

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Vliv kontaminace půdy arsenem na stresový metabolismus rostlin

Diplomová práce

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

Autorka práce: Vendula Krejčová

2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci na téma: Vliv kontaminace půdy arsenem na stresový metabolismus rostlin, vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne

.....
Vendula Krejčová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především Doc. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc., která byla vedoucí mojí diplomové práce, za odborné vedení, pomoc a připomínky při zpracování diplomové práce a zároveň bych chtěla poděkovat Ing. Milanu Pavlíkovi, CSc., z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, který byl mým konzultantem.

AUTORSKÝ REFERÁT

Ve své diplomové práci na téma „Vliv kontaminace půdy arsenem na stresový metabolismus rostlin“ jsem se zabývala vlivem obsahu arsenu v rostlině špenátu setého na množství rostlinných metabolitů (sterolů).

Arsen se řadí mezi rizikové prvky, což je skupina prvků kontaminující životní prostředí. Vyskytuje se v půdě, ovzduší i ve vodě. Ve vysokých koncentracích působí negativně na rostliny, živočichy a člověka. Zdrojem kontaminace arsenu jsou především přípravky obsahující arsen používané v zemědělství, těžba rud nebo spalování uhlí.

Pokusnou rostlinou v následujícím pokusu byl špenát setý (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador). Rostliny špenátu setého jsme zvolili proto, že špenát kumuluje rizikové prvky v nadzemních částech. Pokus byl založen na černozemi ze stanoviště Praha – Suchdol. Do půdy bylo přidáno hnojivo NPK. Do 5 kg půdy bylo 0,5 g N (ve formě NH_4NO_3), 0,16 g P a 0,4 g K (ve formě K_2HPO_4). Arsen byl přidán ve formě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Jedna z variant byla kontrolní, bez přídavku arsenu. Do dalších tří variant bylo přidáno 25, 50, 75 mg $\text{As} \cdot \text{kg}^{-1}$ zeminy.

Po sklizni špenátu byla provedena selektivní extrakce jeho nadzemní biomasy, zaměřená na stanovení obsahu arsenu v jednotlivých frakcích a na stanovení rostlinných metabolitů (sterolů). Při extrakci byla použita tato rozpouštědla : petrolether, butanol, methanol voda, voda při 25-30°C, voda při 90-95°C, methanol + voda + kyselina chlorovodíková.

Výsledkem těchto extrakcí byl obsah arsenu v jednotlivých frakcích. Stanovení arsenu bylo provedeno pomocí přístroje ICP (optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou). Zjištěné hodnoty ukazují celkový obsah arsenu v jednotlivých variantách a schopnost špenátu akumulovat arsen ve své biomase. Nejvyšší hodnoty arsenu v rostlině byly zjištěny u varianty As3 (6,745 mg.kg⁻¹), kde byl přídavek arsenu do půdy nejvyšší 75 mg.kg⁻¹. Výsledky potvrzují, že se vzrůstajícím množstvím arsenu v půdě roste i množství arsenu v rostlině. Ale zároveň dochází ke snižování výnosu čerstvé hmoty i výnosu sušiny špenátu.

Pro stanovení rostlinných sterolů byla významná petroletherová frakce. V této frakci byly sledovány hodnoty sitosterolu a kampesterolu, stanoveny pomocí přístroje HPLC. Z výsledků je patrné, že arsen množství rostlinných sterolů významně ovlivňuje. Došlo k jejich úbytku, a tím narušení metabolismu rostliny, konkrétně ke zvýšení propustnosti rostlinných membrán.

Klíčová slova: arsen, půda, steroly, extrakce, špenát setý

ABSTRACT

The thesis “The effects of arsenic soil contamination on the stress metabolism of plants” is focused on the effect of arsenic effect on a spinach plant and the content of plant metabolites (sterols).

Arsenic is categorized as a risk element, belonging to a group of elements contaminating the environment. They are found in the soil, the air and water and can have negative effects on plants, animals and humans the high concentrations of these elements. The main source of As contamination are products used in agriculture, the mining of ores and coal burning.

The spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) was used as model plant for this experiment as this plant cumulates risk elements in the above-ground parts. The experiment was carried out in chernozem soil at the Prague – Suchdol base. The soil NPK fertilizer was mixed with – 0.5 g of nitrogen (in the form of NH_4NO_3), 0.16 g of phosphorus and 0.4 g of potassium (in the form of K_2HPO_4) were applied into 5 kg of soil. Arsenic was applied in the form of $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. In rate 25, 50 and 75 mg of $\text{As} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil.

A sequential extraction of the above-ground biomass using after the spinach harvest was focused on determination of arsenic concentration in the individual fractions and analysis of plant substances. Petroleum ether, butanol, methanol water, H_2O (25-30°C hot), H_2O (90-95°C hot) and methanol+water+HCl were all the solvents used during the extraction.

Arsenic concentration of the individual fractions was determined. An ICP apparatus (optical emissions spectrophotometry with inductively bound plazma) was used for this analysis. The detected values show the arsenic content in the individual samples and the ability of the spinach plant to accumulate arsenic in its biomass. The highest vaules of arsenic were found in the As3 (6.745 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) treatment with the highest arsenic rate (75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The results confirm, increase of as content arsenic in the plant. After application of As into soil. Yield of fresh and dry matter decrease in the process.

Petroleum ether fraction was important for analyses of plant sterols. The values of sitosterol and campesterol, using the HPLC apparatus, were monitored in this fraction. The results, confirmed that arsenic significantly influenced the content of plant sterols. Metabolism of the plant had been disrupted, due to the decrease of sterols, specifically content and therefore the permeability of the plant membranes was increased.

Key words: arsenic, soil, sterols, extraction, spinach

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. ARSEN.....	2
2.1 Obecná charakteristika arsenu	2
2.1.1 Periodická soustava prvků	2
2.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti.....	2
2.1.3 Výskyt.....	3
2.1.4 Sloučeniny arsenu.....	3
2.2 Mobilita do životního prostředí	4
2.3 Zdroj kontaminace	5
2.3.1 Arsen v půdě.....	8
2.4 Příjem As rostlinami.....	11
2.5 Stres rostlin.....	13
2.6 Absorpce a přizpůsobení v rostlinách.....	14
2.7 Tolerance rostlin.....	15
2.8 Fytotoxicita.....	16
2.9 Fytochelatiny	17
3. ŠPENÁT SETÝ (<i>SPINACIA OLERACEA</i> L. CV. MATADOR).....	18
3.1 Podmínky pěstování	18
3.2 Špenát a rizikové prvky	19
4. STEROLY	20
4.1 Struktura	21
4.2 Biologická funkce v rostlině.....	22
5. MATERIÁL A METODY	23
5.1 Založení pokusu.....	23
5.2 Izolace frakcí z čerstvého materiálu špenátu setého.....	24
5.3 Metodika stanovení volných sterolů a serylglykosidů v petroletherové (I.) frakci 30	
5.3.1 Příprava vzorku k nástřiku.....	30
5.3.2 Přístrojové vybavení.....	30
5.4 Metodika stanovení sterolů pomocí HPLC	31

6. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
6.1 Výnos čerstvé hmoty a výnos sušiny špenátu	32
6.2 Celkový obsah As v jednotlivých variantách	34
6.3 Obsah As v půdě v jednotlivých variantách	35
6.4 Petroletherová frakce volných sterolů a esterů sterolů s mastnými kyselinami	37
6.4.1 Vyjádření závislosti As na P.....	37
6.4.2 Vyjádření závislosti P na As.....	38
6.4.3 Vyjádření závislosti As na Ca	39
6.4.4 Vyjádření závislost P na Ca.....	40
6.5 Obsah sterolů v jednotlivých frakcích.....	41
7. ZÁVĚR	44
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
9. SEZNAM PŘÍLOH	50

1. Úvod

Zachování zdravého životního prostředí je v současné době jedním z vážných problémů lidstva. Důležitou úlohu přitom sehrává antropogenní činnost, která intenzivně využívá přírodní prostředí. Zejména zemědělství je vystaveno vstupům mnoha látek, které jsou mu cizí. Jedním z negativních projevů antropogenní činnosti je právě zamoření potravního řetězce cizorodými prvky, které se dostávají do půdy a vody a odtud do rostlinných orgánů používaných k výrobě potravin. Rostlinami mohou být tyto prvky rovněž přijímány i přímo z atmosféry (Zrůst et al., 2002).

Životní prostředí mnoha zemí světa je znečištěno, především v důsledku průmyslové výroby, těžby a dopravy. Mezi nebezpečné látky patří organické polutanty, radioaktivní látky a rizikové prvky. Do skupiny rizikových prvků (RP) se řadí zejména arsen, kadmium, chrom, měď, nikl, olovo a zinek. Vzhledem k vysoké stabilitě rizikových prvků v životním prostředí je nutno řešit problém, jak vyčistit takto kontaminovanou půdu (Richtrová et al., 2005).

Termíny stopové kovy, těžké kovy a toxické kovy jsou často navzájem zaměňovány. Používají se pro skupinu kovových prvků, které představují určité riziko pro biotiku. Termín stopové kovy se vztahuje na kovy, které jsou přítomné v organismu nebo v životním prostředí ve velmi nízkých koncentracích odpovídajících jednotkám ppm. Toxické kovy jsou takové kovy, které při zvýšených koncentracích působí škodlivě na všechny organismy v ekosystému včetně člověka. Ekotoxikologická terminologie upřednostňuje v případě kovů nebezpečných pro biotiku termín těžké kovy a do této skupiny zahrnuje především měď, zinek, kadmium, olovo, chrom, nikl, mangan a železo, k nimž navíc přiřazujeme polokovy selen a arsen (Kafka, Punčochářová, 2002).

Znepokojení nad arsenem (As) je pochopitelné a často i oprávněné. Arsenové směsi byly preferovány jako vraždící a sebevražedné činitele již v období středověku kvůli svým jedovatým charakteristickým rysům (Eisler, 2007). Sloučeniny arsenu jsou silně toxické s vysokou kumulativní schopností v organismech. Arsen bývá označován jako protoplazmatický jed, protože může pronikat buněčnými membránami do protoplazmatického prostoru, a hluboce tak postihovat živou hmotu (Kafka, Punčochářová, 2002).

2. Arsen

2.1 Obecná charakteristika arsenu

2.1.1 Periodická soustava prvků

Chemická značka je As, je to toxický polokovový prvek. Toxické vlastnosti sloučenin arsenu byly známy již ve starověku (Internetový zdroj 1). Počátky jeho využití spadají daleko do minulosti. Ve starém Egyptě byl využíván arsen jako aditivum do barev (Kafka, Punčochářová, 2002). Název arsen se odvozuje z řeckého slova "arsenikon", což znamená mocný, silný, účinný. Jeho atomové číslo je 33, atomová hmotnost 74,11, specifická hmotnost $5,727 \text{ g.cm}^{-3}$, patří do Vb skupiny Mendělejevy periodické soustavy (Bencko et al., 1995). Hustota arsenu je $5,73 \text{ g.cm}^{-3}$, jeho teplota tání je 817°C a teplota varu 613°C . Běžně se vyskytují v těchto oxidačních stupních: -III, 0, III, V (Adriano, 2001).

2.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

Bencko et al. (1995) dělí stopové prvky do 4 skupin: 1. esenciální. 2. pravděpodobně esenciální, 3. neesenciální, 4. toxické prvky. Arsen se řadí do čtvrté skupiny, kam spolu s ním patří Cd, Pb, Hg. Prvky z této skupiny mají negativní účinky na organismus již při nízkých koncentracích.

Hlavní vzorec toxicity je $\text{AsH}_3 > \text{As}^{\text{III}} > \text{As}^{\text{V}} > \text{RAs-X}$. Toxicita arsenu závisí na řadě faktorů, včetně chemické formy: anorganické formy arsenu jsou více toxické než organické a arsenitan (As^{III}) je více toxický než arseničnan (As^{V}) (Smith et al., 1998).

Arsen se dále řadí mezi cizorodé prvky, tyto prvky nejsou nepřírozenou součástí rostlinných a živočišných potravin a krmiv. Jsou to látky považované za nebezpečné pro zdraví a život člověka. (Zrůst et al., 2002). Patří ke skupině stopových prvků; to znamená, že jakmile překročí obsah As úroveň stopové koncentrace v prostředí může vést k toxickému účinku. Zvýšená úroveň koncentrace v lidském organismu může způsobit karcinogenní a teratogenní příznaky (Vácha et al., 2008).

Pro mnoho půdních polutantů, regulační kritéria pro remediaci nebo zdraví jsou obvykle založené na účincích na lidské zdraví jako koncový bod, ale jisté polutanty jsou toxické pro

faunu a floru daného území v koncentraci které neovlivňuje živočichy nebo lidské zdraví. Arsenik je dobrý příklad na takovou znečišťující látku (Smith et al., 1998).

2.1.3 Výskyt

Arsen se vyskytuje v pěti modifikacích: šedý, žlutý, černý, rombický a hnědý. Nejběžnější je kovový neboli šedý arsen. Je to ocelově šedý, lesklý a křehký kov, vyznačující se nízkou elektrickou vodivostí. Na vzduchu arsen sublimuje, při zahřívání pod tlakem taje při 817°C. Páry As jsou nažloutlé; jejich prudkým ochlazením se získá žlutý arsen, rozpustný v sirovodíku. Působením světla nebo mírným zahřátím se rychle mění na kovový As. Přechodným produktem je černý arsen, který je sklovitě amorfni a nevede elektrický proud. Zahříváním černého As se rtuť při 150°C vzniká rombický arsen. Redukcí roztoku As_2O_3 v HCl chloridem cínatým vzniká hnědý arsen (Trebichavský et al., 1997).

Jeho průměrný obsah v zemské kůře bývá zhruba 3 mg.kg^{-1} , avšak jeho množství v horninách je různé, v žulách se vyskytuje v množství kolem 2 mg.kg^{-1} , v pískovcích a vápencích je to obvykle 1 mg.kg^{-1} a v břidlicích dosahuje hodnoty kolem 10 mg.kg^{-1} (Pertold, 1998). Arsen se může zapojovat do potravního řetězce a patří mezi inhibitory biochemických reakcí (Internetový zdroj 3).

