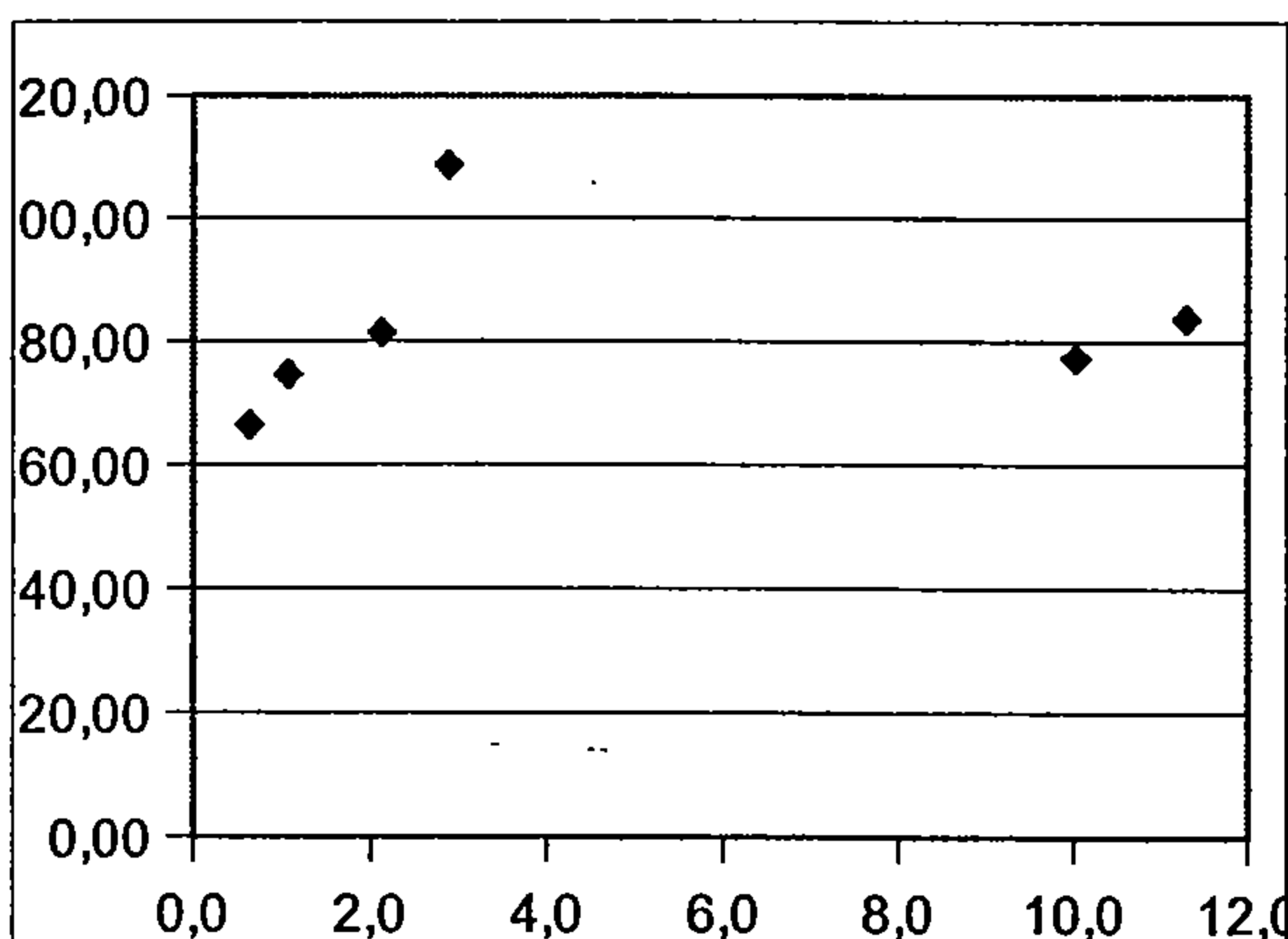
Graf 171: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,31$



