

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Arzen v životním prostředí a jeho vliv na metabolismus rostlin

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

Odborný konzultant: Ing. Milan Pavlík, CSc.

Autor práce: Jana Fuksová

2008

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací na téma: Arzen v životním prostředí a jeho vliv na metabolismus rostlin vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze dne 21.3.2009

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou poděkovat své vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. a odbornému konzultantovi Ing. Milanu Pavlíkovi, CSc. za vstřícný přístup, odborné vedení, cenné rady, připomínky a předané zkušenosti při psaní diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala kolektivu Izotopové laboratoře Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze Krči za umožnění vypracování experimentální části diplomové práce v jejich laboratoři a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

AUTORSKÝ REFERÁT

Arzen se nachází v zemské kůře a je rozšířen v životním prostředí. Nepatří mezi esenciální prvky rostliny a v koncentraci 10-25 mg/kg se projevuje toxicky. Vyskytuje se jako AsV, AsIII, As⁰, As-III, DMA a MMA. Přírodními zdroji arzenu jsou magma, litosféra a sedimenty. Patří mezi mobilní prvky a akumuluje se v půdě. Antropogenními zdroji arzenu jsou především tepelné elektrárny, zemědělská půda a povrchové vody. Od 70. let 20. století jsou ve většině evropských zemích zakázány pesticidy s obsahem arzenu.

V nádobovém pokuse byly v roce 2007 vypěstovány rostliny špenátu setého (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador). Do nádob bylo odváženo 5 kg zeminy, promíchané s 0,5 g N (ve formě NH₄NO₃), 0,16 g P a 0,4 g K (ve formě K₂HPO₄). Arzen byl přidán ve formě Na₂HAsO₄·7H₂O v dávkách 25, 50 a 75 mg As/kg. Po celou dobu trvání experimentu byla vlhkost zeminy udržována na 60 % maximální vodní kapacity závlahou demineralizovanou vodou. Špenát byl sklizen v plné zralosti. Vzorky K, As 1/1, As 2/1 a As 3/1 byly sklizeny 28.5.2007 a vzorky As1/2 a As 2/2 byly sklizeny v době kvetení 11.6.2007. Po vyextrahování bylo stanoveno celkové množství arzenu a dalších vybraných prvků metodou atomové absorpční spektrometrie. Stanovení metabolitů v butanolové frakci a ekdysteroidů bylo prováděno metodou HPLC.

Práce sledovala působení stupňované a toxické dávky arzenu během vegetace na stresový metabolismus rostlin špenátu. Vlivem zvýšeného množství arzenu v půdě docházelo k snížení výnosu čerstvé biomasy a sušiny. Zároveň s rostoucím množstvím arzenu v půdě rostl obsah arzenu v rostlině.

U vzorků docházelo k nárůstu manganu a poklesu zinku v biomase. U vzorků z prvního odběru se s rostoucím množstvím arzenu v biomase zvyšoval i obsah fosforu, který rostlina potřebuje k tomu, aby se vyrovnala s toxickým působením arzenu. Snižující se obsah arzenu dobře koreluje s klesajícím obsahem vápníku v BuOH frakci. Z polynomů 2. stupně vyplývá vysoká závislost hořčíku, fosforu, manganu a zinku na množství arzenu. Jedná se o antagonistické vztahy.

Ekdysteroidy u rostlin nemají zatím zcela objasněnou funkci. Předpokládá se, že tvoří obranné mechanismy před mechanickým poškozením rostlin a jsou obranou před útoky hmyzu. Rostliny reagují na abiotický stres změnou koncentrace ekdysteroidů. Laboratorními pokusy se zjistilo, že množství 20-hydroxyekdysonu vzroste vlivem zvýšené koncentrace

arzenu v půdě oproti kontrole. V době kvetení dochází ke zvýšené tvorbě ekdysteroidů, avšak u vzorku As 2/2 již rostlina upřednostnila tvorbu jiných látek než ekdysteroidů.

Klíčová slova: arzen, stresový metabolismus, HPLC, špenát, ekdysteroidy

ABSTRACT

Arsenic occurs in earth's crust and everywhere in environment. It is not essential trace element and in concentration 10 – 25 mg/kg is toxic for plant. Forms of arsenic are AsIII, AsV, As0, As-III, MMA, DMA. Natural sources of arsenic are magma, lithosphere and sediments. Arsenic is mobile element and can accumulate in soil. Anthropogenic sources of arsenic are thermal power station, agriculture soil and surface waters. Since 1970s pesticides with arsenic are forbidden in European countries.

In our pot experiment were grown plant of spinach (*Spinacia oleracea* L. cv., Matador) in 2007. In containers 5 kg soil were mixed with 0.5 g N (in form NH_4NO_3), 0.16 g P and 0.4 g K (in form K_2HPO_4). Arsenic was added in form $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in concentration 25, 50 and 75 mg As/kg. During the experiment was kept moisture 60 % of maximum water capacity with demineralized water. Spinach was harvested in full maturity. Samples K, As1/1, As 2/1 and As 3/1 were harvested in 28.5.2007 and samples As 1/2 and As 2/2 in 11.6.2007 during blooming period. After extraction total arsenic content and content of other elements were determined using methods atomic absorption spectrometry. Metabolites in butanol fraction and ecdysteroids were detected by HPLC method.

We monitored the effect of increasing and toxic concentration of arsenic on stress metabolism of spinach plants. Yield of fresh biomass and dry matter decreased with increasing content of arsenic in soil. Concentration of arsenic in plant increased with increasing concentration of arsenic in soil.

In samples manganese concentration increased and zinc concentration decreased in biomass. Increased content of phosphorus, which is necessary for plant to face up to toxic effect of arsenic, was determined in samples from the first harvest. Decreasing amount of arsenic in BuOH fraction correlates with decreasing amount of calcium. Polynomial function of the 2nd degree show high dependence magnesium, zinc, phosphorus and manganese on arsenic concentration. It means antagonistic relationship.

Function of phytoecdysteroids in plants is not yet clear. We suppose their function like defense mechanism against mechanic damage or against insect attack. Plants react on abiotic stress with change of ecdysteroid's concentration. In our experiment the content of 20-hydroxyecdysone increased with increasing content of arsenic. In blooming period the production of ecdysteroids is higher, but in sample As 2/2 plant preferred production of another substances than ecdysteroids.

Key words: arsenic, stress metabolism, HPLC, spinach, ecdysteroids

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍL PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ REŠERŽE	3
3.1 PŮVOD.....	3
3.2 CHARAKTERISTIKA.....	3
3.3 FORMY ARZENU.....	4
3.4 PŘÍRODNÍ ZDROJE ARZENU.....	5
3.4.1 Litosféra.....	6
3.4.2 Sedimenty.....	6
3.4.2.1 Uvolňování sulfidicky vázaného horninového arzenu.....	7
3.4.2.2 Rizika přemístování arzenu ze sedimentárních hornin.....	8
3.5 ANTROPOGENNÍ ZDROJE ARZENU.....	8
3.5.1 Tři hlavní zdroje arzenu.....	8
3.5.2 Použití arzenu.....	9
3.5.3 Rizika úniku arzenu z úložišť uhelných popílků.....	10
3.5.4 Potraviny.....	10
3.5.5 Odpady s obsahem arzenu.....	11
3.6. ZPŮSOBY ZNEŠKODŇOVÁNÍ ARZENU.....	11
3.7. KOLOBĚH ARZENU V PŘÍRODĚ.....	12
3.7.1 Ovzduší.....	12
3.7.1.1 Biomethylace – přirozený vstup těkavých sloučenin arzenu do ovzduší.....	12
3.7.2 Voda.....	13
3.7.2.1 Arzen v usazeninách povrchových vod.....	14
3.7.2.2 Odstraňování arzenu z kontaminovaných vod.....	14
3.7.3 Půda.....	15
3.7.3.1 Model chování arzenu v systému půda-rhizosféra-rostlina.....	16
3.7.4 Organismy.....	17
3.7.4.1 Arzenolipidy.....	17
3.7.4.2 Detoxikace.....	18
3.7.4.3 Mikroorganismy.....	18
3.7.4.4 Ptáci.....	18
3.7.4.5 Savci.....	18
3.8 ARZEN A JEHO ÚČINKY NA ČLOVĚKA.....	19
3.8.1 Toxicita pro člověka.....	19
3.8.1.1 Akutní otrava.....	20
3.8.1.2 Chronická otrava.....	20
3.9 ROSTLINY.....	20
3.9.1 Hyperakumulátory arzenu.....	23
3.9.2 Ochranné mechanismy rostlin.....	24
3.9.3 Fytoremediace.....	25
3.10 EKDYSTEROIDY.....	25
3.10.1 Obecná charakteristika.....	25
3.10.2 Význam pro člověka.....	26
3.10.3 Fytoekdysteroidy.....	27
3.10.3.1 Předpokládaná funkce fytoekdysteroidů.....	27
3.10.3.2 Fytoekdysteroidy ve špenátu.....	29

4 METODIKA	30
4.1 VYPĚSTOVÁNÍ VZORKŮ.....	30
4.2 BODOVĚ STRUKTUROVANÁ METODIKA POSTUPU IZOLACÍ FRAKCI Z ČERSTVÉHO MATERIÁLU.....	31
4.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU ARZENU A DALŠÍCH PRVKŮ.....	37
4.4 STANOVENÍ VYBRANÝCH METABOLITŮ V BuOH FRAKCI.....	37
4.5 STANOVENÍ EKDYSTEROIDŮ.....	38
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5.1 VÝNOS ČERSTVÉ BIOMASY A SUŠINY.....	40
5.2 CELKOVÝ OBSAH PRVKŮ V BIOMASE ŠPENÁTU.....	41
5.3 OBSAH ARZENU A NĚKTERÝCH PRVKŮ V BuOH FRAKCI.....	42
5.4 ZÁVISLOST OBSAHU NĚKTERÝCH PRVKŮ NA OBSAHU ARZENU VE VZORKU.....	43
5.5 OBSAH 20-HYDROXYEKDYSONU.....	46
6 ZÁVĚR	48
7 SEZNAM LITERATURY	49

1. ÚVOD

Vlivem stále rostoucí lidské populace dochází k čím dál většímu zatěžování a znečišťování životního prostředí. Vznikají nové koncepce a strategie zabývající se trvale udržitelným rozvojem, ochranou biodiverzity a krajiny, ale vyvíjí se i nové technologie a strategie, které odstraňují škody napáchané na životním prostředí.

K jedněm z významných znečišťovatelů životního prostředí patří rizikové prvky. Řadí se mezi ně arzen, olovo, zinek, kadmium, rtuť, chrom a nikl. Jedná se o prvky hojně rozšířené v životním prostředí a jejich množství značně stoupá vlivem lidské populace. Rizikové prvky jsou součástí všech složek životního prostředí a silně ovlivňují nejen rostliny a živočichy, ale jejich účinky se mohou v krajních případech projevit i smrtelně na člověku, proto se jim v poslední době věnuje stále větší pozornost. Snahou je snížit produkci těchto látek a výrobků rizikové prvky obsahující a samozřejmě odstranit těžké kovy z kontaminovaných oblastí remediačními technologiemi. Ekologickou formou remediací jsou fytoremediace, které k odstranění kontaminantu z prostředí využívají vhodné rostliny.

Předkládaná práce se zabývá výskytem arzenu v životním prostředí a jeho vlivem na metabolismus rostlin. Arzen patří k nejdéle známým toxickým prvkům. V ekosystému se pohybuje specifickými cestami svého biologického cyklu. Z tohoto cyklu může vystupovat a kumulovat se v půdě nebo v živých organismech. Použití arzenu v travičství je věcí dávné minulosti. Zato jej všichni znají jako prostředek k hubení myši a hmyzu, ochraně rostlin proti škůdcům, dřeva proti hnilobě. Již od starověku se používá k výrobě léčiv. Zatímco akutní otravy arzenem dnes nejsou časté, stále častěji se v oblastech se zvýšeným obsahem arzenu vyskytují kožní choroby, neurologické a hematologické změny, rakovina kůže, plic, močového měchýře a další onemocnění. Dávná popularita arzenu je bohužel odvozena z jeho ryze záporných vlastností. Je to prvek, který tvoří vesměs jedovaté sloučeniny. Vyniká mezi nimi především starý známý otrušík neboli utrejch, což není nic jiného než obyčejný oxid arzenitý As_2O_3 .

2. CÍL PRÁCE

Arzen patří mezi rizikové prvky a jeho zvýšená koncentrace v půdě působí jako stresový faktor na metabolismus rostlin. Dochází ke snížení výnosu biomasy i kvality pěstované plodiny. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak obsah arzenu v půdě ovlivňuje jeho kumulaci v rostlině, v tomto případě špenátu, a jaký je jeho vliv na metabolismus rostliny. Jako projev stresu v rostlině byly sledovány změny v obsahu ekdysteroidů na obsahu arzenu - látek vyskytujících se v různých koncentracích v rostlinách, jejichž význam není doposud zcela objasněn.

3. LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1 PŮVOD

Název arzen se odvozuje z řeckého slova arsenikon, což znamená mocný, silný, účinný. V elementární formě ho připravil v polovině 13. století Albertu Magnáš z arzeniku, jednoho z nejstarších známých jedů. K poznání jedovatosti arzenu již v dávných dobách přispělo používání jeho sulfidů, k léčbě vředů, doporučované Hippokratem téměř před dvěma a půl tisíci lety. Později zmíněné sulfidy doporučovali jako účinná léčiva nejčastěji ve formě mastí Aristoteles, Plinius starší a Paracelsus. Poslední z jmenovaných autorů popsal klinický obraz otravy arzenem i její léčení. V současné době jsou akutní otravy spíše vzácné, nicméně předmětem intenzivního zájmu jsou pozdní účinky expozice arzenem, zejména jeho karcinogenní účinky (Bencko a kol., 1995).

3.2 CHARAKTERISTIKA

Arzen se nachází jako elementární prvek v zemské kůře a je široce rozšířen v životním prostředí. Arzen může být metylován na monomethylarsenovou kyselinu (MMAA), dimethylarsenovou kyselinu (DMAA) nebo trimethylarsenoxid (TMAO) za přítomnosti mikroorganismů. Nejtoxičtější formou je AsIII (Duker a kol., 2005).

Arzen je prvek nacházející se ve vzduchu, vodě, půdě, rostlinách a ve všech živých tkáních. Byl používán také jako lék v chemoterapii až do roku 1945, ale neměl velký efekt při léčbě. Chronická otrava arzenem má za následek poškození ledvin, jater, srdce, mozku a sníženou imunitu. Působení arzenem na člověka je spojováno s rakovinou plic a kůže (Eisler, 2007).

V přírodě se vyskytuje zřídka v elementární formě. Arzen se vyskytuje v pěti modifikacích. Nejběžnější je kovový arzen, také nazývaný šedý arzen. Je to lesklý a křehký kov, vyznačující se nízkou elektrickou vodivostí a diamagnetickými vlastnostmi. Na vzduchu arzen sublimuje, při zahřívání pod tlakem taje při 817 °C. Páry jsou nažloutlé a jejich prudkým ochlazením se získá žlutý arzen, rozpustný v sirouhlíku. Páry tékají s vodní párou a mají silně redukční účinky. Působením světla se opět mění na kovový arzen. Přechodným produktem je černý arzen, který je sklovitě amorfni a nevede elektrický proud. Při teplotě 270 °C se mění na kovový arzen. Zahříváním černého arzenem se rtuť při 150 °C vzniká romboický arzen. Redukcí roztoku As_2O_3 v HCl chloridem cínatým vzniká hnědý arzen. Při

zahřívání na vzduchu shoří arzen namodralým plamenem za vzniku bílého dýmu As_2O_3 . Většina sloučenin arzenu jsou látky rozpustné ve vodě (halogenidy, oxyhalogenidy, fosfor). Nerozpustné jsou pouze siřníky, selenid, arzenidy, sulfoarzenidy a některé arzenitany. Na rozdíl od sulfidů jsou oxid a halogenidy snadno těkavé již při poměrně nízkých teplotách (Trebichovský a kol. , 1997).

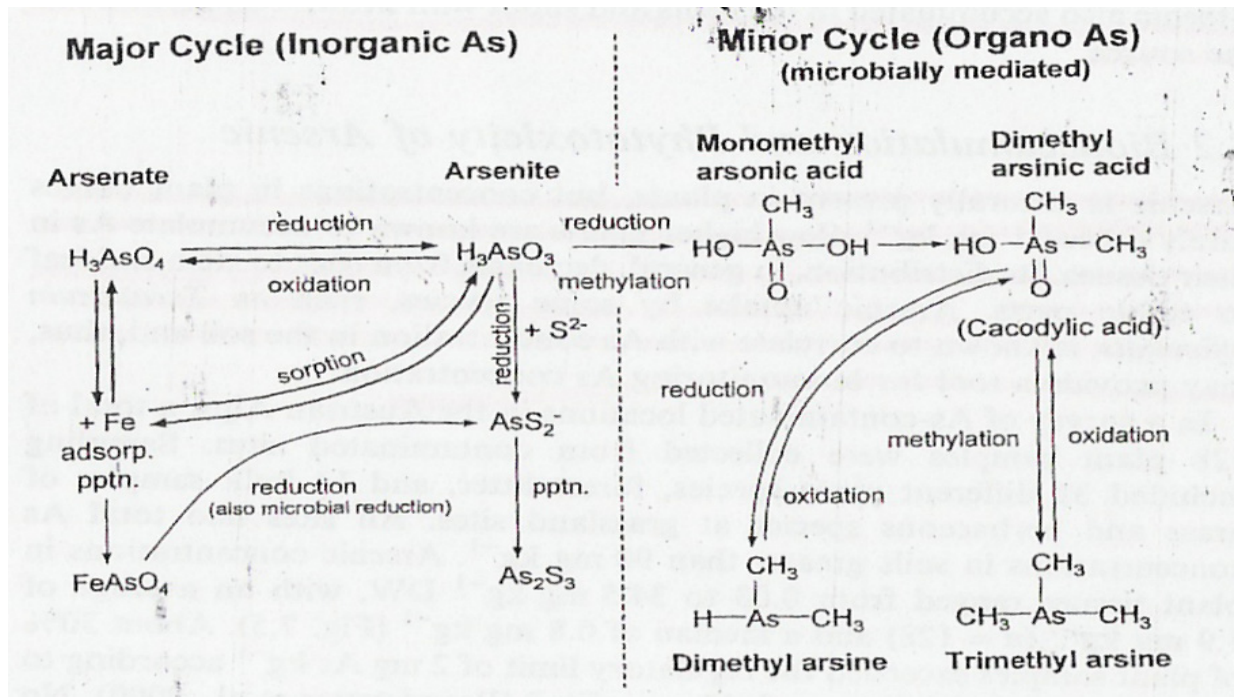
Geochemické chování arzenu v jednotlivých složkách přírodního prostředí (zejména v půdě, podzemních a povrchových vodách a v jejich sedimentech), tedy jeho případné hromadění, nebo naopak pohyb a přestup mezi těmito složkami, jsou určovány některými jeho význačnými vlastnostmi. Především je schopen existovat ve více valenčních stavech (a to v rozmezí zcela běžných fyzikálních a chemických podmínek prostředí), dále má těsný vztah ke geochemii železa v supergenních podmínkách prostředí (tj. za víceméně normálního tlaku a teploty), a konečně jeho sloučeniny se mění biologickou činností (Skřivan, 1996).

