

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA  
V PRAZE

Fakulta životního prostředí  
Katedra ekologie

Problematika stanovení koncentrací stříbra  
v plodnicích hub s vysokým obsahem chlóru

Bakalářská práce

Odborný konzultant: RNDr. Jan Borovička, Ph.D.  
(Ústav jaderné fyziky AV ČR, Geologický ústav AV ČR)

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jana Kocourková, CSc.

Bakalant: Iva Greňová

2012

---

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie  
Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Greňová Iva

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Problematika stanovení koncentrací stříbra v plodnicích hub s vysokým obsahem chlóru**

Anglický název

**The issue of determining the concentration of silver in the fruiting bodies of fungi with a high chlorine content**

---

### Cíle práce

Některé druhy velkých hub mohou v plodnicích akumulovat vysoké obsahy Ag. Koncentrace stříbra v některých houbách varíruje v různých laboratořích, někdy jsou výsledky několikrát nižší, než z pracoviště ÚJF AV ČR. Je možnou příčinou je přítomná vysoká koncentrace Cl v daných vzorcích a srážení nerozpustného chloridu stříbrného. Cílem práce je porovnat některé metody stanovení koncentrací Ag ve vzorcích hub se zaměřením na akumulátory Ag a Cl.

### Metodika

Ve vybraných vzorcích hub s využitím již zpracovaných vzorků v archívu zadavatele stanovení koncentrací: 1/ Cl metodou krátkodobé neutronové aktivační analýzy (INAA); 2/ Ag metodou krátkodobé a dlouhodobé neutronové aktivační analýzy (INAA, ENAA); 3/ Ag metodou ICP-MS při použití několika způsobů rozkladu vzorku (rozklad v PTFE kalíšcích, mikrovlnný rozklad, analýza popela). 4/ Porovnání výsledků. Využití souboru vzorků s vysokými obsahy Ag, ale rozdílnými obsahy Cl. Pro porovnání stanovení koncentrací i některých jiných prvků ve vzorcích (např. Cs). V případě prokázání vzniku sraženiny při „mokrém rozkladu“ pokus identifikace této látky (? AgCl) metodami XRD nebo Ramanovou spektrometrií. Rešeršní část práce stručně pokryje geochemii Ag a Cl, současné znalosti o obsazích obou těchto prvků v houbách a stručně popíše použité analytické metody (INAA, ICP-MS).

### Harmonogram zpracování

ÚJF AV ČR, Řež u Prahy: 1/ Seznámení s problematikou kovů v houbách Analýza stopových prvků – principy, význam, referenční materiály. Seznámení s neutronovou aktivační analýzou. Výběr druhů hub k analýze, příprava lisovaných tablet z hub pro aktivační analýzu (LT-/ST-INAA, ENAA), spálení vybraných vzorků hub v muflovací peci; 2/ Aktivační analýza vzorků hub, stanovení Cl (ST-INAA) a Ag (ST-ENAA); 3/ Vyhodnocení naměřených dat; GIÚ AV ČR, Suchdol: 4/ Seznámení s problematikou analýzy metodou ICP-MS a principem ICP-MS. Rozklad vzorků hub, pozorování případných problémů s rozkladem vzorků. 5/ Analýza rozložených vzorků hub metodou ICP-MS, stanovení Ag a případně dalších prvků; 6/ Vyhodnocení dat + plán dalšího postupu v případě problémů s rozkladem (srážení záhadné sloučeniny): analýza sraženiny pomocí rentgenové strukturní analýzy (XRD) nebo Ramanovy spektrometrie.

## Rozsah textové části

40-60 stran

## Klíčová slova

chemická analýza, ICP-MS, INAA, Amanita, chlór, stříbro

## Doporučené zdroje informací

BOROVÍČKA J., ŘANDA Z., JELÍNEK E., KOTRBA P., DUNN C.E. 2007: Hyperaccumulation of silver by *Amanita strobiliformis* and related species of the section *Lepidella*. *Mycological research* 111, 1339 – 1344.

BOROVÍČKA J., KOTRBA P., GRYNDLER M., MIHALJEVIČ M., ŘANDA Z., ROHOVEC J., CEJTHMALT, STJIVET, DUNN C.E. 2010: Bioaccumulation of silver in ectomycorrhizal and saprobic macrofungi from pristine and polluted areas. *Science of the Total Environment* 408, 2733 – 2744.

BURFORD E.P., KIERANS M., GADD G.M. 2003: Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist* 17(3), 98 – 107.

GADD G.M. 2007: Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological research* 111, 3 – 49.

## Vedoucí práce

Kocourková Jana, doc. RNDr., CSc.

## Konzultant práce

RNDr. Jan Borovička, Ph.D.

  
prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry



  
prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.

Děkan fakulty

V Praze dne 6.9.2011

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Borovičky, Ph.D. a doc. RNDr. Jany Kocourkové, CSc., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze 29.4. 2012

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Janě Kocourkové, CSc., že se mě jakožto zoufalé studentky na poslední chvíli ujala a již od samého začátku mě pobízela a motivovala k činnosti a že pro realizaci mých představ vyjednala spolupráci s RNDr. Janem Borovičkou, Ph.D., kterému patří velký dík za umožnění účastnit se výzkumu na Ústavu jaderné fyziky AV ČR a na Geologickém ústavu AV ČR, za odborné vedení, věcné a upřímné připomínky, za poskytnutí literárních zdrojů a nesmírnou trpělivost při objasňování spousty nejasností. Děkuji i svým přátelům, kteří našli pochopení pro mé zanedbávání mimoškolních povinností v době tvorby této práce.

V Praze 29.4. 2012

## Abstrakt

Úvodní rešeršní část práce stručně charakterizuje říši hub se zaměřením na velké houby (makromycety). Poukázáno je hlavně na jejich ekologický význam, na interakce s geologickým podložím a na jejich roli v koloběhu látek v přírodě. Dále je popsána schopnost hub akumulovat těžké kovy, specificky stříbro; v souvislosti s tématem práce je uveden i přehled znalostí o koncentracích chlóru v plodnicích hub a dále i o geochemii obou prvků. Práce stručně shrnuje i základní principy analytických metod, které byly využity v experimentální části: instrumentální neutronové aktivační analýzy (INAA), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a rentgenové difrakční analýzy (XRD).

Část experimentální se zabývá problematikou stanovení koncentrací stříbra v plodnicích hub. V experimentu byla prokázána výrazná odlišnost výsledků pro koncentrace stříbra v plodnicích hub naměřených pomocí INAA a ICP-MS, přičemž výsledky získané druhou metodou byly obecně nižší, a to v závislosti na koncentraci chlóru. Na druhou stranu však nebyly zjištěny významné rozdíly v případě stanovení rubidia. To podporuje teorii, že vysoké koncentrace Cl pravděpodobně způsobují srážení chloridu stříbrného, což znemožňuje správné stanovení stříbra metodou ICP-MS. V případě jednoho vzorku zvláště bohatého na stříbro i chlór byla po rozkladu v roztoku pozorována šedobílá sraženina, u které rentgenová difrakční analýza (XRD) jednoznačně potvrdila, že se jedná o chlorid stříbrný.

Klíčová slova: chemická analýza, ICP-MS, INAA, *Amanita*, chlór, stříbro

## Abstract

In the introduction, this thesis mainly reviews the general knowledge of the fungal kingdom and specifically focuses on macrofungi (macromycetes) and their ecological roles, interactions with geological bedrock and their contributions to trace element cycling in the environment. The ability of macrofungi to accumulate heavy metals (especially silver) is described and, furthermore, general information on chlorine concentrations in macrofungal fruit-bodies is presented. Basic principles of three analytical methods used in the experimental part are summarized:

instrumental neutron activation analysis (INAA), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and X-ray diffraction analysis (XRD).

The experimental part of this thesis deals with the problem of determination of silver concentration in macrofungal fruit-bodies. It was demonstrated that the results obtained for some macrofungal species by ICP-MS are strikingly lower than those obtained by INAA, apparently depending on the total chlorine content. On the other hand, no striking differences were observed for rubidium. This supports the hypothesis of formation of silver chloride during the decomposition of the sample which makes correct analysis by ICP-MS not possible. In case of a single sample, very rich in silver and chlorine, a gray-whitish precipitate was observed in the solution after decomposition. According to the diffraction pattern obtained by XRD, the precipitate was identified as silver chloride.

Key words: chemical analysis, macrofungi, ICP-MS, INAA, *Amanita*, chlorine, silver

## Obsah

Úvod a cíl práce .....	9
2. Houby .....	12
2.2 Význam a využití hub.....	16
2.3 Akumulace těžkých kovů .....	19
3. Stříbro.....	22
4. Chlór.....	26
5. Instrumentální neutronová aktivační analýza (INAA) .....	28
5.1 Princip INAA.....	28
5.2 Vyhodnocení naměřené aktivity.....	28
5.3 Krátkodobá INAA .....	29
5.4 Výhody a nevýhody INAA.....	29
6 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	31
6.1 Princip ICP-MS .....	31
6.2 Výhody a nevýhody ICP-MS .....	32
7. Rentgenová difrakční analýza (XRD).....	33
8. Metodika .....	35
8.1 Výběr a příprava vzorků pro analýzu .....	35
8.2 Nedestruktivní stanovení Cl a Ag.....	36
8.3 Stanovení Ag a Rb pomocí ICP-MS .....	37
8.4 Vzorky s přidaným Ag .....	37
8.5 Identifikace sraženiny pomocí XRD analýzy.....	38
9. Výsledky .....	39
10. Diskuze.....	43
11. Závěr .....	46
12. Použitá literatura .....	47
Seznam vědeckých a českých názvů hub.....	52
Seznam tabulek .....	53
Seznam obrázků .....	54



## Úvod a cíl práce

### Úvod

Schopnost hub koncentrovat ve svých plodnicích velké množství těžkých kovů a jiných stopových prvků je všeobecně známá. Vzhledem k velké oblibě konzumace hub byl v minulosti výzkum soustředován především na jedlé druhy a na koncentrace toxických těžkých kovů, které pro člověka představují největší zdravotní riziko, hlavně tedy kadmium, rtuť a olovo. Velkým přínosem pro výzkum byl rozvoj analytických metod, mimo jiné neutronové aktivační analýzy. V 80. letech 20. století se výzkum zaměřil na houby především jako na možné biologické indikátory míry znečištění prostředí. To však netrvalo dlouho, neboť nebyla prokázána významná souvislost mezi obsahy těžkých kovů a mírou znečištění půdy.

Některé druhy velkých hub mohou v plodnicích akumulovat vysoké obsahy stříbra. Např. u druhů některých muchomůrek byly naměřeny koncentrace až 2500× větší než v půdě. O těchto houbách mluvíme jako o tzv. hyperakumulátorech. Schopnost hyperakumulace prvků je u hub poměrně vzácným úkazem, ale byla prokázána přinejmenším v případě vanadu, stříbra a arzenu.

V minulosti byl na Oddělení jaderné spektroskopie v ÚJF AV ČR v Řeži opakovaně zjištěn problém, kdy komerční i vědecké laboratoře pověřené úkolem stanovit v některých houbách koncentrace stříbra metodou ICP-MS dodaly výsledky podstatně nižší, než jaké byly na tomto pracovišti zjištěny pomocí neutronové aktivace. Problém může souviset s faktem, že v daných vzorcích byly kromě vysokých koncentrací stříbra také vysoké koncentrace chlóru. Tato nesrovnalost by mohla být dána srážením velmi špatně rozpustného chloridu stříbrného v průběhu rozkladu vzorku (Jan Borovička, III. 2011, in verb.).

Cílem této práce bylo:

1/ Zpracovat stručnou literární rešerši o velkých houbách, geochemii Ag a Cl a shrnující současné znalosti o obsazích obou prvků v houbách a stručně popsat použité analytické metody (INAA, ICP-MS, XRD).

2/ Stanovit koncentrace Cl, Ag a Rb ve vhodně vybraných vzorcích hub metodou tzv. krátkodobé a dlouhodobé instrumentální neutronové aktivační analýzy (INAA, ENAA) na pracovišti ÚJF AV ČR v Řeži.

3/ Stanovit koncentrace Ag a Rb ve vybraných vzorcích hub metodou ICP-MS na pracovišti GIÚ AV ČR v Praze při použití dvou způsobů rozkladu vzorku (rozklad v teflonových kelímcích na topné desce vs. mikrovlnný rozklad).