Graf 174: vliv obsahu vápníku na obsah hořčíku, $R^2 = 0,375$

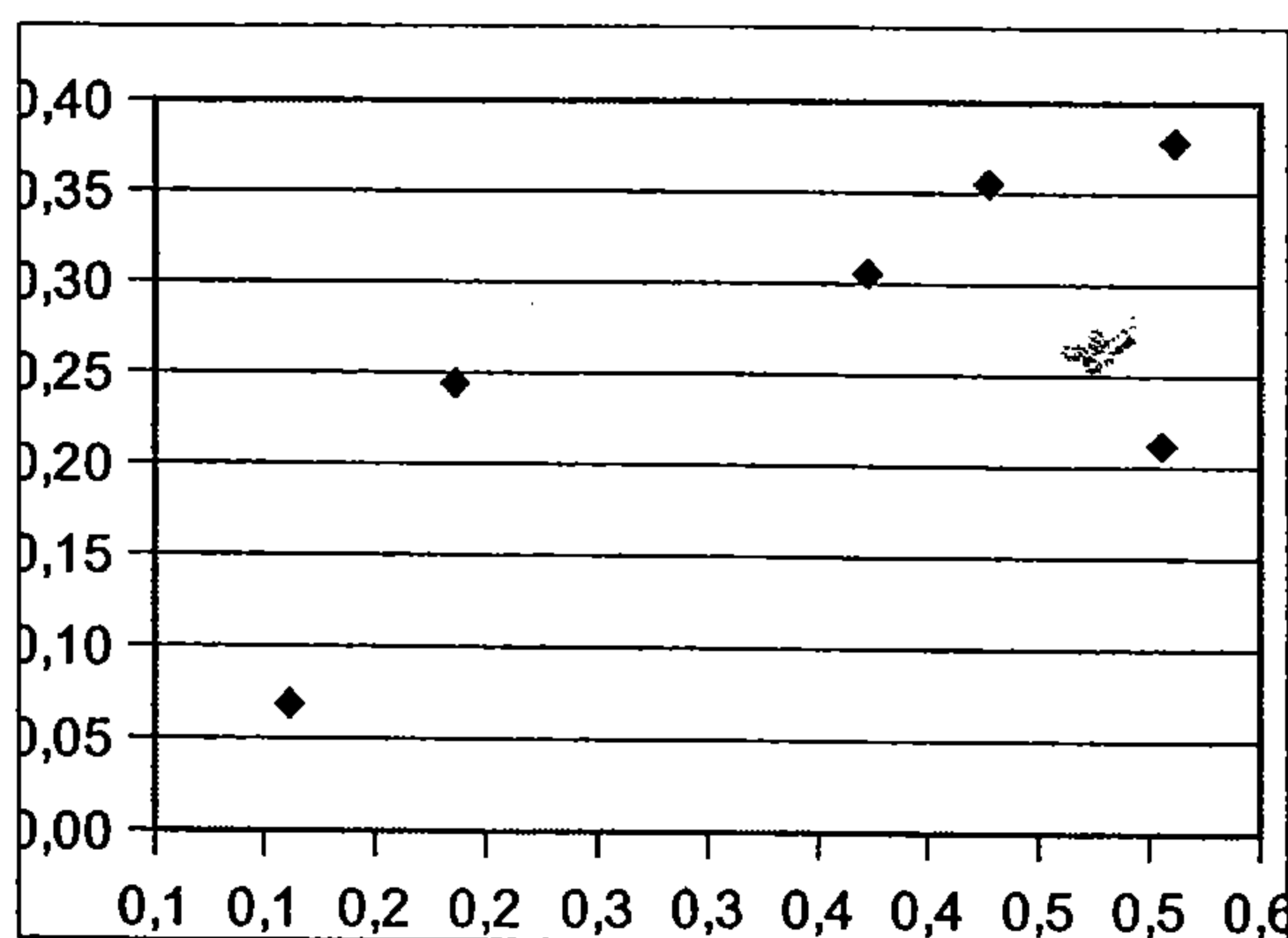


Graf 172: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,521$

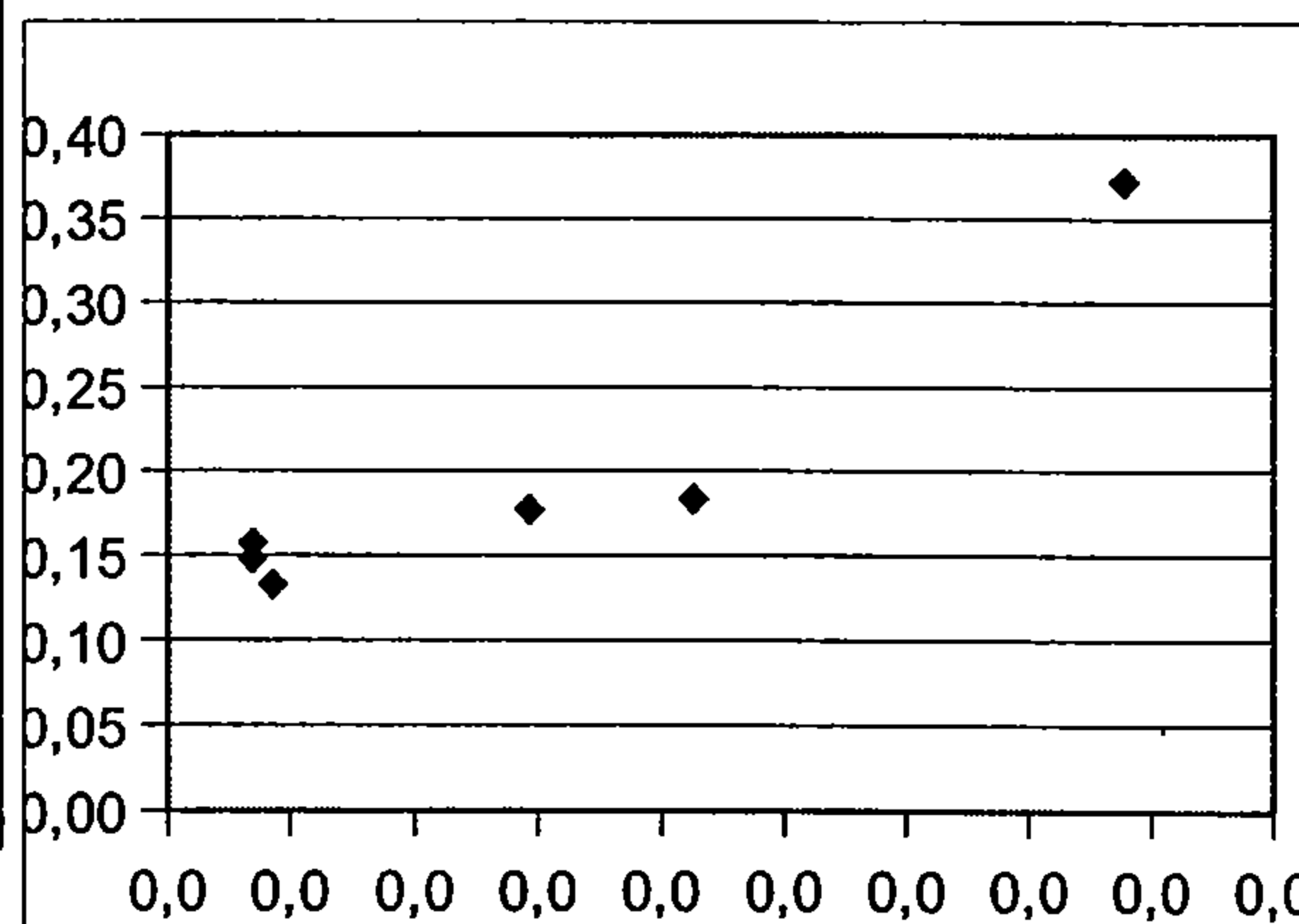


Graf 175: vliv obsahu hořčíku na obsah vápníku, $R^2 = 0,375$

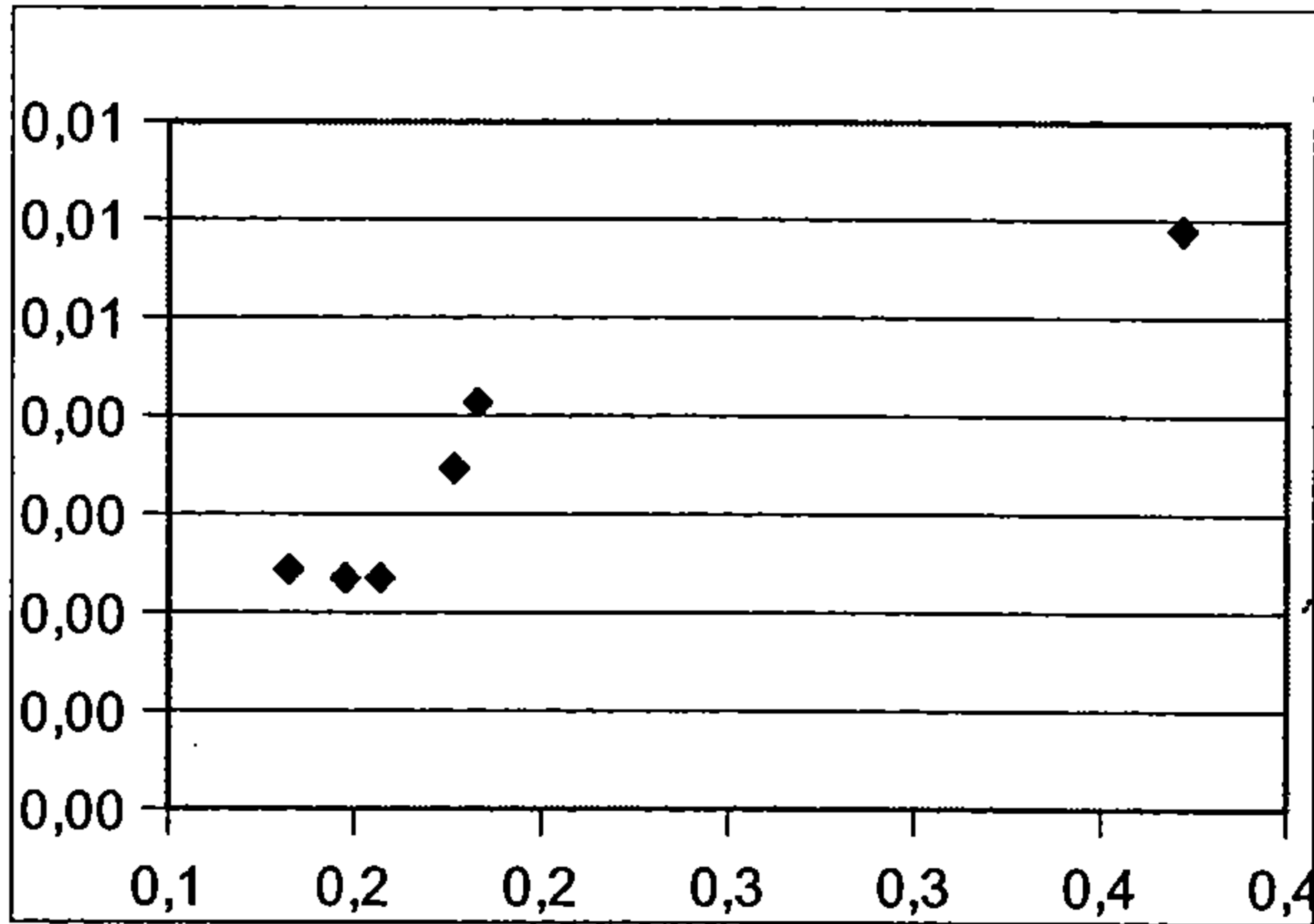
Korelace mezi prvky – frakce X



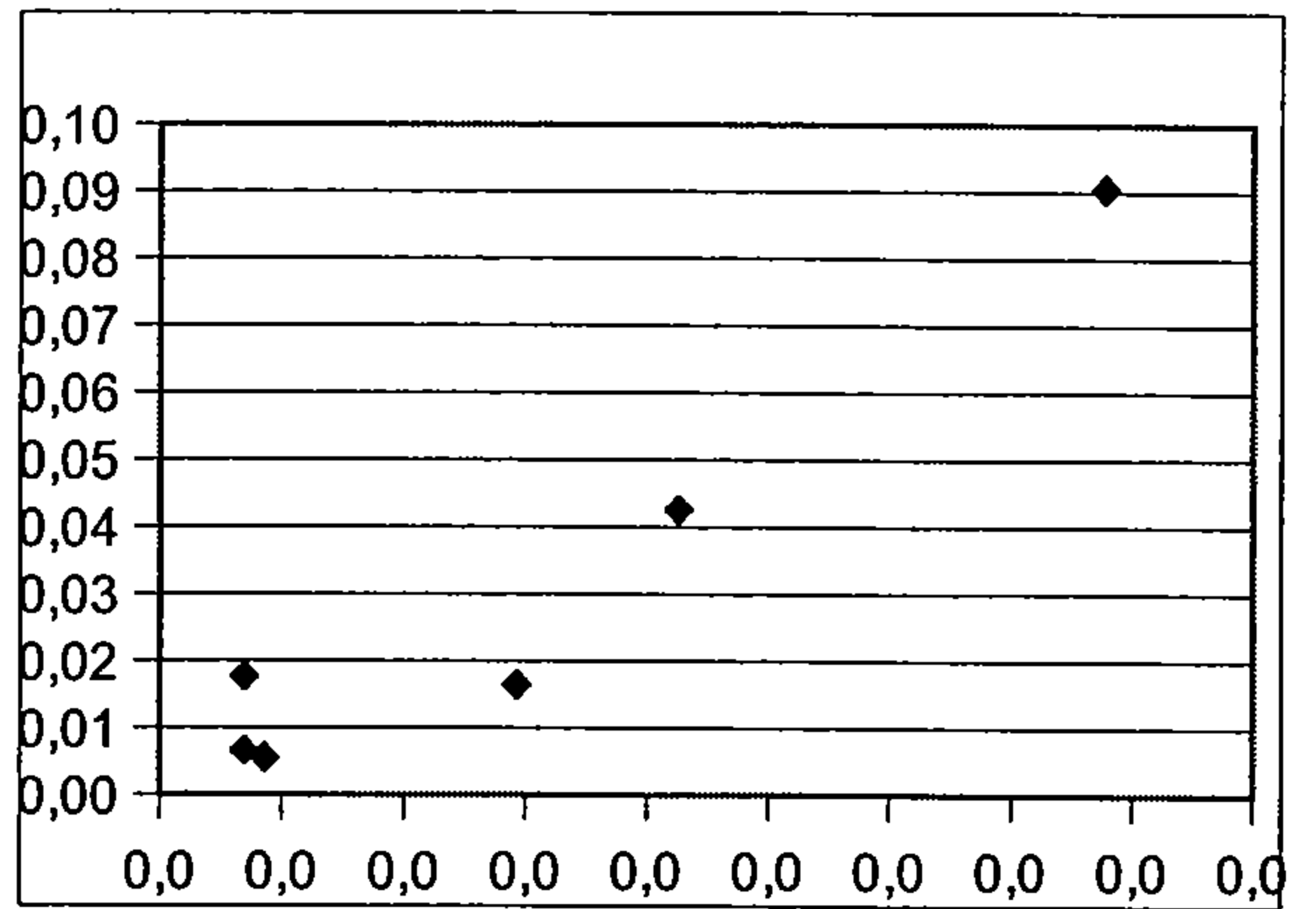
Graf 173: vliv obsahu zinku na obsah mědi, $R^2 = 0,721$



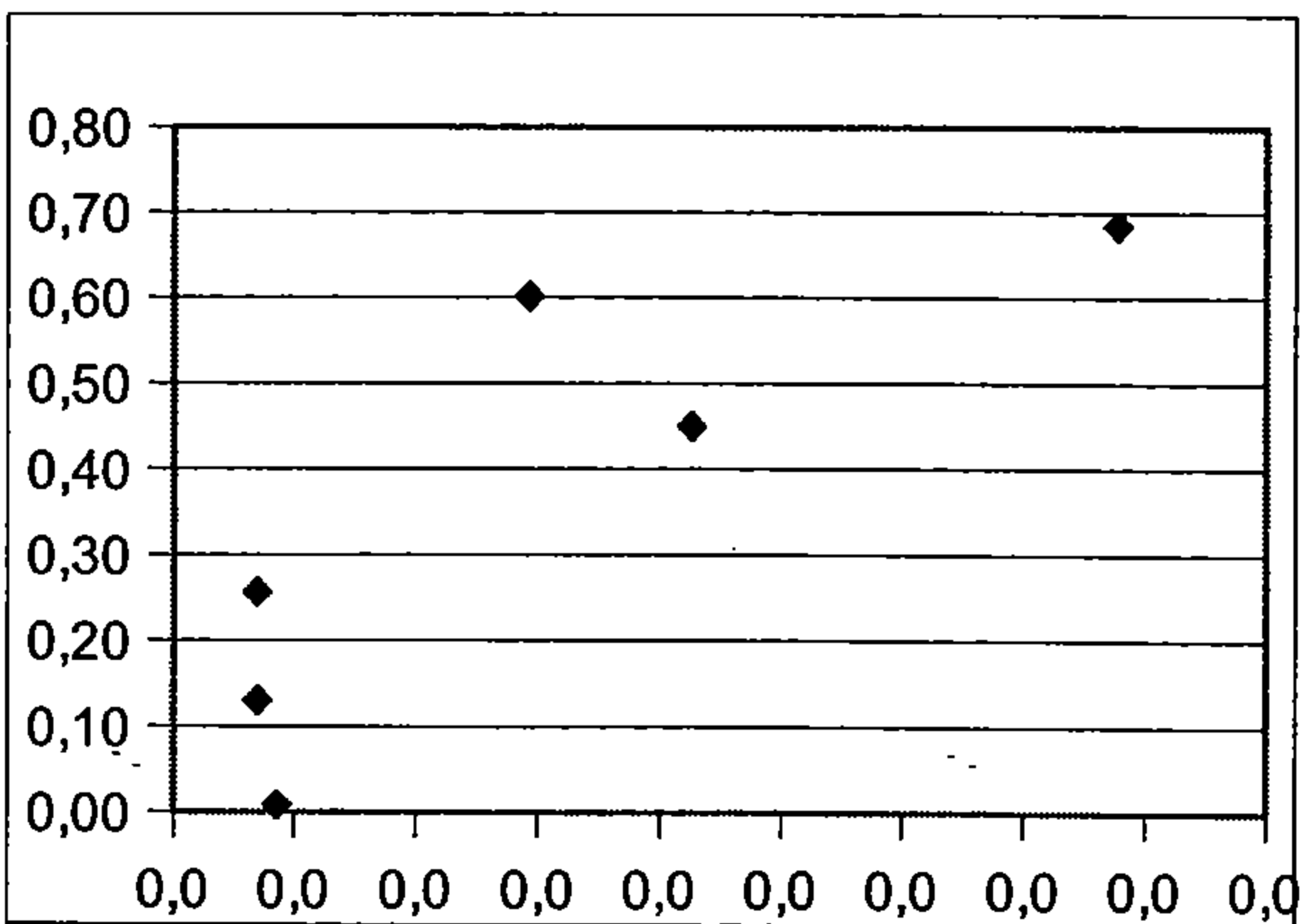
Graf 176: vliv obsahu arsenu na obsah fosforu, $R^2 = 0,983$



