

FRAKCIONACE STOPOVÝCH PRVKŮ V LISTECH VRBY (*Salix spp.*)

KATEŘINA MALISOVÁ^{a*}, OTO MESTEK^a,
JANA KOMÍNKOVÁ^a, JIŘÍ ŠANTRŮČEK^a,
JIŘINA SZÁKOVÁ^b a PAVEL TLUSTOŠ^b

^a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6
Katerina.Malisova@vscht.cz

Došlo 20.4.09, přepracováno 14.9.09, přijato 27.10.09.

Klíčová slova: frakcionace, speciace, vrba, fytořemediace

Úvod

Fytořemediace je postup využívající zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů životního prostředí. Proces fytořemediace těžkých kovů může být zjednodušeně popsán jako odstranění kovů z půdy jejich transportem do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně sklizeny a odstraněny a plocha je opět osázena rostlinami do té doby, než se koncentrace kovů v půdě sníží na přijatelnou hladinu¹. Rostlina vhodná pro fytořemediaci by měla splňovat tři základní předpoklady: měla by rychle růst a produkovat velké množství biomasy, měla by mít dostatečně hluboké kořeny, lehce sbíratelnou nadzemní část a akumulovat velké množství kovů v nadzemní části. Mezi nevýhody této metody patří produkce rostlin obohacených o rizikové prvky, které mohou být konzumovány živočichy nebo vyplaveny, nedostatečná transpirace rostlin během určitých období roku a možné zvýšení transportu stopových prvků díky vylučování rozpustných exudátů kořeny rostlin. Kořeny zasahují pouze do určité hloubky půdního profilu, a není proto možné extrahovat kontaminanty z hlubších horizontů. Rostliny také nemohou růst na půdách s toxicky působící kontaminací².

V současné době využívají fytořemediační technologie dvě dostupné strategie. První možností je použití rostlinných hyperakumulátorů, které mohou vázat kovy ve velkých množstvích, koncentrace těžkých kovů v biomase

takovýchto rostlin překračuje o jeden až dva řády hodnoty získané v běžných rostlinách. Tak např. penízeček modravý (*Thlaspi caerulescens*) dokáže vázat až 30 g kg⁻¹ niklu, 43 g kg⁻¹ zinku, a 2 g kg⁻¹ kadmia a olova³. Malá produkce biomasy hyperakumulátorů je tedy kompenzována velmi vysokým obsahem těžkých kovů v nadzemních částech rostliny. Druhou možností je pěstování rostlin, které dosahují mírně nadprůměrných obsahů kovů v biomase, toto ale kompenzují vysokým výnosem biomasy. Na půdách kontaminovaných do hlubších vrstev se při fytořemediacích osvědčují druhy čeledi *Salicaceae* (vrby a topoly)⁴. Velkou výhodou vrb je možnost častých sklizní, vysoký výnos biomasy, dobrá regenerace (posklizňové odrůstání), efektivní příjem živin, vysoká intenzita a specifická kapacita jednotlivých druhů, hybridů a klonů absorbovat těžké kovy⁵. Některé druhy a klony vrb a topolů však vykazují i velmi vysoký koeficient bioakumulace, díky němuž mohou vykazovat až 5krát vyšší kapacitu příjmu kovů než *T. caerulescens*^{5,6}.

Tolerance vyšších rostlin k přítomnosti těžkých kovů je přirozená nebo získaná schopnost snášet po dlouhou dobu vysoké koncentrace kovů bez patrného negativního působení na metabolismus a schopnosti rozmnožování, která je řízena genetickými vazbami a faktory prostředí. Rozvoj tolerance je dlouho trvající proces a zahrnuje změny v genetice rostlin⁷. Hlavním mechanismem detoxikace iontů kovů v rostlinách je chelatace s ligandy, doplněná odloučením vzniklých komplexů do subcelulárních prostor (převážně do vakuol) nebo do specifických pletiv rostlin. Na detoxikaci těžkých kovů v buňce se jako chelataující ligandy podílí převážně organické kyseliny. Nejčastěji se jedná o kyseliny malonovou, šťavelovou, vinnou nebo citrónovou ve vakuole. Komplexy o větší stabilitě se vytváří vazbou na histidin, metalothioneinům podobné látky a fytochelatiny. Anorganickými ligandy jsou chloridy, fluoridy, sulfáty a další^{4,7}. V této práci jsme se pokusili posoudit, jaké typy vazeb toxických prvků převládají v listech vrby (*Salix spp.*) rostoucí na silně kontaminované půdě.

