

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Aleš Redlich

Mikrobiální mobilizace arsenu v půdách na zlatonosném ložisku
Mokrsko

Microbial mobilization of arsenic in soil at the Mokrsko gold
deposit

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Petr Drahoš, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Mgr. Petra Drahoty, Ph.D., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. 7. 2011

.....

podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Petru Drahotovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a pomoc při řešení problémů. Dále děkuji RNDr. Janu Rohovcovi, Ph.D. za cenné rady v oblasti analytické chemie. V neposlední řadě děkuji Mgr. Lukáši Falteiskovi za rady a provedení analýz z oblasti mikrobiologie. Poděkování si zaslouží také Mgr. Michal Filippi, Ph.D. za instruktáž a zapůjčení mikroskopické techniky. Práce vznikla za finančního přispění GAČR P210-10-P096.

Obsah

1 Úvod

2 Problematika arsenu v životním prostředí

- 2.1 Základní charakteristiky
- 2.2 Sloučeniny arsenu
- 2.3 Biogeochemický cyklus arsenu
- 2.4 Toxikologie
 - 2.4.1 Toxikokinetika
 - 2.4.2 Toxikodynamika

3 Půdní interakce

- 3.1 Mikrobiální rezistence
- 3.2 Bakteriální redukce
 - 3.2.1 Anaerobní respirace
 - 3.2.2 Detoxifikační redukce

4 Studované území

- 4.1 Geologie oblasti
- 4.2 Dosavadní výzkum
- 4.3 Cíle diplomové práce

5 Experimentální část

- 5.1 Použité chemikálie
- 5.2 Použité přístroje
- 5.3 Odběr a zpracování vzorků
- 5.4 Metodika experimentů
 - 5.4.1 Celkové obsahy
 - 5.4.2 Mineralogická charakteristika
 - 5.4.3 Zdroj organické hmoty
 - 5.4.4 Inkubace regolitu a sedimentu
 - 5.4.5 Sekvenční extrakční analýza
 - 5.4.6 Kultivace bakterií
 - 5.4.7 Identifikace bakterií
- 5.5 Výsledky experimentů a analýz
 - 5.5.1 Celkové obsahy
 - 5.5.2 Mineralogická charakteristika

- 5.5.3 Zdroj organické hmoty
- 5.5.4 Inkubace regolitu a sedimentu
- 5.5.5 Výsledky sekvenční extrakce
- 5.5.6 Identifikace bakterií

6 Diskuse

- 6.1 Výběr vzorků pro studium mobilizace
- 6.2 Charakteristika vzorků
- 6.3 Výběr zdroje organické hmoty
- 6.4 Inkubace a sekvenční extrakce regolitu a sedimentu
- 6.5 Výsledky identifikace bakterií
- 6.6 Dopady na životní prostředí

7 Závěr

8 Použitá literatura

Abstrakt

Zlatonosné ložisko Mokrsko je oblast vyznačující se vysokou koncentrací arsenu v půdách. Přirozeně kontaminované vzorky regolitu a fluviálního sedimentu z této oblasti byly použity ke zhodnocení příspěvku mikrobiální činnosti na mobilizaci arsenu. Ve vzorcích regolitu s obsahem 905 mg kg^{-1} a sedimentu s obsahem 1749 mg kg^{-1} arsenu byla identifikována řada arsenonosných minerálů. V regolitu převládá goethit s vazbou arsenu nad Ba-farmakosideritem a arseniosideritem, zatímco v sedimentu je hlavním nositelem arsenu novotvořený realgar a méně goethit a výše zmíněné arseničnany. Ke zhodnocení vlivu mikrobiální mobilizace arsenu byly oba vzorky podrobeny inkubaci v aerobních a anaerobních podmínkách. Po přidání glukosy jako vhodného zdroje organického materiálu pro přítomné mikroorganismy došlo k výraznému urychlení mobilizace arsenu v anaerobních podmínkách. Vysoký korelační koeficient mezi vylouženým množstvím arsenu a železa naznačuje, že uvolňování arsenu se odvíjí od reduktivního rozpouštění HFO, případně sekundárních arseničnanů (Ba-farmakosiderit a arseniosiderit). Na druhé straně docházelo k menšímu uvolnění arsenu ze sedimentu během aerobní inkubace vlivem mikrobiálně řízené oxidace sekundárního realgaru. Ve snaze zjistit, jsou-li ve vzorcích přítomny bakteriální druhy podílející se přímo na redukcí As^{5+} , byla provedena kultivace a následná identifikace bakterií tolerujících As^{5+} s jedním pozitivním výsledkem. Jedná se o nález bakterie *Pseudomonas putida* ve fluviálním sedimentu. Pomocí inkubačních experimentů byl prokázán vliv mikrobiální činnosti na zvýšení mobility arsenu v regolitu a fluviálním sedimentu, který pravděpodobně hraje významnou roli ve zvýšených koncentracích arsenu ve vodách na ložisku Mokrsko.

Abstract

The Mokrsko gold deposit is characterised by high arsenic concentrations in regolith. Naturally contaminated regolith and stream sediment samples have been studied in order to determine microbially mediated processes that lead to As mobilization. Arsenic concentration in regolith and sediment were 905 mg kg^{-1} and 1749 mg kg^{-1} , respectively. The mineralogy of arsenic in the regolith is dominated by arsenic-bearing goethite and minor arseniosiderite and Ba-pharmacosiderite. In contrast, highly reducing sediments are mainly characterised by secondary realgar and less arsenic-bearing goethite and secondary arsenates. These samples were used for incubation experiments under both aerobic and anaerobic conditions. When glucose was supplied as a C source under anaerobic conditions, indigenous bacteria significantly enhanced the extent of As release from the solid samples into solution. Highly positive correlation between the extracted amount of As and Fe implied that the microbial dissolution of Fe(III)-oxides is responsible for the As release, with possible contribution of secondary arsenates dissolution. On the other side, small amount of arsenic was released from the sediment during the aerobic incubation through the microbially mediated oxidation of secondary realgar. In attempt to find some bacterial species responsible for the As(V) reduction, cultivation and identification of As(V)-tolerant bacteria species were carried out with one positive result. *Pseudomonas putida* was found in the sediment sample. The results of the study indicated a direct microbial arsenic-mobilizing activity in the regolith and stream sediment that may contribute to high dissolved arsenic concentrations in natural waters at the Mokrsko gold deposit.

Použité zkratky a symboly

A	– azid
Aox	– arsenitan-oxidáza
ARM	– As ⁵⁺ rezistentní mikroorganismy
Arr	– arseničnan-reduktáza
ATDSR	– Agentura pro registraci toxických látek a nemocí
ATP	– adenosintrifosfát
bp.	– počet párů bazí
BSE	– zpětně odražené elektrony
CAS	– databáze Chemical Abstract
DARP	– disimilativní arsen-redukující prokaryota
DMA	– dimethylarsinát
DMSO	– dimethylsulfoxid
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
E ⁰	– standardní redoxní potenciál
EDS	– metoda disperzní rentgenové spektroskopie
Eh	– redoxní potenciál
GlpF	– glycerolporinový přenašeč
gram-	– gramnegativní
gram+	– grampozitivní
Grx	– glutaredoxin
GSH	– glutathion
GÚ AVČR	– Geologický ústav Akademie věd České republiky
HFO	– hydratované oxidy železa
hm. %	– hmotnostní procento
ICP-OES	– optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
kol.	– kolektiv
LC - NMR	– kapalinová chromatografie s nukleární magnetickou rezonancí
LEA	– Laboratoř elementární analýzy
LOD	– detekční limit přístroje
M	– molární hmotnost, molární
MMA	– monomethylarsonát
n. p.	– národní podnik

PCR	– polymerázová řetězová reakce
Pit	– membránový přenašeč anorganického fosfátu
ppm	– mg kg^{-1}
PSP	– periodická soustava prvků
Pst	– specifický přenašeč fosfátu
R	– regolit
rpm	– počet otáček za minutu
S	– sediment
SD	– směrodatná odchylka
SE	– sekvenční extrakce, sekundární elektrony
SEM	– elektronová skenovací mikroskopie
TC	– celkový obsah uhlíku
TIC	– celkový anorganický uhlík
TK	– těžké kovy
TOC	– celkový organický uhlík
Trx	– thioredoxin
TS	– celkový obsah síry
TSA	– tryptický sójový agar
WDS	– metoda vlnově-disperzní spektrometrie
WHO	– Světová zdravotnická organizace
XRD	– metoda rentgenové difrakce
λ	– vlnová délka
ρ	– hustota

1 Úvod

Arsen je toxický prvek vyskytující se ve všech zemských sférách. Největším rezervoárem arsenu je litosféra, ze které putuje do ostatních sfér a vytváří svůj biogeochemický cyklus (Matschullat, 2000; ATSDR, 2007).

Po celém světě nalézáme v oblasti litosféry místa s mnohonásobně zvýšenou koncentrací arsenu oproti průměrným hodnotám (Mandal a kol., 2002; Vaughan, 2006). Příčinou výrazného nahromadění arsenu může být buď intenzivní antropogenní činnost (spalování, hutní a průmyslová výroba, těžba nerostných surovin, zemědělská činnost), nebo přirozené nakumulování arsenu během geologické evoluce daného území (vznik rudních ložisek a mineralogických výskytů s arsenovými minerály, vulkanická činnost) (WHO, 2001; Bissen a Frimmel, 2003).

V posledních letech se arsen dostává do popředí vědeckého zájmu, a to hlavně z důvodu množících se případů kontaminace podzemních vod arsenem mobilizovaným z půdy, sedimentů a zvětrávajících hornin. V obydlených oblastech dochází k přímému kontaktu člověka s arsenem zejména prostřednictvím kontaminované pitné vody, ve které je mnohonásobně překročen limit pro obsah arsenu v pitné vodě $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (ATSDR, 2007; WHO, 2008). V postižených oblastech jsou lidé dlouhodobě vystaveni vyšším dávkám tohoto toxického prvku a hrozí jim tak riziko vzniku chronických otrav a vážných zdravotních potíží (Mandal a kol., 2002; WHO, 2008). Mezi extrémní případy vodních zdrojů kontaminovaných arsenem, který se uvolňuje zvětráváním minerálů, patří Bangladéš nebo Západní Bengálsko. Zde je ohroženo na 40 milionů lidí, kteří jsou nuceni používat nevyhovující zdroje vody obsahující vysoké koncentrace arsenu (Mandal a kol., 2002; Stüben a kol., 2003; Ahmed a kol., 2004). Mezi další státy, které mají problémy s přirozenou kontaminací vody arsenem, patří Argentina, Čile, Taiwan, Čína, Mexiko, některé státy USA (Mandal a kol., 2002; Vaughan, 2006).

V České republice nepředstavuje výskyt arsenu v přírodě závažný ekologický nebo zdravotní problém. Antropogenním zdrojem kontaminace je především spalování nekvalitního hnědého uhlí s vysokým obsahem arsenu (Száková a kol., 2007; Erbanová a kol., 2008; Novák a kol., 2010). Z hlediska přirozené kontaminace je přítomnost vyššího množství arsenu vázána pouze na lokální zdroje spojené s historickou těžbou zlata a dalších kovů v oblasti Českého masivu (Filippi a kol., 2004; Száková a kol., 2007).

Jednou ze zajímavých lokalit, kde se v České republice setkáváme s abnormálním nahromaděním arsenu v přírodě, je zlatonosné ložisko Čelina-Mokrosko, ležící jižně od Prahy

(Janatka a Morávek, 1990). Jedná se o největší a dosud netěžené ložisko zlata v Českém masivu, objevené v letech 1978 - 1980 (Morávek a kol., 1989).

Během průzkumných prací na ložisku Čelina-Mokrsko se pracovníci společnosti Geoindustria Praha n. p., která na tomto území prospekci a průzkumné práce prováděla, setkali s ústně tradovaným názorem místních starousedlíků, podle něhož je prý v obci Mokrsko vysoká předčasná úmrtnost a častý výskyt zdravotních obtíží, laicky označovaných jako "černání nohou". Proto byla v roce 1985 provedena geomedicínská studie (Jílek, 1985) s cílem objasnit řadu onemocnění a úmrtí ve vesnici Mokrsko. Náplní studie bylo hydrochemické posouzení zdrojů pitné vody a přehled úmrtnosti obyvatelstva za delší časové období (20-30 let). Provedením prvkové analýzy studniční vody byly odhaleny možné příčiny zdravotních problémů obyvatel. Kromě zvýšených koncentrací dusičnanů a fosforečnanů byla u vzorků ze studen v obci Mokrsko naměřena koncentrace arsenu v rozmezí 255 - 1690 $\mu\text{g l}^{-1}$. To je 5 - 34x vyšší koncentrace než v té době doporučená hodnota 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ arsenu pro pitnou vodu. Arsen byl označen za hlavní zdravotně nežádoucí složku pitné vody v obci Mokrsko. Domněnka o vysoké úmrtnosti se však ukázala jako neopodstatněná. Nebyla prokázána přímá souvislost mezi úmrtími a vysokou koncentrací arsenu ve vodě. Případy "černání nohou", neboli tzv. Bürgerovy choroby, která je důsledkem změn ve složení krve a může vést až k nekróze tkání nebo smrti, byly označeny za náhodný jev a neměly přímou souvislost s podmínkami životního prostředí (přítomnost arsenu a dusičnanů ve vodě) (Jílek, 1985; Collins, 2003; WHO, 2008).

Objevením zlata a vysokých koncentrací arsenu se Mokrsko stalo atraktivním místem pro vědecký výzkum (Morávek a kol., 1989; Boiron a kol., 2001; Filippi a kol., 2004, 2007; Drahot a kol., 2006, 2009, 2011).

2 Problematika arsenu v životním prostředí

Předmětem studia přirozené kontaminace arsenem je mapování území s výskytem jeho abnormálního množství, zvětrávání hornin obsahujících arsen, speciálně a s ní spojená toxicita a zejména mobilita tohoto prvku v různých sférách životního prostředí (např. Cullen a Reimer, 1989; Mandal a Suzuki, 2002; Ahmed a kol., 2004; Routh a kol., 2007; Oremland a Stolz, 2005; Drahot a kol., 2006; Lee a kol., 2009, 2010). Arsen, který je v půdě a sedimentu vázán hlavně na sloučeniny železa, hliníku a manganu (Sadiq, 1995; Nicholas a kol., 2003), se za určitých podmínek uvolňuje do vodního prostředí, čímž se zvyšuje riziko kontaminace lidského organismu (Cummings a kol., 1999; WHO, 2001).

2.1 Základní charakteristiky

Arsen je polokov s atomovým číslem 33 a molární hmotností 74,92. Může se vyskytovat ve valenčních stavech -3 (arsenid), 0 (kovový arsen), +3 (arsenitý iont), +5 (arseničný iont). Elektroodový potenciál redoxního páru $\text{As}^{5+} / \text{As}^{3+}$ je +130 mV. Arsenitany vykazují za obvyklých podmínek vyšší hydrologickou mobilitu než arseničnany (Oremland a kol., 2009). Arsen patří mezi stopové prvky vzhledem k jeho průměrné koncentraci v zemské kůře 1,5 - 3 mg kg⁻¹ (Cullen a Reimer, 1989; WHO, 2001; Vaughan, 2006). V databázích arsen nalezneme pod registračním číslem CAS 7440-38-2 (www1).

Elementární arsen vytváří dvě základní alotropní modifikace. Prudkým ochlazením arsenových par vzniká tzv. žlutý arsen. Tato nestálá forma se přeměňuje na stálý ocelově šedý kovový arsen (Fara, 2004; ATSDR, 2007).

2.2 Sloučeniny arsenu

Arsen vytváří pestrou řadu anorganických i organických sloučenin (WHO, 2001). K nejběžnějším sloučeninám ve vodném prostředí patří kyselina arseničná (H_3AsO_4) a její anionty H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} a AsO_4^{3-} . Tyto specie jsou termodynamicky stále v oxidačním prostředí (Cullen a Reimer, 1989). Kyselina arseničná je v kyselém prostředí oxidační činidlo se standardním redoxním potenciálem $E^0 = 0,559 \text{ V}$ (Fara, 2004).

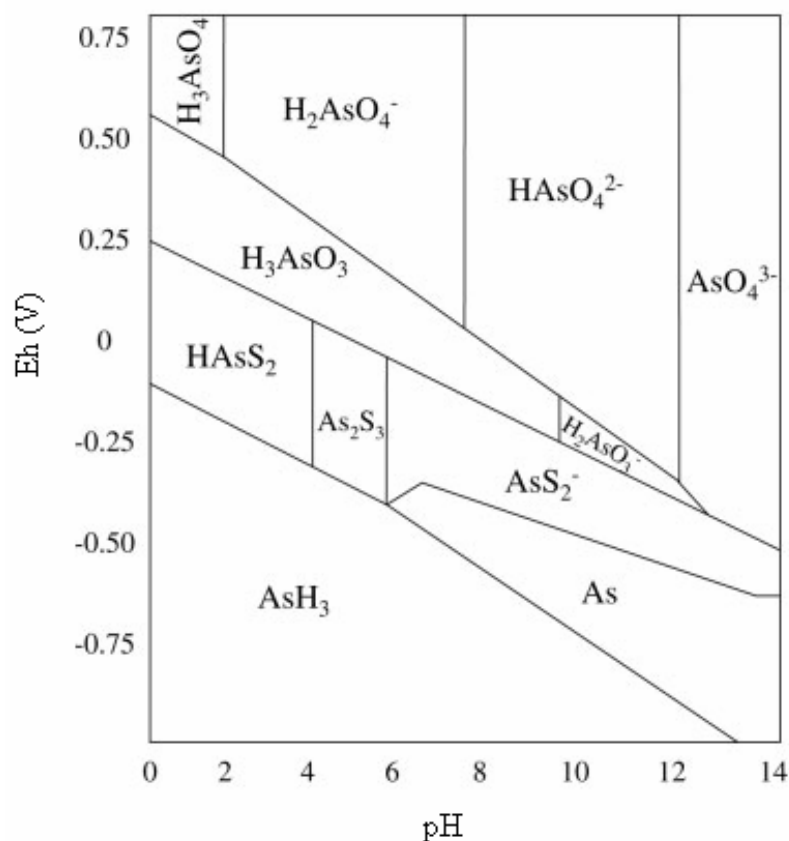
V redukčním vodném prostředí převládá arsen trojmocný jako kyselina arsenitá (H_3AsO_3), která při $\text{pH} > 9$ disociuje na H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} a AsO_3^{3-} (WHO, 2001; Bissen a Frimmel, 2003).

Další významnou sloučeninou je oxid arsenitý (As_2O_3), historicky známý jako jed arsenik. Je slabě rozpustný ve vodě za vzniku kyseliny arsenité (Fara, 2004). Ke stanovení As_2O_3 se v minulosti používala Marshova zkouška. Ta je založena na redukci sloučenin arsenu nascentním vodíkem na arsenovodík AsH_3 , který se po vysušení a zahřátí v úzké trubici rozloží na vodík a kovové zrcátko elementárního arsenu (www2).

Arsenovodík (arsan, AsH_3) je za normálních podmínek plyn česnekového zápachu, který vzniká v extrémně redukčních anaerobních podmínkách (Bissen a Frimmel, 2003; Fara, 2004). Arsan je pokládán za nejtoxičtější sloučeninu arsenu (Bissen a Frimmel, 2003). Podmínky existence specií jsou vyznačeny na pH - Eh diagramu na obrázku 1.

Prostřednictvím mikrobiálních procesů dochází ke vzniku organických sloučenin arsenu, a to nahrazením vodíku nebo hydroxylové skupiny anorganických sloučenin. Z arsanu tak vzniká monomethylarsan (CH_3AsH_2), dimethylarsan ($(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$) a trimethylarsan ($(\text{CH}_3)_3\text{As}$).

K organickým kyselinám s pětimocným arsenem patří např. kyselina monomethylarsonová ($\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$), dimethylarsinová ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$). K těmto procesům dochází v anaerobních podmínkách (Cullen a Reimer, 1989; Bissen a Frimmel, 2003; Vaughan, 2006). Další organické sloučeniny arsenu jsou zmíněny v kapitole 2.3.



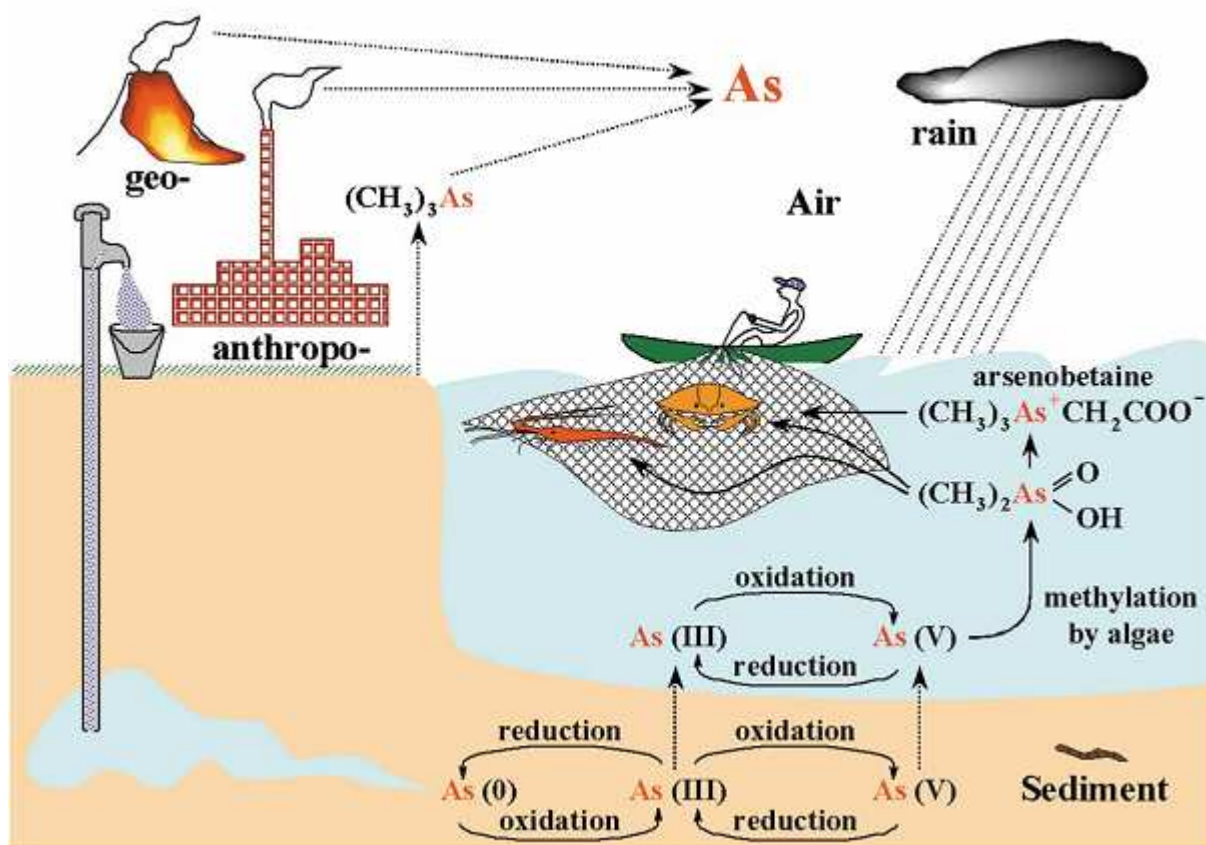
Obrázek 1: pH – Eh diagram systému As-O-S- H_2O (převzato z: Bissen a Frimmel, 2003).

Arsen je v přírodě běžnou složkou více než 300 primárních a sekundárních minerálů (Drahota a Filippi, 2009). Nejhojnějším primárním minerálem je arsenopyrit (FeAsS). Dalšími sulfidickými minerály jsou auripigment (As_2S_3), realgar (AsS), kobaltin (CoAsS) či enargit Cu_3AsS_4 . Arsen může být také příměsí sulfidických rud, ve kterých netvoří hlavní komponentu, především se váže na pyrit (FeS_2) (Mandal a Suzuki, 2002; Zachariáš a kol., 2004). Loellingit (FeAs_2) neboli arsenid železa představuje arsen s oxidačním číslem -III. Běžné jsou i arsenidy kobaltu, niklu nebo mědi. (WHO, 2001; Mandal a Suzuki, 2002; Bissen a Frimmel, 2003; O'Day, 2006). Oxidací arsenopyritu a dalších primárních minerálů arsenu mohou vznikat oxidy arsenolit, claudetit (As_2O_3), případně složitější sekundární arseničnany, jako jsou farmakosiderit ($\text{KFe}_4(\text{AsO}_4)_3(\text{OH})_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), skorodit ($\text{FeAsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pitticit ($\text{Fe}_x(\text{AsO}_4)_y(\text{SO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$), arseniosiderit ($\text{Ca}_2\text{Fe}_3\text{O}_2(\text{AsO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a mnoho dalších (Filippi a kol., 2007; Drahota a Filippi, 2009).

2.3 Biogeochemický cyklus arsenu

Biogeochemický cyklus daného prvku se skládá ze čtyř základních procesů. Jsou jimi horninový cyklus, koloběh vody, atmosferický transport a antropogenní procesy (Moldan, 2006). Cyklus arsenu je schematicky znázorněn na obrázku 2.

Primárním zdrojem arsenu je zemská kůra s přibližným obsahem $4 \cdot 10^{16}$ kg arsenu (Matschullat, 2000). Odtud se arsen v důsledku vulkanické činnosti, exhalace sopečných par a plynů, zvětrávání, eroze a biochemických reakcí uvolňuje a putuje do pedosféry, hydrosféry a atmosféry (Matschullat, 2000; Mukhopadhyay a kol., 2002).



Obrázek 2: Biogeochemický cyklus arsenu (převzato z: Mukhopadhyay a kol., 2002).

Pedosféra je heterogenní směs anorganického a organického materiálu (Matschullat, 2000). Arsen v půdě podléhá oxidačně-redukčním reakcím, které mají obvykle za následek změnu mobility prvku (Mukhopadhyay a kol., 2002; Száková a kol., 2007). V aerobních podmínkách je zde arsen přítomen zejména ve formě arseničnanů vázaných do krystalové struktury sekundárních minerálů arsenu, nebo vázaných adsorpcí a koprecipitací na hydratované oxidy železa, hliníku, jílové minerály a organickou hmotu. V redukčním prostředí arseničnany

snadno přechází na arsenitany. Některé půdní bakterie a houby mají schopnost methylovat anorganické sloučeniny a vytvářet tak organické sloučeniny arsenu (Száková a kol., 2007).