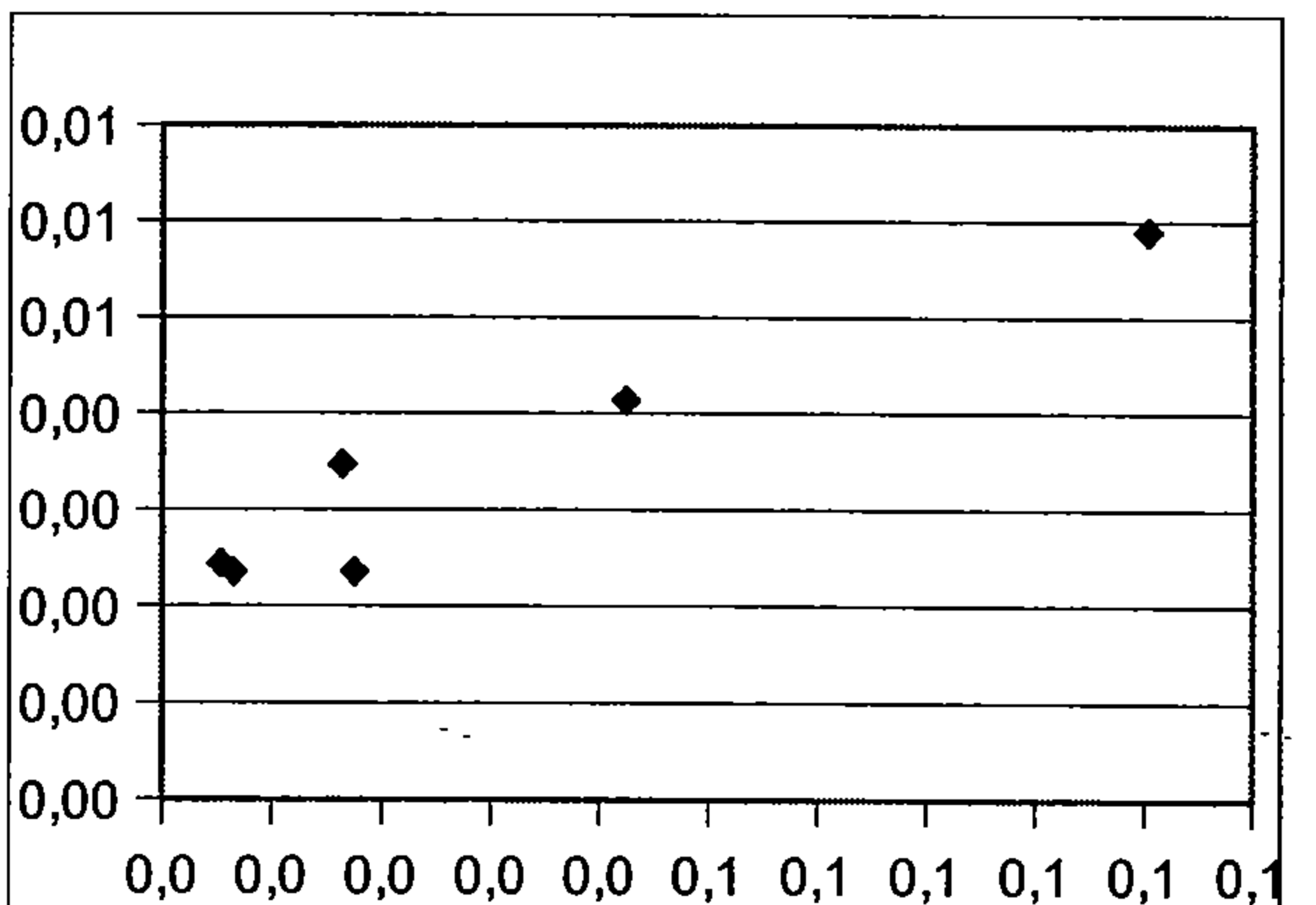
Graf 177: vliv obsahu fosforu na obsah arsenu, $R^2 = 0,928$



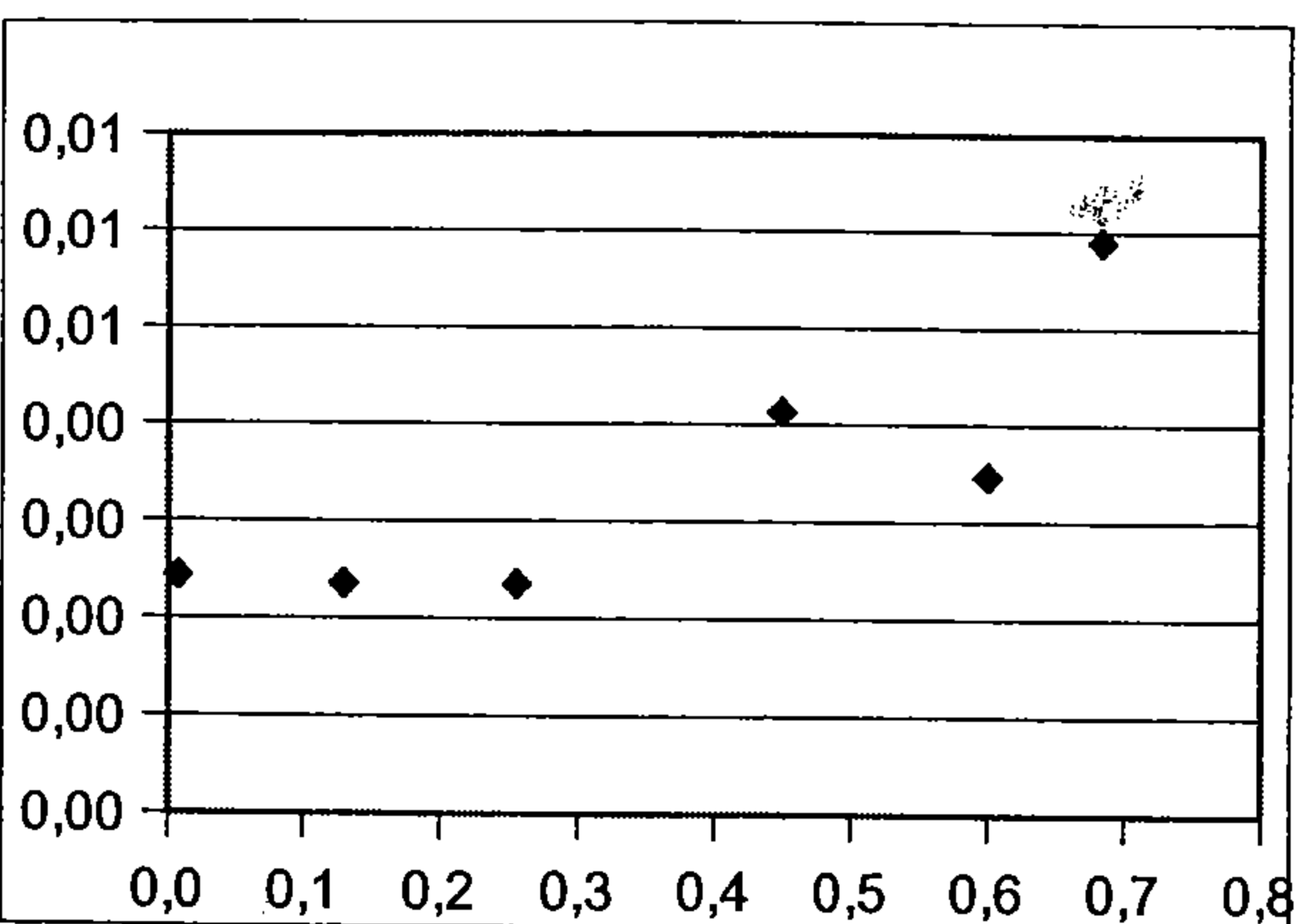
Graf 180: vliv obsahu arsenu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,966$



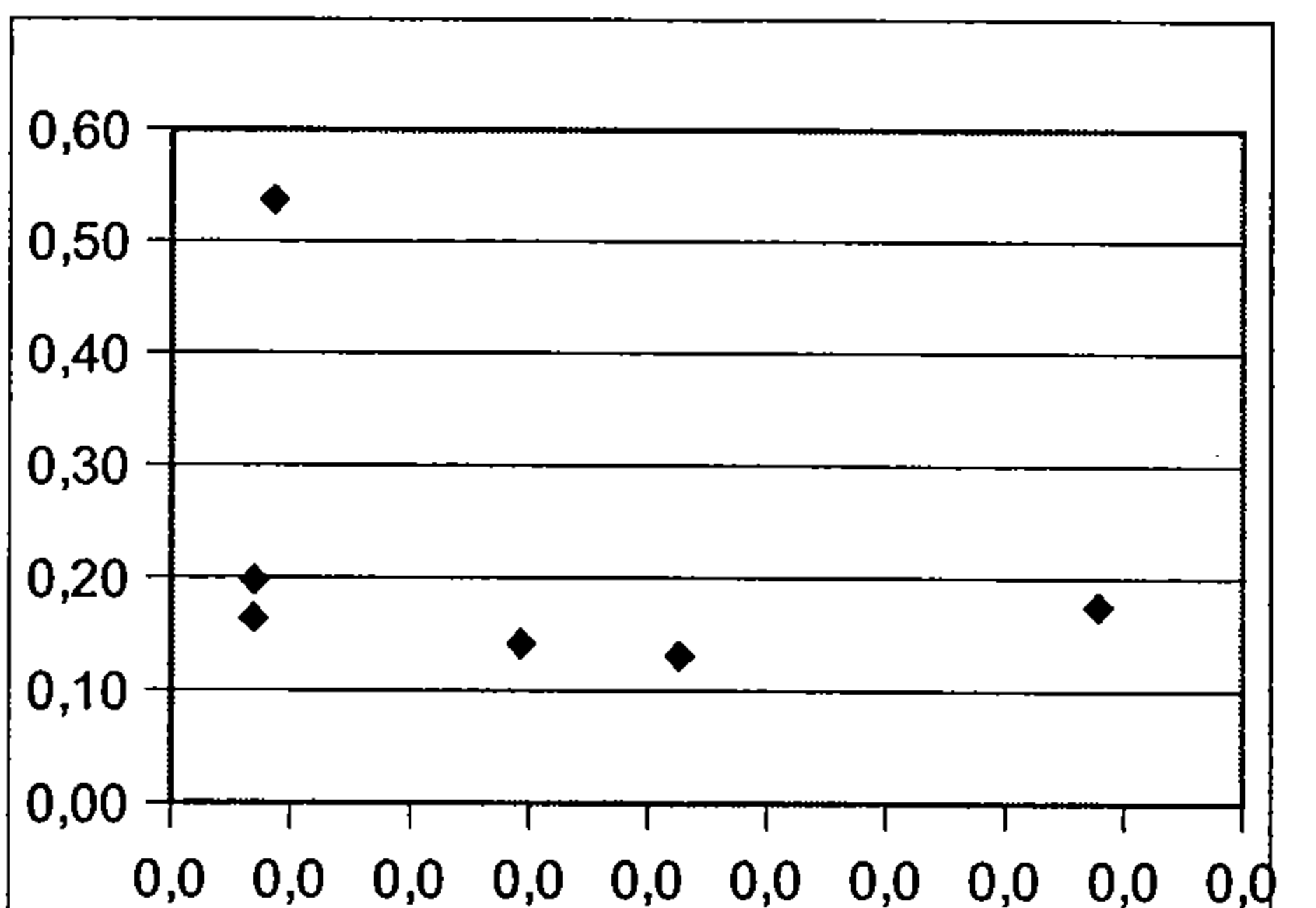
Graf 178: vliv obsahu arsenu na obsah vápníku, $R^2 = 0,785$