Experimentální část

Vzorky. Směs listů (VK) *Salix smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* a *S. dasyclados* byla sbírána na podzim roku 2007 v okolí řeky Litavky na Příbramsku, kde došlo k extrémní kontaminaci půdy způsobené několikanásobným vylitím odkalovacích nádrží blízké kovohutě při povodních. Půda obsahovala 64,1±4,3 mg kg⁻¹ As, 30,5±2,9 mg kg⁻¹ Cd, 2297±42 mg kg⁻¹ Pb a 3718±317 mg kg⁻¹ Zn

* Kateřina Mališová tuto práci úspěšně prezentovala na soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

(cit.⁸). Dva kontrolní vzorky byly sbírány v nekontaminované oblasti u řeky Vltavy v Praze Zbraslavi na jaře (VZJ) a na podzim (VZP) roku 2008.

Chemikálie. Použité kyseliny dusičná a chlorovodíková, hydroxid sodný a amoniak byly třídy Suprapur® (Merck, Německo), octová kyselina byla čistoty p.a. (Lachema, ČR). Základní roztoky prvků o koncentraci 1000 mg l⁻¹ byly získány od firmy Merck. Látka tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris) byla získána od firmy Fluka (Německo). K ředění roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Millipore, USA).

Příprava extraktu v 0,02 mol l⁻¹ Tris-HCl. Navážka 2 g homogenizované biomasy byla extrahována 50 ml pufru 0,02 mol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5) po dobu jedné hodiny v PE lahvičce. Poté byla směs odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

Příprava extraktu v 1 M-NaOH. Navážka 0,5 g homogenizované biomasy byla extrahována 5 ml 1 M-NaOH v PP zkumavce po dobu jedné hodiny. Po naředění byla suspenze neutralizována na pH 7,5 přidávkou kyseliny octové o koncentraci 1,7 mol l⁻¹ a 0,17 mol l⁻¹ za neustálého míchání a sledování pH, směs byla doplněna na objem 50 ml a odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

Stanovení celkového obsahu prvků. 0,5 g homogenizované biomasy nebo 10 ml extraktu bylo v 110 ml PTFE nádobce rozkládáno ve 3 ml kyseliny dusičné za zvýšené-

ho tlaku s fokusovaným mikrovlnným ohřevem (Unilever BM1-Z, Plazmatronika, Polsko). Rozložený vzorek byl převeden do 50 ml odměrné baňky a obsah prvků byl stanoven metodou ICP-MS, na přístroji Elan DRC-e (Perkin – Elmer, Norwalk, USA).

Spojení GPC/ICP-MS. Aparatura pro kvantitativní vyhodnocení frakcionace stopových prvků byla sestavena z vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, Walnut Creek, USA), dvou injektorů umístěných před (smyčka 100 µl pro dávkování vzorku) a za kolonou (smyčka 500 µl pro dávkování kalibračních roztoků prvků) a kolony Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko); jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr, mobilní fáze byla Tris-HCl (pH 7,5) o průtoku 0,5 ml min⁻¹. Pro preparativní separace byla použita kolona Fractogel EMD Bio SEC (Merck), smyčka pro dávkování vzorku měla objem 2 ml, jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr a detektor 9050 UV (Varian), jako mobilní fáze byl použit pufr Tris-HCl (pH 7,5), průtok 2 ml min⁻¹.

