
STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**Speciační analýza arsenu ve vodách, způsoby konzervace
vzorku, vliv mikroorganismů na mobilizaci arsenu a dopad na
životní prostředí v lokalitě Mokrsko**

BARBORA HEŘMANOVSKÁ

Benešov 2013

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor 08 – Ochrana a tvorba životního prostředí

Speciační analýza arsenu ve vodách, způsoby konzervace vzorků, vliv mikroorganismů na mobilizaci arsenu a dopady na životní prostředí v lokalitě Mokrsko

Speciation analysis of arsenic in water, preservation of samples, effects of microorganisms on mobilization of arsenic and impacts on the environment at Mokrsko location

Autor: **Barbora Heřmanovská**

Škola: **Vyšší odborná a Střední zemědělská škola Benešov**

Konzultant: **RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D**

RNDr. Petr Drahota, Ph.D.

Benešov 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechny zdroje, prameny a literaturu, které jsem při vypracování používala řádně cituji s uvedením úplného odkazu na příslušný zdroj.

V Rudolticích dne 26. 3. 2013

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé studentské práce RNDr. Tomáši Matouškovi, PhD., za jeho čas a neobyčejnou ochotu při konzultacích nad vznikajícím textem této práce. Další velký dík patří RNDr. Petru Drahotovi, Ph. D, za cenné rady a připomínky, které mi během sepisování práce velice pomohly. Nesmím také opomenout Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., (číslo výzkumného záměru - AV0Z40310501) a projekt GA ČR číslo 203/09/1783. V neposlední řadě bych ráda poděkovala projektu Otevřená věda III.

Abstrakt

Arsen (As) je toxickým prvkem, který způsobuje řadu závažných problémů a onemocnění. Ve vodách se vyskytuje v mocenství III a V, které se liší toxicitou (As^{III} je až 80x toxičtější) a mobilitou a poměrně snadno mezi sebou v závislosti na podmínkách přecházejí. Z tohoto důvodu je pro správnost chemické analýzy velice důležité používat nejvhodnější stabilizační činidla. V životním prostředí hraje klíčovou roli při kontaminaci vod arsenem činnost člověka, zvětvávání hornin a také přítomnost mikroorganismů. Jedním z hlavních cílů práce bylo vyhodnotit nejvhodnější stabilizační činidla pro vzorky přírodní vody s vysokým obsahem arsenu. Pro tento účel byly použity jako stabilizátory koncentrace kyseliny HCl, HNO_3 , EDTA a nově také HCOOH. Výsledky ukazují, že jako nejvhodnější stabilizační prostředky se jeví HNO_3 , EDTA a HCOOH. HCl je v mnoha zdrojích odborné literatury brána jako spolehlivý stabilizátor, má měření však tuto myšlenku nepotvrdila. Práce se dále zabývá speciálními analýzami studniční a přírodní vody z lokality Mokrsko. Bylo zde odebráno celkem 5 vzorků studniční vody a 1 vzorek přírodní vody. Naměřené hodnoty koncentrace As ve studniční vodě mnohonásobně (34 – 145x) překračovaly limit pro pitnou vodu. Po analýzách byly vypracovány informační zprávy pro obyvatele, kteří byli seznámeni s metodikou a výsledky a byli také poučeni o riziku užívání takto kontaminované vody. Výsledky speciální analýzy přírodní mělké podpovrchové vody ukazují i přes poměrně oxidativní podmínky na přítomnost As^{III} (z 92,4%). Tato termodynamická nerovnováha svědčí o klíčové roli arsen-redukujících mikroorganismů v kontaminaci tamějších vod i půd As^{III} . V souvislosti s tímto výsledkem není v lokalitě Mokrsko vhodné pěstovat jednoleté či dvouleté plodiny určené ke konzumaci, výrazně nedoporučuji ani hnojení z důvodu rychlé reprodukce mikroorganismů. Práce se také zabývá samovolnou redukcí As^{V} v deionizované vodě připravené v naší laboratoři. Vysvětlením pro tento děj je s největší pravděpodobností činnost mikroorganismů. Tento výsledek se stává předmětem dalších experimentů v ÚIACH AV ČR.

Klíčová slova: arsen, speciální analýza, stabilizace vzorků, vliv mikroorganismů na arsen, Mokrsko

Abstract

Arsenic (As) is a toxic element, which causes a lot of problems and diseases. It normally occurs in natural waters, we can find it here in the forms of As^{III} and As^{V} . Each species are different in their toxicity (As^{III} is 60-80x more toxic) and also in mobility. These species can relatively easily change their oxidation state depending on the conditions. So the using of reliable stabilization agent is for the correct chemical analysis very important. The activity of people, weathering of rocks and also the presence of microorganisms have the key role in the contamination of water in the environment. One of main goals of my work was to evaluate the most suitable stabilizing agents for samples of natural water with high concentration of arsenic. For this purpose the acids HCl, HNO_3 , EDTA and also HCOOH as stabilizers of concentration were used. The results show, that the most suitable stabilizing agents are HNO_3 , EDTA and HCOOH . HCl is in many source taken as reliable, but my measurements did not confirm to this state. The work is also focused on the speciation analysis of the well and natural water from Mokrsko location. There were taken 5 samples of well water and 1 sample of natural water. Measured values of concentrations of As in well water manifold cross (34 – 145x) the value for concentration of drinking water. After analysis the information reports for local inhabitants were developed. They were apprised with the methodology and results of analysis and they were also advised about the risk of using of such contaminated water. The results of speciation analysis of natural sub-surface water show despite the relatively oxidative conditions the presence of As III (92.4% from total concentration). This un-equilibrium thermodynamic condition suggest indicates the crucial role of arsenic-reducing microorganisms in contamination of water and soil in Mokrsko. In connection with this result the growing of annual and biennial crops intended for human consumption is not suitable as well as the fertilization, rapid reproduction of microorganisms can occur. The work also deals with spontaneous reduction of As^{V} in deionized water prepared in our laboratory. The explanation of this process is most likely the activity of microorganisms. This result will be apparently the subject of further work in UIACH AV CR.

Key words: arsenic, speciation analysis, stabilization of samples, effects of microorganisms on arsenic, Mokrsko

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	11
2.1 Arsen	11
2.1.1 Obecné vlastnosti arsenu	11
2.1.2 Výskyt arsenu	11
2.1.3 Toxicita arsenu a zdravotní rizika	13
2.2 Mikrobiální mobilizace arsenu	14
2.2.1 DARP mikroorganismy	14
2.2.2 ARM mikroorganismy	15
2.3 Lokalita Mokrsko	15
2.4 Atomová absorpční spektrometrie	16
2.4.1 Generování hydridů	17
2.4.2 Speciační analýza	17
2.4.3 Odlišení As^{III} a As^{V} pomocí pH specifického generování	17
2.5 Způsoby konzervace vzorků	18
3. Experimentální část	19
3.1 Použité chemikálie a jejich příprava	19
3.2 Přístroje a jejich parametry	19
3.2.1 Atomový absorpční spektrometr	19
3.2.2 Součásti systému generování hydridů	20
3.2.3 Atomizátor	21
3.3 Schéma aparatury a procedura	21
3.4 Vyhodnocení naměřených dat	22
3.5 Odběr vzorků v lokalitě Mokrsko	23
3.6 Příprava vzorků přírodní vody se stabilizačními činidly	24
3.7 Příprava vzorků As^{V} v deionizované vodě	24
4. Výsledky a diskuse	25
4.1 Speciační analýza studniční a přírodní vody z Mokrska	25
4.2 Posouzení účinnosti stabilizace vzorků přírodní vody	28

4.3	Analýza vzorků deionizované vody s přidaným As ^V	31
5.	Závěr	33
6.	Seznam použité literatury	35

1. Úvod

Arsen (As) je toxickým prvek vyskytujícím se v povrchové i podpovrchové vodě. Jeho toxické vlastnosti jsou známy již od pradávna. Dlouhodobé požívání vody s vysokým obsahem arsenu může způsobit řadu závažných problémů - chronické nemoci (anémie, padání vlasů nebo ztrátu váhy), rakovinu plic či jater a také nemoc oběhového systému, zvanou Bürgerova choroba, laicky označovanou jako černání nohou.

Koloběh arsenu v životním prostředí a jeho pronikání do vody je proces zcela přirozený, lidé ho však svou činností v oblasti těžby a zpracování rud, metalurgie a spalováním nekvalitního uhlí značně urychlují. Tento zásah do přírodního koloběhu má za následek nadměrné uvolňování arsenu do povrchové a podpovrchové vody.

Příkladem extrémní kontaminace vodních zdrojů přirozenou cestou (zvětráváním hornin) je Bangladéš. Vodní zdroje jsou zde rozhodujícím faktorem pro přežití. Téměř polovina obyvatel Bangladéše je nucena pít vodu s vysokou koncentrací arsenu. Průzkumy ukazují, že více než 20% z celkového počtu úmrtí je způsobeno chronickou otravou arsenem. Toto číslo je více než alarmující. Světová zdravotnická organizace (WHO) hovoří o situaci v Bangladéši jako o největší hromadné otravě v dějinách lidstva.

V České republice je z hlediska přirozené kontaminace nejvýznamnější lokalitou zlatonosné ložisko Čelina-Mokrsko. Abnormální výskyt arsenu je zde vysvětlován jeho vazbou na zlato. Toto území je jedno z největších nalezišť zlata v Evropě. Arsen je zde ke zlatu poután ve formě arsenopyritu, jehož přirozeným zvětráváním dochází k uvolnění arsenu po podzemní vody. Zlato je zde velice jemně rozptýleno, muselo by se z horniny dostávat složitými procesy, jako jsou mletí a drcení. Tato potenciální těžba by mnohonásobně urychlila pronikání arsenu do vodních zdrojů. Geomedicínská studie (za rok 1950 – 1984) ukazuje zvýšený počet úmrtí způsobený rakovinou. Situace byla vyřešena výstavbou vodovodu v roce 1989. Mokrsko se díky vysokému obsahu arsenu stalo atraktivním místem pro vědecký výzkum, zaměřený jednak na vysoké koncentrace arsenu a jeho vztah ke zlatu, ale také na jeho mikrobiální mobilizaci.

Pro povrchovou vodu je typická přítomnost arsenu ve formě As^V , neboť zde dochází k poměrně rychlé oxidaci As^{III} . Zajímavostí je, že některá měření ukázala na vysoké

koncentrace As^{III} v mělké podzemní vodě v lokalitě Mokrsko. As^{V} může být redukován pouze za určitých podmínek – snížením redoxního potenciálu, změnou pH a také činností mikroorganismů. Výskyt As^{III} v mělké podzemní vodě je tedy s největší pravděpodobností způsoben právě přítomností mikroorganismů, které mají schopnost redukovat arsen.

Vzhledem k tomu, že jednotlivé specie arsenu mezi sebou mohou celkem snadno přecházet v závislosti na podmínkách, je pro analýzy velice důležité využít nejvhodnější konzervační činidlo, ne vždy je totiž možné analyzovat vzorek ihned po odebrání. V současné době je nejvyužívanějším konzervačním činidlem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), dále se využívá HCl či HNO_3 .