2.1.4 Sloučeniny arsenu

Sloučeniny arsenu jsou vysoce jedovaté, a to jak akutně, tak chronicky. Některé jsou též prokázány mutageny, karcinogeny a teratogeny. Za netoxický bývá považován kovový arsen, který je však v organismu přeměněn ve své toxické sloučeniny. Sloučeniny trojmocného arsenu jsou všeobecně jedovatější než sloučeniny arsenu pětímocného, neboť mohou lépe vnikat do těla. Mezi nejjedovatější sloučeniny arsenu patří oxid arsenitý As_2O_3 (arsenik, otrušík), chlorid arsenitý AsCl_3 , dále arsenovodík AsH_3 , z organických sloučenin je nejvýznamnější bojový lewisit (Internetový zdroj 4). Arsenik (As_2O_3) je asi nejznámější sloučeninou arsenu vůbec. Jeho smrtelná dávka je 120 mg. AsH_3 (arsenovodík; arsin; nyní arsan) je plyn, který se objevuje jako nečistota v některých technických plynech. K organickým sloučeninám arsenu patří bojová chemická látka Lewisit, směs chlorvinylarsinů. Akutní otrava se projeví gastroenteritidou, zvracením a krvavými průjmy (Prokeš et al., 2005).

2.2 Mobilita do životního prostředí

V běžném okolním životním prostředí se všichni setkáváme s jistou nízkou hladinou expozice arsenem, která ale organismus nijak nepoškozuje a existují naopak studie, které dokazují, že velmi nízké dávky arsenu v přijímané potravě jsou důležité a prospěšné. Bezsporu je však prokázáno, že trvalé vystavení organismu zvýšeným dávkám sloučenin arsenu vede k poškození zdraví (Internetový zdroj 1).

Je známo, že arsen se v různých složkách životního prostředí vyskytuje ve velkém počtu anorganických i organických sloučenin, které se od sebe liší chemickými vlastnostmi, toxikologickými charakteristikami, biopřístupností pro rostliny a chováním v systému půda – rostlina (Száková et al., 2007a).

Adriano (2001) definoval faktory ovlivňující pohyblivost a biologickou dostupnost arsenu:

- Chemické sloučeniny arsenu – Arseničnany (V) a arsenitany (III) jsou primární druhy arsenu v půdách a přírodních vodách. As (III) je nejvíce rozpustný a mobilní stejně tak jako nejvíce toxický.
- pH – Účinek pH na sorpci As (III) se ukázal být závislý na povaze minerálního povrchu. V půdách s nízkým obsahem oxidů, zvýšení pH má malý účinek na množství adsorbovaného As (V), zatímco ve velmi oxidované půdě se adsorpce As (V) snížila se stoupajícím pH.
- Oxidy manganu a železa – Role oxidů Fe, Mn a Al má velký význam pro způsob dopravy As v prostředí. Obecně, koncentrace arsenu jsou mnohem vyšší v usazeninách než ve vodě v kontaminovaných vodních ekosystémech.
- Textura půdy a jílové minerály – Obecně, pohyblivost a dostupnost As je větší v písčitéch půdách než v jílovitých půdách.
- Redukční potenciál – Anaerobní podmínky aktivují soubor chemických a biologických procesů, které mohou měnit fyzikálně-chemické vlastnosti půd a sedimentů pro sorpci arsenu.
- Konkurenční ionty – Konkurenční anionty byly méně efektivní v přesunutí arsenu od půdního komplexu, vzor pro As (V) je $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{H}_2\text{AsO}_4^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-}$ a vzor pro As (III) je $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{H}_3\text{AsO}_3 > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-}$.
- Rostlinný faktor - Odlišná snášenlivost arsenu mezi jednotlivými rostlinnými druhy.

V ekosystémech se mohou rizikové prvky pohybovat specifickými cestami svých biogeochemických cyklů. Z těchto cyklů v různých momentech vystupují a kumulují se velmi často např. v půdách nebo živých organismech. S mobilitou kovů je úzce spjata rozpustnost sloučenin ve vodě – čím je sloučenina rozpustnější, tím je mobilita vyšší. Důležitá je také rozpustnost v kyselinách, zejména v kyselině sírové a dusičné, které jsou často přítomné v životním prostředí. Silně kyselé vodní srážky mohou zvyšovat rozpustnost sloučenin a z půdního roztoku mohou být snadno přijímány rostlinami nebo mohou být vymývány do povrchových vod (Kafka, Punčochářová, 2002).

2.3 Zdroj kontaminace

Arsen se v životním prostředí vyskytuje v ovzduší, půdě i ve vodách. Používáním pesticidů na bázi arsenu je důvodem přítomnosti tohoto polokovu v některých kulturních rostlinách, ale např. i ve vinných nápojích. Arsen se vyskytuje jako doprovodný prvek nejčastěji v rudách mědi, stříbra a olova a při získávání těchto kovů z rud se uvolňuje do životního prostředí (Kafka, Punčochářová, 2002).

Nejdůležitější zdroje kontaminace životního prostředí arsenem:

- Zpracování rud
- Aditiva do skla
- Zemědělství (hnojiva, insekticidy)
- Kouření
- Léčiva pro veterinární medicínu
- Ochranné přípravky na dřevo

(Kafka, Punčochářová, 2002)

Existují také přirozené zdroje arsenu. Jsou to například sulfidické minerály, arseničnany, sopečné plyny a geotermální prameny (Adriano, 2001). Přirozeně je arsen součástí těchto sulfidických minerálů: arsenopyrit (FeAsS), löllingit (FeAs), realgar (As_4S_4) a auripigment (As_2S_3) (Soudek et al., 2006).

V souvislosti s důrazem na kvalitu produkce je nezbytným předpokladem čisté prostředí a rizikovými prvky nezatížená půda. Přitom jen část vstupů je přímo ovlivnitelná zemědělcem. Mezi vstupy, které zemědělec nemůže přímo ovlivnit, patří bezesporu kvalita srážek. V souvislosti s významným omezením emisí z průmyslu v období 90. let minulého století se

zřetelně omezil obsah rizikových prvků ve srážkové vodě. To můžeme vidět v tabulce č. 1. (Balík et al., 2004)

Tab. č. 1 Množství As v atmosférických spadech ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$) v ČR za období 1997 – 2003, (Balík et al., 2004)

Prvek	Množství As ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$) medián zjištěných hodnot			
	1997	1998	2002	2003
As	5,25	4,18	3,58	3,15

Dalším zdrojem se po aplikaci do půdy stávají statková hnojiva, a to jak minerální, tak i organická. Jak je dále zřejmé z tabulky č. 2, mohou být značným zdrojem As, kromě fosforečných hnojiv, také hnojiva dusíkatá a vápenatá. Proto je nezbytná kontrola kvality používaných hnojiv ze strany státu (Balík et al., 2004).

Tab. č. 2 Zdroje As v zemědělství (ppm v sušině) (Kabata-Pendias, Pendias, 2001)

Prvek	Fosforečná hnojiva	Vápenatá hnojiva	Dusíkatá hnojiva	Pesticidy
As	2 - 1200	0,1 - 24	2 – 120	22 – 60

Arsen netvoří těkavé sloučeniny, do ovzduší se dostává prakticky pouze lidskou činností. Z ovzduší se potom buď spadem nebo vymytím deštěm dostává do půdy nebo vody, kde může přetrvávat velice dlouhou dobu, protože má značnou schopnost kumulovat se v sedimentech. Arsen tvoří hlavní složku některých minerálů rozšířených po celém světě. Voda z oblastí velkého výskytu těchto minerálů může obsahovat nadprůměrné koncentrace As. Arsen se nachází také v uhlí. Průměrná koncentrace je $0,5 - 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Jedním z mála přirozených zdrojů arsenu v ovzduší je vulkanická činnost. Atmosférickým spadem se As dostává do vody nebo do půdy (Internetový zdroj 3).

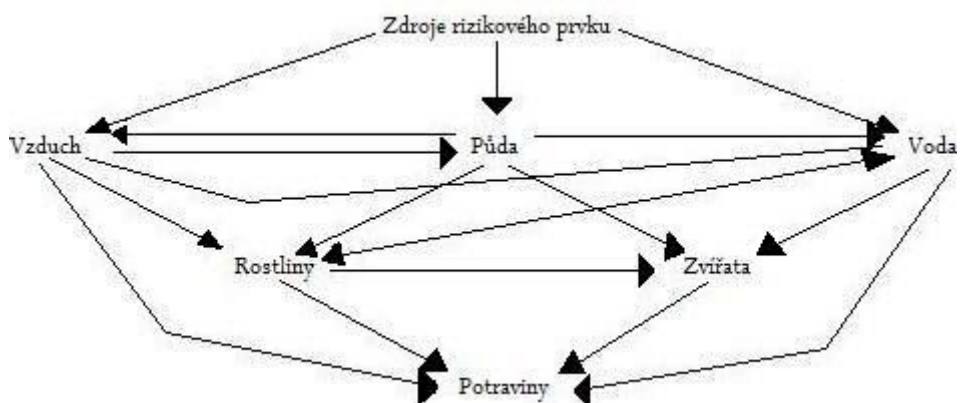
Tab. č. 3 Zdroje arsenu podmíněné lidskou činností (v tisících tun.rok⁻¹) (Petrolid, 1998)

Zdroje arsenu	Atmosféra	Půda	Voda
Metalurgie mědi, niklu	14,3	67,5	28,4
Spalování uhlí	6,2	35,1	-
Chemikálie v zemědělství a lesnictví	3,5	4,6	-
Ocelářství	0,06	5,9	-
Vypalování lesů a pastvin	3,0	-	-
Výroba cementu	2,1	-	-

Průměrný obsah arsenu v živé hmotě rostlin je 0,5 mg.kg⁻¹ (max. obsahy většinou nepřekračují 2 mg.kg⁻¹), v popelu rostlin 5 mg.kg⁻¹ (Trebichavský et al., 1997). Kořínek et al. (2003) uvádí, že fyto toxický obsah arsenu v rostlinné biomase je v rozmezí 3 až 10 mg.kg⁻¹.

Význačná je i ekotoxicita arsenu. Ve vysokých koncentracích je arsen toxický pro rostliny. Na polích ošetřovaných opakovaně pesticidy s obsahem arsenu se arsen zabudovává do půdy a způsobuje snížení úrodnosti kulturních rostlin, jako jsou např. ječmen nebo vojtěška. Na arsen také citlivě reagují stromy (Kafka, Punčochářová, 2002).

Obr. 1: Cesta rizikových prvků od zdrojů do potravin, (Adriano, 2001)



2.3.1 Arsen v půdě

Reakce a transformace arsenu v půdě a jejich závislost na fyzikálně-chemických půdních vlastnostech byla široce zkoumána (Tlustoš, 2004). Mezi faktory, které se nejvíce podílí na výši příjmu prvku z půdy nebo z atmosféry, patří fyzikálně – chemické vlastnosti sledovaných prvků a půdy, druhu, stáří a část rostlin, charakter a intenzita znečištění půdy a atmosféry, klimatické podmínky dané oblasti apod. (Vincenc, 1997). Další roli v příjmu jednotlivých sloučenin arsenu rostlinou, hrají půdní vlastnosti a zdroj kontaminace arsenem. Ukázalo se např., že anorganické sloučeniny arsenu jsou pětkrát toxičtější na písčitéch než na jílovitých půdách (Száková et al., 2007a).

Absorpce arsenu rostlinami z kontaminovaných půd představuje zdravotní riziko, které může ovlivnit použití zemědělské půdy. Metody pro omezení rizika jsou žádány. Navrhované ošetření zahrnuje srážení železitých oxidů v kontaminované půdě, přidavkem síranu železnatého a vápence (Warren et al., 2003).

Obsah As je nejvyšší ve svrchní vrstvě půdy 0 – 20 cm a směrem do hloubky klesá (Zrůst et al., 2002). Vysoké obsahy jsou v sedimentech, zvláště jílových. Nejvíce As mají horniny obsahující sulfidy a uhelnou příměs. Zdrojem zamoření zemědělských půd je především popílek a odsiřovací produkty z kotelen, které byly aplikovány do půdy, nebo se tam dostávají ve formě imisí. Tato situace odráží skutečnost, že největším zdrojem pro vnos As do půd jsou emise (Zrůst et al., 2002).

Jedním z dalších zdrojů arsenu v půdě může být aplikace kalů na zemědělské půdě, které je v současné době dosti populárním tématem. Z toxikologických údajů zabývajících se situací v ČR jsou závazné ukazatele pro hodnocení půd a kalů, které jsou obsaženy ve vyhlášce č. 392/2001 Sb. Ministerstva životního prostředí ČR. Mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových prvků v půdě a kalech vymezují maximální hodnoty koncentrací, po jejichž překročení by mohlo dojít k poškození funkcí půdy a složek životního prostředí, hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce č. 4 a 5 (Kafka, Punčochářová, 2002).

Tab. č. 4 Mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových prvků v půdě v extraktu lučavkou královskou (mg.kg^{-1} sušiny) (Vyhláška MŽP č. 382/2001 Sb.)

Prvky	Běžné půdy	Písky, hlinité písky, štěrkopísky
As	20	15
Cd	0,5	0,4
Cr	90	55
Cu	60	45
Hg	0,3	0,3
Ni	50	45
Pb	60	55
Zn	120	105

Tab. č. 5 Mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových prvků v kalech pro jejich použití na zemědělské půdě (Vyhláška MŽP č. 382/2001 Sb.)

Rizikové prvky	Mezní (maximální) hodnoty koncentrací v kalech (mg.kg^{-1} sušiny)
As	30
Cd	5
Cr	200
Cu	500
Hg	4
Ni	100
Pb	200
Zn	2500

Stabilita rizikových prvků v půdě je na rozdíl od jiných složek prostředí (atmosféra, voda) vysoká, a tak znečištění může mít dlouhodobý nebo dokonce trvalý charakter. Jejich samovolná

degradace je značně limitována dlouhými poločasy rozpadu a jejich obsah může být pozvolna snižován např. vyluhováním, příjmem rostlinami, erozí, výparem (Tlustoš et al., 2003).

