

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Biofortifikace řepky olejné (*Brassica napus* L.) selenem:  
tři úrovně aniontové kompetice v systému půda-rostlina**

.....  
doktorská disertační práce

**Autor: Ing. Lukáš Praus**

**Školitel: prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.**

**Konzultant: prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc., dr. h. c.**

**Praha 2020**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „**Biofortifikace řepky olejné (*Brassica napus* L.) selenem: tři úrovně aniontové kompetice v systému půda-rostlina**“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Praze dne

Podpis



## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád vyjádřil své díky **prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc.** a **prof. Ing. Pavlu Tlustošovi, CSc., dr. h. c.** za odborné vedení práce, přínosné konzultace, cenné rady a přátelský přístup. Děkuji též všem **členům Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin** za jejich mnohdy nezištnou pomoc rozličné povahy.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>VÝZNAM SELENU VE VÝŽIVĚ HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>VÝZNAM SELENU VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>SELEN V PŮDĚ</b>	<b>5</b>
2.3.1	Predikce chemické speciace Se	6
2.3.2	Experimentální frakcionace a speciace Se	7
2.3.2.1	Vodorozpustný podíl Se	9
2.3.2.2	Nespecificky adsorbovaný Se	9
2.3.2.3	Specificky adsorbovaný Se	10
2.3.2.4	Organicky vázaný Se	11
2.3.2.5	Reziduální Se	12
2.3.3	Redukční a oxidační přeměny Se	12
<b>2.4</b>	<b>SELEN A ROSTLINY</b>	<b>13</b>
2.4.1	Význam Se pro vyšší rostliny	13
2.4.2	Příjem a metabolismus Se	14
<b>2.5</b>	<b>BIOFORTIFIKACE SELENEM</b>	<b>16</b>
2.5.1	Agronomická biofortifikace	17
2.5.1.1	Aplikace Se do půdy	18
2.5.1.2	Foliární aplikace Se	19
2.5.1.3	Alternativní metody biofortifikace	20
2.5.2	Biofortifikace řepky olejně	21
<b>2.6</b>	<b>OSUD EXOGENNÍHO SELENANU V PŮDĚ</b>	<b>22</b>
2.6.1	Vliv aplikace hnojiv na osud exogenního Se	24
2.6.1.1	Vliv aplikace minerálních hnojiv	24
2.6.1.2	Vliv aplikace organické hmoty	26
<b>2.7</b>	<b>KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SELENU TECHNIKOU ICPMS</b>	<b>28</b>
2.7.1	Spektrální interference (SI)	28
2.7.2	Nespektrální interference (NI)	29
<b>3</b>	<b>HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b>	<b>30</b>

<b>4</b>	<b><u>PUBLIKOVANÉ PRÁCE</u></b>	<b>32</b>
4.1	<b>PUBLIKACE I:</b> Fast abiotic sorption of selenates in soils: pitfalls of batch sorption data acquired by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry	<b>32</b>
4.2	<b>PUBLIKACE II:</b> Role of sulphate in affecting soil availability of exogenous selenate under different statuses of soil microbial activity	<b>48</b>
4.3	<b>PUBLIKACE III:</b> Rapeseed biofortification with selenium: How do sulphate and phosphate influence the efficiency of selenate application into soil?	<b>56</b>
4.4	<b>PUBLIKACE IV:</b> Efficiency of foliar selenium application on oilseed rape as influenced by rainfall and soil characteristics	<b>71</b>
<b>5</b>	<b><u>SOUHRNNÁ DISKUZE</u></b>	<b>87</b>
5.1	<b>RYCHLÁ ABIOTICKÁ SORPCE SELENANU V PŮDÁCH</b>	<b>87</b>
5.1.1	Nespektrální interference při stanovení Se v půdních výlužích technikou ICPMS	87
5.1.2	Vsádkové sorpční experimenty a aniontová kompetice	89
5.2	<b>STABILIZACE EXOGENNÍHO SELENU V PŮDĚ</b>	<b>91</b>
5.2.1	Krátkodobý inkubační experiment	91
5.2.2	Dlouhodobý inkubační experiment	93
5.3	<b>BIOFORTIFIKACE ŘEPKY OLEJNÉ - APLIKACE SELENANU DO PŮDY</b>	<b>96</b>
5.4	<b>BIOFORTIFIKACE ŘEPKY OLEJNÉ - FOLIÁRNÍ APLIKACE SELENANU</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b><u>ZÁVĚR</u></b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u></b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b><u>PŘÍLOHY</u></b>	<b>122</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1.** Průměrné koncentrace Se v krevním séru či plazmě zdravých dospělých obyvatel vybraných zemí.....5
- Obrázek 2.** *Eh* - *pH* diagram Se-O-H systému zkonstruovaný za podmínek: aktivita  $10^{-10}$  mol l<sup>-1</sup> Se, iontová síla I = 0 při 25 °C a 10<sup>5</sup> Pa.....7
- Obrázek 3.** Počet vědeckých publikací indexovaných v databázi Web of Science mezi léty 1984-2019 nalezených dle uvedených klíčových hesel..... 13

## SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1.** Disociační konstanty kyselin při 25 °C .....6
- Tabulka 2.** Přehled využití půd v jednotlivých experimentech.....87

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### formy selenu:

$Se_{anorg}$	anorganické specie selenu
$Se_{H_2O}$	vodorozpustný podíl Se
$Se_{nesp.ads}$	nespecificky adsorbovaný podíl Se
$Se_{org}$	organické specie selenu
$Se_{pot.fyto}$	potenciálně dostupný Se rostlinám
$Se_{rezidual}$	reziduální formy Se
$Se_{rozp}$	snadno rozpustný podíl Se v půdě
$Se_{spec.ads}$	specificky adsorbovaný podíl Se
$Se_{tot}$	celkový obsah Se
$Se^0$	selen v elementární formě
$Se^{-II}$	formální oxidační číslo Se v dané sloučenině je -II
$Se^{IV}$	formální oxidační číslo Se v dané sloučenině je +IV
$Se^{VI}$	formální oxidační číslo Se v dané sloučenině je +VI
$SeO_3^{2-}$	seleničitanový anion; v širším kontextu používáno i pro seleničitan bez rozlišení mezi $SeO_3^{2-}$ a $HSeO_3^-$
$SeO_4^{2-}$	selenanový anion; v širším kontextu používáno i pro selenan

### formy ostatních prvků:

$PO_4^{3-}$	orthofosforečnanový anion, v širším kontextu používáno i pro fosforečnany bez rozlišení jednotlivých hydrogensolí
$SO_4^{2-}$	síranový anion; v širším kontextu používáno i pro síran
$X_{H_2O}$	vodorozpustný podíl prvku „X“
$X_{org}$	prvek „X“ vázaný v organických sloučeninách
$X_{oxal}$	podíl prvku „X“ extrahovatelný ve šťavelanovém činidle
$X_{tot}$	celkový obsah prvku „X“

### analytické techniky:

ETV-ICPMS	ICPMS, kde se pro zavádění analytu do plazmatu využívá elektrotermické vaporizace (ETV)
EXAFS	rentgenová spektrometrie studující jemnou strukturu na krátkovlnné straně absorpční hrany
GCMS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HG-ICPMS	ICPMS, kde se pro zavádění analytu do plazmatu využívá generování hydridů (HG)

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ (POKRAČOVÁNÍ)

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ICPMS	spřážená technika HPLC a ICPMS
ICPMS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
PCR	technika polymerázové řetězové reakce
XAS	rentgenová absorpční spektrometrie