4/ Porovnat výsledky získané oběma metodami a zjistit případnou závislost správnosti stanovení na koncentraci Cl ve vzorcích. V případě vzniku sraženiny při “mokrém rozkladu” identifikovat tuto látku metodou XRD.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 2. Houby

### 2.1 Charakteristika hub

Houby (*Fungi*) jsou nejpočetnější a velmi významná skupina eukaryotických heterotrofních organismů (Kalina & Váňa, 2005). Dříve byly řazeny k rostlinám (*Plantae*), ale vzhledem k významným odlišnostem jsou nyní považovány za samostatnou říši. Jedním ze základních rozdílů oproti zeleným rostlinám je absence chlorofylu a heterotrofní způsob výživy (Klán 1989; Kalina & Váňa, 2005; Rogers, 2011). Houby jsou organismy jednobuněčné nebo mnohobuněčné; buňky mají jádro s jadernou membránou (*karyolema*), čímž se liší od bakterií a sinic. Buněčné stěny jsou tvořeny chitinem, který můžeme nalézt i u zástupců z říše živočichů (*Animalia*). S říší živočichů mají dále společnou zásobní látku - glykogen (Klán, 1989). Do říše houby jsou také řazeny tzv. lichenizované houby - lišejníky, kdy houba (mykobiont) žije ve spojení s jiným organismem - fotobiontem, jímž je řasa, či sinice (Kalina & Váňa, 2005). Stélka (thallus) hub má jednoduchou stavbu, která u mnohobuněčných zástupců může dosahovat délky až několik desítek metrů. Většinou jsou houby tvořeny větvenými vlákny - hyfami (Klán, 1989). Shluk propletených houbových hyf se nazývá mycelium (podhoubí) (Kalina & Váňa, 2005).

Vzhledem k tomu, že možnosti výzkumu hub se rozvíjejí a neustále jsou objevovány nové druhy, názory na systematiku hub jsou různé. Kalina & Váňa (2005) řadí říši hub do domény Eukarya, kam spadá pět oddělení: *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. V této jejich publikaci je také uvedeno členění podle Simpsona & Rogera (2004), kde organismy, které spadají do oboru mykologie, jsou zahrnuty v říších *Opisthoconta*, *Amoebozoa*, *Chromalveolata*, *Rhizaria*, *Excavata*. V dnes již zastaralé práci Klána (1989) je členění založené na tvaru a funkci rozmnožovacích orgánů, kde do říše hub spadá kmen *Eumycota* (houby pravé). Do tohoto kmene jsou řazeny čtyři podkmeny *Mastigomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*. Často se můžeme setkat s dělením hub na „nižší“ a „vyšší“ nebo lépe na *mikromycety* a *makromycety*. Jako mikromycety jsou chápány ty druhy, které tvoří malé plodnice, anebo je netvoří vůbec, jako makromycety jsou pak označovány houby mající plodnice větší

než 1 mm (Smotlacha, 1983). V této práci je dále pojednáváno pouze o velkých houbách - makromycetech.

Houby jsou heterotrofní organismy, nemají tedy schopnost tvořit organické látky z látek anorganických. Jsou charakteristické biochemickou specializací a rychlým metabolismem (Klán, 1989). Mohou se vyživovat osmoticky, absorpčním způsobem (Kalina & Váňa, 2005). Některé houby díky produkci enzymů rozkládajících vysokomolekulární sloučeniny, které pak ve vodných roztocích mohou procházet buněčnou stěnou. Tento způsob výživy z odumřelých organických látek je charakteristický pro saprotrofní druhy (Klán, 1989; Kalina & Váňa, 2005; Rogers, 2011).

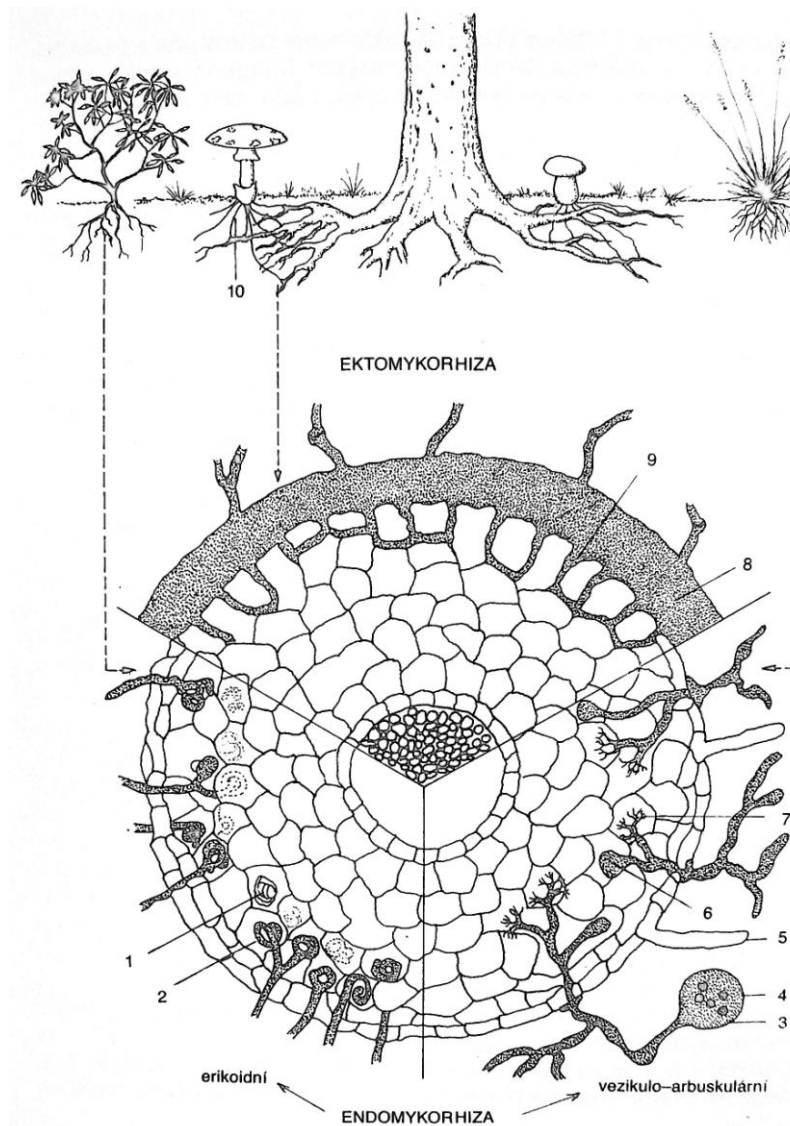
Dalším způsobem výživy hub může být parazitismus, kdy dochází k odnímání asimilátů a dalších látek z těl živých organismů (Klán, 1989; Kalina & Váňa, 2005; Rogers, 2011). Parazitické houby tímto způsobem výživy na živých organismech (převážně rostlinách, ale i hmyzu a houbách) hostitele oslabují, přičemž činnost parazita může vést až k odumření hostitele (Rogers, 2011). U parazitických hub může mycelium pokrývat povrch hostitele a být přichyceno pomocí apresorií, častěji ale proniká do těla hostitele, kde se může rozrůstat v mezibuněčných prostorách (intercelulární mycelium). Mycelium však může pronikat přímo do buňky hostitelského organismu (intracelulární mycelium). Existují také druhy saproparazitické, které mají schopnost změnit způsob výživy a po usmrcení hostitele přecházejí na saprotrofní výživu (Kalina & Váňa, 2005).

Dále se můžeme setkat s houbami symbiotickými - mykorhizními. Mykorhiza je morfologické spojení mykobionta s fytoiontem, kontaktním místem je kořenový systém zelené rostliny (Klán, 1989; Kalina & Váňa, 2005). Mykorhizní spojení se značně liší od houbových infekcí, které způsobují kořenové hniloby (Rogers, 2011). Laboratorními pokusy bylo prokázáno, že mykorhiza je významná pro oba dva partnery, kdy dřeviny bez svého mykobionta rostly velmi pomalu, houby bez fytoionta také, anebo nevyrostly vůbec (Klán, 1989). Klán (1989) uvádí jako základní typy mykorhizy endomykorhizu a ektomykorhizu (Obrázek 1).

U endomykorhizy dochází k pronikání hyf do buněk kořínků, ale nevytváří se hyfový plášť (Klán, 1989; Kalina & Váňa, 2005); pozorovatelná je pouze mikroskopicky. Nejrozšířenějším typem je vesikulo-arbuskulární endomykorhiza. Hyfy se šíří jak buňkami, tak mezibuněčnými prostory. Ve vnitřní kůře kořene se uvnitř buněk vytvoří keříčkovitě větvené útvary (arbuskuly), což je metabolizující

orgán houby. Membránový charakter stěn arbuskul umožňuje oboustranný přenos živin. Při endomykorhize se později vytváří ještě tzv. vesikuly houbových hyf, se zásobní funkcí, které jsou narozdíl od arbuskul trvalými útvary (Klán, 1989). Arbuskulární mykorhizy tvoří zástupci hub spájevých. U vyšších hub se můžeme s endomykorhizou setkat u orchideoidní mykorhizní symbiózy (např. rod *Armillaria*) a u symbiózy erikoidní (např. rod *Clavaria*) (Gryndler et al., 2004).

**Obrázek č. 1:** Morfologie hlavních typů mykorhiz (příčný řez kořenem) (Klán, 1989).



1 - odumřelá hyfa, 2 - živá hyfa, 3 - plodnička, 4 - výtrusy, 5 - kořenový vlásek, 6 - vezikulus, 7 - arbuskulus, 8 - hyfový plášť, 9 - Hartigova síť, 10 - mycelium

V případě makromycetů je nejvýznamnější ektomykorhizní symbióza. Hyfy vnikají pouze do mezibuněčných prostor kůry kořene (kolem buněk kořene tvoří Hartigovu síť), kořínky dřeviny jsou morfologicky změněny, přičemž ektomykorhizní kořeny jsou pokryty hyfovým pláštěm a lze je pozorovat pouhým okem (Obrázek 2) (Klán, 1989; Kalina & Váňa, 2005). Ektomykorhiza je nejrozšířenější u zástupců stopkovýtrosých hub (Kalina & Váňa, 2005). Obnovuje se již po jednom až dvou letech a nejlépe vyvinutá je u jehličnatých dřevin. U dřevin je běžné, že tvoří mykorhizu s více druhy hub zároveň, houba může být mykorhizní s několika druhy dřevin.

**Obrázek č. 2:** Detail ektomykorhizy na kořeni borovice (Vohník, 2010). Foto Martin Vohník.



Dostanou-li se hyfy ektomykorhizních hub do buněk kořene, označujeme symbiózu jako ektendomykorhizní, společně s arbutoidní a monotropoidní mykorhizní symbiózou představují přechod mezi ektomykorhizní a endomykorhizní symbiózou (Gryndler et al., 2004).

Mykorhizní symbióza je velmi důležitá pro výživu obou partnerů a v určité fázi vývoje může být jeden z partnerů zcela závislý na druhém. Pro dřevinu je symbióza přínosná, neboť houba jí dodává vodu a minerální látky, které by jinak

rostlina nebyla schopna z půdy efektivně uvolnit, např. fosfor. Ten se většinou v půdě nachází v nerozpustné formě, tedy pro dřevinu nedostupné. Mykorhizní houba enzymaticky (pomocí fosfatázy) sloučeniny rozkládá a akumuluje do mycelia, odkud ho již rostlina může přijímat. Podobně je tomu tak i s dusíkem, kdy jsou enzymem nitrátoreduktázou štěpeny v půdě obsažené dusičnany. Kromě toho jsou houby schopné zpřístupňovat rostlinám i stopové prvky, např. Ca, K a Mg (Landeweert et al., 2001). Mykobiont je zcela odkázán na rostlinu v příjmu energetických zdrojů a živin, především sacharidů. Dále je ve vztahu významná ochranná funkce, například před parazitismem. Některé druhy hub mají velký význam pro zvýšení odolnosti dřeviny vůči kyselým dešťům. Kyselé srážky totiž mohou uvolňovat z půdy prvky jako je hliník, zinek a měď, které na rostliny působí toxicky (Klán, 1989).

## **2.2 Význam a využití hub**

Vzhledem k tomu, že houby jsou všudypřítomné organismy, vyskytující se i na extrémních stanovištích, mají značný ekologický význam. Velmi důležité jsou houby při geologických procesech, zejména při zvětrávání hornin a minerálů. Také hrají velkou roli při koloběhu živin a některých těžkých kovů, vliv mají i na šíření mikroorganismů v minerálních substrátech (Burford et al., 2003).