Obvykle se nachází v půdě v anorganických formách – arsenitan As (III) a arseničnan As (V); zpravidla v pětimocném stavu, protože forma As (III) oxiduje na formu As (V). Pětimocná forma arsenu se nachází méně toxická. V první řadě ke znečištění půdy arsenem vede atmosférická depozice, záplavy a rozšiřování kolem důlních výsypek (Vácha et al., 2008). Arsen se v půdách vyskytuje hlavně ve formě arsenitanů nebo arseničnanů železa a hliníku, které jsou těžko rozpustné. Arsen je silně vázán na oxidy a hydroxidy Fe a Al, organickou hmotu a jílové minerály. V nepřítomnosti oxidů dochází snadno k biologické redukci (methylaci) a ke vzniku silně toxických alkylových sloučenin As (Trebichavský et al., 1997).

Časté koncentrace ve většině hornin jsou v rozsahu 0,5 až 2,5 ppm, arsen je rozdělený dost rovnoměrně ve významnějších typech hornin. Pouze v jílových sedimentech je průměrná koncentrace vysoko 13 ppm. Arsen je všude přítomný prvek ve svrchní litosféře (Kabata-Pendias, Pendias, 2001). V půdě se arsen přirozeně vyskytuje v koncentraci 0,009 a 1,5 mg.kg⁻¹ a teprve nad koncentrací 1,5 mg.kg⁻¹ bývá půda považována za kontaminovanou arsenem (Soudek et al., 2006).

Pro stanovení obsahu prvků a jejich sloučenin v biologických materiálech a dalších materiálech životního prostředí jsou dnes používány moderní instrumentální analytické metody, jako je atomová spektrometrie ve všech známých modifikacích, metody molekulové spektrofotometrie, elektrochemické metody, hmotnostní spektrometrie, nukleární analytické metody a mnoho dalších. Pro stanovení jednotlivých sloučenin či typů vazeb analyzovaných prvků pak vystupují do popředí metody plynové či kapalinové chromatografie často v kombinaci s některou z výše uvedených metod (Száková, Tlustoš, 2004).

Podle Beneše (1993) jsou stupně obsahu As v půdách klasifikovány takto:

Tab. č. 6 Stupně obsahu As v půdách, (Beneš, 1993)

Hodnoty	Obsah
Do 5 mg.kg ⁻¹	Obsah nízký
5,1 – 20 mg.kg ⁻¹	Obsah střední
Nad 20 mg.kg ⁻¹	Obsah vysoký

Obsah v půdě kolísá od stop k hodnotám 40 mg.kg^{-1} . V nízkých koncentracích se vyskytuje ve vulkanických plynech, pramenité i mořské vodě. V nepatrných koncentracích je proto prakticky vždy přítomen ve všech živočišných a rostlinných pletivech a tekutinách. V přírodě se nejčastěji vyskytuje ve formě sulfidů, z nichž nejčastější je arzenopyrit (Benco et al., 1995).

V půdě se mohou obvyklé koncentrace zvýšit na stovky mg.kg^{-1} po několikátém používání postřiků arsenovými pesticidními preparáty, v okolí hutí zpracovávajících rudy barevných kovů, případně při jejich těžbě (např. Příbramsko, Krompachy) nebo v okolí tepelných elektráren spalujících uhlí s vyšším obsahem arsenu. S jeho vzrůstající koncentrací klesá v půdě obsah dusíku, stoupá titer *Escherichia coli* a klesá klíčivost semen (Benco et al., 1995).

Migraci arsenu ovlivňuje granulometrické složení půd, obsah Fe_2O_3 , pH půdy (s rostoucím pH vzrůstá obsah As) a vlhkost klimatu. Arsen se díky vysokému redukčnímu potenciálu snadno vyluhuje z podorničí. V ČR je koncentrační rozmezí As v půdách $1,8 - 18,4 \text{ g.t}^{-1}$, průměr činí 7 g.t^{-1} . Nejvyšší obsahy v ČR byly pozorovány v hnědých půdách na kyselých vyvěřelinách ($8 - 18 \text{ g.t}^{-1}$), permských jílovcích ($14 - 15,5 \text{ g.t}^{-1}$). Naopak velmi nízké obsahy As (pod 3 g.t^{-1}) vykazují půdy na pararulách, ortorulách, granulitech a svorech. Velmi vysoké koncentrace As byly zjištěny v místech aplikace arsenových pesticidů (až stovky g.t^{-1}), kalů z koželužen nebo ČOV ($50 - 90 \text{ g.t}^{-1}$), v okolí hutí ($400 - 2500 \text{ g.t}^{-1}$), sléváren a uhelných elektráren. Arsen se hromadí v povrchových vrstvách půdy. Hodnota 50 g As.t^{-1} je již pro rostliny toxická a vyvolává druhotný deficit Zn (Trebichavský et al., 1997).

Arsen se hromadí v povrchových vrstvách půdy a může ji časem sterilizovat pro růst některých rostlin, zejména motýlokvětných. Toxicita pro rostliny je modifikována rozpustností použitého preparátu, obsahem železa v půdě, případně použitými druhy průmyslových hnojiv. Na silně kontaminovaných půdách rostliny absorbují větší kvanta arsenu, avšak v množství, které nepředstavuje akutní zdravotní nebezpečí pro člověka (Benco et al., 1995).

2.4 Příjem As rostlinami

Proces příjmu živin je ovlivňován mnoha faktory. Jsou to faktory vnitřní, ovlivněné samotnou rostlinou, a dále faktory vnější, především klimatické, povětrnostní a půdní (Vaněk et al., 2002).

Hlavním zdrojem rizikových prvků pro rostlinu je půda, případně živný roztok. Jedním z nejdůležitějších faktorů určující biologickou dostupnost daného prvku je zabudování v půdních částicích. Rostliny snadno odebírají rizikové prvky, které jsou rozpuštěny v půdním roztoku, kde

se nacházejí v iontových formách nebo ve formě chelátů a komplexů (Kabata-Pendias, Pendias, 2001).

Rostliny akumulující arsen ho mohou uložit v kořenech nebo ho přemístit do nadzemní části. Zdá se, že dvouděložné rostliny přemísťují do nadzemní části více arsenu než jednoděložné rostliny. Rozdílnost v místě uložení arsenu naznačuje rozdílné mechanismy uchování i transportu arsenu v rostlinách (Soudek et al., 2006).

Pohyb rizikových prvků ke kořenům se děje difúzí a hmotovým půdním tokem. V bezprostřední blízkosti kořenů dochází po reakci rizikových prvků s organickými kyselinami vylučovanými rostlinou k tvorbě chelátů, zvyšuje se difúzní gradient a zrychluje příjem prvku. Transport prvku z vnějšího roztoku buněčnou stěnou je proces pasivní, kdy jsou ionty transportovány difúzí (Cibulka et al., 1991). Ionty těchto prvků jsou velmi snadno přijímány kořeny, neboť selektivita transportních proteinů je zřejmě nedostatečná pro jejich rozlišení od těch prvků, které jsou pro život rostliny nezbytné. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Ionty, které proniknou buněčnou stěnou, se soustředí v prostředí plazmatické membrány – plazmalemy. Zvýšený koncentrační gradient vede k transportu iontů přes plazmalemu do buňky. Permeabilita buněčné stěny je výrazně vyšší než permeabilita plazmalemy. Část iontů je transportována přímo apoplastem přes plazmalemu do cytoplasmy. V kořenech také dochází k největšímu hromadění rizikových prvků. Část toxických iontů je přesto translokována i do nadzemních orgánů, kde nejvíce ovlivňuje fyziologické procesy v listech, v první řadě fotosyntézu (Procházka et al., 1998).

Tolerantní rostliny mají tendenci omezit přenos půda-rostlina a kořen-nadzemní část, hyperakumulátory, nebo-li rostliny s extrémně vysokou akumulací daného prvku, aktivně přijímají arsen a transportují jej do nadzemních částí. Pro extrakci nejsou vhodné rostliny s akumulčním faktorem a částečně i koeficientem biologické absorpce menším než jedna. Podle konceptu „akumulátor-excludor“ by se rostliny tolerantní k arsenu měly při akumulčním faktoru $\ll 1$ řadit k excludorům i přes zvýšenou koncentraci kontaminantů v nadzemní části. Hyperakumulace arsenu bude patrně vlastností nezávislou na vnějších podmínkách, než získanou přizpůsobením se prostředí, protože i populace z nekontaminovaných míst jsou schopny hyperakumulovat arsen. O procesech indukovaných kořeny v rhizosféře se předpokládá, že usnadňují příjem arsenu hyperakumulující rostlinou (Soudek et al., 2006).

Koncentrace As v rostlinách na nekontaminovaných půdách je v rozsahu 0,009 až 1,5 ppm sušiny, u listové zeleniny se obsah blíží k horní hranici rozmezí a v ovoci je obsah spíše nižší. Travniny z polovypřehlého klimatického pásma obsahují zvýšené množství As, od 1,1 do 5,4 ppm sušiny. Je zjištěno, že houby jsou poměrně vysokým akumulátorem As. Některé příklady jsou uvedeny v tabulce č. 7 (Kabata-Pendias, Pendias, 2001).

Tab. č. 7 Obsah arsenu v potravinách a píce rostlin (ppb) (Kabata-Pendias, Pendias, 2001)

Rostlina	ppb
Ječmen	3-18
Pšenice	50,3-10
Zelí	20-50
Špenát	200-1500
Salát	20-250
Mrkev	40-80
Brambory	30-200
Rajče	9-120
Jablko	50-200
Pomeranč	11-50
Jeteloviny	20-160

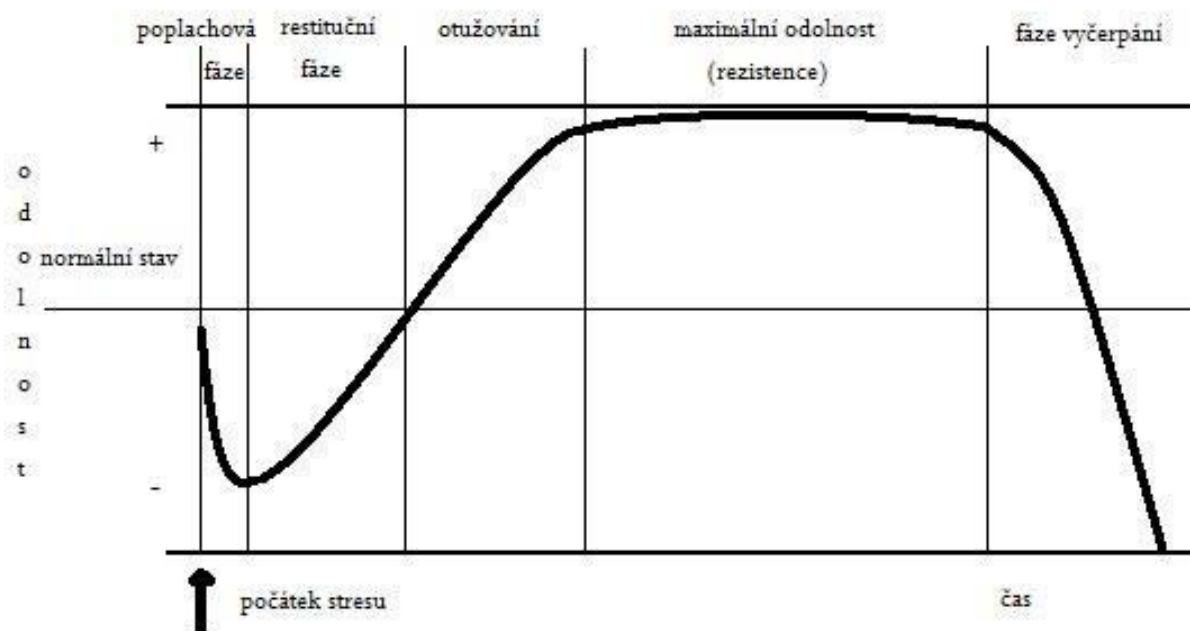
2.5 Stres rostlin

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí (Procházka et al., 1998).

Průběh stresové reakce vyvolané u rostliny závisí na intenzitě a délce působení stresového faktoru, ale i na adaptační schopnosti rostliny. Odezva rostliny na stresové podmínky je komplexní projev. Stresové podmínky vyvolávají paralelní a nebo po sobě jdoucí děje, rychlé fyziologické a pomalé morfologické procesy, jejichž mechanismus může ovlivňovat metabolické změny přímo či nepřímo vyvolané stresem. Některé změny v metabolismu zajišťující vysokou odolnost bývají často provázeny snížením rychlosti tvorby biomasy (Pavlíková et al., 2003).

Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (**poplachová fáze**). Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (**restituční fáze**), které směřují ke zvýšení odolnosti rostlin vůči působícím faktorům (**fáze rezistence**). Ne vždy však toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídané dalším poklesem (**fáze vyčerpání**) (Procházka et al., 1998).

Obr. 2: Idealizovaný průběh stresové reakce, (Procházka et al., 1998)



2.6 Absorpce a přizpůsobení v rostlinách

Toxické ionty vstupují do buněk prostřednictvím absorpčních procesů, které pohybují základním stopovým prvkem. Rostliny mohou přijmout stopové prvky buď z jejich povrchů, pomocí kořenů nebo kombinací obou (Patra et al., 2004).

Mezi jednotlivými rostlinnými druhy existují velké rozdíly pokud se jedná o absorpci, akumulaci a toleranci k rizikovým prvkům (Adriano, 2001).

V půdách a sedimentech je As znám vysokým sklonem ke kyselým povrchům, rozsah závisí na několika biogeochemických faktorech. Velikost částic, povaha základních minerálů, pH, redukční potenciál a konkurenční ionty, všechny mají vliv na adsorpční procesy (Adriano, 2001).

Patra et al. (2004), uvádějí, že množství prvku pohlceného rostlinou závisí na:

- koncentraci a vzniku prvku v půdním roztoku
- jeho pohybu z půdy k povrchu kořene
- transportu z povrchu kořene do kořene
- jeho přemístění z kořene k výhonku

Potenciál mobilizace prvků v půdě závisí v první řadě na obsahu prvků, rozpustnosti organické hmoty, půdním pH a půdních charakteristikách jako oxidace a kationtová výměnná kapacita. Rostlinná absorpce mobilních iontů přítomných v půdním roztoku je velkou měrou určena celkovým množstvím tohoto iontu v půdě ale v případě silně absorbovaných iontů, pohlcení závisí více na množství vyprodukovaného kořeny (Patra et al., 2004).