Cílem mé práce bylo provést speciální analýzu arsenu v mělké podzemní vodě z lokality Mokrsko pomocí metody atomové absorpční spektrometrie s využitím generování těkavých hydridů, z naměřených výsledků nepřímo prokázat přítomnost arsen-redukujících mikroorganismů a zhodnotit dopady na životní prostředí. V práci jsou také obsaženy výsledky speciálních analýz (provedeny stejnou metodou) studničních vod z lokality Mokrsko. Dále jsem se v práci zabývala porovnáním jednotlivých konzervačních činidel (HCl, HNO_3 , EDTA a HCOOH) z hlediska účinnosti stabilizace pro vzorky přírodní vody s vysokým obsahem As. V neposlední řadě je má práce zaměřena na analýzu vzorků As^{V} připravených v deionizované vodě připravené v naší laboratoři, kde v roztocích docházelo k samovolné redukci As^{V} na As^{III} . Pokusila jsem se ověřit hypotézu, že příčinou redukce As^{V} v roztocích je činnost mikroorganismů.

2. Teoretická část

2.1 Arsen

2.1.1 Obecné vlastnosti arsenu

Arsen (*Arsenicum*, As) se řadí do skupiny metaloidů (má vlastnosti kovů i nekovů). Již v 5. století př. n. l. byly popsány vlastnosti sulfidu arsenitého a jeho sloučenin. Elementární arsen byl poprvé izolován německým přírodovědcem Albertem Maghem roku 1250, který jej získal zahříváním auripigmentu (As_2S_3) s mýdlem. Toxicita arsenu je známa od pradávna, jeho sloučeniny se používaly jako jed pro hlodavce a často byly nástrojem travičů. I přes poměrně velkou toxicitu se některé sloučeniny využívaly a dodnes využívají v lékařství. Je známo několik modifikací arsenu – polokovový šedý α -As, amorfní černý nebo hnědý β -As a krystalický (orthorombický) žlutý měkký γ -As. Za nejrozšířenější modifikaci je považován šedý arsen, který vede elektrický proud.

Na suchém vzduchu je stálý, s přibývajícím vlhkostí dostává bronzově matný odstín a po delší době se na povrchu vytvoří černý povlak. Během zahřívání sublimuje a oxiduje na As_4O_5 , při teplotách 250 – 300 °C je tato reakce doprovázena fluorescencí. V plynném stavu tvoří čtyřatomové molekuly As_4 , dvouatomové molekuly As_2 vytváří při teplotě vyšší než 1700°C. Arsen reaguje přímo s chlorem a řadou dalších prvků. S kovy tvoří arsenidy. Poměrně špatně reaguje s vodou, roztoky hydroxidů a neoxidujícími kyselinami. Se zředěnou kyselinou dusičnou se oxiduje na kyselinu trihydrogenarsenitou, naopak s koncentrovanou kyselinou dusičnou na kyselinu trihydrogenarseničnou.

V současné době se arsen využívá ve sklářském průmyslu (As_2O_3), dále jako pesticid a insekticid a také jako součást speciálních slitin v metalurgickém průmyslu. Arsenid galitý je dobrým polovodičem, využívá se v laserových diodách a LED.

2.1.2 Výskyt arsenu

Arsen nemá jako čistý prvek v zemské kůře vysoké zastoupení (51. místo). Jeho nejznámější rudou je arzenopyrit (FeAsS), dále pak realgar (As_4S_4) či auripigment (As_2S_3). Často se vyskytuje jako příměs v rudách zlata, stříbra, železa a niklu, díky kterým se dostává

do půdy a podzemních vod. Příkladem mohou být zlatonosná ložiska v Africe, kde je až 5 g As na 1 kg půdy (Dočekal a kol. 2003). Jedním z nejdiskutovanějších témat je výskyt tohoto toxického prvku v podzemních zdrojích pitné vody. Ve vodách se vyskytuje v oxidačním stupni III (podzemní vody) i V (povrchové vody), které mezi sebou poměrně snadno vzájemně přecházejí v závislosti na podmínkách.

Příkladem lokalit s kontaminovanou vodou je Argentina, Čína, Chile, Indie, Mexiko, Thajsko nebo USA. Mezi extrémní případy pak patří Bangladéš. Arsen je v Bangladéši přítomen ve formě příměsí pyritu či jako složka arsenopyritu. Tyto minerály následně zvětrávají a uvolněný arsen přechází do roztoku, kde je vzápětí adsorbován na usazené hydroxidy manganu a železa. Jestliže se tyto sloučeniny vyskytnou v redukčním prostředí, kde tamější litotrofní bakterie nemohou dýchat kyslík z podzemní vody, dochází ke spotřebě kyslíku z hydroxidů železa a pochopitelně také k uvolňování adsorbovaného arsenu.

Také v České republice jsou místa s poměrně vysokým obsahem arsenu ve vodách, nejznámější lokalitou je Mokrsko (viz. 2.3 Lokalita Mokrsko). V této lokalitě se nachází rozsáhlé, dosud netěžené, naleziště zlata. As je zde ve formě FeAsS. Hornina v této oblasti by se však při těžbě musela několikrát drtit a docházelo by tak k oxidaci As a právě oxidace je nejvhodnější podmínkou pro jeho uvolnění do vody. Dalšími místy s vysokými koncentracemi As ve vodách jsou Kašperské hory a Sedlčansko.

Arsen jako čistý prvek není hojný, často na něj však narážíme ve sloučeninách a nerostech, které obsahují síru, se kterou se arsen vyskytuje poměrně často. Arsen se dostává do koloběhu přirozeně (vulkanická činnost, polévatý prach, oceánský aerosol, lesní požáry) nebo lidskou činností (těžba a zpracování rud, metalurgie, spalování nekvalitního sirného uhlí). Jeho geochemické chování je dáno především tím, že existuje v několika valenčních stavech, má těsný vztah k železu a mění své sloučeniny v závislosti na biologické činnosti. Koloběh As v životním prostředí urychlují svým zvětráváním sulfidické nerosty, z nichž je nejvýznamnějším arzenopyrit (FeAsS). Složky arzenopyritu se postupným zvětráváním oxidují na $\text{Fe}^{\text{III}+}$, SO_4^{2-} (ze kterých vzniká roztok H_2SO_4) a kyselinu arsenitou (HAsO_2), která dále oxiduje na AsO_3^- . Tento roztok se začne časem neutralizovat a z $\text{Fe}^{\text{III}+}$ vzniká $\text{Fe}(\text{OH})_3$, na který se váže většina As. Oxidace sulfidických materiálů je sice přirozený děj, ale člověk ho značně urychluje (těžba nerostných surovin).

2.1.3 Toxicita arsenu a zdravotní rizika

Ve sloučeninách se arsen vyskytuje se v několika mocenstvích. Nejvíce zdraví ohrožující formou je As^{III} , který je šedesátkrát až osmdesátkrát toxicitější než As^{V} . Důvodem je větší termodynamická stabilita As^{III} s thiolovými ($-\text{SH}$) částmi bílkovin. Methylované sloučeniny As byly donedávna považovány za méně toxické, ale nedávné studie prokázaly vysokou toxicitu organických derivátů As^{III} i As^{V} (Kenyon and Hudges 2001, Petrick a kol. 2001, Wanibuchi a kol. 2004). Nedávno provedený výzkum (Porquet a Filella 2007) poukazuje na podobné rozložení chemického náboje v glycerolu a hydroxidu arsenitém (hlavní specie As^{III} přítomná ve fyziologickém vodném roztoku). Tato informace vysvětluje transport As^{III} v prokaryotních i eukaryotních organismech pomocí aquaglyceroproteinů. Anorganický arsen je v těle metabolizován kombinací methylačních a redukčních kroků. Děj je katalyzován řadou enzymů (methyltransferázy a reduktázy), hlavním konečným produktem je DMA^{V} , běžně naležitelný v moči.

Mnoho lidí z různých částí světa (Argentina, Mexiko, Maďarsko, Asie...) je odkázáno na zdroje pitné vody s obsahem arsenu překračujícím $150 \mu\text{g l}^{-1}$ (Smedley and Kinniburgh 2002). Dlouhodobé požívání arsenu (především ve vodě a jídle) může způsobit řadu závažných problémů – kožní léze, ztrátu váhy, chronickou únavu, arsenikózu, kardiovaskulární choroby, různé druhy rakoviny či reprodukční problémy (Kapaj a kol. 2006; Bissen a Frimmel 2003). Mezi projevy akutní otravy arsenem patří zvracení, svalové křeče, křečovité bolesti břicha nebo brnění rukou a nohou. Andrew a kol. (2006) popsal pokles v kapacitě oprav DNA způsobený expozicí arsenu. Tím podpořil hypotézu, že arsen může působit jako kokarcinogen a tím zhoršovat genotoxicitu a mutagenicitu jiných karcinogeních sloučenin. V lidském těle se arsen akumuluje v místech s vysokým obsahem keratinu (Yu a kol. 2006). Indikátorem dlouhodobého příjmu arsenu je jeho výskyt ve vlasech, nehtech, kůži, moči a krvi.

Arsenikóza je chronická nemoc způsobená dlouhodobým požíváním vody s vysokým obsahem arsenu. Yu a kol. (2007) ve své práci popisuje pozitivní korelaci mezi procentem výskytu arsenikózy a počtem studní s vysokým obsahem As ($50 - 1000 \mu\text{g l}^{-1}$) v 16 provinciích Číny. Wang a kol. (2007) se zabýval spojitostí mezi dlouhodobým požíváním arsenu a mozkočevními nemocemi a ischemickou chorobou srdeční. Cévní choroby způsobené arsenem mohou napadat velké (kardiovaskulární nebo cerebrovaskulární nemoci) nebo malé cévy (Bürgerova choroba, laicky označovaná jako černání nohou) (Kwok 2007).

Bürgrova choroba postihuje především periferní tepny a středně velké žíly, zejména u dolních končetin. Na počátku se tato choroba znatelně neprojevuje, vyústí však v zúžení nebo úplné uzavření tepny.

2.2 Mikrobiální mobilizace arsenu

Arsen se neřadí mezi esenciální prvky, tudíž ho buňka nemá potřebu přirozeně přijímat. Z chemického hlediska jsou sloučeniny arsenu téměř analogické se sloučeninami dusíku a fosforu, které jsou přirozenými složkami organismu (Oremland a kol. 2009, Páez-Espino a kol. 2009). Buňka je schopna arseničnany přijmout pomocí fosforečnanových transportérů *Pit* a *Pst* (Páez-Espino a kol. 2009).

Mnoho mikroorganismů žije v prostředí s vysokou koncentrací arsenu. Tyto mikroorganismy se dokázaly adaptovat vyvinutím řady mechanismů, příkladem je detoxifikační redukce. Organismy využívající detoxifikační redukci označujeme jako ARM (arsenate-resistant microorganisms). Nedávné studie prokázaly, že některé typy mikroorganismů mohou získávat energii z arsenu, tyto organismy označujeme jako CAO (chemototrophic arsenite-oxidizing bacteria). Jsou zde také organismy, které arsen dokážou dýchat – DARP (dissimilatory arsenate-reducing prokaryotes) (Oremland a Stolz 2005).

U mnoha organismů se genovou expresí vytvořilo několik nových enzymů. Tyto enzymy katalyzují metabolické interakce mezi buňkami a ionty arsenu. Oxidaci As^{III} na As^{V} katalyzuje enzym As^{III} oxidáza – *Aox*. Touto cestou se organismus stává rezistentním proti přichozímu $\text{As}(\text{OH})_3$. Redukci As^{V} na As^{III} katalyzuje enzym As^{V} reduktáza – *Arr*.