Izolace ligandů stopových prvků pomocí afinitní chromatografie. Ligandy stopových prvků obsažené v nízkomolekulární frakci extraktu v roztoku Tris-HCl byly zachyceny absorpcí v 1 ml chelatační kolonce HiTrap (GE Healthcare Bio Science AB, Uppsala, Švédsko) nasycené ionty Cu²⁺. Absorbované látky byly eluovány pomocí 0,3 mol l⁻¹ roztoku amoniaku a eluát byl lyofilizován.

Tabulka I

Celkové obsahy stopových prvků v sušině homogenizované biomasy listů vrb [µg g⁻¹]

Prvek	Vzorek		
	VK ^a	VZJ ^b	VZP ^c
V	0,230±0,021	0,657±0,065	3,5±0,2
Ag	0,0611±0,0062	0,0088±0,0019	0,0476±0,0028
Cd	60,4±4,0	0,398±0,032	1,81±0,14
Co	0,742±0,034	1,299±0,068	7,86±0,33
Cu	7,33±0,38	9,28±0,40	39,5±1,8
Cr	0,462±0,054	0,655±0,074	3,77±0,53
Fe	200±11	290±22	1452±233
Mo	0,096±0,012	0,205±0,012	1,351±0,078
Mn	318±28	120,0±8,3	1057±62
Ni	8,93±0,53	1,94±0,12	13,8±1,8
Zn	1543±101	66,4±5,2	334±21
As	0,535±0,059	0,1224 ±0,0091	1,303±0,075
Tl	0,0318±0,0019	0,00486±0,00049	0,0275±0,0023
Pb	89,7±8,6	0,518±0,044	3,74±0,21
Sušina	91,8 %	90,2 %	98,0 %

^a Vrba rostoucí v kontaminované půdě v okolí řeky Litavky na Příbramsku, ^b vrba rostoucí v nekontaminované půdě v okolí řeky Vltavy na Praze – Zbraslavi, jarní sběr, ^c vrba rostoucí v nekontaminované půdě v okolí řeky Vltavy na Praze – Zbraslavi, podzimní sběr

MALDI-MS. Měření proběhlo na spektrometru Biflex IV (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Německo), jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, měření probíhalo v pozitivním módu.

Stanovení obsahu aminokyselin v rostlinné biomase. Po kyselinovém rozkladu vzorku byly aminokyseliny stanoveny iontově výměnnou chromatografií s pokolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí.

Výsledky a diskuse

Celkové obsahy stanovovaných prvků v analyzovaných vzorcích shrnuje tab. I. Ze získaných dat je patrné, že listů kontaminovaných vzorků obsahuje výrazně více kadmia (30×), olova (30×) a zinku (5×) než listů nekontaminovaných. Arzen, který byl v půdě obsažen také ve zvýšeném množství, nebyl rostlinou akumulován. To potvrzuje dřívější poznatky zaznamenané u vrb pěstovaných na půdě z této oblasti⁸. Z porovnání obsahů stopových prvků v nekontaminovaných vzorcích VZJ a VZP vyplývá, že během vegetačního období došlo k pěti až desetinásobnému nárůstu obsahu stopových prvků. Dále je patrné, že nekontaminovaný vzorek VZP obsahuje výrazně více železa, manganu a mědi, než vzorek kontaminovaný. Vassilev a spol.⁹ pozorovali snížení obsahu železa a fotosyntetických pigmentů u vrb exponovaných zinku a lze spekulovat, že podobně se vysoký obsah zinku mohl projevit i v našem případě. Tab. II ukazuje extrahovatelné obsahy