K obdobným redoxním a methylačním reakcím dochází v oblasti hydrosféry. Zde je arsen přítomen rovněž převážně ve formě arseničnanů a arsenitanů (Cullen a Reimer, 1989). Řasy, fytoplankton i drobní koryši a měkkýši se často podílejí na tvorbě organických sloučenin, většinou arsenobetainu ($C_5H_{11}AsO_2$) a arsenocholinu ($C_5H_{14}AsO$), které patří mezi kvartérní soli (Koplík a kol., 1997). Část arsenu se v tkáních a membránách organismů uloží ve formě arsenosacharidů a arsenolipidů (Mukhopadhyay a kol., 2002). K dalším methylovaným organickým sloučeninám přítomným ve vodě patří monomethylarsonát (MMA) a dimethylarsinát (DMA) (Száková a kol., 2007).

Vulkanická aktivita a produkty průmyslové činnosti tvoří hlavní toky arsenu do atmosféry (Matschullat, 2000). Koloběh uzavírá mokrá atmosferická depozice. Tímto procesem se arsen vrací do nižších sfér (Mukhopadhyay a kol., 2002).

V důsledku bioakumulace v rostlinných a živočišných tkáních putuje arsen podél potravního řetězce a dochází ke kontaminaci biosféry (Mukhopadhyay a kol., 2002; Száková a kol., 2007).

2.4 Toxikologie arsenu

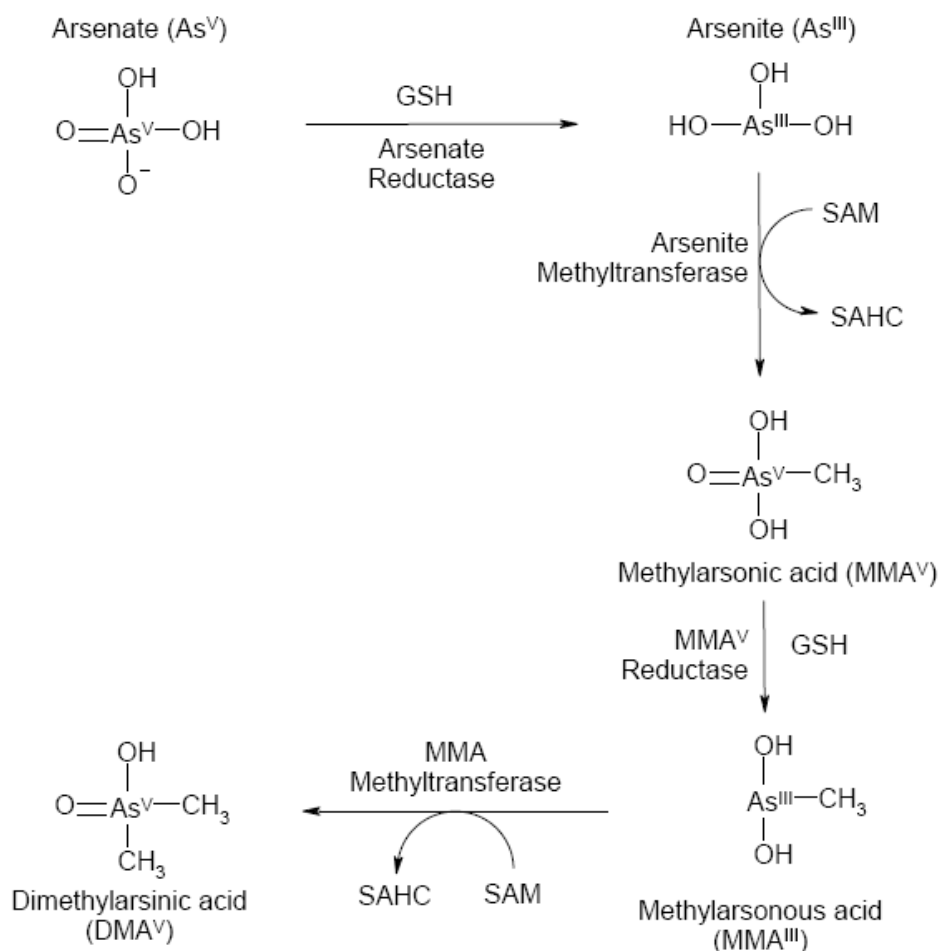
Toxicita prvku závisí na jeho formě, fyzikálně-chemických vlastnostech a biodostupném množství (Mandal a Suzuki, 2002). Obecně je trojmocný arsen pro organismy toxicitější než pětímocný (WHO, 2001; ATDSR, 2007) z důvodu jeho vyšší mobility a destruktivního působení na disulfidické vazby proteinů v organismech (Nicholas a kol., 2003; Oremland a kol., 2009). Anorganické sloučeniny vykazují vyšší toxicitu než sloučeniny organické. Toxicita klesá v řadě $AsO_3^{3-} > AsO_4^{3-} > CH_3AsO(OH)_2 > (CH_3)_2AsO(OH) > (CH_3)_3As^+CH_2COO^-$ (Koplík a kol., 1997). Zdravotní problémy jsou tedy způsobeny příjmem převážně anorganických sloučenin. Arsan a jeho methylované sloučeniny, přestože jsou vysoce toxické, nepředstavují v přírodě vysoké riziko intoxikace vzhledem k jejich těkavému charakteru a nízké rozpustnosti (ATDSR, 2007).

2.4.1 Toxikokinetika

Arsen vstupuje do lidského organismu orální, inhalační a ve velmi malé míře také transdermální cestou (Mandal a Suzuki, 2002). Inhalací se do těla dostává arsen hlavně ve

formě oxidu arsenitého. V potravě a vodě přijímáme arsen v podobě arseničnanů a arsenitanů (ATDSR, 2007).

Rozpuslné sloučeniny trojmocného i pětímocného arsenu jsou rychle vstřebávány v gastrointestinálním traktu. Metabolismus zahrnuje oxidačně-redukční reakce mezi As^{3+} a As^{5+} v plasmě a následnou metylaci As^{3+} v játrech za vzniku mono- a dimetylovaných produktů (obrázek 3) (Mandal a Suzuki, 2002). Donorem CH_3 - skupiny může být například cholin, cystein nebo methionin. Koncovými metabolity jsou kyselina methylarsonová a dimethylarsinová a v této podobě je arsen vylučován močí. Nemalá část přijatého arsenu (anorganického i organického) projde organismem beze změny (ATDSR, 2007). Nevyloučený arsen se akumuluje v jednotlivých tkáních (Mandal a Suzuki, 2002).



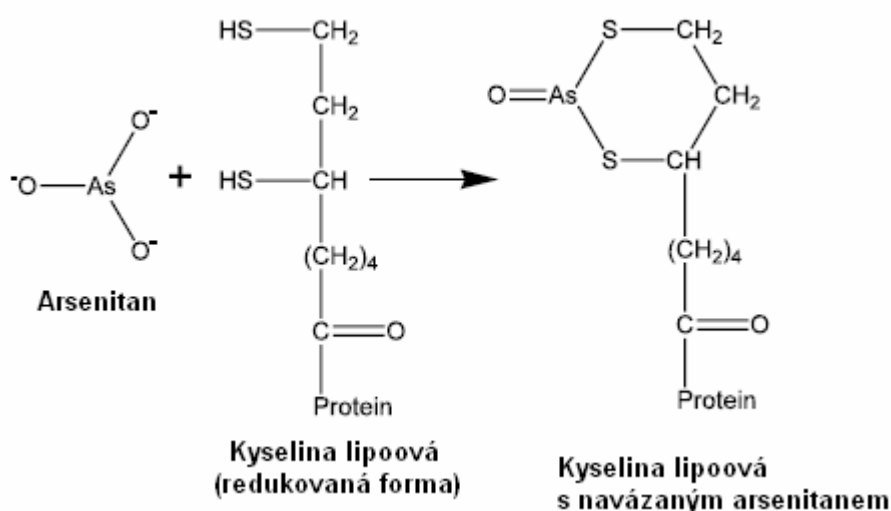
SAHC = S-adenosylhomocysteine; SAM = S-adenosylmethionine

Obrázek 3: Základní metabolická dráha anorganického arsenu (převzato z: ATDSR, 2007).

2.4.2 Toxikodynamika

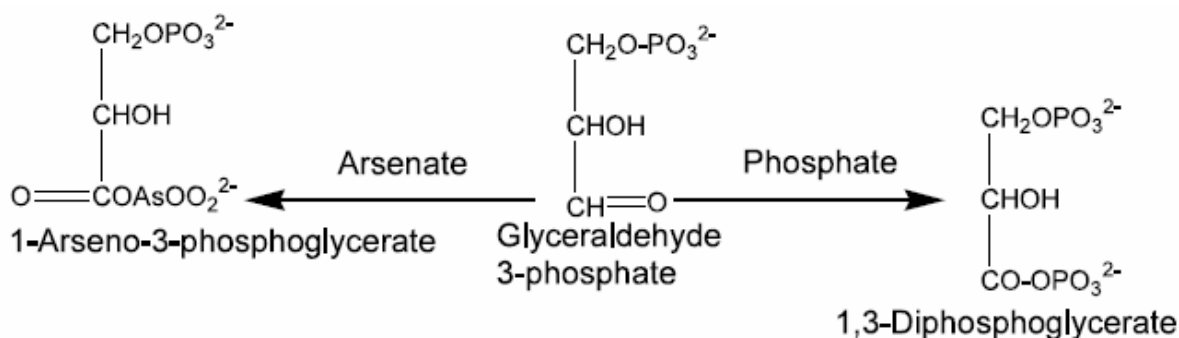
Arsen a jeho metabolity jsou bez významných preferencí distribuovány do všech orgánů a tkání a pomocí pasivní difúze vstupují do buněk. Mechanismus účinku na organismus se u trojmocného a pětímocného arsenu liší (ATDSR, 2007).

Působení arsenitanů spočívá v narušení enzymové aktivity, kdy se As^{3+} váže na $-\text{SH}$ a $-\text{OH}$ skupiny enzymů. Konkrétně se může jednat o inhibici pyruvát dehydrogenázy prostřednictvím vazby na její prostetickou skupinu – kyselinu lipoovou (obrázek 4). To vede k zastavení dalších enzymatických pochodů a produkce ATP v buňce (Mandal a Suzuki, 2002).



Obrázek 4: Vazba arsenitanu na kyselinu lipoovou (převzato z: Mandal a Suzuki, 2002).

Arseničnany AsO_4^{3-} rovněž zasahují do tvorby ATP, a to prostřednictvím kompetice s PO_4^{3-} , například v procesu glykolýzy (obrázek 5) nebo oxidativní fosforylace. Arseničnany mohou rovněž substituovat fosfát ve struktuře DNA (Mandal a Suzuki, 2002; Oremland a kol., 2003).



Obrázek 5: Vazba arseničnanu na glyceraldehyd-3-fosfát (převzato z: Mandal a Suzuki, 2002).

Akutní expozice arsenu vyvolává zvracení, silné bolesti břicha, poruchy nervového systému, selhání ledvin. Chronická expozice má za následek ztrátu tělesné hmotnosti, srdeční arytmií, zužování cév nebo hyperpigmentaci (Bissen a Frimmel, 2003). Dlouhodobý příjem sloučenin arsenu zvyšuje riziko výskytu rakoviny plic, jater a močového měchýře (ATDSR, 2007). Silná afinita As^{3+} k síře způsobuje akumulaci arsenu v keratinových tkáních (Mandal a Suzuki, 2002).

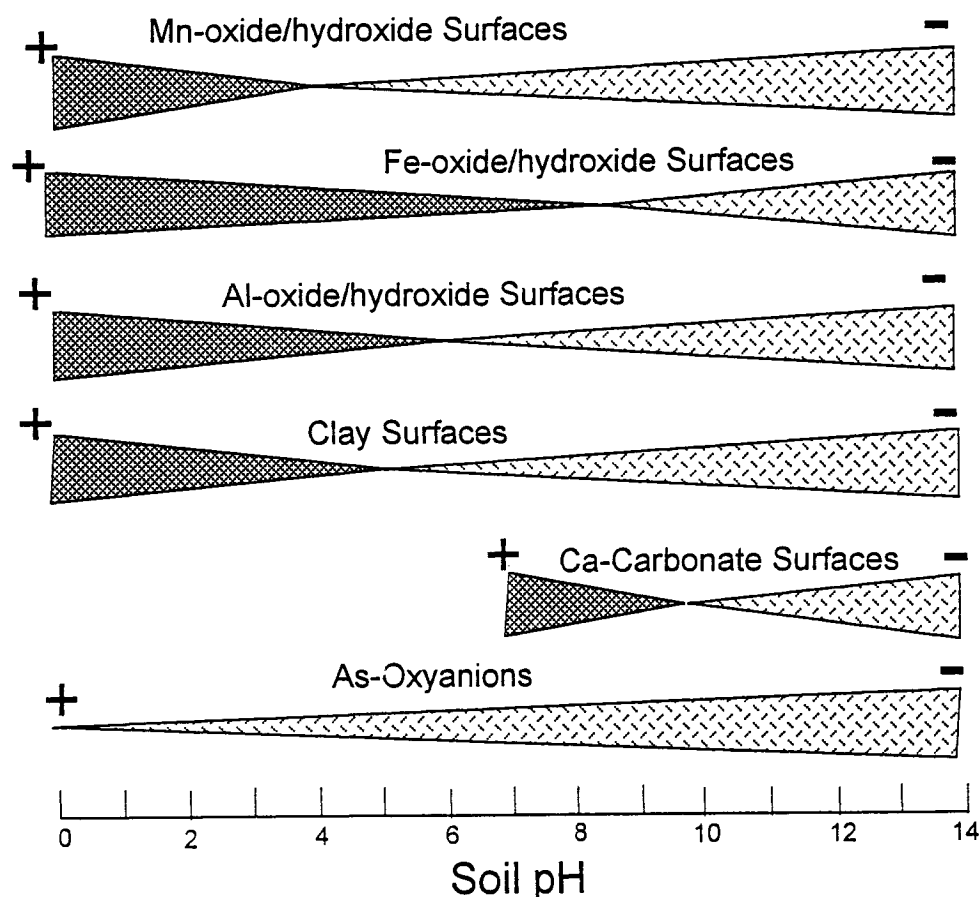
3 Půdní interakce

Chemie arsenu v půdě je závislá na složení pevné fáze, složení půdního roztoku, redoxních podmínkách a na aktivitě půdních mikroorganismů (Sadiq, 1995).

Poměr $\text{As}^{5+} / \text{As}^{3+}$ v prostředí je ovlivněn přítomností ostatních redoxních párů, zejména $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$, $\text{N}^{5+} / \text{N}^{3+} / \text{N}^0$, $\text{Mn}^{4+} / \text{Mn}^{2+}$ a $\text{S}^{6+} / \text{S}^{4+} / \text{S}^0 / \text{S}^{2-}$ (Frankenberger Jr., 2009).

Důležitým faktorem, který ovlivňuje koncentraci arsenu v roztoku, je jeho adsorpce/desorpce na pevné substráty (Bowell, 1994; Frankenberger Jr., 2009). Tento děj je dle charakteru vzniklé vazby složen z fyzikální adsorpce a chemisorpce a vede k značnému omezení mobility a snížení dostupnosti rozpuštěného arsenu (Cullen a Reimer, 1989; Sadiq, 1995). V této souvislosti se arsen vyznačuje afinitou zejména k povrchům hydratovaných oxidů Fe, Mn, Al, jílových minerálů, uhličitánů a organické hmotě. Povrchy těchto (často koloidních) částic mají specifický náboj, který se u většiny substrátů může měnit při změně pH prostředí. Obecně platí, že povrchy substrátů mají za vyššího pH záporný náboj a přitahují kladné ionty, zatímco při nižším pH kladný náboj přitahuje oxoanionty arsenu (obrázek 6). Po obsazení všech adsorpčních míst může následovat srážení sekundárních minerálů arsenu (Sadiq, 1995).

Dominantním procesem je adsorpce a koprecipitace arsenu na hydratovaných oxidech železa (HFO) (Cullen a Reimer, 1989; Nicholas a kol., 2003). Odtud se arsen mobilizuje redukcí svých iontů, rozpadem adsorbentu, tj. redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} , a rozpouštěním při snížení pH (Bowell, 1994; Sadiq, 1995; Radloff, 2007; Frankenberger Jr., 2009). Redukce Fe^{3+} probíhá jak abiotickou, tak mikrobiální cestou (obrázek 7), a to pomocí bakterií využívajících Fe^{3+} jako akceptor elektronů při respiraci, např. *Shewanella alga* (Cummings, 1999; Frankenberger Jr., 2009). Redukce As^{5+} a Fe^{3+} mohou probíhat současně (Campbell a kol., 2006; Lloyd a Oremland, 2006).

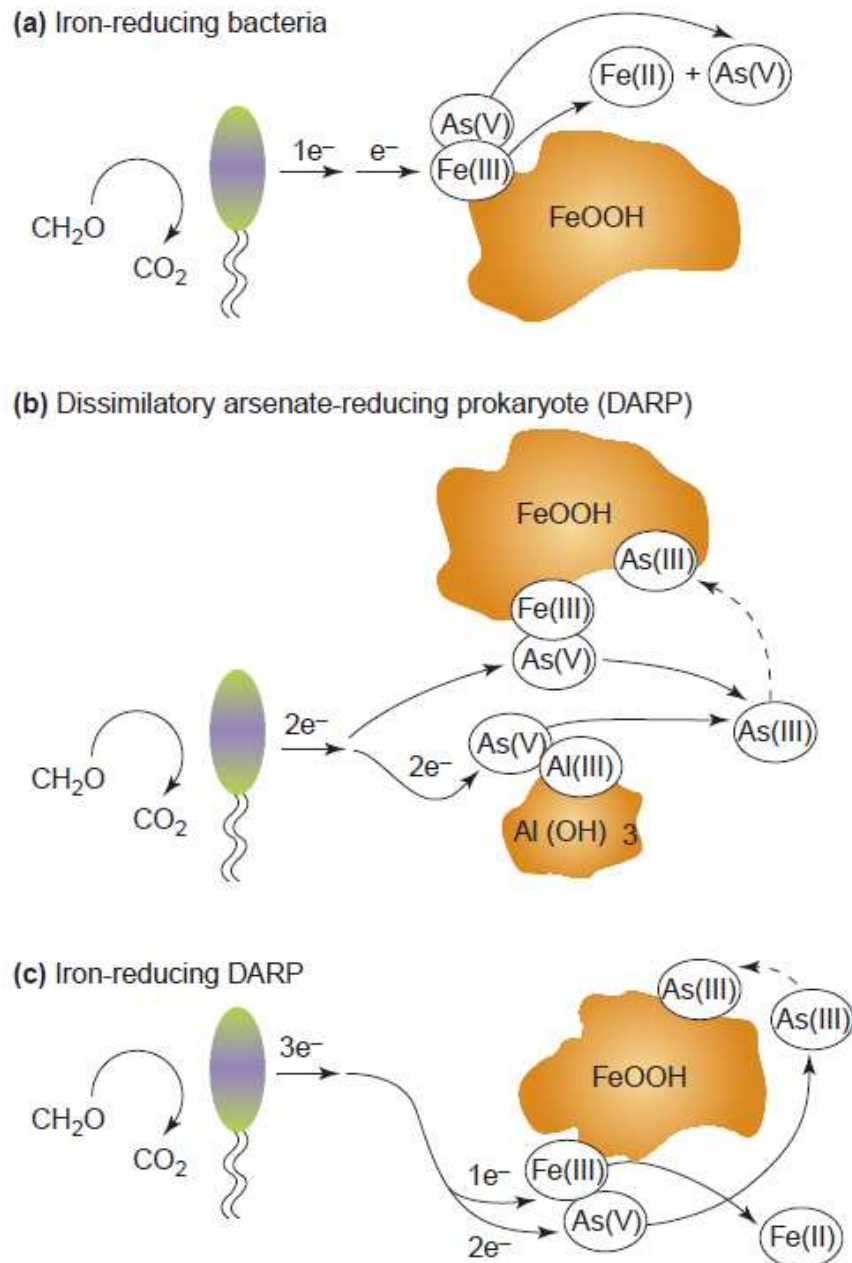


Obrázek.6: Rozložení náboje koloidních částic v závislosti na pH půdy (převzato z: Sadiq, 1995).

Řada bakterií a hub disponuje schopností arsen různým způsobem transformovat. Vedle již zmíněné methylace (kapitola 2.3) se jedná o oxidačně-redukční metabolické reakce nevytvářející vazbu arsen - uhlík (Cullen a Reimer, 1989; Mukhopadhyay a kol., 2002; Yamamura, 2009). Tyto mikrobiální aktivity probíhající ve vodách, půdách a sedimentech mají vliv na speciaci a biodostupnost arsenu (Oremland a Stolz, 2005) a také mohou být odpovědné za sezónní variabilitu ve speciaci a koncentraci arsenu (Nicholas a kol., 2003).

3.1 Mikrobiální rezistence

Protože arsen nepatří mezi esenciální prvky, buňka nemá důvod jej přirozeně přijímat a nemá vyvinuty specifické cesty pro jeho vstup do vnitrobuněčného prostoru. Jako zástupce 5A skupiny PSP tvoří arsen sloučeniny analogické s dusíkem a fosforem, což jsou přirozené složky organismu (Oremland a kol., 2009; Páez-Espino a kol., 2009). Arseničnany jsou proto buňkami přijímány prostřednictvím fosforečnanových transportérů *Pit* (phosphate inorganic transporter) a *Pst* (phosphate specific transporter), se silnou preferencí *Pit* systému (Páez-Espino a kol., 2009).

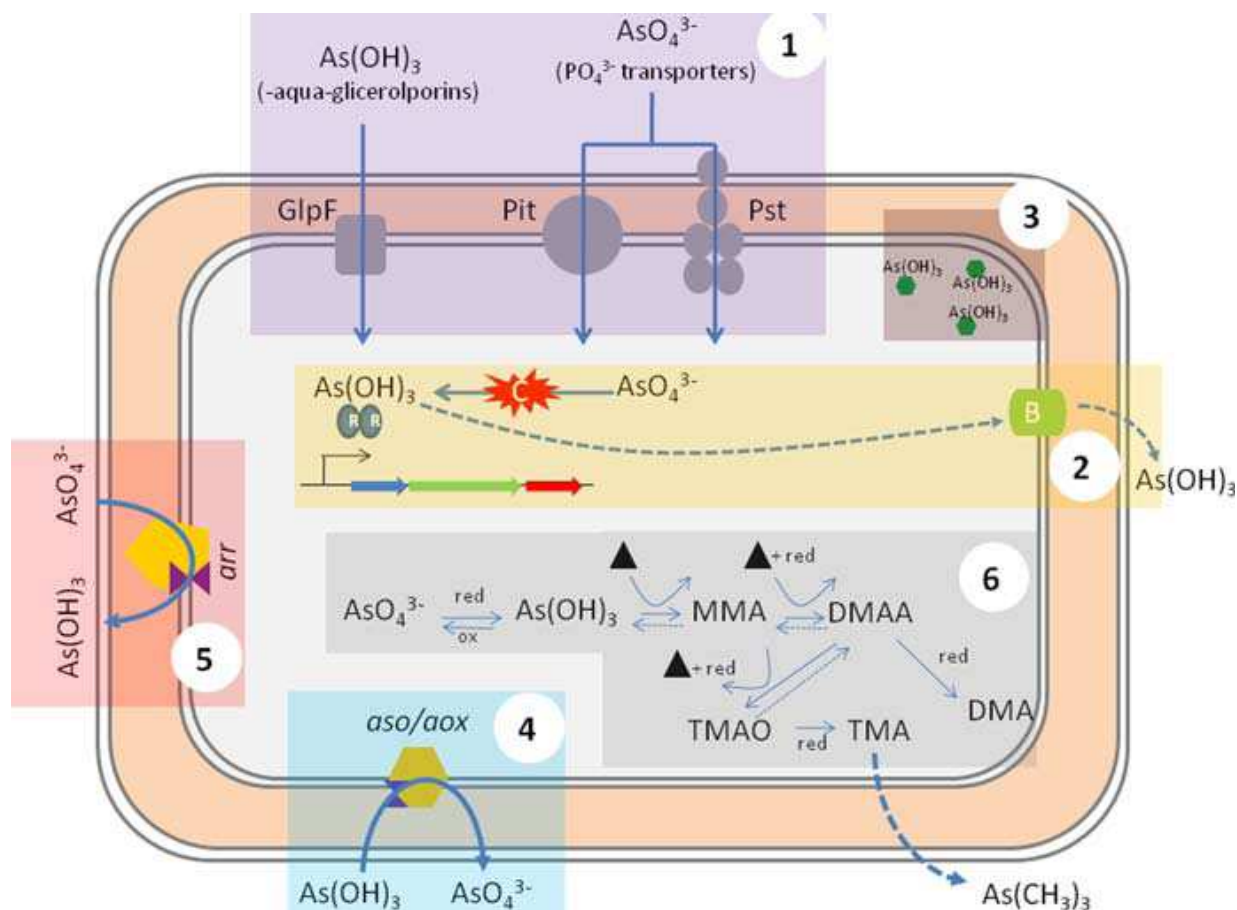


Obrázek 7: Mechanismy mobilizace arsenu mikrobiální cestou (převzato z: Oremland a Stolz, 2005). a) uvolnění As^{5+} prostřednictvím Fe^{3+} redukujících bakterií b) uvolnění adsorbovaného arsenu z povrchu minerálů prostřednictvím As^{5+} redukujících bakterií c) současná redukce a uvolnění As^{3+} a Fe^{2+} pomocí bakterií a případná readsorpce As^{3+} .

I přes chemickou podobnost arsenu a fosforu dokáže *Pst* systém rozlišit mezi fosforečnanem a arseničnanem, a to zhruba 100x přesněji než *Pit* systém. U organismů, kde přísun fosforečnanu závisí na *Pit*, dojde při dlouhodobé expozici arsenu k vyčerpání buněčné ATP a následné akumulaci arsenu uvnitř buňky (Frankenberger Jr., 2009). Podobnost pK_a kyseliny arseničné (2,2; 7; 11,5) a kyseliny fosforečné (2,1; 7,2; 12,7) se využívá při

uvolňování aniontů z membránových transportérů uvnitř buňky (Mukhopadhyay a kol., 2002).

Trojmocný arsen je do buněk při fyziologickém pH transportován ve formě nenabitě částice $\text{As}(\text{OH})_3$ přes aqua-glycerolporinový transportér GlpF (obrázek 8) (Páez-Espino a kol., 2009).



Obrázek 8: Vstup a transformace arsenu v bakteriální buňce (převzato z Páez-Espino a kol., 2009). 1) transport arsenu přes membránu 2) redukce arseničnanu na arsenitan 3) komplexace As^{3+} peptidy s vysokým obsahem cysteinu 4) As^{3+} jako donor elektronů 5) As^{5+} jako akceptor elektronů při respiraci 6) výcestupňová methylace anorganických forem arsenu.