2.2.1 DARP mikroorganismy

Organismy, které využívají v dýchacím řetězci As^{V} místo kyslíku se nazývají arsenotrofní organismy. Označujeme je jako DARP organismy (dissimilatory arsenate reducing prokaryotes) Arseničnan se během dýchacího procesu stává terminálním akceptorem elektronů. Pro jeho redukci je nutná oxidace, arsenotrofní organismy oxidují nejčastěji organickou hmotu, Fe^{II} či Mn^{II} . Respirace vyžaduje striktně anaerobní podmínky (Frankenberger Jr., 2009). Tento proces byl poprvé popsán u bakterie z kmene MIT-13,

pojmenované *Geospirillum arsenophilus*. V současné době je známo více než 20 druhů anaerobních heterotrofních mikroorganismů, které mají schopnost dýchat arsen (Oremland a kol., 2009).

Pro redukci As^{V} je nutné, aby byl v buňce přítomen membránový/periplasmatický protein, který je složen ze dvou jednotek – *arrA* a *arrB*. *Arr* reduktáza byla poprvé popsána u bakterie *Chrysiogenes arsenatis*, která byla izolována z vody ze zlatonosného dolu (Lloyd a Oremland, 2006). DARP organismy mají dále vyvinuty geny *ArsC* a *ArsB*. Gen *ArsC* je využit při detoxifikaci a gen *ArsB* umožní vylučování vzniklého As^{III} ven z buňky. Přítomnost těchto genů umožňuje mikroorganismům přežít v prostředí s vysokou koncentrací arsenu redukovaného při respiraci (Oremland a kol., 2009).

2.2.2 ARM mikroorganismy

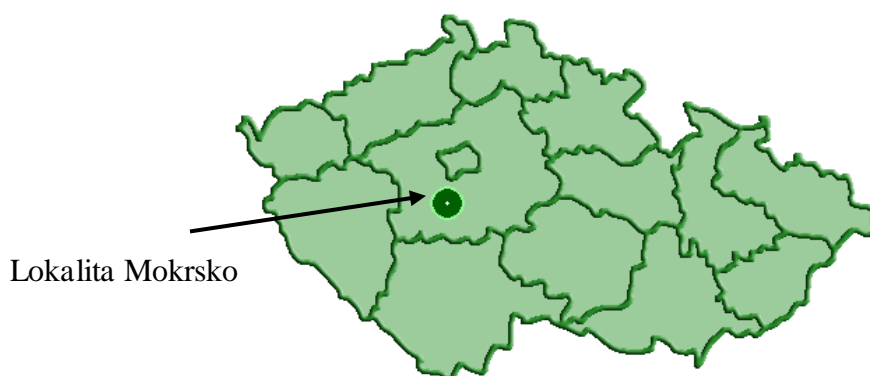
ARM (arsenate resistant microorganisms) mikroorganismy redukují arsen za účelem detoxifikace (Oremland a Stolz, 2005). Proces probíhá buď za anaerobních nebo aerobních podmínek (Frankenberger Jr., 2009). Buňka přijímá As^{V} přes *Pit* nebo *Pst* systém. Během detoxifikace je potřebná buněčná energie ve formě *Ars* proteinů, jedná se o dvousložkový ATP-dependentní systém (Mukhopadhyay a kol., 2002). Nejvíce popsaný detoxifikační mechanismus je *ArsC* systém. *ArsC* je monomerní protein složený zhruba ze 135 aminokyselin a 3 cysteinových zbytků. Tento protein umožňuje redukci As^{V} na As^{III} v cytoplazmě. As^{V} je poután k cysteinu na N-konci a je redukován elektrony z glutathionu. Vzniklý As^{III} je vyloučen z buňky pomocí proteinu *ArsB*, kterému dodává energii podjednotka *ArsA*. Pokud není přítomna podjednotka *ArsA*, pak je energie pro protein *ArsB* přítomna ve formě membránového potenciálu (Frankenberger, 2009).

2.3 Lokalita Mokrsko

Obec Mokrsko leží v okrese Příbram ve Středních Čechách (Obrázek 1). Jedná se o součást důlního revíru Psí hory ustanoveného roku 1978-1980. Byl zde proveden výzkum zaměřený na geochemické anomálie zlata Mokrsko-západ, Mokrsko-východ a Čelina. Výsledkem výzkumu bylo odhalení obrovského, dosud netěženého ložiska zlata. Odhadovaný obsah Au je 110 t (Morávek a kol., 1989).

Arsen je poměrně často poután ke zlatu, z tohoto důvodu se v této lokalitě nachází vysoké koncentrace As v povrchové a podpovrchové vodě. První detailní geochemický průzkum byl proveden Janatkou a Morávkem (1990). Výzkum prokázal jednak nové zóny zlatonosného zrudnění, ale také vysoké koncentrace As. Další vědecké práce byly zaměřeny na akumulaci arsenu rostlinami a zemědělskými plodinami (Száková a kol, 2007; Soudek a kol., 2006). V srpnu roku 1990 bylo odebráno 6 vzorků obilí z polí v lokalitě Mokrsko. Byl zjištěn nadměrný obsah arsenu u většiny plodin. Naměřené hodnoty byly vyšší než norma pro obsah As v mouce ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Nejvyšší koncentrace byla $7,21 \text{ mg kg}^{-1}$ (Bezvodová, 1996). Byla zde také naměřena poměrně vysoká koncentrace arsenu v zemědělsky využívané půdě ($> 2800 \text{ mg kg}^{-1}$).

Výzkumy také prokázaly, že vyšší koncentrace As^{III} se nachází v redukční (podpovrchová voda), ale také v oxidační zóně (povrchová voda) (Drahota a kol. 2009). Poměr As^{III} a As^{V} odpovídající naměřenému množství organické hmoty ve vodě nás vede k domněnce, že mikroorganismy zde provádí biochemickou transformaci arsenu ve vodě.



Obrázek 1 – Lokalita Mokrsko

2.4 Atomová absorpční spektrometrie

Jedná se o nejrozšířenější metodu stopové analýzy prvků, která prošla největším vývojem v 60. – 80. letech 20. století. Atomová absorpční spektrometrie (AAS) disponuje vysokou citlivostí a nízkými náklady. Lze díky ní stanovit až 60 prvků. Roku 1802 byly poprvé pozorovány absorpční čáry ve slunečním spektru. O více než sto let později, roku 1953, sestrojil Sir Alan Walsh první atomový absorpční spektrometr. Princip této metody se odvíjí

od vlastností elektronů, které jsou vázané v atomu. Elektrony se nacházejí na určitých energetických hladinách, které jsou pro jednotlivé prvky charakteristické. Základem metody je absorpce fotonu o určité vlnové délce, který je potřebný k přechodu elektronu z hladiny nižší na hladinu vyšší (excitace). AAS je metoda relativní, vycházíme z hodnot absorbance, naměřených pro standardní roztoky, které následně porovnááme s hodnotami neznámých vzorků (Dočekal a kol. 2003).

2.4.1 Generování hydridů

Metoda generování hydridů (HG) je jednou z technik AAS, která se využívá speciálně pro stanovení As, Bi, Pb, Te, Se, Sn a Ge ve velice nízkých koncentracích (mg l^{-1} , $\mu\text{g l}^{-1}$). Principem je převedení analytu reakcí s NaBH_4 (tetrahydridoboritan sodný) na plynný hydrid, který je oddělen od kapaliny a proudem nosného plynu veden do atomizátoru. HG je poměrně jednoduchá metoda a není náročná na cenu vybavení. Její hlavní předností je separace analytu od matrice a nekoncentrování, což nám zvýší citlivost a omezí rušivé vlivy při atomizaci. Naopak jednou z nevýhod jsou rušivé vlivy při tvorbě a přechodu hydridu do plynné fáze (Dočekal a kol. 2003).

2.4.2 Speciační analýza

Pod pojmem speciační analýza se rozumí určení a stanovení jednotlivých forem analytu ve vzorku. Pro analýzu se může nejdříve provést separace forem – specií arsenu některou ze separačních metod (např. kapalinovou chromatografií) a poté jejich stanovení některou ze spektroskopických metod. Dalším možným postupem je metoda selektivního (např. pH specifického) generování těkavých hydridů, kdy se za určitých podmínek generují hydridy pouze z některých forem As. Po vygenerování příslušných hydridů se provádí atomizace a detekce.

2.4.3 Odlišení As^{III} a As^{V} pomocí pH specifického generování

Metoda je využívána pro selektivní analýzu jednotlivých forem As. Při pH nad hodnotu 6 není As^{V} schopen reagovat s NaBH_4 , zatímco při nízkém pH probíhá reakce s NaBH_4 pro obě formy As. Alternativou je před-redukce L-cysteinem, který pětimocné složky zredukuje na

trojmocné. Během analýzy se nejdříve stanoví množství As^{III} ve vzorku, který neobsahuje L-cystein. Druhý vzorek s přidavkem před-redukčního činidla nám ukáže množství $\text{As}^{\text{III+V}}$, po odečtení dostáváme množství As^{V} (Matoušek a kol. 2008).

2.5 Způsoby konzervace vzorků

Konzervace vzorků anorganických specií arsenu je pro správnost chemické analýzy klíčovým bodem. Methylované specie arsenu bývají oproti anorganickým mnohem více stabilní (Crecelius a kol. 1986). Úspěšná konzervace závisí na složení matrice vzorku (Palacios a kol. 1997). Arseničnany mohou být v přírodní vodě redukovány na arsenitany dokonce i po odstranění mikroorganismů (Hall 1999). Mimoto některé formy přírodní organické hmoty mohou redukovat As^{V} na As^{III} , zatímco ostatní druhy mohou fotolyticky oxidovat As^{III} na As^{V} (Emett a kol. 2001). Oxidace As^{III} ve vodném roztoku je poměrně pomalá, dokud není překročena aktivační bariéra vlivem zahřívání (Tingle 1911), ultrazvuku (Witekowa a Farbotko 1972), přítomnosti katalyzátoru (Kao a Kuwana 1984) či přítomností silných oxidantů jako je Fe^{III} (Cherry a kol. 1979).

Pro stabilizaci anorganických specií arsenu se nejčastěji využívají kyseliny – dusičná, chloristá, chlorovodíková, octová, sírová či ethylendiamintetraoctová (EDTA). Účinnost stabilizace vzorků se zvyšuje jejich skladováním při teplotě $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Portman 1964). Bednar a kol. (2002) používali pro konzervaci vzorku během jejich experimentu HCl (0,06 M), HNO_3 (0,08 M), H_2SO_4 (0,09 M) a EDTA (1,25 mM). Jejich výsledky vyhodnotily jako nejspolehlivější stabilizátor anorganických specií arsenu kys. EDTA, která zachovala poměr As^{III} i As^{V} po dobu 120 h (5 dnů).