Houby jsou velmi důležitým článkem detritového potravního řetězce, neboť se podílejí na dekompozici organických látek. Jejich makromolekuly rozkládají až na nejjednodušší složky. Podílejí se ale i na syntéze jednodušších organických látek na látky složitější. Přičemž pro zachování úrodnosti půdy by měla humifikace převládat nad mineralizací (Klán, 1989). Houby mají významnou roli v biogeochemických cyklech některých prvků, například uhlíku, dusíku, fosforu, síry, draslíku (Walker, 1975; Klán, 1989; Gadd, 2007; Fulton, 2011; Rogers, 2011). Například mohou lákat hlístice, kterým slouží houby jako potrava. Hlístice následně vylučují dusík, síru a fosfor v takové formě, kterou již rostliny mohou využívat (Fulton, 2011). V koloběhu látek jsou velmi významné mykorhizní houby, neboť umožňují svým symbiotickým rostlinám větší přístup k živinám a vodě. Síť houbových hyf výrazně rozšiřuje plochu pro vstřebávání látek pro rostlinu potřebných k růstu, a to i ve velkých vzdálenostech od kořene rostliny (Walker, 1975; Fulton, 2011). Významný je například příjem fosforu, který je v půdě málo

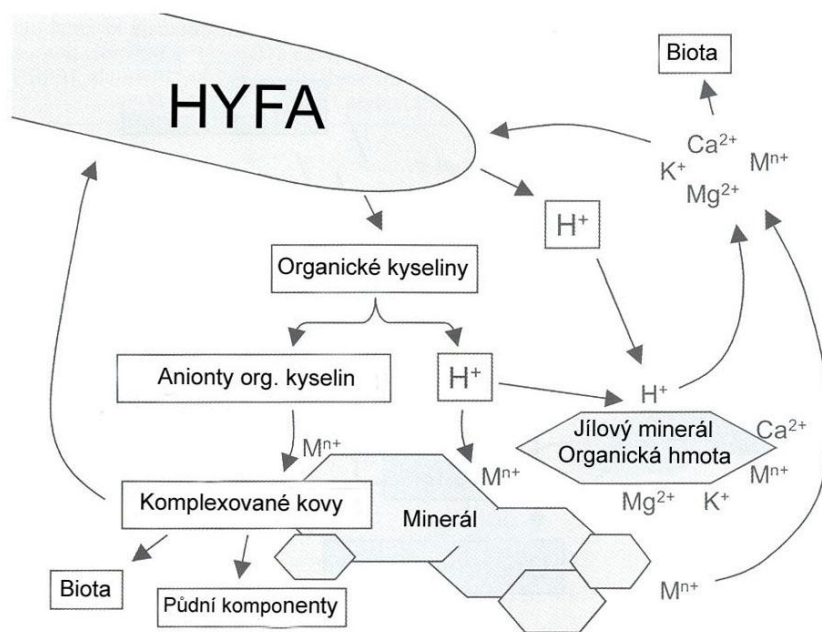


mobilní. Mykorhizní houby se tak mohou v některých případech stát účinnou náhradou za fosforečné hnojivo (Fulton, 2011).

Síť mycelia je důležitá pro udržování půdní struktury, zlepšuje pórovitost půdy, pohyb a zadržení vzduchu a vody v půdě (Walker, 1975; Gadd, 2007; Fulton, 2011). U některých mykorhizních hub se můžeme setkat se schopností přenášet rozpuštěné sloučeniny uhlíku z jedné rostliny na druhou, u stejných či odlišných druhů rostlin (Walker, 1975). Fulton (2011) zmiňuje důležitost mykorhizních hub také při sekvestraci uhlíku v půdě, a díky tomu i následné snižování koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře. Další významnou rolí hub v koloběhu látek v půdě je schopnost mobilizovat kovy, polokovy a radionuklidy mající původ přírodní či antropogenní (Gadd, 2007).

Obor zabývající se rolí hub v geologických procesech se nazývá geomykologie. Houby hrají velmi významnou roli při interakcích s minerály a jsou nedílnou součástí půdní biochemie. Podílejí se na rozrušování nerostů a na jejich transformaci (Burford et al., 2003; Gadd, 2007). Horninu mohou poškozovat biomechanicky nebo biochemicky. Biochemické zvětrávání (Obrázek 3) může vést ke změnám minerálů nebo i k úplnému rozrušení minerálních zrn (Gadd, 2007). Zvětrávací proces může nastat v důsledku vylučování metabolitů, například H<sup>+</sup> nebo organických kyselin (Burford et al., 2003; Gadd, 2007). Organické kyseliny, jako například kyselina šťavelová a kyselina citronová, působí agresivně na povrchy minerálů a narušují je. Vyloučení organických kyselin houbami může být ovlivněno přítomností toxických kovů v minerálech. Kyselina šťavelová může kovy vyluhovat a následně vytvářet rozpustné šťavelové komplexy (Gadd, 2007). Interakce hub s podložím mají tedy vliv při uvolňování a rozptylu některých kovů v půdním prostředí. Na druhou stranu je tu schopnost sorbce a akumulace kovů v tělech hub, které mohou představovat vstupní cestu do potravního řetězce, což může mít neblahé důsledky pro některé organismy (Gadd, 2001).

**Obrázek č. 3:** Rozpouštění kovů v půdním prostředí organickými kyselinami produkovanými houbovými hyfami (Gadd, 2004; upraveno).



Význam hub pro člověka je vzhledem k tomu, že se jedná o skupinu značně rozmanitou, jak pozitivní, tak i negativní. Ve střední Evropě jsou plodnice jedlých volně rostoucích hub běžnou součástí jídelníčku už od pradávna. Dříve bylo houbám přezdíváno „maso lesa“ nebo také „maso chudých“. Největší význam ve výživě člověka mají houby zejména proto, že obsahují důležité minerální látky a vitamíny. Jejich využitelnost je jen velmi málo známá (Kalač, 2008). Zmínky o záměrném pěstování jedlých hub pochází již z 2. až 3. století (Klán, 1989). Mezi dnes nejběžněji pěstované druhy patří např. pečárka dvouvýtrusá (*Agaricus bisporus*), konzumace volně rostoucích žampionů se však někdy nedoporučuje (Cibulka, 1996), neboť kumulují ve větší míře kadmium a rtuť (Borovička, 2007; Kalač, 2008). Schopnost kumulovat těžké kovy se zřejmě zvyšuje se stářím mycelia. U pěstovaných žampionů bývá stáří mycelia pouze několik měsíců (a na čistém substrátu), kdežto mycelium nacházející se volně v přírodě může být staré i několik desítek let (Kalač, 2008). Další pěstované houby jsou například hlívy (*Pleurotus*), lanýže (*Tuber*) a límcovka vrásčitoprstenná (*Stropharia rugosoannulata*) (Klán, 1989).

Makromycety jsou velmi významné i pro farmakologický průmysl (Klán 1989; Kalač, 2008). Využívanými druhy jsou např. hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*) a lesklokorka lesklá (*Ganoderma lucidum*) (Kalač, 2008). Negativní roli pro člověka představují např. houby způsobující různá onemocnění rostlin (Kalina & Váňa, 2005). Dále je u některých druhů hub významná produkce toxinů (mykotoxinů), některé mohou po konzumaci vyvolávat zdravotní potíže, nebo mohou mít i smrtící účinek (Klán, 1989).

### 2.3 Akumulace těžkých kovů

Těžké kovy jsou obvykle definovány jako prvky s měrnou hmotností  $6 \text{ g cm}^{-3}$  (Alloway, 1995). Jsou to anorganické látky, které se vyskytují v horninách, půdě, vodním prostředí i v atmosféře, a to v různých koncentracích. Obsah těžkých kovů v půdě může být přirozený, pocházející z matečné horniny, nebo se může jednat o kovy původu antropogenního, např. ze suché či mokré atmosférické depozice (Gadd, 2001; Liška, 2003; Bellion et al., 2005; Gadd, 2007; Fulton, 2011). Kontaminace prostředí může být zejména v důsledku spalování fosilních paliv, těžbou a zpracováním nerostů (rud), z průmyslově znečištěných vod a kalů, či z hnojiv a pesticidních přípravků (Kabata-Pendias, 1988; Gadd, 2007; Fulton, 2011). Jako součást prachu v atmosféře můžou být těžké kovy větrem nebo dešťovými srážkami roznášeny do širšího okolí (Fulton, 2011). K půdám vykazujícím silnou schopnost vázat a fixovat stopové prvky patří zejména půdy těžšího charakteru s vyšším obsahem organických látek. Takové půdy nejvíce podléhají pozvolné chemické degradaci, která často vede k nevratným změnám. Důsledky znečištění se projevují po delší době. Půdy písčité sorbují stopové prvky jen slabě, neboť jsou snadno přístupné rostlinám a mohou se rychle dostávat do podzemních a povrchových vod (Kabata-Pendias, 1988).

Různé kovy, například Zn, Cu a Mn, mohou být pro organismy v nízkých koncentracích nezbytné, při vyšších koncentracích se mohou stávat toxickými. Dalšími takovými kovy jsou například Na, K, Co, Ca, Mg a Fe (Gadd, 2007; Fulton, 2011). Některé kovy mohou být toxické již při velmi nízkých koncentracích, např. Hg, Cd a Pb (Bellion et al., 2005). Mezi fyto toxické prvky patří zejména Zn a Ni, za nejnebezpečnější zootoxické a humanotoxické prvky jsou považovány hlavně Cd, Pb, Hg a Tl (Němeček et al., 2010).

Některé druhy hub mají značnou schopnost koncentrovat ve svých plodnicích stopové prvky, zejména těžké kovy, polokovy a radionuklidy (Cibulka, 1996; Liška, 2003; Borovička, 2007; Borovička et al., 2007; Zhang et al., 2010). Kumulace stopových prvků může být ovlivněna mnoha faktory, především se jedná o specifickou schopnost druhu kumulovat určitý prvek (Borovička, 2007; Fulton, 2011; Zhang et al., 2010). Dále je důležitá ekologická strategie, stáří mycelia, případně růstová vlna (Borovička, 2007), přičemž starší mycelium by mělo být v kumulaci účinnější než mycelium mladší (Zhang et al., 2010). Mnoho výzkumů ukázalo, že obsah kovů je větší u mladších plodnic, vliv může mít tedy i stáří, resp. velikost plodnice (Kalač, 2008). Významný vliv mají i vlastnosti prostředí, jako například povaha geologického podloží, kontaminace a mobilita prvků v půdách, která může být ovlivněna pH půdy, oxidačně redukčními podmínkami, přítomností jílovitých minerálů a organických látek (Tüzen et al., 1998; Gadd, 2001; Borovička, 2007; Zhang et al., 2010). Schopnost akumulace prvku vystihuje bioakumulační faktor, což je poměr množství prvku obsaženého v sušině plodnice a v sušině substrátu (Borovička, 2007; Kalač, 2008). Mimořádně vysoká schopnost hromadit stopové prvky v tkáních rostlin či hub je označována jako hyperakumulace. Pojem hyperakumulace je definován jako schopnost koncentrovat 100 krát větší množství než ostatní rostliny, respektive houby rostoucí na stejném substrátu (Borovička, 2007; Borovička et al., 2007).

K akumulaci prvků v plodnicích hub dochází především transportem přes mycelium, u druhů vytvářejících trvalejší plodnice má význam spíše atmosférická depozice (Borovička, 2007). Mechanismy akumulace kovu můžeme rozdělit na procesy závislé či nezávislé na metabolismu organismu. Metabolicky závislé mechanismy zahrnují aktivní dopravu kovu do intracelulárních prostor a jsou obecně pomalejší. Proces na metabolismu nezávislý označujeme jako biosorpci. U většiny vláknitých hub je biosorpce v porovnání s metabolicky závislým příjmem více zastoupená (Gadd, 2001). Biosorpce kovů probíhá především iontovou výměnou, chelatací a adsorbci na biopolymerech buněčných stěn (Bellion et al., 2005; Fulton, 2011). Významnou roli při akumulaci kovu houbou hrají cysteinem bohaté bílkovinné molekuly, tzv. metalothioneiny (Cibulka, 1996; Gadd, 2001; Liška, 2003; Bellion et al., 2005; Gadd, 2007). Iont kovu se nejprve váže na vnější stěnu myceliového vlákna, poté se dostává do nitra buňky. Tento proces je velmi energeticky náročný a dochází k vyloučení draslíku. Například

při zabudování jednoho iontu kadmia dojde k vyloučení dvou iontů draslíku (Cibulka, 1996).

### 3. Stříbro

Stříbro je ušlechtilý měkký tažný kujný kov značného ekonomického významu. Uplatnění má například v elektrotechnice, fotografickém průmyslu nebo v lékařství. Stříbro se velmi snadno vylučuje elektrolýzou z roztoků svých solí. Stříbrné kationty mají sklon k tvorbě sloučenin s velkou mřížkovou energií, mnoho ze sloučenin stříbra je tedy ve vodě nerozpustných (Heslop & Jones, 1982). Je nejstálější s oxidačním číslem +I. Jeho dobře rozpustnou solí je např. dusičnan stříbrný, naopak málo rozpustný je síran. Z halogenidů je dobře rozpustný fluorid, nerozpustné jsou chloridy, bromidy a jodidy. Ag s vyšším oxidačním číslem než jedna je většinou nestálé, vzniká například při tvorbě komplexních sloučenin. Ty jsou však také nestálé a vyznačují se silnými oxidačními účinky (Lukeš, 2009).

V přírodě vytváří stříbro např. samostatné minerály argenit ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ), pyrargyrit ( $\text{Ag}_3\text{SbS}_3$ ), proustit ( $\text{Ag}_3\text{AsS}_3$ ) a chlorargyrit ( $\text{AgCl}$ ) (Heslop & Jones, 1982; Lukeš, 2009), celkově tvoří přibližně  $2 \times 10^{-5}$  % litosféry (Heslop & Jones, 1982). Stříbro je přítomné jako kov či sloučenina v některých horninách, v rudách často doprovází Cu (Maynard, 1983) a běžně se vyskytuje také s Au, Pb a Fe (Křížková et al., 2009). Průměrná koncentrace Ag v horních vrstvách půdy je většinou nižší než  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kabata-Pendias, 2001), někdy je uváděna hodnota až  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Mobilita Ag v půdách je relativně nízká (Borovička et al., 2010). Koncentrace může být v půdě významně zvýšena antropogenní činností, např. v důsledku těžby, metalurgie, odpadu z fotografického průmyslu, umělého vyvolávání srážek aj. V České republice je těžbou stříbra značně ovlivněno okolí Kutné Hory (Křížková et al., 2009). V rostlinných tkáních můžeme nalézt koncentrace obvykle nižší než  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , hodnoty se ale mohou velmi lišit, a to v závislosti na druhu (Borovička et al., 2010).