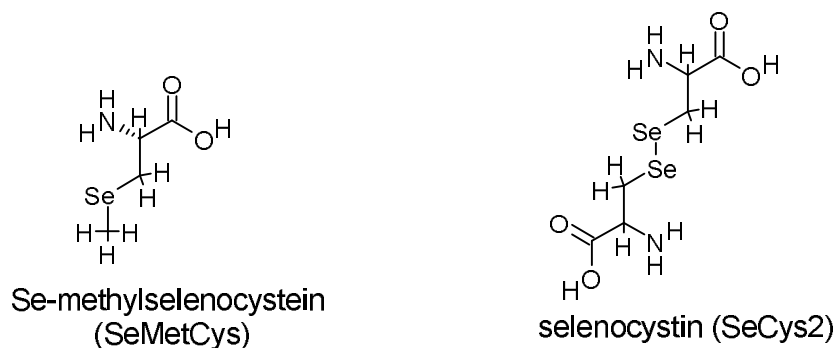
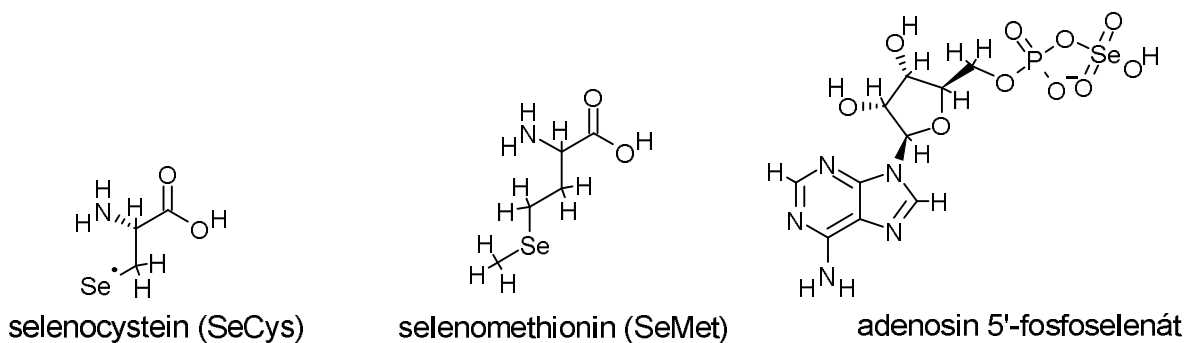
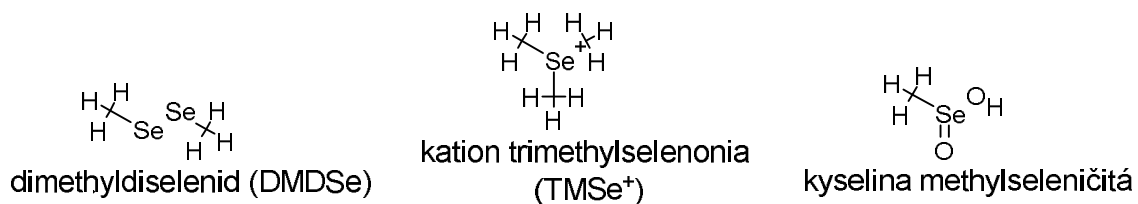
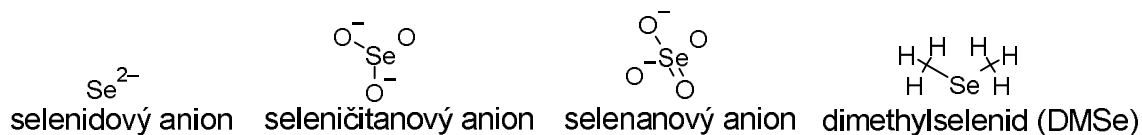
### adsorpční a inkubační experimenty:

$C_{eq}$	rovnovážná koncentrace sorbatu ve výluhu po kontaktu s půdou
$C_0$	výchozí koncentrace sorbatu v roztoku před kontaktem s půdou
$d_0$	okamžik začátku inkubace půdy
$d_{72}$	72. den inkubace půdy
$K_d$	distribuční koeficient
$Q_{eq}$	rovnovážné množství adsorbovaného sorbatu vztažené na hmotnost půdy

### ostatní:

DL	detekční limit
DDP	doporučený denní příjem
CHVK	chromatografická výtěžnost kolony
MPE	metoda postupné extrakce
NI	nespektrální interference
$pH$	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů v roztoku
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
POH	půdní organická hmota
QC	kontrola kvality (analytických výsledků)
SAK	selenoaminokyselina
SI	spektrální interference
EÚ	extrakční účinnost

## STRUKTURNÍ VZORCE SPECIÍ SELENU UVEDENÝCH V TÉTO PRÁCI



# 1 ÚVOD

Selen (Se) je chemický prvek ze skupiny chalkogenů, polokov, který je kladen do souvislosti s několika rozporupnými tématy. Tento pro člověka a živočichy esenciální stopový prvek vykazuje nebývale tenkou hranici mezi denními příjmy, které jsou považovány za nezbytné, optimální a již způsobující chronickou intoxikaci. V určitých oblastech světa jsou nebezpečně vysoké obsahy Se v půdě a vodě námětem výzkumu remediačních opatření. V jiných oblastech jsou relevantními tématy boj s deficiencí Se a suplementace potravního řetězce tímto prvkem. Selen zaznamenal široký ohlas ve výzkumu chemopreventivní aktivity jeho sloučenin. Na straně jedné Se představuje pro své elektrické a optoelektronické vlastnosti strategickou surovinu 21. století, na straně druhé se se zdroji Se zachází velmi nehospodárně. V nedostatečné míře je Se získáván z hlušiny z těžby a úpravy sulfidických rud a uhlí, velké množství Se je značně neúčelně spotřebováváno globálním sklářským průmyslem (Haug et al., 2007; Ullah et al., 2019). Celosvětové kapacity produkce Se jsou omezené, stejně tak možnosti jeho recyklace. Je tedy otázkou, zda při rostoucí poptávce po Se bude v budoucnu upřednostněn technologický pokrok či nutriční potřeby příštích generací.