3.3 FORMY ARZENU

Anorganické formy arzenu jsou oxidovány *in vivo*, biomethylovány a obvykle rychle vyloučeny v moči. Naproti tomu organické formy arzenu nepodléhají obvykle transformacím (Eisler, 2007).

Arzen se vyskytuje v přírodě v několika oxidačních stavech: As^{+V} , As^{+III} , As^0 , As^{-III} . Ve vodním prostředí najdeme anorganický arzen v podobě arzenité a arzeničné kyseliny a jejich solí. Anorganické sloučeniny arzenu mohou být bakteriemi methylovány na organické formy MMA (monomethylarsenová kyselina), DMA (dimethylarsenová kyselina) a plynné deriváty arzenu (Bissen, Frimmel, 2003).

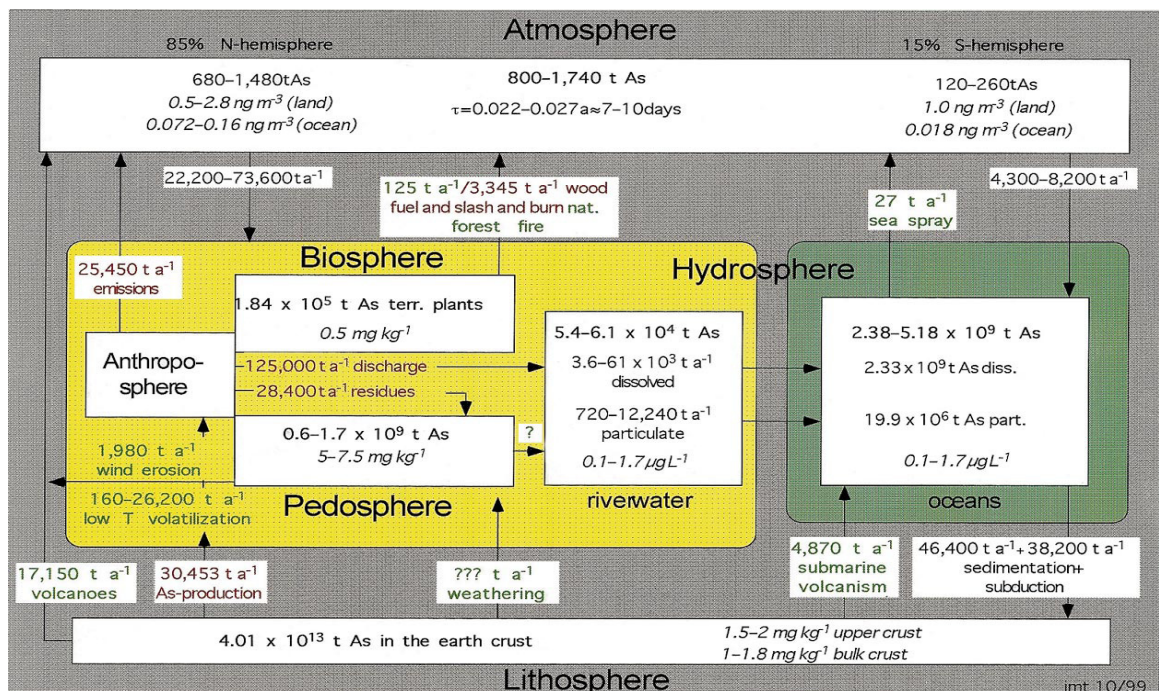
Obr 1. Zjednodušené přeměny arzenu v životním prostředí (Adriano, 2001)



3.4 PŘÍRODNÍ ZDROJE ARZENU

Hlavními rezervoáry arzenu jsou magma, sedimenty, vody hlubokých oceánů a kontinentální a oceánská troposféra. Arzen je mobilní prvek, ale neakumuluje se v ovzduší, rostlinách či vodě, ale kumuluje se v půdě, ale nedistribuční organismy zabraňují škodlivým akumulacím (Eisler, 2007).

Obr 2. Cyklus arzenu (Matschullat, 2000)



3.4.1 Litosféra

Arzen v biosféře, hydrosféře i atmosféře pochází z litosféry. Průměrný obsah arzenu (klark) v kontinentální kůře je kolem 3 mg/kg, podíl arzenu v jednotlivých horninách se však značně liší. V žulách je ho kolem 2 mg/kg, v pískovcích a vápencích 1 mg/kg, v břidlicích se obsahy pohybují kolem 10 mg/kg. V Českém masivu zejména jílovce a prachovce permokarbonu, třetihorní a křídové jíly, kulmské břidlice Nízkého Jeseníku a silurské břidlice Barrandienu mají obsahy obvykle ještě o něco vyšší.

Kromě běžných hornin se arzen koncentruje na některých ložiskách nerostných surovin. Průměrný obsah v uhlí je uváděn mezi 12 a 18 mg As/kg. V Českém masivu je velkým rezervoárem arzenu hnědé uhlí. Uhelné sloje severočeské pánve obsahují arzen v průměru 40 mg/kg, kdežto v pánvi sokolovské 333 mg/kg. Zvětráváním arzenopyritu, popřípadě jiných minerálů obsahujících arzen, vznikají sekundární minerály, nejčastěji arzeničnany. Jejich vznik a stabilita (nerozpustnost) závisí na geochemickém prostředí lokality, na jejich chemickém složení a krystalové struktuře. Při oxidaci ve vodných roztocích vzniká na povrchu arzenopyritu oxyhydroxid železa a hydroxidy a oxyhydroxidy arzenu. Arzenopyrit je v zemské kůře stabilní, pokud se nachází pod hladinou podzemní vody. Octne-li se výše, v zóně nenasycené vodou, dochází k jeho oxidaci a tím i k uvolňování prvků, z nichž vznikají sekundární minerály, zejména ve zvětrávacích zónách sulfidických ložisek (nejčastěji arzeničnan železa skorodit). Část složek uvolněných z arzenopyritu se dostane do podzemních a povrchových vod a vysráží se později v sedimentech (Skřivan, 1996).

3.4.2 Sedimenty

V sedimentech je AsV redukován na AsIII a methylován na methylarzenovou nebo dimethylarzenovou kyselinu. Tyto sloučeniny mohou být dále methylovány na trimethylarzen nebo redukovány na dimethylarzen a mohou těkat do atmosféry. AsV je sedimenty absorbován mnohem více než jiné formy arzenu. Adsorpce závisí především na koncentraci arzenu, charakteristice sedimentu, pH a iontové koncentraci ostatních sloučenin. Důležitý mechanismus adsorpce arzenu na jezerní sedimenty zahrnuje interakci mezi anionty arzenu a oxidy kovů. Arzen je zabudováván do sedimentů během tvorby oxidů, méně častěji je adsorbován do již existujících sedimentů. Koncentrace arzenu v sedimentech souvisí s obsahem manganu, především Mn^{2+} . Mobilita arzenu v sedimentech a jeho uvolňování do vody je spojeno se sezonními změnami (Eisler, 2007).

V sedimentech je obvykle množství arsenu 5 – 10 mg/kg. Písek a pískovec obsahují menší množství arsenu díky vysokému obsahu křemene a živce. Břidlice mají vysoký obsah arsenu vzhledem k obsahu pyritu (Smedley, Kinniburgh, 2002).

3.4.2.1 Uvolňování sulfidicky vázaného horninového arsenu

Jedním z procesů, které mohou místy až v katastrofických rozměrech urychlit a rozšířit vstup arsenu do přírodního prostředí, je zvětrávání sulfidických nerostů obsahujících tento prvek. Nejběžnějším z nich je arzenopyrit, FeAsS . Je třeba si uvědomit, že tyto minerály vznikaly za extrémních podmínek tuhnutí a diferenciací horninových magmat, diametrálně odlišných od podmínek, s jakými se dnes setkáváme na zemském povrchu. Už z tohoto pohledu je zřejmé, že krystalické fáze (minerály) takto vzniklých hornin jsou vlastně v běžných podmínkách prostředí nestabilní a je jen otázkou, jak rychle na zemském povrchu zvětrávají. Chemický rozklad sulfidických minerálů v přírodě společně působí atmosférický kyslík, oxid uhličitý, popřípadě další atmosférické kyseliny a voda. V arzenopyritu, který tomuto rozkladu podléhá poměrně rychle, nakonec postupně oxidují všechny jeho chemické složky: sulfidická síra oxiduje na síranový anion (ve vodě obíhající při louhování vzniká kyselina sírová), uvolněné železnaté ionty se postupně oxidují na železité, které však zůstávají ve vzniklém extrémně kyselém prostředí v roztoku, a arzen je za těchto podmínek přítomen v roztoku ve formě nedisociované kyseliny arzenité. Tato kyselina se za přístupu vzduchu pozvolna dále oxiduje na ionty kyseliny arzeničné. Znamená to, že zprvu zůstávají všechny chemické složky arzenopyritu v roztoku. Teprve později a dále od míst chemického zvětrávání arzenopyritu dochází k postupné neutralizaci odtékajících roztoků. Ta má za následek hydrolyzu do té doby rozpuštěných iontů trojmocného železa, při které se z vody začíná vylučovat rezavý hydroxid železitý. Díky jeho specifickým chemickým vlastnostem a velikému povrchu vznikající sraženiny je na této fázi (sorpčně a spolusrážením) zachycována také většina arsenu. Je však třeba říci, že jednotlivé popsání děje probíhají různou rychlostí a některé z nich jsou ve skutečnosti velmi pomalé. Například poločas reakce, při které jsou v přírodních systémech povrchových vod oxidovány rozpuštěné formy trojmocného arsenu na As(V) , je v řádu hodin až dní (Skřivan, 1996).

3.4.2.2 Rizika přemístování arzenu ze sedimentárních hornin

V historii vývoje zemského povrchu na mnoha místech vznikly písčité sedimenty, které byly později zpevněny a nyní jsou podstatnou složkou tmelu jejich křemenných zrn oxohydroxidy trojmocného železa. Pískovce často obsahují značné koncentrace arzenu. Protože však tyto sedimenty vznikly za normálních (oxidačních) přírodních podmínek, je v nich arzen vcelku bezpečně fixován, a to i v jejich zvodnělých horizontech. Přestává to však platit ve chvíli, kdy v podobné sedimentární hornině výrazně ovlivníme (chemicky nebo biologickou aktivitou) hodnotu oxidačně redukčního potenciálu prostředí (Eh), tzn. v tomto případě jeho schopnosti redukovat trojmocné železo (Skřivan, 1996).

3.5 ANTROPOGENNÍ ZDROJE ARZENU

Poměr antropogenních zdrojů ku přírodním je 3:1. Lidé využíváním přírodních zdrojů způsobují znečištění vody, vzduchu a půdy. Emise se mohou akumulovat v rostlinách a živočiších. V půdě se může arzen akumulovat díky používání pesticidů, insekticidů, hnojením, spalováním fosilních paliv, používáním v průmyslu (Mandal, Suzuki, 2002).

3.5.1 Tři hlavní zdroje arzenu

Tepelné elektrárny: Většina arzenu zjištěného na našem území se dostala do ovzduší z tepelných elektráren spalujících hnědé uhlí. Další část se nachází v popelu tohoto uhlí (nad 100 mg/kg), a zejména v popílcích, kde obsahy dosahují mnoha set i více mg/kg.

Zemědělské půdy: Průměrný obsah arzenu v zemědělských půdách České republiky se odhaduje kolem 8 mg/kg. Do půd ročně vstupuje 102 g/ha arzenu (z toho 83 % z atmosférických spadů, 13,3 % z hnojiv. Výstupy arzenu činí 35 g/ha, z toho 50 % erozí, 35 % do rostlin, 23 % do vod).

Povrchové vody: Zvýšené obsahy arzenu v českých vodách jsou odrazem jak velkých geologických jednotek, tak i lokálních zdrojů spojených s lidskou činností (například s tepelnými elektrárnami). Přirozené lokální zdroje (ložisko Mokrsko) se také projevují ve složení vod v jejich blízkém okolí (Pertold, 1998).

3.5.2 Použití arzenu

Světová produkce arzenu s pohybuje kolem 75 000 – 100 000 tun, z toho na USA připadá cca 21 000 tun a spotřeba kolem 40 000 tun. Největším importérem arzenu je Švédsko. Téměř 97 % vyprodukovaného arzenu je ve formě As_2O_3 , z toho 74 % je používáno jako ochranné prostředky na dřevo a stromy a 19 % jako agrochemikálie (insekticidy, herbicidy, fungicidy a látky na podporu růstu rostlin a živočichů). Menší množství jsou pak používána při výrobě skla, elektronice, v lékařství a veterinářství (Eisler, 2007).

Dle směrnice 2003/2/ES se nesmí sloučeniny arzenu používat a látky obsažené v přípravcích určených k použití jako ochrana před znečišťováním mikroorganismy, rostlinami nebo zvířaty u trupů lodí, košů, plováků, sítí a jiného zařízení nebo vybavení používaného k chovu ryb a měkkýšů, jakéhokoliv zařízení nebo vybavení, která jsou zcela nebo částečně ponořena nebo k ošetření dřeva. Pesticidy s obsahem arzenu nejsou v České republice už více jak 50 let registrovány (<http://eur-lex.europa.eu>, 17.12.2008).

Produkce arzenu stoupala asi do poloviny čtyřicátých let (v roce 1943 dosáhla cca 70 000 t). S postupným nahrazováním arzenových pesticidů, zvláště insekticidů, účinnějšími z hlediska akutní toxicity méně nebezpečnými preparáty – především DDT – došlo pak k pozvolnému poklesu produkce arzenu. Arzenové pesticidy používali zemědělci včetně vinařů ve formě sloučenin arzenitanu sodného Na_2HAsO_3 , vápenatého $Ca(AsO_2)_2$, octoarzenitanu měďnatého-svinibrodské zeleně $Cu(CH_3COO)_2 \cdot 3Cu(AsO_2)_2$, pyroarzenitanu měďnatého ($Cu_2As_2O_5$), arzeničnanu vápenatého ($Ca_2As_2O_5$), a arzeničnanu sodného ($Na_2HAsO_3 \cdot 12H_2O$). Arzen je součástí prostředků ke konzervaci dřeva proti houbám (Wolmanova sůl, obsahující 25 % arzenitanu sodného). Menší množství se používá ve farmaceutickém průmyslu, ve sklářství, pro veterinární účely, při výrobě protiparazitálních lázní, konzervačních prostředků na kůže, otrávených vnaidel, některých herbicidů, jedů proti kobylkám a při preparaci loveckých trofejí. Elementární arzen kovový se používá při výrobě slitin. Do olova na výrobu broků se přidává pro zvýšení povrchového napětí slitiny k dosažení dokonalého kulovitého tvaru. Zvyšuje odolnost mědi ke korozi, zlepšuje její mechanické vlastnosti a zvyšuje bod tuhnutí. Malé množství přidané do zlata výrazně zlepšuje jeho tvrdost a křehkost. Krystaly arzenidu gallia se používají jako kvantové generátory světelného zařízení v laserech. Kyselina arzeničná a její organické deriváty kyseliny 4-aminofenylarzeničné a 3-nitro-4-hydroxyfenylarzeničné se v některých zemích, zvláště v USA, přidávají do krmných směsí pro některá hospodářská zvířata v koncentracích 25 až 45 mg/kg jako růstové stimulanty (Bencko a kol., 1995).

3.5.3 Rizika úniku arzenu z úložišť uhelných popílků

Spalování uhlí, vzhledem k obrovskému rozsahu této aktivity a také proto, že uhlí často obsahuje značné koncentrace arzenu, má za následek patrně nejvýznamnější vstupy arzenu do prostředí způsobené člověkem, a to hned dvojí cestou:

- 1) emisemi do ovzduší, kde je arzen přítomen zejména ve formě povlaků kondenzovaného As_2O_3 na jemných částicích komínových úletů
- 2) ukládáním popílků a škváry.

První proces vede přes atmosféru k rozptýlu arzenu do širokého okolí od zdroje emisí, druhý znamená možnost vzniku významných zdrojů místního zamoření povrchových a podzemních vod. Rizika uvolnění arzenu z úložišť uhelných popílků jsou do značné míry podobná rizikům jeho úniku z pískovců bohatých arzenem. Popílků zpravidla obsahují vyšší koncentrace železa, které pak po hydrataci povrchu jednotlivých částic popílku v přírodním prostředí a vzniku oxohydroxidů železa představuje nejvýznamnější prostředek poutání arzenu. Další mobilizace takto vázaného arzenu opět přichází v úvahu (ve zvodnělých vrstvách úložiště) při snížení hodnot pH daného prostředí (Skřivan, 1996).