stopových prvků ve vzorku VK. Při extrakci do pufru Tris-HCl se vyextrahovalo více Fe, Mn a Tl; při extrakci do roztoku NaOH se vyextrahovalo více Cu, Mo, Ni, Zn, As a Pb. Pro identifikaci vazeb prvků na složky rostlinné biomasy metodou GPC/ ICP-MS byly sledovány pouze prvky obsažené v extraktu ve vyšších koncentracích (Cd, Zn, Pb, Mn a Ni). Tab. II ukazuje podíly těchto prvků prošlé kolonou GPC. Tato hodnota určuje podíl kovů vázaných do stabilních komplexů. Zbýlý podíl obsažený v iontové formě je GPC kolonou pevně vázán a musí být po skončení analýzy odstraněn nástřikem roztoku EDTA. Je patrné, že při extrakci do NaOH se v případě Cd, Pb a Zn uvolňuje vyšší podíl stabilních komplexů. V případě Ni a Mn podíly prošlé kolonou na použitém typu extrakčního činidla nezávisí. Obr. 1 ukazuje prvkově specifické chromatogramy extraktu v pufru Tris-HCl a v roztoku NaOH. Je patrné, že pro případ extrakce do roztoku Tris-HCl jsou ligandy eluovány převážně v jednom retenčním čase v nízkomolekulární oblasti, zatímco v případě extrakce do roztoku NaOH jsou ligandy eluovány ve více retenčních časech ve vysokomolekulární, středně i nízkomolekulární oblasti. Použité extrakční činidlo tedy může významně ovlivnit konečnou interpretaci výsledků.

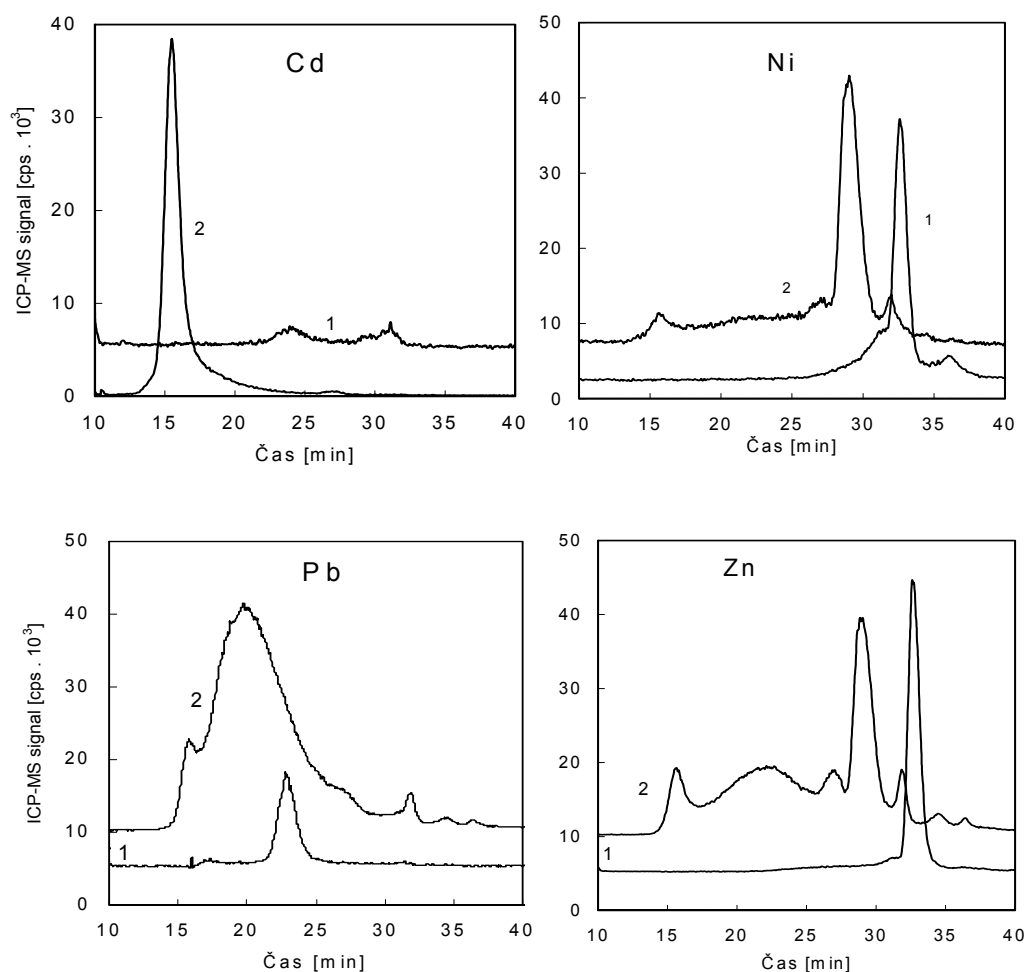
Nízkomolekulární frakce extraktu v pufru Tris-HCl byla separována metodou preparativní GPC (kolona Fractogel), dále přečištěna technikou afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu a podrobena dalším analýzám. V tab. III jsou ukázány nalezené obsahy aminokyselin. Je zřejmý vysoký výskyt kyseliny asparagové či aspa-