Stříbro v iontové formě  $\text{Ag}^+$  je jedním z nejvíce toxických kovů pro mnohé organismy, především bakterie, řasy a ryby (Křížková et al., 2009; Borovička et al., 2010). Již při koncentraci  $\text{Ag}^+$   $1\text{--}5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  dochází k úhynu některých druhů ryb (Křížková et al., 2009). Toxicita je způsobena schopností  $\text{Ag}^+$  iontů vázat se na enzymy a další buněčné komponenty, čímž je narušena jejich funkčnost (Borovička et al., 2010). Přítomnost Ag iontů v rostlinách ovlivňuje mnoho procesů, např. může inhibovat působení ethylenu, ovlivnit propustnost membrán, a tím omezit

příjem vody a minerálů, ovlivňuje syntézy lipidů aj. Rostliny mohou biosyntetizovat obranné proteiny a sloučeniny za účelem detoxikace (Křížková et al., 2009).

Schopnost akumulace Ag byla prokázána u některých bakterií, v jejich buněčných strukturách byly nalezeny stříbrné nanočástice. Ty byly zjištěny také ve tkáních některých druhů rostlin rostoucích na substrátu s vysokým obsahem Ag (Harris & Bali, 2008). Se schopností „akumulace“ stříbra se můžeme setkat dále u mechorostů, některé druhy jsou schopny adsorbovat téměř veškeré Ag z celkového ročního atmosférického spadu (Suchara & Sucharová, 2005). Z eukaryotních organismů byla významná schopnost akumulace Ag popsána pouze u hub (Borovička et al., 2007). Přehled některých akumulujících a hyperakumulujících druhů s naměřenými koncentracemi je uveden v Tabulce 1.

**Tabulka č. 1:** Přehled některých hub akumulujících a hyperakumulujících Ag v plodnicích (Borovička et al., 2010; upraveno).

čeleď / rod / druh	ekologie	prostředí	koncentrace Ag (v sušině)	Reference
<i>Amanita</i> (sekce <i>Lepidella</i> )	ECM	čistě	desítky-stovky mg kg <sup>-1</sup> (-1253 mg kg <sup>-1</sup> )	1
<i>Amanita</i> (sekce <i>Vaginatae</i> )	ECM	čistě	do 35 mg kg <sup>-1</sup>	9, 10, 18
<i>Boletus</i> spp. ( <i>B. edulis</i> , <i>reticulatus</i> )	ECM	čistě	desítky mg kg <sup>-1</sup> (-102 mg kg <sup>-1</sup> )	2, 7, 11, 12, 17
<i>Amanita</i> (sekce <i>Vaginatae</i> )	ECM	Ag-znečištěné	stovky mg kg <sup>-1</sup> (-692 mg kg <sup>-1</sup> )	18
<i>Boletus edulis</i>	ECM	Ag-znečištěné	206-242 mg kg <sup>-1</sup>	18
<i>Agaricus</i> spp.	SAP	čistě	běžně desítky mg kg <sup>-1</sup>	2, 3, 5, 6, 13, 16
<i>Macrolepiota</i> spp. ( <i>M. procera</i> , <i>rhacodes</i> )	SAP	čistě	jednotky-desítky mg kg <sup>-1</sup> (-150 mg kg <sup>-1</sup> )	8, 12, 15, 17
<i>Lycoperdaceae</i> (různé rody)	SAP	čistě	desítky mg kg <sup>-1</sup> (-315 mg kg <sup>-1</sup> )	12, 14, 17
<i>Agaricus</i> spp.	SAP	městské	desítky-stovky mg kg <sup>-1</sup> (-528 mg kg <sup>-1</sup> )	4, 18
<i>Agaricus xanthodermus</i>	SAP	Ag-znečištěné	995 mg kg <sup>-1</sup>	13
<i>Hygrocybe coccinea</i>	SAP	Ag-znečištěné	120 mg kg <sup>-1</sup>	9
<i>Lycoperdaceae</i> ( <i>Calvatia</i> , <i>Lycoperdon</i> )	SAP	Ag-znečištěné	desítky mg kg <sup>-1</sup>	18

1 - Borovička et al. (2007), 2 - Byrne et al. (1979), 3 - Cocchi & Vescovi (1997), 4 - Falandysz & Bona (1992), 5 - Falandysz & Danisiewicz (1995), 6 - Falandysz et al. (1994a,b,c), 7 - Falandysz et al. (2001), 8 - Falandysz et al. (2007), 9 - Jones et al. (1985), 10 - Michelot et al. (1998), 11 - Nikkarinen & Mertanen (2004), 12 - Řanda (2002), 13 - Řanda & Kučera (2004), 14 - Schmitt et al. (1978), 15 - Stijve & Andrey (2002), 16 - Stijve et al. (2001), 17 - Svoboda & Chrastný (2008), 18 - Borovička et al. (2010).

ECM - ektomykorhizní houby, SAP - saprotrofní houby

Ektomykorhizní houby mají obvykle nižší obsah Ag než houby saprotrofní, nejméně u dvou ektomykorhizních druhů však byla zjištěna hyperakumulace stříbra: u muchomůrky šiškovité (*Amanita strobiliformis*) (Obrázek 4) a u muchomůrky

ježatohlavé (*Amanita solitaria* (Obrázek 5). Koncentrace Ag v plodnicích hub byly 800–2500× větší než v půdě, a to vesměs na místech nepostižených kontaminací (Borovička et al. 2007, 2010). Obsah Ag u mnoha dalších druhů muchomůrek nepřekročil hodnoty typické pro ektomykorhizní houby. U saprotrofních druhů jsou obsahy Ag obecně o něco vyšší než u ektomykorhizních hub, s nejvyššími koncentracemi např. u pečárky polní (*Agaricus campestris*), pečárky pochvaté (*A. bitorquis*), pečárky císařské (*A. augustus*) a pečárky zápašné (*A. xanthodermus*) (Borovička et al., 2007, 2010). Dalšími účinnými akumulátory mohou být druhy z čeledi *Boletaceae* a *Lycoperdaceae*, z čeledi *Agaricaceae* pak ještě např. pýchavka palicovitá (*Calvatia excipuliformis*, Obrázek 6) (Borovička et al., 2010).

**Obrázek č. 4:** Muchomůrka šiškovitá (*Amanita strobiliformis*), druh obsahující vysoké koncentrace Ag a Cl. Foto Jan Borovička.





**Obrázek č. 5:** Muchomůrka ježatohlavá (*Amanita solitaria*), druh obsahující vysoké koncentrace Ag a Cl. Foto Jan Borovička.



**Obrázek č. 6:** Pýchavka palicovitá (*Calvatia excipuliformis*), druh schopný akumulovat Ag, ale s nízkou koncentrací Cl. Foto Jan Borovička.

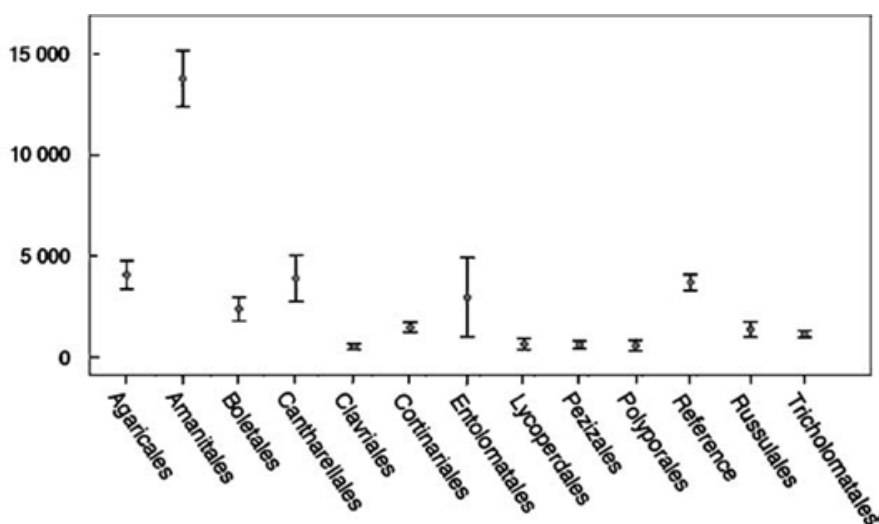


## 4. Chlór

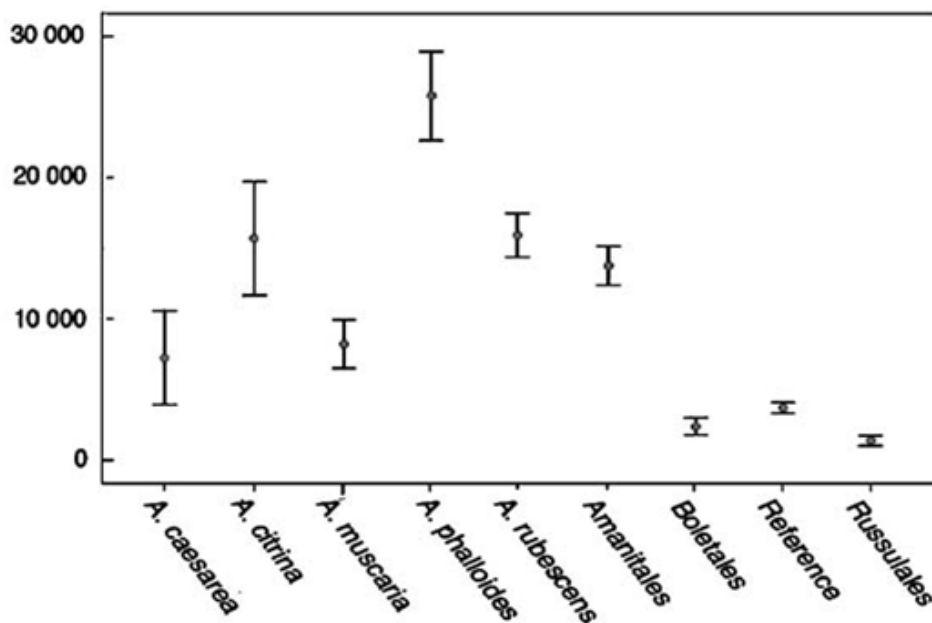
Chlór je žlutozelený toxický plyn. Je velmi reaktivní, v přírodě se tedy nevyskytuje volně (Heslop & Jones, 1982). Nejčastěji se vyskytuje ve formě NaCl a KCl - v pevné fázi či rozpuštěný ve vodě (Lukeš, 2009). Běžnou součástí horninového prostředí jsou chloridy, které se zvětráváním a vyluhováním dostávají do okolního prostředí (Nábělková & Nekovářová, 2010). Chlór je v pořadí dvacátý nejhojnější prvek na Zemi, jeho zastoupení v litosféře je 0,2 %. Nejvíce chlóru se spotřebovává při výrobě chlorovaných organických sloučenin, celkově 70% z jeho produkce. Asi 20% je použito při bělení papíru a textilií a na dezinfekci. Zbývajících 10% je použito při výrobě anorganických sloučenin chlóru. V atmosféře se chlór vyskytuje především ve formě HCl a NH<sub>4</sub>Cl. Původ v prostředí je např. z vulkanické činnosti, vodní tříšť z moří, přírodních požárů, ale může být i původu antropogenního, kdy zdrojem je např. spalování uhlí, odpadů a biomasy (Kalač et al., 2010).

Koncentrace Cl v houbách je běžně v koncentracích od desítek mg kg<sup>-1</sup> do tisícovek mg kg<sup>-1</sup> (Obrázek 7). U muchomůrek jsou známé koncentrace mnohem větší (Obrázek 8). Naměřené hodnoty v plodnicích muchomůrek jsou 1–2,5% jejich hmotnosti (Borovička, 2007). Jejich schopnost koncentrovat velké množství chlóru ve svých plodnicích je pro muchomůrky charakteristická a může být užitečná při jejich taxonomickém třídění (Petrini et al., 2009).

**Obrázek č. 7:** Koncentrace Cl naměřené u některých řádů hub (mg kg<sup>-1</sup> v sušině) (Petrini, 2009).



**Obrázek č. 8:** Rozmezí koncentrací Cl u muchomůrek, které koncentrují větší množství Cl, a některých dalších skupin hub (mg kg<sup>-1</sup> v sušině) (Petri, 2009).



Za jistých podmínek reaguje v roztoku chlór se stříbrem za vzniku sraženiny chloridu stříbrného. Chlorid stříbrný je bílá, ve vodě téměř nerozpustná sloučenina ( $K_s=1,6 \cdot 10^{-10}$ ). Na rozdíl od bromidu a jodidu se poměrně snadno rozpouští ve vodném roztoku amoniaku za vzniku chloridu diaminstříbrného. Halogenidy stříbrné jsou citlivé na světlo, využití mají proto například pro fotografické účely (Heslop & Jones, 1982; Lukeš, 2009).