3.5.4 Potraviny

V některých potravinách nacházíme i v přirozených podmínkách větší množství arzenu. Nejvíce ho obsahují moštní měkkýši a z méně exotických produktů nejvíce oves. Víno a vinný mošt mohou příležitostně obsahovat větší množství arzenu, které je obvykle silně redukováno v průběhu zpracování, protože je kumulováno kvasinkami. Ukázalo se, že vinné kvasinky obsahovaly arzen v koncentracích do 150-180 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Maso může obsahovat stopy arzenu používaného jako růstový stimulant, či tonikum v několika dávkách před porážkou. Příležitostně dochází ke kontaminaci výrobků z obilí, při jehož sušení bylo použito koxu vyrobeného z uhlí s vysokým obsahem arzenopyritu. Arzenem byly kontaminovány potravinářské výrobky obsahující želatinu z kůže ovčí ošetřovaných protiparazitárními lázněmi. Vyskytl se dokonce případ značné kontaminace čokolády z obalového papíru barveného arzenovými pigmenty. Podobné případy se ale vyskytují jen vzácně. Nejvyšší přípustné množství arzenu je v mléce 0,05 mg/kg , v maso 0,1 mg/kg , v zelenině 0,5 mg/kg vyjma brambor, kde je limit 0,3 mg/kg (Bencko a kol., 1995).

Tolerovaný týdenní příjem anorganického arzenu je 0,015 mg/kg lidské váhy. V případě organického arzenu je povolený příjem 0,05 $\text{mg}/\text{lidské váhy}/\text{den}$ (Uneyma a kol., 2007).

3.5.5 Odpady s obsahem arzenu

Odpadní arzenové vápno – zdrojem tohoto odpadu je výroba neželezných kovů.

Odpadní sulfid arzenitý – zdrojem je chemický průmysl a výroba pracích prostředků.

Ostatní odpadní sloučeniny – z chemického, sklářského a keramického průmyslu.

Skoroditový kal – z výroby neželezných kovů.

Ostatní odpady – elektrárenské strusky a popílky, smetky z městských komunikací, kaly z ČOV (Trebichovsky a kol., 1997).

3.6 ZPŮSOBY ZNEŠKODŇOVÁNÍ ARZENU

- Vysrážení arzenového ferihydrátu, kde se rozpustnost snižuje při vyšších poměrech železa k arzenu (>4). Při rekrystalizaci na α -FeOOH (α -goethit) může dojít k uvolňování arzenu. Tato metoda je vhodná např. v polních podmínkách Bengálska, kde se pitná voda upravuje dostupnou zvětralinou, obsahující volné hydroxidy železa.
- Vysrážení ve formě arzeničnanů Fe a Ca. Nejstabilnější je skorodit (rozpustnost <1 mg/kg) dobře krystalovaný v prostředí s poměrem železa a arzenu nejméně 3, za pH 4 až 10. Pokud je v arzeničnanech přítomen také vápník, mají vyšší rozpustnost. Krystalizace skoroditu je průmyslově nejúčinnější metodou k odstranění arzenu z roztoku. V poslední době byla vypracována modifikace této metody, provozovaná při 90 °C za atmosférického tlaku, která probíhá za postupné neutralizace a zaručuje dobrou krystaličnost skoroditu a tím i jeho nízkou rozpustnost.
- Arzenové strusky mohou obsahovat až 10 % As a jsou velmi málo rozpustné. Není však známo jejich dlouhodobé chování.
- Arzenové cementové směsi fyzicky uzavírají sloučeniny arzenu a zamezují jejich dalšímu reagování. Používají se např. k vyplňování vydobytých důlních prostor (těžené ložisko zlata Bourneix ve Francii).
- Technologie SMITE (synthetic mineral immobilization technology), kterými se vyrábějí arzenové analogy stabilních minerálů, například svabit $\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{F}$, což je minerál apatitového typu.
- Je známo 34 kmenů bakterií, které oxidují toxický As^{3-} na As^{5+} v odpadních vodách. Biometylací přecházejí anorganické sloučeniny arzenu na různé sloučeniny organické (Pertold, 1998).

3.7 KOLOBĚH ARZENU V PŘÍRODĚ

3.7.1 Ovzduší

Koncentrace arzenu v ovzduší se běžně pohybují v rozmezí 0,4 - 30 ng/m³. Množství inhalovaného arzenu v neznečištěném prostředí je 120 ng, z čehož pouze 30 ng je absorbováno (Mandal, Suzuki, 2002).

Do atmosféry se dostává arzen především díky větrné erozi, vulkanickým emisím, volatizací z půdy a spalováním uhlí. Koncentrace arzenu v dešťových či sněhových srážkách nad venkovskými oblastmi je obvykle nižší než 0,03 µg/l. V industriálních oblastech, v blízkosti sopek a v místech, kde se spalují uhlí, jsou tyto hodnoty vyšší 0,5 - 16,0 µg/l (Smedley, Kinniburgh, 2002).

3.7.1.1 Biomethylace – přirozený vstup těkavých sloučenin arzenu do ovzduší

Dalším zajímavým rysem arzenu je jeho schopnost tvorby plyných sloučenin. Jejich objev má už poměrně dlouhou historii, která se odvíjí od objevu toxického tzv. Gosiova plynu. Původně B. Gosio, italský badatel, zjistil, že se ve vlhkých vytapetovaných místnostech vyvíjí jedovatý plyn, a to všude tam, kde bylo použito barviv obsahujících arzen. Později, r. 1901, popsal únik jedovatého plynu neznámého složení i z kultur určitých plísní obsahujících oxid arzenitý. Mechanismus vzniku tohoto plynu vysvětlil jednoznačně teprve r. 1945 F. Challenger. Ten zjistil, že jde o trimethylarzin, který vzniká biologickou methylací anorganických sloučenin arzenu. Později se zjistilo, že k biomethylaci sloučenin arzenu dochází běžně v anaerobním prostředí sedimentů povrchových vod a zamokřených půd. V tomto případě mají příslušný reakční mechanismus na svědomí jednobuněčné mikroorganismy (např. rod *Methanobacterium*) a na ději se podílí derivát vitamínu B₁₂, methylkobalamin. Tento přirozený proces umožňuje přestup arzenu původně vázaného v sedimentech a půdách do příslušných vod a odtud (ve formě plyného dimethyl- a trimethylarzinu) až do ovzduší. Tam ovšem osudy arzenu nekončí. Účinkem vzdušného kyslíku a za spoluúčasti ultrafialového záření a atmosférické vlhkosti se tyto sloučeniny arzenu částečně oxidují na tzv. kakodylovou kyselinu (CH₃)₂HAsO₂, která je vymývána dešťovými srážkami a vrací se tak na zemský povrch. Biologická methylace arzenu, jeho únik do atmosféry, následná oxidace a zpětné vymývání arzenu na zemský povrch uzavírají koloběh tohoto zajímavého prvku v přírodním prostředí. Zároveň představují vysvětlení dvou významných výše uvedených přirozených vstupů arzenu do ovzduší

ve formě těkavých sloučenin arzenu mořského a suchozemského původu. O celkovém rozsahu biologické methylace arzenu si můžeme učinit představu z odhadované velikosti součtu obou vstupů do atmosféry, která činí ročně zhruba 3 600 tun arzenu (Skřivan, 1996).

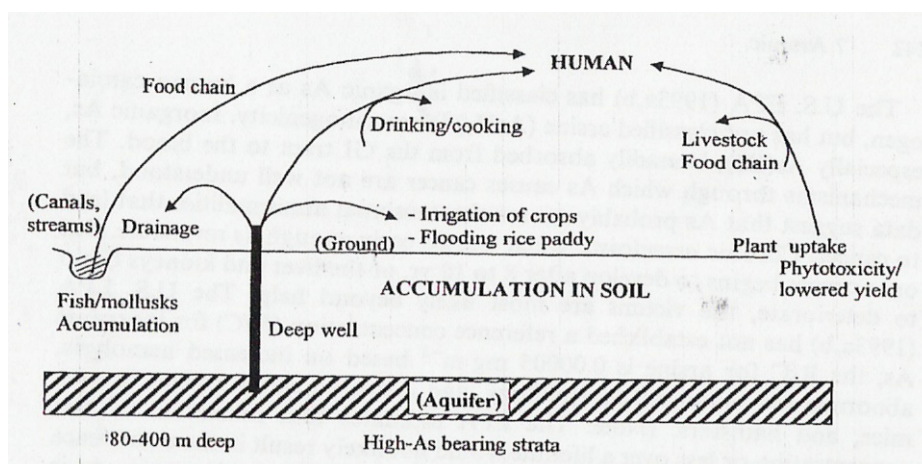
3.7.2 Voda

Ve vodě se arzen vyskytuje v organické (AsV) i anorganické formě (AsIII) a to jak v rozpuštěné tak v plynné podobě. To v jaké podobě se arzen bude vyskytovat ve vodním prostředí závisí na pH, obsahu organických látek, suspendovaných částicích, rozpuštěném kyslíku a dalších faktorech. Primárně se arzen vyskytuje ve vodě jako rozpustný iont nebo jako pevná nebo kapalná částice. Velmi zřídka se ve vodě vyskytuje v elementárním stavu As⁰. Nejčastější formy arzenu ve vodním prostředí jsou arzeničnany, arzenitany nebo methanarzenová kyselina. Anorganická forma arzenu (AsV) se nejčastěji nachází ve vodách s vysokou koncentrací rozpuštěného kyslíku, neutrální pH, redukováným obsahem organického materiálu. Opačné podmínky podmiňují výskyt sulfidů arzenu. V chladnějších měsících je dominantní formou arzenu (AsV) a v teplejších je častější výskyt methylovaných forem arzenu. Mořské řasy transformují arzenitany na netěkavý methylovaný arzen jako například na methanarzenovou kyselinu a zároveň syntetizují v tucích rozpustné sloučeniny arzenu. Mořský fytoplankton je schopen akumulovat arzen ve vyšších koncentracích a přeměňovat anorganické formy arzenu na methylované formy, které jsou později přeneseny do potravních řetězců (Eisler, 2007).

Arzen se nachází v malých koncentracích v přírodních vodách. Povolené maximum v pitné vodě je 10 µg/l. Tato norma je platná pro státy EU. Například Indie nebo Bangladéš, státy mající problém s vysokou koncentrací arzenu v pitné vodě, mají tyto limity mnohem vyšší až 50 µg/l. Mořská voda obsahuje obvykle 0,001 – 0,008 mg/l (Mandal, Suzuki, 2002).

V prostředí s pH nižším jak 6,9 se častěji objevuje arzen ve formě H_2AsO_4^- , ve vodách s vyšších pH je častější výskyt HAsO_4^{2-} . V redukčních podmínkách při pH nižším než 9,2 převládá H_3AsO_3^0 . V přítomnosti extrémně vysoké koncentrace rozpuštěné síry můžeme pozorovat významné množství rozpuštěných As-sulfidů. Redukční kyselé prostředí podporuje vylučování As_2S_3 , AsS nebo jiných minerálů s obsahem arzenu. Koncentrace arzenu ve vodě záleží na zdroji arzenu, jeho dostupném množství a geochemické charakteristice prostředí. V tekoucích vodách jsou koncentrace obvykle nízké 0,1 – 0,8 mg/l. V geotermálních oblastech může obsah arzenu v řekách dosahovat až 10 – 70 mg/l (Smedley, Kinniburgh, 2002).

Obr 3. Cyklus arzenu čerpaného z artézských vod (Adriano, 2001)



3.7.2.1 Arzen v usazeninách povrchových vod

Zajímavý je ovšem i další osud arzenu, fixovaného (často ve vysokých koncentracích) v přirozených chemogenních sraženinách hydroxidu železitého, které jsou především produkty sulfidického zvětrávání. V teplých měsících roku dochází k teplotnímu rozvrstvení rybníční vody, v důsledku mikrobiální činnosti je v hlubších vrstvách spotřebován veškerý rozpuštěný kyslík a v takto vzniklém odkysličeném prostředí dochází k redukci Fe(III) přítomného v usazenině. Vznikající dvojmocné železo přechází do roztoku, kam se spolu s ním uvolňuje také sorbovaný arzen. Takováto železem a arzenem obohacená voda přichází v prostoru výpusti pod hrází do styku s atmosférickým kyslíkem, kde se proto opět tvoří rezavá sraženina hydroxidu železitého, vznikající oxidací rozpuštěných Fe^{2+} iontů. Popsané transformace sloučenin železa, jež probíhají v tomto přirozeném reakčním systému, mají za následek, že se koncentrace arzenu v jednotlivých typech vod silně liší: při hladině rybníka bylo vždy méně než 10 g As/l, u dna v době teplotního rozvrstvení bylo nalezeno až 80 g As/l, ve výpusti pak až 120 g As/l (Skřivan, 1996).

3.7.2.2 Odstraňování arzenu z kontaminovaných vod

Při odstraňování arzenu z vody je nutné odstranit obě formy arzenu As(III) i As(V). Mezi základní používané technologie se řadí sorpce na aktivním hliníku a výměna iontů s využitím polymerů. Obě tyto metody však vyžadují úpravu pH nebo pre-oxidační či post-oxidační úpravy. Proto byla vynalezena nová metoda odstraňování arzenu z kontaminovaných vod s využitím polymerního hybridního sorbetu, který vykazuje velmi dobrou mechanickou pevnost a je schopen odstranit obě formy arzenu aniž by bylo třeba provádět úpravu pH

či oxidaci. Navíc nezpůsobuje změnu kvality vyčištěné vody. Další výhodou je jeho schopnost regenerace a opětného využití (DeMarco a kol., 2003).

3.7.3 Půda

Hlavními zdroji arzenu v půdě jsou arzenopyrit (FeAsS) a další sulfidy obsahující As jako hlavní nebo stopovou komponentu, např. lölingit (FeAs_2) nebo pyrit (FeS_2) s obsahem arzenu. Po uvolnění ze sulfidů je As(III) oxidován na As(V) a v závislosti na jeho koncentraci mohou sloučeniny arzenu koprecipitovat s nově tvořenými hydro-oxidy železa (HFO) nebo mohou být adsorbovány na povrchu těchto minerálů, popřípadě se mohou zapojit do obou procesů. HFO jsou nejdůležitějšími sorbenty As v půdách, ale svůj význam mají i oxohydroxidy hliníku a jílové minerály. Mobilita arzenu v půdě je velmi nízká ve srovnání s mobilnějšími elementy, jako jsou kadmium nebo zinek. Anorganické sloučeniny arzenu jsou pětikrát toxičtější na písčitéch než na jílovitých půdách. Je zřejmé, že biopřístupnost sloučenin arzenu v půdě je závislá na procesech sorpce a biotransformace těchto sloučenin jak v oblasti rhizosféry, tak i v okolní půdě a speciace arzenu v půdním roztoku je odpovědná za kvantitativní a kvalitativní aspekty speciace arzenu v rostlinách (Száková a kol., 2007).

Koncentrace arzenu v půdě se pohybují v rozmezí 5–10 mg/kg. Kyselé půdy s obsahem síry vzniklé oxidací pyritu jsou relativně bohaté na arzen. Podpovrchové půdní horizonty jsou chudší na arzen, který se vlivem volatizace uvolňuje do ovzduší nebo výluhem dostává do nižších vrstev. Dominantním zdrojem arzenu v půdě je geologické podloží, dále pak industriální zdroje, v zemědělství používané pesticidy a hnojiva (Smedley, Kinniburgh, 2002).

Mobilita arzenu v půdě závisí na typu půdy, pH, redoxním potenciálu a obsahu železa, manganu, hliníku, vápníku, hořčíku v půdě, přírodních organických látkách a jílu (Bissnen, Frimmel, 2003).

Sulfát železa se často používá k redukci mobility arzenu v půdě. Pozvolné uvolňování FeII poskytuje ideální podmínky pro oxidaci AsIII na AsV, který se pak snadno adsorbuje na hydroxid železa. Stejně tak oxidy manganu mohou adsorbovat vysoké množství arzenu a tím snižovat jeho mobilitu a toxicitu. Naopak alkalické materiály v půdě zvyšují mobilitu arzenu. Jílovité půdy obsahují velmi malá množství arzenu díky jeho silným vazbám na jíl (Kumpiene a kol., 2008).

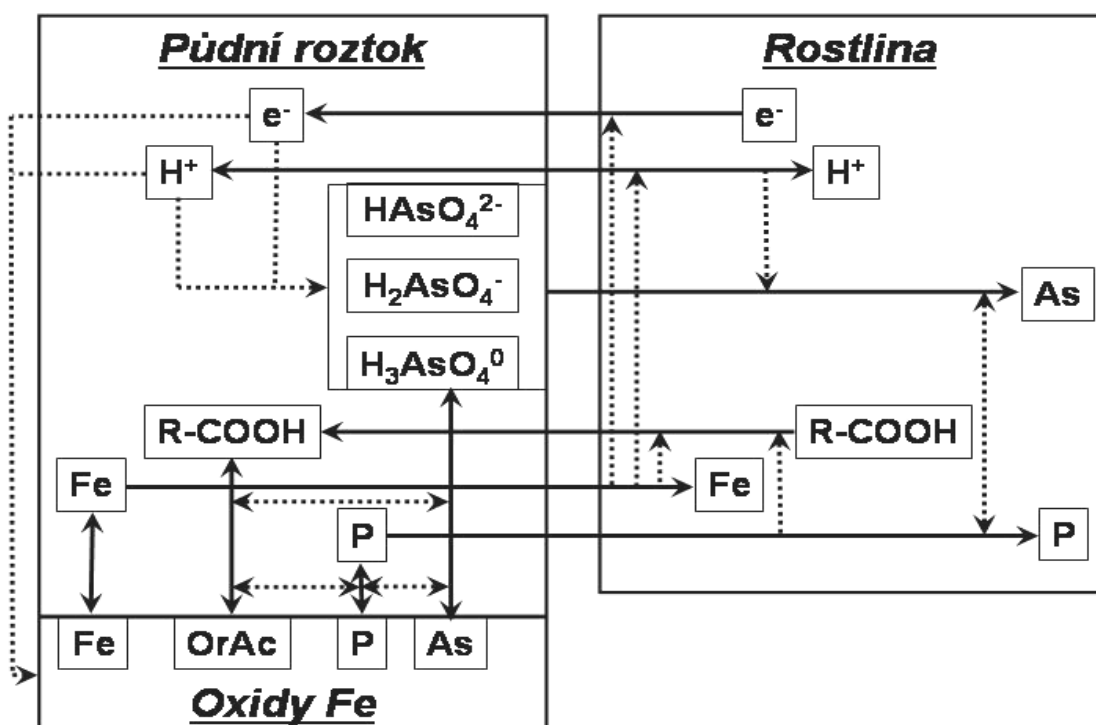
V aerobních podmínkách se vyskytuje arzen v půdě nejčastěji ve formě AsO_4^{3-} vázaný na jílové minerály. V kyselých půdách se nalézá arzen v podobě AlAsO_4 a FeAsO_4 (Matschullat, 2000).