McCleakey a kol. (2004) došli během práce k závěru, že pro konzervaci As je nezbytná filtrace, stabilizace Fe pomocí HCl , H_2SO_4 či EDTA a uložení vzorků ve tmě. Filtrace odstraní ze vzorku většinu koloidních částic a mikroorganismy, které mohou ovlivňovat poměr rozpuštěného $\text{As}^{\text{III/V}}$. Okyselení roztoku zabrání oxidaci a sražení Fe a Mn hydroxidů, které mohou absorbovat As. EDTA izoluje Fe a vznik jeho sraženin je potlačen. HCl se během experimentu jevila jako vhodný stabilizátor specií As a Fe pro širokou škálu vzorků přírodních vod. HCl je také preferována pro analýzy využívající pro určení As metodu HG-AAS, protože matrice vzorku je podobná matrici reakčního media. Naopak pro HPCL-ICP-MS je více vhodná EDTA, neboť HCl by mohla během analýzy poškodit kolonu.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a jejich příprava

Všechny roztoky byly připravovány v deonizované vodě (Watrex Ultrapur, USA).

Standardní roztoky As o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$, $20 \mu\text{g l}^{-1}$ a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ byly připraveny ředěním zásobního roztoku 10 mg l^{-1} As. Standardní roztok 10 mg l^{-1} As^{III} byl připraven z roztoku 1000 mg l^{-1} As^{III} ($0,132 \text{ g As}_2\text{O}_3$ rozpuštěno v malém množství 10% KOH a doplněno deonizovanou vodou do 100ml). Standardní roztok 10 mg l^{-1} As^{V} byl připraven z komerčního roztoku 1000 mg l^{-1} As^{V} (Merck, Německo).

Redukčním činidlem byl 1% roztok NaBH_4 (Sigma-Aldrich, čistota 97%) v 0,1 % KOH (Lach-Ner). Roztok byl připravován pro každé měření čerstvý.

Jako reakční médium byl použit roztok $0,75 \text{ mol/l}$ $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ pufru, který byl připraven rozpuštěním $29,55 \text{ g}$ tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu (Sigma-Aldrich, čistota 99%) v 250 ml deonizované vody. Poté jsem pomocí 10% roztoku KOH (Lach-Ner) upravila hodnotu pH na 6,0 (kontrolováno pH metrem, Mettler-Toledo, Švýcarsko).

Pro generování trojmocných a pětímocných forem As byl použit jako před-redukční činidlo 2% L-cystein hydrochlorid monohydrát (Merck, for biochemistry).

Dále byly využity stabilizátory koncentrace v podobě kyselin – EDTA (kys. ethylendiamintetraoctová – disodná sůl, p.a., Lachema), HCl (p.a., Merck), HNO_3 (p.p., Lach-Ner, ČR) a HCOOH (p.a., Lachema).

3.2 Přístroje a jejich parametry

3.2.1 Atomový absorpční spektrometr

Pro detekci byl zvolen atomový absorpční spektrometr GBC SavantAA (Obrázek 5) s korekcí pozadí. Jako zdroj záření byla použita buzená výbojka s dutou katodou (SuperLamp). Parametry spektrometru jsou uvedeny v Tabulce 1.

Vlnová délka (nm)	193.7
Šířka spektrálního intervalu (nm)	2.00
Žhavicí proud (mA)	20
Režim měření	Peak Area
Doba měření (s)	60

Tabulka 1 - Nastavení spektrometru



Obrázek 5 - Ato­mový absorpční spektrometr GBS SavantAA

3.2.2 Součásti systému generování hydridů

Peristaltická pumpa (pro vodu, NaBH ₄ , Tris·HCl pufr)	Reglo Digital (Ismatec, Switzerland) Průtok 1,0 ml min ⁻¹
Peristaltická pumpa (pro odpad)	Reglo Digital (Ismatec, Switzerland) Průtok 12,9 ml min ⁻¹
Regulátor průtoku argonu	FMA-A2403 (Omega, USA) Průtok 75ml min ⁻¹
Regulátor průtoku vzduchu	FMA-2604A (Omega, USA) Průtok 30 ml min ⁻¹ pro vzorky s přísávkem L-cysteinu

Průtok 25 ml min⁻¹ pro vzorky

bez přídavku L-cysteinu

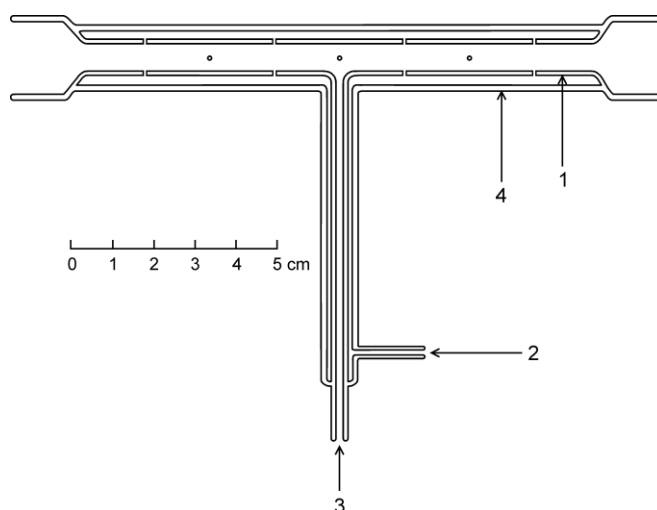
Pec

(RMI, s.r.o, ČR)

900°C

3.2.3 Atomizátor

Pro generování analytu na volné atomy byl použit křemenný multiatomizátor (Dědina a Matoušek 2000), vyhřívaný pecí na teplotu 900°C (Obrázek 2).



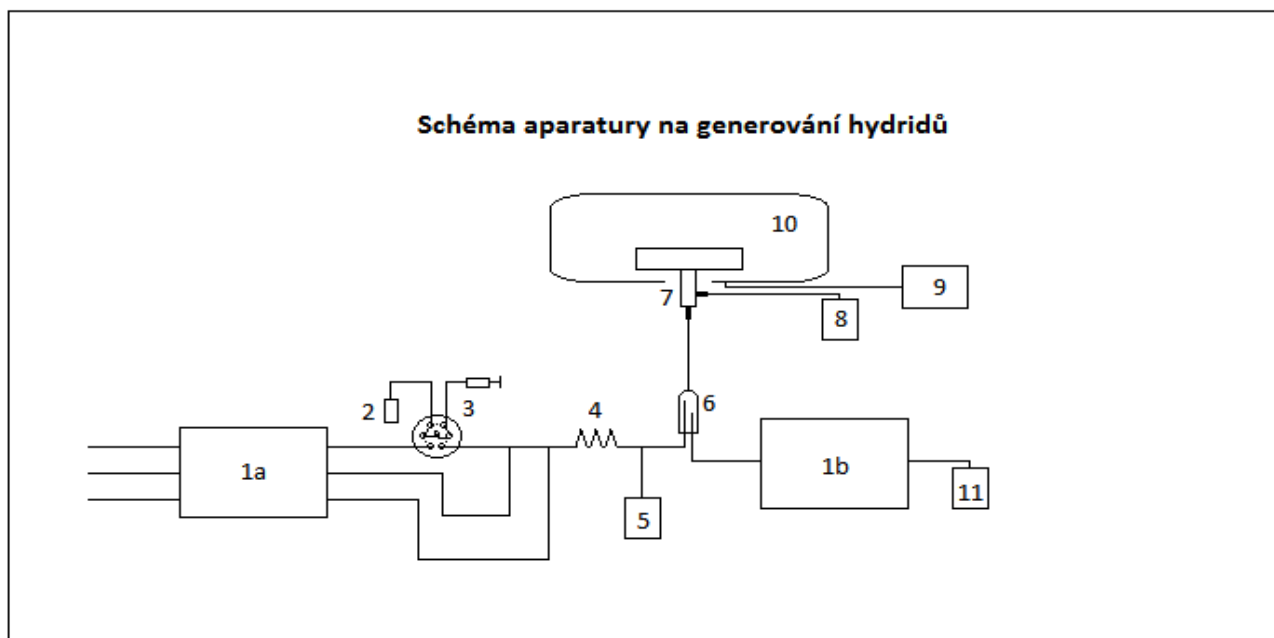
Obr. 2 Schematický náčrt křemenného multiatomizátoru (1 – vnitřní trubice se 14 otvory, 2 – vstup pro vzduch, 3 – vstup hydridu a Ar, 4 – vnější trubice)

3.3 Schéma aparatury a procedura

Schéma aparatury je na Obr. 3

Peristaltickou pumpou (1a) je čerpána deionizovaná voda, Tris·HCl pufr a NaBH₄. Voda působí jako nosné médium, do kterého je pomocí manuálního injekčního ventilu (3) vpraven vzorek o objemu 250 μl (2). Vzorek v proudu nosného média se mísí s Tris·HCl pufr a následně s NaBH₄. V reakční cívce (4) je pak analyt redukován na plynný hydrid. Hydrid se pomocí nosného plynu, argonu, který je přiváděn přes regulátor průtoku (5), dostává do separátoru fází (6), kde se oddělí kapalná fáze (odpad - 11) od plynné fáze (hydrid, argon,

vznikající vodík). Odpadní kapalina je čerpána peristaltickou pumpou (1b). Plynná fáze s hydridem pokračuje do peci (9) vyhřívaného křemenného multiatomizátoru (7), kam je přiváděn pomocí regulátoru průtoku (8) vzduch. K detekci byl využit atomový absorpční spektrometr GBS SavantAA (10).