Toxicita a příjem arsenu je spojený s jeho oxidačním stavem a druhem sloučeniny. Proto je pouhé zjištění celkového množství arsenu ve vzorku nedostatečné pro odhad rizikivosti pro prostředí. Určení druhu sloučeniny arsenu v rostlině může poskytnout důležitou informaci, která může napomoci pochopit mechanismus akumulace, translokace, transformace a detoxifikace (Soudek et al., 2006). Například Tlustoš et al. (1998) ve své studii uvádí, že příjem As ředkvičkou velmi záleží na jeho formě v půdě a klesá v řadě - As org. > As V+ > As III+.

Arsen v anorganických a organických formách se užíval jako pesticid, rostlinné defolianty a herbicid, mohlo dojít k nahromadění v zemědělských půdách a v rostlinách. Rostliny pohotově přijmou arsenitany a arseničnany, významnější formy arsenu, příjem je velmi ovlivněný půdní strukturou a konkurenčními fosfáty. Nízká úroveň fosfátů přesune arsen z půdních částic, zvětší se absorpce a fytotoxicita, zatímco větší množství fosfátů soutěží s arsenem v kořenových površích k snížení absorpce a fytotoxicity. Hromadění arsenu rostlinou může být ovlivněno dalšími faktory, jako jsou rostlinné druhy, typ a způsob aplikace. Zřídka dochází k tomu, že arsen nahromaděný v rostlinách dosáhne takové úrovně aby poškozoval zvířata a člověka (Patra et al., 2004).

Neexistuje důkaz, že by arsen byl pro rostliny esenciálním prvkem, přestože v nízkých koncentracích stimuluje růst rostliny. Z hydroponických experimentů, ve kterých byl testován příjem arsenu rostlinou, je známo, že chemická forma je důležitější než celkové množství arsenu v roztoku (Soudek et al., 2006).

2.7 Tolerance rostlin

Jak uvádějí Patra et al., (2004) rostliny pěstované na kontaminovaných místech potřebují vyvinout nějaký stupeň snášenlivosti k toxicitě kovu za účelem přežití.

Omezení příjmu prvku je nejběžnější mechanismus odolnosti rostliny vůči rizikovým prvkům. Existují různé mechanismy redukce:

- uložení v buněčných stěnách
- chelátová sekrece

Tolerance rostliny k arsenu záleží na druhu rostliny a může vyplývat ze dvou strategií: nepřijetí arsenu (excludor) nebo akumulace arsenu (akumulátor). První strategie zahrnuje zabránění příjmu arsenu nebo omezení transportu arsenu do nadzemních částí rostliny. Tuto strategii uplatňuje například *Typha latifolia* hojně rostoucí na půdě kontaminované tímto prvkem. Naopak druhá strategie předpokládá silnou akumulaci arsenu v rostlině. Toto je strategie několika suchozemských rostlin rostoucích na haldách po těžbě nerostů, které obsahují hodně arsenu, např. *Agrostis tenuis* (Soudek et al., 2006).

Jako reakci na stres způsobený zvýšenou hladinou rizikových prvků mohou rostlinné buňky uplatnit ochranné systémy, jako jsou imobilizace rizikových prvků v buněčných stěnách, omezení vstupu přes membrány, syntéza metallothioneinů, tvorba komplexů vázajících rizikové prvky, syntéza stresových proteinů, redukce specifických stresových metabolitů, např. ethylenu (Pavlíková et al., 2003).

Rostliny jsou trvale přizpůsobeny k vykonávání všech životně důležitých funkcí za poměrně velkého kolísání faktorů vnějšího prostředí. Pokud však toto kolísání překročí jistou mez (hranici tolerance), dojde v rostlině k poruchám struktur a funkcí. Současně však dojde i k aktivaci nápravných procesů na úrovni molekulární, biochemické a fyziologické. Tento mimořádný stav rostliny, označovaný jako stres, může vést buď k dosažení nové homeostáze, nebo k uhynutí postiženého orgánu či celé rostliny (Procházka et al., 1998).

2.8 Fytotoxicita

Arsen patří mezi nejintenzivněji studované rizikové prvky z důvodu jeho toxicity pro člověka i ostatní živočichy. Rovněž fytotoxicita tohoto prvku je známa (Száková et al., 2007a).

Toxický vliv se ihned neprojevuje vizuálně. Teprve pozvolným zvyšováním dochází k nepříznivým změnám v půdě, které pak mají za následek celkové snížení půdní úrodnosti (Beneš, 1993).

Fytotoxicita As se u rostlin projevuje plazmolýzou pletiv kořenů a žloutnutím listů vedoucím až k nekróze špiček a okrajů listů. Byl rovněž prokázán vliv zvýšené koncentrace As na snížení absorpce některých esenciálních mikroelementů, jako jsou B, Cu, Mn a Zn (Pavlíková et al., 2007).

2.9 Fytochelatiny

Nejrůznější zdroje znečištění přinutily mikroorganismy, rostliny i živočichy k vytvoření ochranných mechanismů. V jejich životním prostředí je přítomna celá škála prvků včetně těžkých kovů, které představují jednu z nejdůležitějších skupin toxických látek. Mechanismy detoxikace a metabolismus těžkých kovů jsou intenzivně studovány u různých organismů. Pokud jsou rostliny vystaveny účinkům těžkých kovů, zahájí jejich buňky syntézu fytochelatinů (PC), což jsou peptidy, které mají schopnost vázat těžké kovy, a zajišťují tak rostlině transport toxických iontů do vakuoly kde již bezprostředně svou toxicitou rostlinný organismus neohrožují. Tyto peptidy jsou také označovány jako rostlinné metalothioneiny (Vacek et al., 2003). Obecná struktura fytochelatinů je $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ (Soudek et al., 2006).

Mechanismus detoxikace prostřednictvím PC byl doposud prokázán u kadmia, stříbra, mědi a arsenu. Pro studium PC má velký význam také objasnění principů transportu fytochelatinových komplexů přes buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu a membránu vakuoly. Za hlavní funkci PC je považována detoxikace těžkých kovů (Vacek et al., 2003).

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

Přímá identifikace komplexu je obtížná. Pokud jsou fytochelatiny ze vzorku extrahovány médiem při $\text{pH} > 7$, pravděpodobně budou komplexy disociovat na volný fytochelatin a arseničnan (redukcí fytochelatinů a oxidací arsenitanu). Pokud je tedy v extraktu z rostliny detekován arseničnan, může pocházet z komplexu arsenitan-fytochelatin (Fitz et al., 2002).

3. Špenát setý (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador)



Obr. 3: Špenát setý
(Internetový zdroj 5)

Špenát setý je nejznámější a nejrozšířenější špenátovou zeleninou, to znamená listovou zeleninou upravovanou vařením. Pravděpodobně vznikl z planého druhu *Spinacia tetrandra*, který roste od Kavkazu přes Turkestán a Írán až po Afghánistán. Špenát patří do čeledi Merlíkovité (*Chenopodiaceae*) (Pekárková, 2002).

Rostlina špenátu je jednoletá. Vytváří nejdříve růžici sytě zelených hladkých nebo bublinatých lesklých listů, později rozvětvený, 60 až 70 cm vysoký květní stonek. Rostlina je výrazně dlouhodobní, proto při pozdním jarním výsevu vybíhá rychle do květu. Cennou složkou špenátových listů jsou bílkoviny, minerální látky (především jód a železo), dále provitamin A a vitamín B1, B2, C, K a kyselina křemičitá (Pekárková, 2002).

Rostlina špenátu obsahuje poměrně vysoký obsah minerálních látek: Ca 8300 mg, P 4300 mg, S 2350 mg, Mg 980 mg, Fe 60 mg na 1000 g čerstvé hmoty, vitamínu C 50-80 mg, A 2,5-7 mg i dalších jako B1, B2, B6, E, K, PP. Má poměrně vysoký obsah dusíkatých látek 3,5 %, cukrů 1,5 %. Vysoký je však i obsah kyseliny šťavelové 290-320 mg (Malý et al., 1998).

Špenát v nadzemních orgánech dosti výrazně akumuluje nitráty, zvláště při omezeném růstu. Proto je hnojení dusíkatými hnojivy nejvýznamnějším opatřením. Při hnojení je nutné brát v úvahu množství dusíku, které je k dispozici v půdě (Vaněk et al., 2002).

3.1 Podmínky pěstování

Listová zelenina patří ke středně náročným zeleninám na živiny (Hlušek et al., 2002). Špenát je rostlina nenáročná na klima, vyžaduje však půdu s dostatkem živin. Slouží dokonce pěstitelům jako indikátor půdní úrodnosti. Potřebuje také dostatek vláhy a dostatečně světelné stanoviště. Rychle roste, takže se hodí do meziřádků smíšených kultur s pomalu rostoucími zeleninami (Pekárková, 2002).

Nesnáší kyselé půdy, optimální pH je neutrální, nebo slabě alkalické, nejvhodnější jsou propustné písčitohlinité půdy s dostatkem humusu. Má vysoké nároky na vodu, vzhledem ke krátkému vegetačnímu období a poměrně mělkému kořenovému systému. Na nedostatek vláhy

reaguje pomalým růstem, tvorbou nízkého počtu listů a předčasným vyběháním do květu (Malý et al., 1998).

Nedostatek vápníku vyvolává u listových zelenin poruchy růstu a vývoje (nesnáší kyselou půdní reakci). U špenátu vyvolává zvýšený obsah kyseliny šťavelové v rostlině, což má za následek tvorbu žloutnoucích a natrpkých listů. Špenát je přitom považován za indikativní rostlinu na pH. Špenátu nejlépe vyhovuje pH 6,0-7,5. Velmi dobře roste při hodnotě 6,6 (Hlušek et al., 2002).

3.2 Špenát a rizikové prvky

Listová zelenina patří k velmi citlivým druhům na tyto prvky v půdě a ve zvýšené míře je přijímá a kumuluje v nadzemních částech (hlavně špenát a salát). Stejným způsobem může kvalitu ovlivnit i znečištěná atmosféra (Hlušek et al., 2002).

Cibulka et al. (1991), rozdělili jednotlivé druhy zelenin podle relativní akumulace rizikových prvků v jedlých podílech:

- Vysoký příjem – salát, **špenát**, řeřicha, mrkev, čekankové puky,
- Střední příjem – kapusta, řepa, ředkvička, hořčice, brambory,
- Nízký příjem – hlávkové zeli, sladká kukuřice, brokolice, květák, růžičková kapusta, celer,
- Velmi nízký příjem – luskoviny, meloun, okurka, rajče.

4. Steroly

Ve svém pokusu jsem se zaměřila především na sledování množství sterolů v závislosti na množství arsenu ve špenátu přijatého z půdy.

Přestože membrány jednotlivých organel se poněkud liší svým složením, submikroskopickou strukturou a funkcí, je jisté, že všechny mají jednotný princip molekulární organizace. Biomembrány se podílejí na realizaci takřka všech základních životních funkcí buňky: na metabolických přeměnách, na transportu molekul, na transformaci energie a na informačních procesech. Základní komponentou všech biomembrán jsou molekuly lipidů a bílkovin. V menší míře jsou v biomembránách zastoupeny sacharidy ve formě glykoproteinů a glykolipidů. V lipidové složce membrán jsou zastoupeny dvě kategorie lipidů: fosfolipidy (fosfatidy) a steroly (Procházka et al., 1998).

Rostlinné membrány obsahují málo nebo žádný cholesterol a místo toho obsahují několik druhů fytosterolů, které jsou strukturou podobné cholesterolu, ale obsahují methyl nebo ethyl skupinu v C-24 (Moreau et al., 2002).

Rostlinné steroly jsou základní součástí membrán všech eukaryotických organismů (Piironen et al., 2000). Eukaryotické buňky mají vyvinutý mechanismus pro udržování stálé úrovně volných sterolů. Ačkoli steroly jsou základní součástí eukaryotických membrán, nejsou rovnoměrně rozděleny všude v buňce a množství volného sterolu v každé části je jedinečné (Yang, 2006).

Na rozdíl od živočišných a houbových buněk, které obsahují jen jeden významnější sterol, rostlinné buňky obsahují komplex sterolů, ze směsi sterolů často převládá sitosterol, stigmasterol a 24-methylcholesterol (Hartmann, 1998). Kvasinky a houby obsahují další membránové steroly, jako je ergosterol, který má mezi C 7 a C 8 dvojnou vazbu. Velmi rozmanité steroly byly zjištěny v mořských živočiších různých kmenů. V postranním řetězci na C 17 obsahují například cyklopropanové kruhy a terminální methylenové skupiny (Voet, Voetová, 1990).

Rostlinné steroly jsou primární součástí buněčných membrán, kde řídí přizpůsobivost a propustnost. Menší část sterolů slouží jako zdroj pro deriváty steroidu, kde byla nedávno identifikována nová třída rostlinných růstových látek zvaných brasinosteroidy (Schaller, 2003).

Obvykle zkoumané rostlinné steroly jsou sitosteroly, stigmasteroly a kampesteroly. Rostlinné oleje jsou bohatým zdrojem esterů sterolů. Rostlinné steroly, zvané také fytosteroly, obsahují přes 250 různých sterolů a příbuzných směsí v rozličných rostlinách a mořských materiálech. Nejběžnější jsou sitosteroly, stigmasteroly a kampesteroly (4 – desmethyl sterol). 4 – methyl

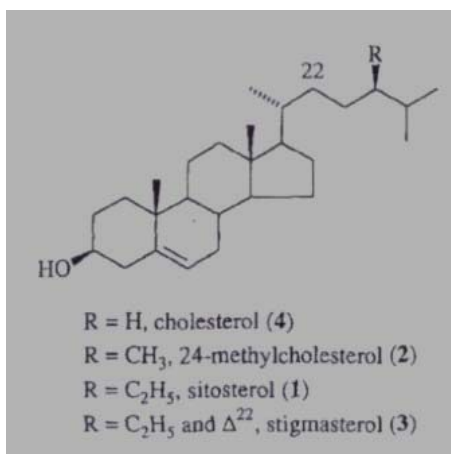
sterol a 4,4 – dimethyl sterol jsou obvykle jen méně důležitou součástí rostlin (Piironen et al., 2000).