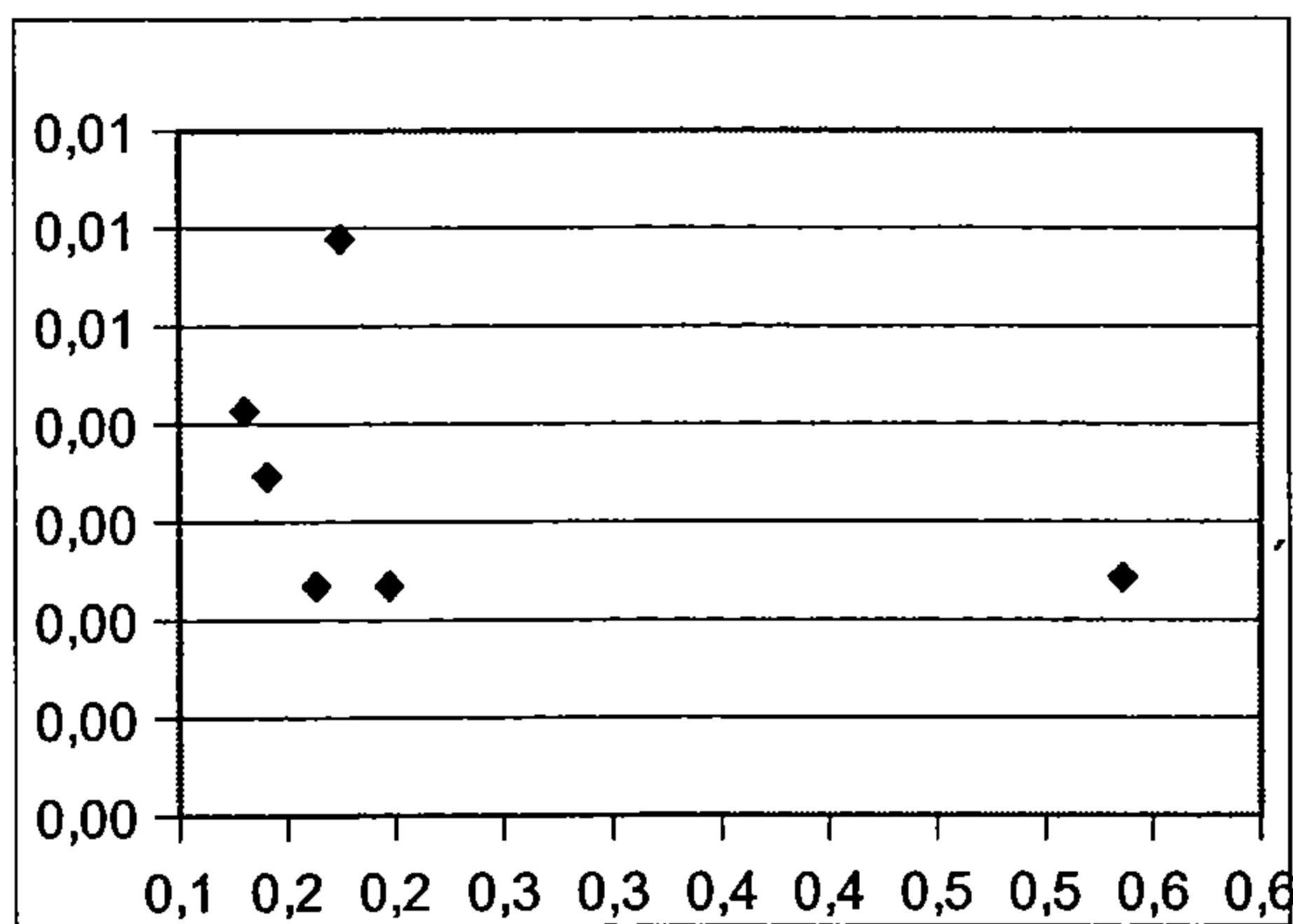
Graf 181: vliv obsahu hořčíku na obsah arsenu, $R^2 = 0,929$



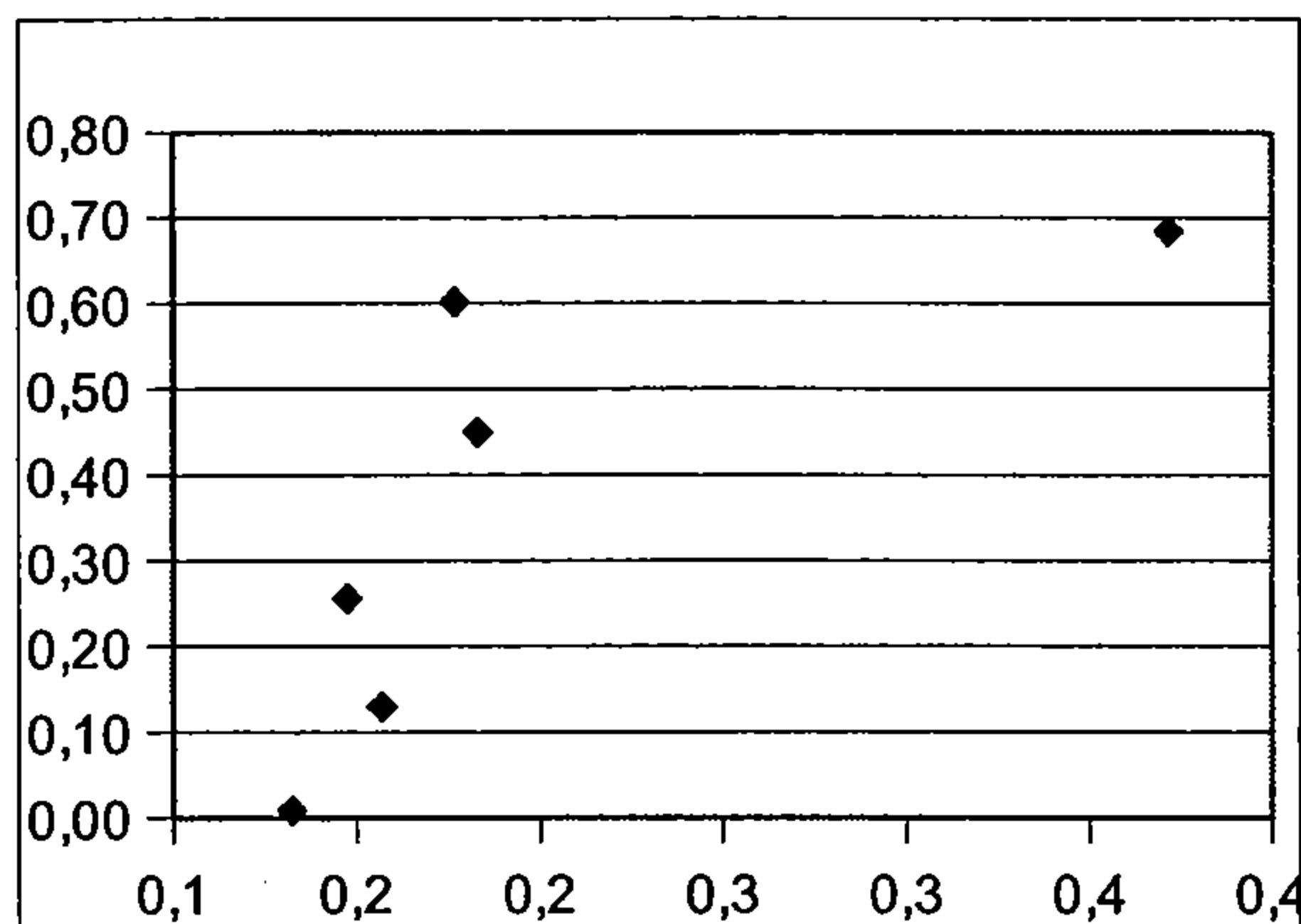
Graf 179: vliv obsahu vápníku na obsah arsenu, $R^2 = 0,794$



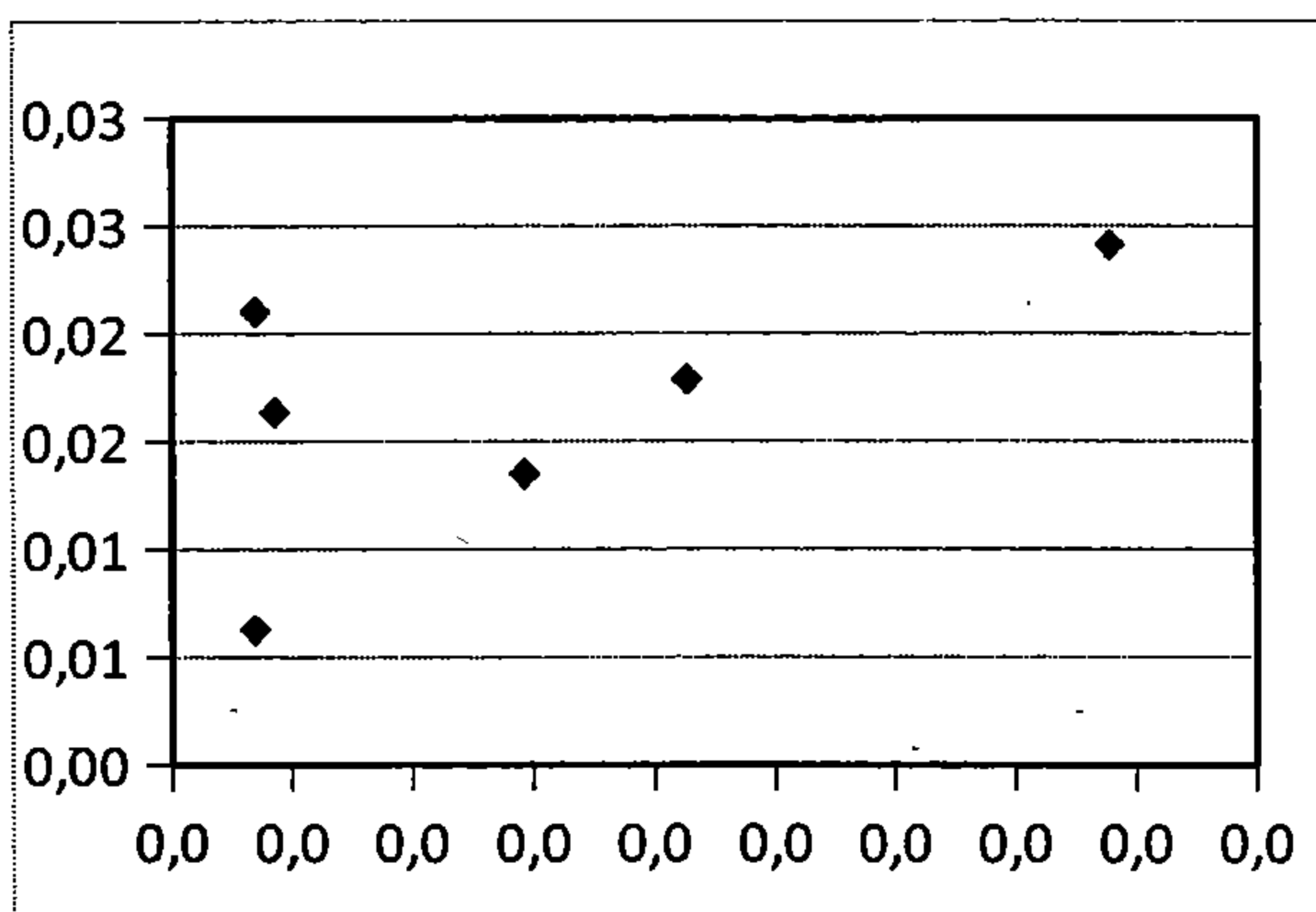
Graf 182: vliv obsahu arsenu na obsah železa, $R^2 = 0,235$