Obrázek 3 – Vlastní schematický náčrt aparatury na generování hydridů

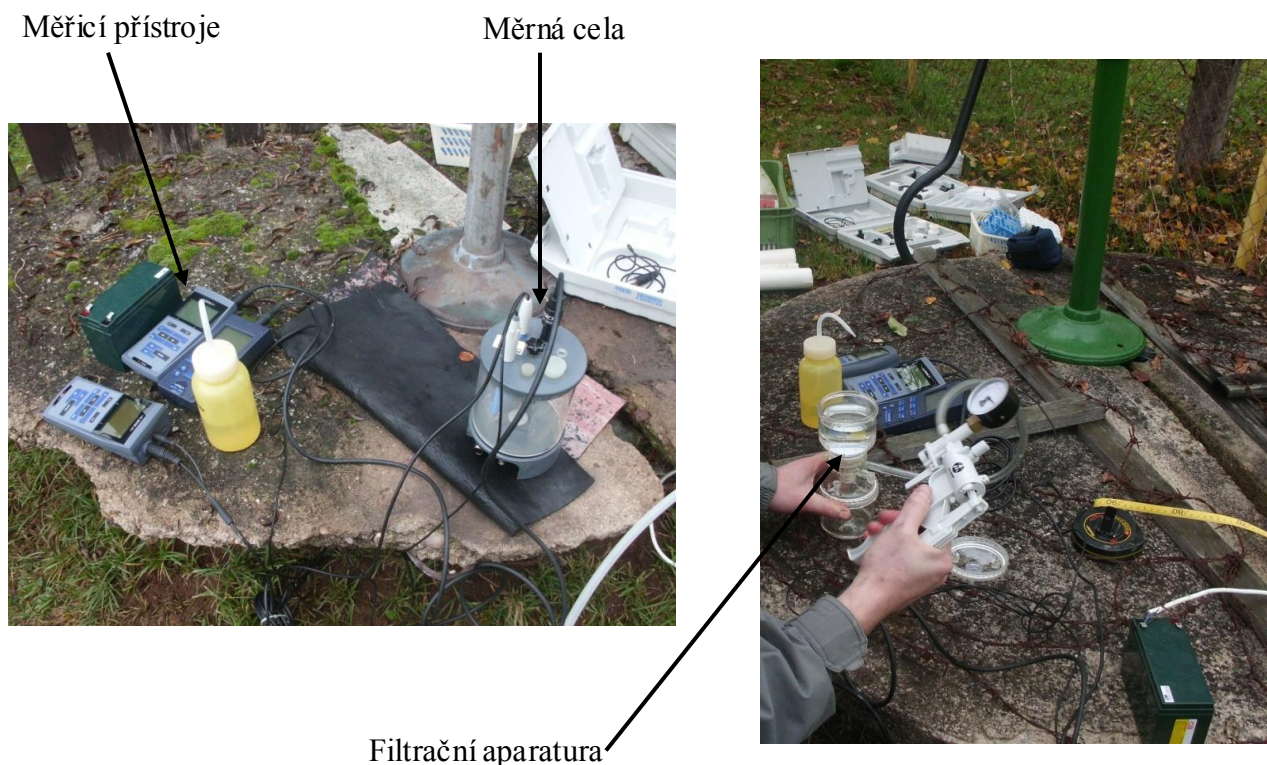
3.4 Vyhodnocení naměřených dat

Naměřená data (plochy píku vypočítané softwarem spektrometru) byla zpracována pomocí metody kalibrační křivky. Jednotlivé body standardních roztoků jsem proložila přímkou pomocí lineární regrese, zobrazila si její rovnici a korelační koeficient (hodnota spolehlivosti R). Podle rovnice regrese jsem spočítala koncentraci As pro neznámé vzorky. Jako první byla měřena hodnota nulového bodu (blank), která se vždy odečítala. Před každým měřením bylo provedeno nastavení nulové linie. Analýzu každého vzorku jsem opakovala nejméně třikrát. Ze získaných hodnot koncentrace pro neznámé vzorky jsem vypočítala průměr a směrodatnou odchylku.

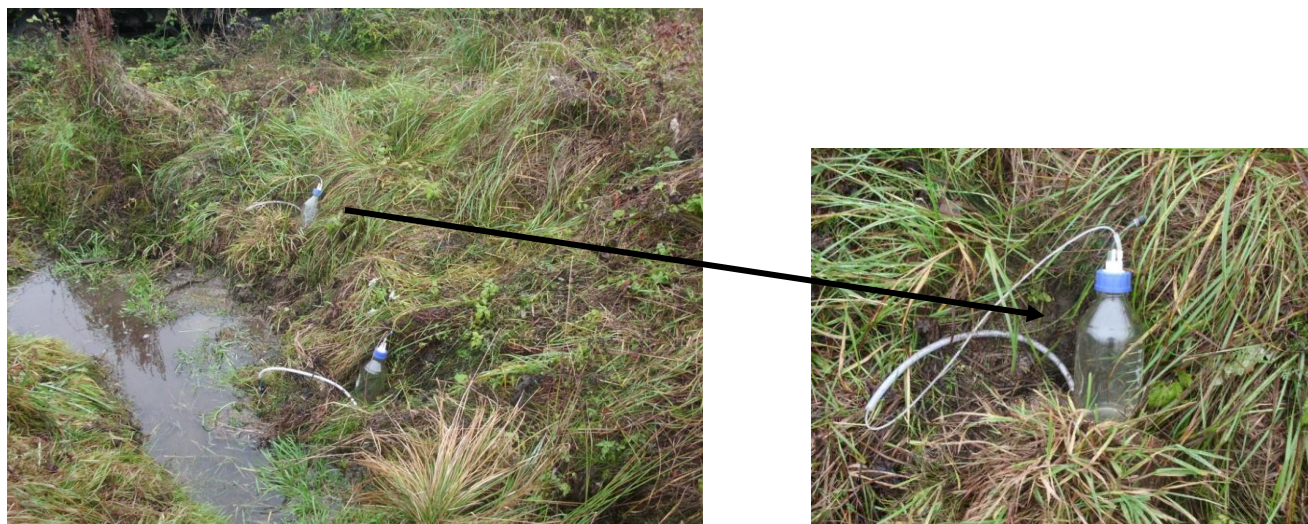
3.5 Odběr vzorků v lokalitě Mokrsko

Vzorky studniční a přírodní vody byly odebrány dne 25. 10. 2012 v dopoledních hodinách. Místa odběru byla zaznamenávána do mapy. Voda byla čerpána pomocí čerpadla do průtokové cely, kde bylo měřeno pH, Eh, množství rozpuštěného kyslíku (DO) a teplota.

Voda byla přefiltrována filtrem o velikosti 0,45 μm , čímž byla ze vzorku odstraněna většina přítomných mikroorganismů. Pro zabránění oxidace As^{III} na As^{V} byly všechny vzorky stabilizovány přidávkem 1 mM EDTA 2-Na a uloženy v neprůhledných plastových lahvích. Vzorky byly až do analýzy uschovány v lednici.



Obrázek 4 a 5 – Vlastní fotografie z odběru vzorků studniční vody



Obrázek 6 a 7 - Vlastní fotografie lyzimetru umístěného v potoce

3.6 Příprava vzorků přírodní vody se stabilizačními činidly

Pro tento experiment byla použita přírodní voda odebraná dne 25. 10. 2012 z lyzimetru umístěného v potoce v obci Mokrsko. Postup při odběru je uveden v kapitole 3.5.

Okamžitě po odběru a přefiltrování vody bylo připraveno 5 vzorků:

1. Vzorek bez konzervačního činidla (označení Vz. 1)
2. Vzorek s přidávkou 0,03 M HCl (označení Vz. 2)
3. Vzorek s přidávkou 0,028 M HNO₃ (označení Vz. 3)
4. Vzorek s přidávkou 1 mM EDTA-2Na (označení Vz. 4)
5. Vzorek s přidávkou 1% HCOOH (označení Vz. 5)

3.7 Příprava vzorků As^V v deionizované vodě

Nedávná měření provedená v ÚIACH poukázala na samovolnou redukci As^V v deionizované vodě. Na základě tohoto poznatku byl připraven vzorek o známém množství As^V s cílem znovu pozorovat případnou redukci přidaného As^V.

Vzorek As^V o koncentraci 40 µg l⁻¹ byl připraven dne 4. 1. 2013 zředěním zásobního roztoku 10 mg l⁻¹ As^V v deionizované vodě (400 µl na 100 ml vody). Zásobní roztok byl připraven z komerčního roztoku 1000 mg l⁻¹ As^V (Merck, Německo).

4. Výsledky a diskuse

4.1 Speciační analýza studniční a přírodní vody z Mokrska

Dohromady bylo odebráno 5 vzorků studniční vody (označení 1, 2, 3, 4 a 6) a 1 vzorek přírodní (mělké podpovrchové) vody odebraný z lyzimetru uloženého v potoce, který vytéká z rybníku Kuchyňka (označení 5). Z celkového počtu vzorků studniční vody byly dvě z nich studny obecní (1, 4) a zbylé tři studny soukromé (2, 3, 6). Popis jednotlivých vzorků je v Tabulce 2. Místa odběru jsou znázorněna na Obrázku 8.

Číslo vzorku	Popis	Stav po odebrání	pH	Eh (mV)	t (°C)	DO (mg/l)
1	Obecní studna	Čirá	6.6	501	12.1	1.9
2	Dům č. 8	Čirá	7.2	323	12.0	1.9
3	Dům č. x	Čirá	7.2	425	11.0	0.6
4	Obecní studna	Čirá	7.4	451	10.4	1.3
5	Lyzimetr	Čirá	7.5	84	10.8	1.41
6	Dům č. 23	Čirá	7.2	385	10.6	0.5

Tabulka 2 – Popis odebraných vzorků studniční vody z lokality Mokrsko

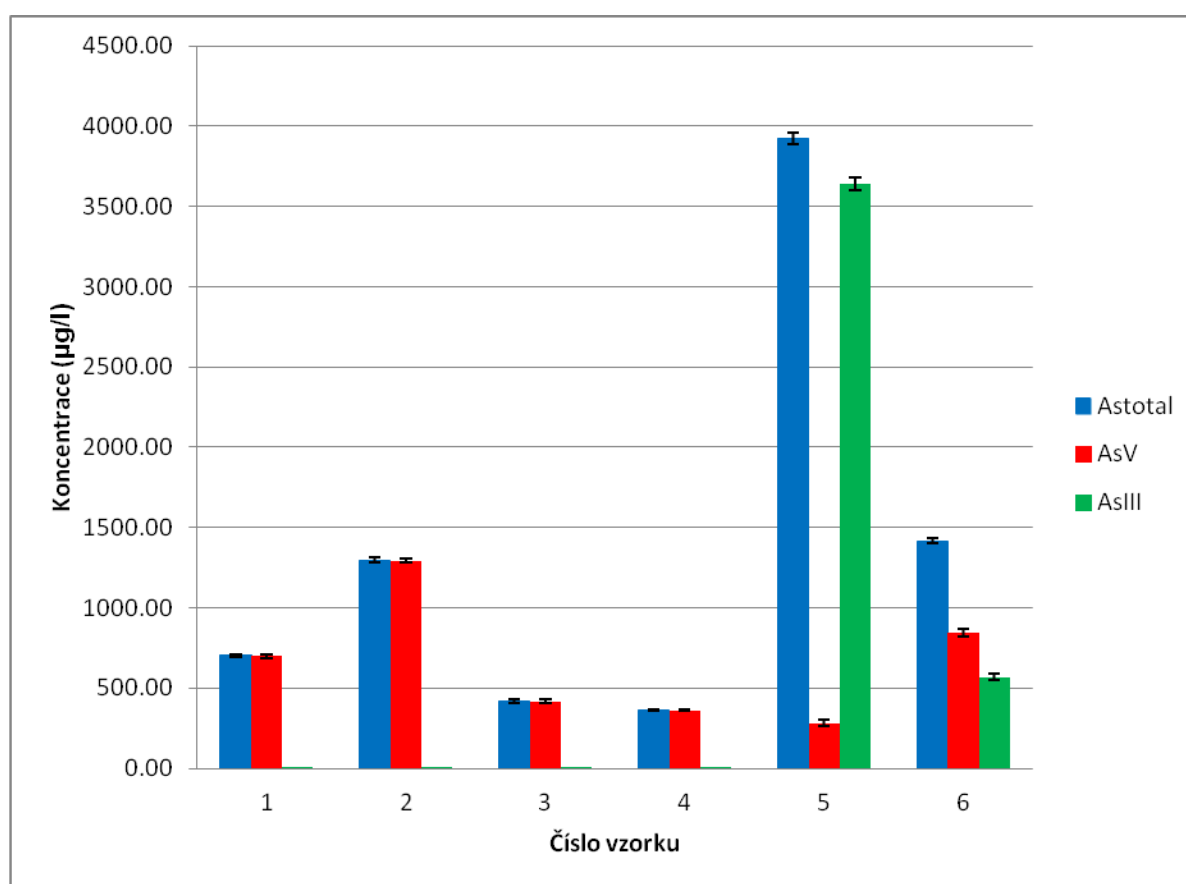


Obrázek 8 – Místa odběru vzorků studniční vody z lokality Mokrsko

Analýzy všech vzorků byly provedeny dne 1. 11. 2012. Výsledky speciální analýzy studniční i přírodní (mělké podpovrchové) vody uvádí Tabulka 3, které odpovídá Graf 1.