4.1 Struktura

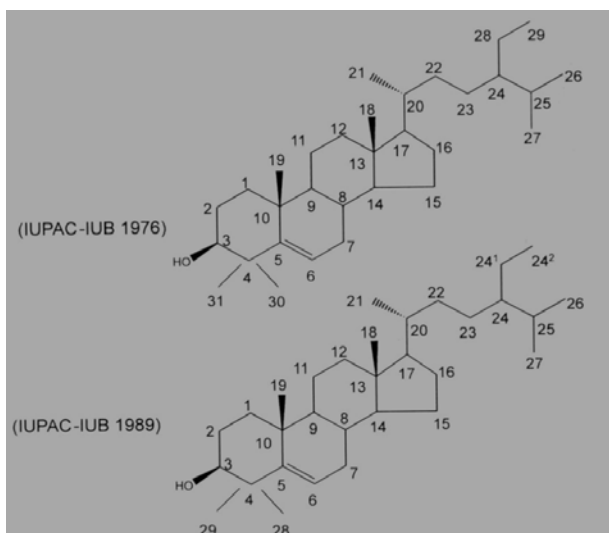
Chemická struktura těchto sterolů je podobná jako cholesterol, liší se pouze v postranním řetězci. Například, sitosterol a stigmasterol mají etylovou skupinu v C- 24, kampesterol má methylovou skupinu ve stejné pozici (Piironen et al., 2000).

Struktura sterolu sestává ze čtyř uhlovodíkových kruhů a postranního osmi uhlíkového řetězce (viz obr. 4). Neobsazená OH skupina volného cholesterolu umožňuje jeho interakci s vodou, proto je volný cholesterol částečně hydrofilní (esterifikovaný cholesterol má na OH skupině navázanou mastnou kyselinu, je proto zcela hydrofobní) (Internetový zdroj 2).

Obr. 4: Vzorec sterolů



Obr. 5: Názvoslovní fytoosterolu (např. sitosterol)



4.2 Biologická funkce v rostlině

Steroly řídí přizpůsobivost membrán a nepochybně hrají roli v adaptaci membrán k teplotě. Volná hydroxylová skupina ve volných sterolech je důležitým faktorem umožňujícím jeho zvláštní interakce s fosfolipidy a proteiny v membránách. Všechny rostlinné steroly jsou schopny řídit přizpůsobivost membrán s různou efektivitou. Sitosterol a kampesterol jsou nejvíce účinné. Steroly také hrají funkci v buněčné odlišnosti a rozšíření. Jejich hromadění v semenech pravděpodobně poskytuje zásobu pro klíčení a růst nových buněk (Piironen et al., 2000).

Sitosterol a 24-methylcholesterol jsou nejvíce účinné steroly pro omezení pohyblivosti fosfolipidů. *Trans*-orientovaná dvojná vazba v C 22 v postraním řetězci molekuly sterolu významně redukuje jeho stavební funkci, což bylo ověřeno srovnáním mezi sitosterolem a stigmasterolem (Hartmann, 1998).

Cholesterol je přítomný ve stopovém množství v několika druzích vyšších rostlin. Steroly jsou prekurzory k některým skupinám steroidů jako sapogeniny, ekdysteroidy, kardenolidy, estrogeny a androgeny. Bylo navrhováno, že steroly působí v rostlinách jako hormony, ale je nejisté, jestli tak přímo fungují. Druhá role sterolu v rostlinách souvisí s propustností membrán, steroly jsou součástí membrán (Johansson-Kornfeldt, 1979).

Rostlinný materiál a zvláště rostlinné oleje obsahují volný a esterifikovaný sterol a glykosid sterol který může být esterifikovaný k acylovanému glykosid sterolu. Volné steroly, sterol glykosid a acylovaný sterol glykosid jsou do jisté míry začleněni do buněčných membrán. Jako cholesterol v savčí buňce vykonává důležitou roli ve struktuře a funkci buněčných membrán (Piironen et al., 2000).

5. Materiál a metody

5.1 Založení pokusu

Nádobový pokus byl založen v roce 2007 ve vegetační hale katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin ČZU v Praze (viz obr. 6). Pro pokus byl použit špenát setý (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador).

Obr. 6: Vegetační hala KAVR ČZU v Praze



Do jednotlivých nádob bylo odváženo po 5 kg zeminy ze stanoviště Suchdol (tabulka č. 8 a tabulka č. 9) 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). Arsen byl přidán ve formě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v dávce 25, 50 a 75 mg As $\cdot \text{kg}^{-1}$ dle schématu pokusu (tabulka č. 10). 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 arsenu a část byla uchována v tekutém dusíku pro analýzu rostlinných metabolitů.

Tab. č. 8 Vybrané agrochemické a pedologické charakteristiky použité zeminy

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

Tab. č. 9 Celkový obsah živin v černozemi stanovený dle Mehlicha (mg.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. č. 10 Schéma pokusu

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

Usušený rostlinný materiál byl rozložen na suché cestě ve směsi oxidačních plynů ($\text{O}_2 + \text{O}_3 + \text{NO}_x$) s využitím přístroje APION (Tessek, CZ). Popel byl rozpuštěn v 1ml 1,5 % HNO_3 . Arsen byl stanoven metodou generace hybridů na atomovém absorpčním spektrometru Varian SpectrAA-300 (Australia) vybaveném generátorem hybridů VGA-76.

5.2 Izolace frakcí z čerstvého materiálu špenátu setého

Pro mé stanovení byla významná petroletherová frakce. Na ostatních stanoveních, jsem se podílela a proto zde i tuto metodiku pro zajímavost uvádím.

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

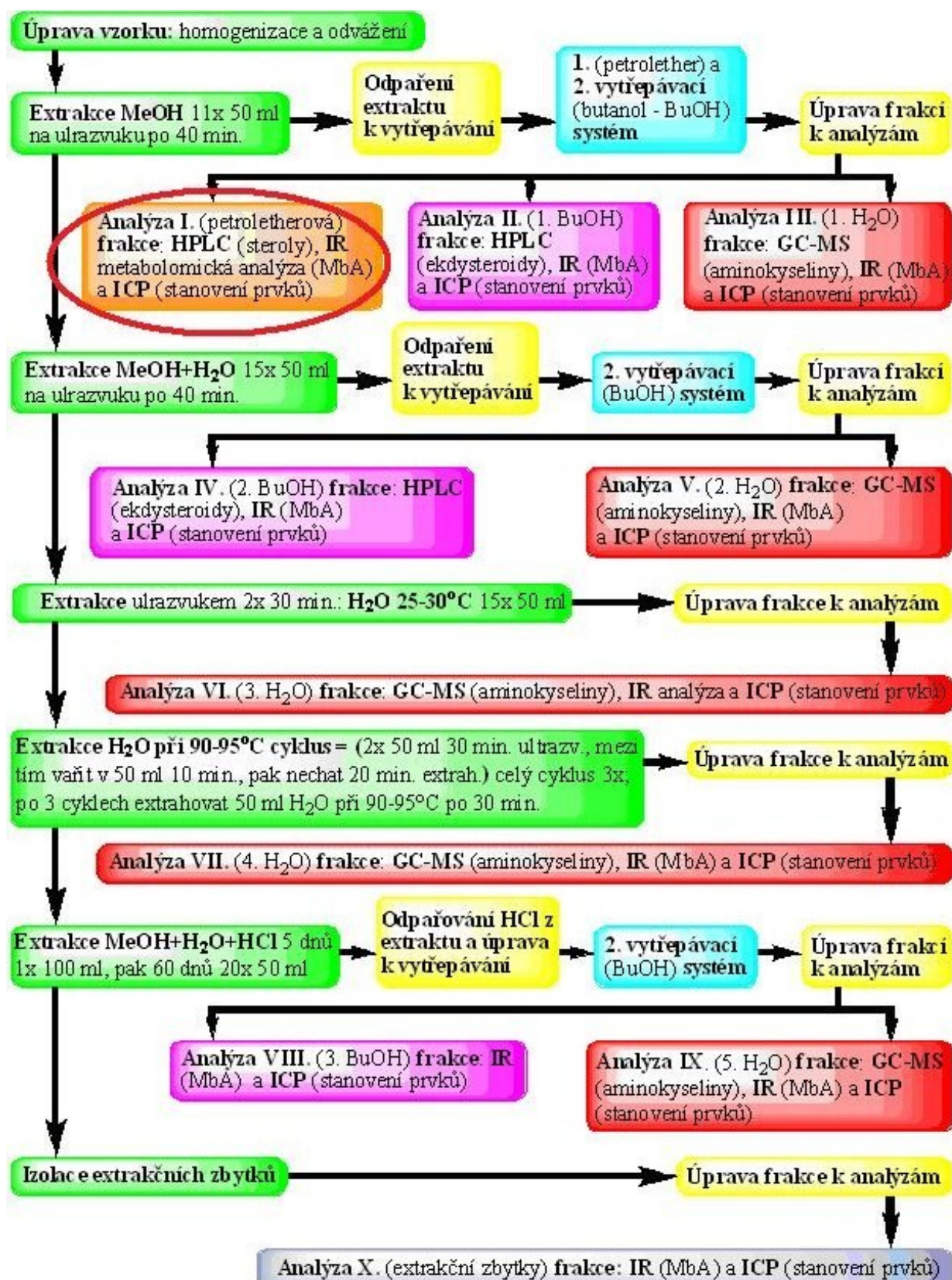
- 2.3.2. **Odpařování frakce - VM/f1a:** Odpařeno na 1/10 objemu, zakoncentrováním je odstraněn MeOH
- 2.3.3. **Odpařování frakce - Pe/f1a:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 2.3.4. **Zpětné vytřepání Pe/f1a:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml MeOH + H₂O (1:1) - získány dvě frakce **a)** petroletherová frakce - **Pe/fb1** (pro závěrečné spojení) a **b)** vodně metanolová 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 methanolová 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/f1a** a **b)** vodná frakce - **V/f1a** (pro závěrečné spojení)
- 2.5.2. **Odpařování frakce V/f1a:** Odpařeno na 1/10 objemu - zakoncentrování
- 2.5.3. **Odpařování frakce - B/f1a:** Zakoncentrováno na 150 ml
- 2.5.4. **Zpětné vytřepání B/f1a:** 2 x 20 ml a 1 x 30 ml H₂O - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce **B/fb1** (pro závěrečné spojení) a **b)** vodná frakce **V/f1b**
- 2.5.5. **Závěrečné zpětné vytřepání V/f1b:** Získaná frakce po zpětném vytřepání **V/f1b** se vytřepala 1 x 50 ml a 1 x 30 ml BuOH - získány dvě frakce **a)** BuOH frakce - **B/f2** (pro závěrečné spojení) a **b)** vodná frakce **V/f1c** (pro závěrečné spojení)
- 2.6.2.1. **Úprava 1. BuOH frakce = II. frakce:** Spojení frakcí **B/fb1** + **B/f2** a odpaření do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 2.6.2.2. **Analýza II. frakce:** **HPLC** (ekdysteroidy), **IR** (metabolomická analýza), **ICP** (stanovení prvků)

- 2.6.3.1. **Úprava 1. vodné frakce = III. frakce:** Spojení frakce *V/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/fla* + *VM/flc* a odpařeno do sucha, zvážení frakce, odvážení vzorků k analýze a příprava vzorku k analýze podle typu analýzy.
- 3.6.2.2. **Analýza V. frakce:** GC-MS (analýza vázaných aminokyselin), IR (metabolomická analýza), ICP (stanovení prvků)
- 4.1. **Extrakce H₂O při 25-30°C:** 15 x 50 ml, ultrazvukováno 2x30 minut a 30 minut pauza
- 4.2. **Úprava 3. H₂O frakce při 25-30°C = VI. frakce:** Frakce je odpařená do sucha, zvážená a po odvážení vzorků k analýze jsou připraveny vzorky k analýze podle typu analýzy.

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

Obr. 7 : Schéma postupu extrakce



5.3 Metodika stanovení volných sterolů a sterylglukosidů v petroletherové (I.) frakci

5.3.1 Příprava vzorku k nástřiku

1 mg petroletherové (I.) frakce bylo rozpuštěno v 1 ml MeOH. Z frakce bylo odebráno 100 μ l rozpuštěného vzorku k analýze na HPLC. Analýza byla provedena 3 krát.

5.3.2 Přístrojové vybavení

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). Eluenty 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 byla měřena pomocí UV - PDA detektoru Waters 2996 - Photodiode Array Detector (detektor diodového pole).

Jako eluent byla používána voda 2krát 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. Nástřik 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 / m², obsah kovů je pod 5 ppm, povrchová plocha 450 m² / g, velikost pór 100 Å, operační rozsah pH 2 - 8, teplotní rozsah \leq 70°C. Kolony byly umístěny v kolonovém termostatu s chlazením (Column oven Waters), který byl během analýzy vyhříván na 25°C.

5.4 Metodika stanovení sterolů pomocí HPLC

Volné steroly byly stanovovány v první petroletherové frakci. Petroletherová frakce byla kromě analýzy ekdysteroidů analyzována také na volné konjugáty sterylglukosidů. Standardy sterylglukosidů byly připraveny Dr. Věrou Siglerovou z ÚEB, Izotopové laboratoře, protože nejsou komerčně dostupné. První vzorek byl analyzován dvěma relativně totožnými programy, které se od sebe lišily délkou eluce MeOH a monitorováním určitých vlnových délek. Protože bylo zjištěno, že délka eluce je příliš dlouhá, byla zkrácena o 60 minut. Nami zvolená koncentrace neumožňovala stanovovat některé barevné sloučeniny, a proto bylo upuštěno také od monitorování při vlnových délkách 660 nm (chlorofyl) a 455 nm (karoteny). 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. Pro sledování dalších možných látek (metabolomická analýza) obsažených v extraktu byly vzorky monitorovány současně s předcházejícími UV vlnovými délkami i při 220, 245 a 260 a 400 nm. Kolona byla termostatem vyhřívána na 25°C. K analýze pro petroletherovou frakci byl použit následující gradient: start 20 % eluentu A a 80 % B, do 15. minuty 0 % eluentu A a 100 % eluentu B, pak izokratické podmínky (100 % B) do 70 minuty. Od 70 do 72 návrat na původní podmínky a následovně do 900 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.