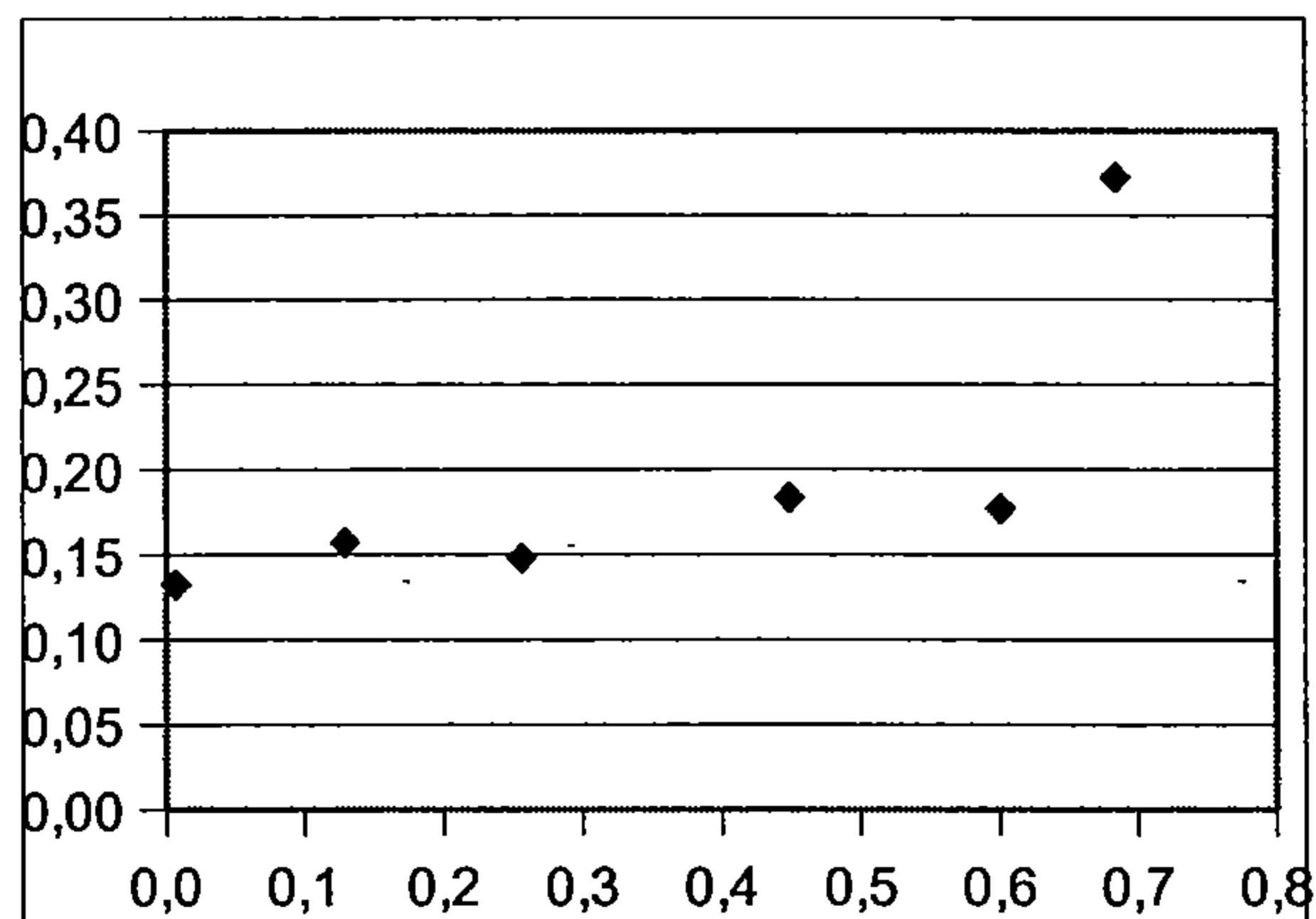
Graf 183: vliv obsahu železa na obsah arsenu, $R^2 = 0,153$



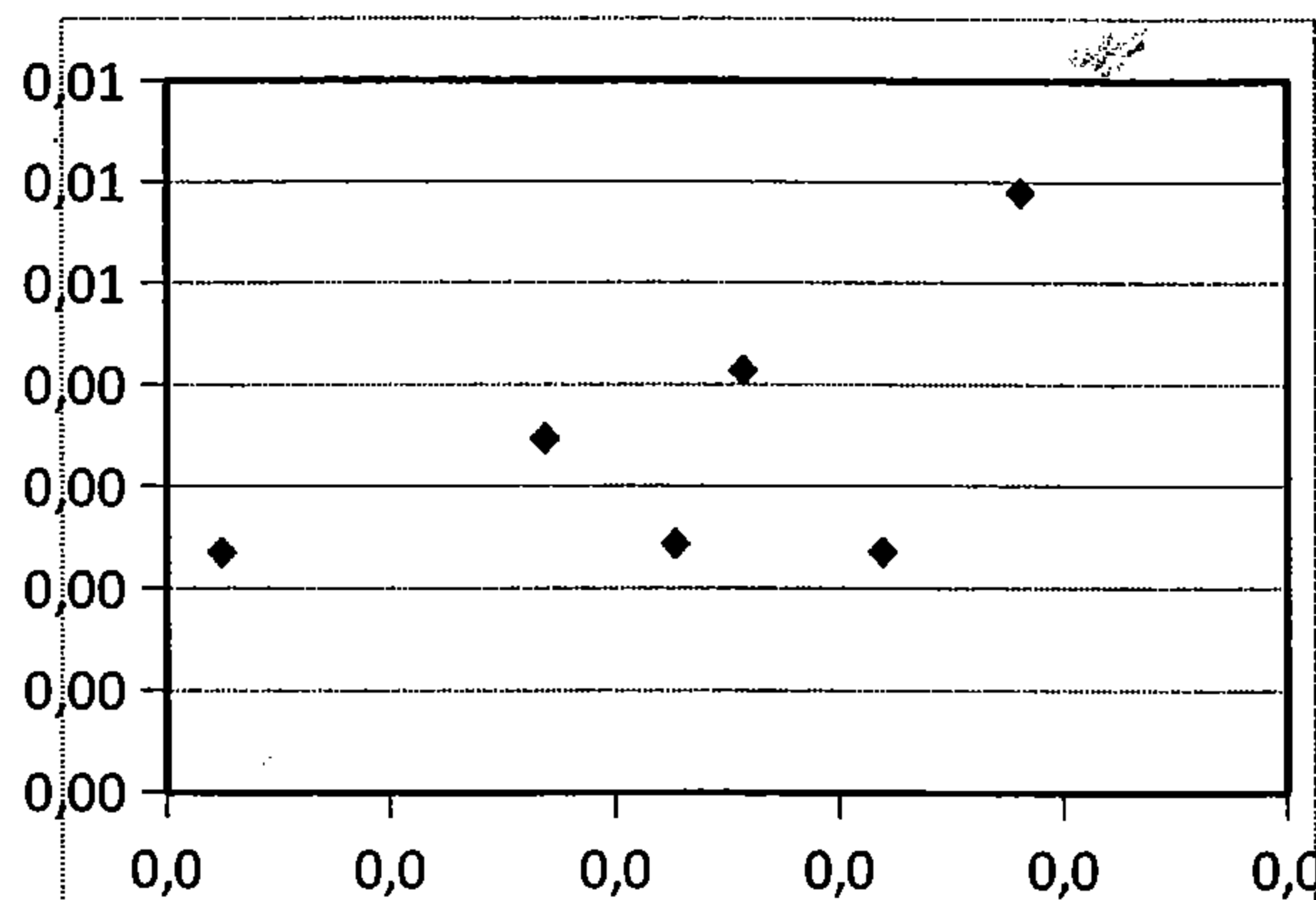
Graf 186: vliv obsahu fosforu na obsah vápníku, $R^2 = 0,856$



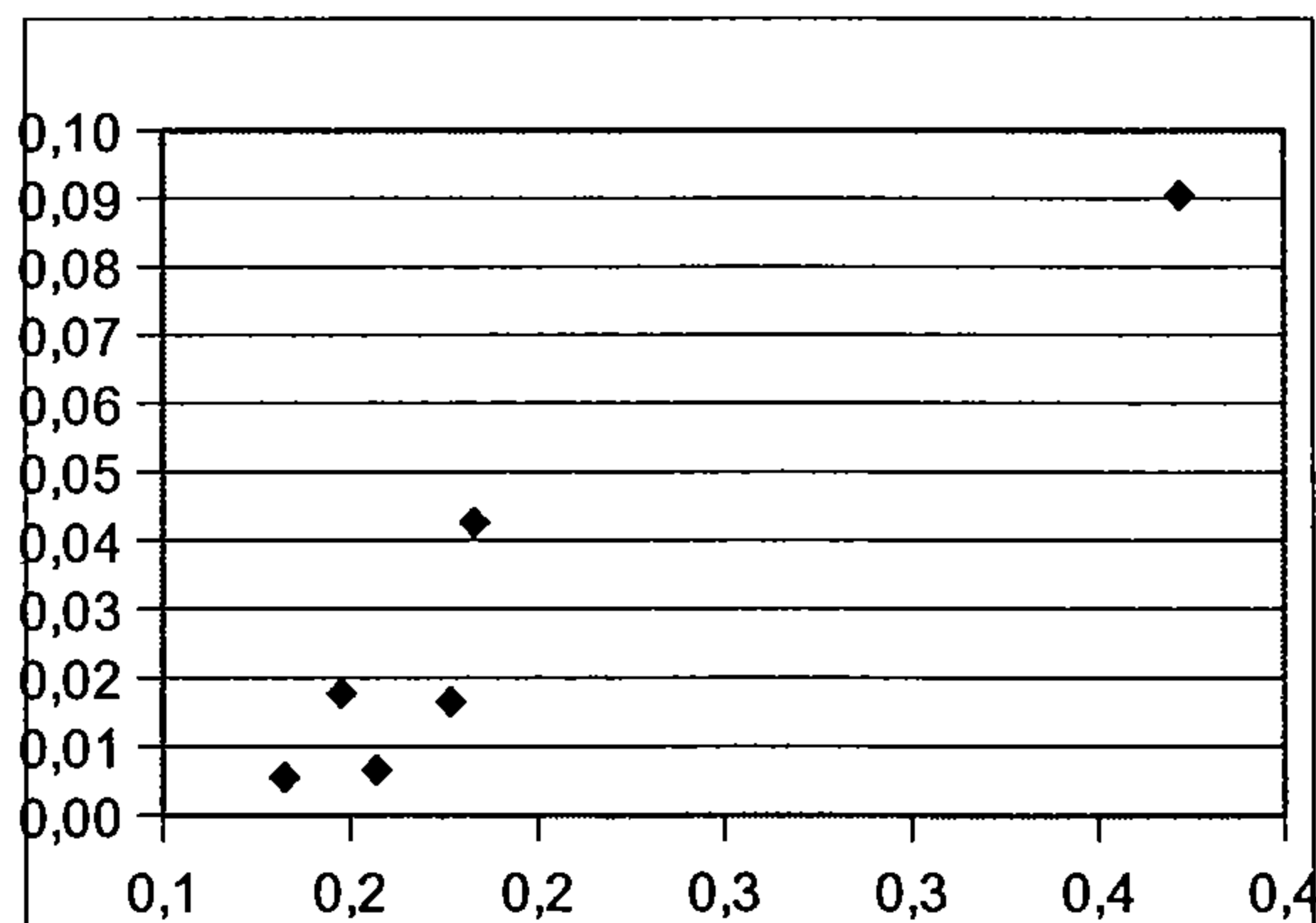
Graf 184: vliv obsahu arsenu na obsah zinku, $R^2 = 0,39$