Číslo vzorku	As ^{total} (μg l ⁻¹)	As ^V (μg l ⁻¹)*	As ^{III} (μg l ⁻¹)
1	701,3±11,1	699,3±11,1	2,0±0,1
2	1298,3±14,1	1294,5±14,1	3,8±0,1
3	418,7±9,6	417,8±9,6	0,9±0,1
4	361,3±4,4	360,6±4,4	0,7±0,1
5	3922,6 ±36,7	280,94±42,2	3641,7±20,9
6	1415,2±15,2	846,2±25,4	569,0±20,3

Tabulka 3 – Výsledky speciální analýzy studniční (1, 2, 3, 4, 6) a přírodní (5) vody z lokality Mokrsko



Graf 1 – Výsledky speciální analýzy studniční (1, 2, 3, 4, 6) a přírodní vody (5) z lokality Mokrsko

Ve studniční vodě (označení 1, 2, 3, 4, 6) odebrané z obce Mokrsko se nacházejí vysoké koncentrace arsenu (v rozmezí od 361 do 1415 $\mu\text{g l}^{-1}$), které mnohonásobně převyšují limit pro pitnou vodu (10 $\mu\text{g l}^{-1}$). Dominující formou zde je As^{V} , tento fakt poměrně dobře koreluje s naměřenými hodnotami redoxního potenciálu. S dlouhodobým příjmem vody s vysokým obsahem arsenu souvisí vážná zdravotní rizika. Roku 1985 byla provedena geomedicínská studie, které obsahuje přehled úmrtnosti za období 1950 – 1984. Nejčastějšími příčinami smrti byla ischemická choroba srdce, kornatění srdce a cév, mozková mrtvice a různé druhy rakoviny. V průběhu posledních několika let se v obci Mokrsko vyskytovala „medicínská anomálie“ – černání nohou. Tato anomálie má svůj původ v Bürgerově chorobě, která zde byla potvrzena dohromady u 5 případů. Bürgerova choroba se v souvislosti s dlouhodobým příjmem vody s vysokým obsahem arsenu vyskytuje pouze v Bangladéši. Řešením otázky vysoce kontaminované vody byla výstavba vodovodu roku 1989. Všichni obyvatelé dnes užívají vodu z vodovodu, zamořenou vodou však napájí hospodářská zvířata a zalévají s ní kořenovou zeleninu. Vzhledem k tomu, že tamější půda obsahuje také poměrně vysoké koncentrace arsenu, není vhodné zde pěstovat jakékoli jednoleté a dvouleté plodiny určené ke konzumaci. Po analýze byly vypracovány informační zprávy pro všechny obyvatele, kteří mi umožnili odběr vody z jejich studny. Ve zprávě byli seznámeni s metodickými postupy a výsledky speciální analýzy a také byli poučeni o rizicích užívání takto kontaminované vody.

Pro mělkou podpovrchovou vodu (označení 5) je typický As^{V} , neboť zde snadno zde dochází k oxidaci. Relativně oxidativní podmínky (Eh 84mV) a převaha As^{III} (92,4%) naznačuje nerovnováhu v termodynamických podmínkách. Toto měření svědčí o stěžejní roli arsen-redukujících mikroorganismů v kontaminaci mělké podpovrchové vody v lokalitě Mokrsko. Kontaminace těchto vod As^{III} vede ve velkém měřítku k jeho pronikání do studniční a povrchové vody v lokalitě Mokrsko. Je také důležité zdůraznit, že As^{III} může snadno pronikat do půdy. Z tohoto důvodu nedoporučuji pěstování jakékoli kořenové zeleniny v této oblasti. Nevhodné je také hnojení dusíkatými či fosfátovými hnojivy, neboť právě tyto látky jsou přirozeným zdrojem živin pro bakterie, které se začnou množit. Proces redukce As^{V} na As^{III} by se právě díky rapidnímu navýšení počtu bakterií mohl mnohonásobně urychlit.

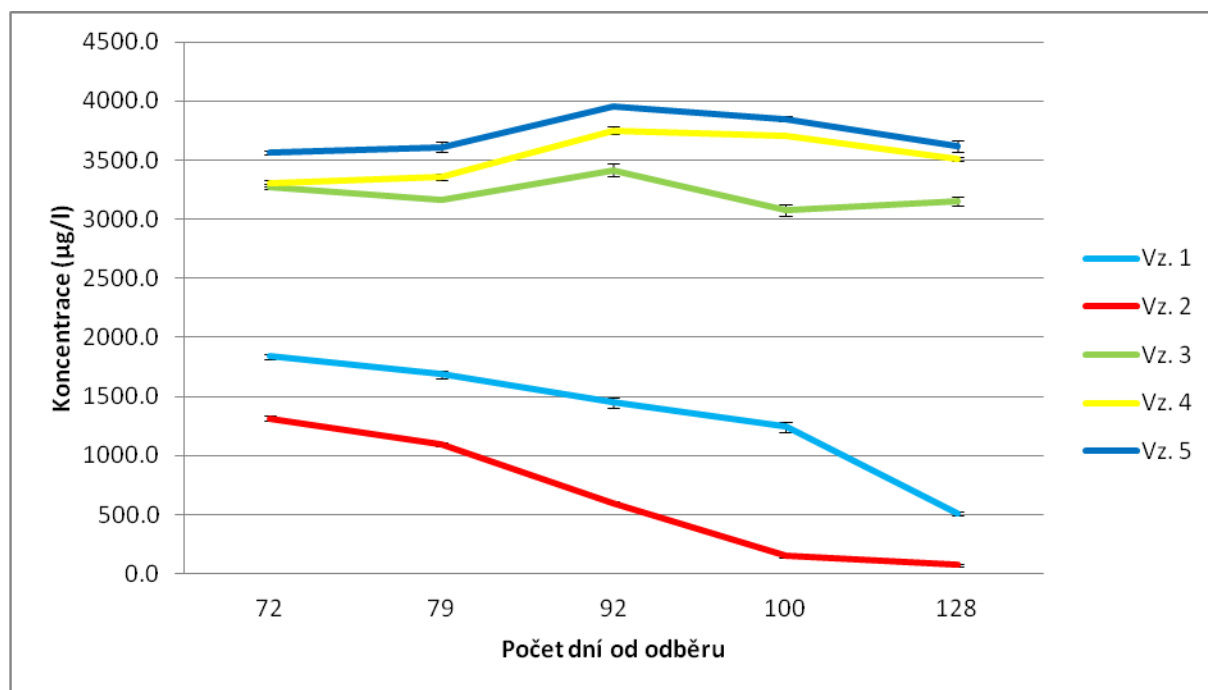
4.2 Posouzení účinnosti stabilizace vzorků přírodní vody

Analýzy byly provedeny ve dnech 4.1 2013 (72 dní po odběru), 11. 1. 2013 (79 dní po odběru), 24. 1. 2013 (92 dní po odběru), 1. 2. 2013 (100 dní po odběru) a 8. 3. 2013 (128 dní po odběru). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4 (pouze obsah As^{III}) a Tabulce 5 (celkový obsah As), které jsou kopírovány Grafem 2 a Grafem 3.

Koncentrace As (As^{III} i As^{total}) naměřená několik dní po odběru je v Tabulce 4 (viz 4.1).

Počet dní od odebrání	Vz. 1 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Vz. 2 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Vz. 3 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Vz. 4 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Vz. 5 ($\mu\text{g l}^{-1}$)
72	1838	1315	3273	3304	3566
79	1687	1096	3165	3358	3612
92	1450	602	3417	3749	3955
100	1242	152	3077	3700	3849
128	507	72	3151	3506	3618

Tabulka 4 – Stabilizační činidla pro vzorky přírodní vody (pouze As^{III})

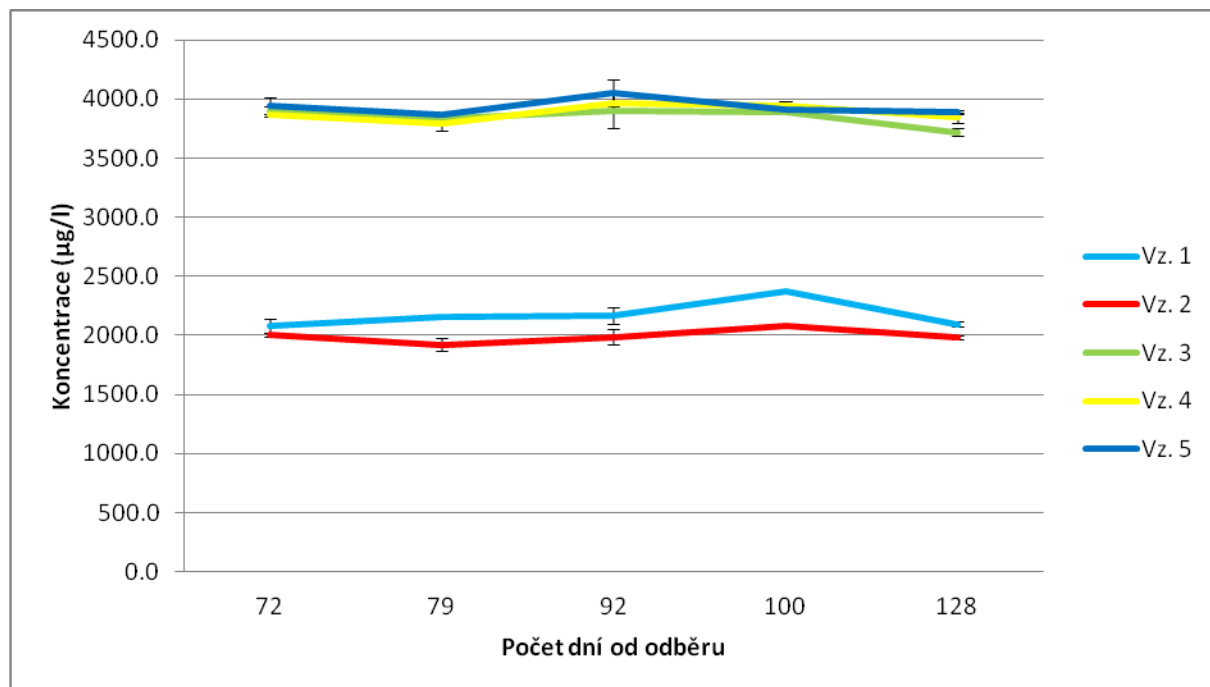


Graf 2 – Stabilizační činidla pro vzorky přírodní vody (pouze As^{III})

První analýza byla provedena 72 dní po odběru vzorku. Koncentrace As^{III} ve vzorku bez stabilizačního činidla (Vz. 1) a ve vzorku s přidavkem 0,03M HCl (Vz. 2) klesla téměř dvojnásobně v porovnání se vzorky s 0,028M HNO_3 (Vz. 3), 1mM EDTA (Vz. 4) a 1% $HCOOH$ (Vz.5). HCl bývá často považována za vhodný stabilizační prostředek pro vzorky přírodní vody s vysokým obsahem As^{III} , nicméně má měřené toto tvrzení nepotvrdila. Zajímavé také je, že koncentrace As^{III} zde klesala mnohem rychleji, než ve vzorku bez přidání konzervačního činidla.