6. Výsledky a diskuze

Výsledky, které zde budu hodnotit byly stanovovány na rostlinách špenátu setého (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador). Rostliny byly vypěstovány v nádobovém pokusu, který byl založen v roce 2007 ve vegetační hale katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin ČZU v Praze. Vzorke byly odebírány ve dvou termínech. První odběr byl proveden 28.5. ve čtyřech variantách: kontrola (0 mg As.kg⁻¹), As1 (25 mg As.kg⁻¹), As2 (50 mg As.kg⁻¹), As3 (75 mg As.kg⁻¹), a druhý odběr proběhl 11.6. pouze ve dvou variantách: As1 (25 mg As.kg⁻¹), As2 (50 mg As.kg⁻¹), kdy již byly rostliny špenátu setého ve fázi květu. Což v některých případech může odlišovat výsledky od výsledků z prvního odběru. Varianta As3 (75 mg As.kg⁻¹) se nepodařila odebrat, rostlina byla již v pokročilé fázi květu a zároveň byla napadena škůdcem (mšicemi) viz. obr. 8.

Obr. 8 : Varianta As3 v době květu



6.1 Výnos čerstvé hmoty a výnos sušiny špenátu

Jak můžeme vidět podle tabulky č.11 a grafu č.1, se výnos biomasy se zvyšujícím se množstvím přidávaného As snižuje. A to jak v případě výnosu čerstvé hmoty, tak i výnosu sušiny. Protože jak ve svém článku uvádějí Pavlíková et al., (2003), rostlina disponuje určitými adaptačními mechanismy na nepříznivé vlivy prostředí, ale pouze do určité hranice.

U kontrolní varianty, která není ovlivněna žádným přídatkem arsenu je výnos nejvyšší. S postupně se zvyšujícím se množstvím přidávaného arsenu je výnos nižší. Což je patné na obrázku v příloze č.2. Rostlina totiž reaguje významným snížením růstu při působení rizikových prvků. I přesto, že špenát je odolnější k rizikovým prvkům, vysoká dávka arsenu se na výnosu čerstvé biomasy projevila snížením. Z tabulky je dále možno vidět, že u vzorku As1 28.5. je větší procentické zastoupení sušiny, to je v tomto případě způsobené zřejmě větším podílem žilnatiny oproti listové hmotě.

Tab. č. 11 Výnos čerstvé hmoty a výnos sušiny špenátu (g)

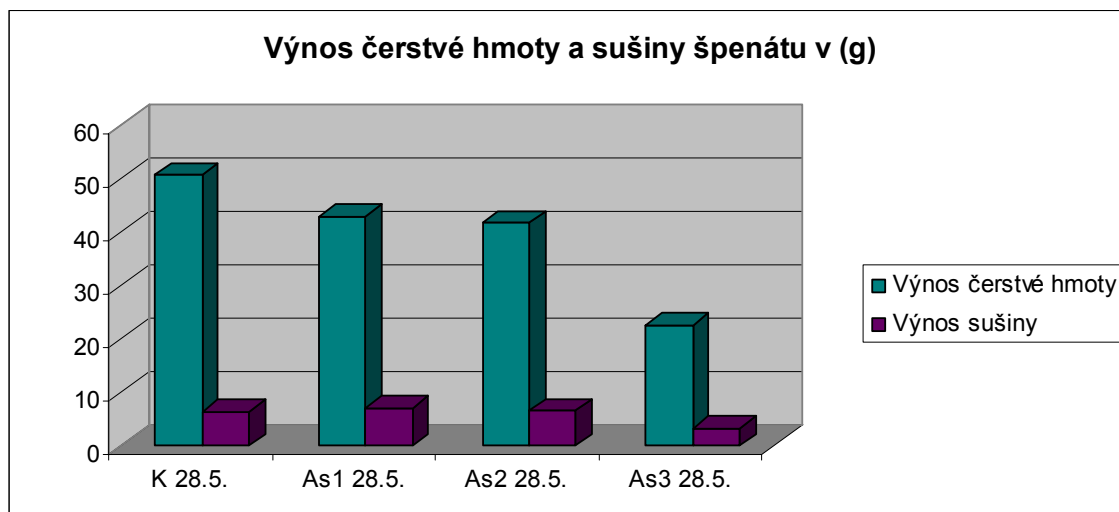
Vzorek	VČ	SM	% sušiny	VS
K 28.5.	50,8	10,748	12,42	6,32
As1 28.5.	43,05	4,313	16,16	6,96
As2 28.5.	41,75	7,283	15,66	6,54
As3 28.5.	22,65	1,061	14,17	3,21
As1 11.6.	53,5	-	12,56	6,72
As2 11.6.	46,2	-	14,74	6,81

SM.....směrodatné odchylka

VČ.....výnos čerstvé hmoty (v g na nádobu)

VS.....výnos sušiny (g)

Graf č.1: Výnos čerstvé hmoty a výnos sušiny špenátu (g)



6.2 Celkový obsah As v jednotlivých variantách

Je patrné, že tvrzení autorů Tlustoš et al., (2004), kteří uvádí, že se snižujícím se množstvím výnosu biomasy se obsah arsenu v biomase zvyšuje, se i v našem pokusu potvrdilo. Adriano (2001) řekl, že snášenlivost arsenu mezi jednotlivými rostlinnými druhy je odlišná. Jak uvádí Cibulka et al.,(1991), špenát má vysokou akumulaci schopnost vůči rizikovým prvkům. Nejvyšší koncentrace arsenu je u varianty As3. Kdy dosahuje hodnoty $As_3 = 6,745 \text{ mg.kg}^{-1}$. U kontrolní varianty je vidět, že i když v tomto případě do půdy nebyl přidáván žádný arsen i přesto ho rostlina obsahovala ($K = 0,425 \text{ mg.kg}^{-1}$). Je to způsobeno přirozeným obsahem arsenu v půdě, který rostlina přijala. Jak Kabata-Pendias, Pendias (2001) říká, obsah arsenu v rostlinách rostoucích na nekontaminovaných půdách se pohybuje mezi $0,009 - 1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Kořínek et al. (2003) uvádí, že za fyto toxický obsah arsenu v rostlinné biomase se považuje rozmezí 3 až 10 mg.kg^{-1} . Na základě našich výsledků lze říci, že kromě kontrolní varianty je obsah arsenu v rostlině v ostatních variantách toxický.

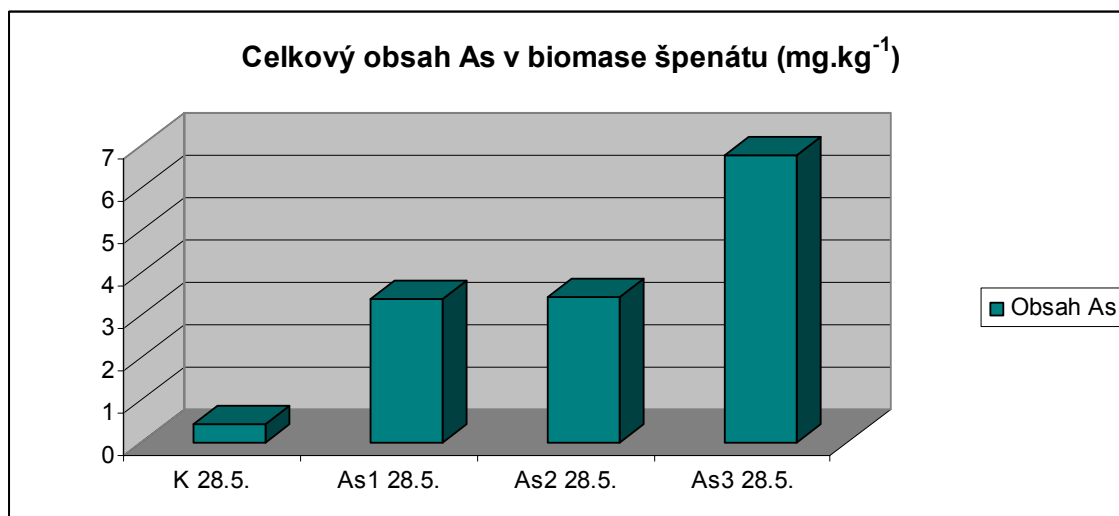
Příčinou zvýšených hodnot u variant z 2. odběru As1 11.6. a As2 11.6. oproti As1 28.5. a As2 28.5. je delší doba vegetace a to, že při odebrání vzorků těchto variant byla rostlina ve fázi květu.

Obsah arsenu v jednotlivých variantách je rovněž závislý na obsahu arsenu v půdě. Čím více bylo arsenu v půdě, tím více arsenu bylo stanoveno v rostlině.

Tab. č. 12 Celkový obsah As v jednotlivých variantách (mg.kg^{-1})

Vzorek	Průměr hodnot	Směr. odchylka
K 28.5.	0,425	0,123
As1 28.5.	3,352	0,025
As2 28.5.	3,410	0,311
As3 28.5.	6,745	0,191
As1 11.6.	3,920	1,245
As2 11.6.	4,330	0,113

Graf č.2 : Grafické znázornění celkového obsahu As v jednotlivých variantách (mg.kg^{-1})



6.3 Obsah As v půdě v jednotlivých variantách

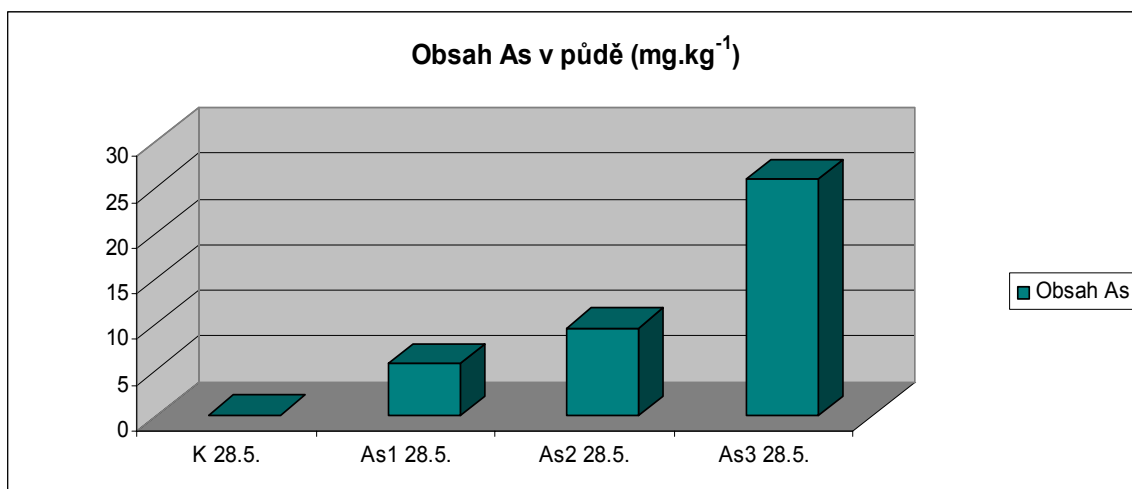
Pro získání podrobnějších informací o distribuci prvků v jednotlivých složkách půdy a o způsobu a pevnosti vazeb prvků na tyto komponenty byla vyvinuta celá řada extrakčních činidel. Volba chemické sloučeniny použité pro extrakci se pak řídí požadavkem, která frakce prvku má být z dané půdy uvolněna. Silné kyseliny nejsou schopny kvantitativně uvolnit prvky pevně vázané na silikátovou matici půdních vzorků, přesto se využívají tyto extrakční metody pro přibližný odhad celkového obsahu prvků v půdě, především při zevrubné znalosti půdních parametrů. Lze konstatovat, že tato činidla uvolňují potenciálně mobilizovatelný obsah prvků v půdě, tj. takový podíl, který lze změnou fyzikálně-chemických podmínek (pH, sorpční kapacita, obsah půdní organické hmoty) převést na podíl rostlinám přístupný. Roztoky neutrálních solí uvolňují z půdy frakce prvků přibližně odpovídající podílu prvků přijatelných rostlinám. Jsou tedy velmi vhodné při studiu přestupu prvků z půdy do rostlin (Száková et al., 2001).

Výsledky potvrdili těsnou závislost mezi obsahem arsenu v rostlinách a obsahem arsenu v půdě. To je dobře patné na grafu č. 4. Se zvyšující se dávkou arsenu v půdě dochází k nárůstu množství arsenu v rostlině, což ve své práci potvrdili i Kořínek et al., (2003). Příjem prvku z půdy je rovněž ovlivněn druhem či stářím rostliny, charakterem znečištění ale i klimatickými podmínkami (Vincenc, 1997).

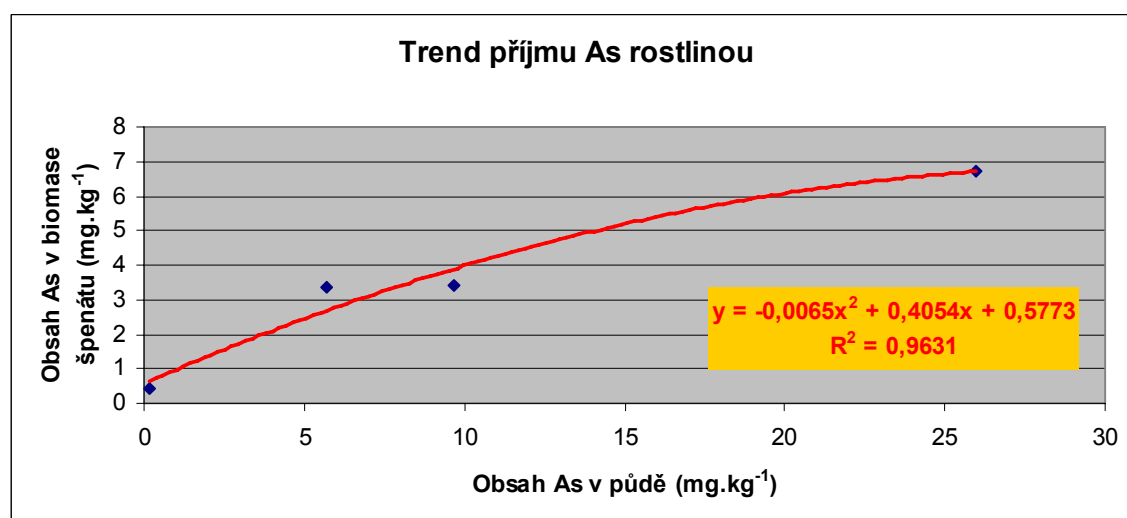
Tab. č. 13 Přístupný obsah arsenu v půdě ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Vzorek	Obsah As
K 28.5.	0,17
As1 28.5.	5,71
As2 28.5.	9,70
As3 28.5.	25,99
As1 11.6.	5,95
As2 11.6.	11,70

Graf č.3: Grafické znázornění obsahu As v půdě



Graf č.4: Trendová funkce příjmu arsenu rostlinou špenátu setého



6.4 Petroletherová frakce volných sterolů a esterů sterolů s mastnými kyselinami

V tabulce č. 14 jsou uvedeny koncentrace vybraných prvků stanovených v petroletherové frakci.