Fytotoxické účinky arzenu v půdě jsou redukovány zvýšeným obsahem vápna, organického materiálu, železa zinku a fosforu v půdě. Poločas rozpadu arzenu v půdě je 6,5 roku trioxidu arzenu až po 16 let u arzeničnanu olovnatého.(Eisler, 2007).

3.7.3.1 Model chování arzenu v systému půda-rhizosféra-rostlina

Model zahrnuje příjem arzenu, chemickou speciaci v půdním roztoku a interakci s půdní pevnou fází a rostlinnou výživu železem a fosforem. Individuální procesy znázorněné v modelu jako proudy/ transformace (plná čára) a vlivy/interakce (tečkovaná čára) jsou dobře známé, ale dosud nebyly pro popis arzenu v systému půda-rhizosféra-rostlina aplikovány. Tento model zdůrazňuje klíčové procesy a jejich interakce a může být nápomocen v dalším studiu chování arzenu v rhizosféře suchozemských rostlin. Arzen je v půdě asociován s oxidy-hydroxidy železa. Hodnota pH v rhizosféře se může lišit od pH v okolní půdě až o dvě jednotky. Za aerobních podmínek je arzen přítomen v půdním roztoku jako AsV a desorbuje se ze sorpčních míst za zvýšení pH. Uvolnění arzenu a fosforu do půdního roztoku může nastat rozpuštěním oxidůhydroxidů železa jak při zmenšení redukčního potenciálu indukovaného rostlinou, tak při drastickém poklesu pH v rhizosféře. Redukce AsV na AsIII vede k jeho zvýšené přístupnosti pro organismy a k toxicitě pro rostliny. Příjem železa a arzenu mohou interagovat, protože mobilizační procesy indukované kořeny, mající za účel zvýšit rozpustnost železa z jeho oxidů/hydroxidů, nevyhnutelně vedou k uvolnění železem vázaného arzenu. Byly popsány dva odlišné typy reakce kořenů, jmenovitě strategie I a II, jako mechanismus pro získání železa. Především uvolnění redukčních a chelatačních sloučenin zvyšuje přístupnost arzenu pro organismy v rhizosféře. Karboxylové kyseliny uvolněné rostlinami s nedostatkem fosforu se podílí na mobilizaci anorganického fosforu v rhizosféře. Takové procesy také ovlivňují přístupnost arzenu pro rostliny vzhledem k známé podobnosti arzeničnanu a fosforečnanu (Soudek a kol., 2006).

Obr 4. Model chování As v systému půda-rhizosféra-rostlina (Soudek a kol., 2006)



3.7.4 Organismy

Zvířata vystavovaná vlivům arzenů si mohou na něj vypěstovat toleranci. Nejspíš je to spojeno se schopností methylace v živém organismu. Buňky se mohou adaptovat na působení arzenů zvyšující se biotransformací a zvýšeným množstvím methylovaných forem. Koncentrace arzenů v tkáních mořských organismů je nejvyšší v tucích, svalech a mění se se stářím organismů, geografickou polohou a antropogenními vlivy. Obecně lze říci, že tkáně obsahující hodně tuků vykazují také vyšší koncentrace arzenů. Nejvyšší hodnoty 30 mg/kg byly zaznamenány ve svalovině žraloka *Mustelus antarcticus* a hodnota 16,2 mg/kg ve svalech *Raja sp.* Rekordní hodnota u mořského savce byla 2,8 mg As/kg tuků v těle velryb. Vyšší koncentrace arzenů v tělech mořských živočichů je dána jejich dobrou schopností akumulovat arzen z vody a z potravy (Eisler, 2007).

3.7.4.1 Arzenolipidy

Přírodní arzenolipidy jsou analogy neutrálních lipidů jako jsou monoglyceridy, glykolipidy, fosfolipidy a fosfonolipidy. Nachází se v mikroorganismech, houbách, rostlinách, lišejnících, rybách i bezobratlých organismech. Arzenolipidy jsou konečnými produkty detoxifikace arzenitanů, která zahrnuje redukci, oxidační methylaci a adenosilaci.

Biogeneze arzenolipidů souvisí s přirozeným výskytem metabolitů arzenu (Dembitsky, Levitsky, 2004).

3.7.4.2 Detoxikace

Methylace arzenu AsV na methyларzen a dimethyларzenovou kyselinu je hlavním detoxikačním mechanismem v těle savců. Před methylací, která se nejčastěji odehrává v játrech, dochází k redukci AsV na AsIII (Eisler, 2007).

3.7.4.3 Mikroorganismy

Mikroorganismy díky své adaptabilitě a diversitě mohou existovat i ve velmi špatných podmínkách, nevhodných pro růst některých vyšších rostlin. Obsahují rezervoár důležitých genů, které jsou významné při detoxifikaci kovů (LeDuc, Terry, 2005).

Důležitou roli při oxidaci a redukci arzenu v půdě, sedimentech, čistírenských kalech apod. hraje aktivita mikrobiální biomasy. Půdní bakterie jsou také schopny redukovat arseničnany na arsenitany a poté je methylovat na dimethylarsan. Rovněž houby jsou schopny konvertovat organické i anorganické sloučeniny arzenu na těkavé methylarsany. Metabolická aktivita specifických mikrobiálních populací půdní biomasy hraje významnou roli ve speciaci anorganického arzenu v půdním roztoku (Száková a kol., 2007).

3.7.4.4 Ptáci

Poznatky o otravě AsIII u ptáků, které se projevují ztíženou koordinací svalů, zpomaleností a těžkopádností, trhavými pohyby, pokleslými očními víčky, schouleností, ztrátou orientačního reflexu, neschopností pohybu, jsou velmi podobné příznakům otrav i jinými toxikanty. První příznaky se objevují již po jedné hodině, smrt pak nastává během jednoho až šesti dní. Předpokládá se, že letální efekt akutní otravy arzenem, je způsoben destrukcí krevních cév, což má za následek snížení krevního tlaku (Eisler, 2007).

3.7.4.5 Savci

Savci jsou vystaveni arzenu primárně díky kontaminované vegetaci a vodě, popřípadě vlivem antropogenních aktivit. Často jsou používána potravní aditiva s obsahem arzenu pro podporu růstu. Vstřebávání arzenu do těla zvířete se děje inhalacemi, absorpcí pokožky nebo sliznicí. Rozpustné formy arzenu jsou přijímány snáze a ve vyšších koncentracích. AsIII inhibuje mitochondriální respiraci, způsobuje distální neuropatii a poruchu motoriky (Yokel a kol., 2006).

3.8 ARZEN A JEHO ÚČINKY NA ČLOVĚKA

Arzen může být absorbován s potravou, inhalacemi, průnikem přes pokožku či sliznice. Do buněk se arzen dostává aktivním transportem. Nejčastěji je arzen do těla dostáván potravou a většinou je pak vylučován močí během prvních pár dní. Nejtoxičtější formou je anorganický AsIII nejméně pak As0. Rozpustnost ve vodě a tělních tekutinách souvisí s toxicitou. Čím méně toxická forma tím méně je ve vodě rozpustná. Ačkoli metabolismus arzenu v mořských a suchozemských organismech je podobný, v mořských organismech jsou koncentrace arzenu mnohem vyšší.(Eisler, 2007).

3.8.1 Toxicita pro člověka

AsH₃, plynná forma arzenu, je nejvíce toxická a smrtelná dávka je 250mg/m³. Pro AsIII je letální dávka 34,5 mg/kg (Bissen, Frimmel, 2003).

Rozpustné sloučeniny arzenu jsou absorbovány střevy a vyloučeny ledvinami dále přes močové cesty ven z těla. Methylované formy arzenu (anorganické formy AsIII a AsV) jsou detoxifikovány v játrech na MMAA a DMAA. I přesto jsou tyto detoxifikované formy toxické pro člověka a savce. AsIII je toxický především díky jeho vazbám na SH skupinu enzymů a proteinů a způsobuje jejich denaturaci. Se vzrůstajícím množstvím kyslíku v buňce způsobuje jejich rozpad. AsIII inhibuje v lidské těle více než 20 enzymů. AsV je svou strukturou podobný fosforu a může ho v lidském těle nahrazovat například v kostech. AsV se snadno hydrolyzuje, což brání přeměně fosforu ve formě ADP na formu ATP a tím spotřebovává energii. AsIII, nejvíce toxická forma arzenu, způsobuje rozpad červených krvinek, který může vést až k hemolytické anémii. Interakce s SH skupinami proteinů a enzymů inhibuje sodíko-draselné pumpy v erythrocytech. AsIII také snižuje schopnost DNA opravných systému, což může vést k nádorovému bujení (Duker a kol., 2005).

Arzen bývá označován jako protoplazmatický jed, protože může pronikat buněčnými membránami do protoplazmatického prostoru a hluboce tak postihovat buněčnou hmotu. Je klasifikován i jako kapilární jed, protože způsobuje propustnost stěn krevních kapilár (Kafka, Punčochářová, 2002).

3.8.1.1 Akutní otrava

Symptomy akutní toxicity se objeví většinou 30 minut po přijetí větší dávky arzenu. Pokud je arzen přijímán potravou mohou se tyto příznaky objevit později. Mezi nejčastější projevy akutní toxicity patří slabost, bolest svalů, zvracení a průjemy. Prudká otrava probíhá buď pod obrazem gastrointestinálního syndromu v důsledku paralýzy kapilár mezenteria, protože arzen je silný kapilarotixický jed, nebo po požití enormních dávek, případně rychlém vstřebání jedu rannou plochou poškozené sliznice pod obrazem paralytického asfyktického syndromu s rychlým bezvědomím a obrnou oběhu a dýchání (Saha a kol., 1999).

3.8.1.2 Chronická otrava

Nejčastěji zasahuje arzen orgány jako jsou střeva, játra, ledviny, pokožka, krevní oběh a může způsobovat vypadávání vlasů, zvýšenou pigmentaci, tvrdnutí pokožky, rakovinu, vaskulární onemocnění, neurozy (Duker a kol., 2005).

3.9 ROSTLINY

Arzen patří mezi nejintenzivněji studované rizikové prvky z důvodu jeho toxicity pro člověka i ostatní živočichy. Rovněž fytotoxicita tohoto prvku je známa. Považuje hladinu As v rostlinách 0,01–1 mg/kg za normální a obsahy 3–10 mg/kg za fytotoxické. Byl rovněž prokázán vliv zvýšené koncentrace As na snížení absorpce některých mikroprvků jako B, Cu, Mn a Zn rostlinami (Száková a kol., 2007).

Na polích ošetřovaných pravidelně pesticidy s obsahem arzenu se arzen zabudovává do půdy a způsobuje snížení úrodnosti kulturních rostlin jako jsou například ječmen nebo vojtěška (Kafka, Punčochářová, 2002).

Arzen není pro rostliny esenciální živinou, přesto byly zjištěny zvýšené výnosy při pěstování na půdách s nízkými koncentracemi arzenu. Tento efekt byl pozorován u odolných plodin jako jsou brambory, kukuřice, žito a pšenice. Suchozemské rostliny akumulují přednostně AsIII. Fosfáty inhibují příjem arzenu rostlinami. Toxicita arzenu se v rostlině projevuje blokací syntézy proteinů. Schopnost rostlin přijímat arzen je vyšší v půdách s hrubší texturou s malým koloidním materiálem a menší schopností výměny iontů. Aby mohl být arzen rostlinou přijímán musí být v mobilní formě. Methylovaný arzen at již v podobě herbicidů nebo defoliantů je rozprašován na povrch rostlin a následně se tyto látky dostávají do půdy buď přímo při aplikaci těchto výrobků nebo při oplachu rostlin vodou. Další formy arzenu se dostávají do půdy z kořenů rostlin nebo po smrti rostliny při jejím rozkladu.

Fytotoxické reakce organického a anorganického arzenu jsou odlišné. Primárně ovlivňuje arzen v rostlinách aktivaci světla, pravděpodobně narušením pentosofosfátového cyklu. AsIII pronikají přes rostlinou kutikulu v mnohem větších koncentracích než AsV. Při průniku dochází k poklesu turgoru. Fytotoxicita herbicidů je charakterizována chlorací, zastavením růstu, postupným hnědnutím, dehydratací a smrtí. Rostliny mohou přijímat arzen prostřednictvím kořenů a listů. Koncentrace arzenu v rostlině pak souvisí s obsahem arzenu ve vodě a v půdě. Půdy obohacené o rostliny, které byly kontaminovány arzenem, nemají nijak znatelně poškozený cyklus CO₂ či nitrifikaci. Z toho vyplývá, že pokud přidáme do půdy arzen, neovlivní nám to rozklad rostlinných pletiv půdními mikroorganismy (Eisler, 2007).

Ze zemědělských plodin jsou na účinky As nejcitlivější luskoviny. Fytotoxicita arzenu se u rostlin projevuje plazmolýzou pletiv kořenů a žloutnutím listů vedoucím až k nekroze špiček a okrajů listů (Pavlíková a kol., 2007).

Fytotoxicita arzenu se liší v závislosti na rostlinném druhu, množství arzenu v půdě, na půdních vlastnostech a jejím složení a také na teplotě (Naidu a kol., 2006).

Tolerance k arzenu záleží na druhu rostliny a může vyplývat ze dvou strategií: nepřijetí arzenu (excluder) nebo akumulace arzenu (akumulátor). Strategie nepřijetí arzenu zahrnuje zabránění příjmu arzenu nebo omezení transportu arzenu do nadzemních částí rostliny. Tuto strategii uplatňuje např. *Typha latifolia* hojně rostoucí na půdě kontaminované arzenem. Akumulační strategie předpokládá silnou akumulaci arzenu v rostlině. Toto je strategie několika suchozemských rostlin rostoucích na haldách po těžbě nerostů, které obsahující hodně arzenu, např. *Agrostis tenuis*. Přestože je rostlina schopna akumulovat velké množství arzenu, na to aby mohla být označena za hyperakumulátor, je nutné splnit ještě druhou podmínku a sice absorbce rizikových prvků až 1000 mg As/kg sušiny (Soudek a kol., 2006).

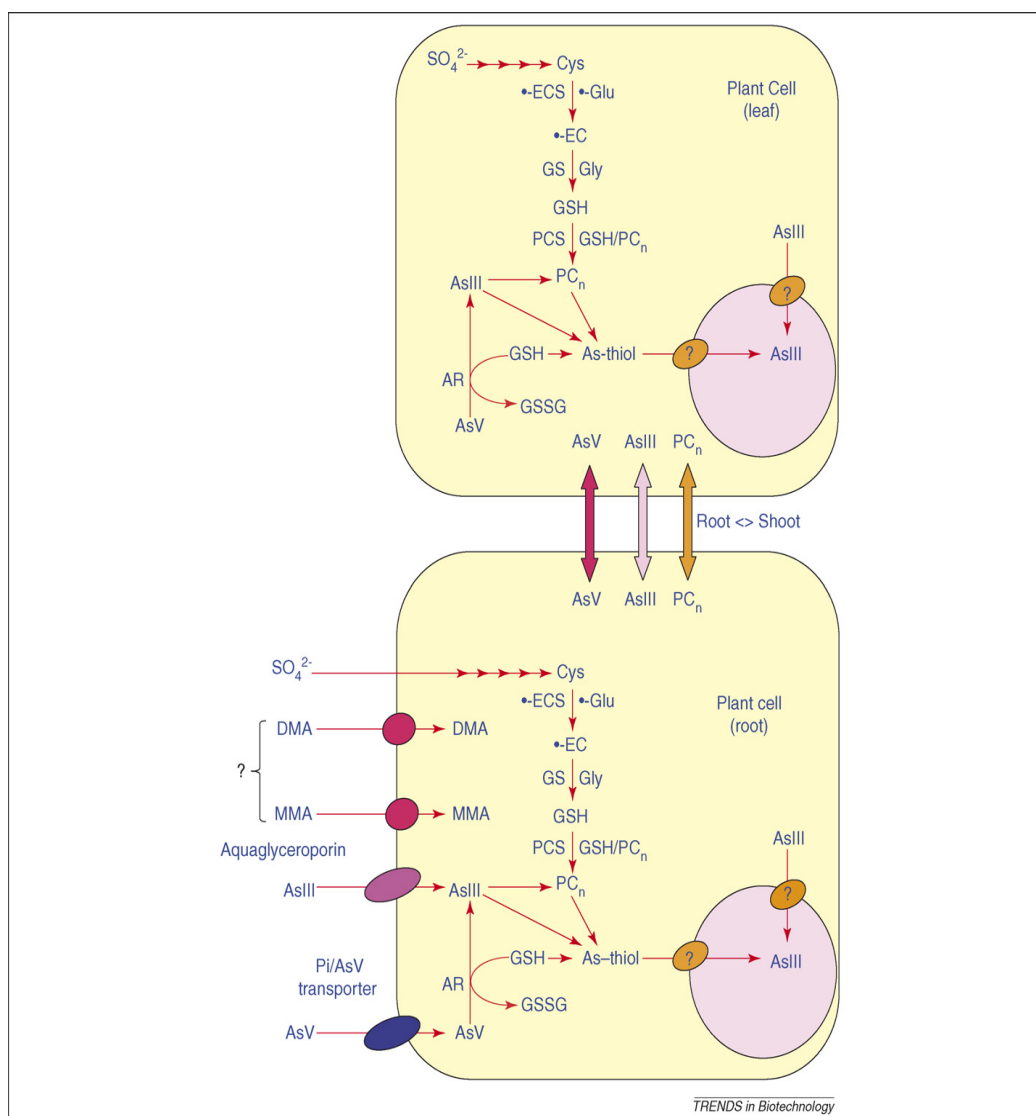
Arzen je přijímán rostlinou využitím fosfátového transportního systému. Arzen inaktivuje řadu enzymů díky své vysoké afinitě k thiolové skupině proteinů. V přítomnosti fosforečnanů je příjem arzenu inhibován zatímco v přítomnosti arzenu je fosfát jen slabě inhibován. U suchozemských rostlin existuje mezi arzenem a fosforem kompetitivní interakce během příjmu rostlinou. Toxicita arzenu částečně blokuje syntézu proteinů a dochází k interferenci s proteinovou fosforylací, avšak přítomnost fosforu zabraňuje této reakci (Soudek a kol., 2006).