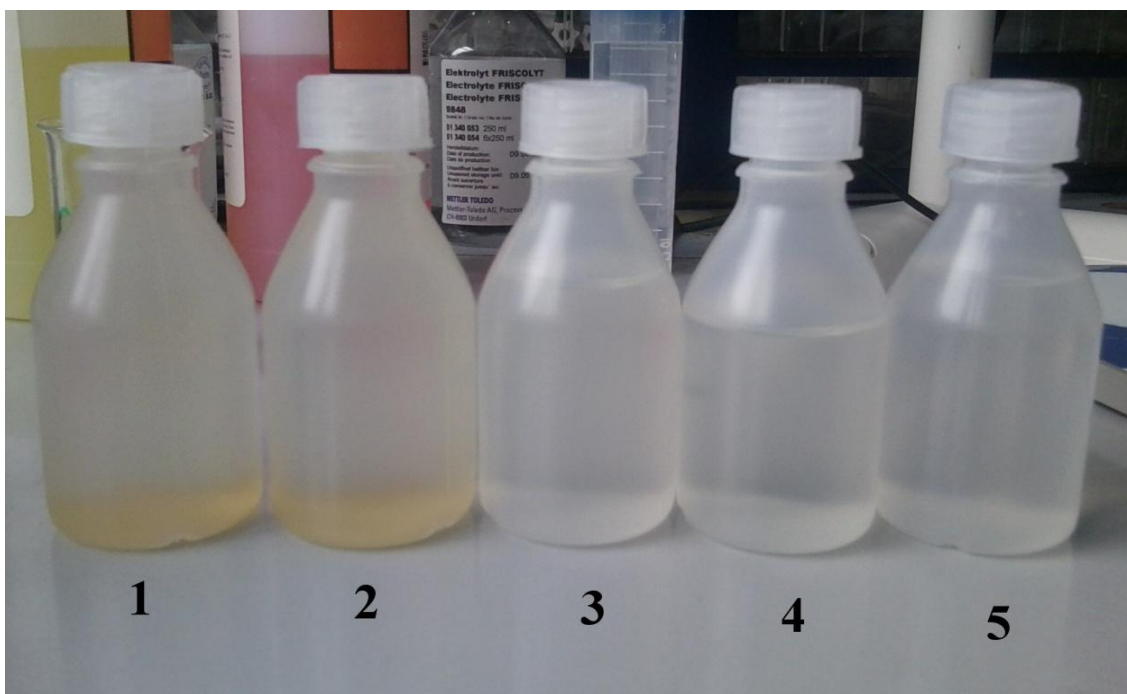
Počet dní od odběru	Vz. 1 ($\mu g\ l^{-1}$)	Vz. 2 ($\mu g\ l^{-1}$)	Vz. 3 ($\mu g\ l^{-1}$)	Vz. 4 ($\mu g\ l^{-1}$)	Vz. 5 ($\mu g\ l^{-1}$)
72	2078.4	2002.4	3895.9	3869.3	3948.3
79	2152.6	1922.2	3840.0	3787.1	3865.6
92	2168.3	1987.8	3898.6	3960.5	4056.2
100	2369.0	2080.2	3891.1	3946.8	3915.0
128	2093.4	1983.8	3721.3	3841.2	3890.6

Tabulka 5 – Stabilizační činidla pro vzorky přírodní vody (As^{total})



Graf 3 – Stabilizační činidla pro vzorky přírodní vody (As^{total})

Výsledky analýza celkového obsahu As (As^{total}) ukazují, že se HNO_3 , EDTA a HCOOH jeví jako spolehlivě použitelné stabilizační prostředky. V případě vzorku bez konzervačního činidla a vzorku s přidavkem HCl byl pozorován téměř dvojnásobný úbytek koncentrace, nicméně tato koncentrace se s postupem času neklesala. Důvodem této výrazně nižší koncentrace může být přítomnost Fe^{II} ve vzorku ($5,6 \text{ mg l}^{-1}$). Již několik dní od odebrání se v obou vzorcích vytvořil hnědý zákal (Obrázek 9), pravděpodobně hydroxidů železa, které jsou schopny absorbovat As. Větší okyselení vzorku by mohlo zabránit vytvoření sraženiny, nicméně snížení pH by mělo s největší pravděpodobností vliv na selektivitu pH specifického generování.

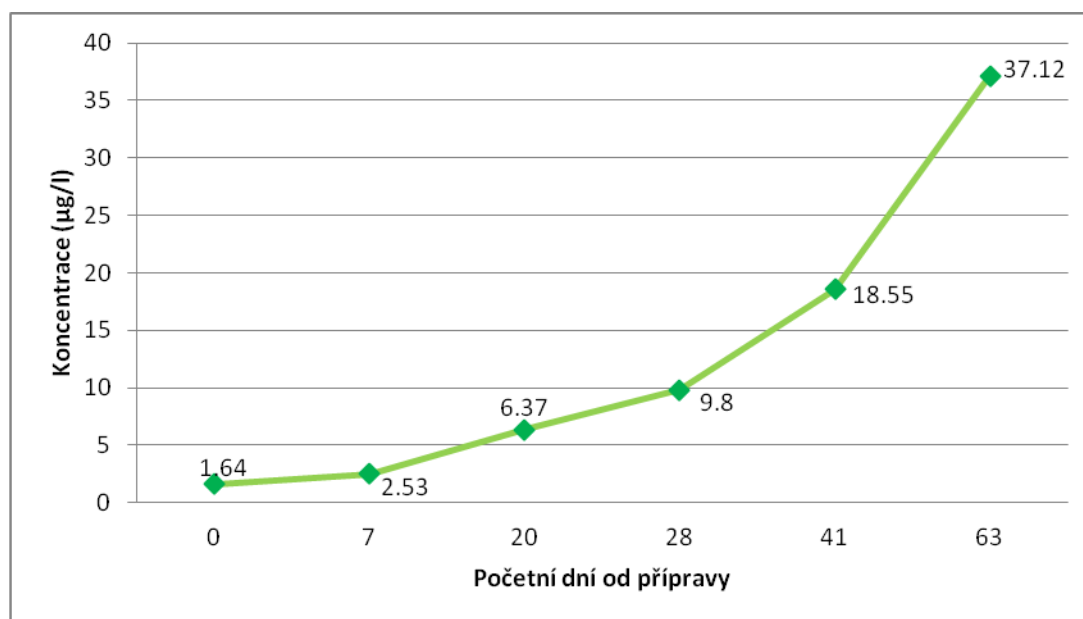


Obrázek 9 – Vzorky přírodní vody odebrané z ly zimetru v lokalitě Mokrsko (1 – bez konzervace, 2 – s HCl , 3 – s HNO_3 , 4 – s EDTA, 5 – s HCOOH)

Z provedených analýz vyplývá, že vhodná konzervační činidla pro vzorky přírodní vody z lokality Mokrsko jsou HNO_3 , EDTA a HCOOH . Tento fakt je v dobré shodě literaturou. HCOOH nebyla dosud pro účely stabilizace vzorků vody s vysokým obsahem arsenu využita.

4.3 Analýza vzorků deionizované vody s přidaným As^V

Analýzy byly provedeny 4. 1. 2013 (několik hodin po přípravě), 11. 1. 2013 (7 dní po přípravě), 24. 1. 2013 (20 dní po přípravě), 1. 2. 2013 (28 dní po přípravě), 14. 2. 2013 (41 dní po přípravě) a 8. 3. 2013 (63 dní po přípravě). Výsledky jsou uvedeny v Grafu 4.



Graf 4 – Koncentrace As^{III} vzniklého redukcí As^V přidaného do deionizované vody

Koncentrace As^{III} stoupla již několik hodin po přípravě na hodnotu 1,64 µg l⁻¹. Po týdnu se koncentrace zvýšila téměř o 55% a stále narůstala. Po 63 dnech se ustálila na hodnotě 37,12 µg l⁻¹. Jediným možným vysvětlením redukce As^V je přítomnost arsen-redukujících mikroorganismů. Deionizovaná voda je voda chemicky čistá, nevyskytují se v ní tudíž žádné ionty. Vzhledem k tomuto faktu se jedná s největší pravděpodobností o AMR mikroorganismy, které využívají pro redukci As^V detoxifikační mechanismus.

Pro ověření tohoto závěru byl navržen experiment, jehož základem je odstranění mikroorganismů z deionizované vody a provedení opětovné analýzy. Budou připraveny 3 vzorky. K prvnímu bude přidán pouze As^V o známé koncentraci (40 µg l⁻¹), v případě druhého vzorku bude deionizovaná voda převařena a následně obohacena o známou koncentraci As^V a u třetího vzorku bude voda ošetřena přidavkem 10 mM azidu sodného (NaN₃) a poté obohacena o známé množství As^V.

Pokud nedojde v upravených vzorcích deionizované vody k redukci As^{V} a ve vzorku bez ošetření ano, je to jasný důkaz svědčící o přítomnosti arsen-redukujících mikroorganismů. V případě, že se tímto experimentem podaří ověřit výskyt mikroorganismů, bude ve spolupráci s MBÚ AV ČR provedena sekvence DNA s cílem zjistit konkrétní druhy mikroorganismů.

Tento výsledek se stává předmětem dalších experimentů v Ústavu analytické chemie AV ČR.

5. Závěr

Tato práce byla zaměřena na speciální analýzu studniční a mělké podzemní vody z lokality Mokrsko. Dalším předmětem diskuse byla konzervace vzorku a udržení oxidačního stupně arsenu. Práce se dále zabývá mikrobiální mobilizací arsenu v lokalitě Mokrsko a také ve vzorcích deionizované vody připravené v naší laboratoři.

Výsledky speciální analýzy studniční vody ukazují na vysoké koncentrace arsenu v rozmezí 361 – 1415 $\mu\text{g l}^{-1}$, které mnohonásobně překračují limit pro pitnou vodu. Situace byla částečně vyřešena výstavbou vodovodu, nicméně místní obyvatelé využívají kontaminovanou vodu jako vodu užitkovou, např. pro zalévání konzumních plodin. Po provedení analýz byly pro obyvatele, kteří mi umožnili odběr jejich vody, vypracovány informační zprávy, ve kterých byli seznámeni s metodikou a výsledky speciální analýzy. Občané byli také poučeni o riziku užívání takto kontaminované vody. Ze záznamů z místní matriky a také z informací od místních obyvatel se v této lokalitě vyskytovala „medicínská anomálie“ – černání nohou, která má svůj původ v Bürgerově chorobě. Tato nemoc oběhového systému je v souvislosti s nadměrným příjmem arsenu potvrzena jen v Bangladéši.

Speciální analýza mělké podzemní vody odebrané z lyžimetru v obci Mokrsko poukazuje na nadměrnou koncentraci As^{III} (92,4% z celkového množství As). Pro tento typ vody je typická přítomnost arsenu ve formě As^{V} , neboť zde poměrně snadno dochází k oxidaci. Relativně oxidativní podmínky a převaha As^{III} naznačuje na nerovnováhu v termodynamických podmínkách. Tyto výsledky svědčí o stěžejní roli arsen-redukujících mikroorganismů ve vodách v lokalitě Mokrsko. Je poměrně důležité uvědomit si, že As^{III} může celkem snadno pronikat do půdy. Na základě tohoto závěru nedoporučuji obyvatelům obce Mokrsko pěstovat jakékoli jednoleté či dvouleté plodiny určené ke konzumaci. Nevhodné je také hnojení dusíkatými a fosfátovými hnojivy. Právě tyto látky představují přirozené živiny pro mikroorganismy, jejichž množství by se mohlo mnohonásobně zvýšit a tím by se i značně urychlil proces pronikání As^{III} do vody a půdy.