## 5. Instrumentální neutronová aktivační analýza (INAA)

### 5.1 Princip INAA

INAA je nepříliš běžná analytická metoda, při níž je vzorek ozářen proudem neutronů; tento přehled byl vypracován na základě práce Řandy (2008). V případě tzv. neutronového záchytu, kdy atomová hmotnost prvku stoupá o 1, vzniká u řady prvků radioaktivní izotop, který, pakliže je při jeho přeměně uvolňováno gama záření, umožňuje stanovit kvantitativní i kvalitativní zastoupení původního prvku ve vzorku. Metoda umožňuje spolehlivé, citlivé nedestruktivní stanovení široké řady prvků, především stopových, již při koncentracích  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  %. Při neutronové aktivační analýze jsou vzorky aktivovány termálními neutrony s energií okolo 0,025 eV. Zdrojem neutronů je většinou jaderný reaktor. Pokud ozařujeme vzorek v kadmiovém pouzdře, dochází v tomto pouzdru díky izotopu  $^{113}\text{Cd}$  k absorbování neutronů s energií menší než 0,4 eV (tepelných neutronů), což zvyhodňuje stanovení prvků s tzv. rezonančním integrálem, tedy se zvýšenou specifickou schopností zachytávat neutrony s vyšší energií (epitermální neutrony). V tomto případě hovoříme o epitermální neutronové aktivační analýze (ENAA).

### 5.2 Vyhodnocení naměřené aktivity

Naměřenou aktivitu lze vyhodnotit tzv. absolutní metodou, která se však pro svou nejednoduchost v praxi nepoužívá. Obvykle se vyhodnocuje metodou relativní, která spočívá v tom, že společně s vzorky se ozařuje standard stanovovaných prvků a za stejných podmínek jako u vzorků je změřena jeho aktivita. Při vyhodnocování je možné vyloučit mnoho faktorů ovlivňujících přesnost stanovení. V současnosti se nejběžněji k měření aktivity využívá spektrometrie záření  $\gamma$ . V praxi se tedy vzorky měří na germaniových (HPGe) detektorech a naměřená gamaspektra pak umožňují vyhodnotit kvalitativní zastoupení prvků (podle energie píků) a kvantitativní zastoupení prvků (naměřená aktivita v porovnání se standardem).

### 5.3 Krátkodobá INAA

Při tzv. krátkodobé aktivační analýze se využívají radionuklidy s krátkými poločasy přeměny (v rozmezí několika sekund až hodin). Z tohoto důvodu je potřebný rychlý transport vzorku, k tomu slouží nejčastěji pneumatická potrubní pošta. Prvky produkující pouze krátkodobé radioizotopy jsou F, Mg, Al, S, Cl, Ca, Ti, V, Mn, In, I a Dy. Touto metodou lze stanovit i prvky produkující dlouhodobější radioizotopy, např. Na, K, Cu, As, Br, Sr, Ba, Sm, Eu, Hf a U. Hmotnost vzorku pro analýzu je omezena podle typu materiálu, obvykle dosahuje desítek mg. Zvláštní variantou je krátkodobá epitermální neutronová aktivační analýza (ozařování v Cd pouzdru) umožňující stanovení prvků, které vytváří krátkodobé radionuklidy aktivací převážně epitermálními neutrony. Stanovit tak můžeme např. Si, Co, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Ag, Cd, In, I, Cs, Ba, Hf, Hg a U.

### 5.4 Výhody a nevýhody INAA

Výhodou INAA je především možnost nedestruktivního stanovení, což se využívá především u cenných vzorků, které i po analýze zůstávají zachovány pro další výzkum. Odpadá tak problém s rozkladem vzorku, a tedy i jeho možné kontaminace chemickými látkami k rozkladu používanými, případně se ztrátami během rozkladu (adsorbce na povrch chemického nádobí a srážení látek v roztoku). Dále je výhodná svou velkou citlivostí analýzy, umožňující stanovení velmi malých koncentrací a možnost analyzování vzorků i o velmi malé hmotnosti (od desítek  $\mu\text{g}$ ).

Vzhledem k možnosti analyzovat pouze relativně malé množství vzorku je však třeba vysoká homogenita navážky. Při dlouhodobé analýze je pro stanovení některých prvků, poskytujících dlouhodobé produkty záření, možné měřit až po delší době (za jeden i více měsíců po ozáření), až když vymřou krátkodobé produkty, které zvyšují pozadí detektoru při měření. Za jistou nevýhodu je možno považovat i přesnost stanovení, kterou ovlivňuje statistika měření aktivity - lepší nejistotu stanovení než cca 1% (relativní) nelze očekávat, pro většinu aplikací je to však postačující. Jelikož v České republice máme v provozu prakticky pouze jedno pracoviště zabývající se aktivační analýzou, je omezené množství analýz, a to především u dlouhodobé aktivační analýzy. Dále je potřebná vysoká odborná kvalifikace personálu, vybavení laboratoří je poměrně nákladné, ozařovací zdroje

jsou omezeně dostupné, může tu být i riziko ozáření a problém představuje i likvidace radioaktivního odpadu.

## 6 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

### 6.1 Princip ICP-MS

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou je analytická metoda, využívaná ke stanovování stopových prvků ve vzorku; tento přehled byl vypracován na základě prací Strnada (2008) a Beckerové (2007). Kapalný vzorek je ve formě aerosolu po průchodu plazmou převeden na atomy a ionty. Teplota plazmy Ar je běžně 7000–8000 K, což umožňuje ionizaci většiny prvků (ale v tomto prostředí nelze analyzovat např. fluor a vzácné plyny). K ionizaci molekuly je potřeba minimální energie elektronů, tzv. ionizační energie (ionizační potenciál). Většina prvků má ionizační potenciál menší než Ar. Prvky tedy pomocí plazmy můžeme ionizovat a následně analyzovat. Plazma je vedena do spektrometru expanzní komorou, která umožňuje pohyb iontů z prostředí atmosférického tlaku do prostředí vakua, kde dochází k separaci a detekci iontů. Změnami tlaku je vytvořen paprsek ionizovaných částic, ten vstupuje do vlastního spektrometru. Separace iontů je při metodě ICP-MS různá. Nejjednodušším způsobem je, když jsou ionty vedeny do kvadrupólového separátoru, který oscilací elektromagnetického pole umožňuje pohyb iontů k detektoru. Dochází tu ke změnám napětí na kvadrupólech, což umožňuje průchod iontů v závislosti na jejich náboji a hmotnosti. Podmínky na kvadrupólu se mění během zlomků sekundy, je tedy možné analyzovat celé hmotnostní spektrum během několika sekund. Ionty, které neprojdou, jsou odstraněny vakuovými pumpami. Signál iontů dopadajících na detektor je zesílen a dále zpracován. Podstatně přesnějším, ale instrumentálně náročnějším je varianta aparatury s vysokým rozlišením (HR-ICP-MS), kdy jsou ionty separovány v magnetickém poli a elektrostatickém analyzátoru.

V porovnání například s ICP-OES (optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem), XRF (rentgenová fluorescenční spektrometrie) a INAA (instrumentální neutronová aktivační analýza) jsou detekční limity ICP-MS velmi nízké, pohybují se v rozmezí od  $\text{ng l}^{-1}$  po  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

## 6.2 Výhody a nevýhody ICP-MS

Metoda ICP-MS je metodou vysoce citlivou, rychlou a umožňující stanovení nejenom široké řady prvků, ale také jejich izotopů. Problémy u ICP-MS mohou nastat při analyzování vzorku neznámého složení - pro analýzu je totiž nežádoucí přítomnost velkého množství kyselin (především  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a HF), solí nebo organické hmoty. Vzorek je tedy lepší víckrát naředit, aby obsah rozpuštěných látek nebyl vyšší než  $1 \text{ g l}^{-1}$ . S tím jsou ovšem spojeny problémy spočívající v rozkladu vzorku, který musí být dokonalý a v průběhu zpracování vzorku také nesmí dojít k jeho kontaminaci nebo ztrátám některých složek roztoku např. v důsledku adsorbce nebo vysrážení. Nevýhodou této metody je dále nákladnost provozu a vybavení laboratoře. Velké náklady jsou také na chemikálie používané pro rozklad, které musí mít velmi vysokou čistotu.



## 7. Rentgenová difrakční analýza (XRD)

Rentgenová difrakční analýza je nedestruktivní metoda, s níž můžeme určit strukturu pevné krystalické látky; tento stručný přehled je vypracován podle Němcové et al. (1997). Podstatou metody je interakce rentgenového záření (RTG) s elektrony atomů, které mají v krystalické látce pravidelně se opakující uspořádání. Po průchodu RTG záření krystalickou látkou dochází k jeho difrakci. Vzniklá difrakční maxima mají polohu, intenzitu a tvar v závislosti na druhu atomu. Z difrakčního obrazce (tzv. difraktogramu) je pak možné určit složení vzorku, neboť neexistují dvě různé látky, které by měly stejnou strukturu.

Malé množství vzorku se s pomocí etanolu nebo jiného rozpouštědla nanese na čistou nedifraktující podložku a vzorek je umístěn do středu kruhu, po jehož obvodu se pohybuje zdroj záření a detektor. Úhel dopadu záření se postupně mění, zesílené záření dopadá na film, kde vzniká ozářený bod. Z výsledného difraktogramu je možné kvalitativní stanovení, které se provádí srovnáváním s databází difraktogramů.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 8. Metodika

### 8.1 Výběr a příprava vzorků pro analýzu

Pro porovnání stanovení Ag pomocí nedestruktivní INAA a ICP-MS bylo z archivu Jana Borovičky vybráno 11 vzorků hub. Vzorky byly vybrány na základě v minulosti stanovených koncentrací Ag a Cl tak, aby měly pokud možno vždy relativně vysoké koncentrace Ag a různé koncentrace Cl. Z tohoto důvodu jde většinou o vzorky pocházející z lokality Lhota u Příbramě, kde jsou koncentrace Ag v houbách zvýšené kvůli činnosti kovohuť (Borovička et al. 2010). Dále byla zařazena muchomůrka šiškovitá (*A. strobiliformis*), která hyperakumuluje stříbro a má vysoké koncentrace Cl (Borovička et al. 2007); seznam druhů je uveden v Tabulce 2.

**Tabulka č. 2:** Výběr druhů hub použitých pro analýzu Ag metodami INAA a ICP-MS se známými stanovenými koncentracemi Ag, Rb a Cl (vztaženo na sušinu).

vzorek	druh	lokality	Ag <sup>1</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Rb <sup>1</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Cl <sup>2</sup> mg kg <sup>-1</sup>
AGP-3	<i>Calvatia excipuliformis</i>	Lhota u Příbramě	55,7	4,33	-
AGP-7	<i>Boletus badius</i>	Lhota u Příbramě	20,7	28,1	-
AGP-19	<i>Amanita crocea</i>	Lhota u Příbramě	338	83,3	-
B-16	<i>Amanita muscaria</i>	Lhota u Příbramě	47	29,9	10889
B-58	<i>Paxillus involutus</i>	Lhota u Příbramě	47,3	45,8	277
B-188c	<i>Amanita strobiliformis</i>	Praha – Střelecký ostrov	935	50,1	15333
B-212b	<i>Amanita strobiliformis</i>	Praha – Klíčov	259	127	15111
B-611	<i>Cortinarius cinnamomeus</i>	Lhota u Příbramě	294	240	5511
M-122	<i>Boletus reticulatus</i>	Křivoklátsko	6,2	80,6	2877
B-194a	<i>Amanita strobiliformis</i>	Praha – Královská zahrada	725	71	27809
B-196	<i>Amanita strobiliformis</i>	Praha – Klíčov	215	171	27042

1 - data Jana Borovičky v minulosti zjištěná metodou dlouhodobé a krátkodobé INAA (Řanda & Kučera, 2004; Řanda et al., 2005)

2 - vzorky AGP-3, AGP-7 a AGP-19 byly na koncentrace Cl analyzovány až v průběhu této studie

Byl naplánován i pokus s přidáním známého množství Ag k biomase hub se zanedbatelnou přirozenou koncentrací Ag, ale s vysokými koncentracemi Cl; byly vybrány muchomůrka plavá (*Amanita fulva*), muchomůrka slámožlutá (*A. gemmata*), muchomůrka červená (*A. muscaria*) a muchomůrka růžovka (*A. rubescens*) (Tabulka 3). U všech vybraných vzorků byly z minulosti známy i koncentrace Rb, které bylo zvoleno jako referenční prvek neovlivněný případným srážením AgCl.

**Tabulka č. 3:** Výběr druhů muchomůrek (*Amanita*) s různými koncentracemi Cl pro analýzu s přidaným Ag a jejich koncentrace Ag a Rb (vztaženo na sušinu)

vzorek	druh	lokality	Ag <sup>1</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Rb <sup>1</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Cl <sup>2</sup> mg kg <sup>-1</sup>
B-679	<i>Amanita fulva</i>	Mirochov, Losí Blato	3,12	285	15 266
B-680	<i>Amanita gemmata</i>	Malonty, Bělá	1,36	142	20 117
B-682	<i>Amanita rubescens</i>	Mirochov, Nadějov	0,63	456	25 165
B-683	<i>Amanita muscaria</i>	Dobrá Voda	3,77	308	5 643

1 - data Jana Borovičky v minulosti zjištěná metodou dlouhodobé a krátkodobé INAA (Řanda a Kučera 2004, Řanda a kol. 2005)

2 - koncentrace Cl byly analyzovány v průběhu této studie metodou krátkodobé INAA

Sušené homogenizované vzorky hub (navážky okolo 100 mg) byly pro analýzu Cl zataveny do polyethylenové fólie (kolečka o průměru 25 mm). Pro analýzu Ag byly vzorky slisovány v hydraulickém lisu na tablety o průměru 16 mm a hmotnosti od 140 do 180 mg. Tablety byly poté zataveny do polyethylenové fólie o průměru 20 mm.