Tabulka II

Extrahovatelné obsahy prvků v rostlinné biomase vzorek VK a podíly prošlé kolonou

Prvek	Extrahovatelný podíl ^a		Podíl prošlý kolonou ^b	
	extrakce do Tris	extrakce do NaOH	extrakce do Tris	extrakce do NaOH
V	<0,001 (<1 %)	<0,001 (<1 %)		
Ag	0,002 (3 %)	0,009 (15 %)		
Cd	8,8 (15 %)	9,9 (16 %)	0,045 (<1 %)	7,5 (76 %)
Co	0,31 (42 %)	0,27 (37 %)		
Cu	1,1 (14 %)	3,3 (45 %)		
Cr	0,01 (2 %)	0,25 (54 %)		
Fe	56 (28 %)	37 (19 %)		
Mo	0,03 (34 %)	0,06 (61 %)		
Mn	245 (77 %)	193 (61 %)	0,16 (<1 %)	0,13 (<1 %)
Ni	5,4 (61 %)	6,5 (73 %)	4,0 (61 %)	4,4 (66 %)
Zn	573 (37 %)	956 (62 %)	10,5 (1 %)	60,8 (6 %)
As	0,096 (18 %)	0,39 (73 %)		
Tl	0,012 (37 %)	0,0052 (16 %)		
Pb	2,6 (3 %)	18,9 (21 %)	0,21 (1 %)	5,4 (29 %)

Výsledky jsou uvedeny v $\mu\text{g g}^{-1}$, v závorce je uveden procentický podíl vztažený k celkovému obsahu (^a) nebo k extrahovatelnému množství (^b)



Obr. 1. GPC profily jednotlivých prvků pro extrakci do Tris-HCl (1) a do NaOH (2)

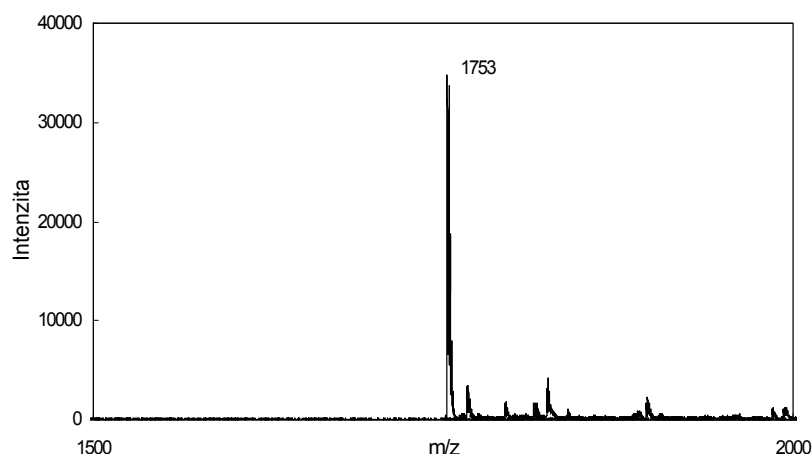
Tabulka III

Výsledky analýzy aminokyselinového složení nízkomolekulární frakce extraktu rostlinné biomasy

Aminokyselina	Zastoupení [% mol mol ⁻¹]
Asp	19
Ser	12
Glu	13
Gly	14
Cys	36
Lys	6

raginu a glutamové či glutaminu, serinu, glycinu a cysteinu. V MALDI-MS spektru této přečištěné frakce byl nalezen jeden pík odpovídající molekulové hmotnosti 1753 Da (obr. 2).