Jako odpověď na přítomnost toxických kovů se u mikroorganismů vyvinula řada adaptačních mechanismů, umožňujících jim přežít v širokém spektru toxických látek a koncentrací (Mukhopadhyay a kol., 2002). U bakterií izolovaných v oblastech se zvýšenou koncentrací arsenu (kaly, důlní vody, půdy) byly objeveny *ars* operony zajišťující buňce rezistenci vůči tomuto prvku (Cullen a Reimer, 1989; Oremland a kol., 2009). Geny jsou lokalizovány v chromozomální DNA a DNA plazmidů (Páez-Espino a kol., 2009). Jsou všudypřítomné, hojně rozšířené u gram-negativních i gram-positivních bakterií a Archae (Silver a Phung, 2005; Frankenberger Jr., 2009).

Bakteriální rezistenci vůči arsenu poprvé pozorovali Novick a Roth (1968) u *Staphylococcus aureus* na plasmidech kódujících rezistenci na antibiotika a těžké kovy. Potvrzena byla odolnost vůči As^{3+} i As^{5+} (Frankenberger Jr. 2009).

Genovou expresí vznikají enzymy katalyzující metabolické interakce buňky s ionty arsenu. Oxidaci As^{3+} na As^{5+} na povrchu buňky zajišťuje enzym As^{3+} oxidáza *Aox*. Buňka se tak brání pasívnímu přísunu $\text{As}(\text{OH})_3$ přes glycerolporinový transportér. Redukci As^{5+} na As^{3+} katalyzuje enzym As^{5+} reduktáza *Arr*. Organismus tak reaguje na akumulaci As^{5+} uvnitř buňky (Oremland a kol., 2009). Deaktivací *ars* systémů se buňka stává hypersensitivní vůči arsenu (Mukhopadhyay a kol., 2002).

3.2 Bakteriální redukce As^{5+}

Z termodynamického hlediska pomáhají heterotrofní mikroorganismy vyrovnat chemickou nerovnováhu setrvávající v ekosystému z důvodu nerovnoměrné distribuce redoxně aktivních látek a pomalé kinetiky některých reakcí. Heterotrofní metabolismus oxiduje organický uhlík v přítomnosti vhodného akceptoru elektronů. Tím může být například O_2 , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} a také As^{5+} ležící svým redoxním potenciálem mezi Fe^{3+} a SO_4^{2-} (Nicholas a kol., 2003).

Byly popsány dva případy metabolické redukce pětimocného arsenu. Prvním procesem je disimilační redukce při anaerobní respiraci, která využívá As^{5+} jako terminální akceptor elektronů. Druhým dějem je redukce As^{5+} jako detoxifikační mechanismus (Cullen a Reimer, 1989; Páez-Espino a kol., 2009).

Historicky prošly konvergentním vývojem tři typy reduktáz katalyzujících redukci arseničnanů na arsenitany. Jedná se o prokaryotní větve *Escherichia Coli GSH/Grx* (plasmid R773 gram- bakterií), *Staphylococcus Trx* (plasmid pI258 gram+ bakterií) a *Saccharomyces* katalyzující tuto redukci u eukaryot. Liší se v některých detailech mechanismu působení. Tyto monomerní enzymy využívají k vazbě arsenových iontů oxidačně-redukční reakce thiolové skupiny cysteinu a jeho regenerace pomocí glutaredoxinu *Grx* nebo thioredoxinu *Trx* (Mukhopadhyay a kol., 2002).

3.2.1 Anaerobní respirace

Anaerobní respirace byla poprvé popsána u bakterie kmene MIT-13, pojmenované *Geospirillum arsenophilus*. Při pokusu v živném médiu byla pozorována úměra mezi úbytkem laktátu (jako zdroje organického uhlíku) a množstvím As^{5+} redukováného na As^{3+} (Ahmann a

kol., 1994). Respiračním procesem buňka získává energii pro svůj růst. Proto lze tyto organismy označit jako „arsenotrofní“ (Oremland a kol., 2009).

Organismy respirující As^{5+} jsou označovány jako DARP (dissimilatory arsenate reducing prokaryotes). Je známo více než 20 rodů anaerobních heterotrofů dýchajících arsen (Oremland a kol., 2009). Respirace vyžaduje k použití arsenu jako akceptoru elektronů místo kyslíku striktně anaerobní podmínky (Frankenberger Jr., 2009). DARP organismy mohou využívat i jiné akceptory elektronů (sírany, dusičnany, fumarát) s výjimkou kmene *MLMS-1*, který striktně využívá As^{5+} jako akceptor elektronů při respiraci (Oremland a kol., 2009).

Potřebu anoxie pro anaerobní respiraci potvrdil Dowdle a kol. (1996). Metabolická redukce As^{5+} byla v této studii urychlena přidávkem donoru elektronů v podobě H_2 , laktátu nebo glukózy. V kontrolním vzorku byly použity inhibitory respirace, které prokazatelně zastavily redukci As^{5+} na As^{3+} , což potvrzuje, že As^{3+} pocházel z anaerobní respirace (Dowdle a kol., 1996). Některé rody (např. *Shewanella*) mohou obsahovat jak respirační, tak detoxifikační reductázy (Oremland a kol., 2003).

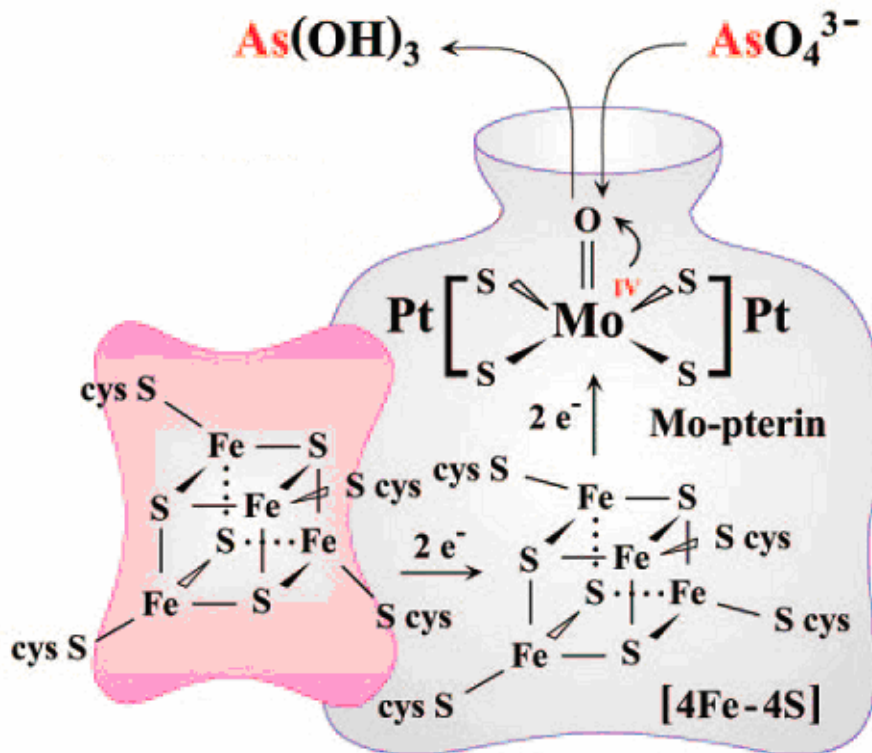
Redukci při anaerobní respiraci provádí membránový/periplasmatický protein složený ze dvou jednotek *arrA* a *arrB*. Některé kmeny mají i třetí jednotku *arrC* (Silver a Phung, 2005; Oremland a kol., 2009; Páez-Espino a kol., 2009). Respirační reductáza *arr* (obrázek 9) se funkčně i strukturně liší od detoxifikačních *Ars* reductáz (obrázek 10) (Oremland a kol., 2009).

První *arr* reductáza byla popsána u bakterie *Chrysiogenes arsenatis*, izolované v odpadní vodě ze zlatonosného dolu (Lloyd a Oremland, 2006). Větší jednotka *arrA* patří mezi DMSO (dimethylsulfoxid) reductázy s molybdenovým kofaktorem (Mukhopadhyay a kol., 2002). Menší *arrB* obsahuje [Fe-S] kofaktor s navázaným cysteinem, který poskytuje $2e^-$ pro redukci As^{5+} (Silver a Phung, 2005).

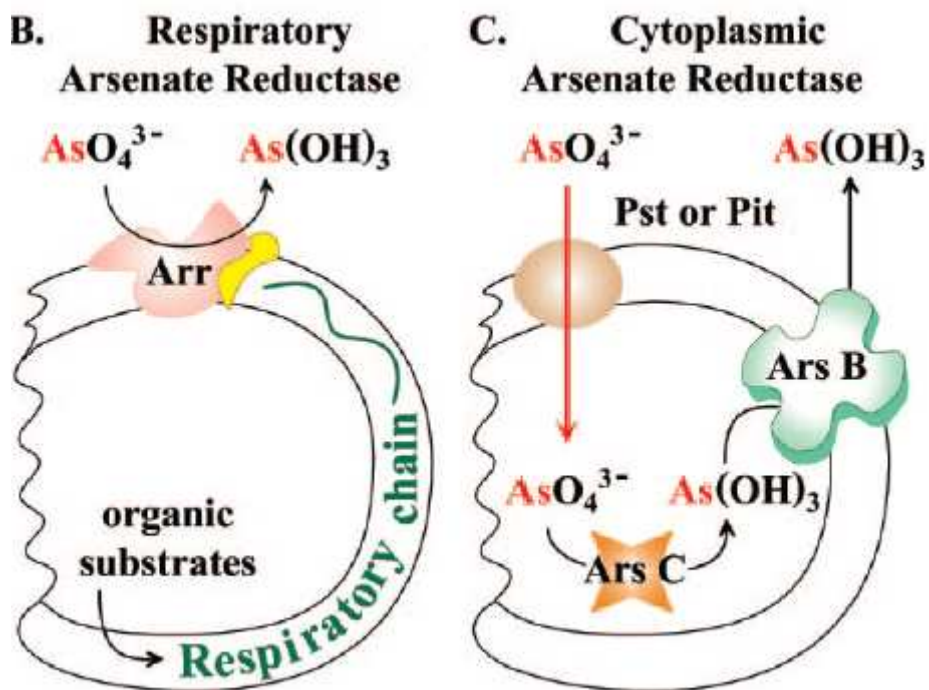
Bakterie redukující As^{5+} při respiraci mají vyvinuté i geny *ArsC* pro detoxifikaci a *ArsB* pro vylučování As^{3+} z cytoplazmy. To jim umožňuje přežití ve vysoké koncentraci arsenu redukovaného při respiraci (Oremland a kol., 2009).

3.2.2 Detoxifikační redukce

Organismy redukující As^{5+} za účelem detoxifikace jsou označovány jako ARM (arsenate-resistant microorganisms) (Oremland a Stolz, 2005). Detoxifikační redukce probíhá v aerobních i anaerobních podmínkách (Frankenberger Jr., 2009). Reakci zajišťuje skupina proteinů *Ars*, což je dvousložkový ATP-dependentní systém. Při detoxifikaci se tedy spotřebovává buněčná energie (Mukhopadhyay a kol., 2002).



Obrázek 9: Model respirační *arr* reduktázy (převzato z: Silver a Phung, 2005).

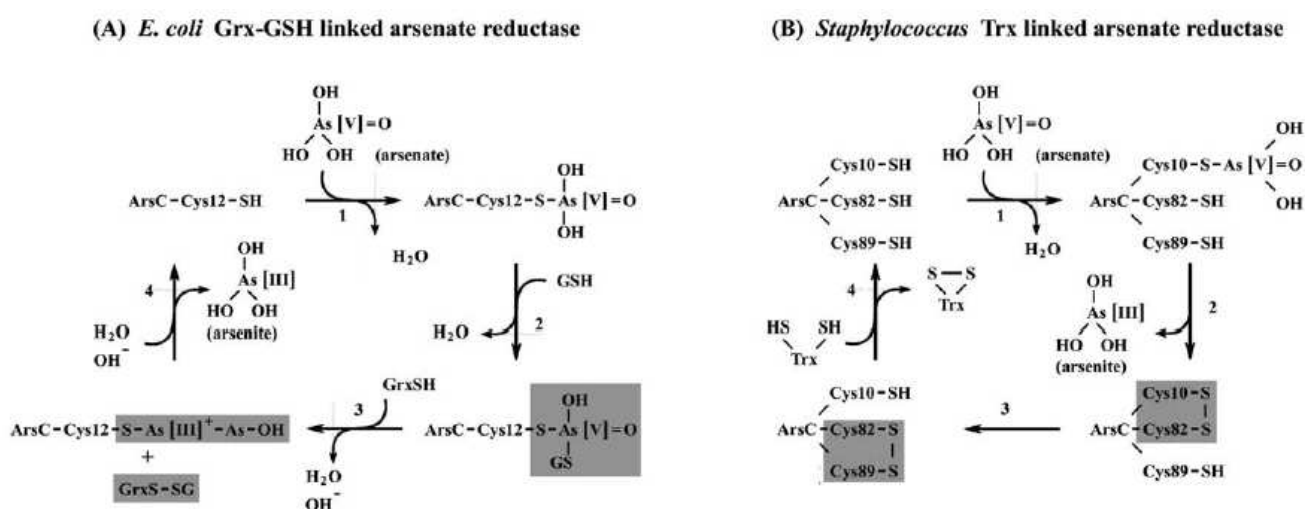


Obrázek10: Lokalizace a rozdíl v činnosti respirační (vlevo) a cytoplazmatické reduktázy (vpravo) (převzato z: Silver a Phung, 2005).

Součástí mechanismu, který redukuje pětimocný arsen a pumpuje trojmocný arsen ven z buněčného prostoru, je monomerní protein *ArsC* (cca 135 aminokyselin) se třemi cysteinovými zbytky. *ArsC* zpracovává pouze As^{5+} ve vodné fázi a není schopen redukce pevného nebo adsorbovaného substrátu. Dále je kódován membránový protein *ArsB* asociovaný s rozpustnou podjednotkou *ArsA*. Protein *ArsA* poskytuje hydrolyzou ATP energii pro *ArsB*, ale jeho gen nemusí být v genetické výbavě organismu vždy přítomen (Oremland a Stolz, 2005; Silver a Phung, 2005; Frankenberger, 2009). V takovém případě je energie pro *ArsB* přítomna ve formě membránového potenciálu (Frankenberger, 2009).

Samotné redukcí předchází exprese genu *arsR*, který kóduje regulační represorový protein, a exprese genu *arsD*, odpovědného za produkci sekundárního transkripčního regulačního proteinu s nižší afinitou k As^{3+} než *arsR* (Frankenberger, 2009).

Po vstupu do vnitrobuněčného prostoru přes *Pit* nebo *Pst* je As^{5+} navázán na cystein u N-konce cytoplazmatické reduktázy *ArsC*. Následuje redukce arсенu pomocí elektronů z glutathionu (obrázek 11). Vzniklý As^{3+} tvoří substrát pro ATP-dependentní *ArsB*, pomocí kterého je následně vyloučen z buňky (obrázek 11) (Oremland a kol., 2003; Frankenberger, 2009).



Obrázek 11: Reakční mechanismus *ArsC* E. Coli *GSH/Grx* a *Staphylococcus Trx* (převzato z: Mukhopadhyay a kol., 2002).

4 Studované území

Lokalita Mokrsko je součástí důlního revíru Psí hory, jenž byl ustanoven v letech 1978-1980 v rámci projektu vyhledávacího průzkumu Jílovské pásmo - Au, Cu rudy. V dalších letech byl proveden detailní průzkum významných geochemických anomálií zlata Mokrsko-západ, Mokrsko-východ a Čelina. V rámci geologického průzkumu zde bylo

odhaleno unikátní, dosud netěžené ložisko zlata s odhadovaným obsahem na 110 tun vzácného kovu (Morávek a kol., 1989).

4.1 Geologie oblasti

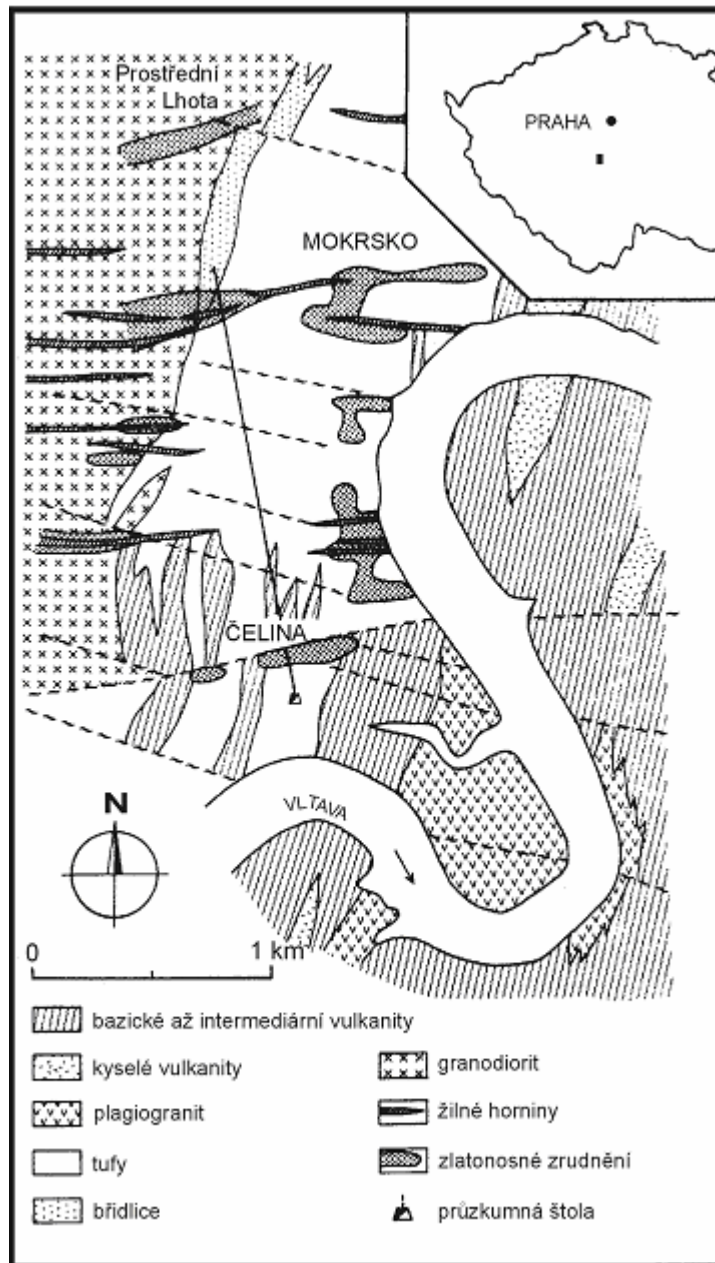
Ložisko Čelina-Mokrsko je součástí geologické jednotky Český masiv (obrázek 12). Leží v oblasti křížení tektonické zóny tahového charakteru V-Z směru, na styku granitoidů slapské apofýzy střeďočeského plutonu (320 – 360 mil. let) se svrchnoproterozoickým vulkanosedimentárním souvrstvím (640 – 700? mil. let) jíllovského pásma (Janatka a Morávek, 1990).

4.2 Dosavadní výzkum

Z geochemického hlediska provedli detailní průzkum ložiska Čelina-Mokrsko Janatka a Morávek (1990). Průzkum byl zaměřen na mapování distribuce stopových prvků v horninovém prostředí (Ag, As, B, Bi, Co, Cu, Mo, Ni, Pb, Sn, W, Zn). Vzorby byly odebírány kombinací mělkých rýh a hlubinných vrtů. Byly odhaleny nové zóny zlatonosného zrudnění a také vysoké koncentrace arsenu v rozmezí 500 – 600 mg kg⁻¹ ve vulkanosedimentárních horninách a až 5000 mg kg⁻¹ v granodioritu.

Arsen, stejně jako ostatní prvky, může být značně akumulován rostlinami a zemědělskými plodinami (Száková a kol, 2007; Soudek a kol., 2006). V rámci projektu VP Čelina-Mokrsko 29 86 3101 bylo v srpnu 1990 odebráno 6 vzorků obilí z polí okolo obce Mokrsko. Výsledky analýz obsahu arsenu byly u většiny plodin alarmující a výrazně překračovaly normu pro obsah arsenu v mouce 0,1 mg kg⁻¹. Nejvyšší naměřená koncentrace činila 7,21 mg kg⁻¹ (Bezvodová, 1996).

Přenos těžkých kovů (TK) z půdy do rostlin bývá charakterizován přestupovým faktorem, který je definován jako poměr celkového obsahu TK v sušině půdy k obsahu TK v sušině rostliny (Chamberlain, 1983). Podle tohoto návodu byly na území Mokrska odebrány vzorky půd a vzorky plodin na nich rostoucích (brambory, ječmen, borůvky). Následně bylo provedeno stanovení obsahu arsenu a dalších kovů (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) v těchto vzorcích. Limity pro obsah TK byly výrazně překročeny jen v případě arsenu. Z tohoto důvodu byl ječmen rostoucí na zdejších polích označen za nevhodný pro potravinářské účely. Ostatní plodiny lze využívat bez hygienického rizika (Bezvodová, 1996).



Obrázek 12: Geologická mapa zlatonosného ložiska Mokrosko-Čelina.

Na lokalitách Mokrosko, Roudný a Kašperské Hory byla provedena analýza vzorků půdy a důlních odpadů s cílem zjistit distribuci arsenu a dalších prvků v těchto vzorcích a identifikovat mineralogickou vazbu arsenu (Filippi a kol., 2004). Tyto tři oblasti jsou spojeny s výskytem mezotermálních ložisek zlata a liší se rozsahem důlní činnosti. V Kašperských Horách byla těžba ukončena přibližně před 500 lety, na Roudném před 70 lety a Mokrosko dosud těženo nebylo. V oblasti Mokroska byla naměřena vysoká koncentrace arsenu v zemědělsky využívané půdě (více jak 2800 mg kg^{-1}). Nad podložím z granodioritu je arsen vázán na farmakosiderit, arseniosiderit, skorodit, goethit a další neidentifikované HFO. Nad

vulkanosedimentárním podložím je arsen nejvíce vázán na HFO (zejména goethit a hematit), s malým příspěvkem vazby na farmakosiderit (Filippi a kol, 2004).

Další výzkum se zaměřil na experimentální stanovení rychlosti zvětrávání a uvolňování arsenu ze zlatonosného zrudnění obsahujícího velké množství sulfidů. Byly provedeny loužící experimenty v kolonovém uspořádání a vsádkovém uspořádání, ve kterém byly vzorky protřepávány. Pokusy sledovaly faktory ovlivňující množství vyluhovaného arsenu. Vzorky byly rozděleny do čtyř frakcí podle velikosti zrn. Nejvíce vyluhovaného arsenu bylo ve frakci 64 - 1000 μm . Množství arsenu ve vyluzích záviselo na zvolených podmínkách, konkrétně na velikosti zrn, hmotnosti vzorku a teplotě. Faktorem nejvíce ovlivňujícím zvětrávání se ukázala přítomnost uhličitánů. Ty mění pH interagujících roztoků. Hydratované oxidy železa byly nejvýznamnějším sorbentem rozpuštěného arsenu. Rychlost oxidace sulfidů byla přímo úměrná specifickému povrchu loužených vzorků (Mihaljevič a kol., 2004).

Na rychlost zvětrávání a eroze se zaměřili také Drahota a kol. (2006). Zhodnocením vstupů (např. zvětrávání arsenopyritu, atmosferická depozice, antropogenní vstupy v podobě hnojení) a výstupů (např. voda odtékající z povodí v povrchové a podzemní vodě) arsenu z povodí Čelina a Mokrsko byla vytvořena hmotnostní bilance. Z výsledků vyplývá, že mechanickým a chemickým zvětráváním se do půdy dostane více jak 95 % ročního přísunu arsenu. Rychlost zvětrávání arsenopyritu je limitována rychlostí zvětrávání podložní horniny. Zvětrávání a eroze hrají významnou úlohu v geochemii arsenu.

Půdní vzorky byly analyzovány kvůli popisu struktury a obsahu arsenových minerálů. U odebraných vzorků byly změřeny fyzikálně-chemické charakteristiky, jako jsou pH, chemické složení, množství organické hmoty a obsah karbonátů a železa. Vazba arsenu byla studována sekvenční extrakcí podle Wenzela a mineralogickými metodami XRD, SEM-EDS/WDS a Ramanovou spektroskopií. Jako produkty zvětrávání pyritu a arsenopyritu byly identifikovány farmakosiderit, arseniosiderit, skorodit a jarosit. Vzorky byly rozděleny na dvě skupiny podle místa odběru a) rovinatá nezalesněná oblast na podloží z granodioritu a b) svažující se zalesněné plochy na vulkanosedimentárním podloží. V první skupině byl arsen vázán především na farmakosiderit, arseniosiderit, skorodit a goethit. Ve druhé skupině byl arsen vázán na goethit, hematit, farmakosiderit, HFO a jarosit (Filippi a kol., 2007).

Další rozsáhlý výzkum byl zaměřen na vzorky půdy, vody a sedimentu z hlediska popisu procesů vedoucích k uvolňování arsenu do vody. Předmětem zájmu byly také faktory ovlivňující speciaci anorganického arsenu v odlišných redoxních podmínkách. Dále byly popisovány minerály, na které je arsen nejčastěji vázán. Výsledky měření speciace ukázaly na rozpor mezi zjištěnou koncentrací trojmocného a pětímocného arsenu ve vodách a speciačním

modelováním v těchto podmínkách. Výzkum odhalil výrazný nadbytek As^{3+} jak v redukční zóně (podzemní voda, hyporheická zóna potočního koryta, půdní pórová voda), tak v zóně oxidační (povrchová voda). Protože poměr $\text{As}^{3+} / \text{As}^{5+}$ velmi dobře koreloval s obsahem organické hmoty, nabízí se hypotéza, že rovnovážné podmínky byly narušeny činností mikroorganismů, které jsou schopné biochemické transformace arsenu (Drahota a kol., 2009).

U zájmových prvků byly sledovány sezónní výkyvy koncentrací provedením odběru vzorků v jednoměsíčních intervalech. Během roku dochází ke změnám teploty, intenzity slunečního záření i biologické aktivity mikroorganismů. V důsledku těchto a dalších změn se koncentrace As, Cu, Zn, Mo systematicky vychylují od průměrné hodnoty během roku (Drahota a kol., 2011).