Pro ověření správnosti analytického stanovení byly použity standardní referenční materiály s certifikovanými koncentracemi Ag a Rb: NIST 1566a (oyster tissue), NIST 1566b (oyster tissue) a NIST 1575a (pine needles). Dále byl využit interní laboratorní standard M122 (*Boletus reticulatus*).

## 8.2 Nedestruktivní stanovení Cl a Ag

Pro nedestruktivní stanovení Cl ve vzorcích hub byla využita tzv. krátkodobá aktivační analýza termálními neutrony, která je popsána v práci Řandy et al. (2005). Vzorky byly pomocí potrubiční pošty odesílány do reaktoru (LVR-15, Ústav jaderného výzkumu, a.s. v Řeži), 1 minutu ozářeny a po 10 minutách vymírání byla jejich gama spektra měřena 10 minut na HPGe detektoru. Chlór byl stanoven na základě reakce  $^{37}\text{Cl} (n, \gamma) ^{38}\text{Cl}$ , tedy podle izotopu  $^{38}\text{Cl}$  s poločasem přeměny 37,3 minuty a linek 1624,69 a 2167,68 keV (byla využita metoda srovnání se standardem).

Stříbro bylo ve vzorcích stanoveno Ag pomocí tzv. krátkodobé ENAA, kdy je vzorek v reaktoru ozařován v kadmiovém pouzdru, které specificky zachytává termální neutrony (Řanda et al. 2005). Stanovení proběhlo na základě reakcí

$^{107}\text{Ag}$  ( $n, \gamma$ )  $^{108}\text{Ag}$  (poločas přeměny 2,37 min, 633 keV) a  $^{109}\text{Ag}$  ( $n, \gamma$ )  $^{110}\text{Ag}$  (poločas přeměny 24,6 s, 657,6 keV). Vzorke byly ozařovány půl minuty a měřeny s co možná nejnižší vymírací dobou (20–30 sekund). Všechny vzorky byly ozářeny v duplikátech, aby bylo možno využít a porovnat 2 různé typy rozkladu (viz níže).

### 8.3 Stanovení Ag a Rb pomocí ICP-MS

Po měsíci vymírání byly vzorky, ve kterých byla stanovena koncentrace Ag pomocí ENAA, rozloženy pro analýzu pomocí ICP-MS. Rozklad byl proveden dvojím způsobem:

1/ Tableta vybalená z polyethylenové fólie byla přemístěna do 60 ml PFA rozkladného kelímku (Savillex), převážena a přelita 6,5 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$  (J.T. Baker, destilovaná v teflonu). Po zavíčkování byl kelímek umístěn na topnou desku o teplotě  $250^\circ\text{C}$ ; rozklad probíhal 16 hodin.

2/ Tableta vybalená z polyethylenové fólie byla převážena, přemístěna do teflonové rozkladné nádoby, přelita 6 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$  a 2 ml MQ vody; rozklad probíhal v mikrovlnném rozkladném zařízení MARS5.

Společně se vzorky byly rozkládány i standardní referenční materiály NIST 1566a-b a NIST 1575a, k němuž byla z důvodu obsahu  $\text{SiO}_2$  přidána koncentrovaná HF (Merck).

### 8.4 Vzorky s přidaným Ag

Rozkladem stříbrného drátku ve zředěné  $\text{HNO}_3$  byl připraven roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci Ag  $269 \text{ mg l}^{-1}$ . K přibližně 200 mg sušiny houbové biomasy vybraných muchomůrek bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku tak, aby teoretická koncentrace Ag v sušině po rozkladu odpovídala  $\pm 500 \text{ mg kg}^{-1}$ . Několik minut poté byla ke vzorku přidána koncentrovaná  $\text{HNO}_3$  a vzorek byl rozložen na topné desce stejným způsobem jako ostatní vzorky hub.

## 8.5 Identifikace sraženiny pomocí XRD analýzy

Po rozkladech vzorků Ag bohatých muchomůrek byla v roztoku pozorována jemná sraženina. Ve zvláště bohatém vzorku muchomůrky *A. strobiliformis* (B 194b) s koncentrací Ag 993 mg kg<sup>-1</sup> (Borovička et al. 2007) bylo možné sraženinu promýt vodou a acetonem, usušit a v kapce acetonu nanést na podložku k provedení rentgenové difrakční analýzy (XRD) na přístroji Bruker D8 DISCOVER.

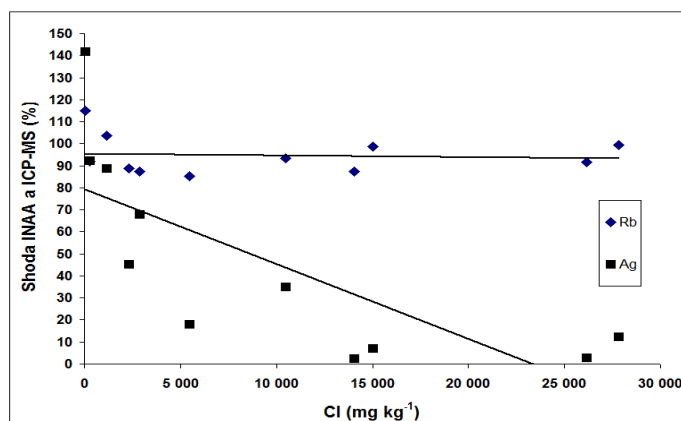
## 9. Výsledky

Výsledky analýz jsou vedeny v tabulkách a některé pro přehlednost znázorněny v grafech (všechny uvedené koncentrace jsou vztaženy na sušinu). V Tabulce 4 jsou prezentovány koncentrace Ag a Rb naměřené metodami INAA a ICP-MS (mikrovlnný rozklad). V Tabulce 5 jsou tytéž hodnoty pro sadu vzorků rozložených na topné desce. Výsledky získané pomocí INAA a ICP-MS (pro oba typy rozkladu) byly porovnány formou procentuelní shody, přičemž jako 100% byla uvažována hodnota získaná metodou INAA, která není ovlivněna koncentrací Cl ve vzorku. Grafické znázornění výsledků je na Obrázcích 9 a 10.

**Tabulka č. 4:** Koncentrace Cl, Ag a Rb naměřené metodou INAA a koncentrace Ag a Rb naměřené ve stejných vzorcích metodou ICP-MS po mikrovlnném rozkladu. Míra shody mezi oběma metodami je pro Ag i Rb vyjádřena v procentech, přičemž jako 100% jsou uvažovány hodnoty získané metodou INAA.

vzorek	Cl INAA	Ag ENAA	Ag ICP-MS	Ag shoda (%)	Rb INAA	Rb ICP-MS	Rb shoda (%)
B-194a	26 136	672	19,1	<b>2,8</b>	71	65,0	<b>91,6</b>
B-196	27 814	211	26,3	<b>12,5</b>	171	170	<b>99,5</b>
AGP-3	58,3	61,8	87,6	<b>141</b>	4,33	5,0	<b>115</b>
AGP-7	1 167	23,8	21,1	<b>88,7</b>	28,1	29,1	<b>103</b>
AGP-19	2 315	319	144	<b>45,4</b>	83,3	74,0	<b>88,8</b>
B-16	10 480	47,5	16,7	<b>35,1</b>	29,9	27,9	<b>93,5</b>
B-58	268	48	44,3	<b>92,2</b>	45,8	42,1	<b>91,8</b>
B-188c	14 072	850	19,6	<b>2,3</b>	50,1	43,7	<b>87,3</b>
B-212b	15 016	257	18,4	<b>7,2</b>	127	125	<b>98,8</b>
B-611	5 485	289	52,4	<b>18,1</b>	240	204	<b>85,2</b>
M-122	2 877	7,71	5,2	<b>67,9</b>	80,6	70,4	<b>87,4</b>

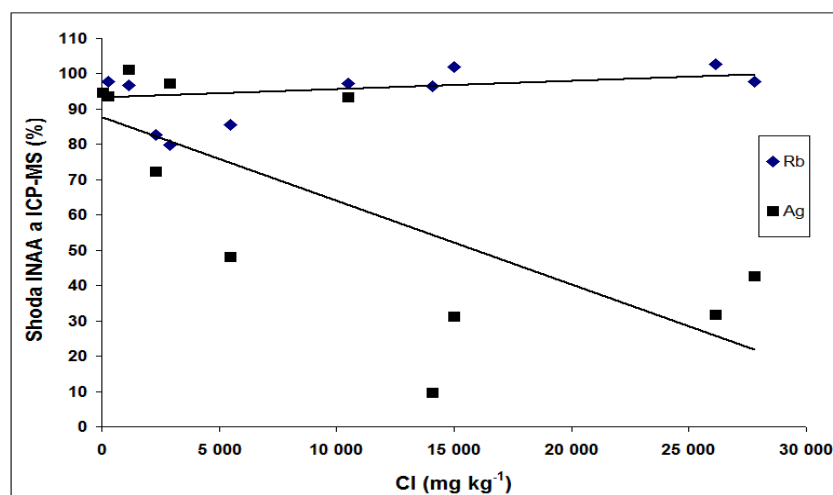
**Obrázek č. 9:** Grafické znázornění závislosti míry shody stanovení koncentrací Ag a Rb metodami INAA a ICP-MS na koncentraci Cl ve vzorku (mikrovlnný rozklad).



**Tabulka č. 5:** Koncentrace Cl, Ag a Rb naměřené metodou INAA a koncentrace Ag a Rb naměřené ve stejných vzorcích metodou ICP-MS po rozkladu na topné desce. Míra shody mezi oběma metodami je pro Ag i Rb vyjádřena v procentech, přičemž jako 100% jsou uvažovány hodnoty získané metodou INAA.

vzorek	Cl	Ag	Ag	Ag shoda (%)	Rb	Rb	Rb shoda (%)
	INAA	ENAA	ICP-MS		INAA	ICP-MS	
B-194a	26 136	598	189	<b>31,7</b>	71	73,0	<b>102</b>
B-196	27 814	213	91,0	<b>42,7</b>	171	167	<b>97,7</b>
AGP-3	58,3	62,6	59,3	<b>94,7</b>	4,33	4,9	<b>112</b>
AGP-7	1 167	23,7	23,9	<b>101</b>	28,1	27,2	<b>96,8</b>
AGP-19	2 315	329	237	<b>72,2</b>	83,3	68,8	<b>82,6</b>
B-16	10 480	47,5	44,3	<b>93,3</b>	29,9	29,1	<b>97,2</b>
B-58	268	48,6	45,4	<b>93,5</b>	45,8	44,8	<b>97,7</b>
B-188c	14 072	852	82,5	<b>9,7</b>	50,1	48,3	<b>96,4</b>
B-212b	15 016	257	79,9	<b>31,1</b>	127	129	<b>101</b>
B-611	5 485	292	140	<b>48,2</b>	240	205	<b>85,6</b>
M-122	2 877	7,2	7,0	<b>97,1</b>	80,6	64,3	<b>79,8</b>

**Obrázek č. 10:** Grafické znázornění závislosti míry shody stanovení koncentrací Ag a Rb metodami INAA a ICP-MS na koncentraci Cl ve vzorku (rozklad na topné desce).





Pro zjištění závislosti správnosti stanovení na koncentraci Cl byl vypočítán Spearmanův korelační koeficient. Korelovanými veličinami v tomto testu nezávislosti jsou naměřené koncentrace Cl a míra shody pro Ag i Rb. Hodnoty koeficientu spočítané pro oba typy rozkladu jsou uvedeny v Tabulce 6.

**Tabulka č. 6:** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro oba typy rozkladů.

Mikrovltný rozklad		
	Cl-Ag shoda	Cl-Rb shoda
n	11	11
Spearman. korel. koef.	-0,90*	-0,18
Rozklad na topné desce		
	Cl-Ag shoda	Cl-Rb shoda
n	11	11
Spearman. korel. koef.	-0,77*	0,16

\* korelace významné na hladině  $p < 0,01$

Výsledky pro analyzované standardní referenční materiály včetně přehledu certifikovaných hodnot jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Tabulka č. 7:** Výsledky stanovení Ag a Rb pro standardní referenční materiály s přehledem certifikovaných hodnot.

Certifikované hodnoty ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			
	Ag	Rb	
NIST 1566a	$1.68 \pm 0.15$	3*	
NIST 1566b	$0.666 \pm 0.009$	$3.26 \pm 0.14$	
NIST 1575a	-	$16.5 \pm 0.9$	
Mikrovltný rozklad ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			
	Ag (ENAA)	Ag (ICP-MS)	Rb (ICP-MS)
NIST 1566a	-	-	-
NIST 1566b	0,61	0,74	3,1
Rozklad na topné desce ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			
	Ag (ENAA)	Ag (ICP-MS)	Rb (ICP-MS)
NIST 1566a	1,69	1,55	3,07
NIST 1566b	0,68	0,66	3,14
NIST 1575a	-	0,31	15,6

\*necertifikovaná hodnota

Výsledky stanovení koncentrací Ag a Rb ve vzorcích muchomůrek s různou koncentrací Cl po přidání známého množství Ag jsou uvedeny v Tabulce 8.