Výsledky potvrdily již známou schopnost vrb rostoucích na kontaminované půdě akumulovat vysoké obsahy zejména Cd a Zn^{8,10,11}, přičemž tyto kovy jsou obsaženy převážně v nerozpustné frakci analyzované biomasy. Nízkomolekulární látky tvořící rozpustné komplexy s kovy v extraktech obsahují vysoký podíl aminokyselin cysteinu a kyselin asparagové a glutamové, tedy látek s vysokou komplexační schopností. Výsledky tedy naznačují, že vrby pravděpodobně mají účinné detoxikační mechanismy, díky jimž jsou tyto dřeviny tolerantní k vysokým obsahům toxických prvků v půdě. Přesné popsání těchto mechanismů však vyžaduje další intenzivní výzkum.



Obr. 2. MALDI-MS spektrum nízkomolekulární frakce extraktu listů vrby VK přečištěné technikou IMAC

Tato práce vznikla za podpory výzkumných záměrů MŠMT ČR MSM 6046137307 a MSM 6046070901.

LITERATURA

1. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Koryta J., Vaněk T.: Chem. Listy 102, 346 (2008).
2. Iskandar I. K., Adriano D. C. (ed.): *Remediation of Soils Contaminated with Metals (Advances in Environmental Science)*. Middlesex, Northwood 1997.
3. Dercová K., Makovníková J., Barančíková G., Žuffa J.: Chem. Listy 99, 682 (2005).
4. Prasad M. N. V. (ed.): *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin 1999.
5. Pulford I. D., Watson C.: Environ. Intern. 29, 529 (2003).
6. Robinson B. H., Mills T. M., Petit D., Fung L. E., Green S. R., Clothier B. E.: Plant Soil 227, 301 (2000).
7. Sanità di Toppi L., Gabbriellini R.: Environ. Exp. Bot. 41, 105 (1999).
8. Tlustoš P., Száková J., Vysloužilová M., Pavlíková D., Weger J., Javorská H.: Centr. Eur. J. Biol. 2, 254 (2007).
9. Vassiliev A., Perez-Sanz A., Cuypers A., Vangronsveld J.: J. Plant Nutr. 30, 1471 (2007).
10. Klang-Westin E., Eriksson J.: Plant Soil 249, 127 (2003).
11. Eriksson J., Ledin S.: Water Air Soil Poll 114, 171 (1998).

K. Mališová^a, O. Mestek^a, J. Komínková^a, J. Šantrůček^a, J. Száková^b, and P. Tlustoš^b (^a *Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b *Czech University of Life Sciences, Prague*): **Concentration of Trace Metals in Willow (*Salix spp.*) Leaves**

The title method was used for phytoremediation of soils. The experiments were performed with leaves of willow (*S. smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* and *S. dasyclados*) grown in soil contaminated with heavy metals (Cd, Zn, Pb). The ability of the leaves to accumulate these metals was confirmed. The total contents of metals in 0.02 mol l⁻¹ Tris buffer (pH 7.5) and in 1 mol l⁻¹ sodium hydroxide extracts were determined. Size exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry was used for separation and determination of metals in the extracts. The metals in the extracts are present mainly in low-molecular-weight fractions ($M \approx 2$ kDa). These fractions were obtained by preparative size exclusion chromatography and refined by immobilized metal affinity chromatography. The compounds in the fractions were analyzed by amino acid analysis and MALDI mass spectrometry. The results show that majority of heavy metals in willow biomass remained in insoluble residue whereas the extracts contain substantial amounts of chelating agents, which suggests their role in metal detoxication processes in willow plants.