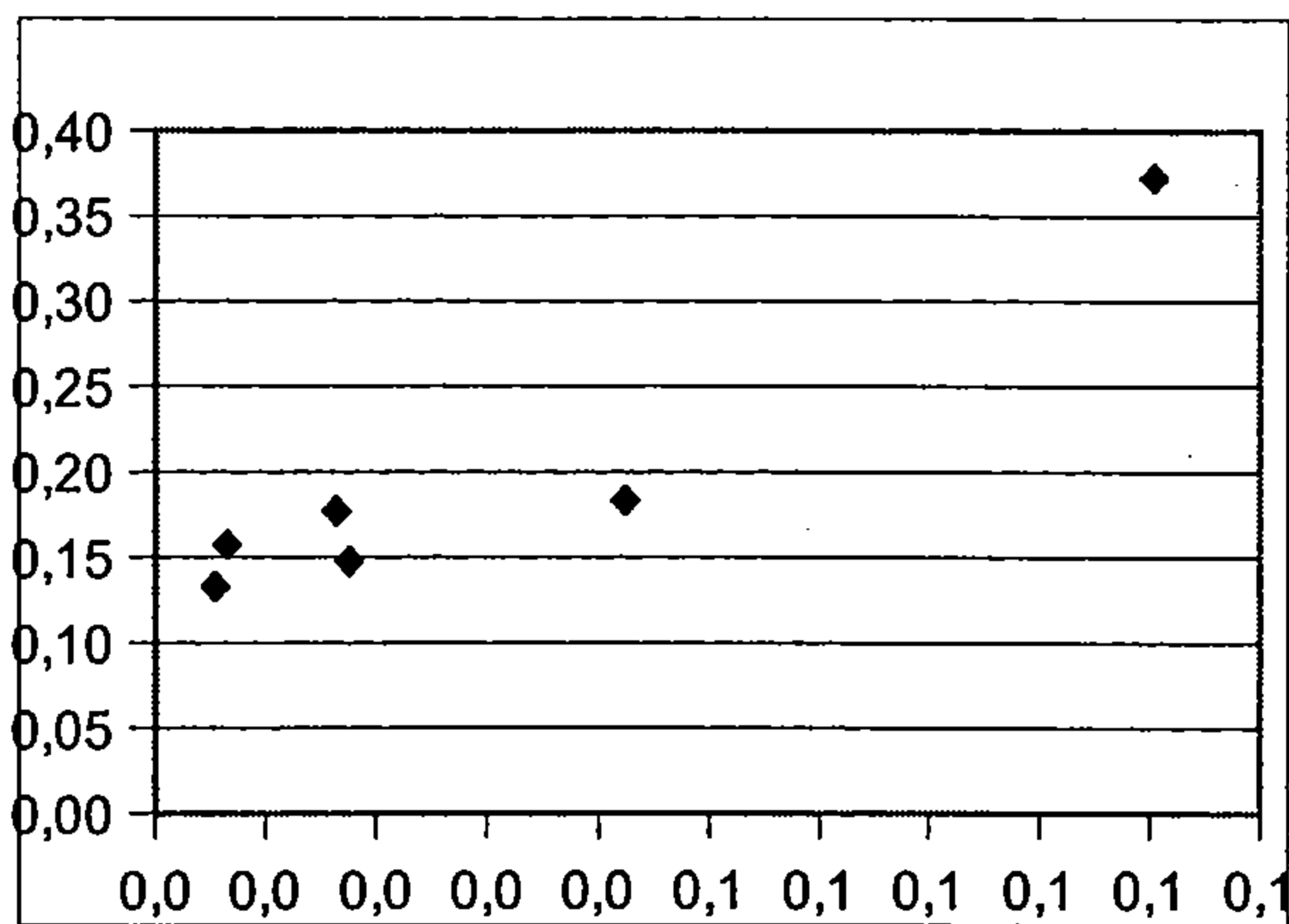
Graf 187: vliv obsahu vápníku na obsah fosforu, $R^2 = 0,717$



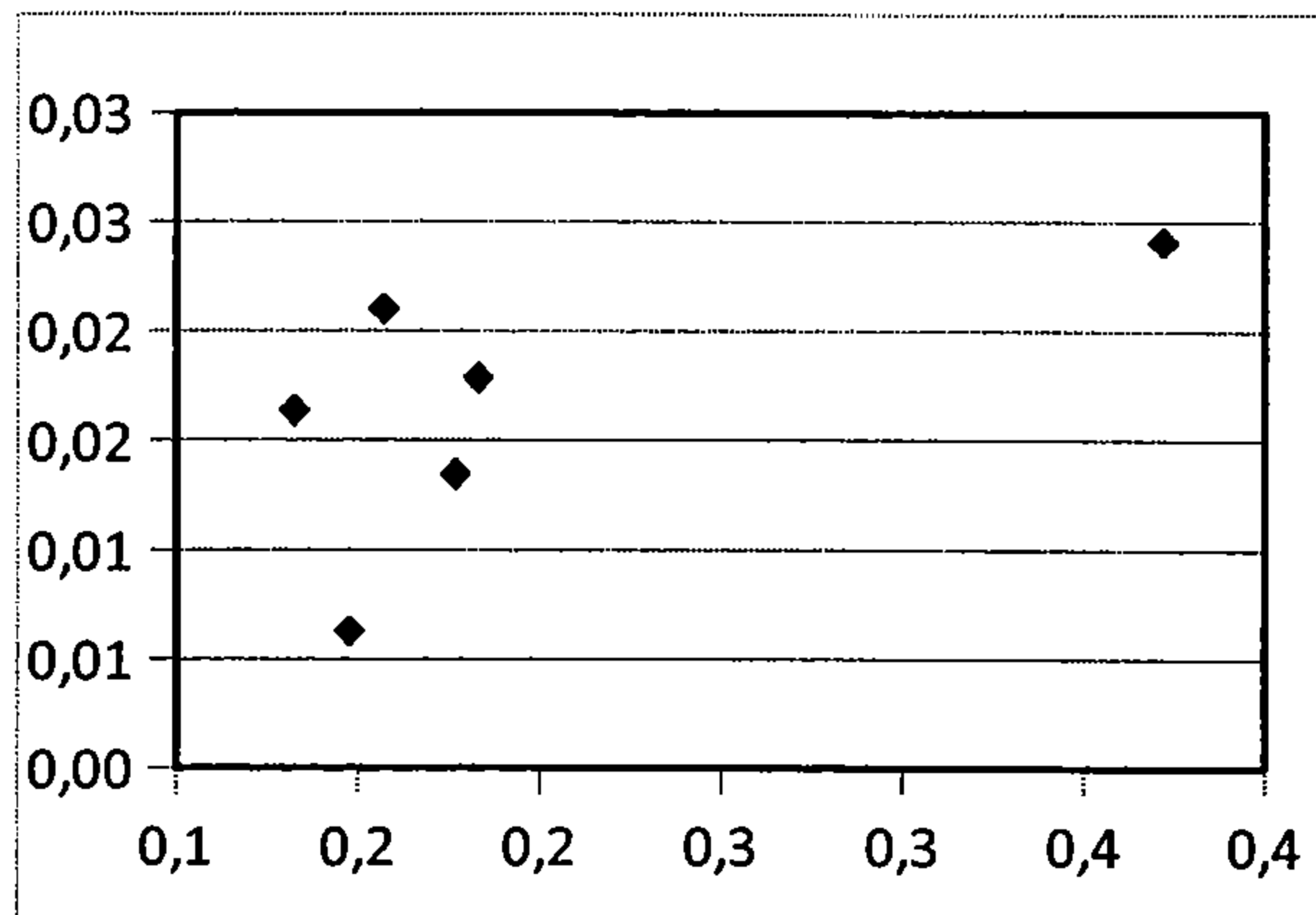
Graf 185: vliv obsahu zinku na obsah arsenu, $R^2 = 0,45$



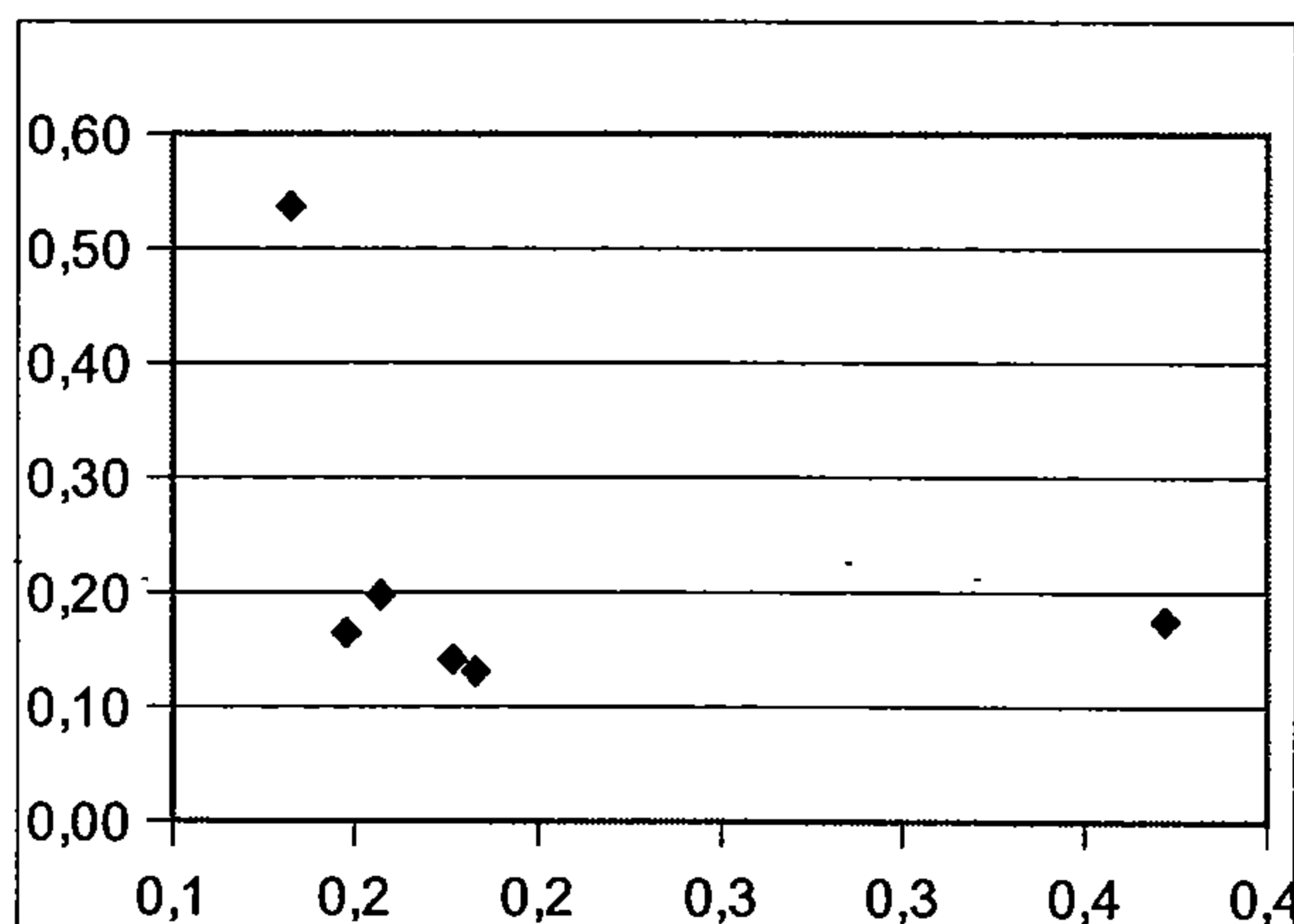
Graf 188: vliv obsahu fosforu na obsah hořčíku, $R^2 = 0,922$