Pro experiment zaměřený na posouzení účinnosti stabilizačních činidel pro vzorky přírodní vody s vysokým obsahem arsenu byl využit vzorek vody odebrané z lyžimetru. Byly testovány stabilizátory v podobě kyseliny chlorovodíkové, dusičné, ethylendiamintetraoctová a kyseliny mravenčí. Kyselina chlorovodíková je v odborné literatuře často považována jako spolehlivý stabilizační prostředek, nicméně má měření tuto myšlenku nepotvrdila.

Nejspolehlivěji se jeví kyselina dusičná, ethylendiamintetraoctová a také nově použitá kyselina mravenčí.

Posledním předmětem diskuse je analýza vzorku As^{V} připraveného v deionizované vodě, ve které během nedávných měření v naší laboratoři docházelo k samovolné redukci As^{V} . Pro tento experiment byl připraven vzorek As^{V} o známé koncentraci, který byl několikrát měřen po dobu více než 2 měsíců. Již několik hodin po přípravě byl zaznamenán nárůst koncentrace As^{III} , která se v závislosti na čase neustále zvyšovala. Jediným možným vysvětlením samovolné redukce As^{V} je přítomnost arsen-redukujících mikroorganismů. Pro ověření správnosti výsledků byl navržen experiment, který by měl potvrdit hypotézu o výskytu mikroorganismů v deionizované vodě. V případě, že naše myšlenka bude skutečně potvrzena, bude ve spolupráci s MBÚ AV ČR provedena sekvence DNA s cílem zjistit konkrétní druhy daných mikroorganismů. Tento výsledek se stává předmětem dalších měření v ÚIACH AV ČR.

6. Seznam použité literatury

- **S. Andrew, J. L. Burgess, M. M. Meza, E. Demidenko, M. G. Waugh, J. W. Hamilton a kol.**, Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair in vitro and in individuals exposed to drinking water arsenic, *Environ Health Perspect*, 2006, 114, 1193 - 1198
- **A.J. Bednar, J. R. Garbarino, J. F. Ranville, T. R. Wildeman**, Preserving the distribution of inorganic arsenic species in groundwater and acid mine drainage samples, *Environ Sci Technol*, 2002, 36, 2213 - 2218
- **B. Bezdová**, *Mokrsko – přenos těžkých kovů z půdy do rostlin*, Technická zpráva CEÚ, Praha 1996
- **M. Bissen, F. H. Frimmel**, *Arsenic – a review. Part I.: occurrence, toxicity, speciation, mobility*, *Acta Hydrochim Hydrobiol*, 2003, 31, 9 - 18
- **E. A. Crecelius, N. S. Bloom, C. E. Cowan, E. A. Jenne**, *Speciation of selenium and arsenic in natural water and sediments, Volume 2: Arsenic speciation*, Research Project 2020-2, Report EA-4641, Electric Power Research Institute 1986
- **B. Dočekal a kolektiv**, *Atomová absorpční spektrometrie, 2 THETA*, Český Těšín 2003
- **P. Drahota, J. Rohovec, M. Filippi, M. Mihajlevič, P. Rychlovský, V. Červený, Z. Pertold**, *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*, 2009, 407, 3372–3384
- **M. T. Emmett, G. H. Koe**, *Photochemical oxidation of arsenic by oxygen and iron in acidic solutions*, *Water Res.*, 2001, 35, 649 – 656
- **W. T. Frankenberger**, *Environmental chemistry of arsenic*, University of California, Riverside, California 2009
- **G. E. M. Hall, J. C. Pelchat, G. Gauthier**, *Stability of inorganic arsenic (III) and arsenic (V) in water samples*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 205 - 213
- **J. A. Cherry, A. U. Shaikh, D. E. Tallman, R. V. Nicholson**, *Arsenic species as an indicator of redox conditions in groundwater*, *J. Hydrol*, 1979, 43, 373 - 392
- **J. Janatka, P. Morávek**, *Geochemical exploration in the Jilové Belt: case history of the Čelina deposit, Bohemian Massif, Czechoslovakia*, *Journal of Geochemical Exploration* 1990, 37, 367–384

- **S. Kapaj, H. Peterson, K. Liber, P. Bhattacharya**, *Human health effects from chronic arsenic poisoning – a review*, J. Environ Sci Health, 2006, 41, 2399 – 2428
- **E. M. Kenyon, M. F. Hudes**, *A incisive review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsinic acid*, Toxicology, 2001, 160, 227 - 236
- **R. K. Kwok**, *A review and rationale for studying the cardiovascular effects of drinking water arsenic in women of reproductive age*, Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 222, 344 - 350
- **J. R. Lloyd, R. S. Oremland**, *Microbial transformations of arsenic in the environment: From soda lakes to aquifers*, Elements 2006, 2, 85–90
- **V. Majer, J. Veselý**, *Čistota vodních toků*, Vesmír, 1996, 75, 497-498
- **T. Matoušek, A. Hernández-Zavala, M. Svoboda, L. Langrová, B. M. Adair, Z. Drobná, D. J. Thomas, M. Stýblo, J. Dědina**, *Oxidation State Specific Generation of Arsines from Methylated Arsenicals Based on L- Cysteine Treatment in Buffered Media for Speciation Analysis by Hydride Generation - Automated Cryotrapping - Gas Chromatography- Atomic Absorption Spectrometry with the Multiatomizer*, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2008, 63, 396-406
- **R. B. McCleakey, D. K. Nordstrom, A. S. Maest**, *Preservation of water samples for arsenic (III/V) determinations: an evaluation of the literature and new analytical results*, Applied Geochemistry, 2004, 19, 995 - 1009
- **P. Morávek, P. Janatka, J. Pertoldová, J. Straka, J. Ďurišová, M. Pudilová**, *Mokrsko gold deposit - the largest gold deposit in the Bohemian Massif, Czechoslovakia*, Economic Geology Monographs 1989, 6, 252–259
- **R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, L. T. Phung, S. Silver**, *Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes*, FEMS Microbiological Review, 2002, 26, 311
- **R. S. Oremland, J. F. Stolz**, *Arsenic, microbes, and contaminated aquifers*, Trends in Microbiology, 2005, 13, 45–49
- **R. S. Oremland, F. Wolfe-Simon, C. W. Saltikov, J. F. Stolz**, *Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems*, Geomicrobiology Journal, 2009, 26, 522-536
- **M. A. Palacios, M. Gomez, C. Camara, M. A. Lopez**, *Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholin in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determinativ by liquid chromatogramy with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection*, Anal Chim, Acta, 1997, 340, 209 - 220

- **J. S. Petrick, B. Jagadish, E. A. Mash, H. V. Aposhian**, *Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) and arsenite: LD₅₀ in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase*, Chem Res Toxicol, 2001, 14, 651 - 656
- **P. Pitter**, *Hydrochemie*, VŠCHT, Praha 2009
- **Porquet, M. Filella**, *Structural evidence of the similarity of Sb(OH)₃ and As(OH)₃ with glycerol: implications for their uptake*, Chem Res Toxicol, 2007, 20, 1269 - 1276
- **J. E. Portman, J. P. Riley**, *Determination of arsenic in sea water, marine plants and silicite and carbonate sediments*, Anal. Chim. Acta, 1964, 31, 509 - 519
- **S. Silver, L. T. Phung**, *Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic*, Applied and Environmental Microbiology 2005, 71, 599–608
- **P. Skřivan**, *Koloběh arsenu v životním prostředí*, Vesmír, 1996, 75, 247
- **P. L. Smedley, D. G. Kinniburgh**, *A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters*, Appl Geochem, 2002, 17, 517 - 569
- **P. Soudek, L. Vichová, Š. Valenová, R. Podlipná, J. Malá, T. Vaněk**, *Arsen a jeho příjem rostlinami*, Chemické listy, 2006, 100, 323–329
- **J. Száková, M. Mihaljevič, P. Tlustoš**, *Mobilita, transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a rostlinách*, Chemické Listy, 2007, 101, 397–405
- **J. B. Tingle**, *Oxidation of arsenious and antimonious oxides*, J. Am. Chem. Soc., 1911, 33, 1762 – 1763
- **S. L. Wang, C. K. Chang, C. L. Chen, L. I. Hsu, H. Y. Chiou, S. Y. Chen, a kol.**, *A review of the epidemiologic literature on the role of environmental arsenic exposure and cardiovascular diseases*, Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 222, 315 – 326
- **H. Wanibuchi, E. I. Salim, A. Kinoshita, J. Shen, M. Wei, K. Morimura a kol.**, *Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models*, Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 198, 366 - 376
- **S. Witekowa, W. Farbotko**, *Chemical effects of ultrasonic waves. XVII. Oxidation of arsenous acid under ultrasonic irradiation*, Acta Chim, 1972, 17, 91 – 95
- **H. S. Yu, W. T. Chai, C. Y. Chai**, *Arsenic carcinogenesis in the skin*, J Biomed Sci, 2006, 13, 657 - 666
- **G. Yu, D. Sun, Y. Zheng**, *Health effects of exposure to natural arsenic in groundwater and coal in China: an overview of occurrence*, Environ Health Perspect, 2007, 115, 636 - 642

Konzultantský posudek SOČ- 2013

Speciační analýza arsenu ve vodách v lokalitě Mokrsko

Student: Barbora Heřmanovská

Slečna Barbora Heřmanovská působila v naší laboratoři v rámci programu Otevřená věda III. Tématem práce je stopová speciační analýza arsenu ve vodách, tj. analýza forem ve kterých je As přítomen, metodou atomové absorpční spektrometrie se selektivním generováním hydridů. Práce je pokračováním jejího předešlého působení v naší laboratoři, kdy se věnovala především vývoji a optimalizaci analytické metody.

Studentka se pro vlastní práci zkontaktovala s RNDr. Petrem Drahotou, Ph.D., z Přírodovědecké fakulty PřF UK, který se dlouhodobě zabývá výskytem arsenu v lokalitě Mokrsko. Ve spolupráci s ním odebrala vzorky povrchové i studniční vody, které analyzovala na své aparatuře. Aby se ověřila vhodnost různých strategií konzervace vzorků pro budoucí analýzy z této lokality, různě zakonzervované vzorky byly opakovaně analyzovány po dobu několika měsíců. Dále se též věnovala objasnění problému se samovolnou redukcí standardních roztoků As^V , pozorované v naší laboratoři.

Studentská práce shrnuje výsledky těchto experimentů. Svým rozsahem se blíží bakalářské práci slušné úrovně v oboru analytické chemie.

Studentka je velmi samostatná a má velký zájem o obor. Dokázala si najít vhodné odborníky, se kterými konzultovala různé aspekty své práce i mimo obor analytické chemie. Aktivně vyhledávala literární zdroje, kterých nastudovala mnohem více, než citovala v práci. Velmi dobře zvládá experimentální práci i vyhodnocování získaných výsledků. Také její prezentace výsledků je na vynikající úrovni.

V Praze 26. 3. 2013



RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultant práce

Vědecký pracovník

Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.,
Oddělení stopové prvkové analýzy, detašovaná laboratoř Praha

Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4- Krč

Tel. 241 062 474, E-mail matousek@biomed.cas.cz