4.3 Cíle diplomové práce

Pomocí inkubačních experimentů se vzorky regolitu a fluviálního sedimentu z oblasti Mokrsko by měla být potvrzena nebo vyvrácena možnost vlivu mikrobiální činnosti na mobilizaci arsenu v tranzitních a redukčních zónách, které obsahují velmi vysoké koncentrace rozpuštěného arsenu (Drahota a kol., 2009).

Cíl práce sleduje několik dílčích experimentů:

- mineralogicko-geochemická charakteristika vzorku regolitu a fluviálního sedimentu s ohledem na vazbu arsenu
- sekvenční extrakce regolitu a fluviálního sedimentu
- inkubace regolitu v anaerobních podmínkách v roztoku různých zdrojů organické hmoty pro heterotrofní mikroorganismy
- inkubace regolitu a fluviálního sedimentu v aerobním a anaerobním prostředí se zvoleným zdrojem organické hmoty
- kultivace bakteriálních kultur přítomných ve vzorcích regolitu a fluviálního sedimentu v aerobních a anaerobních podmínkách

- izolace DNA nalezených bakterií a jejich identifikace, izolace genů kódujících jednotlivé mechanismy tolerance As^{5+} (respirace, detoxifikace)

Na území Mokrsko nebyl dosud podobný pokus realizován. V literatuře však mechanismy mikrobiální mobilizace arsenu v podobných podmínkách jsou popsány (např. Dowdle a kol., 1996; Jones a kol., 2000; Babechuk a kol., 2009; Lee, 2009; Yamamura a kol., 2009).

5 Experimentální část

5.1 Použité chemikálie

V experimentech byly použity tyto chemikálie:

Azid sodný, 99%, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich

D-laktosa monohydrát, p.a., (M = 360,32), $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$, Penta, ČR

D-glukosa monohydrát, p.a., (M = 198,17), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$, Penta, ČR

Dihydrogenfosforečnan amonný, dusičnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan diamonný, uhličitán vápenatý, hydrogenuhličitán sodný – čistý, Lachema Brno

Hydrogenarseničnan disodný heptahydrát, p.a., Fluka

Kyselina dusičná, 65 %, suprapur, Merck; Kyselina dusičná, 65 %, J.T. Baker

Kyselina chloristá, p.a., Merck

Kyselina fluorovodíková, p.a., Penta, ČR

Octan amonný, ultra 99 %, Fluka, Holandsko

Peroxid vodíku, 30 %, p.a., Penta, ČR

Síran amonný, dihydrogenfosforečnan amonný - p.a., Riedel-de Haën

Síran hořečnatý monohydrát, p.a., Penta, ČR

Šťavelan diamonný monohydrát, p.a., Merck

Tryptic Soy Agar, Difco

kalibrační roztoky As, Fe, Al, Mn, K, S, P, Ca: Astatol, $1,000 \pm 0,005 \text{ g l}^{-1}$, 99,999% prvku v matrici 2% HNO_3

Jako inertní plyn byl použit dusík Air-Products, čistota základní průmyslová 99,996 %.

V provedených experimentech byla použita deionizovaná voda SCI-AQUA LAB ULTRA.

5.2 Použité přístroje (GÚ AVČR)

Koncentrace analytů byly měřeny metodou ICP-OES na přístroji IRIS Interpid II XSP, Thermo Electron Corp (software TEVA, Verze 1.6.4) na Geologickém ústavu AVČR v.v.i. (operátor A. Redlich) Podmínky měření jsou v tabulce 1. Detekční limity byly získány z trojnásobku směrodatné odchylky 10x opakovaného měření.

Tabulka 1: Seznam vlnových délek měřených prvků a jejich detekční limity (LOD = trojnásobek směrodatné odchylky 10x opakovaného měření).

Prvek:	Měřená λ (nm):	LOD (ppm):
Al	396,1	0,014
As	193,7	0,018
Fe	240,4	0,024
Ca	317,9	0,232
K	317,9	0,006
Mn	259,3	0,004
P	185,9	0,173
S	185,0	0,882

V krocích sekvenční extrakce byla použita Lázeň vodní třepací GFL 1083, Merci s.r.o. a centrifuga Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen.

Sterilizace roztoků proběhla v tlakovém hrnci Barazzoni 12L.

Redoxní potenciál byl měřený platinovou elektrodou SenTix ORP a přístrojem Schott-Geräte, Handylab 2. Kvalita elektrody byla ověřena pomocí Zobelova kalibračního roztoku. Přesnost měření přístroje byla $\pm 0,5$ mV.

pH roztoků bylo měřeno argentschloridovou elektrodou SenTix 51, přístrojem WTW 3310 set 2. Každému měření předcházela kalibrace pomocí komerčních pufrů WTW (pH 4,01; 7,02; 10). Přesnost měření stroje byla $\pm 0,01$ jednotky pH.

5.3 Odběr a zpracování vzorků

Při prvním odběru v terénu byly odebrány cca 2 kg regolitu pomocí vrtu z hloubky 85 – 115 cm. Tato hloubka odpovídala hranici podzemní vody. Vyvrtaný materiál byl vložen do sterilních igelitových sáčků, které byly přímo v terénu profouknuty dusíkem a v inertní atmosféře uzavřeny. Vzorek byl zpracován do 4 hodin po odběru a použit k prvnímu inkubačnímu experimentu.

Při druhém odběru v terénu (o 30 dní později) byly odebrány další 2 kg vzorku regolitu ze stejného místa (obrázek 13) a stejným způsobem jako při prvním odběru. Stejným způsobem byly dále odebrány cca 2 kg fluvialního sedimentu z hloubky 60 cm (obrázek 13). Vzorky

byly opět v inertních podmínkách převezeny do laboratoře a část každého vzorku byla do 4 hodin po odběru zpracována pro druhý inkubační experiment. Zbytek vzorku byl usušen a skladován v inertní atmosféře za laboratorní teploty a postupně zpracováván k dalším analýzám.

5.4 Metodika experimentů

5.4.1 Celkové obsahy

Celkové obsahy prvků (SiO_2 , Al_2O_3 , Na_2O , K_2O , CaO , MgO , P_2O_5 , Fe_2O_3 , MnO , As_2O_3) ve vzorcích regolitu a fluvialního sedimentu byly stanoveny duplikovaně metodou XRF s vlnově-disperzním spektrometrem ARL 9400 XP (software winXRF). Analyzované práškové vzorky byly vylisovány do tablet o tloušťce 5 mm a průměru 40 mm. Získané hodnoty byly zpracovány a vyhodnoceny programem Uniquant 4. Stanovení provedla Laboratoř RTG difraktometrie, VŠCHT Praha (operátor S. Randáková).



Obrázek 13: obec Mokrsko; R – místo odběru regolitu, S – místo odběru sedimentu

Celkové obsahy uhlíku (TC) a síry (TS) v odebraných vzorcích regolitu a fluvialního sedimentu byly stanoveny triplikovaně pomocí simultánního analyzátoru C/S ELTRA CS 530 spalováním vzorku při $1350\text{ }^{\circ}\text{C}$ v proudu kyslíku v odporové peci s následnou detekcí CO_2 a

SO₂ v infračervených celách. Navážka vzorku činila 100 – 500 mg. Konfigurace analyzátorů umožňuje také stanovení celkového anorganického uhlíku (TIC). Z rozdílu stanovení TC a TIC lze nepřímo stanovit celkový obsah organického uhlíku (TOC). Stanovení provedla Laboratoř elementární C/S analýzy (LEA), Laboratoře geologických ústavů PřF UK, Praha (operátor O. Šebek).

5.4.2 Mineralogická charakteristika

Mineralogická charakteristika vzorků byla zaměřena na zjištění zdroje a vazby arsenu v regolitu a sedimentu. Z usušeného vzorku regolitu a sedimentu v inertní atmosféře byla prosítováním vytvořena frakce o velikosti zrn 0,1 – 0,5 mm. Tato frakce byla opakovaně umyta v lihu a následně podrobena separaci v těžkých kapalinách za účelem nabohacení vzorku minerály obsahujícími arsen (sulfidy, oxidy, arseničnany). Těžkou kapalinu tvořil roztok bromoformu a 1,4-dioxanu s hustotou 2,81 g cm⁻³. Separací byla oddělena lehká frakce ($\rho < 2,81 \text{ g cm}^{-3}$) od těžké frakce ($\rho \geq 2,81 \text{ g cm}^{-3}$). Sítování i separace v těžkých kapalinách probíhala za normálních atmosférických podmínek, ale vzorky byly ihned po každé výše zmiňované proceduře důkladně promyty inertním plynem a také v něm uskladněny.

Těžké frakce obou vzorků byly rozděleny na dvě části. První část vzorků byla nejprve podrobena detailnímu mikroskopickému studiu, v rámci kterého byla vyseparována některá zrna pro fázovou analýzu pomocí práškové rentgenové difrakce (RTG). Tato analýza byla provedena i na směsném vzorku těžké i lehké frakce regolitu a sedimentu.

Rentgenová difrakce byla provedena v Laboratoři práškové rentgenové difrakce Ústavu geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů PřF UK na přístroji PANalytical X`PertPro (PW3040/60) s detektorem X`Celerator (operátoři P. Drahota, A. Redlich). Podmínky analýzy: záření CuK α , 40 kV, 30 mA, krok 0.02°/200s v úhlovém rozsahu 5-70° 2 Theta. Kvalitativní analýza byla provedena pomocí programu X`Pert HighScore 1.0d s databází JCPDS PDF-2 (ICDD 2002).

Z druhé části těžké frakce vzorků byly zhotoveny leštěné nábrusy, které byly studovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (TESCAN Vega) se systémem EDS (detektor X-Max 50, Oxford Instruments) pro kvantitativní mikroanalýzu. Studium proběhlo v Laboratoři skenovací elektronové mikroskopie Ústavu petrologie a strukturní geologie PřF UK (operátoři P. Drahota, A. Redlich a M. Racek).

Ze vzorku sedimentu, který prošel anaerobní inkubací s glukosou, byla z frakce 0,1 – 0,5 mm pod mikroskopem vyseparována zrna, která by svým charakterem mohla odpovídat

realgaru (žluté poprašky na minerálních zrnech). Zrnka se přilepila na oboustrannou pásku, pokovila uhlíkem a pomocí rastrovacího mikroskopu Vega 3 XM (Tescan) s detektorem XFlash 5010 (Bruker) byly pořízeny detailní fotografie povrchu minerálních zrn s realgarem. Studium proběhlo na Geologickém ústavu AVČR, v.v.i. (operátoři V. Böhmová a P. Drahotka).

5.4.3 Zdroj organické hmoty

Půdní organotrofní organismy potřebují pro svůj život zdroj organické hmoty (viz kapitola 3.2.1). Dodáním vhodného zdroje organické hmoty lze navíc urychlit metabolismus, resp. transformaci metabolizovaných prvků. Pro tyto účely byly v prvním inkubačním experimentu porovnávány 3 organické sloučeniny: glukosa, laktosa, octan amonný (acetát). Ve vsádkovém uspořádání jsme sledovali vliv těchto organických sloučenin na mikrobiální mobilizaci arsenu a dalších prvků z regolitu.

Do vyloužených sterilních litrových lahví byla vložena navážka 50 g homogenního vzorku vlhkého regolitu. Poté byl přidán 1 litr 5% roztoku zdroje organického uhlíku. Roztoky glukosy, laktosy a octanu amonného byly připraveny rozpuštěním 200 g sloučeniny v deionizované vodě. Před nalitím k navážce byly roztoky sterilizovány v tlakovém hrnci po dobu 20 minut při 120 °C.

Vznikly dvě sady duplikovaných vzorků (celkem 12, viz tabulka 2), přičemž do jedné sady nádob bylo přidáno 0,65 g azidu sodného k usmrcení mikroorganismů (Radloff a kol., 2008). Láhve byly opatřeny zátkou se septem a vloženy do anaerobního prostředí s dusíkovou atmosférou.

Tabulka 2: Schéma vsádkového inkubačního experimentu s různými zdroji organické hmoty

Číslo nádob:	Obsah nádoby:
1; 2	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku glukosy -----
3; 4	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku laktosy -----
5; 6	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku acetátu -----
7; 8	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku glukosy 0,65 g NaN ₃
9; 10	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku laktosy 0,65 g NaN ₃
11; 12	50 g regolitu, 1 l 5% roztoku acetátu 0,65 g NaN ₃

Experiment trval 25 dní. Během této doby bylo u každé nádoby provedeno 14 odběrů. Injekcí s celokovovou jehlou (sterilizovanou při 130 °C) bylo přes septum odebíráno a do

zkumavky pomocí jednorázových stříkačkových filtrů (0,45 µm) přefiltrováno 10 ml roztoku a stabilizováno 100 µl 2M HNO₃ (suprapur, Merck).

5.4.4 Inkubace regolitu a sedimentu

Na základě výsledků předchozího experimentu byla provedena 29denní inkubace regolitu a fluvialního sedimentu pro zjištění mikrobiálního vlivu na mobilizaci arsenu za různých experimentálních podmínek.

Do vyloužených litrových nádob byla vložena navážka 50 g homogenního vlhkého vzorku regolitu nebo sedimentu. Navážka byla zalita 1 l syntetické podzemní vody (pH 7,1) pro simulaci reálných podmínek (tabulka 3) na lokalitě (Drahota a kol. 2009). Před nalitím k navážce byly roztoky sterilizovány v tlakovém hrnci 20 minut při 120°C.

Takto vznikla nová sada triplikovaných vzorků bez azidu a duplikovaných vzorků s azidem (celkem 26 nádob, tabulka 4). Jako zdroj organické hmoty byla použita sloučenina, která se v předchozím experimentu ukázala jako nejefektivnější.

Tabulka 3: Složení syntetické vody (podle průměrného složení podzemní vody v Drahota a kol. 2009).

Sloučenina:	Koncentrace (g l ⁻¹):
KNO ₃	0,016
CaCO ₃	0,24
MgSO ₄	0,11
KH ₂ PO ₄	7,2·10 ⁻⁴
NaHCO ₃	pufrace do pH 7,1

Injekcí s celokovovou jehlou (sterilizovanou při 130°C) bylo přes septum odebíráno a do jednorázové zkumavky přefiltrováno (0,45 µm stříkačkový filtr) 12 ml roztoku a stabilizováno 100 µl 2M HNO₃ (suprapur, Merck). U odběrů byly na přístroji ICP-OES stanoveny koncentrace Al, As, Ca, Fe, K, Mn, P, S. Ihned po odběru byla v cca 3 ml odděleného roztoku měřena hodnota pH a redoxního potenciálu. Kalibrace pH a kontrola Eh byly prováděny před každým odběrem (celkem 8) během inkubačního experimentu.

Tabulka 4: Schéma vsádkového inkubačního experimentu loužení regolitu a fluviálního sedimentu.

Číslo nádoby:	Obsah nádoby:	Prostředí:
1; 2; 3	50 g regolitu	aerobní
4; 5; 6	50 g sedimentu	aerobní
7; 8	50 g regolitu, 0,65g NaN ₃	aerobní
9; 10	50 g sedimentu, 0,65g NaN ₃	aerobní
11; 12; 13	50 g regolitu, 0,05M glukosy	anaerobní
14; 15; 16	50 g sedimentu, 0,05M glukosy	anaerobní
17; 18; 19	50 g regolitu	anaerobní
20; 21; 22	50 g sedimentu	anaerobní
23; 24	50 g regolitu, 0,65 g NaN ₃ , 0,05 M glukosy	anaerobní
25; 26	50 g sedimentu, 0,65 g NaN ₃ , 0,05 M glukosy	anaerobní

5.4.5 Sekvenční extrakční analýza

Metoda sekvenční extrakce byla použita na vzorcích regolitu a sedimentu před inkubačním experimentem a na vybraných vzorcích po inkubačním experimentu z důvodu zjištění a srovnání vazby arsenu v těchto materiálech mezi těmito experimenty. Pro sekvenční extrakci (SE) bylo vybráno a upraveno extrakční schéma Wenzel a kol. (2001), Dold (2003) a Caraballo a kol. (2009). Extrakci byly podrobeny tyto homogenizované a v inertní atmosféře usušené vzorky ve frakci < 2 mm:

- regolit a fluviální sediment
- směsný vzorek regolitu po anaerobní inkubaci s glukosou (nádoby 11, 12, 13) a směsný vzorek sedimentu po anaerobní inkubaci s glukosou (nádoby 14, 15, 16)
- směsný vzorek regolitu po aerobní inkubaci (nádoby 1, 2, 3) a směsný vzorek sedimentu po aerobní inkubaci (nádoby 4, 5, 6) (viz kapitola 5.4.6).

SE byla provedena pro každý typ vzorku triplicovaně. 1 g vzorku byl navážen do 50 ml centrifugační zkumavky Falcon, ve které celá extrakce proběhla. K navážce byl přidán objem extrakčního činidla (tabulka 5). Po každém kroku byl roztok centrifugován 10 minut při 2500 rpm a objem kapalné fáze byl přefiltrován do zkumavky (stříkačkový filtr 0,45 μm) a stabilizován 100 μl 2M HNO₃. Extrakce probíhala v prvních 4 krocích v inertní atmosféře.

Tabulka 5: Schéma použité sekvenční extrakce.

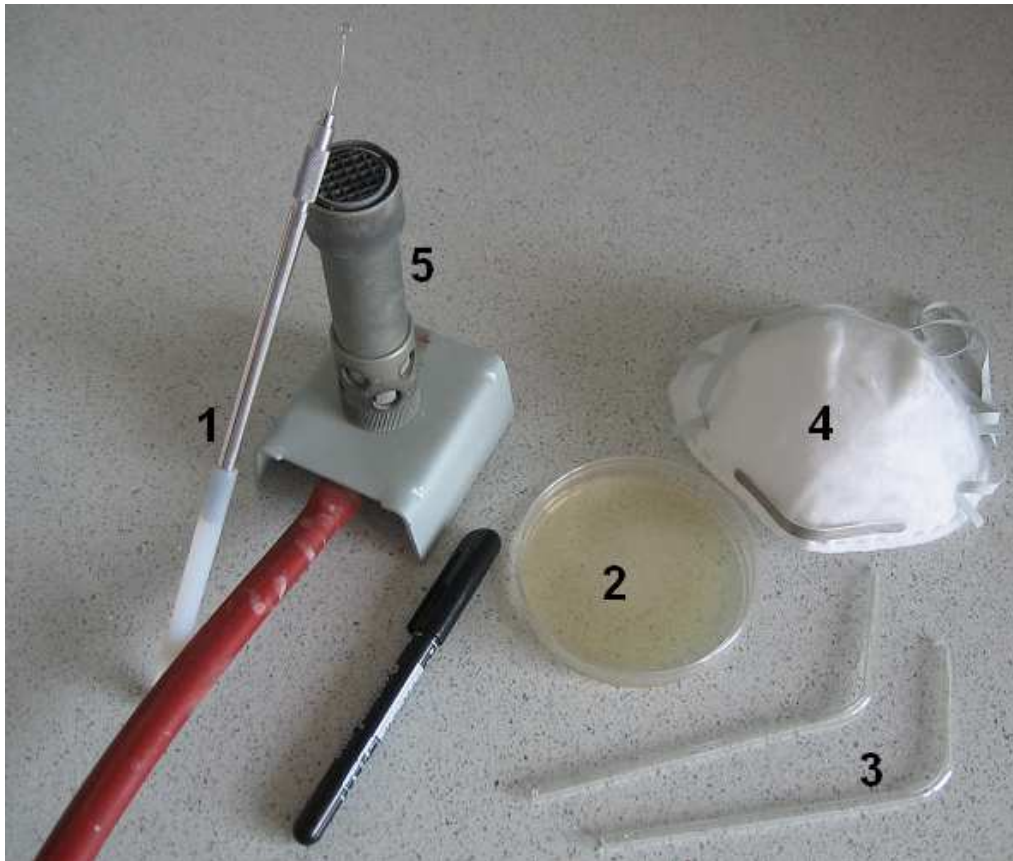
Krok SE:	Popis frakce:	Činidlo/podmínky:
1.	velmi slabě vázaná	0,05M síran amonný, 1:25, 4 hod. třepat
2.	specificky vázaná	0,05M dihydrogenfosforečnan amonný, 1:25, 16 hod. třepat
3.	vazba na aktivní Fe a Mn hydratované oxidy	0,2M oxalát amonný pH = 3, 1:40, 2 hod. třepat, ve tmě
4.	vazba na krystalické Fe a Mn hydratované oxidy	0,2M oxalát amonný pH = 3, 1:40, 1 hod. třepat, ve vodní lázni (80° C)
5.	reziduální	směs 5 ml konc. HNO ₃ + 2,5 ml H ₂ O ₂ , 4 hod. třepat, ve vodní lázni (80° C)

5.4.6 Kultivace bakterií

Ke zjištění, které druhy bakterií tolerující arsen jsou přítomné ve vzorcích regolitu a sedimentu, byla provedena kultivace v anaerobním a aerobním prostředí na živném médiu (agar) s obsahem As⁵⁺.

Živné médium bylo připraveno rozpuštěním 40 g pevného TSA agaru v 1 l deionizované vody. Do suspenze bylo přidáno množství AsHNa₂O₄, aby výsledná koncentrace As⁵⁺ byla 5 mmol l⁻¹. Směs byla sterilizována v tlakovém hrnci po dobu 20 minut při 120°C. Po mírném zchladnutí byla směs rozlita po 20 ml na sterilní jednorázové Petriho misky.

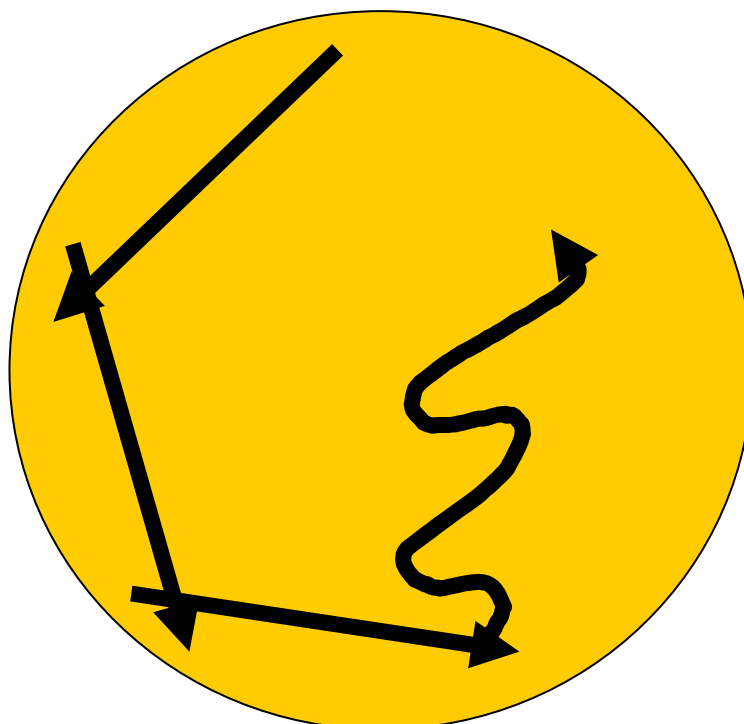
Dále byla připravena suspenze regolitu a suspenze sedimentu v 0,1M NH₄H₂PO₄ v poměru 1:3 (w:v) (Lee a kol., 2009). Na připravené agarové plotny bylo sterilní pipetou nanášeno 20 µl suspenze a rozetřeno bakteriologickou hokejkou (obrázek 14). Poté byly Petriho misky zabaleny do hliníkové fólie a ponechány dle potřeby v aerobních nebo anaerobních podmínkách inertního boxu při laboratorní teplotě. Po 2 dnech se na povrchu agarových ploten vytvořily makroskopické kolonie (obrázek 15). Po označení odlišných oblastí byly mikroorganismy pomocí bakteriologické kličky (obrázek 14) podle schématu (obrázek 16) přeočkovány na nové čisté agary (obrázek 14). Po dalších 2 dnech bylo opět provedeno přeočkování vytvořených kultur (celkem 3x). Takto se jednotlivé kultury diferencovaly ze směsné kolonie a bylo možno rozlišit jednotlivé druhy, tj. na jedné misce rostl jeden druh bakterie. Po ukončení kultivace byly vzorky odeslány na sekvenaci bakteriální DNA a pomocí metody PCR došlo k identifikaci bakterií.



Obrázek 14: Pracovní pomůcky použité při kultivaci bakterií. 1) bakteriologická klička 2) čistá agarová plotna 3) bakteriologická hokejka 4) obličejová rouška (k zamezení kontaminace) 5) kahan k dezinfekci kličky a hokejky během přeočkování



Obrázek 15: Směs bakteriálních kultur vypěstovaných na agarové plotně obsahující 5 mM As^{5+} .



Obrázek 16: Schéma očkování na Petriho misce (šipky ukazují ve směru snižující se koncentrace bakterií)

5.4.7 Identifikace bakterií

Z narostlých monoklonií studovaných bakterií bylo pro PCR odebráno cca 1 μ l pomocí sterilní kličky a rozmícháno ve vodě. Následně byl připraven PCR premix bez vody a přidán k reakcím, které byly ihned vloženy cykleru. Podle druhu bakterií vznikl produkt dlouhý 860 – 900 bp.

Produkty PCR byly analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Tato metoda je založena na faktu, že molekula DNA je záporně nabitý polyanion, který se v prostředí stejnosměrného proudu pohybuje ke kladnému náboji. Tato vlastnost DNA je využita k rozdělování jejích úseků podle velikosti (délky/hmotnosti) pomocí agarosového gelu, který tvoří prostorovou polymerní síť, takže kratší úseky se vzdálí od počátku nejdál a naopak.

Extrakce DNA z gelu byla provedena pomocí ZymoClean Gel DNA Recovery KitTM (Zymo Research) podle pokynů výrobce.

Sekvence byla provedena pracovníky Sekvenační laboratoře PřF UK na kapilárním sekvenátoru Avant 3130 Genetic Analyzer. Od každého druhu byla poté vybrána reprezentativní sekvence rDNA a k ní byly nalezeny nejbližší známé sekvence ve veřejné mezinárodní databázi GenBank (NCBI) pomocí internetové aplikace BLAST. Pokud se podařilo najít sekvence náležející známému druhu bakterie, které vykazovaly více než 98% shodu se zkoumanou sekvencí, byla bakterie považována za určenou. Pokud byly takto

shodné sekvence více příbuzných druhů a variabilita nedovolovala rozhodnout, ke kterému z nich zkoumaná sekvence patří, bylo určení uzavřeno jako nejednoznačné. Identifikaci provedl Mgr. Lukáš Falteisek, Katedra buněčné biologie PřF UK.