Příjem arzenu rostlinou je ovlivněn texturou půdy a kompeticí a fosforečnany. Nízké dávky fosfátů vytlačí arzen z půdy a zvýší tím jeho příjem a fytotoxicitu, zatímco větší dávky fosfátů soutěží s arzenem na povrchu kořenů rostlin a snižují tak jeho příjem a fytotoxicitu.

Množství přijatého arzenu rostlinou se zvyšuje s jejím růstem. Fytotoxicita arzenu je značně ovlivněna jeho chemickou formou a koncentrací. Ve vodě rozpustné formy jsou mnohem více toxické než pevně vázané formy. AsIII má významný inhibiční efekt na mitochondriální respiraci. Díky chemické podobnosti arzenu k fosforu se arzen účastní mnoha reakcí v buňkách a může působit i jako substituent fosforu v DNA. Inhibice enzymů v DNA opravné, způsobená arzenem, může zapříčinit poškození DNA. AsIII je slabý mutagen, ale potencionální komutagen (Patra a kol., 2004).

Biokoncentrační faktor musí být větší než 1, tedy koncentrace kovu v rostlině musí být větší než koncentrace kovu v půdě. Rostliny akumulující arzen ho mohou uložit v kořenech nebo ho přemístit do nadzemní části. Zdá se, že dvouděložné rostliny přemísťují do nadzemní části více arzenu než jednoděložné rostliny. Rozdílnost v místě uložení arzenu naznačuje rozdílné mechanismy uchování i transportu arzenu v rostlinách. Arzen akumulující se v buňkách kořenů tak, jak to můžeme např. pozorovat v kořenovém systému rajčat, může být součástí strategie nepřijetí arzenu. Pokud je velká koncentrace arzenu v nadzemní části, ale ne v kořenech, může být právě transport kořeny-nadzemní část důležitý pro toleranci, tak je tomu např. u *Pteris vittata*. U této rostliny byla nalezena ve starších listech větší koncentrace arzenu než v mladších, což lze vysvětlit tak, že xylém, kterým je arzen transportován, vede právě přes starší listy po celou dobu vegetace. Transport arzenu z kořenů do stárnoucích listů byl považován za detoxifikační proces, protože rostlina se může arzenem zbavit opadem listů. To, že bylo u volně rostoucí *Pteris vittata* nalezeno více arzenu v živých listech než v mrtvých, se připisuje vymytí arzenu z mrtvých listů vodou nebo přenosu arzenu společně s živinami před opadnutím listů do živých listů (Soudek a kol., 2006).

Obr 5. Mechanismus rostlin – příjem, translokace a detoxikace arzenu (Tripathi a kol., 2007).



3.9.1 Hyperakumulátory arzenu

Prvními objevenými hyperakumulátory arzenu jsou *Pteris vittata* a *P. calomelanos*. Obě kapradiny produkují velká množství biomasy, takže jsou vhodnými kandidáty pro účely fytoextrakce. Produkce biomasy *P. vittata* se dokonce po aplikaci As zvýšila. Koeficient biologické absorpce je definovaný jako poměr koncentrace prvku v nadzemní části rostliny a koncentrace prvku v půdě. Faktor akumulace je definovaný jako poměr koncentrace prvku v nadzemní části rostliny a koncentrace prvku v kořenech.

Tolerantní rostliny mají tendenci omezit přenos půda-rostlina a kořen-nadzemní část, hyperakumulátory aktivně arzen přijímají a transportují do nadzemních částí. Pro extrakci nejsou vhodné rostliny s akumulacním faktorem a částečně i koeficientem biologické

absorpce menším jedné. Podle konceptu akumulátor-excluder by se rostliny tolerantní k arzenu měly při akumulčním faktoru < 1 řadit k excluderům i přes zvýšenou koncentraci kontaminantu v nadzemní části. Hyperakumulace arzenu bude zřejmě vlastností nezávislou na vnějších podmínkách, než získanou přizpůsobením se prostředí, protože i populace z nekontaminovaných míst jsou schopny hyperakumulovat arzen. O procesech indukovaných kořeny v rhizosféře se předpokládá, že usnadňují příjem arzenu hyperakumulátorem (Soudek a kol., 2006).

Rostliny přijímají arzen v podobě AsV a AsIII využitím fosfátových přenašečů a aglycyliceroporinů. Malé množství organického arzenu (monomethylarzenová kyselina MMA a dimethylarzenová kyselina DMA) mohou být také přijímány přes neznámé přenašeče. Rostliny asimilují sulfáty (SO_4^{2-}) na cystein (Cys) k syntéze glutathionu (GSH) ve dvou krocích, které jsou závislé na ATP. V prvním kroce je g-glutamylcystein (gEC) syntetizován pomocí g-glutamylcysteinsyntetázy (g-ECS) s využitím cysteinu a g- glutamové kyseliny (g-Glu) jako substrátu. V druhém kroce je GSH syntetizován za přítomnosti glutathionosyntetázy (GS) s využitím glycinu (Gly) jako substrátu. Reakci na arzen rostlina indukuje syntézu fytochelatinu (PCn), polymerů GSH za účasti enzymu fytochelatinsyntetázy (PCS). Před detoxifikací je AsV redukován na AsIII arzenreduktázou (AR) s využitím GSH jako resultantu. Fytochelatiny a GSH v koordinaci s AsIII vytváří různé komplexy, které jsou obsaženy především ve vakuolách (Tripathi a kol., 2007).

3.9.2 Ochranné mechanismy rostlin

K ochraně rostlin před otravou rizikovými prvky si musí rostlinné buňky vytvářet ochranné mechanismy, které inaktivují ionty těchto prvků. Za významné inaktivátory rizikových prvků jsou považovány fytochelatiny, peptidy nacházející se v autotrofních rostlinách a některých houbách. Tyto peptidy se objeví v rostlině po indukci rizikovým prvkem. Fytochelatiny hrají roli v homeostázi rizikových prvků v rostlině a mají strukturu $(\text{c-glu-cys})_n\text{-gly}$, kde $n = 2-11$. Jedná se o mechanismus, který reguluje dostupnost iontů prvku v rostlinné buňce (Zenk, 1996).

Fytochelatiny jsou syntetizovány z GSH a syntéza končí po ukončení expozice rizikovými prvky. Fytochelatiny váží arzen do svých triolových skupin a tím chrání rostlinu před škodlivým vlivem arzenu (Sneller a kol., 1999).

3.9.3 Fytoremediace

K omezení kontaminace se používá fytoimobilizace nebo fytostabilizace, k odstranění je vhodná fytoextrakce a fytovolatilizace. Fytostabilizace využívá rostliny k stabilizaci množství kontaminantu. Fytofiltrace zahrnuje využití rostlin k čištění vodního prostředí. Fytovolatilizace znamená extrakci kovů z půdy rostlinou a jejich následné uvolnění do atmosféry volatilizací. Při fytoextrakci rostlina absorbuje kovy z půdy a přesune je do nadzemních výhonků, kde se kovy akumulují (Padmavathiamma, Li, 2007).

Do budoucna by mohl být využíván potenciál mokřadů konstruovaných speciálně pro remediace zemědělských drenážních vod a průmyslových odpadních vod. Rostliny mohou akumulovat těžké kovy ve své sklizňové biomase (fytoextrakce) nebo je mohou přeměňovat na těkavé formy a vypouštět (fytovolatilizace). Rostlinné hyperakumulátory a některé mikrobi, které jsou tolerantní vůči těžkým kovům, akumulují je a detoxifikují jsou důležitými rezervoáry unikátních genů, které mohou být importovány do rychlerostoucích rostlinných druhů, čímž se zvýší účinnost fytoremediací (LeDuc, Terry, 2005).

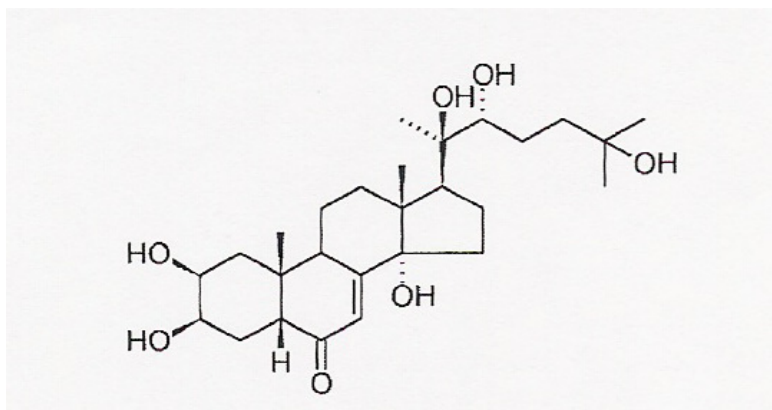
3.10 EKDYSTEROIDY

3.10.1 Obecná charakteristika

Uhlíková kostra ekdysteroidů se nazývá cyklopentan-perhydro-fenantren s □ postranním řetězcem na C-17. Tato kostra vzniká biosyntézou terpenu pomocí nebalonové kyseliny, cholesterolu a dalších sterolů. Celý postranní řetězec prekurzorů sterolů drží strukturu vzniklých ekdysteroidů. Takto vznikají například ekdysteroid C₂₇₋₂₉. Štěpením postranního řetězce vznikají ekdysteroidy C₁₄, C₂₁, C₂₄. Základní stavba ekdysteroidu je charakterizována α-hydroxylovou skupinou v pozici C-14 a β-hydroxylovou skupinou v pozici C-3. Ekdysteroidy jsou vysoce hydroxylované s dvěma až osmi hydroxylovými skupinami. Další možností je alternativní dvojitá vazba v jedné z následujících pozic: 4-5, 8-9, 9-11, 12-13, 14-15, 24-25, 25-26 nebo 24-28. Druhá oxo skupina se může objevit v pozici C-2, C-3, C-12, C-17, C-20 nebo C-22. Zatímco počet zoekdysteroidů se odhaduje na sto, rostlinných ekdysteroidů se předpokládá na více než 250. Počet, poloha a pozice hydroxylových substituentů zajišťuje tak velkou diverzitu. Zoekdysteroidy mají maximálně 8 hydroxylových skupin. Ecdysteroidy s hydroxylovou skupinou v pozici C-9, C-12, C-17, C-19, C-21, C-24, C-28 a C-29 s objevují pouze v rostlinách. Přírodní deriváty ekdysteroidů

zahrnují estery (organických i anorganických kyselin), ethery (s organickými alkoholy) a glykosidy. Toxicita ekdysteroidů je velmi nízká. Letální dávka je 6,4 g/kg (Báthori, Pongracz, 2005).

Obr. 6. 20-hydroxyekdyson (Dinan a kol., 2001)



3.10.2 Význam pro člověka

Ekdysteroidy často používají lidé, kteří chtějí zvýšit nárůst své svalové hmoty. Tyto látky jsou obsaženy v přípravcích s názvy Ecdysten, Leveton nebo Prime Plus. Zmíněné preparáty zlepšují anabolickou aktivitu, předchází proteinové nerovnováze a podporují nárůst pracovní kapacity. U atletů zvyšují výkon, ale také způsobují hormonální změny. Rovněž byla zaznamenána redukce chemoluminescence v moči a snížení malonových dialdehydů. Další efekty jsou následovné:

- zvyšují syntézu proteinů, 20-hydroxyekdyson a turkesteron způsobují nárůst svalové hmoty a jaterní tkáně
- stimulují karbohydrátový metabolismus- anabolické steroidy účinně redukuje hyperglykemickou odpověď na exogenní glukagon
- ovlivňují biosyntézu lipidů a ochranu jater- působením ekdysteroidů dochází ke snížení hladiny cholesterolu. Dále pak zlepšuje chemické složení žluči, zvyšuje hladinu žlučových kyselin a bilirubinu
- mají také vliv na rovnováhu moči v krvi a ledvinovou disfunkci –snižují množství moči v krvi a zbytkového dusíku
- snižují hypoazetomický efekt
- 20-hydroxyekdyson obnovuje funkci ledvin
- antiarytmický efekt ekdysteroidů
- imunostimulující efekt
- antioxidační účinky (Báthori, Pongracz, 2005).

3.10.3. Fytoekdysteroidy

Ekdyson a 20-hydroxyekdyson jsou svlékací hormony u arthropod. Nalezeny byly i u rostlin. Oba dva byly také součástí insekticidů, indikátory hlísti a některých lidských onemocnění. Obě dvě molekuly jsou steroidy rozpustné ve vodě. Jejich struktury se liší pouze v substituci hydroxylové skupiny u 20-hydroxyekdysonu a hydrogenu (u ekdysonu) v pozici C-20. Tato substituce mění hydrofobicitu těchto dvou molekul, ekdyson je více hydrofobní. Extrakce ekdysonu, 20-hydroxyekdysonu a ostatních ekdysteroidů se provádí nepolárním rozpouštědlem, například methanolem nebo butanolem a dále pak vodou o teplotě 80-90 °C (Modlin a kol., 1994).

Ekdysteroidy jsou vysoce polární steroidní hormony zodpovědné za růst a vývoj mnoha členovců a na mnoho z nich mohou mít letální efekt (Soriano a kol., 2004).

Byly zjištěny v mnoha rostlinných druzích, ne však ve všech. Koncentrace fytoekdysteroidů v rostlinách je asi 100-1000krát větší než koncentrace ekdysteroidů v hmyzu. Pro zjištění množství fytoekdysteroidů v rostlinách se využívá metody RIA (radioanalýza), HPLC (vysocevýkonné kapalinové chromatografie) a bioanalýzy. Kombinací těchto metod je možné efektivně identifikovat i velmi malá množství ekdysteroidů v rostlinách. Zároveň lze determinovat profil ekdysteroidů a podle toho určit o jaký rostlinný druh se jedná. Tyto přístupy jsou využívány též k analýzám ekdysteroidů v hmyzu. Doposud bylo zjištěno, že ekdysteroidy jsou obsaženy ve všech částech rostliny. Kvalitativně se však liší ekdysteroidy v rostlině a v semeni. V rostlinách je přítomno poměrně velké množství helix-hydrolizovatelného konjugátu, který není v semenech. Kořeny rostlin obsahují větší množství ekdysteroidů než je tomu v jiných částech rostlin a v listech je jsou také větší koncentrace než ve stvolu. Kořeny mohou být místem biosyntézy ekdysteroidů (Dinan, 1994).

3.10.3.1 Předpokládaná funkce fytoekdysteroidů

Pestrost ekdysteroidních konjugátů hmyzu byla identifikována z vajec, ovárií a larev různých druhů hmyzu. Ekdysteroidy izolované z tkání vajec a ovárií slouží jako zásobárny aktivních ekdysteroidů nutných k embryonálnímu vývoji. Ekdysteroidy rozpoznané v postembryonálním stádiu jsou primárními inaktivačními produkty v útrokách a jsou tak dobrou ochranou hmyzu před potravními ekdysteroidy. Na rozdíl od hmyzu, kde jsou funkce ekdysteroidů známy, jejich funkce u rostlin nejsou dosud objasněny. V rostlinách se nachází široká škála ekdysteroidů (Grebek a kol., 1994).

Phytoekdysteroidy se mohou vyskytovat v širokém spektru rostlin. Zjištění, že rostoucí koncentrace fytoekdysteroidů v reakci na rostoucí mechanické poškození a aplikací poškozeného hormonu, methyl jasmonátu je shodný s představou, že fytoekdysteroidy mohou chránit rostliny před útoky hmyzu (Soriano a kol., 2004).

Studie zabývající se výživou potvrdily, že mnoho řádů hmyzu vykazovalo vývojové abnormality a vzrostla mortalita vlivem požití fytoekdysteroidů. Fytoekdysteroidy mohou stimulovat zabraňovací receptory a mají regulační funkci, která zahrnuje syntézu a katabolické reakce, díky nimž se možná podaří zjistit přesnou funkci fytoekdysteroidů, která není dosud objasněna. Na základě současných znalostí o ekdysteroidech se předpokládá, že ve špenátu má 20 hydroxyekdyson funkci rostlinného hormonu (Schmelz a kol., 2000).

Předpokládá se, že fytoekdysteroidy mají v rostlinách funkci hormonů, ale zdá se více pravděpodobné, že by mohly odrazovat hmyz a způsobovat jeho hormonální nerovnováhu a tím způsobit narušení vývoje hmyz či dokonce jeho smrt. Pokusy na rostlinách čeledi merlíkovitých ukázaly, že v různých rostlinách stejné čeledi se vyskytuje jiné množství i odlišná kvalita fytoekdysteroidů. (Dinan, 1994).