Biofortifikaci plodin je třeba vnímat jako nástroj zvýšení toku Se potravním řetězcem, který přispěje k lepšímu zdravotnímu stavu dotčených konzumentů. Mezi hlavní úkoly výzkumu agronomické biofortifikace selenem patří zajištění stabilního obsahu Se ve sklizni (bezpečnost) a maximalizace využití Se rostlinou (hospodárnost).

Tato disertační práce je předkládána jako soubor čtyřech publikovaných článků věnovaných vybraným aspektům biofortifikace řepky olejně selenem, a to metodou aplikace  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  do půdy i foliárně. Zadání disertační práce reaguje na rozšířený problém nedostatečného obsahu Se v potravinách a krmivech. Hlavním cílem práce je studium faktorů komplexně ovlivňujících účinnost biofortifikace. Účinnost biofortifikace při aplikaci  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  do půdy úzce souvisí s osudem exogenního Se v dané půdě. Biogeochemické vlastnosti Se, jak naznačuje úvodní literární přehled, jsou velmi komplikované. Jejich důsledky ve vztahu k účinnosti biofortifikace však nejsou zcela objasněny, nebyly dosud systematicky zkoumány a jsou obtížně předvídatelné.

Mezi významná specifika Se, přičemž o většině z nich tato práce pojednává, patří oxidačně-redukční změny, kontrastní mobilita jednotlivých specií Se v půdě a rostlinách, esenciálnost a proteinogenní povaha selenoaminokyselin, mikrobiální a rostlinná biomethylace Se. Některé z uvedených specifíků souvisí se skutečností, že Se má podobné chemické vlastnosti s výrazně biogenní sírou (S). Podobnost vlastností sloučenin Se a S se také odráží ve sdílení transportních a metabolických drah těchto prvků v živých systémech. Výzkum chování Se v agroekosystémech vyžaduje průnik



znalostí z řady vědních oborů (půdní chemie, environmentální geochemie, mikrobiologie, výživa a fyziologie rostlin, pěstování rostlin a analytická chemie). V tomto multidisciplinárním duchu byl sestaven literární přehled i koncept celé disertační práce.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 VÝZNAM SELENU VE VÝŽIVĚ HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

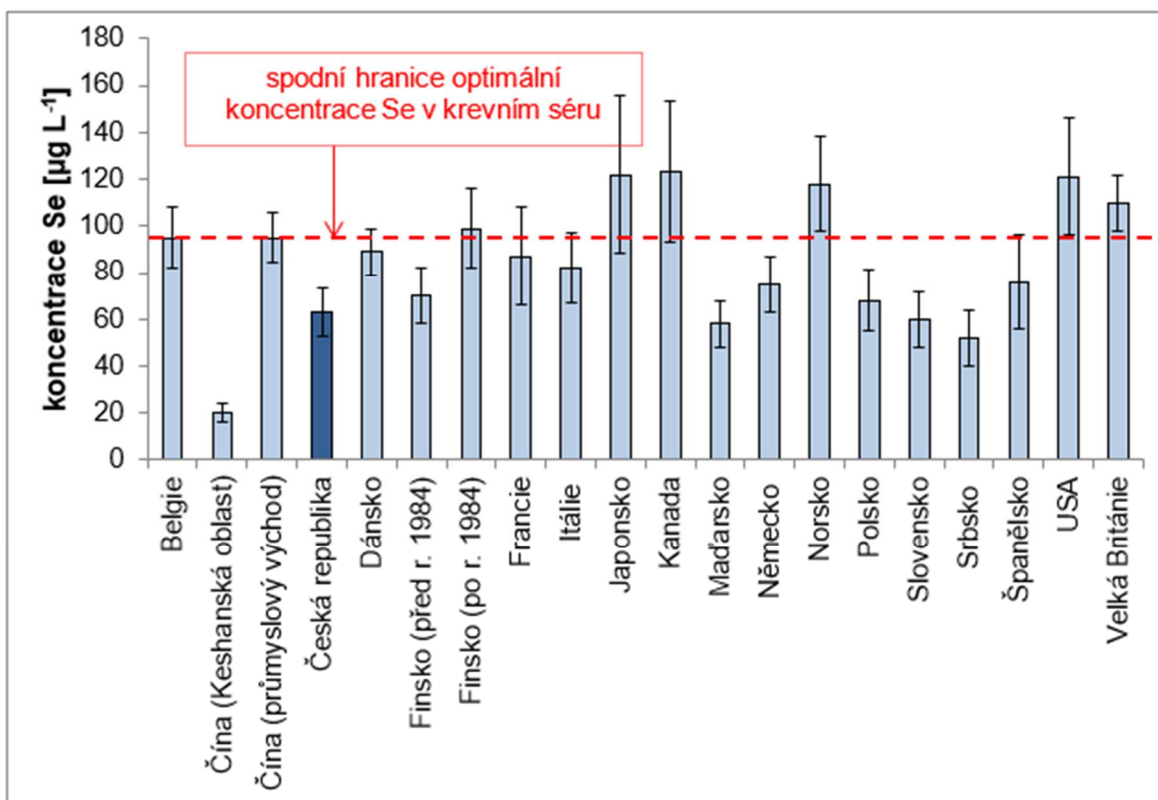
Prvotní stimulací výzkumu biologických účinků selenu (Se) byla snaha farmářů o porozumění a eliminaci ztrát plynoucích z toxického působení Se na hospodářská zvířata. Již závěry klinické studie Smith et al. (1936) upozorňovaly na zdravotní rizika spojená s chronickou expozicí vysokým dávkám Se z potravy vyprodukované v seleniferních oblastech (tj. s vysokým obsahem Se v půdě). Na základě těchto poznatků bylo možné vysvětlit i mnohé intoxikace a záhadné úhyny zvířat, které se datují celá staletí nazpět (Kim a Mahan, 2003).