5.5 Výsledky experimentů a analýz

5.5.1 Celkové obsahy

Obsahy nejdůležitějších prvků v analyzovaném regolitu a sedimentu zobrazuje tabulka 6. Hodnoty stanovené metodou XRF udávají procentuální zastoupení prvku ve vzorku ve formě oxidu. Výsledkem je průměr a směrodatná odchylka ze dvou vzorků.

Tabulka 6: Celkové obsahy prvků v regolitu (R) a sedimentu (S) na základě měření XRF. SD představuje směrodatnou odchylku z měření dvou vzorků.

Prvek:	R (hm. %)	SD (hm. %)	S (hm. %)	SD (hm. %)
As₂O₃	0,12	0,01	0,23	0,03
Fe₂O₃	4,58	0,56	3,86	0,57
MnO	0,09	0,01	0,11	0,01
Al₂O₃	19,88	0,66	19,00	0,75
Na₂O	2,34	0,21	3,15	0,06
K₂O	2,65	0,13	2,91	0,21
MgO	1,67	0,18	1,86	0,31
CaO	2,43	0,08	2,65	0,03
SiO₂	65,44	1,39	65,32	1,98
P₂O₅	0,083	0,01	0,09	0,01
S	51,07·10 ⁻⁴	1,28·10 ⁻⁴	0,14	0,001

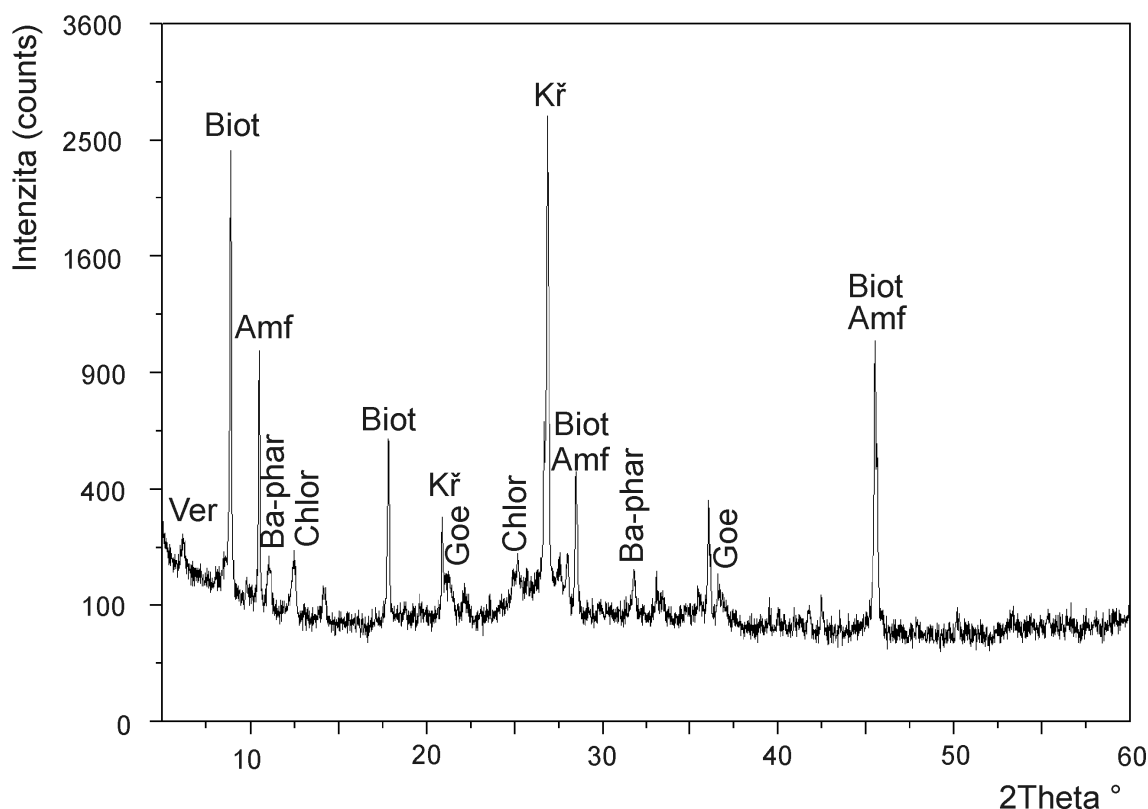
V případě arsenu je jeho množství dále v textu vyjádřeno jako koncentrace samotného As v jednotkách mg kg⁻¹. Odebraný regolit obsahuje průměrně 905 mg kg⁻¹ arsenu. Sediment obsahuje průměrně 1749 mg kg⁻¹ arsenu.

Hodnota TS z analyzátoru C/S ELTRA byla stanovena na 51,07·10⁻⁴ ± 1,28·10⁻⁴ hm. % ve vzorku regolitu a 0,14 ± 0,001 hm. % ve vzorku sedimentu. Z analýzy síry pomocí XRF vyplývá, že v regolitu převládá její síranová forma, zatímco v sedimentu se síra vyskytuje hlavně v sulfidické, případně elementární formě.

Hodnota TC z analyzátoru C/S ELTRA byla stanovena na 0,139 ± 0,004 hm. % ve vzorku regolitu a 1,41 ± 0,035 hm. % ve vzorku sedimentu. Hodnoty TIC byly v obou případech pod detekčním limitem přístroje 50 mg kg⁻¹. Z této skutečnosti vyplývá, že naměřená hodnota TC odpovídá obsahu organického uhlíku (TOC) ve vzorcích.

5.5.2 Mineralogická charakteristika

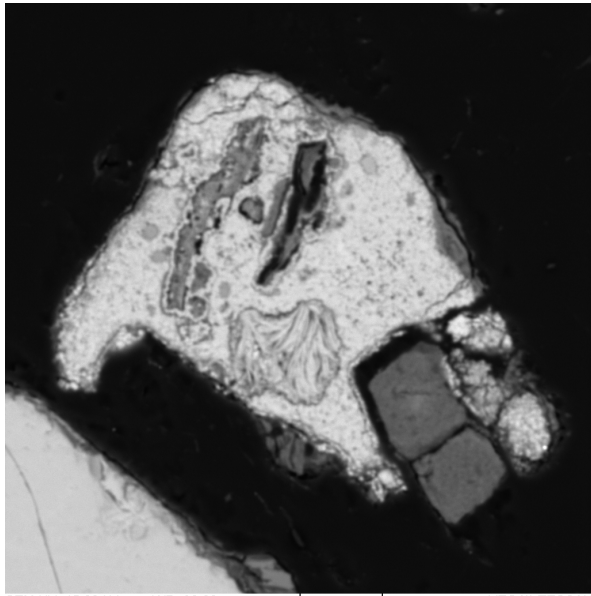
Lehké frakce regolitu a sedimentu shodně obsahují albit $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$, křemen SiO_2 , ortoklas KAlSi_3O_8 a muskovit $\text{KAl}_2(\text{Si,Al})\text{O}_{10}(\text{OH,F})$. Těžká frakce regolitu obsahuje amfibol $(\text{Ca,Na})_2(\text{Mg,Fe,Al})_5(\text{Si,Al})_8\text{O}_{22}(\text{OH,F})_2$, ortoklas, křemen, albit, goethit $\text{FeO}(\text{OH})$ a biotit $\text{K}(\text{Fe,Mg})_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH,F})_2$. Výsledek rentgenové difrakce vyseparovaných zrn těžké frakce regolitu znázorňuje obrázek 17. Vzorek obsahuje převážně křemen, amfibol, biotit, chlorit $(\text{Mg}_{6-x}\text{Al}_x)(\text{Si}_{4-x}\text{Al}_x)\text{O}_{10}(\text{OH,O})_8$, vermikulit $(\text{Mg,Fe,Al})_3(\text{Al,Si})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$, goethit a jednoho zástupce minerálu arsenu, Ba-farmakosiderit $\text{BaFe}_4(\text{AsO}_4)_3(\text{OH})_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.



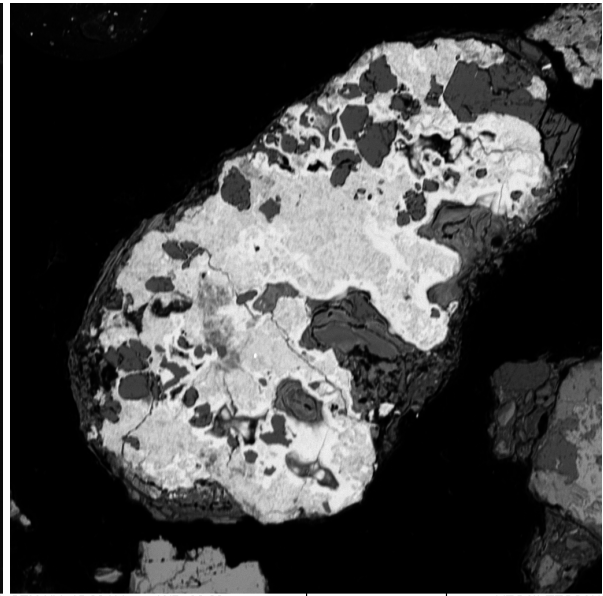
Obrázek 17: Mineralogické složení vyseparovaných zrn těžké frakce regolitu. Ver – vermikulit, Biot – biotit, Amf – amfibol, Ba-phar – Ba farmakosiderit, Kř – křemen, Chlor – chlorit, Goe – goethit

Analýza těžké frakce regolitu na elektronovém mikroskopu s EDS potvrdila přítomnost Ba-farmakosideritu a nově zjistila menší množství arseniosideritu $\text{Ca}_2\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (obrázek 18). Hlavním nositelem arsenu v regolitu jsou však hydratované oxidy železa (obrázek 19, 20), které vždy obsahovaly určité množství arsenu (obrázek 21), dosahující obvykle několika jednotek hm. %. Z obrázků 19 – 23 je zřejmé, že Fe-oxid je obalený jílovými minerály (distribuce Al na obrázku 23), které neobsahují arsen. Naopak mapa Fe-oxidu se překrývá s vyššími koncentracemi arsenu. Je tedy zřejmé, že arsen se ve

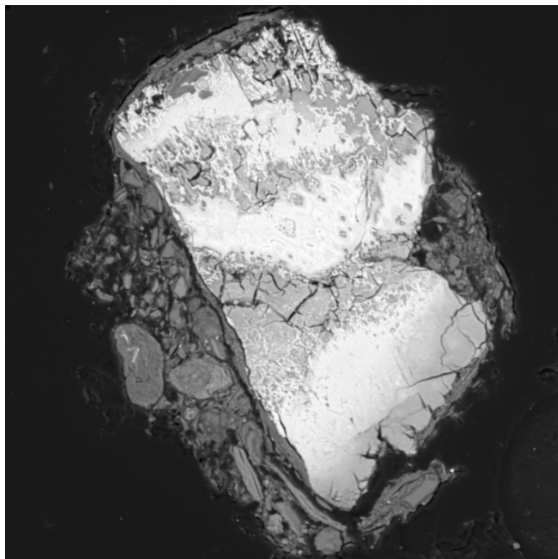
vzorku regolitu váže zejména na Fe-oxidy, které sice obsahují relativně nižší koncentrace arsenu (jednotky hm. %), ale jsou ve vzorku velmi hojné, a částečně též na hydratované sekundární arseničnany trojmocného železa, Ba-farmakosiderit a arseniosiderit.



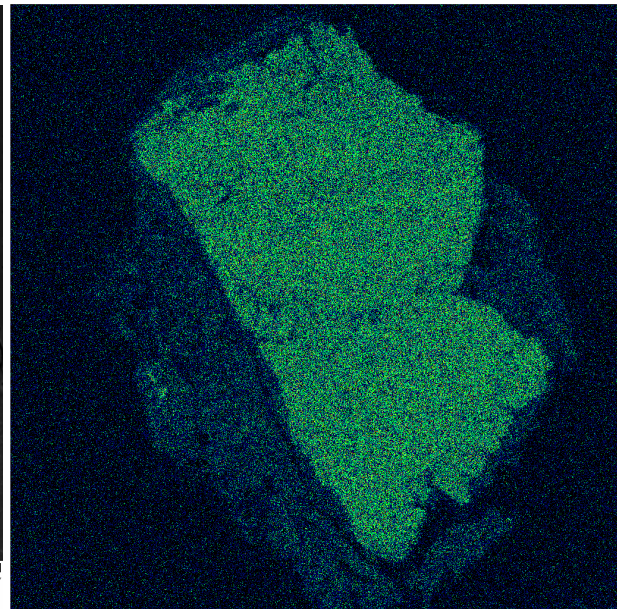
Obrázek 18: Ba-farmakosiderit s uzavřeným arseniosideritem (tmavší domény) v regolitu



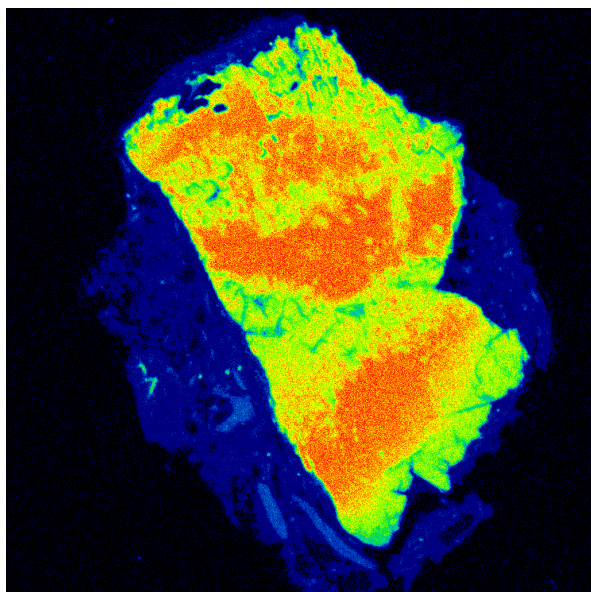
Obrázek 19: Fe-oxidy (světlé) v regolitu



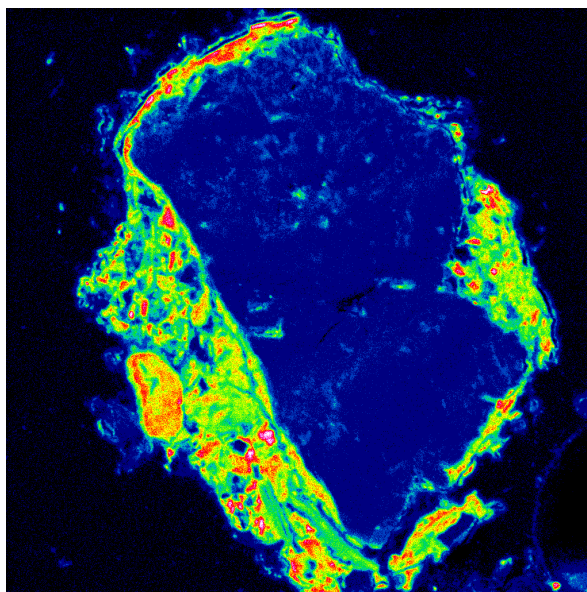
Obrázek 20: Fotografie Fe-oxidu v BSE



Obrázek 21: Distribuční mapa As u Fe-oxidu

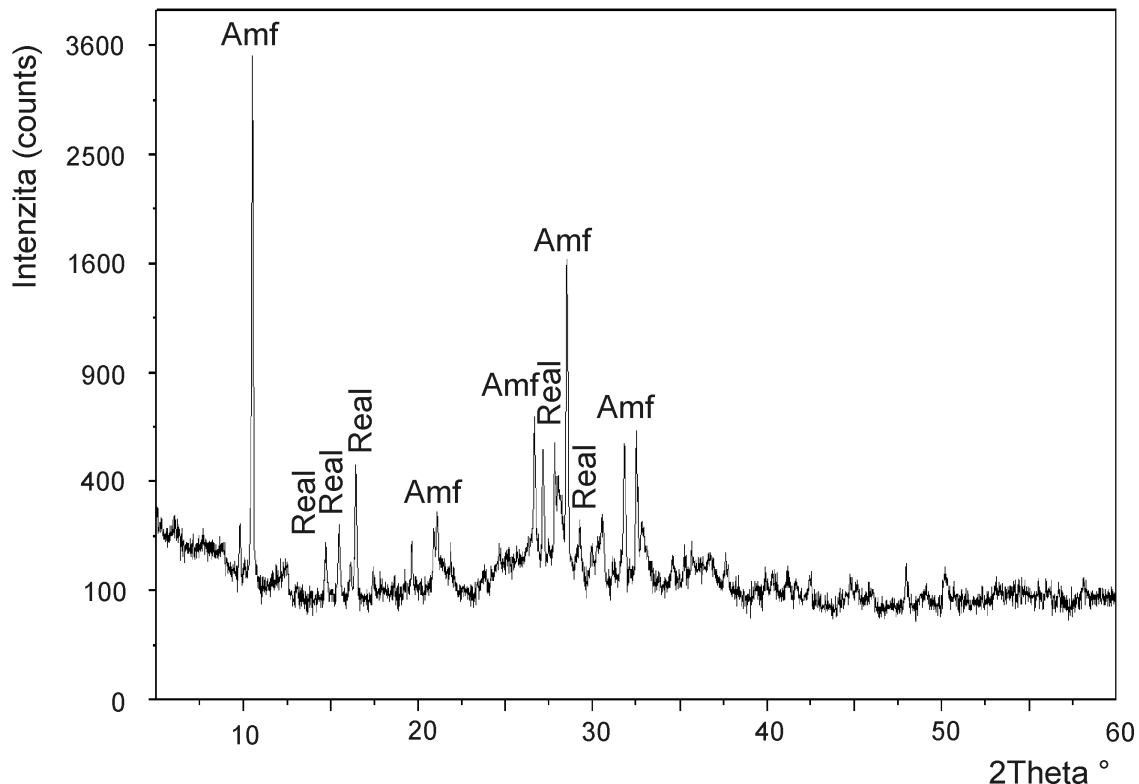


Obrázek 22: Distribuční mapa železa u Fe-oxidu



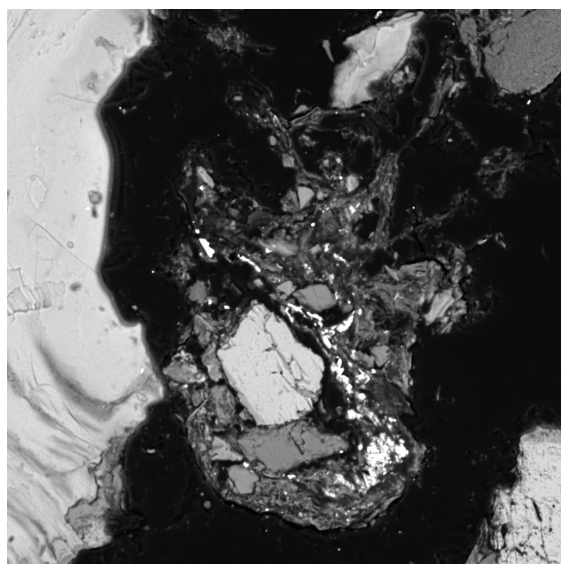
Obrázek 23: Distribuční mapa Al u Fe-oxidu

Na základě RTG bylo zjištěno, že těžká frakce sedimentu obsahuje jen amfibol a biotit. Ve vyseparovaném vzorku těžké frakce sedimentu byl nalezen amfibol a realgar AsS jako jediný zástupce minerálů arsenu (obrázek 24).

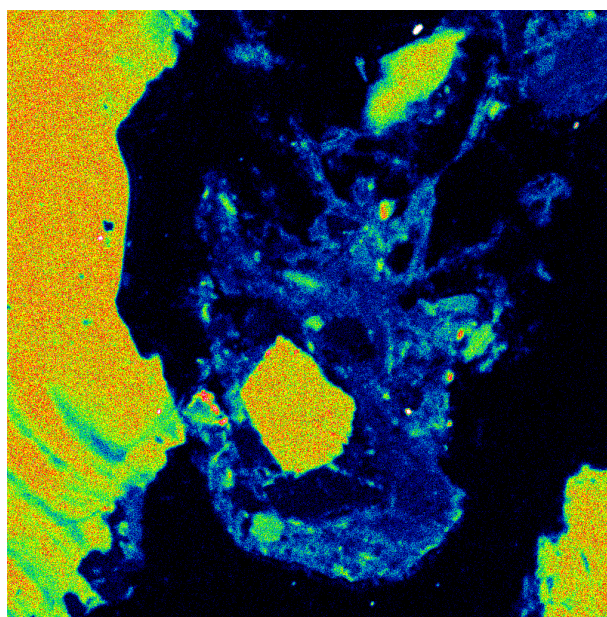


Obrázek 24: Mineralogické složení vyseparovaných zrn fluviálního sedimentu. Amf – amfibol, Real – realgar.

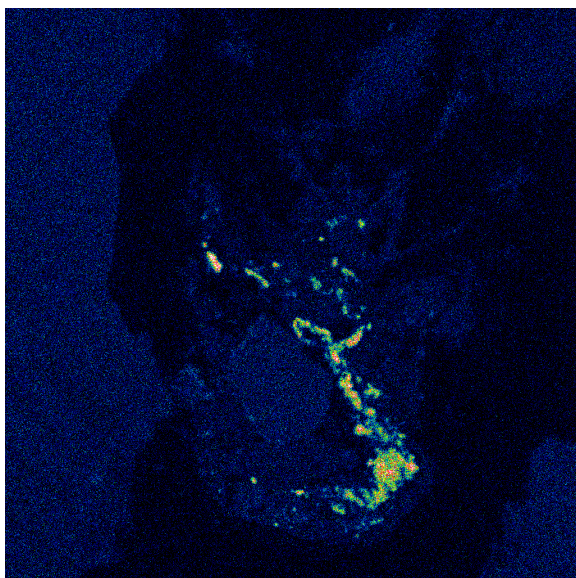
Studium těžké frakce sedimentu v elektronovém mikroskopu s EDS potvrdilo častý výskyt realgaru, ale objevilo také menší množství HFO s podobným obsahem arsenu jako v regolitu (jednotky hm. %) a ojediněle i zrno arseniosideritu. Realgar obvykle tvoří drobná zrnka nebo krystaly na povrchu minerálních zrn a jejich agregátů (obrázek 25 – 28), jak lze vidět na shodné distribuci arsenu a síry na povrchu minerálního agregátu na obrázcích 27 – 28.



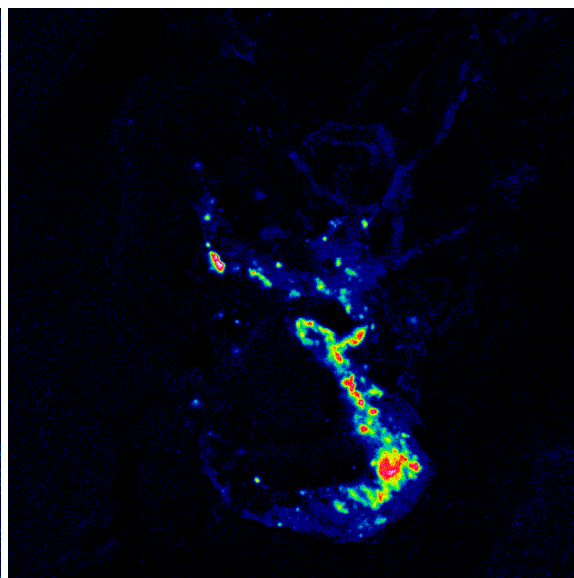
Obrázek 25: Fotografie minerálního agregátu s realgarem v BSE



Obrázek 26: Distribuční mapa Fe v minerálním agregátu s realgarem



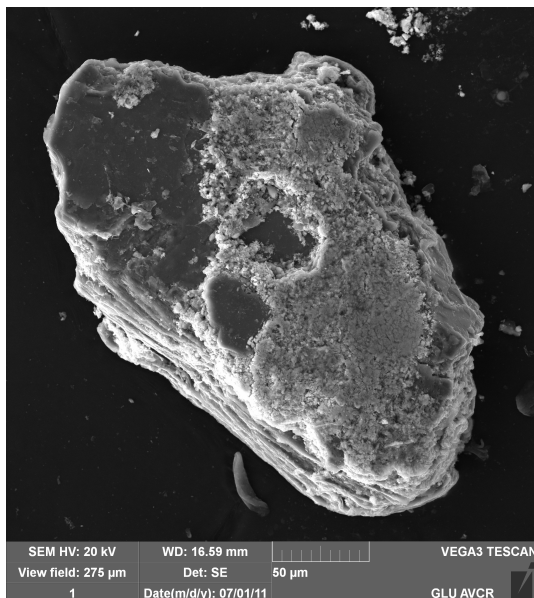
Obrázek 27: Distribuční mapa As v minerálním agregátu s realgarem



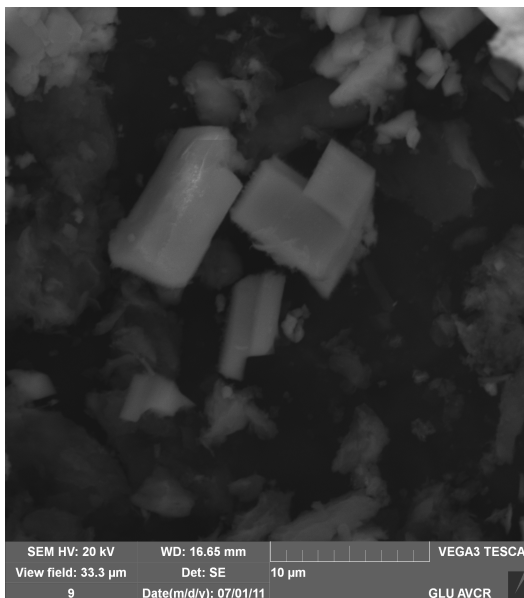
Obrázek 28: Distribuční mapa S v minerálním agregátu s realgarem

Ke zjištění morfologie realgaru bylo použito snímkování elektronového mikroskopu v sekundárních elektronech (SE). Bylo zjištěno, že vytváří povlaky na zrnech amfibolu

(obrázek 29), biotitu, případně organického materiálu (kousky dřeva). Obvykle je jemnokrystalický s nedokonalými krystaly, ovšem výjimečně vytváří až 10 µm idiomorfní krystaly (obrázek 30).