Tab. č.14 Obsah arsenu, fosforu a vápníku v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy

Vzorek	Hmot. frakce v mg	As v $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ frakce	As v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	P v $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ frakce	P v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	Ca v $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ frakce	Ca v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy
K 28.5.	58,2	0,192	1,096	0,066	0,376	0,851	4,856
As1 28.5.	78,1	0,233	1,389	0,072	0,429	0,937	5,586
As2 28.5.	45,5	0,227	0,898	0,057	0,225	0,726	2,872
As3 28.5.	57,5	0,129	0,720	0,043	0,240	0,510	2,847
As1 11.6.	35,1	0,220	0,750	0,024	0,082	0,332	1,131
As2 11.6.	39,1	0,341	1,333	0,038	0,148	1,533	5,994

6.4.1 Vyjádření závislosti As na P

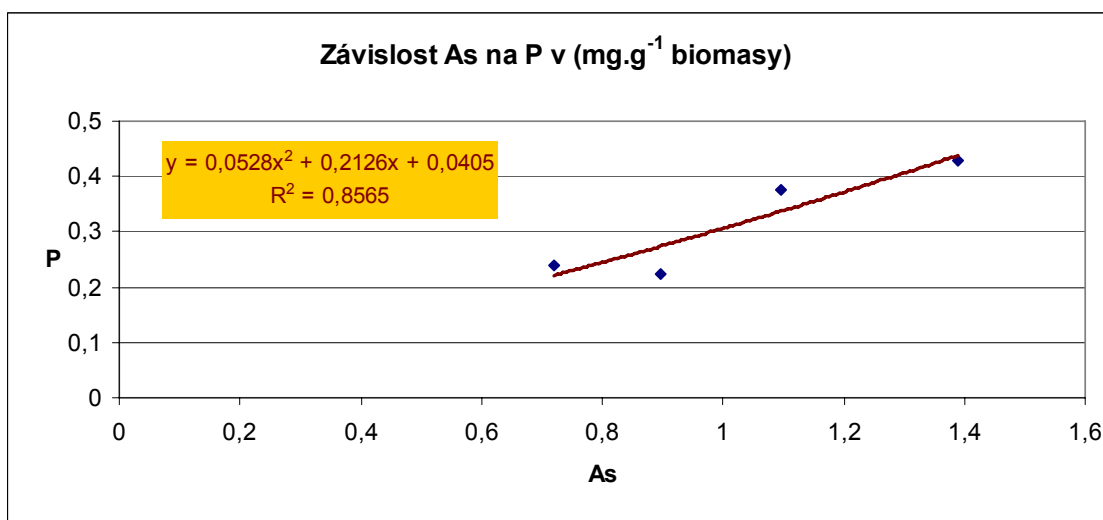
K vyjádření závislosti ve všech případech jsme použili trendovou polynomickou funkci 2. stupně. Podle hodnoty spolehlivosti (determinačního koeficientu), jsme pak určili danou závislost prvků.

V tomto případě je determinační koeficient $R^2 = 0,8565$ lze určit, že závislost arsenu na fosforu je poměrně vysoká. Z hodnot, které jsme získali lze usuzovat, že ve vztahu As-P, přítomnost fosforu zvýšila koncentraci arsenu v nadzemní biomase. Což ve své práci uvádějí i (Száková et al., 2007b). Koncentrace fosforu je závislá na množství a formě arsenu. Dále uvádí že, translokace As (V) od kořenů nastane stejnou cestou jako P (V) ale translokace As (III) se děje jinou cestou.

Tab. č. 15 Obsah As a P v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy

Vzorek	As v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	P v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy
K 28.5.	1,096	0,376
As1 28.5.	1,389	0,429
As2 28.5.	0,898	0,225
As3 28.5.	0,720	0,240
As1 11.6.	0,750	0,082
As2 11.6.	1,333	0,148

Graf č. 5: Grafické znázornění závislosti



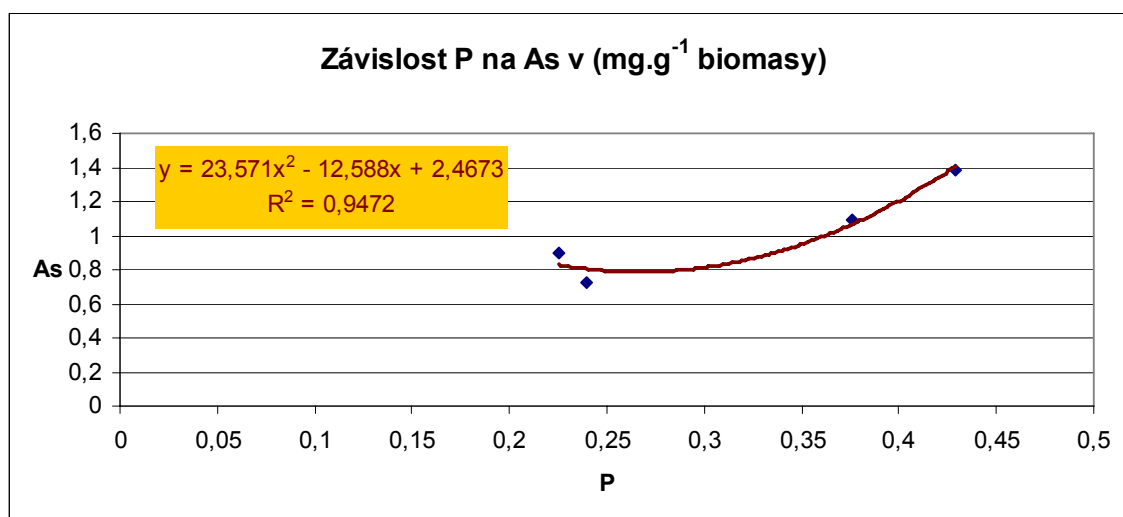
6.4.2 Vyjádření závislosti P na As

U této závislosti lze rovněž říci, že je závislost vysoká. Hodnota determinačního koeficientu $R^2 = 0,9472$. Z toho vyplývá, že aby rostlina dobře snášela vyšší dávky arsenu potřebuje i vyšší dávky fosforu.

Tab. č. 16: Obsah P a As v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy

Vzorek	P v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	As v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy
K 28.5.	0,376	1,096
As1 28.5.	0,429	1,389
As2 28.5.	0,225	0,898
As3 28.5.	0,24	0,72
As1 11.6.	0,082	0,75
As2 11.6.	0,148	1,333

Graf č. 6: Grafické znázornění závislosti



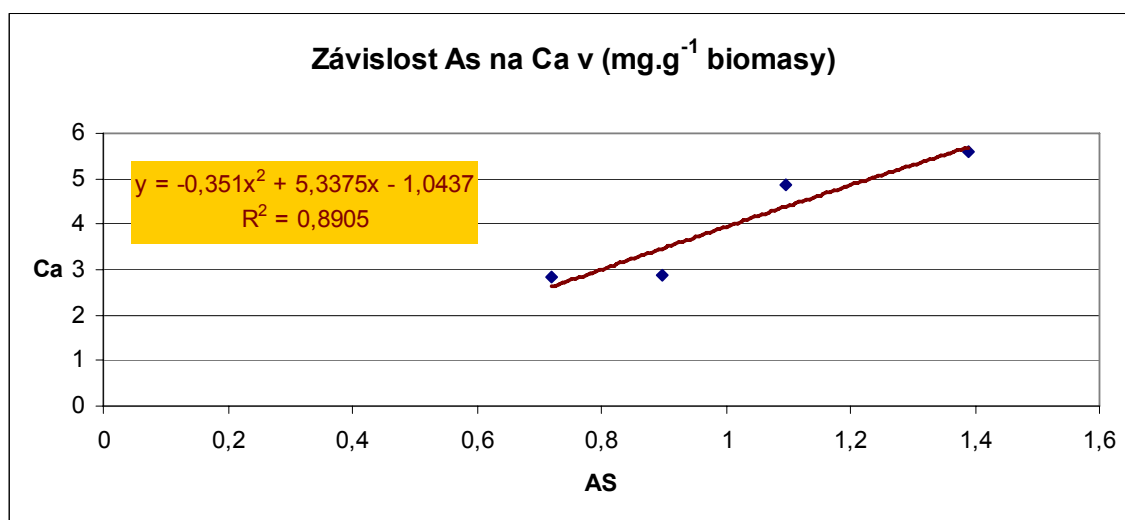
6.4.3 Vyjádření závislosti As na Ca

Zde je závislost rovněž dosti těsná. Výsledky ukazují, že zvyšující se obsah arsenu koreluje se zvyšujícím se obsahem vápníku v naší frakci.

Tab. č. 17 Obsah As a Ca v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy

Vzorek	As v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	Ca v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy
K 28.5.	1,096	4,856
As1 28.5.	1,389	5,586
As2 28.5.	0,898	2,872
As3 28.5.	0,720	2,847
As1 11.6.	0,750	1,131
As2 11.6.	1,333	5,994

Graf č. 7: Grafické znázornění závislosti



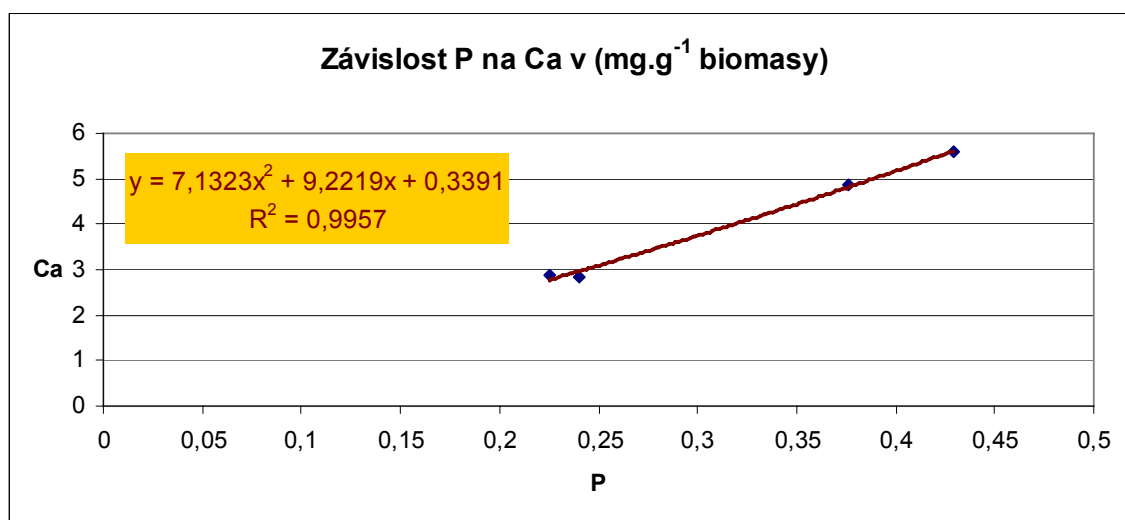
6.4.4 Vyjádření závislost P na Ca

Metabolismus fosforu a vápníku by měl mít velmi těsnou závislost. To proto, že aby rostlina dobře snášela vyšší dávky arsenu a metabolismus fosforu fungoval tak jak má, potřebuje i vyšší dávky vápníku. Rovněž i v tomto případě je hodnota determinační koeficientu dosti vysoká $R^2 = 0,9952$, a tím závislost prvků poměrně úzká.

Tab. č. 18: Obsah P a Ca v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy

Vzorek	P v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy	Ca v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasy
K 28.5.	0,376	4,856
As1 28.5.	0,429	5,586
As2 28.5.	0,225	2,872
As3 28.5.	0,240	2,847
As1 11.6.	0,082	1,131
As2 11.6.	0,148	5,994

Graf č. 8: Grafické znázornění závislosti



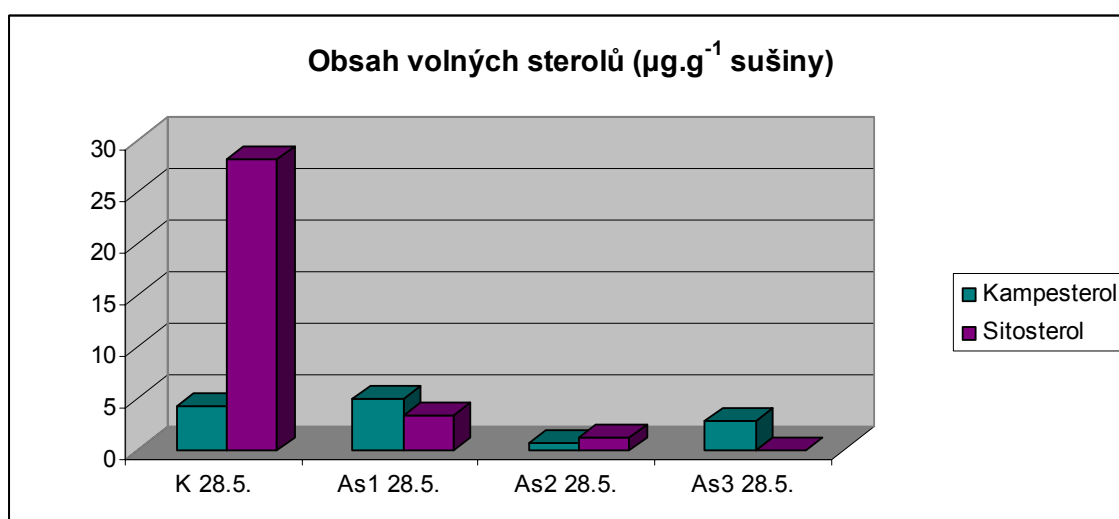
6.5 Obsah sterolů v jednotlivých frakcích

Množství sterolů bylo stanovováno při extrakci MeOH, po odpaření extraktu a po následném vytřepání. K vytřepání jsme použili petrolether a vzniklou frakci jsem změřili na přístroji HPLC. Výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v tabulce č. 19.