Na biologickou nezbytnost Se jako první poukázali Schwarz a Foltz (1957), a to objevem přímé souvislosti mezi přítomností stopového množství Se a účinnou ochranou živočišné tkáně proti nekrotickému poškození, které se rozvinulo na játrech laboratorních hlodavců (*Rattus* spp.) na dietě sestávající z čistého kaseinu. Tento průlom v poznání zásadně přispěl k rozšíření zájmu vědecké komunity o Se a jeho sloučeniny a položil základy pro studium deficiencie Se v živých organismech. Výsledky intenzivního výzkumu etablovaly Se jako esenciální stopový prvek ve výživě savců, u nichž na buněčné úrovni ve formě selenoproteinů zabezpečuje řadu esenciálních fyziologických procesů, zvláště v rámci imunitního, reprodukčního a redoxního systému a metabolismu thyroidních hormonů (Rayman, 2002; Hefnawy a Tórtora-Pérez, 2010). Výčet prospěšných aktivit Se zahrnuje účinky antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní, antikarcinogenní, antibakteriální, antivirotické, antiparazitární a antifungální (Hosnedlova et al., 2017). Selenizace krmiv, dnes běžný nástroj v boji proti deficienci Se, snižuje výskyt nemocí, zvyšuje plodnost, užitkovost a kvalitu produkce (Lyons et al., 2007). Jako kritická hodnota obsahu Se v rostlinných krmivech způsobující závažné projevy deficiencie u hospodářských zvířat se uvádí  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  sušiny (Rimmer et al., 1990). Gupta a Gupta (2017) uvádí deficitní obsahy Se v krmných plodinách menší než  $50\text{--}100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , zatímco obsahy  $2000\text{--}5000 \mu\text{g kg}^{-1}$  již mohou působit toxicky.

### 2.2 VÝZNAM SELENU VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA

Téma deficiencie Se ve výživě člověka bylo otevřeno až v roce 1979 s diagnózou Keshanské nemoci (juvenilní kardiomyopatie), jejíž příčinou, nikoliv jedinou, je extrémně nízký denní příjem Se ( $3\text{--}11 \mu\text{g}$ ) (Navarro-Alarcon a Cabrera-Vique, 2008). Příjem Se nižší než  $40 \mu\text{g den}^{-1}$  se považuje za deficitní (Winkel et al., 2012). Světové zdravotnické organizace uvádějí hodnoty doporučeného denního příjmu (DDP) Se pro dospělého muže takto:  $55 \mu\text{g}$  (Institute of Medicine US, 2000),  $42 \mu\text{g}$  (WHO/FAO, 2004) a  $70 \mu\text{g}$  (National Health and Medical Research Council, 2006). Adekvátní příjem Se indukuje optimální