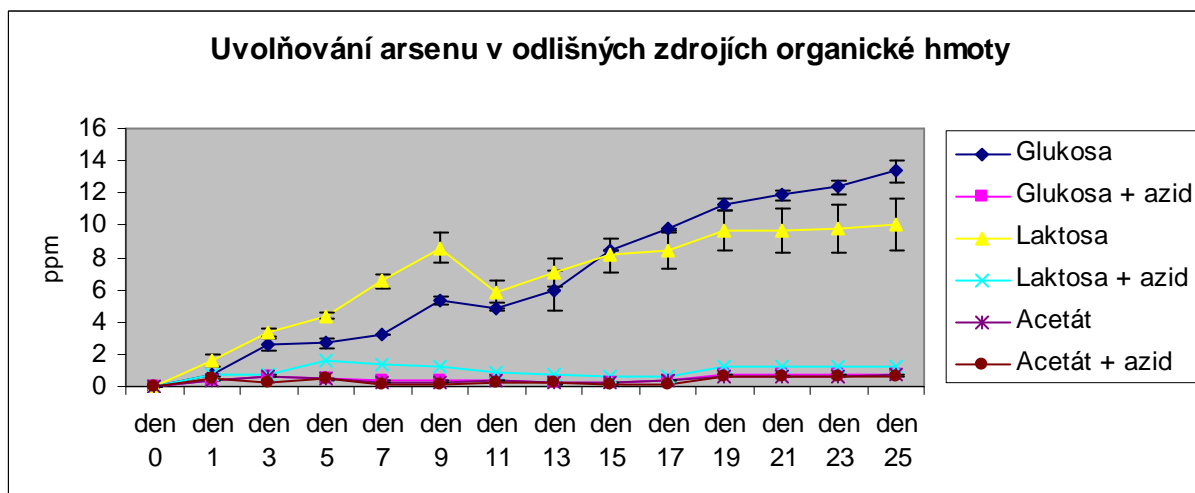
Obrázek 29: Amfibol vpravo obalený realgarem



Obrázek 30: Habitus krystalů realgaru

5.5.3 Zdroj organické hmoty

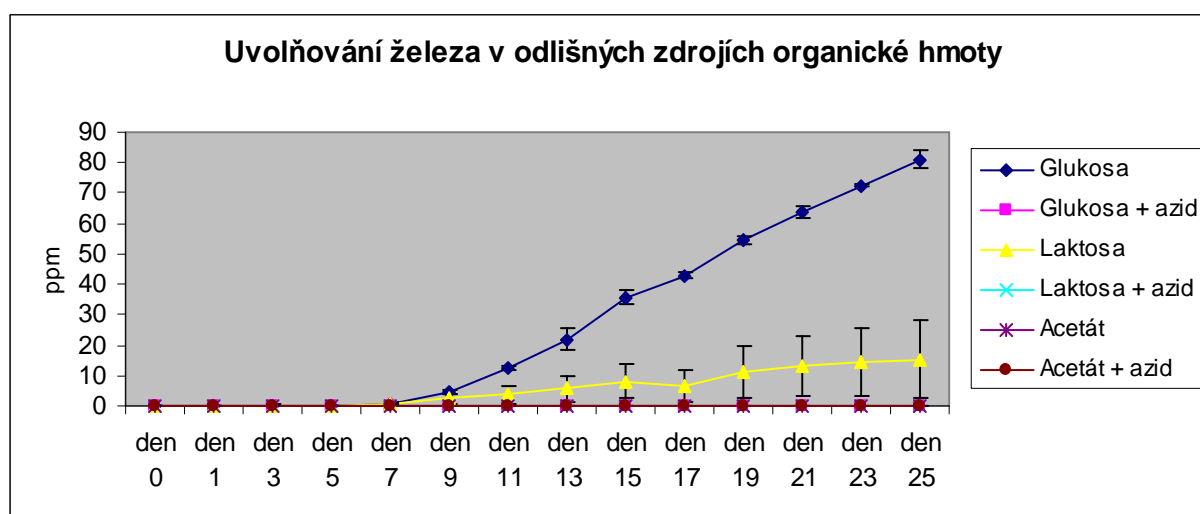
V prvním inkubačním experimentu byl sledován vliv glukosy, laktosy a acetátu na mikrobiální mobilizaci prvků z regolitu v anaerobních podmínkách.



Obrázek 31: Průběh loužení arsenu v jednotlivých zdrojích organické hmoty. Koncentrace arsenu v grafu ukazuje na koncentraci rozpuštěného arsenu v nádobě.

U odběrů byly na přístroji ICP-OES změřeny koncentrace As, Fe, Al, a Mn. Na obrázku 31 a 32 je znázorněn průběh vývoje koncentrace arsenu, jakožto hlavního zájmového prvku, a železa, jehož uvolňování obvykle úzce souvisí s vazbou arsenu (viz kapitola 3).

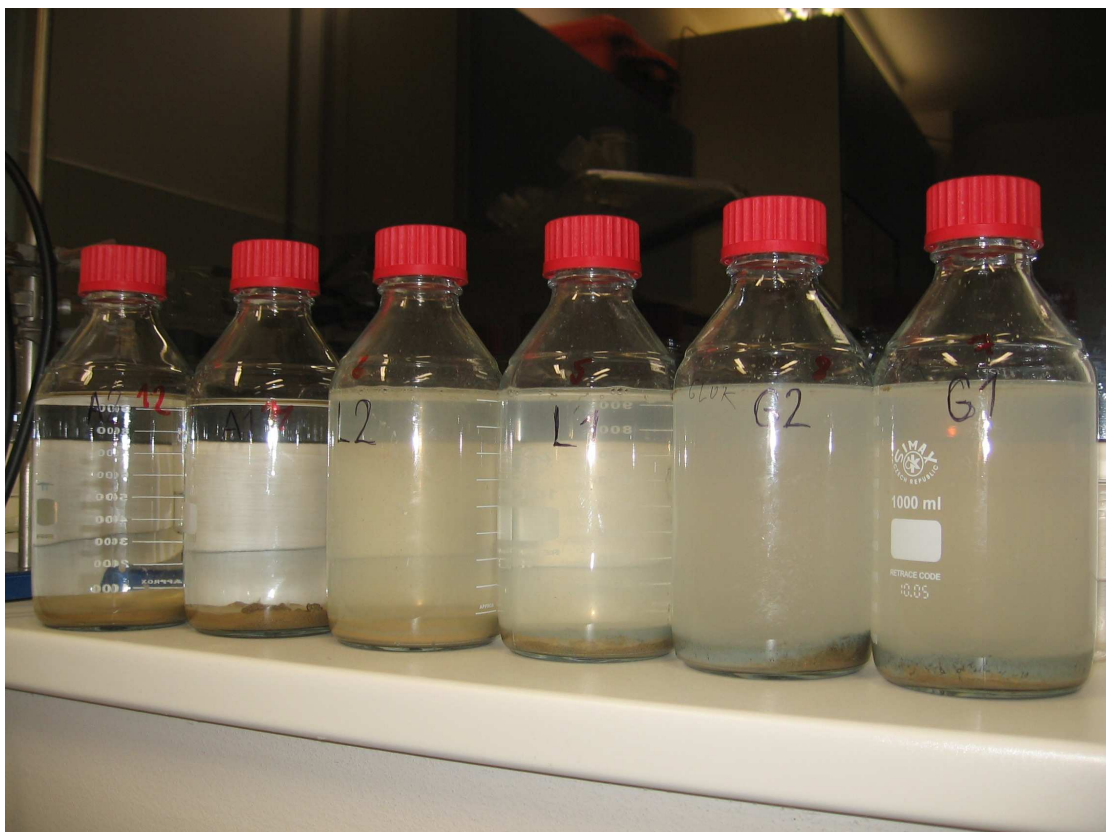
Při porovnání zdrojů organické hmoty klesá množství arsenu i železa v roztoku (vzhledem k poslednímu odběru) v pořadí: glukosa > laktosa > acetát. Stejně pořadí je zachováno i v případě loužení hliníku a manganu. Jejich koncentrace v roztoku byla na konci experimentu velmi nízká (max. 1 ppm Al, max. 5 ppm Mn). Tyto prvky se pravděpodobně uvolnily prostřednictvím mobilizace hydratovaných oxidů železa a manganu, které mohou obsahovat nízké koncentrace hliníku ve své struktuře.



Obrázek 32: Průběh loužení železa v jednotlivých zdrojích organické hmoty. Koncentrace železa v grafu ukazuje na koncentraci rozpuštěného železa v nádobě.

Odlišnosti mezi jednotlivými organickými sloučeninami dokumentuje fotografie z průběhu experimentu (obrázek 33). U jednotlivých nádob je možno vidět různou intenzitu zákalu (nejméně acetát – 2 nádoby zleva) a také různý stupeň redukce (šednutí) zdrojového regolitu (nejvíce glukosa – 2 nádoby zprava). Rozdíl mezi nádobami s živými a usmrcenými mikroorganismy je patrný z obrázku 34. U nádob s azidem není přítomen zákal ani nedochází k šednutí vloženého regolitu. Jeho redukce není urychlena činností mikroorganismů.

Z hlediska množství prvku (jeho koncentrace v odebraném roztoku) uvolněného v průběhu experimentu je jako zdroj organické hmoty pro mikroorganismy nejúčinnější glukosa (vylouženo 29,5 % z celkového arsenu v navážce regolitu), následovaná laktosou (vylouženo 22 % z celkového arsenu v navážce regolitu). Acetát, u něhož koncentrace vylouženého As a Fe nepřesahuje 1 ppm, není v tomto časovém rozmezí dostatečně účinným zdrojem elektronů.



Obrázek 33: Srovnání zdrojů organické hmoty v nádobách s živými mikroorganismy (zleva: acetát, laktosa, glukosa)



Obrázek 34: Rozdíl mezi nádobami s živými mikroorganismy (vlevo) a nádobami s mikroorganismy usmrcenými azidem (vpravo); příklad s glukosou

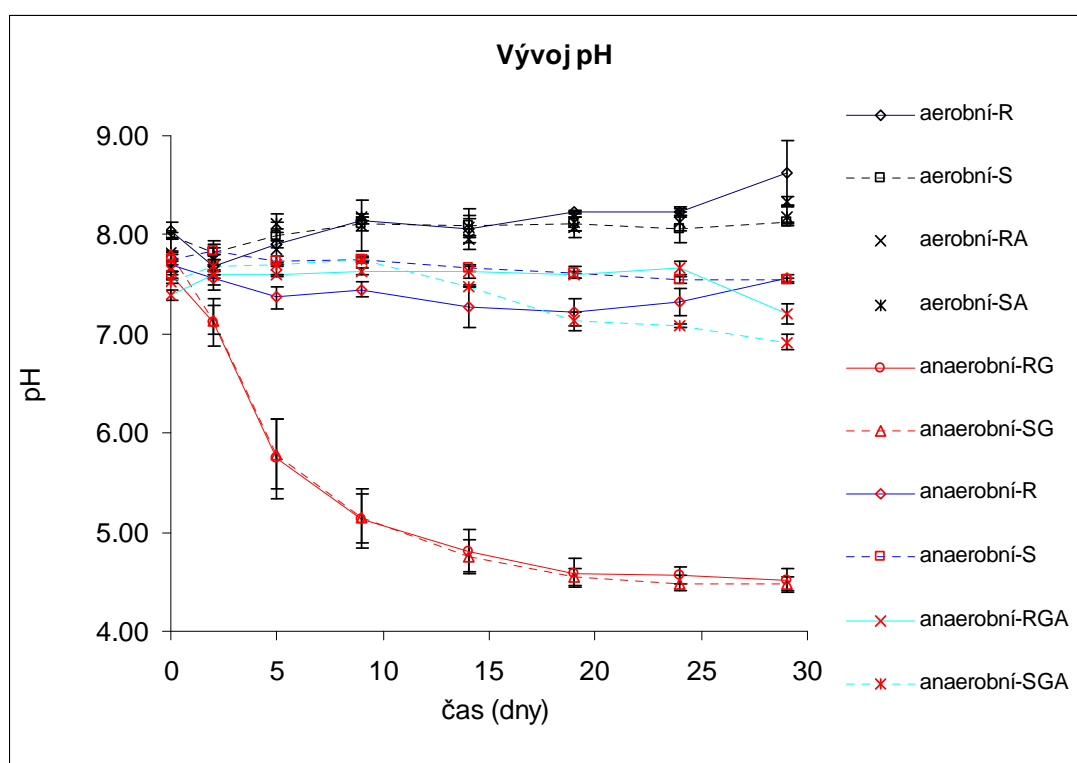
Minimální koncentrace vylouženého arsenu u nádob s azidem mohou být způsobeny například prostým vyloučením nejslaběji vázaného arsenu nebo nedostatečným usmrcením mikroorganismů.

Po zvážení výše uvedených zjištění a literatury zabývající se podobnou tematikou (Park a kol., 2006; Lee a kol., 2009; Freikowski a kol., 2010) byla jako zdroj organického materiálu pro další inkubační experiment zvolena glukosa.

5.5.4 Inkubace regolitu a sedimentu

Po potvrzení vlivu mikroorganismů na mobilizaci arsenu v regolitu a volbě zdroje organické hmoty pro jejich metabolismus byla provedena inkubace regolitu a sedimentu s použitím předchozích zjištění. Doba experimentu a navážky byla zvolena podobně jako u prvního inkubačního experimentu, nicméně ve snaze přiblížit se reálným podmínkám byla snížena koncentrace zdroje organického materiálu na 0,05 M glukosy.

Průběh pH z tohoto inkubačního experimentu je zobrazen na obrázku 35. Významný pokles pH u nádob regolitu a sedimentu s glukosou v anaerobním prostředí je s největší pravděpodobností způsoben rozkladem glukosy (rovnice 1) pomocí mikroorganismů (Freikowsky a kol., 2010).



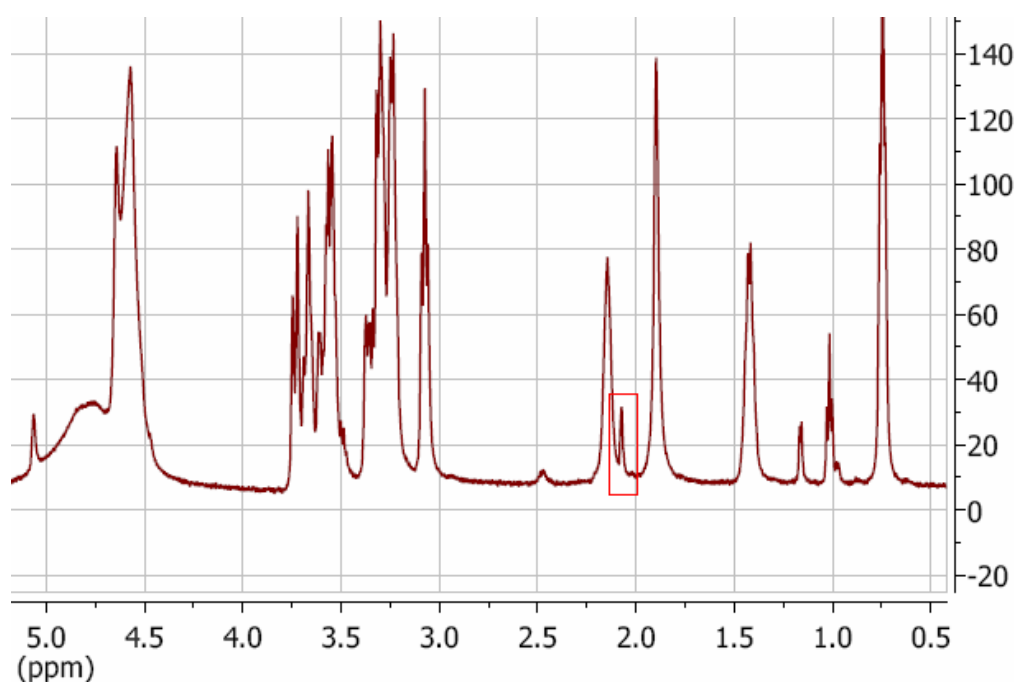
Obrázek 35: Vývoj pH v jednotlivých nádobách druhého inkubačního experimentu (R regolit, S – sediment, G – glukosa, A – azid). Směrodatná odchylka pochází z měření 3 vzorků.

Rovnice 1 (převzato z: Freikowsky a kol., 2010):



V nádobách vzniká velké množství protonů H^+ a různé množství plynů (pravděpodobně CO_2 a H_2). Po ukončení experimentu bylo naměřeno NMR spektrum roztoku z nádoby č. 14, která představuje roztok po inkubaci sedimentu v anaerobním prostředí s přidáním glukosy (tabulka 4). NMR spektroskopie potvrdila přítomnost zbytku nemetabolizované glukosy, ve spektru byl dále identifikován signál CH_3 - skupiny kyseliny octové (obrázek 36), která může vznikat dle rovnice 1. Měření provedl Prof. Jan Schraml, DrSc., Centrální LC-NMR Laboratoř, Ústav chemických procesů AVČR. Je tedy velmi pravděpodobné, že kromě protonů H^+ se na okyselení roztoku podílí mikrobiálně řízená produkce kyseliny octové z glukosy podle rovnice 1, která také pravděpodobně limituje spodní hranici pH křivek hodnotou své pK_a 4,75.

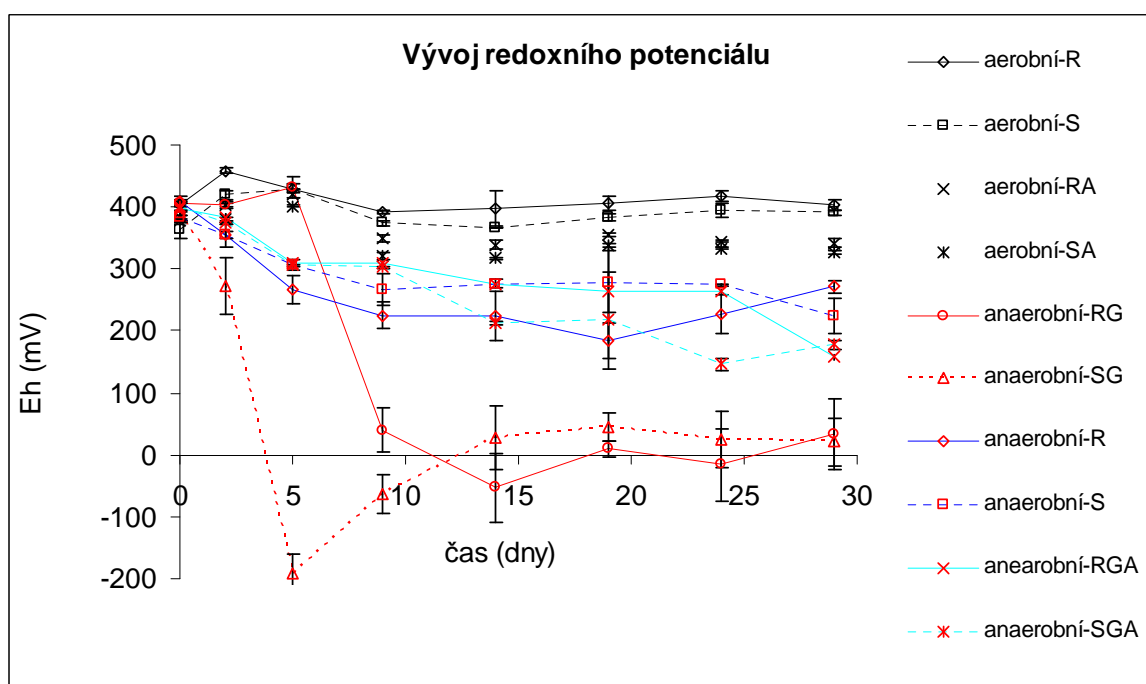
Nepatrný pokles pH u nádob regolitu a sedimentu s glukosou a přidavkem azidu v anaerobním prostředí může být zapříčiněn nedokonalým usmrcením mikroorganismů, a tudíž uvolňováním protonů a tvorbou kyseliny octové z glukosy.



Obrázek 36: ^1H NMR spektrum roztoku z nádoby č. 14 s vyznačením polohy vodíku na methylové skupině kyseliny octové (Gottlieb a kol., 1997).

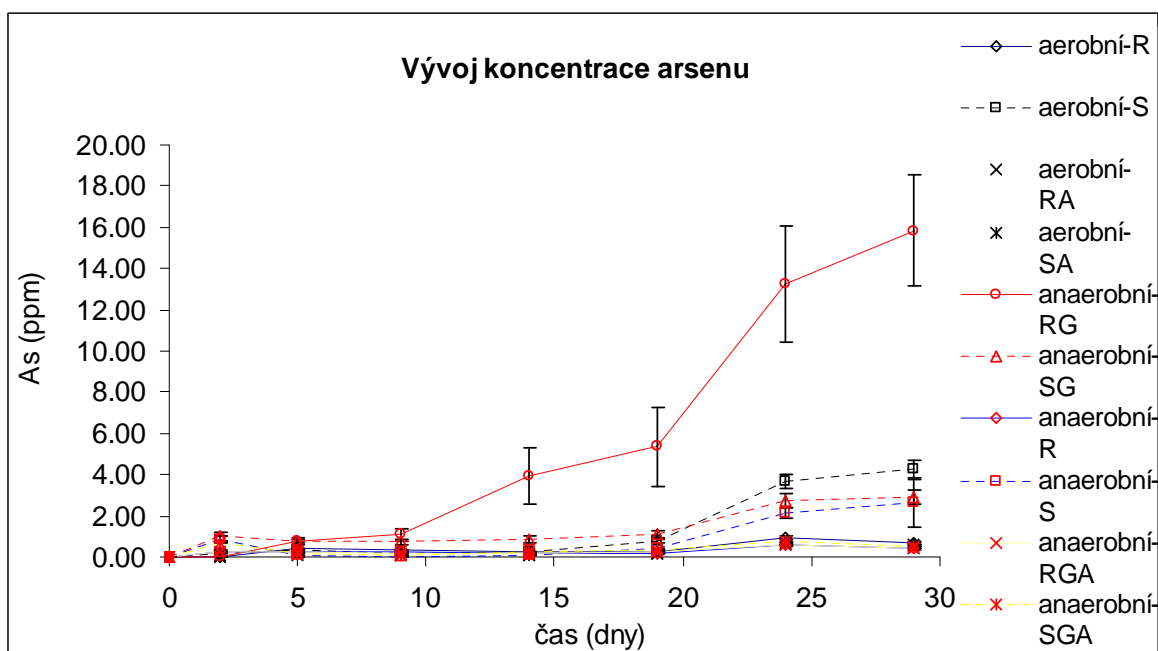
Průběh Eh z druhého inkubačního experimentu je zobrazen na obrázku 37. Poklesem Eh je dokumentován vznik redukčního prostředí v nádobách. Největší pokles redoxního potenciálu

byl zaznamenán podobně jako u pH v nádobách regolitu a sedimentu s glukosou v anaerobním prostředí. Zde dochází vlivem mikrobiální činnosti k urychlené redukci vloženého materiálu. Ke snížení Eh dochází i v nádobách RGA v anaerobním prostředí, zřejmě rovněž z důvodu nedostatečného usmrcení mikroorganismů a jejich adaptací na nové prostředí. Pro první možný důvod hraje fakt, že láhve, ve kterých inkubační experiment probíhal, nebyly po celou dobu promíchávány (homogenizovány s roztokem), a je proto pravděpodobné, že v sedimentu mohly vzniknout drobné enklávy, kde působení azidu nebylo úspěšné. Menší změny v ostatních nádobách jsou patrně způsobeny ustanovováním nové rovnováhy mezi jednotlivými redoxními páry v průběhu experimentu.



Obrázek 37: Vývoj Eh v jednotlivých nádobách 2. inkubačního experimentu (R – regolit, S – sediment, G – glukosa, A – azid)

Na obrázcích 38 – 41 vidíme průběh uvolňování arsenu, železa, manganu a síry v jednotlivých nádobách. Nejvíce arsenu se vyloužilo v nádobě regolitu s glukosou v anaerobním prostředí. Arsen se zde uvolňoval kontinuálně od 1. dne experimentu a díky přidavku glukosy byl mobilizován pomocí mikroorganismů, neboť v identickém vzorku s azidem k uvolňování arsenu nedocházelo (obrázek 38). Koncentrace As v roztoku na konci experimentu činila 15,84 ppm. V ostatních nádobách se vyloužilo výrazně menší nebo zcela minimální množství arsenu. Koncentrace 4 ppm v nádobě se sedimentem v aerobním prostředí zřejmě patří arsenu, který byl vázán na sulfidickou síru, jež se v aerobním prostředí zoxidovala.