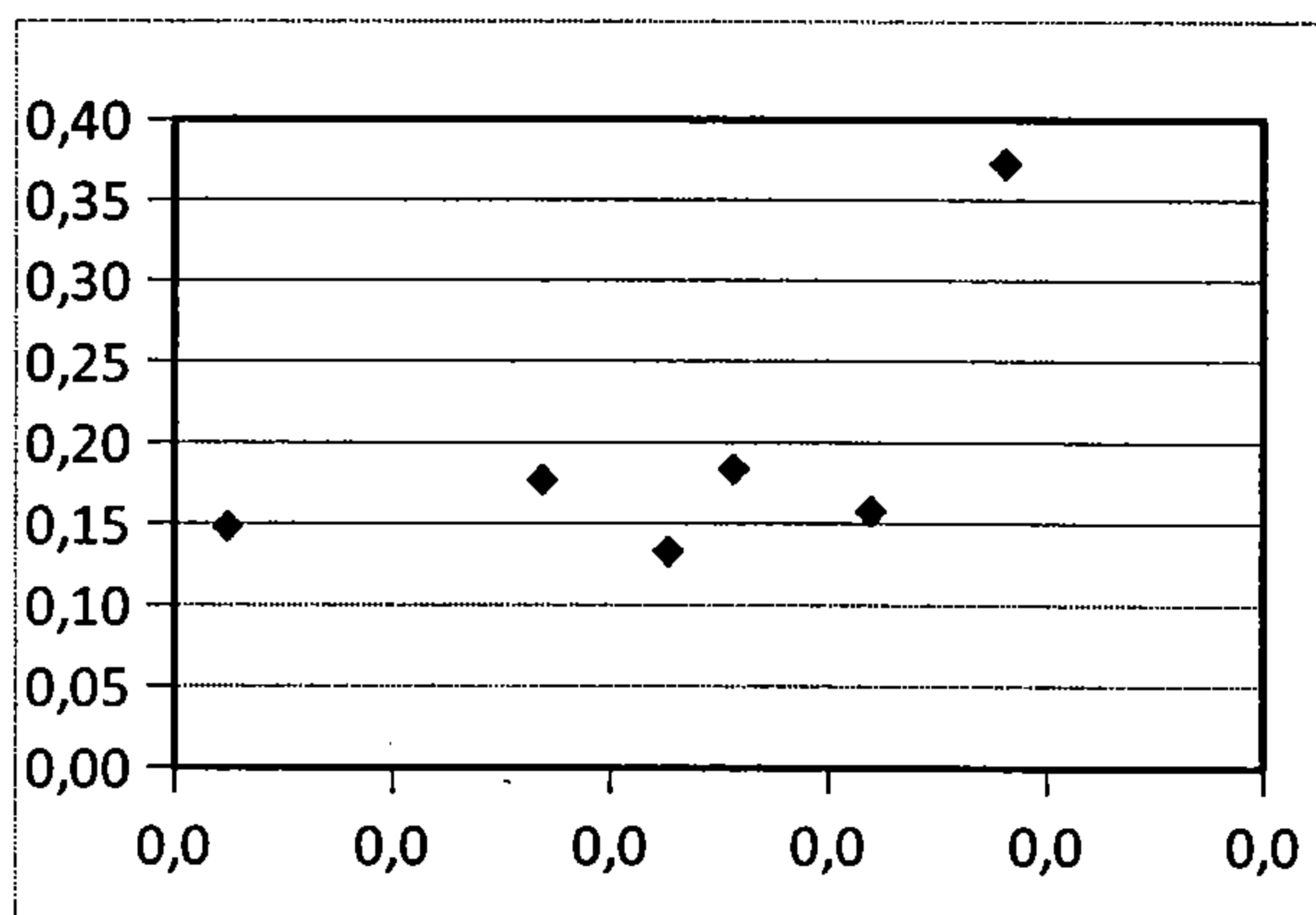
Graf 189: vliv obsahu hořčíku na obsah fosforu, $R^2 = 0,974$



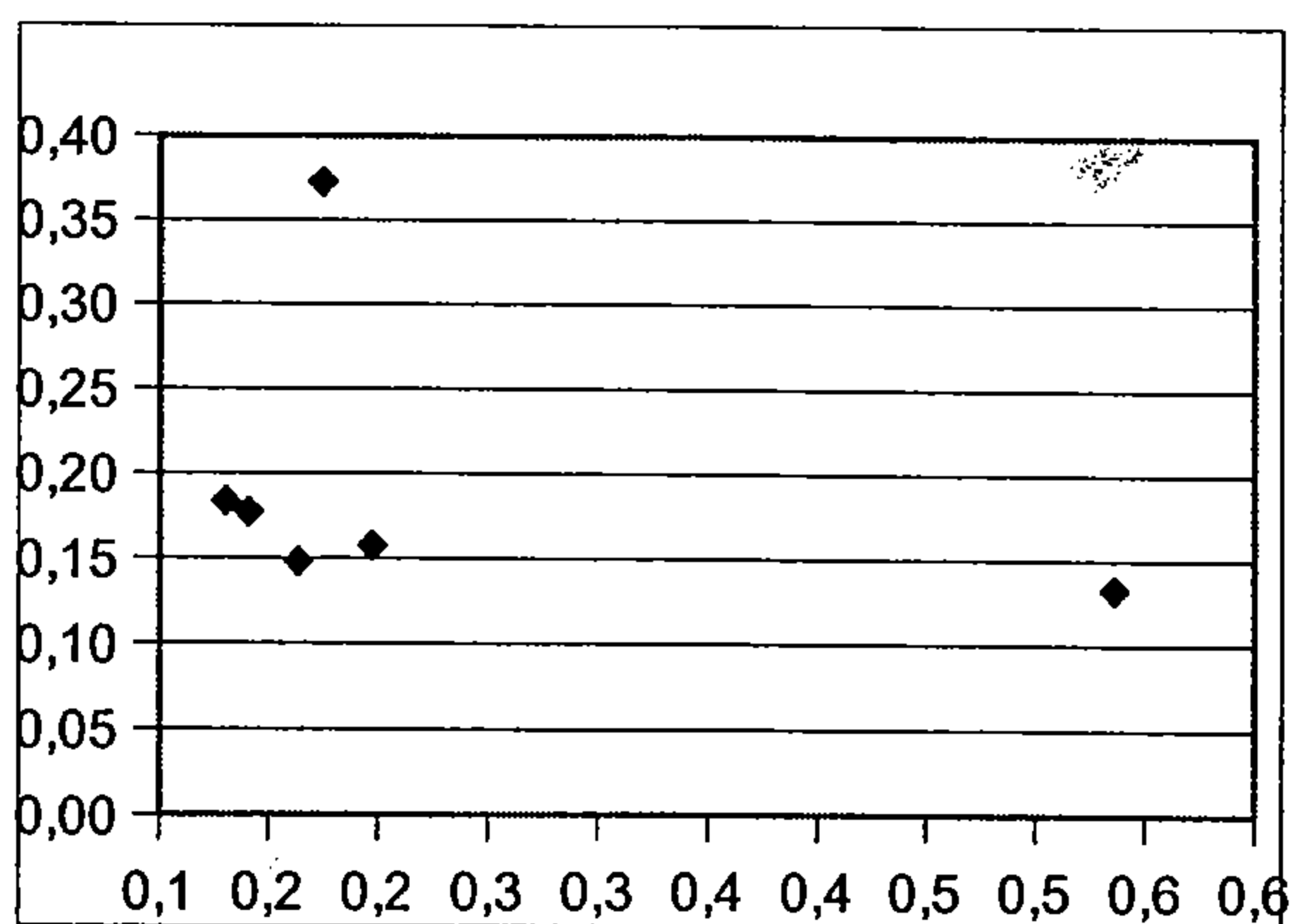
Graf 191: vliv obsahu fosforu na obsah zinku, $R^2 = 0,381$



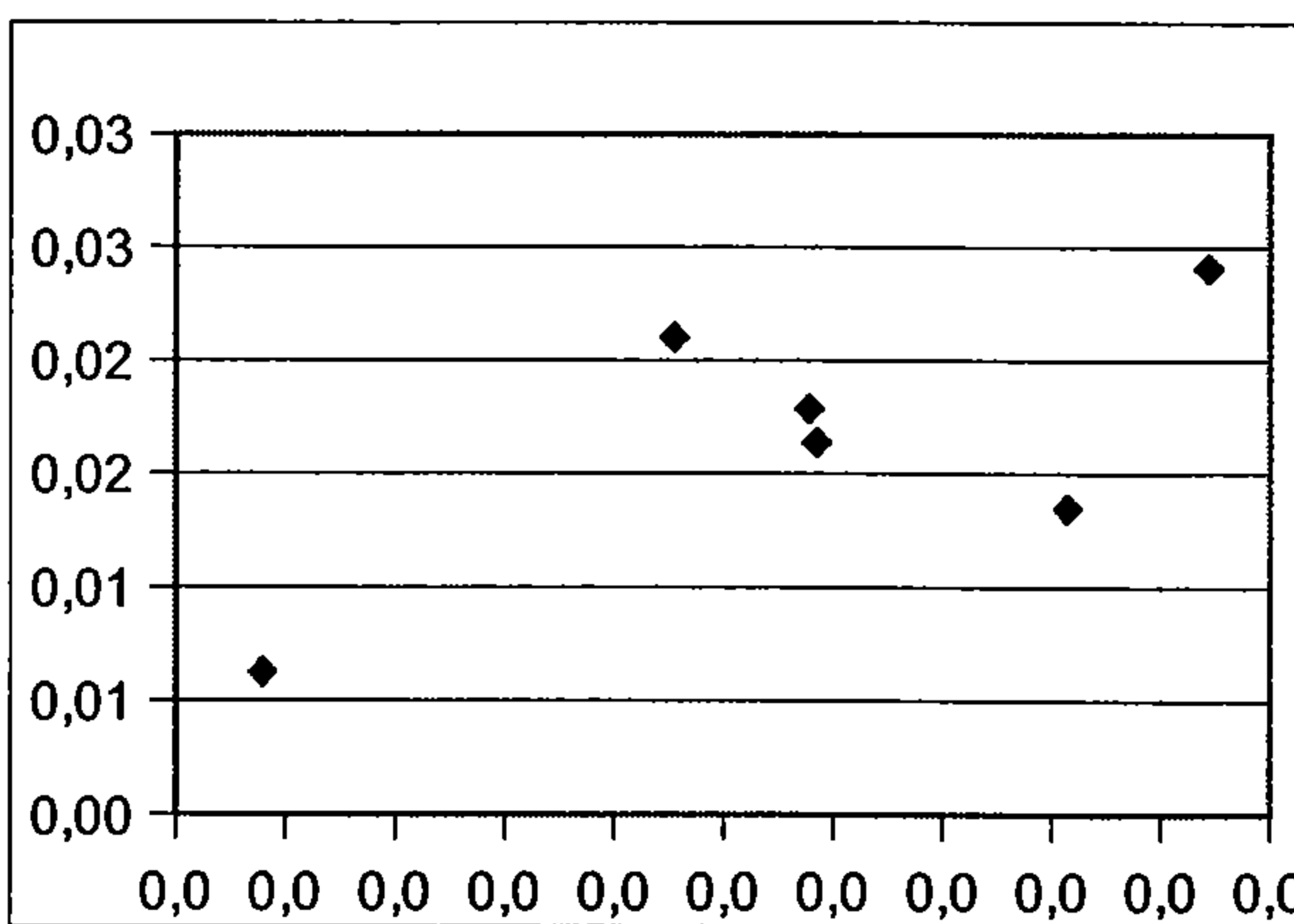
Graf 190: vliv obsahu fosforu na obsah železa, $R^2 = 0,689$