**Tabulka č. 8:** Naměřené koncentrace Ag a Rb (ICP-MS) u vzorků s přidáním Ag s procentuálně vyjádřenou správností stanovení Ag a procentuální shodou stanovení Rb (srovnání s INAA).

vzorek	Ag (ICP-MS)	Ag*	shoda (%)
B-679	41,2	518	<b>7,96</b>
B-680	29,9	499	<b>5,99</b>
B-683	57,3	492	<b>11,6</b>
B-682	82,1	497	<b>16,5</b>

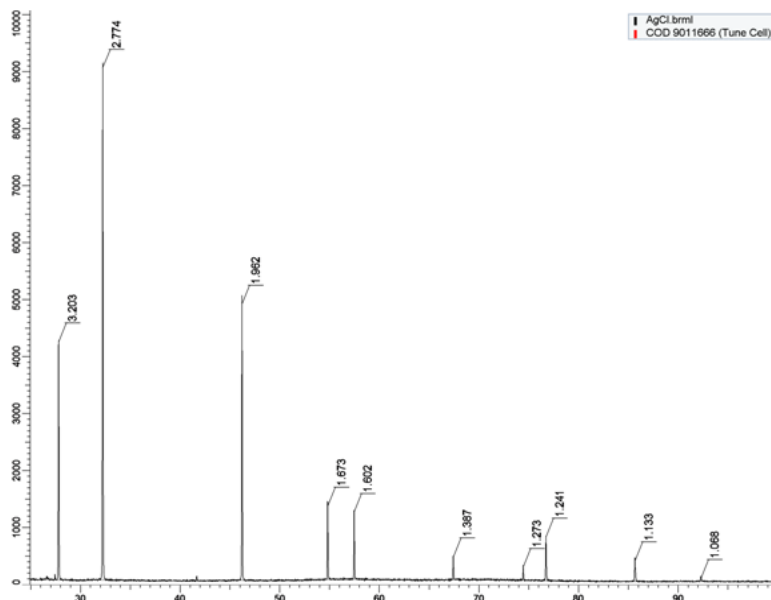
  

vzorek	Rb (ICP-MS)	-	shoda (%)
B-679	276	-	<b>96,8</b>
B-680	137	-	<b>96,5</b>
B-683	279	-	<b>90,6</b>
B-682	444	-	<b>97,4</b>

\* skutečná koncentrace Ag ve vzorku po přidání roztoku Ag

U vzorků s vysokým obsahem Ag a Cl byla po rozkladu pro analýzu metodou ICP-MS pozorována šedobílá sraženina, a to jak při rozkladu mikrovlnném, tak i při rozkladu na topné desce. Vzorek sraženiny vzniklý při rozkladu vzorku *Amanita strobiliformis* se podařilo analyzovat metodou XRD. Získaný difraktogram (Obrázek 11) plně odpovídá chloridu stříbrnému.

**Obrázek č. 11:** Difraktogram pro AgCl získaný XRD analýzou.



## 10. Diskuze

Koncentrace Ag ve vzorcích hub stanovené metodami INAA a ICP-MS (Tabulka 4-5) se výrazně liší, přičemž hodnoty získané metodou ICP-MS jsou většinou nižší, a to jak u rozkladu na topné desce (shoda stanovení 9,7-101%), tak v mikrovlnném zařízení (shoda stanovení 2,3-92,2%). Správnost měření Ag oběma metodami je však jednoznačně potvrzena analýzou standardních referenčních materiálů (Tabulka 7). V případě výsledků pro Rb byly hodnoty zjištěné pomocí INAA a ICP-MS podobné, shoda stanovení se většinou pohybovala v rozmezí +/- 10%. V tomto případě však do rozdílnosti stanovení přispívala i nehomogenita vzorku, protože Rb bylo (na rozdíl od Ag) stanoven v samostatné navázce. Přesnost měření Rb pomocí ICP-MS byla také potvrzena analýzou standardního referenčního materiálu (Tabulka 7).

To nasvědčuje tomu, že problém vzniká při rozkladu vzorku. Z výsledné hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu (Tabulka 6) pro naměřené koncentrace Cl a míru shody měření metodami INAA a ICP-MS po mikrovlnném rozkladu (Tabulka 4), vyplývá, že Cl a míra shody měření Ag je záporně korelovaná na hladině významnosti 0,01. Výsledná hodnota Spearmanova korelačního koeficientu pro naměřené koncentrace Cl a míru shody měření metodami INAA a ICP-MS po rozkladu na topné desce (Tabulka 5) rovněž indikuje zápornou korelaci. I když je tato hodnota slabší než v předchozím případě, i zde můžeme na hladině významnosti 0,01 zamítnout hypotézu o nezávislosti správnosti stanovení koncentrací Ag na koncentraci Cl. Je tedy evidentní, že vysoké koncentrace Cl statisticky významně ovlivňují správnost stanovení Ag pomocí ICP-MS, a to bez ohledu na použitý způsob rozkladu. Zatímco dobré shody bylo dosaženo u vzorků s nízkým obsahem Cl (AGP-3, Tabulka 5), u vzorků s vysokým obsahem Cl (tisíce  $\text{mg kg}^{-1}$  a výše) mohou být výsledky pro Ag až o 98% nižší oproti skutečnosti! Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro koncentrace Cl a míru shody měření Rb, které se blíží nule, značí, že tyto hodnoty jsou nekorelované – na sobě nezávislé, a koncentrace Cl tedy neovlivňují stanovení Rb.

Některé hodnoty Ag naměřené u stejných vzorků metodou ENNA se liší (porovnáme-li např. vzorek B 194a, Tabulka 4 a 5), což je zřejmě dáno nehomogenitou vzorku. Ag se v plodnicích hub může vyskytovat v podobě

nanočástic, jejichž distribuce může být v plodnicích hub nerovnoměrná. Malé navážky, které jsou podmínkou pro analýzu krátkodobou ENAA, nemusí tedy být vždy dostatečně reprezentativní.

Poněkud rozdílné hodnoty byly pomocí ICP-MS naměřeny při použití dvojího způsobu rozkladu vzorků, kdy při rozkladu na topné desce byly naměřené hodnoty Ag o něco málo vyšší (a správnější) než hodnoty získané po mikrovlnném rozkladu. Neshoda s výsledky naměřenými pomocí ENNA je však v obou případech velmi vysoká.

Správnost analytického stanovení u obou metod (INAA, ICP-MS) byla ověřena analýzou SRM a koncentrace Ag i Rb naměřené v referenčních materiálech oběma metodami spadají do certifikovaného rozmezí hodnot (Tabulka 7). Získané výsledky jsou tedy s největší pravděpodobností správné, ale i tak je třeba uvažovat možnou chybu při měření či kontaminaci v průběhu rozkladu; např. u vzorku AGP-3 (*Calvatia excipuliformis*) měřeném ICP-MS po mikrovlnném rozkladu (Tabulka 4), kdy je naměřená hodnota Ag mnohem větší (o 40%), než bylo předpokládáno. Při rozkladu stejného vzorku na topné desce však analýza proběhla s uspokojivým výsledkem (Tabulka 5).

Vzorky s přidaným známým množstvím Ag ve formě dusičnanu stříbrného měřené pomocí ICP-MS měly koncentrace Ag podstatně nižší oproti skutečnosti, a to až o 92%. Pro malé množství dat nebyla závislost správnosti stanovení na koncentraci Cl statisticky vyhodnocována, ale není pochyb, že vysoké koncentrace Cl ve vzorcích i v tomto případě znemožnily správné stanovení koncentrací Ag, neboť v roztoku byla po rozkladu pozorovatelná šedobílá sraženina. Na samotné formě Ag v biomase analyzovaného vzorku tedy zřejmě nezáleží, protože ke ztrátám Ag v průběhu rozkladu došlo i v tomto případě. Hodnoty koncentrací Rb naměřené při této analýze se víceméně shodovaly s koncentracemi již dříve naměřenými při INAA (mírné odlišnosti v naměřených hodnotách mohou být zapříčiněny i nehomogenitou vzorků).

Signifikantní korelace míry správnosti stanovení s koncentrací Cl ve vzorku svědčí pro srážení AgCl v průběhu rozkladu. V případě rozkladu vzorku zvláště bohatého Ag a Cl byla v roztoku po rozkladu pozorována šedobílá sraženina, jejíž množství bylo dostatečné pro identifikaci metodou rentgenové difrakce. Bylo potvrzeno, že jde o AgCl (Obrázek 11). V důsledku srážení AgCl je tedy do značné míry znemožněno stanovovat Ag v houbách s vysokými koncentracemi Cl rutinním

způsobem pomocí analytických metod, které vyžadují převedení vzorku do roztoku. To tedy znamená, že některá data v minulosti publikovaná v literatuře (např. Michelot et al. 1998 aj.) mohou být nesprávná.

## 11. Závěr

Stanovením koncentrací Cl, Ag a Rb ve vybraných vzorcích hub metodami INAA, ENNA a ICP-MS byly získány výsledky, na jejichž základě bylo možné statistické vyhodnocení, které potvrdilo závislost správnosti stanovení Ag metodou ICP-MS na koncentraci Cl v biomase. Vysoké koncentrace Cl ve vzorcích hub zapříčinily, že hodnoty koncentrací Ag získané metodou ICP-MS byly až o 98% nižší. Tento fakt je zapříčiněn srážením AgCl při rozkladu vzorku, přičemž nehraje roli, zda je vzorek rozkládán na topné desce nebo v mikrovlnném zařízení. Pro stanovení Ag ve vzorcích hub s vysokými koncentracemi Ag a Cl je tedy klasický „mokrý rozklad“ nepoužitelný a pro stanovení Ag je velmi vhodná INAA, která umožňuje stanovit Ag nedestruktivně.

## 12. Použitá literatura

- ALLOWAY B. J., 1995: *Heavy Metals in Soil*. Blackie Academic & Professional, London, 368 pp.
- BECKER J. S., 2007: *Inorganic mass spectrometry*. Wiley, Chichester, 496 pp.
- BYRNE A. R., DERMEJ M., VAKSELJ T., 1979: *Silver accumulation by fungi*. *Chemosphere* 8: 815–821.
- BELLION M., COURBOT M., BLAUDEZ D., CHALOT M., 2005: *Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi*. *Federation of European Microbiological Societies* 254: 173–181.
- BOROVÍČKA J., 2007: *Houby a stopové prvky*. *Vesmír* 86: 508.
- BOROVÍČKA J., ŘANDA Z., JELÍNEK E., KOTRBA P., DUNN C. E., 2007: *Hyperaccumulation of silver by Amanita strobiliformis and related species of the section Lepidella*. *Mycological Research* 111: 1339–1344.
- BOROVÍČKA J., KOTRBA P., GRYNDLER M., MIHALJEVIČ M., ŘANDA Z., ROHOVEC J., CAJTHMAL T., STJIVE T., DUNN C. E., 2010: *Bioaccumulation of silver in ectomycorrhizal and saprobic macrofungi from pristine and polluted areas*. *Science of the Total Environment* 408: 2733–2744.
- BRUMMIT R. K., POWELL C. E., 1992: *Authors of plants names*. Royal Botanical Gardens, Kew.
- BURFORD E. P., KIERANS M., GADD G. M., 2003: *Geomycology: fungi in mineral substrata*. *Mycologist* 17(3): 98–107.
- CIBULKA J., 1996: *Cizorodé prvky v houbách*. *Vesmír* 75: 389.
- COCCHI L., VESCOVI L., 1997: *Studio delle concentrazioni di elementi chimici in alcune specie dell'ordine Boletales al fine di valutare un loro possibile ruolo tassonomico attraverso la costruzione di impronte digitali chimiche*. *Il Fungo* 15: 42–60.
- FALANDYSZ J., BONA H., 1992: *Zawartość metali w pieczarkach Agaricus sp. dziko rosnących na terenie Gdańska i jego okolicy*. *Bromat Chemical Toxicology* 15: 251–256.
- FALANDYSZ J., DANISIEWICZ D., 1995: *Bioconcentration factors (BCF) of silver in wild Agaricus campestris*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 122–129.