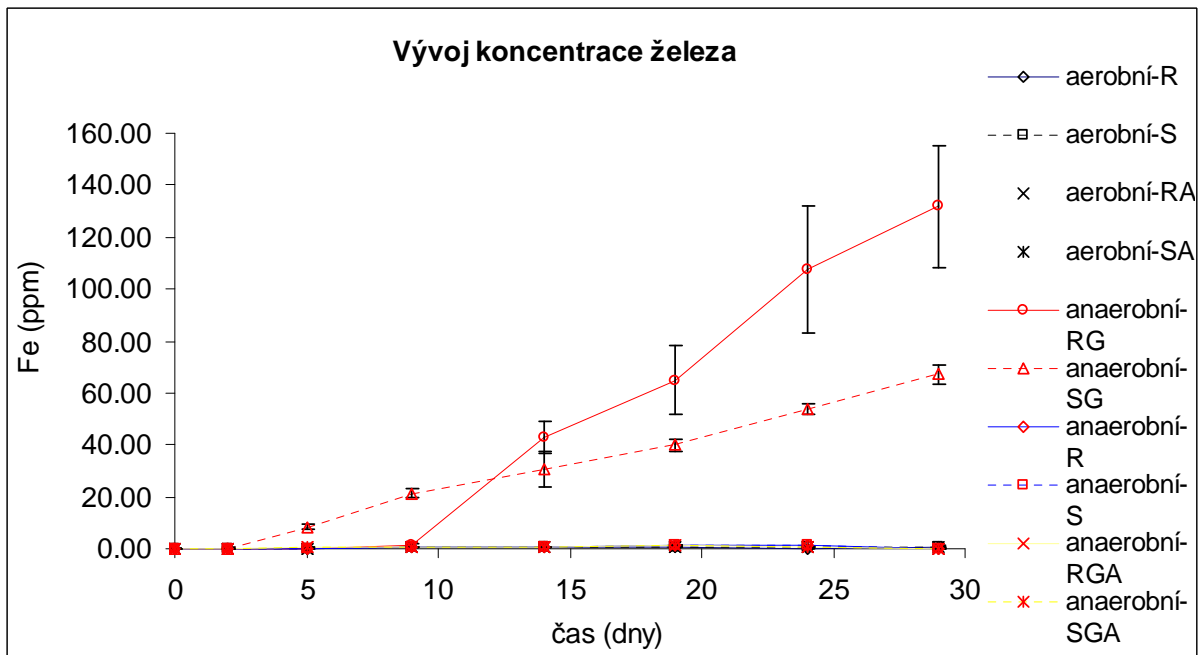


Obrázek 38: Průběh loužení arsenu v jednotlivých nádobách druhého inkubačního experimentu

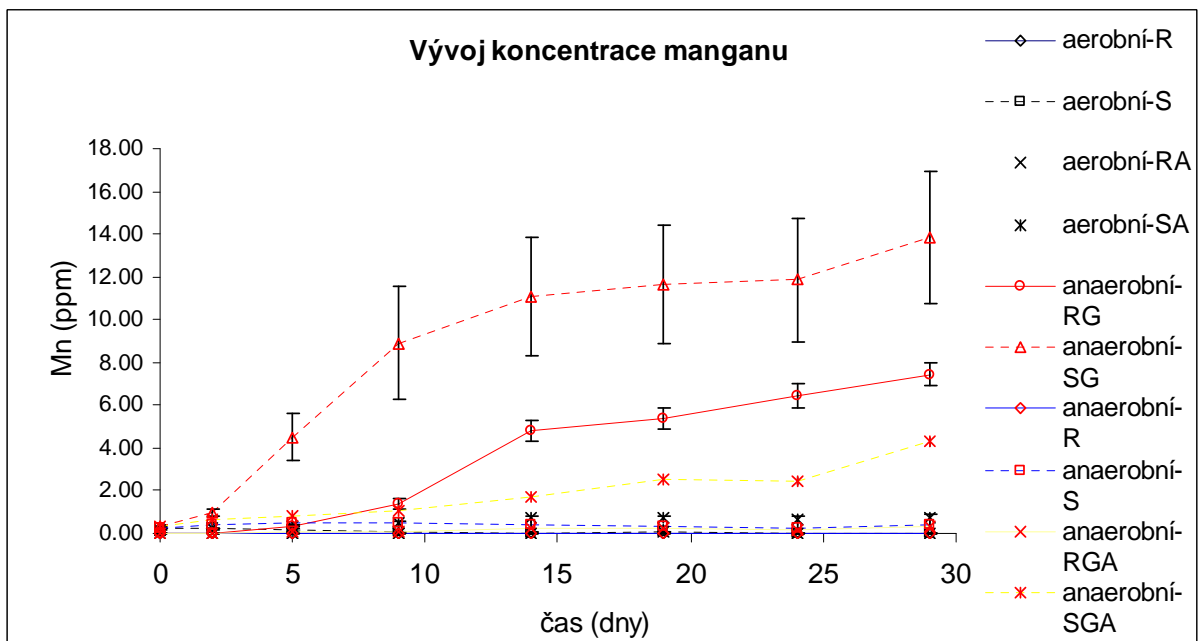
To lze předpokládat na základě výsledků vazby As v sedimentu (kapitola 5.5.2) a stejně načasovaného uvolnění síry (obrázek 41). V nádobě sedimentu s glukosou v anaerobním prostředí se vyloužilo 3 ppm arsenu. Malé množství arsenu se uvolnilo také ze sedimentu v anaerobním prostředí bez přidání glukosy.

V důsledku snižování Eh je redukováno zejména velké množství Fe^{3+} na Fe^{2+} , jak je patrné z obrázku 33. Železo se kontinuálně uvolňuje po celou dobu experimentu v anaerobním prostředí sedimentu s glukosou. Z regolitu se ve stejném prostředí uvolňuje železo až od 9. dne a jeho koncentrace v roztoku je na konci experimentu dvojnásobná (132 ppm) oproti sedimentu s glukosou v anaerobním prostředí. V ostatních nádobách se železo nemobilizuje.

K uvolnění manganu do roztoku dochází od počátku experimentu významně v nádobách regolitu a sedimentu s glukosou, v malé míře také v regolitu s glukosou s azidem, vše v anaerobním prostředí.

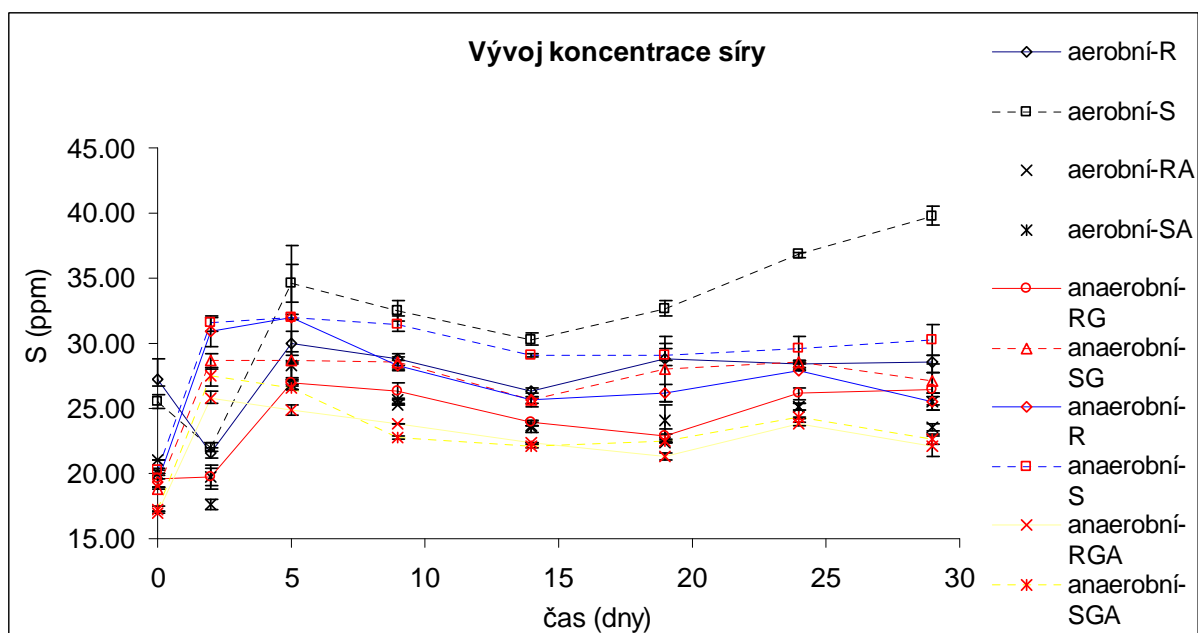


Obrázek 39: Průběh loužení železa v jednotlivých nádobách ve 2. inkubačním experimentu



Obrázek 40: Průběh loužení manganu v jednotlivých nádobách ve 2. inkubačním experimentu

Vzhledem k použití MgSO_4 v syntetické vodě byla počáteční koncentrace síry v nádobách cca 29 mg l^{-1} . K uvolňování síry z vloženého materiálu dochází pouze u sedimentu v aerobních podmínkách po cca 15 dnech experimentu (obrázek 41) v důsledku oxidace sulfidické síry.



Obrázek 41: Průběh loužení síry v jednotlivých nádobách ve 2. inkubačním experimentu

5.5.5 Výsledky sekvenční extrakce

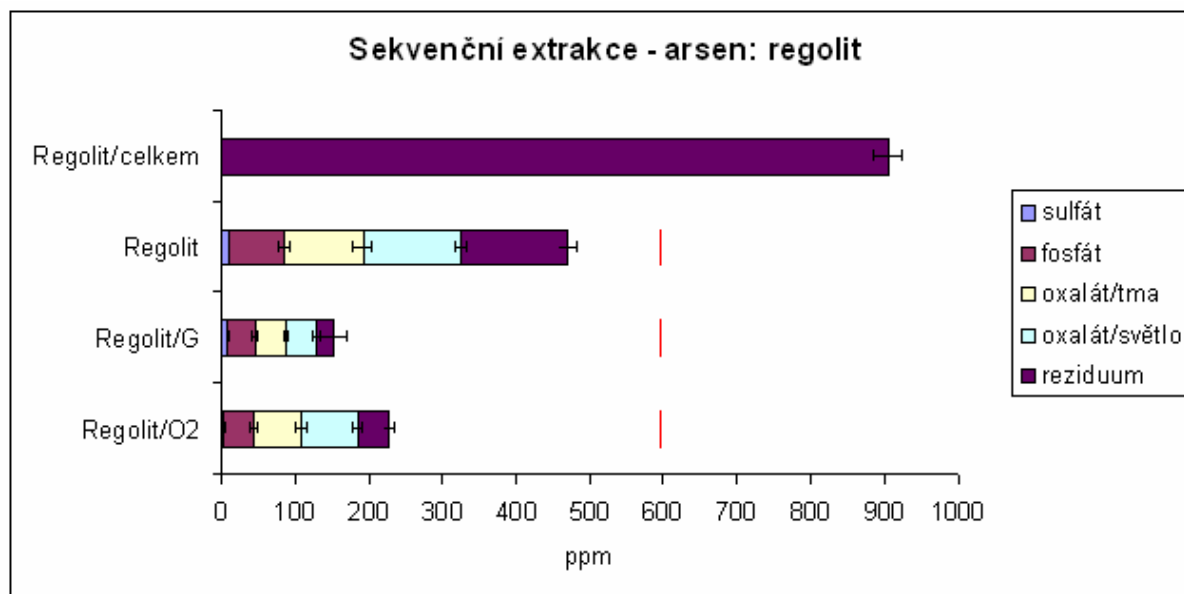
Na obrázcích 42 – 45 jsou vyobrazeny výsledky sekvenční extrakce (SE) regolitu a sedimentu před inkubací a po inkubaci. Hodnoty udávají koncentrace arsenu a železa v jednotlivých frakcích v mg kg^{-1} . Pro srovnání grafy obsahují také údaj o celkové koncentraci prvku ve vzorku, zjištěný pomocí XRF (hodnoty: Sediment/celkem, Regolit/celkem). Tyto celkové hodnoty však byly získány z jemně namletého vzorku, zatímco sekvenční extrakce byla provedena na homogenizovaných vzorcích frakce menší než 2 mm. Proto byla jednorázovou extrakcí $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$, pořízena také kontrolní „celková“ koncentrace prvku, kterou lze vyloužit nejsilnějším činidlem SE.

V případě regolitu (obrázek 42 a 43) obsahovaly (z celkové koncentrace arsenu a železa v navážce) sulfátová frakce 1,1 % As a 0,04 % Fe, fosfátová 8 % As a 0,01 % Fe, oxalát/tma 11 % As a 1 % Fe, oxalát/světlo 14,5 % As a 5,5 % Fe. Reziduální frakce vážala 16 % arsenu a 41,7 % železa. Návratnost SE regolitu činila 78,4 % u arsenu a 87,8 % u železa. Návratnost SE je počítána vůči kontrolní koncentraci.

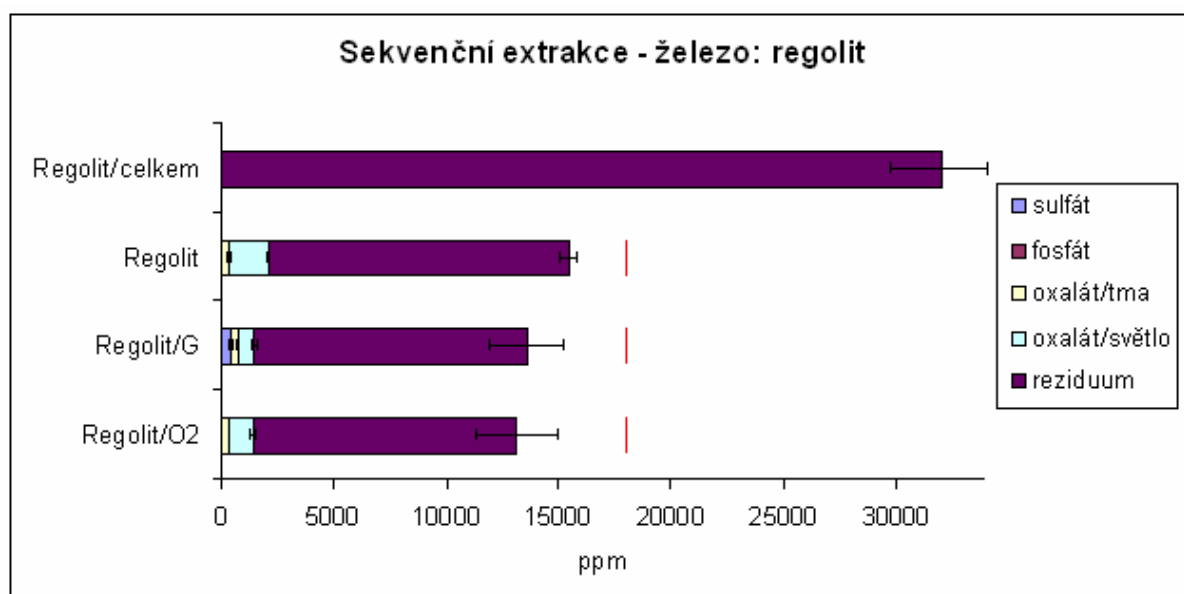
U regolitu, který prošel inkubací s glukosou v anaerobním prostředí, se množství arsenu v posledních 4 frakcích SE zmenšilo přibližně o $\frac{3}{4}$. U železa došlo ke zmenšení reziduální a oxalát/světlo frakcí. Část Fe byla redistribuována do sulfátové frakce (448 ppm místo původních 12 ppm) (obrázek 43).

Z celkové koncentrace v navážce (obrázek 44 a 45) obsahoval sediment 0,55 % As a 0,04 % Fe v sulfátové frakci, 3,8 % As a 0,01 % Fe ve fosfátové frakci, 8,5 % As a 2,6 % Fe v

oxalát/tma frakci, 3,2 % As a 8,2 % Fe v oxalát/světlo frakci. Reziduum obsahovalo 35 % As a 56,4 % Fe. Návratnost SE sedimentu činila 64,9 % u arsenu a 80,4 % u železa. Návratnost SE je počítána vůči kontrolní koncentraci.



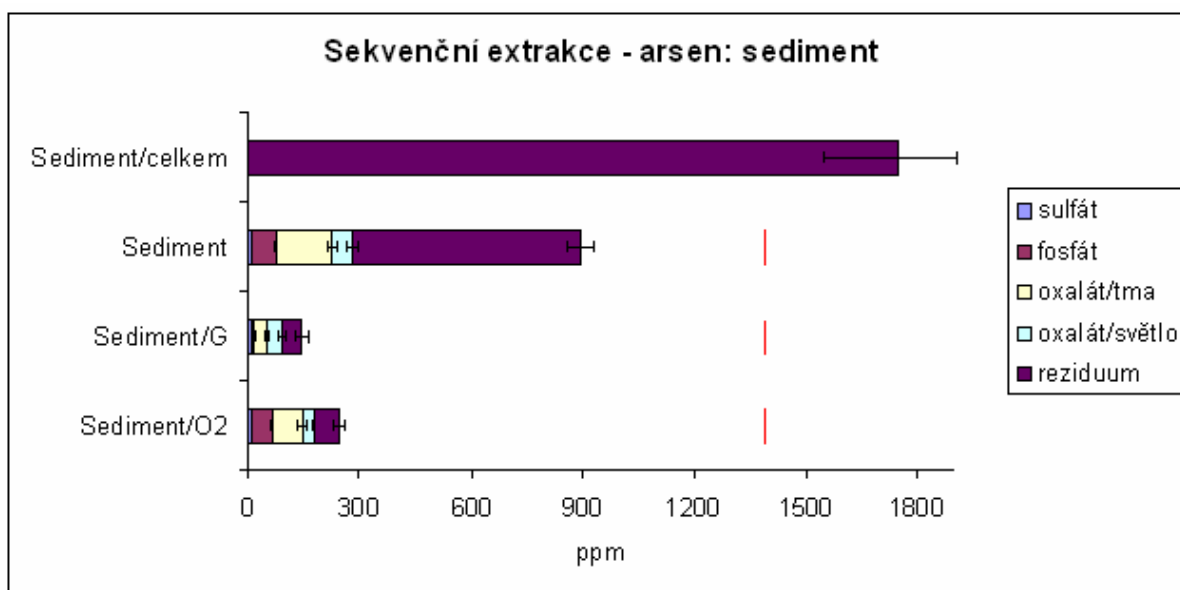
Obrázek 42: Frakcionace arsenu ve vzorku regolitu. | = 599 ppm (kontrolní koncentrace jednorázově vyloužená činidlem $H_2O_2 + HNO_3$)



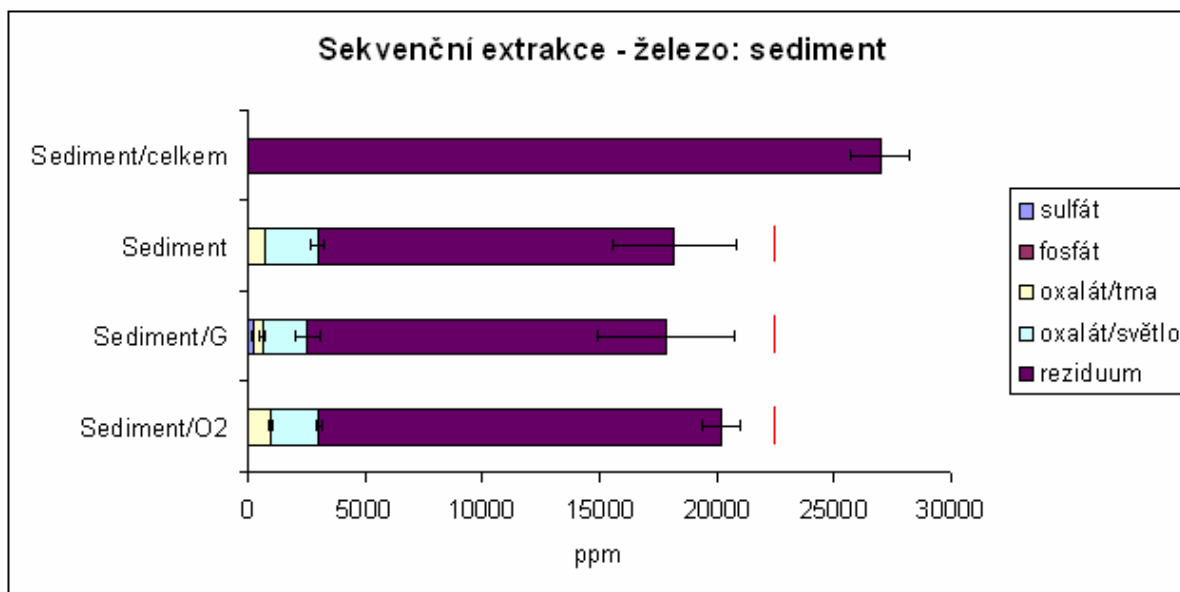
Obrázek 43: Frakcionace železa ve vzorku regolitu. | = 17 612 ppm (kontrolní koncentrace jednorázově vyloužená činidlem $H_2O_2 + HNO_3$)

U sedimentu, který prošel inkubací s glukosou v anaerobním prostředí, došlo u arsenu k výraznému zmenšení všech frakcí kromě sulfátové frakce. Sediment po anaerobní inkubaci s glukosou obsahoval 0,64 % As v sulfátové frakci, 0,42 % As ve fosfátové frakci, oxalát/tma obsahuje 1,9 % As, oxalát/světlo obsahuje 2,4 % As a reziduální frakce obsahuje 3,1 % As.

V případě železa se vytvořila sulfátová frakce s obsahem 448 ppm železa a zmenšila se frakce oxalát/tma.



Obrázek 44: Frakcionace arsenu ve vzorku sedimentu. | = 1382 ppm (kontrolní koncentrace jednorázově vyloužená činidlem $H_2O_2 + HNO_3$)



Obrázek 45: Frakcionace železa ve vzorku sedimentu. | = 22 595 ppm (kontrolní koncentrace jednorázově vyloužená činidlem $H_2O_2 + HNO_3$)

Výsledky sekvenční extrakce vzorků regolitu a sedimentu po inkubaci v aerobním prostředí jsou v případě železa a zejména arsenu velmi neuspokojivé, ačkoliv směrodatné odchylky ze tří opakování ukazují na relativně malé chyby v měření. Množství arsenu v součtu všech frakcí SE a množství arsenu uvolněného ze vzorku během inkubace se výrazně liší.

5.5.6 Identifikace bakterií

Po kultivaci vzorku regolitu a sedimentu bylo identifikováno více než 25 různých druhů bakterií. Seznam nalezneme v tabulce 7. Lomítkem jsou odděleny těžko rozlišitelné druhy.

Tyto druhy jsou díky mechanismům rezistence schopné přežít v podmínkách s více jak 900 ppm arsenu v regolitu a 1750 ppm arsenu ve fluviálním sedimentu.

Tabulka 7: Seznam identifikovaných bakterií. R – regolit, S – sediment.

Název:	Nalezeno:
<i>Aeromonas salmonicida/bestiarium/piscicola/media</i>	S
<i>Arthrobacter agilis</i>	S
<i>Arthrobacter sp./sulfonivorans/oxydans/ramosus</i>	S
<i>Bacillus megatherium</i>	R, S
<i>Bacillus psychrodurans</i>	S
<i>Bacillus simplex</i>	R, S
<i>Bacillus thioparans/boroniphilus</i>	S
<i>Bacillus weihenstephanensis/mycooides</i>	R, S
<i>Caulobacter leidyi</i>	R
<i>Exiguobacterium undae</i>	S
<i>Lactobacillus sphaericus</i>	R
<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	S
<i>Lysinibacillus sp.</i>	S
<i>Mesorhizobium sp.</i>	R
<i>Micrococcus luteus</i>	S
<i>Nesterenkonia flava</i>	S
<i>Paenibacillus anaericanus</i>	S
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	R
<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i>	R
<i>Pseudomonas frederikbergensis/mediterranea</i>	R
<i>Pseudomonas putida</i>	S
<i>Sporosarcina globispora</i>	S
<i>Sporosarcina luteola</i>	S

6 Diskuse

6.1 Výběr vzorků pro studium mobilizace

Lokalita Mokrsko je oblast vyznačující se vysokou koncentrací arsenu v půdě (Janatka a Morávek, 1990). Jak vyplývá z předcházejících výsledků (Drahota a kol., 2009), arsen se z půdy mobilizuje prostřednictvím řady biogeochemických procesů, a proto se vyskytuje ve vodném prostředí v koncentračním rozmezí 68 – 1141 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pro studium mobilizace byly vybrány dva vzorky reprezentující kontrastní prostředí, ve kterých je arsen odlišně vázán a ze kterých se na daném území může uvolňovat vlivem mikrobiální činnosti do vodného prostředí. Odebrán byl vzorek regolitu z oxidačního prostředí na hranici podzemní vody

(hloubka cca 100 cm), jejíž kolísání může mít vliv na změnu redoxních podmínek. Toto prostředí obsahuje obvykle nejvyšší koncentrace arsenu ve zvětrávacím profilu (Drahota a kol. 2009). Z těchto důvodů je přestup arsenu v tomto prostředí z pevné fáze do vodného prostředí vlivem mikrobiální aktivity velmi pravděpodobný. Jako druhý vzorek byl odebrán fluviální sediment z redukčního prostředí (hloubka cca 60 cm) s vysokým obsahem organické hmoty.

6.2 Charakteristika vzorků

Celkový obsah arsenu v regolitu byl metodou XRF stanoven na 905 mg kg^{-1} . Obsah As v sedimentu byl metodou XRF stanoven na 1749 mg kg^{-1} . Drahota a kol. (2009) naměřili u odběrů ze stejného místa 1770 mg kg^{-1} As v regolitu a 1193 mg kg^{-1} As v sedimentu. Takto odlišné hodnoty mohou být důsledkem zejména prostorové variability koncentrací arsenu na krátké vzdálenosti, která byla zjištěna již ve starších pracích (Filippi a kol., 2004, 2007; Drahota a kol., 2009).

Metodami XRD a EDS byl v regolitu identifikován křemen, amfibol, biotit, vermikulit, Ba-farmakosiderit, arseniosiderit a goethit obsahující arsen. V sedimentu byl nalezen amfibol, Fe-oxidy s obsahem arsenu, arseniosiderit a realgar. Výsledky mineralogie arsenonosných minerálů v regolitu a sedimentu se prakticky shodují s výsledky, které publikovali Filippi a kol. (2004, 2007) a Drahota a kol. (2009) z této oblasti. Zahrnují významnou vazbu arsenu na sekundární produkty zvětrávání arsenopyritu, jako jsou hydratované Fe oxidy, Ba farmakosiderit a arseniosiderit. Drahota a kol. (2009) rovněž uvádějí, že arsen je v redukčních podmínkách sedimentu vázan prostřednictvím adsorpce a koprecipitace na novotvořené sulfidy železa. Vycházejí z naměřené nízké koncentrace rozpuštěného arsenu, potřebné k vysrážení sulfidů arsenu, a termodynamického modelování. Tyto výsledky nesouhlasí s výsledky současného měření, jelikož ve vzorku fluviálního sedimentu nebyly nalezeny sulfidy železa. Významnou odlišností je nález realgaru ve vzorku fluviálního sedimentu, který dříve nalezen nebyl. Jeho vznik v povrchových podmínkách je ve světové literatuře popsán pouze ojediněle. Nález novotvořené realgaru v sedimentu potvrdili pomocí rentgenové absorpční spektroskopie O'Day a kol. (2004) v souvislosti s mikrobiální redukcí síry a arsenu. Realgar tvoří hlavní arsenonosnou fázi. Bylo potvrzeno, že arsen zde není součástí pyritu ani arsenopyritu.

Realgar (AsS) a jeho polymorfní formy (As_4S_4) obvykle vznikají ze sopečných exhalací. Často se vyskytují spolu s auripigmentem (As_2S_3) (Mandal a Suzuki, 2002). Za příznivých

podmínek mohou rozpuštěné sulfidy přímo reagovat s oxyanionty arsenu za vzniku nerozpustných sraženin (Wilkin a Ford, 2006). Realgar je stabilní v rozmezí redoxního potenciálu od -200 do -400 mV v rozmezí pH rostoucího od 4 do 8 (Cullen a Reimer, 1989). Se sulfidy se sráží železo dříve než arsen. V podmínkách s omezeným množstvím Fe^{2+} a dostatečným nadbytkem S^{-2} (rychlou redukcí síranů) se arsen s přebytkem sulfidické síry sráží na pevné As-S struktury, jako jsou amorfní auripigment či realgar (Kocar a kol., 2010).