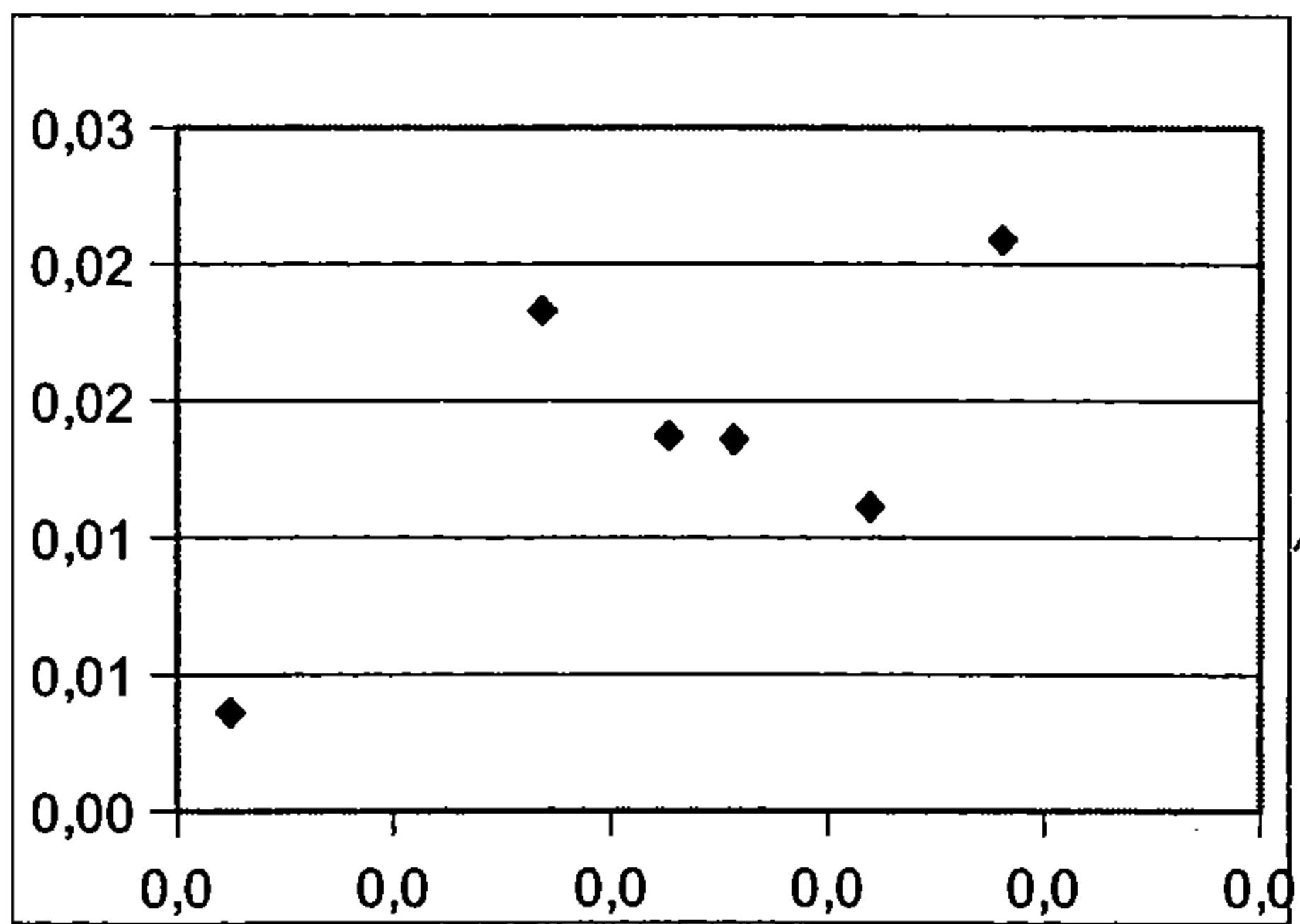
Graf 192: vliv obsahu zinku na obsah fosforu, $R^2 = 0,702$



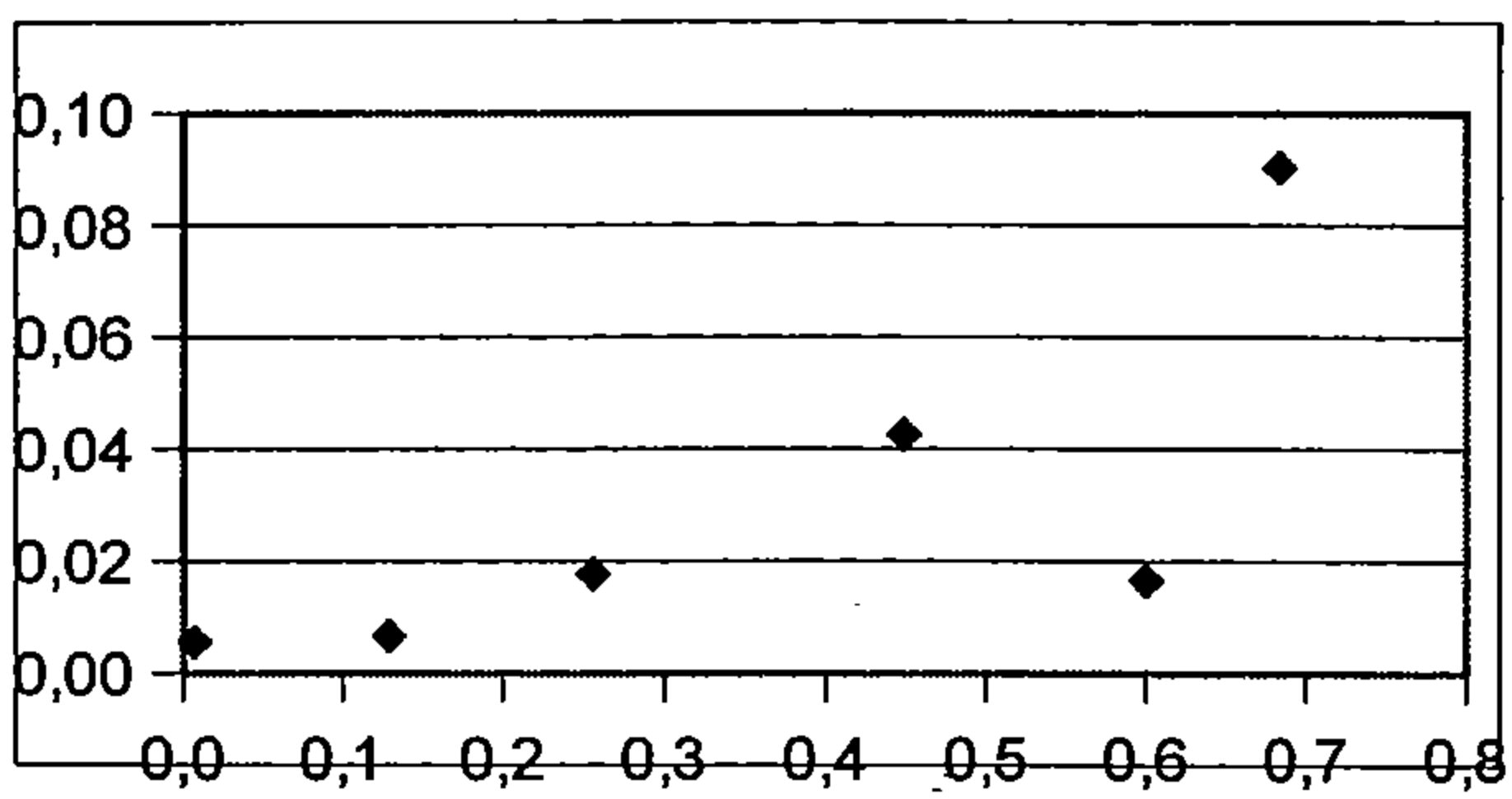
Graf 191: vliv obsahu železa na obsah fosforu, $R^2 = 0,15$



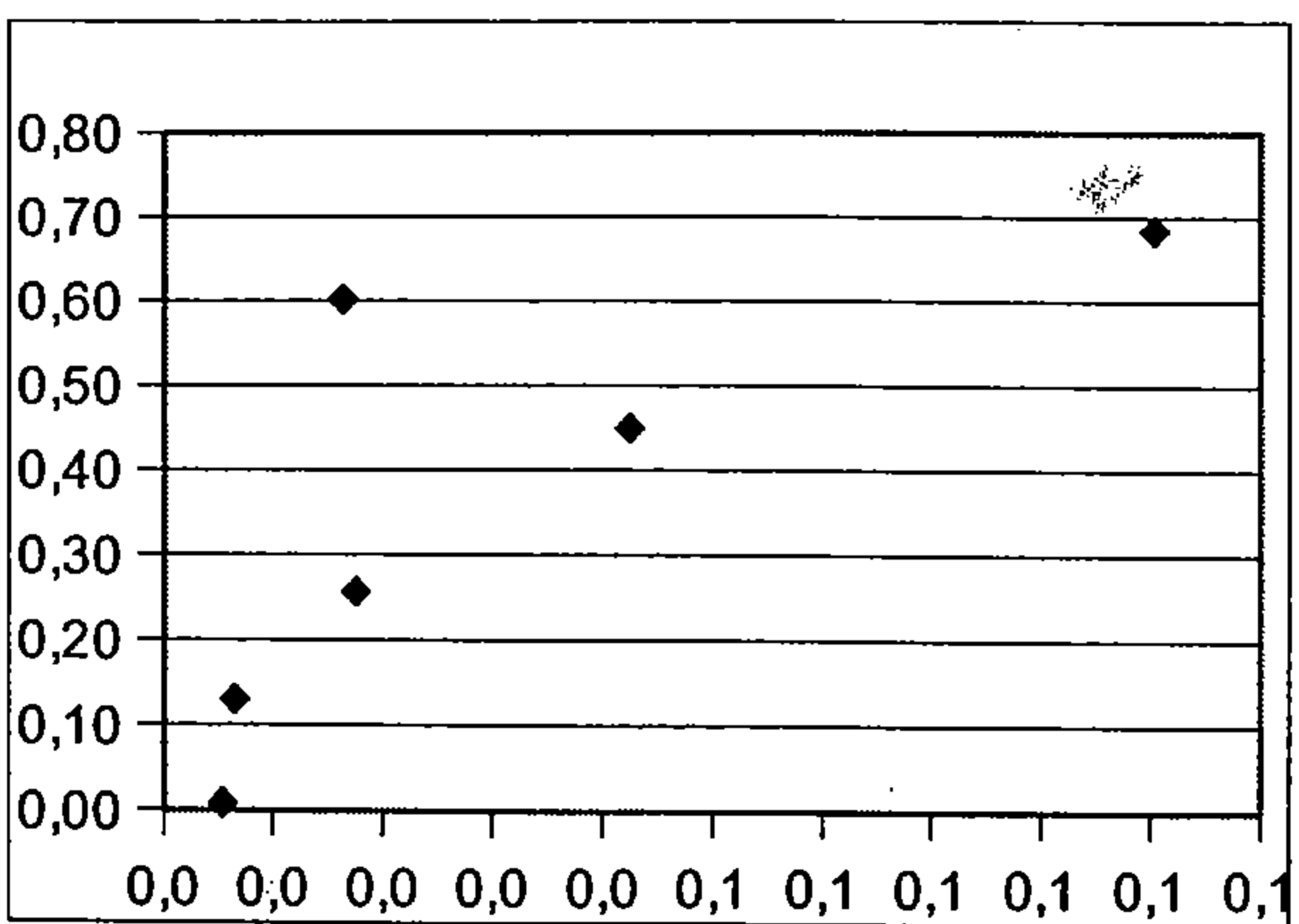
Graf 193: vliv obsahu mědi na obsah zinku, $R^2 = 0,563$



Graf 194: vliv obsahu zinku na obsah mědi,
 $R^2 = 0,54$



Graf 195: vliv obsahu vápníku na obsah
 hořčíku, $R^2 = 0,624$



Graf 196: vliv obsahu hořčíku na obsah
 vápníku, $R^2 = 0,645$

Seznam příloh

Obr. 1, grafické schéma postupu izolace frakcí

Tab. 11, charakteristika zeminy použité pro nádobový pokus

Obr. 2 – 11, IR spektra

Graf 1 – 196, korelace mezi prvky