- FALANDYSZ J., BONA H., DANISIEWICZ D., 1994a: *Silver content of wild-grown mushrooms from Northern Poland*. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung 199: 222–224.
- FALANDYSZ J., BONA H., DANISIEWICZ D., 1994b: *Silver uptake by Agaricus bisporus from an artificially enriched substrate*. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung 199: 225–228.
- FALANDYSZ J., BONA H., DANISIEWICZ D., 1994c: *Zawartość srebra w grzybach wielkoowocnikowych*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna 17: 211–225.
- FALANDYSZ J., SZYMCZYK K., ICHIHASHI H., BIELAWSKI L., GUCIA M., FRANKOWSKA A., 2001: *ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland*. Food Additives & Contaminants 18: 503–513
- FULTON S. M., 2011: *Mycorrhizal Fungi. Soil, Agriculture and Environmental Implications*. Nova Science Publishers, New York: 261 pp.
- FALANDYSZ J., GUCIA M., MAZUR A., 2007: *Niektóre składniki mineralne i ich współczynniki biokoncentracji w czubajce kani Parasol Mushroom (Macrolepiota procera) z okoli Poniatowej w Woj. Lubelskim*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna 40: 249–255.
- GADD G. M., 2001: *Fungi in Bioremediation*. Cambridge university press, New York, 481 pp.
- GADD G. M., 2004: *Mycotransformation of organic and inorganic substrates*. Mycologist 18(2): 60–70.
- GADD G. M., 2007: *Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation*. Mycological Research 111: 3–49.
- GRYNDLER M., BALÁŽ M., HRŠELOVÁ H., JANSÁ J., VOSÁTKA M., 2004: *Mykorhizní symbióza - O soužití hub s kořeny rostlin*. Academia, Praha, 366 str.
- HARRIS A. T., BALI R., 2008: *On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants*. Journal of Nanoparticle Research 10: 691–695.
- HESLOP R. B., JONES K., 1982: *Anorganická chemie - průvodce pro pokročilé stadium*. Nakladatelství technické literatury, Praha, 836 str.



- JONES K. C., PETERSON P. J., DAVIES B. E., MINSKI M. J., 1985: *Determination of silver in plants by flameless atomic absorption spectrometry and neutron activation analysis*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 21: 23–32.
- KABATA-PENDIAS A., 1988: *Škodlivost nadměrných koncentrací stopových prvků v půdách*. In: KOLEKTIV AUTORŮ: *Stopové prvky a toxické látky v životním prostředí*. Dům techniky Český svaz vědeckotechnických společností, Ústí nad Labem: 86–97.
- KABATA-PENDIAS A., 2001: *Trace elements in soils and plants*. CRC Press. Boca Raton, 432 pp.
- KALÁČ P., 2008: *Houby, víme, co jíme?*. Dona, České Budějovice, 114 str.
- KALÁČ P., TRÍSKA J., KOLÁŘ L., JÍROVCOVÁ E., 2010: *Chemie životního prostředí*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 171 str.
- KALINA T., VÁŇA J., 2005: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha, 606 str.
- KLÁN J., 1989: *Co víme o houbách*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 310 str.
- KŘÍŽKOVÁ S., ADAM V., KŘÍŽEK R., 2009: *Fytotoxicita stříbrných iontů*. Chemické listy 103: 559–568.
- LANDEWEERT R., HOFFLAND E., FINLAY R. D., KUYPER T. W., VAN BREEMEN N., 2001: *Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals*. Trends in Ecology & Evolution 16 (5): 248–254.
- LIŠKA J., 2003: *Proč se užívá chemická analýza některých mechů k stanovení stupně znečištění prostředí těžkými kovy?* Vesmír 82: 209.
- LUKEŠ I., 2009: *Systematická anorganická chemie*. Karolinum, Praha, 233 str.
- MAYNARD J. B., 1983: *Geochemistry of Sedimentary Ore Deposits*. Springer - Verlay, New York, 305 pp.
- MICHELOT D., SIOBUD E., DORÉ J. C., VIEL C., POIRIER F., 1998: *Update on metal content profiles in mushrooms - toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation*. Toxicon 36: 1997–2012.
- NĚMCOVÁ I., ČWRMÁKOVÁ Z., RYCHLOVSKÝ P., 1997: *Spektrometrické analytické metody I*. Karolinum, Praha, 166 str.

- NĚMEČEK J., VÁCHA R., PODLEŠÁKOVÁ E., 2010: *Hodnocení kontaminace půd v ČR*. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i., Praha, 148 str.
- NÁBĚLKOVÁ J., NEKOVÁŘOVÁ J., 2010: *Chemie životního prostředí*. České vysoké učení technické v Praze, Praha, 197 str.
- NIKKARINEN M., MERTANEN E., 2004: *Impact of geological origin on trace element composition of edible mushrooms*. Journal of Food Composition and Analysis 17: 301–310.
- PETRINI O., COCCHI L., VESCOVI L., PETRINI L., 2009: *Chemical elements in mushrooms: their potential taxonomic significance*. Mycological Progress 8: 171–180.
- ROGERS K., 2011: *Fungi, algae and protist*. Britannica Educational Publishing, New York, 209 pp.
- ŘANDA Z., 2002: *Stopové prvky v houbách*. Mykologický sborník 79: 115–124.
- ŘANDA Z., KUČERA J., 2004: *Trace elements in higher fungi (mushrooms) determined by activation analysis*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 259: 99–107.
- ŘANDA Z., SOUKAL L., MIZERA J., 2005: *Possibilities of the short - term thermal and epithermal neutron activation for analysis of macromycetes (mushrooms)*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 264: 67–76.
- ŘANDA Z., 2008: *Aktivační analýza v geologii*. In: KOLEKTIV AUTORŮ: *Moderní analytické metody v geologii*. Vysoká škola Chemicko - Technologická, Praha: 57–66.
- SCHMITT J. A., MEISCH H. U., REINLE W., 1998: *Schwermetalle in höheren Pilzen, IV. Silber*. Z Naturforsch 33 C: 608-615.
- SIMPSON A. G. B., ROGER A. J., 2004: *The real „kingdoms“ of eukaryotes*. Current Biology 14: 693–696.
- SMOTLACHA M., 1983: *Atlas tržních a jedovatých hub*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 269 str.
- STIJVE T., ANDREY D., GOESSLER W., GUINBERTEAU J., DUPUY G., 2001: *Étude comparative des métaux lourds et d'autres éléments traces dans Gyrophragmium dunalii et dans les Agarics jaunissants de la section Arvenses*. Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France 117: 133–144.
- STIJVE T., ANDREY D., 2002: *L'énigme de la pholiote dorée: pholiote ou lépiote?* Miscellanea Mycologica 72: 43–48.

- SVOBODA L., CHRASTNÝ V., 2008: *Levels of eight trace elements in edible mushrooms from a rural area*. Food Additives & Contaminants 25: 51–58.
- STRNAD L., MIHALJEVIČ M., ŠEBEK O., 2008: *Aplikace hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geovědách*. In: KOLEKTIV AUTORŮ: *Moderní analytické metody v geologii*. Vysoká Škola Chemicko - Technologická, Praha: 44–45.
- SUCHARA I., SUCHAROVÁ J., 2005: *Mechový archiv*. Vesmír 84: 548.
- TÜZEN M., ÖZDEMİR M., DEMIRBAS A., 1998: *Heavy metal bioaccumulation by cultivated Agaricus bisporus from artificially enriched substrates*. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung 206: 417–419.
- WALKER N., 1975: *Soil Microbiology. A Critical Review*. Butterworths, London and Boston, 262 pp.
- ZHANG D., FRANKOWSKA A., JARZYNSKA G., KOJTA A. K., DREWNOWSKA M., WYDMANSKA D., BIELAWSKI L., WANG J., FALANDYSZ J., 2010: *Metals of King Bolete (Boletus edulis) Bull.: Fr. collected at the same site over two years*. African Journal of Agricultural Research 5(22): 3050–3055.

### **Internetové zdroje**

- VOHNÍK M., 2010: *Ekologie mykorhizních symbióz - Anatomie a morfologie mykorhizních symbióz*. Praha, online: [www.mykorhizy.webpark.cz](http://www.mykorhizy.webpark.cz), cit. 12.4. 2012.
- STALPERS J., COCK A., 2012: *Fungal Databases Nomenclature and Species Banks*. Online: [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org), cit. 12.4. 2012.

## Seznam vědeckých a českých názvů hub

Uvedená nomenklatura je čerpána z MycoBank (Stalpers & Cock, 2012), společně s uvedenými autorskými zkratkami přiřazenými k názvu, jež jsou platné podle Brummita & Powella (1992).

- Agaricus augustus* Fr. - pečárka císařská  
*Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach - pečárka dvouvýtrusá  
*Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. - pečárka pochvatá  
*Agaricus campestris* L. - pečárka polní  
*Agaricus xanthodermus* Genev. - pečárka zápašná  
*Amanita crocea* (Quél.) Singer - muchomůrka šafránová  
*Amanita fulva* Pers. - muchomůrka plavá  
*Amanita gemmata* (Fr.) Bertill - muchomůrka slámožlutá  
*Amanita muscaria* (L.) Lam. - muchomůrka červená  
*Amanita rubescens* Pers. - muchomůrka růžovka  
*Amanita solitaria* (Bull.) Mérat - muchomůrka ježatohlavá  
*Amanita strobiliformis* (Paulet ex Vittad.) Bertill. - muchomůrka šiškovitá  
*Boletus badius* (Fr.) Fr. - hřib hnědý  
*Boletus edulis* Bull. - hřib smrkový  
*Boletus reticulatus* Schaeff. - hřib dubový  
*Calvatia excipuliformis* (Scop.) Perdeck - pýchavka palicovitá  
*Cortinarius cinnamomeus* (L.) Gray - pavučinec skořicový  
*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. - lesklokorka lesklá  
*Hygrocybe coccinea* (Scop.) P. Kumm. - voskovka šarlatová  
*Lactarius rufus* (Scop.) Fr. - ryzec ryšavý  
*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler - houževnatec jedlý  
*Macrolepiota procera* (Scop.) Singer - bedla vysoká  
*Macrolepiota rhacodes* (Vittad.) Singer - bedla červenající  
*Paxillus involutus* (Batsch) Fr. - čechratka podvinutá  
*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. - hlíva ústřičná  
*Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill - límcovka vrásčítoprstenná

## Seznam tabulek

**Tabulka č. 1:** Přehled některých hub akumulujících a hyperakumulujících Ag v plodnicích (Borovička et al., 2010; upraveno).

**Tabulka č. 2:** Výběr druhů hub použitých pro analýzu Ag metodami INAA a ICP-MS se známými stanovenými koncentracemi Ag, Rb a Cl (vztaženo na sušinu).

**Tabulka č. 3:** Výběr druhů muchomůrek (*Amanita*) s různými koncentracemi Cl pro analýzu s přidaným Ag a jejich koncentrace Ag a Rb (vztaženo na sušinu)

**Tabulka č. 4:** Koncentrace Cl, Ag a Rb naměřené metodou INAA a koncentrace Ag a Rb naměřené ve stejných vzorcích metodou ICP-MS po mikrovlnném rozkladu. Míra shody mezi oběma metodami je pro Ag i Rb vyjádřena v procentech, přičemž jako 100% jsou uvažovány hodnoty získané metodou INAA.

**Tabulka č. 5:** Koncentrace Cl, Ag a Rb naměřené metodou INAA a koncentrace Ag a Rb naměřené ve stejných vzorcích metodou ICP-MS po rozkladu na topné desce. Míra shody mezi oběma metodami je pro Ag i Rb vyjádřena v procentech, přičemž jako 100% jsou uvažovány hodnoty získané metodou INAA.

**Tabulka č. 6:** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro oba typy rozkladů.

**Tabulka č. 7:** Výsledky stanovení Ag a Rb pro standardní referenční materiály s přehledem certifikovaných hodnot.

**Tabulka č. 8:** Naměřené koncentrace Ag a Rb (ICP-MS) u vzorků s přidaným Ag s procentuálně vyjádřenou správností stanovení Ag a procentuální shodou stanovení Rb (srovnání s INAA).

## Seznam obrázků

**Obrázek č. 1:** Morfologie hlavních typů mykorhiz (příčný řez kořenem) (Klán, 1989).

**Obrázek č. 2:** Detail ektomykorhizy na kořeni borovice (Vohník, 2010). Foto Martin Vohník.

**Obrázek č. 3:** Rozpouštění kovů v půdním prostředí organickými kyselinami produkovanými houbovými hyfami (Gadd, 2004; upraveno).

**Obrázek č. 4:** Muchomůrka šiškovitá (*Amanita strobiliformis*), druh obsahující vysoké koncentrace Ag a Cl. Foto Jan Borovička.

**Obrázek č. 5:** Muchomůrka ježatohlavá (*Amanita solitaria*), druh obsahující vysoké koncentrace Ag a Cl. Foto Jan Borovička.

**Obrázek č. 6:** Pýchavka palicovitá (*Calvatia excipuliformis*), druh schopný akumulovat Ag, ale s nízkou koncentrací Cl. Foto Jan Borovička.

**Obrázek č. 7:** Koncentrace Cl naměřené u některých řádů hub ( $\text{mg kg}^{-1}$  v sušině) (Petrini, 2009).

**Obrázek č. 8:** Rozmezí koncentrací Cl u muchomůrek, které koncentrují větší množství Cl, a některých dalších skupin hub ( $\text{mg kg}^{-1}$  v sušině) (Petrini, 2009).

**Obrázek č. 9:** Grafické znázornění závislosti míry shody stanovení koncentrací Ag a Rb metodami INAA a ICP-MS na koncentraci Cl ve vzorku (mikrovlňný rozklad).

**Obrázek č. 10:** Grafické znázornění závislosti míry shody stanovení koncentrací Ag a Rb metodami INAA a ICP-MS na koncentraci Cl ve vzorku (rozklad na topné desce).

**Obrázek č. 11:** Difraktogram pro AgCl získaný XRD analýzou.