Všechny rostlinné druhy mají kapacitu k produkci i třeba jen malého množství fytoekdysteroidů. Což je důležitý poznatek, protože pak můžeme genetickými modifikacemi zvýšit množství ekdysteroidů v rostlině a tím zvýšit její ochranu. Ochrana spočívá v postupné akumulaci toxinů a nestrávitelných látek pro hmyz. Zvýšením koncentrace ekdysteroidů v rostlině za účelem její ochrany před hmyzími predátory nedochází k zvýšení rizika pro obratlovce nebo člověka. Zvýšení obsahu ekdysteroidů je prováděno v genovém inženýrství ekdysteroidního biosyntetického cyklu nebo jeho regulací k zajištění adekvátní úrovně fytoekdysteroidních analogů, které zatím nebyly polyfágními predátory detoxifikovány. Fytoekdysteroidy nejsou toxické pro savce a mohou být použity ve farmakologii nebo medicíně. Ekdysteroidy jsou steroidní hormony mnoha členovců a bezobratlých. Z hmyzu regulují svlékání larev a metamorfozu, ale mohou mít vliv i na reprodukci a embryogenezi. Majoritními ekdysteroidy jsou následující: 20-hydroxyekdyson a 20-dihydroxyekdyson (Dinan a kol., 2001).

3.10.3.2 Fytoekdysteroidy ve špenátu

K biosyntéze ekdysteroidů v rostlině špenátu (*Spinacia oleracea*) dochází až během ontogeneze primárních a sekundárních listů. Během ontogenetického vývoje rostliny dochází k jejich apikálnímu transportu. Ve starších pletivech dochází ke snižování množství ekdysteroidů vlivem jejich transportu do apikálních částí rostlin a do nově vznikajících tkání (Grebenok, Adler, 1993).

Uvnitř semene špenátu je obsaženo 17 μg ekdysteroidů zatímco osemení obsahuje pouze 1 μg . Během prvních dvaceti dní vývoje je hladina ekdysteroidů konstantní. Po 20 dnech dochází k zvyšování obsahu ekdysteroidů úměrně s věkem rostliny. Fyziologická úroveň ekdysteroidů klesá a stoupá v závislosti na vývoji poměru μg ekdysteroidů na gram čerstvé hmotnosti. Během tohoto cyklu jsou ekdysteroidy syntetizovány v apikálních listech (Grebenok, Adler, 1991).

4. METODIKA

4.1 VYPĚSTOVÁNÍ VZORKŮ

Nádobový pokus byly založeny v roce 2007 ve vegetační hale katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin ČZU v Praze. Pro pokus byl použit špenát setý (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador).

Do jednotlivých nádob bylo odváženo po 5 kg zeminy ze stanoviště Suchdol (Tab. 1 a Tab. 2) promíchané s 0,5 g N (ve formě NH_4NO_3), 0,16 g P a 0,4 g K (ve formě K_2HPO_4). Arzen byl přidán ve formě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v dávkách 25, 50 a 75 $\text{mg As} \cdot \text{kg}^{-1}$ dle schématu pokusu (Tab. 3). Každá varianta byla pětkrát opakována. Po celou dobu trvání experimentu byla vlhkost zeminy udržována na 60 % maximální vodní kapacity závlahou demineralizovanou vodou. Špenát byl sklizen v plné zralosti. Nadzemní biomasa byla zvážena a ze sklizené rostlinné biomasy byla část usušena při 60 °C pro stanovení obsahu arzenu a část byla uchována v tekutém dusíku pro analýzu rostlinných metabolitů.

Tab. 1: Vybrané agrochemické a pedologické charakteristiky použité zeminy

Půdní typ	Půdní druh	pH	KVK ($\text{mval} \cdot \text{kg}^{-1}$)	C_{ox} (%)
Černozem	Jílovitohlinitá	$7,2 \pm 0,2$	258 ± 4	$1,83 \pm 0,41$

Tab. 2: Celkový obsah živin v černozemi stanovený dle Mehlicha ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a celkový obsah As

Půdní typ	Ca	Mg	K	P	As_T
Černozem	8973,8	202,2	235,4	75,0	18,0

Tab. 3: Schéma pokusu

Varianta	Hnojení	Přídavek As ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Kontrola	NPK	0
As1	NPK	25
As2	NPK	50
As3	NPK	75

4.2 BODOVĚ STRUKTUROVANÁ METODIKA POSTUPU IZOLACÍ FRAKČÍ Z ČERSTVÉHO MATERIÁLU

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 H₂O
- 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/f1a* a **b)** vodně methanolvá frakce *VM/f1a* (pro závěrečné spojení)
 - 2.3.2. **Odpařování frakce - VM/f1a:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrováním je odstraněn MeOH
 - 2.3.3. **Odpařování frakce - Pe/f1a:** Zakoncentrováno na 150 ml
 - 2.3.4. **Zpětné vytřepání Pe/f1a:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml MeOH + H₂O (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 methanolvá 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 vodu 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/fla** a **b)** vodná frakce - **V/fla** (pro závěrečné spojení)
- 2.5.2. **Odpařování frakce V/fla:** Odpařeno na 1/10 objemu - zakoncentrování
- 2.5.3. **Odpařování frakce - B/fla:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 2.5.4. **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**
- 2.5.5. **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)
- 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/fla** + **VM/flc** 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/f1a* + *VM/f1c* 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/f1a** a **b)** vodná frakce - **V/f1a** (pro závěrečné spojení)
- 6.3.2. **Odpařování frakce V/f1a:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrování
- 6.3.3. **Odpařování frakce - B/f1a:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 6.3.4. **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**
- 6.3.5. **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)
- 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/f1a** + **VM/f1c** 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)

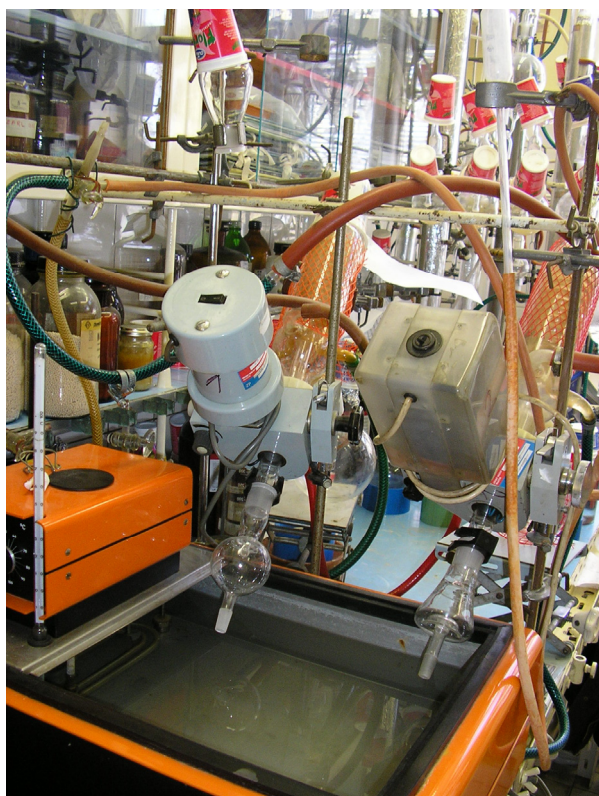
Foto 1: Vzorky špenátu kontrola vlevo, As 2/1 vpravo (autor Doc. Pavlíková, Csc.)



Foto 2: Extrakce vzorků špenátu

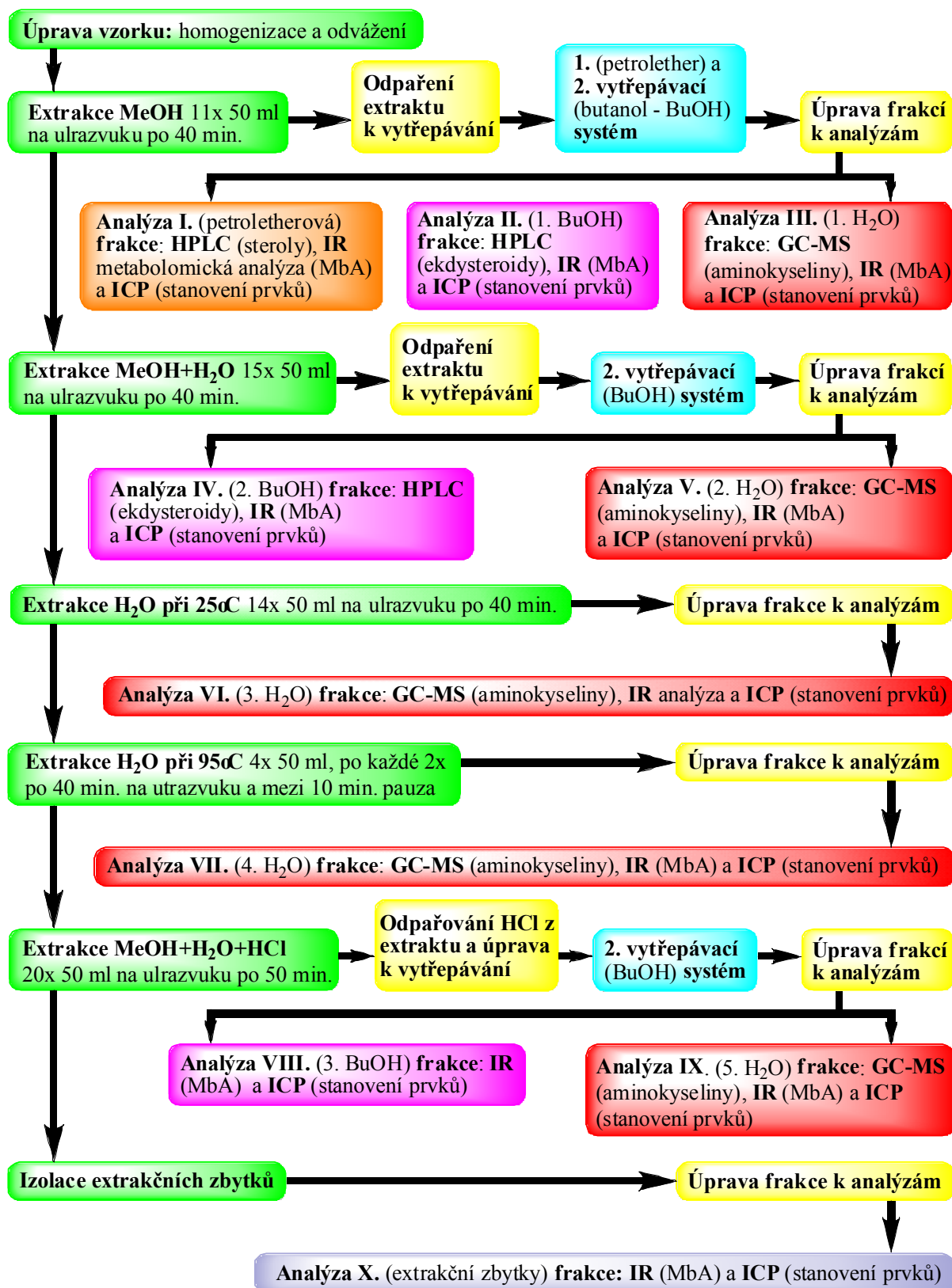


Foto 3: Odpařování vzorků na odparce EL – 20R



Do MeOH frakce se extrahovaly mastné kyseliny, fosfolipidy, estery mastných kyselin, steroly a jejich konjugáty, flavonoidní látky a další. Do petroletherové frakce se extrahovaly steroly a nepolární látky. BuOH frakce obsahovala aminokyseliny, oligopeptidy, oligosacharidy, nízkomolekulární proteiny a ekdysteroidy.

Obr. 7 Grafické schéma postupu



4.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU ARZENU A DALŠÍCH PRVKŮ

Usušený rostlinný materiál byl rozložen na suché cestě ve směsi oxidačních plynů ($O_2 + O_3 + NO_x$) s využitím přístroje APION (Tessek, CZ) (Miholová a kol., 1993). Popel byl rozpuštěn v 1ml 1,5 % HNO_3 . Arzen byl stanoven metodou generace hybridů na atomovém absorpčním spektrometru Varian SpectrAA-300 (Australia) vybaveném generátorem hybridů VGA-76.

4.4 STANOVENÍ VYBRANÝCH METABOLITŮ V BuOH FRAKCI

Stanovení vybraných metabolitů bylo prováděno pomocí HPLC od firmy Waters. Vzduch byl z eluentů odstraňován pomocí degaseru Waters - In-Line Degasser AF (4-kanálový vakuový degasser). Eluentu byly do kolony pumpovány pomocí pump Waters Delta 600 (Kvarternární gradientové čerpadlo), gradient byl kontrolován pomocí Waters 600 Controller, který byl řízen pomocí programu Empower1 Application. UV spektra byly měřena pomocí UV - PDA detektoru Waters 2996 - Photodiode Array Detector (detektor diodového pole).

Jako eluent byl používána voda 2 krát destilována (po druhé pak s NaOH a manganistanem draselným) - roztok eluentu A, speciální MeOH ke gradientové eluci využívaný pro HPLC - methanol G - for gradient elution, ACS - roztok eluentu B. Nastří byl prováděn pomocí Rheodynu 7725i s 5 μ l smyčkou.

Všechny analýzy byly prováděny na koloně, před kterou byl nejprve předkolonkový filtr od firmy Supelco (Valco Pre-Column Filter s fritou z antikorozní oceli o průměru pór 0,5 μ m) a následně HPLC předkolonka od firmy Supelco - Ascentis C8 (I.D. 4,0 mm, délka 2 cm, velikost zrn stacionární fáze 5 μ m). Byla použita HPLC kolona od firmy Supelco - Ascentis C8 (I.D. 4,6 mm, délka 25 cm, velikost zrn stacionární fáze 5 μ m). Parametry stacionární fáze: 15 % uhlíku, charakteristika zrn -silikagel vysoce čistý, sférický, fáze - oktadecylsilan, pokrytí povrchu 4 μ m / m^2 , obsah kovů je pod 5 ppm, povrchová plocha 450 m^2 / g, velikost pór 100 Å, operační rozsah pH 2 - 8, teplotní rozsah ≤ 70 °C. Kolony byly umístěny v kolonovém termostatu s chlazením (Column oven Waters), který byl během analýzy vyhříván na 25 °C.

4.5 STANOVENÍ EKDYSTEROIDŮ

Ekdysteoidy byly stanovovány ve dvou prvních BuOH frakcích. První a druhá BuOH frakce byla kromě analýzy ekdysteroidů analyzována také na volné konjugáty sterylglukosidů. Proto byla provedena eluce MeOH, ale také byl tomu uzpůsoben monitoring UV vlnových délek. Pro sledování sterylglukosidů byly UV vlnové délky monitorovány při 205 (blíží se maximu), 210 (při této vlnové délce byly tyto látky kvantitativně vyhodnocovány) a 215 nm a pro sledování ekdysteroidů pak současně s předcházejícími vlnovými délkami byly UV vlnové délky monitorovány při 235, 245 (blíží se maximu; při této vlnové délce byly ekdysteoidy kvantitativně vyhodnocovány) a 255 nm. Kolona byla termostatem vyhřívána na 25 °C. K analýze pro 1. BuOH frakci byl použit následující gradient: start 90 % eluentu A a 10 % B, do 50. minuty 30 % A, do 70. minuty 0 % A a 100 % B, pak izokratické podmínky (100 % B) do 130 minuty. Sterylglukosidy nejsou součástí této diplomové práce, proto nebyly vyhodnocovány.

Od 130 do 132 návrat na původní podmínky a následovně do 150 minuty se ustalovala kolona na původních podmínkách. K analýze pro 2. BuOH frakci byl použit následující gradient: start 90 % eluentu A a 10 % B, do 50. minuty 30 % A, do 70. minuty 0 % A a 100 % B, pak izokratické podmínky (100 % B) do 100 minuty. Od 100 do 102 návrat na původní podmínky a následovně do 120 minuty se ustalovala kolona na původních podmínkách. Frakce byly napichovány o objemu 5 µl (o koncentraci 1 mg izolované frakce byl rozpuštěn v 1 ml MeOH).

Uvedené výsledky jsou získané z 1. BuOH frakce, protože v 2. BuOH frakci byla zjištěna pouze stopová množství. Analýza 1. BuOH frakce byla delší, protože v ní mohly být ještě obsaženy nepolární látky.

Pro vyhodnocení 20-hydroxyekdysonu byla již dříve provedená stanovení na 2. (SEPARON C 18) a 3. odlišné koloně. Toto bylo prováděno z důvodu ověření, že se vzorek dělí, a že stanovujeme právě 20-hydroxyekdyson.