Tab. č. 19 Obsah volných sterolů

Vzorek	Kampesterol $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny	Sitosterol $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny
K 28.5.	4,28	28,13
As1 28.5.	4,87	3,25
As2 28.5.	0,69	1,24
As3 28.5.	2,78	0
As1 11.6.	1,21	4,43
As2 11.6.	14,2	33,65

Graf č. 9: Obsah volných sterolů



Často zkoumané rostlinné steroly jsou sitosterol, stigmasterol a kampesterol. My jsme v našem pokusu sledovali obsah sitosterolu a kampesterolu v rostlině špenátu setého. Jak uvádí Piironen et al., (2000), rostlinné steroly jsou základní součástí membrán všech eukaryotických organismů. A podle Schallera, (2003) jsou rostlinné steroly primární součástí buněčných membrán, kde řídí přizpůsobivost a propustnost. Kampesterol a sitosterol jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu.

Z našich výsledků je vidět, že obsah arsenu v rostlině ovlivňuje množství rostlinných sterolů. U varianty As3 28.5. (to je varianta s největším přidavkem arsenu) je hodnota sitosterolů $0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. To znamená, že v tomto vzorku byl obsah sitosterolů pod mezí detekce. Obsah rostlinných sterolů se postupně snižuje. Čím více arsenu se v rostlině vyskytuje, tím méně sterolů

je v rostlině obsaženo. Tím dochází k ovlivnění membrán, membrány se stávají více propustné. Množství rostlinných sterolů rovněž může být ovlivněno druhem rostliny.

7. Závěr

Rizikové prvky jsou jednoznačně jedním z kontaminantů životního prostředí, které ovlivňují všechny organismy včetně člověka.

Z výsledků této práce vyplývá, že vlivem zvyšujícího se množství arsenu do půdy dochází k větší akumulaci arsenu v nadzemní biomase špenátu setého. Toto je dobře patné na polygonu druhého stupně, kdy je hodnota determinálního koeficientu $R^2 = 0,9631$, což je závislost téměř lineární. Ale zároveň v důsledku přidavku arsenu do půdy dochází ke snížení výnosů jak čerstvé hmoty tak i výnosů sušiny. Pokud bychom toto chtěli vyjádřit procenticky, lze říci, že u varianty As1 (přídavek 25 mg As.kg⁻¹) došlo ke snížení výnosu zhruba o 15 %, u varianty As2 (50 mg As.kg⁻¹) o 18 %, u varianty As3 (75 mg As.kg⁻¹) o 55 % oproti kontrole.

Dalším cílem práce bylo zjistit jak dané množství arsenu přijatého rostlinou působí na metabolismus rostlin. Je patrné, že dochází k fyziologickým změnám v jejich metabolismu, protože větší množství arsenu způsobuje rostlině stress. Reakcí rostliny na stress mohou být metabolické poruchy. Ve frakcích, které byly extrahovány, bylo analyzováno množství arsenu a dalších vybraných prvků. Z těchto výsledků lze usuzovat i jejich závislost mezi sebou, kterou jsme vyjádřili pomocí polynomické funkce druhého stupně. Hodnoty determinálního koeficientu potvrdily, že závislost arsenu na fosforu; fosforu na arsenu; arsenu na vápníku a fosforu na vápníku je poměrně vysoká.

Z výsledků extrakce je rovněž patné, že došlo ke snížení obsahu sitosterolu a kampesterolu, na které jsme se zaměřili. Jejich funkcí v rostlinných membránách je řídit přizpůsobivost a propustnost. Po celkovém zhodnocení výsledků lze konstatovat, že vlivem přidavku arsenu došlo k jejich snížení, došlo k porušení funkce membrány. Membrána se stala propustnější, což samozřejmě rostlině způsobuje stres.

8. Seznam použité literatury

1. ADRIANO D. C. (2001) : Trace Elements in Terrestrial Environments. Springer-Verlag, New York, 866 s.
2. BALÍK J., PAVLÍKOVÁ D., HLUŠEK J., PROVAZNÍK K. (2004) : Zdroje rizikových prvků v životním prostředí. Sborník z 10. mezinárodní konference zaměřené na problematiku rizikových látek v rostlinné výrobě. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 22-29.
3. BENEŠ S. (1993) : Obsah a bilance prvků ve sférách životního prostředí, část první, Praha MZe ČR, 88 s.
4. BENCO V., CIKRT M., LENER J. (1995) : Toxické kovy v životním a pracovním prostředí. Grada Publishing, 282 s.
5. CIBULKA J. et al. (1991) : Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. Academia, Praha, 432s.
6. EISLER R. (2007) : Eisler's Encyklopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals. Amsterdam, 501 s.
7. FITZ W., WENZEL W. W. (2002) : Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of Biotechnology 99, (3), s. 259-278.
8. HARTMANN M. A. (1998): Plant sterols and the membrane environment. Trends in Plant Science 3, (5), s. 170-175.
9. HLUŠEK J., RICHTER R., RYANT P. (2002) : Výživa a hnojení zahradních plodin. Vydáno redakcí odborných časopisů, 81 s.
10. JOHANSSON-KORNFELDT A. (1979) : Sterols in Vegetable Oils, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 40 s.

11. KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. (2001) : Trace Elements in Soil and Plants. Boca Raton, Florida, CRC Press, 315 s.
12. KAFKA Z., PUNČOCHÁŘOVÁ J. (2002) : Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita, Chemické listy 96. s.611-617.
13. KOŘÍNEK K., TLUSTOŠ P., SZÁKOVÁ J., BALÍK J. (2003) : Akumulace arsenu a kadmia v zeleninách pěstovaných ve znečištěné oblasti. Sborník z 9. mezinárodní konference zaměřené na setrvalý rozvoj a precizní zemědělství. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 155-158.
14. MALÝ I., BARTOŠ J., KOPEC K., PETŘÍKOVÁ K., POD J., SPITZ P. (1998) : Polní zelinářství. Agrospoj. 196 s.
15. MOREAU R. A., WHITAKER B. D., HICKS K. B. (2002) : Phytosterols , phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. Progress in Lipid Research 41, s. 457-500.
16. 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, s. 199–223.
17. PAVLÍKOVÁ D., PAVLÍK M., MATĚJŮ L., BALÍK J. (2007) : Ekotoxikologie, ČZU, Praha, 152 s.
18. PAVLÍKOVÁ D., STASZKOVÁ L., PAVLÍK M., SZÁKOVÁ J., NAJMANOVÁ J. (2003) : Reakce špenátu na stres vyvolaný Cd a Zn. Sborník z 9. mezinárodní konference zaměřené na setrvalý rozvoj a precizní zemědělství. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 165-168.
19. PEKÁRKOVÁ E. (2002) : Pěstujeme salát, špenát a další listové zeleniny. Grada Publishing, 90 s.
20. PETROLD Z. (1998) : Arzen v životním prostředí. Vesmír 77. (6). s. 324-326.

21. PIIRONEN V., LINDSAY D., MIERRINEN T., TOIVO J., LAMPI A. (2000) : Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *Journal of Science of Food and Agriculture* 80: s. 939-966.
22. PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK a kol. (1998) : *Fyziologie rostlin*. Academia Praha, 486 s.
23. PROKEŠ J., BARTONÍČEK F., BRANIŠ M., POUČKOVÁ P., ŠTABLOVÁ R., ŠTAMBERGOVÁ A., VEČERKOVÁ J., WENKE M. (2005) : *Základy toxikologie*. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. 248 s.
24. RICHTROVÁ E., TLUSTOŠ P., SZÁKOVÁ J. (2005) : Příjem arsenu vybranými rostlinami. Sborník z 11. mezinárodní konference zaměřené na problematiku vápnění. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 135-138.
25. SCHALLER H. (2003) : The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* 42, s.163-175.
26. SMITH E., NAIDU R., ALSTON A. M. (1998) : Arsenic in the Soil Environment: A Review. *Advances in Agronomy* 64. s.149-195.
27. SOUDEK P., VÍCHOVÁ L., VALENOVÁ Š., PODLIPNÁ R., MALÁ J., VANĚK T. (2006) : Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické listy* 100. s. 323-329.
28. SZÁKOVÁ J., MICHALJEVIČ M., TLUSTOŠ P. (2007a) : Mobilita, transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a rostlinách. *Chemické listy* 101. s. 397-405.
29. SZÁKOVÁ J., TLUSTOŠ P. (2004) : Analytické metody stanovení rizikových prvků a reprodukovatelnost analýz. Sborník z 10. mezinárodní konference zaměřené na problematiku rizikových látek v rostlinné výrobě. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 61-68.
30. SZÁKOVÁ J., TLUSTOŠ P., BALÍK J., PAVLÍKOVÁ D., BALÍKOVÁ M. (2001) : Použití sekvenčního extrakčního postupu pro posouzení vlivu přídatku upraveného čistírenského kalu na mobilitu Cd a Zn v půdě. *Chemické listy* 95. s. 645-648.

31. SZÁKOVÁ J., TLUSTOŠ P., GOESSLER W., PAVLÍKOVÁ D., SCHMEISSER E. (2007b) : Response of Pepper Plants (*Capsicum annum* L.) on Soil Amendment by Inorganic and Organic Compounds of Arsenic. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52, s. 36-46.
32. TLUSTOŠ P., GÖSSLER W., SZÁKOVÁ J., PAVLÍKOVÁ D., BALÍK J. (2004) : Arsenic compounds in the leaves and roots of radish grown in three soils treated by dimethylarsenic acid. Plant, Soil and Environment 50 (12), s. 540-546.
33. TLUSTOŠ P., ŠICHOROVÁ K., SZÁKOVÁ J., PAVLÍKOVÁ D. (2003) : Plošná variabilita znečištění půd těžkými kovy. Sborník z 9. mezinárodní konference zaměřené na setrvalý rozvoj a precizní zemědělství. Racionální použití hnojiv. Praha, ČZU, s. 165-168.
34. TREBICHA VSKÝ J., ŠAVRDOVÁ D., BLOHBERGER M. (1997) : Toxické kovy. NSO, Kutná Hora, 483 s.
35. VACEK J., KIZEK R., KLEJDUS B., HAVEL L. (2003) : Fytochelatiny a jejich role pro detoxikaci těžkých kovů: biosyntéza, regulace a transport. Biologické listy 68 (2), s. 133-153
36. VANĚK V., BALÍK J., PAVLÍKOVÁ D., TLUSTOŠ P. (2002) : Výživa a hnojení polních a zahradních plodin, Vydání třetí, Praha, 132 s.
37. VÁCHA R., MACUROVÁ H., SKÁLA J., HAVELKOVÁ M., ČECHMÁNKOVÁ J., HORVÁTHOVÁ (2008) : Possibilities of some methods for risk assessment of arsenic load in soil, Plant, Soil and Environment 54, (7). s. 279 – 287.
38. VINCENC J. (1997) : Rizikové prvky v půdě a ve finálním produktu řepky ozimé a slunečnice. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno. 32 s.
39. VOET D., VOETOVÁ J. G. (1990) : Biochemie. Victoria Publishing, Praha, 1325 s.
40. VYHLÁŠKA MINISTERSTVA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. Dostupné z <<http://portal.gov.cz/wps/portal/>>

41. WARREN G. P., ALLOWAY B. J., LEPU N. W., SINGH B., BOCHEREAU F. J. M., PENNY C. (2003) : Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *The Science of the Environment* 311. s. 19-33
42. YANG H. (2006): Nonvesicular sterol transport: two protein families and sterol sensor?. *Trends in Cell Biology* 16 (9). s. 427-432.
43. ZRŮST J., REJLKOVÁ M., HUŠEK J., JŮZL M., UŠŤÁK S. (2002) : Rizika pěstování brambor v půdách kontaminovaných kadmíem, arsenem, beryliem. Havlíčkův Brod. 44 s.
44. INTERNETOVÝ ZDROJ 1: Wikipedie – otevřená encyklopedie. Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Arsen>> [citováno 2008-05-05]
45. INTERNETOVÝ ZDROJ 2: Dostupné z <<http://www.sekk.cz/Prodej/Encyklopedie/SJATP.htm>> [citováno 2008-07-15]
46. INTERNETOVÝ ZDROJ 3: Kolektiv : Arsen a sloučeniny. Integrovaný registr znečišťování. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z < http://www.irz.cz/latky/arsen_a_sl> [citováno 2008-06-17]
47. INTERNETOVÝ ZDROJ 4: Krmenčík P., Kysilka J., : V.A Skupina – skupina dusíku. Toxikon. Dostupné z <http://www.biotox.cz/toxikon/anorgan/ja_5a.php#As> [citováno 2009-02-19]
48. INTERNETOVÝ ZDROJ 5: Český herbář. Nakladatelství Alois Hynek. Praha 1899. Špenát setý. Dostupné z <<http://botanika.wendys.cz/cherbar/heslo.php?670>> [citováno 2009-03-18]

9. Seznam příloh

Příloha č.1 Fotodokumentace - Kontrolní varianta špenátu setého

Příloha č.2 Fotodokumentace - Porovnání kontrolní varianty (vlevo) a varianty As2 (vpravo)

Příloha č.3 Fotodokumentace - Vzorky v ultrazvukové lázni

Příloha č.4 Fotodokumentace - Oddělování jednotlivých frakcí

Příloha č.5 Fotodokumentace - Oddělování jednotlivých frakcí

Příloha č. 1 - Kontrolní varianta špenátu setého



Příloha č.2 - Porovnání kontrolní varianty (vlevo) a varianty As2 (vpravo)



Příloha č.3 - Vzorky v ultrazvukové lázni



Příloha č.4- Oddělování jednotlivých frakcí



Příloha č.5 - Oddělování jednotlivých frakcí