6.3 Výběr zdroje organické hmoty

Pro účely urychlení mobilizace arsenu a dalších prvků pomocí organotrofních mikroorganismů přítomných ve vzorku regolitu byly porovnávány 3 zdroje organického materiálu (glukosa, laktosa, acetát). Jak vyplývá z obrázků 31 a 32, zobrazujících uvolňování As a Fe během prvního inkubačního experimentu, je z daného výběru pro uvolnění obou prvků nejúčinnější glukosa. Laktosa je účinná v případě uvolňování arsenu, nikoli však železa. K mobilizaci arsenu v roztoku glukosy i laktosy dochází kontinuálně od 1. dne inkubace. Železo se v glukose i laktose začíná mobilizovat shodně až od 7. dne inkubace. Na základě těchto zjištění lze tedy uvažovat o dvou možných procesech mobilizace. První proces zahrnuje preferenční mikrobiální redukcí pětimocného arsenu, která předchází reduktivnímu rozpouštění hydratovaných Fe oxidů. Druhým možným vysvětlením dřívějšího uvolnění arsenu z hydratovaných Fe oxidů a Fe arseničnanů je sorbce Fe na minerální povrchy. Tuto hypotézu podporuje fakt, že se slabě vázaná frakce Fe (sulfátová frakce) v SE u vzorku regolitu po anerobní inkubaci výrazně zvětšila (obrázek 43). V roztoku glukosy se daří zejména bakteriím redukujícím Fe^{3+} . Lze tak usuzovat z koncentrace prvku na konci experimentu (81 ppm Fe v glukose, 15 ppm v laktose). Acetát, přestože je z daného výběru nejpřirozenější sloučeninou *in situ* (např. kořenové exudáty rostlin, metabolity půdních organismů), nemá evidentně podíl na mobilizaci prvků ve zkoumaném vzorku regolitu a sedimentu.

Lee a kol. (2009) a Freikowski a kol. (2010) zkoumali v podobném experimentu vliv glukosy, laktátu a acetátu. Výsledky jasně hovoří ve prospěch glukosy a jejího vlivu na rychost mobilizace arsenu, respektive růst bakteriálních kultur.

6.4 Inkubace a sekvenční extrakce regolitu a sedimentu

K nejintenzivnějšímu uvolňování arsenu dochází podle očekávání v inkubovaném regolitu s přidavkem glukosy v anaerobním prostředí (obrázek 38). Přibližně od 9. dne dochází k

rapidnějšímu nárůstu koncentrace As v roztoku. Podobný průběh jako arsen má koncentrační křivka železa (obrázek 39). Korelační koeficient (0,9849) mezi koncentracemi As a Fe v roztoku naznačuje, že v nádobě dochází k mikrobiální redukci hydratovaných oxidů železa (případně sekundárních arseničnanů), na kterých je adsorbováno velké množství arsenu. Tomu odpovídá výrazný pokles Eh na obrázku 37 a mineralogické složení regolitu. Malá část arsenu se může desorbovat z rozpouštějících se oxidů manganu (Sadiq, 1995), který se mobilizuje rovněž od cca 9. dne inkubace. Ze SE regolitu po inkubaci s glukosou vyplývá, že arsen pochází zejména z reziduální, obou oxalátových a fosfátové frakce. Snížení arsenu v oxalátových frakcích koresponduje s očekávaným uvolněním arsenu z hydratovaných Fe oxidů, které tímto snižují svůj celkový povrch ve vzorku a tedy i množství vázaného arsenu ve fosfátové frakci (obrázek 42). Pokles v reziduální frakci může korespondovat s uvolněním arsenu z krystalických sekundárních arseničnanů, jako je Ba farmakosiderit a arseniosiderit, nicméně lze předpokládat, že se tyto fáze budou do určité míry rozpouštět i v obou oxalátových extrakcích (Matera a kol., 2003). Pokles železa v oxalát/světlo frakci ukazuje na převahu dobře krystalických Fe fází (goethit a hematit) nad amorfními (ferrihydrit) (obrázek 43).

Inkubace sedimentu s glukosou v anaerobních podmínkách nevedla k tak výraznému uvolnění arsenu (pouze 2,9 ppm As v roztoku na konci experimentu) jako u regolitu. To odpovídá mineralogickému složení sedimentu, který obsahuje výrazně menší množství hydratovaných Fe oxidů se sorbovaným arsenem než regolit. Relativně malé uvolnění arsenu v tomto experimentálním uspořádání ovšem nesouhlasí s výsledky SE (obrázek 44), podle kterých by koncentrace arsenu v roztoku na konci inkubačního experimentu měla být více jak o řád vyšší, zhruba 38 ppm. Možné vysvětlení tohoto rozporu by mohlo být srážení sulfidů arsenu během zvýšení redukčních podmínek (obrázek 37), tomu ovšem neodpovídá očekávaný pokles koncentrace síry během inkubace (obrázek 41). Ze sedimentu s glukosou v anaerobních podmínkách se uvolnilo nejvíce manganu (14 ppm v roztoku na konci experimentu), a 67 ppm železa, pocházejících z oxalát/tma frakce. To odpovídá rozpouštění zjištěných hydratovaných Fe oxidů a častějších Mn oxidů ve fluvialním sedimentu než v regolitu (Drahota a kol., 2011).

V nádobě bez glukosy, obsahující sediment v anaerobním prostředí, došlo k uvolnění 2,6 ppm arsenu, který se patrně uvolnil z hydratovaných oxidů železa, přítomných v sedimentu z důvodu kontaminace při odběru vzorku. Experiment v tomto uspořádání nejlépe modeloval podmínky *in situ*, neboť zdroj organické hmoty byl ve stejné koncentraci a složení jako v přírodě. Lze tedy předpokládat, že v případě zamezení přístupu atmosférického kyslíku

prouděním podzemní vody do sedimentu bude docházet k poklesu redoxního potenciálu, reduktivnímu rozpouštění hydratovaných Fe oxidů a uvolňování sorbovaného arsenu.

Naopak inkubace regolitu v anaerobních podmínkách bez přidání glukosy nevedla v průběhu trvání experimentu (1 měsíc) k uvolnění železa a arsenu, ani nedocházelo k výkyvům pH a Eh. V těchto podmínkách tedy pravděpodobně není dostatek vhodné organické hmoty pro mikrobiální mobilizaci prvků.

Zajímavý je průběh loužení arsenu a síry v sedimentu v aerobních podmínkách (obrázek 38 a 41). Korelační koeficient jejich koncentrací má hodnotu 0,7761. Od 19. dne inkubace dochází k současnému uvolňování obou prvků. Vzhledem k faktu, že se v této nádobě neuvolňuje žádný jiný prvek, mohlo by se jednat o rozpouštění realgaru oxidací sulfidické síry, ačkoliv nedochází ke zvyšování redoxního potenciálu (obrázek 37). V experimentu prováděném za stejných podmínek, ovšem s přidáním azidu, k uvolňování arsenu ani síry nedocházelo. Je tedy zřejmé, že oxidace realgaru v sedimentu je mikrobiálně katalyzována a uvolnění arsenu v podmínkách bez glukosy a bez azidu mohou mít na svědomí chemolitotrofní mikroorganismy, které jako zdroj elektronů pro redukci As^{5+} využívají jednoduché anorganické sloučeniny (např. S^{-2}) (Routh a kol., 2007).

V regolitu s celkovým obsahem 905 ppm arsenu bylo sekvenční extrakcí rozloženo 470 ppm arsenu. Kontrolní koncentrace z jednorázové extrakce činila 599 ppm. V případě fluvialního sedimentu bylo z celkové koncentrace 1749 ppm pomocí SE mobilizováno 897 ppm As. Jednorázovou extrakcí se získalo 1382 ppm arsenu. Zbytek do celkového množství vázaného arsenu zůstal nerozložen. Jedním z důvodů může být větší zrnitost extrahovaného materiálu, jak bylo zmíněno v kapitole 5.5.5. Nedostupnost velkého množství arsenu (34 % As v regolitu a 21 % As v sedimentu) lze také vysvětlit přítomností pevné vazby arsenu v realgaru či Ba-farmakosideritu v reziduální frakci a volbou nedostatečně silného činidla SE. Přestože je činidlo HNO_3 v kombinaci s H_2O_2 hojně používáno pro extrakci reziduální frakce, nemusí být v závislosti na vzorku dostatečně selektivní a účinné. Pro silně vázané sloučeniny, jako jsou některé jednoduché sulfidy arsenu (např. realgar a auripigment), by bylo zřejmě vhodnější použít silnější rozpouštědla typu HClO_4 , HF nebo aqua regia (Gleyzes a kol., 2002; Hudson-Edwards a kol., 2004). Tuto teorii by objasnila pouze mineralogická analýza zbytku materiálu po sekvenční extrakci.

6.5 Výsledky identifikace bakterií

Nalezené druhy bakterií v tabulce 7 byly izolovány ze dvou nezávislých, po sobě jdoucích kultivacích. U druhé kultivace, provedené na vzorku regolitu a sedimentu s glukosou v anaerobním prostředí po ukončení druhého inkubačního experimentu, se s předchozí kultivací shodovalo pouze 5 druhů bakterií. Ostatní byly nové. Je proto velmi pravděpodobné, že neznámé množství druhů zůstalo neobjeveno a neidentifikováno. Navíc je možné, že celou řadu bakterií, mezi kterými mohou být i bakterie metabolizující arsen, nelze úspěšně kultivovat na zvoleném typu živného média (TSA).

Původní záměr – izolovat u nalezených druhů bakterií *ars* geny kódující konkrétní způsob transformace arsenu (respirace, detoxifikace) – se nezdařil. Geny nebyly z neznámých důvodů nalezeny.

Klíčový význam pro splnění cíle diplomové práce má nález bakterie *Pseudomonas putida* v odebraném sedimentu. Jak známo z literatury, tento druh disponuje schopností anaerobní respirace pětimocného arsenu a jeho transformace na As^{3+} ve formě arsenitanů. Bylo pozorováno, že při nulové koncentraci arseničnanů nedochází k bakteriálnímu růstu, přestože je přítomen zdroj organického materiálu (Freikowski a kol., 2010). Lze proto předpokládat, že tento druh může hrát podobnou roli v respiraci pětimocného arsenu i v anaerobním prostředí na Mokrsku.

6.6 Dopady na životní prostředí

Abnormální množství arsenu v půdě s sebou přináší obavy z jeho uvolňování a následné kontaminace vodních zdrojů. Inkubace regolitu a fluvialního sedimentu v anaerobních podmínkách (bez přídavku organické hmoty) představuje věrohodný model reálných podmínek, ve kterých v oblasti Mokrska může docházet k mobilizaci arsenu. Inkubace navíc probíhala v syntetické vodě, jejíž složení přibližně odpovídá složení vody na Mokrsku.

Z inkubace regolitu v anaerobních podmínkách (obrázek 38) vyplývá, že v daných podmínkách nehrozí rapidní uvolňování arsenu, např. v případě kolísání hladiny podzemní vody nebo přívalových dešťů. Nedochází ani k výkyvům pH (obrázek 35). Důvodem je nízký obsah vhodných organických látek pro heterotrofní organismy, které jsou v regolitu na Mokrsku přítomny a jsou schopné velmi snadno reduktivně rozpouštět hydratované Fe oxidy, případně sekundární Fe arseničnany. Jinak je tomu u inkubace sedimentu v anaerobních podmínkách, kde docházelo k mírnému uvolňování As z reduktivního rozpouštění hydratovaných Fe-oxidů. Větší množství organické hmoty v sedimentu zřejmě hraje hlavní

roli v mikrobiální redukci, která může být zvýšena zamezením přístupu atmosférického kyslíku do sedimentu, např. zvýšením hladiny podzemní vody.

K rapidnějšímu nárůstu mobility arsenu může dojít v případě a) intenzivního hnojení na dané lokalitě, tj. přísun živin pro chemolitotrofní organismy a organického materiálu pro heterotrofní organismy, např. dusíkatá hnojiva nebo fosfátová hnojiva, kdy může dojít k vytěsnění arseničnanů specificky vázaných ve fosfátové frakci; b) vývozu bahna z rybníka v obci Mokrsko, tzn. přesunutí sedimentů, které kromě heterotrofních mikroorganismů schopných redukovat Fe^{3+} , případně pětimocný arsen, obsahují také chemoautotrofní bakterie, které katalyzují oxidaci hlavního nositele arsenu v anaerobních podmínkách na Moksku (novotvořený realgar) do aerobních podmínek (křivka inkubace sedimentu v aerobních podmínkách na obrázku 38).

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vliv mikrobiální aktivity na mobilizaci arsenu vázaného v půdě v oblasti zlatonosného ložiska Mokrsko. Ke studiu byl vybrán vzorek regolitu z polního vrtu v hloubce 100 cm a vzorek potočního sedimentu z hloubky 60 cm. V rámci charakteristiky vzorků byly metodou XRF stanoveny celkové koncentrace arsenu 905 mg kg^{-1} v regolitu a 1749 mg kg^{-1} v sedimentu. Metodou XRD a EDS byly identifikovány minerály obsahující arsen: Ba-farmakosiderit ($\text{BaFe}_4(\text{AsO}_4)_3(\text{OH})_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), arseniosiderit $\text{Ca}_2\text{Fe}_3\text{O}_2(\text{AsO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a Fe-oxidy (goethit $\text{Fe}_3\text{O}(\text{OH})$) s vazbou arsenu v regolitu a novotvořený realgar (AsS) spolu s menším množstvím Fe-oxidů s arsenem v sedimentu..

Pro zhodnocení vlivu zdroje organického materiálu na mikrobiální aktivitu byla porovnávána glukosa, laktosa a acetát. Pro naše účely se nejvíce osvědčila glukosa. Ta byla použita v hlavním inkubačním experimentu, který měl objasnit rychlost mobilizace arsenu v různých podmínkách (aerobní, anaerobní prostředí, přídavek organického materiálu, usmrcení mikroorganismů podílejících se na mobilizaci). Největší nárůst rozpuštěného arsenu byl zaznamenán v podmínkách inkubace regolitu v anaerobních podmínkách s přídavkem glukosy, což ukazuje na významný vliv mikrobiální redukce Fe^{3+} z hydratovaných Fe-oxidů a snad i sekundárních arseničnanů železa při mobilizaci arsenu v podzemních vodách. Navíc je pravděpodobné, že mobilizace arsenu v těchto podmínkách může být zvýšena mikrobiální redukcí pětimocných forem arsenu na trojmocné, které jsou ve vodním prostředí za normálních podmínek obvykle mobilnější. Tuto schopnost má například bakterie

Pseudomonas putida, která je jediným takovým zástupcem z 25 druhů bakterií izolovaných v těchto podmínkách.

Kromě heterotrofních bakterií a jejich vlivu na mikrobiální mobilizaci arsenu se ukázal také vliv chemoautotrofních mikroorganismů na mobilizaci arsenu do vodního prostředí na studované lokalitě. Ve velmi redukčních podmínkách fluviálních sedimentů může docházet k mikrobiální katalýze oxidace realgaru, která může hrát významnou roli v mobilizaci arsenu během přesunu do aerobních podmínek.

Cíl práce byl splněn s uspokojivými výsledky. Byly odhaleny dva různé procesy mikrobiální mobilizace, které bezesporu hrají významnou roli v uvolňování arsenu do přírodních vod na lokalitě Mokrsko.

8 Použitá literatura

Ahmann D., Roberts A.L., Krumholz L.R., Morel F.M.M.: Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* 371 (1994), 750.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry.: Toxicological Profile of Arsenic, U.S. Department of Health and Human Services, 2007.

Ahmed K.M., Bhattacharya P., Hasan M.A., Akhter S.H., Alam S.M.M., Bhuyian M.A.H., Imam M.B., Khan A.A., Sracek O.: Arsenic enrichment in groundwater of the alluvial aquifers in Bangladesh: an overview. *Applied Geochemistry* 19 (2004), 181–200.

Arsenic and arsenic compounds. Environmental Health Criteria 224, second edition, World Health Organization, Geneva, 2001.

Babechuk M.G., Weisener C.G., Fryer B.J., Paktunc D., Maunders C.: Microbial reduction of ferrous arsenate: Biogeochemical implications for arsenic mobilization. *Applied Geochemistry* 24 (2009), 2332–2341

Bezvodová B.: Mokrsko – přenos těžkých kovů z půdy do rostlin. Technická zpráva CEÚ, Praha, 1996.

Bissen M., Frimmel F.H.: Arsenic – a review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta hydrochimica hydrobiologia* 31 (2003), 1, 9–18.

Boiron M.C., Barakat A., Cathelineau M., Banks D.A., Ďurišová J., Morávek P.: Geometry and P-VT-X conditions of microfissural ore fluid migration: the Mokrsko gold deposit (Bohemia). *Chemical Geology* 173 (2001), 207–225.

Bowell, R.J.: Arsenic sorption by iron oxyhydroxides and oxides. *Applied Geochemistry* 9 (1994), 279–286.

Buděšínský M., Koudelka J., Podlaha J., Stibor I., Štrauch B., Ubik K.: Spektroskopické metody, 18. svazek cyklu *Organická chemie*, Praha (1991), 74.

Campbell K.M., Malasarn D., Saltikov C.W., Newmann D.K., Hering J.G.: Simultaneous Microbial Reduction of Iron(III) and Arsenic(V) in Suspensions of Hydrated Ferric Oxide. *Environmental Science & Technology* 40, (2006), 5950–5955.

Caraballo M.A., Rotting T.S., Nieto J.M., Ayora C.: Sequential extraction and DXRD applicability to poorly crystalline Fe- and Al-phase characterization from an acid mine water passive remediation system. *American Mineralogist* 94 (2009), 1029–1038.

Collins R. D.: *Diferenciální diagnostika prvního kontaktu*. 3. vydání, USA, 2003.

Cullen W. R., Reimer J. K.: Arsenic speciation in the environment. *Chemical Review* 89 (1989), 713–764.

Cummings D.E., Caccavo F., Jr., Fendorf S., Rosenzweig R.F.: Arsenic Mobilization by the Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacterium *Shewanella alga* BrY. *Environmental Science & Technology* 33 (1999), 723–729.

Brookins D.G.: *Eh-pH Diagrams for Geochemistry*. Springer-Verlag, New York, 1988.

Dold B.: Speciation of the most soluble phases in a sequential extraction procedure adapted for geochemical studies of copper sulfide mine waste. *Journal of Geochemical Exploration* 80 (2003), 55–68.

Dowdle P.R., Laverman A.M., Oremland R.S.: Bacterial Dissimilatory Reduction of Arsenic(V) to Arsenic(III) in Anoxic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996), 1664–1669.

Drahota P., Pačes T., Pertold Z., Mihaljevič M., Skřivan P.: Weathering and erosion fluxes of arsenic in watershed mass budgets. *Science of the Total Environment* 372 (2006), 306–316.

Drahota P.: *Geochemical model of arsenic at the Mokrsko gold deposit*. Dissertation of Petr Drahota, Faculty of Science, Charles University in Prag, 2008.

Drahota P., Filippi M.: Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environment International* 35 (2009), 1243–1255.

Drahota P., Rohovec J., Filippi M., Mihajlevič M., Rychlovský P., Červený V., Pertold Z.: Mineralogical and geochemical controls of arsenic speciation and mobility under different redox conditions in soil, sediment, and water at the Mokrsko-West gold deposit, Czech Republic. *Science of the Total Environment* 407 (2009), 3372–3384.

Drahota P., Mihajlevič M., Grygar T., Rohovec J., Pertold Z.: Seasonal variations of Zn, Cu, As and Mo in arsenic-rich stream at the Mokrsko gold deposit, Czech Republic. *Environmental Earth Science* 262 (2011), 429–441.

Erbanová L., Novák M., Fottová D., Doušová B.: Export of arsenic from forested catchments under easing atmospheric pollution. *Environ Science & Technology* 42 (2008), 7187–92.

Fara M.: Arsen a jeho sloučeniny z hlediska potenciálních rizik a vlivů zdrojů znečišťování ovzduší na životní prostředí. Projekt Ministerstva životního prostředí VaV 740/4/03, 2004.

Filippi M., Goliáš V., Pertold Z.: Arsenic in contaminated soils and anthropogenic deposits at Mokrsko, Roudný and Kašperské hory deposits, Bohemian Massif (CZ). *Environmental Geology* 45 (2004), 716–730.

Filippi M., Doušová B., Machovič V.: Mineralogical speciation of arsenic in soils above the Mokrsko-west gold deposit, Czech Republic. *Geoderma* 139 (2007), 154–170.

Frankenberger W.T., Jr.: *Environmental chemistry of arsenic*. University of California, Riverside, California, 2009.

Freikowski D., Winter J., Gallert C.: Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2010), 1363–1371.

Gleyzes Ch., Tellier S., Astruc M.: Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002), 6–7.

Gottlieb H.E., Kotlyar V., Nudelman A.: NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry* 62 (1997), 7512–7515.

Guidelines for drinking-water quality: second addendum. Vol. 1, Recommendations. 3rd ed. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008.

Hudson-Edwards K.A., Houghton S.L., Osborn A.: Extraction and analysis of arsenic in soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004), 10–11.

Chamberlain A. C.: Fallout of Pb and uptake by crops. *Atmospheric Environment* 17 (1983), 693–706.

Janatka J., Morávek P.: Geochemical exploration in the Jílové Belt: case history of the Čelina deposit, Bohemian Massif, Czechoslovakia. *Journal of Geochemical Exploration* 37 (1990), 367–384.

Jílek V.: Mokrsko – geomedicínská studie. Technická zpráva, Geofond, Praha, 1985.

Jones C. A., Langner H. W., Anderson K., McDermott T. R., Inskeep W. P.: Rates of Microbially Mediated Arsenate Reduction and Solubilization. *Soil Science Society of America Journal* 64 (2000), 600–608.

Kocar B.D., Borch T., Fendorf S.: Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74 (2010), 980–994.

Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. *Chemické Listy* 91 (1997), 38–47.

Lee J. U., Lee S. W., Chon H.T., Kim K.W., Lee J.S.: Enhancement of arsenic mobility by indigenous bacteria from mine tailings as response to organic supply. *Environment International* 35 (2009), 496–501.

Lee K.Y., Kim K.W., Kim S.O.: Geochemical and microbial effects on the mobilization of arsenic in mine tailing soils. *Environmental Geochemistry and Health* 32 (2010), 31–44.

Lloyd J.R., Oremland R.S.: Microbial transformations of arsenic in the environment: From soda lakes to aquifers. *Elements* 2 (2006), 85–90.

Mandal K.B., Suzuki K.T.: Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58 (2002), 201–235.

Matera V., Le Hécho I., Laboudigue A., Thomas P., Tellier S., Astruc M.: A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environmental Pollution* 126 (2003), 51–64.

Matschulat J.: Arsenic in the geosphere: a review. *Science of the Total Environment* 249 (2000), 297–312.

Mihaljevič M., Sís L., Ettler V., Šebek O., Průša J.: Oxidation of As-bearing gold ore – a comparison of batch and column experiments. *Journal of Geochemical Exploration* 81 (2004), 59–70.

Moldan B.: *Ekologická dimenze udržitelného rozvoje*, Karolinum, Praha (2006), 60.

Morávek P., Janatka P., Pertoldová J., Straka J., Ďurišová J., Pudilová M.: Mokrsko gold deposit - the largest gold deposit in the Bohemian Massif, Czechoslovakia. *Economic Geology Monographs* 6 (1989), 252–259.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Phung L. T., Silver S.: Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiological Review* 26 (2002), 311.

Nicholas D.R., Ramamoorthy S., Palace V., Spring S., Moore J.N., Rosenzweig R.F.: Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments. *Biodegradation* 14 (2003), 123–137.

Novák M., Erbanová L., Fottová D., Voldrochová P., Prechová E., Bláha V., Veselovský F., Krachler M.: Increasing arsenic concentrations in runoff from 12 small forested catchments (Czech Republic, Central Europe): Patterns and controls. *Science of the Total Environment* 408 (2010), 3614–3622.

Novick R.P., Roth C.: Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 95 (1968), 1335–1342.

O'Day P.A., Vlassopoulos D., Root R., Rivera N.: The influence of sulfur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), 13703–13708.

O'Day P.A.: Chemistry and Mineralogy of Arsenic. *Elements* 2(4) (2006), 77–82.

Oremland R.S., Stolz J.F.: The ecology of arsenic. *Science* 299 (2003), 939–944.

Oremland R.S., Stolz J.F.: Arsenic, microbes, and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology* 13 (2005), 45–49.

Oremland R.S., Wolfe-Simon F., Saltikov C.W., Stolz J.F.: Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems. *Geomicrobiology Journal* 26 (2009), 522–536.

Paéz-Espino D., Tamames J., de Lorenzo V., Cánovas D.: Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* 22 (2009), 117–130.

Radloff K.A., Cheng Z.Q., Rahman M.W., Ahmed K.M., Mailloux B.J., Juhl A.R., Schlosser P., van Geen A.: Mobilization of arsenic during one-year incubations of grey aquifer sands from Araihasar, Bangladesh. *Environmental Science & Technology* 41 (2007), 3639–3645.

Radloff K.A., Manning A.R., Mailloux B., Zheng Y., Rahman M.M., Huq M.R., Ahmen K.M., van Geen A.: Considerations for conducting incubations to study the mechanisms of As release in reducing groundwater aquifers *Applied Geochemistry* 23 (2008), 3224–3235.

Routh J., Bhattacharya A., Saraswathy A., Jacks G., Bhattacharya P.: Arsenic remobilization from sediments contaminated with mine tailings near the Adak mine in Västerbotten district (northern Sweden). *Journal of Geochemical Exploration* 92 (2007), 43–54.

Sadiq M.: Arsenic Chemistry in Soils: An overview of thermodynamic predictions and field observation. *Water, Air and Soil Pollution* 93 (1997), 117–136.

Silver S., Phung L.T.: Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), 599–608.

Soudek P., Víchová L., Valenová Š., Podlipná R., Malá J., Vaněk T.: Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické listy* 100 (2006), 323–329.

Stüben D., Berner Z., Chandrasekharam D., Karmakar J.: Arsenic enrichment in groundwater of West Bengal, India: Geochemical evidence for mobilization of As under reducing conditions. *Applied Geochemistry* 18 (2003), 1417–1434.

Száková J., Mihaljevič M., Tlustoš P.: Mobilita, transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a rostlinách. *Chemické Listy* 101 (2007), 397–405 .

Vaughan D.: Arsenic. *Elements* 2 (2006), 71–75.

Wenzel W.W., Kirchbaumer N., Prohaska T., Stingeder G., Lombi E., Adriano D.C.: Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 436 (2001), 309–323

Wilkin R.T., Ford R.G.: Arsenic solid-phase partitioning in reducing sediments of a contaminated wetland. *Chemical Geology* 228 (2006), 156–174.

www1: www.chemblink.com/ 29.10.10

Yamamura S., Watanabe M., Yamamoto N., Sei K., Ike M.: Potential for microbially mediated redox transformations and mobilization of arsenic in uncontaminated soils. *Chemosphere* 77 (2009), 169–174.

Zachariáš J., Frýda J., Paterová B. Mihaljevič M.: Arsenopyrite and As-bearing pyrite from the Roudný deposit, Bohemian Massif. *Mineralogical Magazine* 68 (2004), 31–46.