Foto 4: HPLC Waters

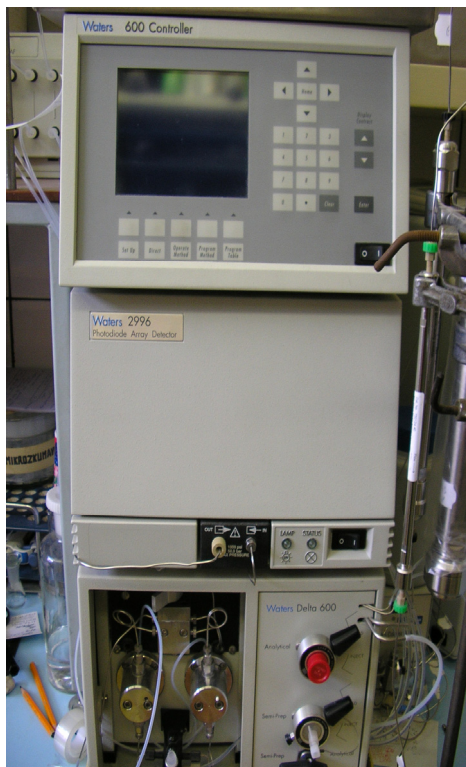


Foto 5: HPLC kolona Supelco - Ascentis C8 s předkolonkou



5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 VÝNOS ČERSTVÉ BIOMASY A SUŠINY

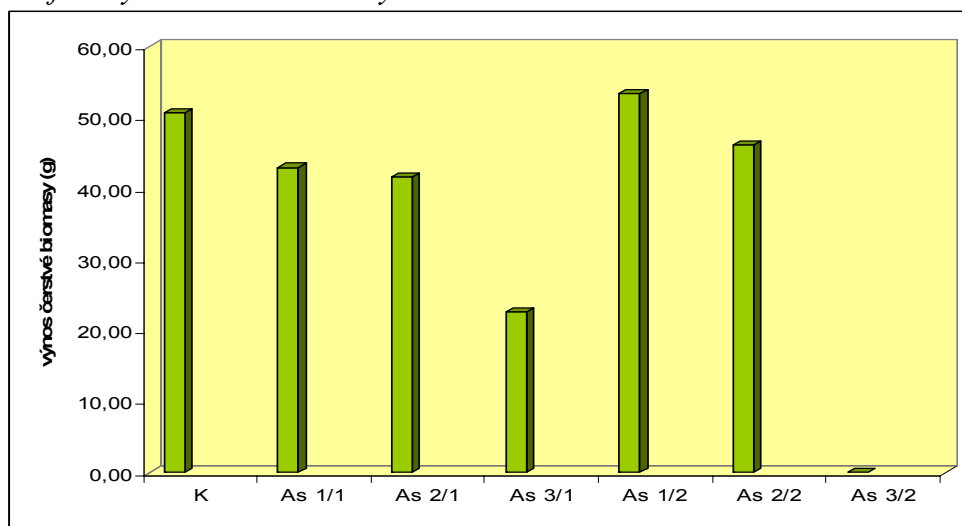
K pokusu bylo použito šest vzorků špenátu. Kontrola, vzorek As 1/1, As 2/1 a As 3/1 byly sklizeny v plné zralosti 28.5.2007. Vzorky As 1/2, As 2/2 a As 3/2 byly sklizeny 11.6.2007, tedy v době kvetení. V tomto vegetačním období dochází u rostlin k omezenému příjmu látek z půdy. Výnos vzorku As 3/2 vlivem toxického působení arzenu v půdě byl natolik malý, že ho nebylo možné použít pro stanovení čerstvé biomasy ani pro extrakce.

Fytotoxická dávka arzenu je již 3-10 mg/kg (Száková a kol., 2007). Z grafu 1 je patrné, že množství biomasy s rostoucím množstvím arzenu klesá. Toto zjištění odpovídá výsledkům v již dříve publikované literatuře (Paivoke, Simola, 2001). Obsah sušiny se také s rostoucím množstvím arzenu snižuje (*Tab. 1*). Tento fakt neplatí u vzorků z druhého odběru. Zde dochází naopak k mírnému nárůstu množství sušiny, avšak tato množství jsou stále nižší oproti kontrole. Zvýšené množství sušiny je zde zapříčiněno pozdějším sběrem. Rostlina ve fázi kvetení má nižší podíl listové plochy a více žilnatiny. Každá rostlina přijímá arzen jinak. Symptomy toxicity u rajčat byly sledovány až po přidání více než 25 mg/kg (Száková a kol., 2007). Podobně je tomu i u paprik, které také patří do skupiny rostlin, v kterých nedochází k transportu arzenu do nadzemní biomasy vlivem rostoucí koncentrace arzenu v půdě. Tyto rostliny si tvoří obranné mechanismy, které akumulují arzen v kořenech a blokují jeho translokaci v rostlině (Száková a kol., 2007). Naopak stimulace růstových parametrů u rajčat byla pozorována u rostlin, které byly pěstovány na půdě s koncentrací arzenu 15 mg/kg (Miteva, 2002).

Tab. 1: Výnos sušiny a hmotnost navážky

	vzorek	sušina (g)	navážka na extrakci (g)
1. odběr	K	7,79	10,20
	As 1/1	6,96	13,10
	As 2/1	6,54	11,50
	As 3/1	3,21	10,30
2. odběr	As 1/2	6,72	10,30
	As 2/2	6,81	10,00
	As 3/2	X	X

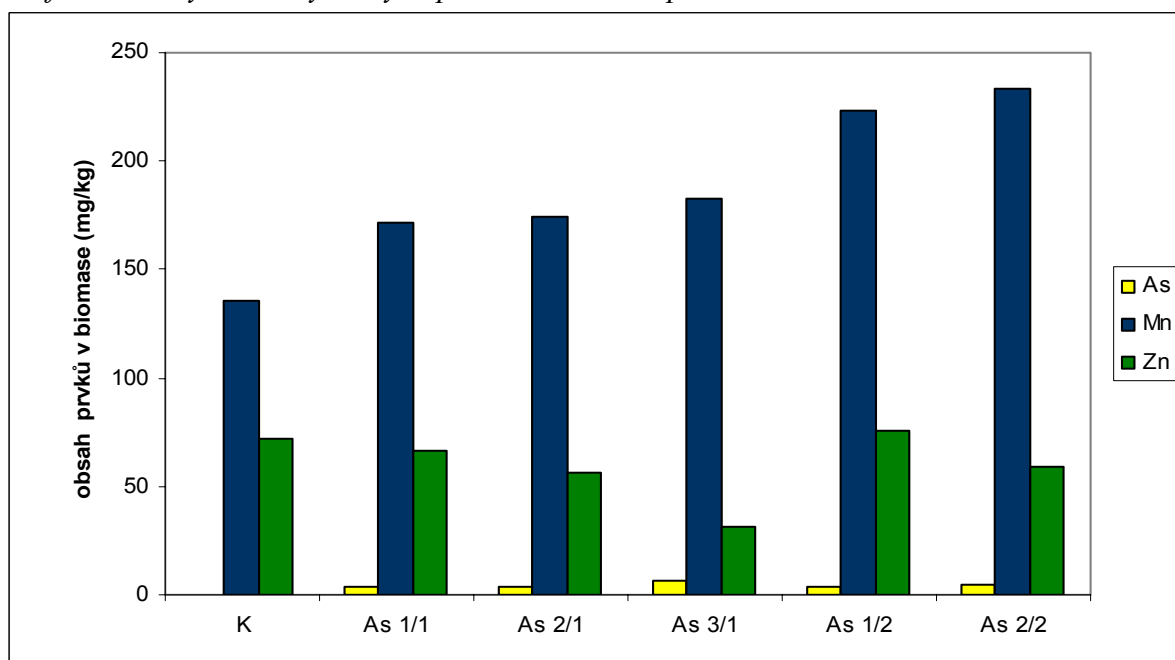
Graf 1: Výnos čerstvé biomasy na nádobu



5.2 CELKOVÝ OBSAH PRVKŮ V BIOMASE ŠPENÁTU

Ačkoli je arzen základní složkou mnoha rostlin, ví se málo o jeho biochemické funkci v rostlině (Kabata a kol., 2007). V pokusných vzorcích bylo sledováno celkové množství arzenu, manganu a zinku (Graf 2). Malé množství arzenu je obsaženo v téměř každé půdě, proto obsah arzenu u kontroly není nulový. Celková koncentrace arzenu v listech a kořenech markantně vzroste po přidání sloučenin arzenu do půdy (Tlustoš a kol., 2004). S postupným zvyšováním dávek arzenu do půdy dochází k zvyšování obsahu arzenu i v biomase špenátu u našeho pokusu. Stejně je tomu i u manganu. Množství zinku naopak klesá.

Graf 2: Celkový obsah vybraných prvků v biomase špenátu



5.3 OBSAH ARZENU A NĚKTERÝCH PRVKŮ V BuOH FRAKCI

Obsah arzenů získaných v BuOH frakci se nejprve zvýšil vzhledem ke kontrole a postupně pak dochází k jeho snižování (Tab. 2). Znamená to, že ve vzorku, který rostl na nejvíce kontaminované půdě, jsme získali nejmenší obsah arzenů v BuOH frakci. Většina slaběji vázaných forem arzenů se uvolnila již v předchozích frakcích. Například v petroetherové frakci dochází naopak k zvyšování množství arzenů v závislosti na zvyšující se kontaminaci půdy. Během BuOH extrakce není uvolněna část arzenů pevně vázaná. Počáteční nárůst množství arzenů oproti kontrole může být způsoben reakcí rostliny po zvýšení kontaminace v půdě. V BuOH frakci klesá množství arzenů, protože se tvořily látky, které souvisí s rezistencí stresového metabolismu a neobsahovaly přímo arzen.

Tab. 2: Obsah prvků přepočtený na 1 mg frakce

vzorek	Obsah prvků na 1 mg frakce (mg)			
	As	Ca	Mg	P
K	0,131	0,858	0,386	0,108
As 1/1	0,175	1,611	0,336	0,071
As 2/1	0,152	1,310	0,359	0,079
As 3/1	0,025	0,840	0,720	0,083
As 1/2	0,137	0,595	0,428	0,088
As 2/2	0,172	1,335	0,640	0,097

Tab. 3: Hmotnost BuOH frakce

vzorek	hmotnost frakce (mg)	hmotnost frakce na 1 g sušiny (mg)
K	66,30	8,50
As 1/1	106,60	15,32
As 2/1	119,50	18,27
As 3/1	133,90	41,71
As 1/2	153,20	22,80
As 2/2	116,00	17,03

5.4 ZÁVISLOST OBSAHU NĚKTERÝCH PRVKŮ NA OBSAHU ARZENU VE VZORKU

Vlivem měnícího se množství celkového arzenu ve vzorku dochází také ke změnám u ostatních prvků obsažených v rostlině. Deficit nějakého esenciálního prvku může vyvolat v rostlině příjem dalších mikronutrientů. Interakce mezi chemickými prvky mají antagonistický nebo synergický charakter. Ačkoli mnoho interakcí je spjato s fyziologickými procesy v rostlině, některé reakce souvisí s pedochemickými procesy. Mezi hlavní antagonistické reakce v půdě patří Mn - Zn, Mn - As, P - As, P - Mn, P - Zn, Mg - Mn, Mg - Zn. Interakce mezi prvky v půdě mají složitý charakter, ale hlavní roli zde hrají sorpční schopnost půdních částic, povrch kořenových buněk a kořenové exudáty (Kabata a kol., 2007).

Z grafu 3 je vidět, že čím nižší je množství arzenu v BuOH frakci, tím větší množství hořčíku se z této frakce uvolní. Znamená to, že silně kontaminovaná půda arzenem snižuje příjem hořčíku rostlinou.

K tomu, aby rostlina dobře snášela vyšší dávky arzenu, potřebuje i vyšší dávky fosforu (Graf 4). Reakce arzenu s enzymy a blokováním toku fosforu v rostlinném systému způsobuje poruchy v energetickém toku v buňkách. Inhibice kořenového růstu a následná smrt je způsobena stresem vyvolaným arzenem (Kabata a kol., 2007). Roztoky fosforu efektivně ovlivňují extrakci specificky vázaného arzenu z povrchu minerálů. Fosfáty v půdě jsou schopny uvolňovat As V z adsorpčního místa díky malé velikosti a vysokému náboji. Přidání arzenu do půdy vede ke zvýšení koncentrace arzenu v rostlině v porovnání s kontrolou v pořadí DMA \square As V \square As III (Tlustoš a kol., 2004). Koncentrace fosforu ovlivňuje příjem a transformaci jednotlivých forem arzenu. PV a AsV jsou přijímány stejným transportním systémem přes plazmatickou membránu. Rostoucí koncentrace fosforu zvyšuje procento arzenu v kořenech a výhoncích. Také se ukazuje, že koncentrace fosforu může podporovat translokaci arzenu z kořenů do výhonků (Száková a kol., 2007).

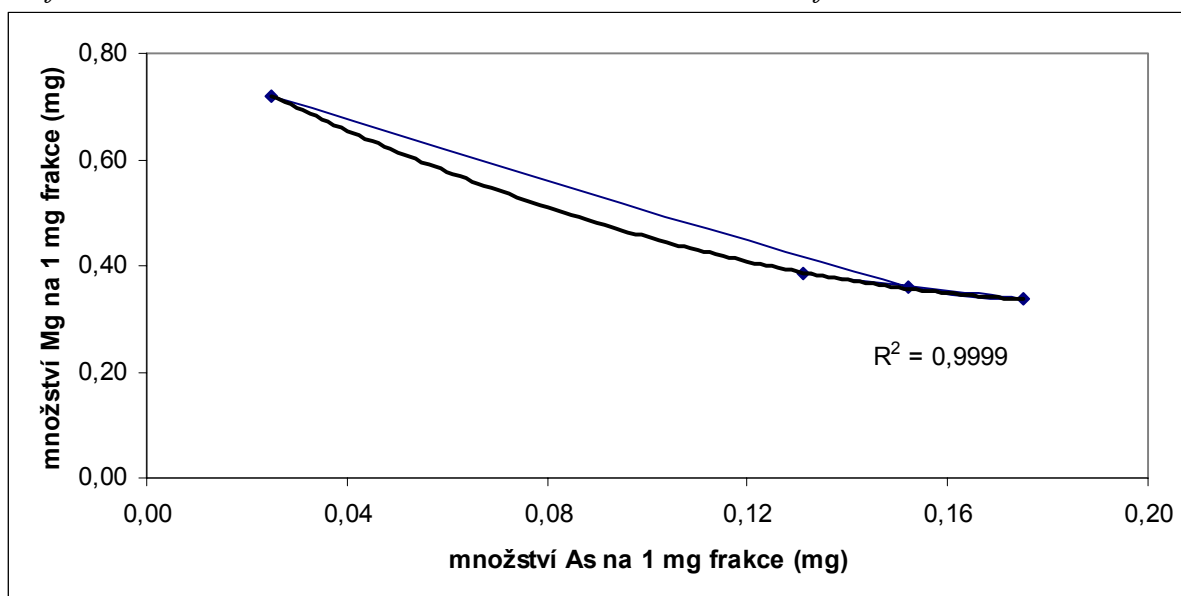
Většina studií na interakce As-P byla provedena na uměle kontaminovaných půdách. Předpokládá se, že významně odlišná bude koncentrace nestabilního As a P v půdách, které postupně přijímaly As během dlouhé doby skrze antropogenní procesy. Bylo dokázáno, že As se rychle v půdě mění na nepřístupný, což vede ke snížené toxicitě (Soudek a kol., 2006).

Stejná závislost nám vyšla i u manganu. Opět se zvyšoval obsah manganu s rostoucím celkovým množstvím arzenu v biomase špenátu (Graf 5). Obsah manganu se mění během

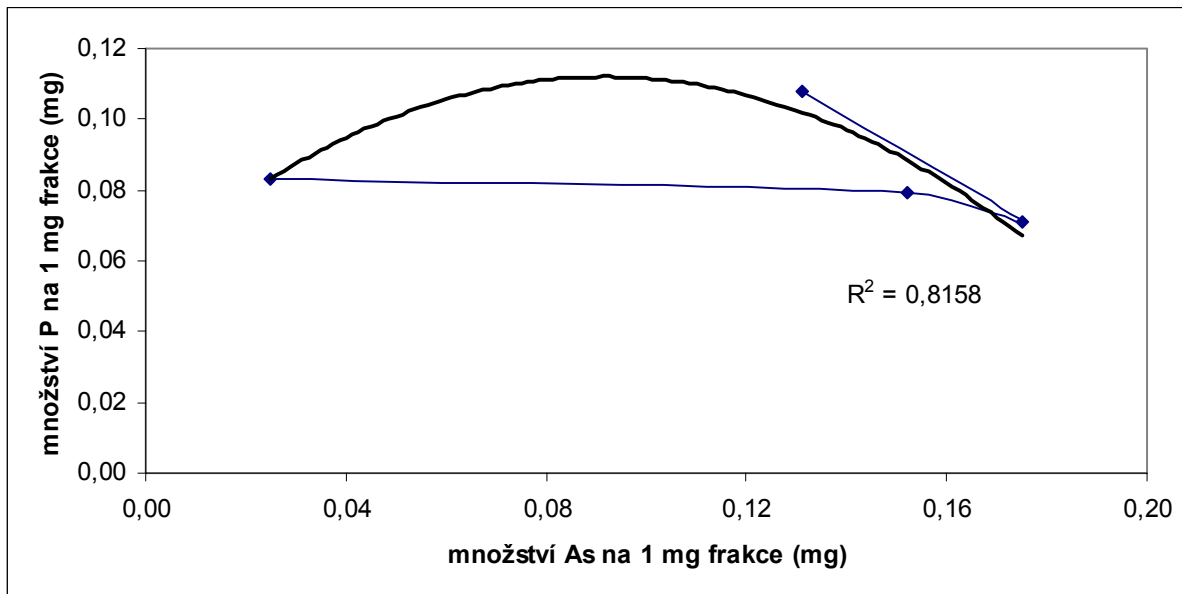
vegetativního období a jeho koncentrace se zvyšuje v starších částech rostliny (Kabata a kol., 2007). To se potvrdilo i v našem pokusu (*Graf 2*).

Obecně se ze zjištěných výsledků dá říci, že čím více arzenu je v půdě, tím více se ho kumuluje v biomase špenátu a rostlina má větší potřebu získávat další prvky jako například, fosfor, mangan, hořčík. Toto neplatí u zinku (*Graf 6*). Z grafu 6 je patrné, že s rostoucím množstvím arzenu klesá obsah zinku v rostlině. Vliv zvýšené koncentrace arzenu na snížení absorpce zinku rostlinami byl již dříve prokázán (Száková a kol., 2007). Zinek má esenciální metabolickou roli v rostlině a stimuluje rezistenci rostlin proti suchu, vysokým teplotám a některým houbovým onemocněním. Toxické množství zinku pro rostlinu je 300 - 400 mg/kg (Kabata a kol., 2007).

Graf 3: Závislost množství hořčíku na množství arzenu v BuOH frakci

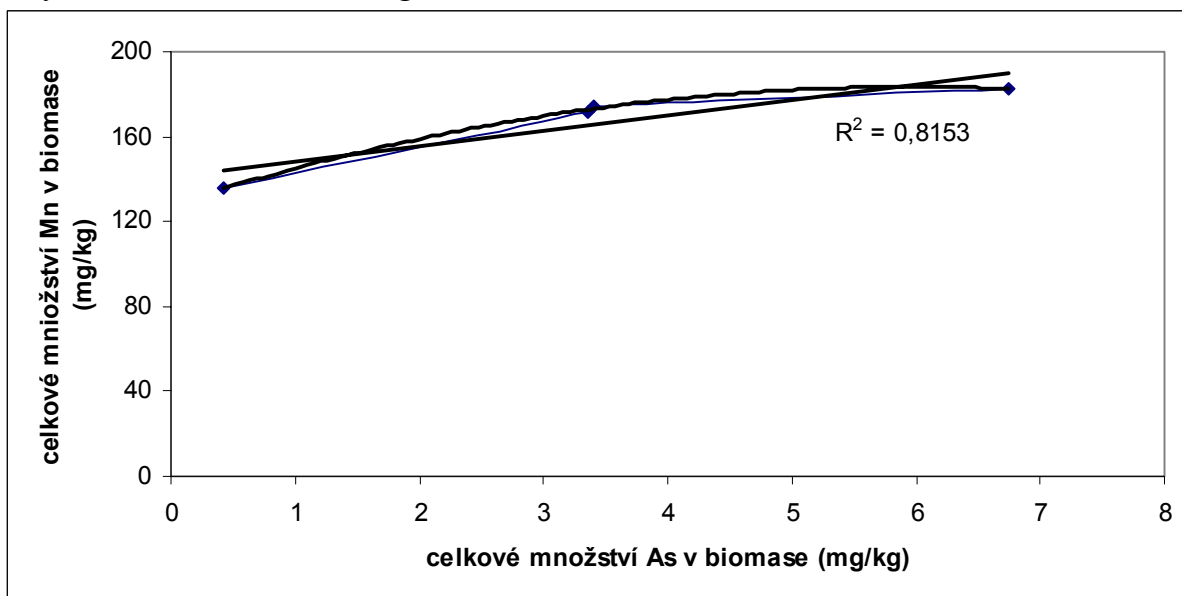


Graf 4: Závislost množství fosforu na množství arzenu v BuOH frakci

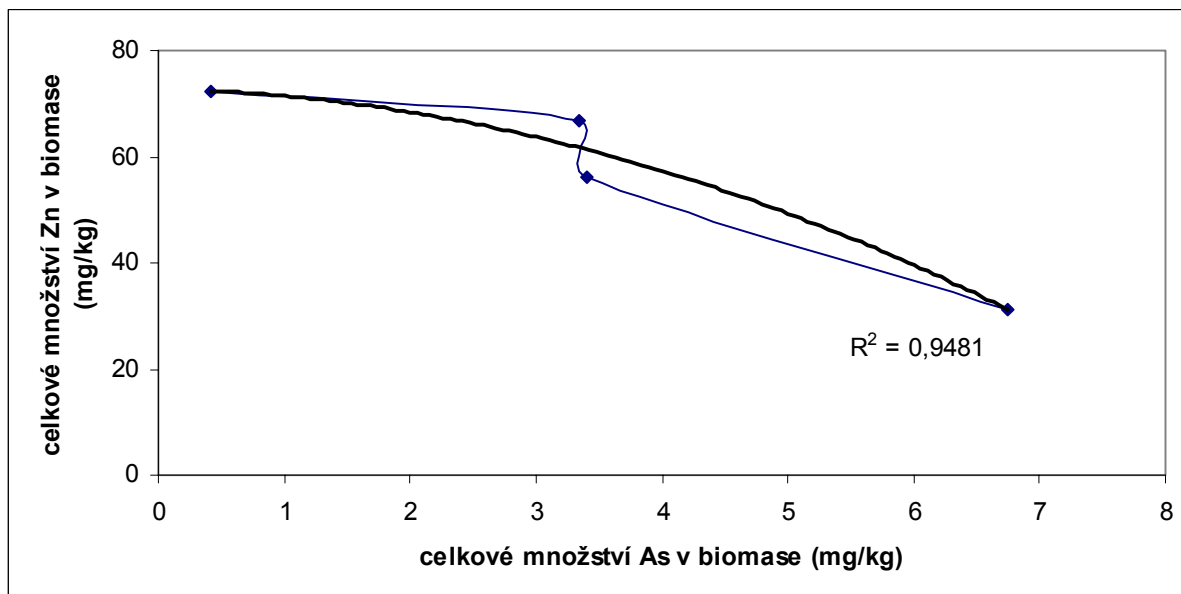


Grafy 3,4,5 a 6 znázorňují pomocí polynomu 2. stupně závislost některých prvků na množství arzenu. Koefficient determinace R^2 vyšel u všech prvků vysoký, což značí vysokou závislost.

Graf 5: Závislost množství manganu na množství arzenu



Graf 6: Závislost množství zinku na množství arzenu



5.5 OBSAH 20-HYDROXYEKDYSONU

Množství 20-hydroxyekdysonu ve frakci klesá oproti kontrole, ale naopak narůstá v čerstvé biomase a v sušině (Tab. 4). Změna koncentrace ekdysteroidů je reakcí na abiotický stres způsobený zvýšeným množstvím arzenu. Ve vzorku As 1/2 z pozdějšího odběru se markantně zvyšuje obsah 20-hydroxyekdysonu oproti kontrole. Tento jev souvisí s nárůstem ekdysteroidů v době kvetení spolu s dalšími specifickými látkami například prolinem. U vzorku As 2/2 rostlina upřednostnila tvorbu jiných látek než ekdysteroidů. Tyto látky mají přímou korelaci s fertilitou pylu (např. glykoproteiny s vysokým obsahem prolinu) (Wu a kol., 2001).

Tab.4: Obsah 20-hydroxyekdysonu

vzorek	obsah 20E (µg)		
	v 1 mg frakce	v 1 g čerstvé biomasy	v 1 g sušiny
K	11,80	67,40	502,60
As 1/1	8,90	103,60	666,10
As 2/1	10,00	101,30	646,80
As 3/1	6,80	87,80	619,50
As 1/2	16,30	168,40	1156,60
As 2/2	8,25	61,25	415,45

Aby se tvořil prolin a zabudoval se do glykoproteidů, tak se musí snížit jeho množství a přestává být aktivní alosterická inhibice a pak dochází k tvorbě prolinu z glutamové kyseliny (Pavlíková a kol., 2007).

Zvýšení 20-hydroxyekdysonu v rostlině není vyšší než obvyklý obsah 20-hydroxyekdysonu v rostlině obsahující více ekdysteroidů (*Leuzea carthamoides*) (Pavlík a kol., 2004).

Další možnou hypotézou je, že 20-hydroxyekdyson nemá primárně obrannou funkci proti napadení hmyzem. Množství 20-hydroxyekdysonu se mění během ontogenetického vývoje rostliny (ústní sdělení – Pavlík, 2009).

Ve špenátu stejně jako v kukuřici nebo pšenici existují ekdysteroid fosfáty, přirozené látky rostlin. Z literatury (Kabata a kol., 2007) víme, že atom fosforu je nahrazován atomem arzenu. Můžeme tedy soudit, že část 20-hydroxyekdysonu se přeměnila na konjugát s arzenem. Ten jsme nemohli detekovat, protože ho dosud nikdo neizoloval a nemáme jeho standard. Je pravděpodobné, že konjugáty by mohly být v extraktech, ale pro potvrzení by to znamenalo tyto látky izolovat, což je nad rámec této diplomové práce. Je nutné získat minimálně 5 mg čisté látky, aby bylo možné provést analýzy pomocí IR spekter, MS spekter, C-NMR a H-NMR spekter. Po provedení těchto analýz je možné určit strukturu, že jde o konjugát arzenu z 20-hydroxyekdysonu. Izolace takového množství by trvala v důsledku stopového množství ve špenátu více jak jeden rok (vypěstování velkého množství biomasy, extrakce této biomasy, jejich vytřepání, zchromatografování frakcí pomocí HPLC). Všechny frakce by musely být monitorovány pomocí IR spekter při vlnové délce 1652 nm.

6. ZÁVĚR

Práce sledovala působení stupňované a toxické dávky arzenu během vegetace na stresový metabolismus rostlin špenátu. Vlivem zvýšeného množství arzenu v půdě docházelo k snížení výnosu čerstvé biomasy a sušiny. Toto zjištění neplatí u vzorků z druhého odběru, které byly v době sklizně v jiném vegetačním období než vzorky z prvního odběru. V období kvetení má rostlina větší podíl žilnatiny než listové plochy. Zároveň s rostoucím množstvím arzenu v půdě rostl obsah arzenu v rostlině.

U vzorků docházelo k nárůstu manganu a poklesu zinku v biomase. Stejný jev byl pozorován při pokusech na *Pisum sativum* (Paivoke, Simola, 2001). U vzorků z prvního odběru se s rostoucím množstvím arzenu v biomase zvyšoval i obsah fosforu, který rostlina potřebuje k tomu, aby se vyrovnala s toxickým působením arzenu. Snižující se obsah arzenu dobře koreluje s klesajícím obsahem vápníku v BuOH frakci. Z polynomů 2. stupně vyplývá vysoká závislost hořčiku, fosforu, manganu a zinku na množství arzenu. Jedná se o antagonistické vztahy.

Ekdysteroidy u rostlin nemají zatím zcela objasněnou funkci. Předpokládá se, že tvoří obranné mechanismy před mechanickým poškozením rostlin a jako obrana před útoky hmyzu (Sorianoa kol., 2004). Rostliny reagují na abiotický stres změnou koncentrace ekdysteroidů. Laboratorními pokusy se zjistilo, že množství 20-hydroxyekdysonu vzroste vlivem zvýšené koncentrace arzenu v půdě oproti kontrole. V době kvetení dochází ke zvýšené tvorbě ekdysteroidů, avšak u vzorku As 2/2 již rostlina upřednostnila tvorbu jiných látek než ekdysteroidů

Stres způsobený rizikovými prvky vyvolá syntézu mnoha obranných proteinů. Mezi známé obranné mechanismy rostlin proti arzenu patří fytochelatiny (Békésiová a kol., 2008).

7. SEZNAM LITERATURY

1. Adriano D. C. (2001): Trace elements in Terrestrial Environments Biochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, Springer, 867 str.
2. Bathori M., Pongracz Z. (2005): Phytoecdysteroids - from Isolation to their Effects on Humans. **Current Medicinal Chemistry**, 12(2), 153-172.
3. Békésiová B., Hraška Š., Libantová J. a kol. (2008): Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. **Molecular Biology Reports**, 35(4), 579-588.
4. Bencko, V., Cikrt M., Lener J. (1995): Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Praha, Grada Publishing, 282 str.
5. Bissen M., Frimmel F.H. (2003): Arsenic - a Review. - Part 1: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility, **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, 31(1), 9-18.
6. DeMarco M.J., SenGupta A.K., Greenleaf J.E. (2003): Arsenic Removal Using Polymeric/Inorganic Hybrid Sorbent. **Water Research**, 37(1), 164-176.
7. Dembitsky M. V., Levitsky O. D. (2004): Arsenolipids. **Progress in Lipid Research**, 43(5), 403-448.
8. Dinan, L. (1994): Phytoecdysteroids in *Kochia scoparia* (Burning Bush). **Journal of Chromatography A**, 658(1), 69-76.
9. Dinan, L., Savchenko T., Whiting P. (2001): On the Distribution of Phytoecdysteroids in Plants. **Cellular and Molecular Life Science**, 58(8), 1121-1132.
10. Duker A.A, Carranza E.J.M., Hale M. (2005): Arsenic Geochemistry and Health. **Environment International**. 31(5), 631-641.
11. Eisler, R. (2007): Eisler's encyklopedia of environmentally hazardous priority chemicals. Elsevier, Amsterdam, vyd. 1, 501 str.
12. Grebenok R.J., Adler J.A. (1991): Ecdysteroid distribution during development of spinach. **Phytochemistry**, 30(9), 2905-2910.
13. Grebenok R.J., Adler J.A. (1993): Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. **Phytochemistry**, 33(2), 34-347.
14. Grebenok J.R. Venkatachari S., Adler J.H. (1994): Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. **Phytochemistry**, 36(6), 1399-1408.
15. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. (2007): Trace elements from soil to human. Springer, Berlin Heidelberg, vyd.1, 550 str.

16. Kafka Z, Punčochářová J. (2002): Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. **Chemické listy**, 96(7), 611-617.
17. Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. (2008): Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments. **Waste Management**, 28(1), 215-225.
18. LeDuc D.L., Terry N. (2005): Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 32(11-12), 514-520.
19. Mandal B.K., Suzuki K.T. (2002): Arsenic round the world: a review. **Talanta**, 58(1), 201-235.
20. Matschullat J. (2000): Arsenic in the geosphere. **Science of the Total Environment**, 249(1-3), 297-312.
21. Miholová, D., Mader, P., Száková, J., Slámová, A., Svatoš, Z. (1993): Czechoslovak biological certified reference materials and their use in the analytical quality assurance system in a trace element laboratory. **Fresenius Journal of Analytic Chemistry**, 345(2-4), 256-260.
22. Miteva E. (2002): Accumulation and effect of arsenic on tomatoes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 33(11-12), 1917-1926.
23. Modlin R.F., Alred P.A., Tjerneld F. (1994): Utilization of temperature-induced phase separation for the purification of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from spinach. **Journal of Chromatography A**, 668(1), 229-236.
24. Naidu R., Smith E., Owens G., Bhattacharya P., Nadebaum P. (2006): Managing arsenic in the environment, CSIRO, Collingwood, 654 str.
25. Padmavathiamma P.K., Li L.Y. (2007): Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. **Water Air and Soil Pollution**, 184(1-4), 105-126.
26. Paivoke E.A., Simola L.K. (2001): Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: Mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49(2), 111-121.
27. 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(3), 199-223.

28. Pavlík M., Pavlíková D., Száková J., Vašíčková S., Tlustoš P. (2004): Binding forms of risk elements in root fractions of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 54(2-3), 239-243.
29. Pavlíková D., Pavlík M., Staszková L., Tlustoš P., Száková J., Balík J.(2007): The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase. **Plant Soil and Environment**, 53(5), 201-206.
30. Pavlíková D., Pavlík M., Matějů L., Balík J. (2007): Ekotoxikologie. Praha, Česká zemědělská univerzita, fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra agrochemie a výživy rostlin, vyd. 1, 152 str.
31. Pertold Z. (1998): Arzen v životním prostředí, přírodní i jiné zdroje arzenu a způsoby, jak jej zneškodnit. **Vesmír**, 77(6), 323-326.
32. Saha J.C., Dikshit A.K., Bandyopadhyay M., et al. (1999): A review of arsenic poisoning and its effects on human health. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 29(3), 281-313.
33. Skřivan P. (1996): Koloběh arzenu v přírodním prostředí. **Vesmír**, 75(5), 247- 249
34. Schmelz E.A., Grebenok R.J., Ohnmeiss T.E., Bowers W.S. (2000): Phytoecdysteroid turnover in spinach: Long-term stability supports a plant defense hypothesis. **Journal of Chemical Ecology**, 26(12), 2883-2896.
35. Smedley P.L., Kinniburgh D.G. (2002): A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Applied Geochemistry**, 17(5), 517-568.
36. Sneller, F.E.C., van Heerwaarden L.M., Kraaijeveld-Smith F.J.L., Ten Bookum W.M., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C. (1999): Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. **New Phytologist**, 144(2), 223-232.
37. Soriano IR, Riley I.T., Potter M.J., Bowers W.S. (2004): Phytoecdysteroids: a novel defense against plant – parasiti nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, 30(10), 1885-9.
38. Soudek, P. Vichová L., Valenová S., Podlipná R., Malá J., Vaněk T. (2006): Arzen a jeho příjem rostlinami. **Chemické listy**, 100(5), 323-329.
39. Száková J., Mihaljevic M., Tlustos P. (2007): Mobility, transformation, and essential methods of determination of arsenic compounds in soil and plants. **Chemické listy**, 101(5), 397-405.

40. Száková J., Tlustoš P., Goessler W., Pavlíková D., Schmeisser E. (2007): Response of Proper Plants (*Capsicum annum L.*) on Soil Amendment by Inorganic and Organic Compounds of Arsenic. **Archives of Environmental Contamination and Ecotoxicology**, 52(1), 38-46.
41. Tlustoš P., Goessler W., Száková J., Balík J. (2004): Arsenic compounds in leaves and roots of radish grown in soil treated by arsenite, arsenate and dimethylarsenic acid. **Plant Soil and Environment**, 50(12), 540-546.
42. Trebichovský J., Šavrdová D., Blohberger M. (1997): Toxické kovy. Praha, Repro Fetterle s.r.o., 483 str.
43. Tripathi D.R., 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(4), 158-165.
44. Uneyama C., Toda M., Yamamoto M., Morikawa K. (2007): Arsenic in various foods: Cumulative data. **Food Additives & Contaminants**, 24(5), 447-534.
45. Wu H, de Graf B., Mariani C., Cheung Y.A. (2001): Hydroxyproline-rich glycoproteins in plant. **Cellular and Molecular Life Science**, 58(1), 1418-1429.
46. Yokel R.A., Lasley S.M., Dorman D.C. (2006): The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 9(1), 63-85.
47. Zenk M.H. (1996): Heavy metal detoxification in higher plants. **Gene**, 179(1), 21-30.
48. Směrnice 2003/2/ES o omezení uvádění na trh a používání arzenu, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0002:CS:HTML>, 17.12.2008.