expresi selenoproteinů, kterých bylo dosud identifikováno v proteomu člověka 25, z nichž jen několik bylo funkčně charakterizováno (Roman et al., 2014). Selenoproteiny jsou oblastí aktivního výzkumu prevence a léčby závažných onemocnění, zvláště kardiovaskulárních, neurologických a některých typů rakoviny (Zwolak a Zaporowska, 2012; Newman et al., 2019; Kuria et al., 2020). Inkorporace selenocysteinu (SeCys) v aktivním centru namísto cysteinu (Cys) zvyšuje redoxní aktivitu příslušných enzymů (Zhang a Gladyshev, 2009). Hledisko dosažení maximální aktivity selenoenzymů vedlo k návrhu velmi vysokých DDP selenu, 200–300 µg (Schrauzer a Surai, 2009). Někteří autoři však chemopreventivní účinky Se rozporovali, ba dokonce zjistili, že vyšší terapeutické dávky používané v klinických a biochemických studiích (140–300 µg den<sup>-1</sup> Se) zvyšují riziko vzniku diabetu 2. typu a onkologických onemocnění prostaty a kůže (Jablonska a Vinceti, 2015). Rayman (2012) uzavírá, že zdraví prospěšné účinky přijatého Se se projevují především u jedinců s deficitním nutričním statutem Se. Vodítky k posouzení příjmu a statutu Se na úrovni populace jsou obsahy Se v půdě, krmivech a základních potravinách s přihlédnutím k výživovému zvyklostem populace. Na úrovni jedince je vhodným indexem koncentrace Se v krvi (plné krvi, plazmě, séru, erytrocytech) a moči či obsah Se ve vlasech a nehtech (Kvíčala et al., 1995; Fairweather-Tait et al., 2011). Ideální odhad skutečného statutu Se by však měl reflektovat množství Se, které je dostupné pro aktivitu funkčních selenoproteinů (Thomson, 2004). Klinické studie dokumentují, že koncentrace Se v krevním séru a plazmě obyvatel řady zemí neodpovídají adekvátnímu příjmu a statusu Se (Obrázek 1) a zdaleka nedosahují hodnot, které by zajistily maximální využití antioxidačního potenciálu selenoenzymů (Rayman, 2002). Podle indexů Se publikovaných v Kvíčala et al. (1995; 2008) je také příjem Se obyvateli České republiky znepokojivě nízký. Combs (2001) odhadl, že deficiencí Se je zasaženo 0,5–1 miliarda světové populace. Navíc v návaznosti na predikční modely změn klimatu ve 21. století se riziko deficience Se v globálním měřítku může dále zvyšovat (Jones et al., 2017).



**Obrázek 1.** Průměrné koncentrace Se v krevním séru či plazmě zdravých dospělých obyvatel vybraných zemí. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky průměrů jednotlivých klinických studií provedených v dané zemi ( $n \geq 3$ ). Upraveno z kompilace dat v Combs (2001). Spodní hranice optimální koncentrace Se v krevním séru činí  $95 \mu\text{g l}^{-1}$  (Kvičala et al., 2008).

### 2.3 SELEN V PŮDĚ

Obsah Se v zemské kůře je v průměru velmi nízký ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ), kolísá však dle typu hornin, v nichž lokálně, např. v některých břidlicích, může dosahovat až stovky  $\text{mg kg}^{-1}$  (Fordyce, 2013). Transport Se z hornin je řízen biogeochemickými procesy, které jsou zodpovědné za nerovnoměrnou distribuci Se na zemském povrchu (Fernández-Martínez a Charlet, 2009). Matečná hornina je tradičně považována za hlavní proměnnou ovlivňující obsah Se v půdě (Gondi et al., 1992; El-Ramady et al., 2015). Nové poznatky však zdůrazňují opomíjený význam dvou redistribučních procesů, atmosférické depozice a volatilizace Se, které úzce souvisí s klimatem (Sun et al., 2016). Celkový obsah selenu ( $\text{Se}_{\text{tot}}$ ) v půdách může lokálně nabývat extrémních hodnot  $< 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  nebo  $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  (Winkel et al., 2012). Běžné obsahy  $\text{Se}_{\text{tot}}$  se pohybují mezi  $0,1$  a  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , přičemž celosvětový průměr činí  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  v sušině půdy (Bitterli et al., 2010). Této distribuci se blíží výsledky systematické analýzy zemědělského půdního fondu v České republice (průměr  $\text{Se}_{\text{tot}}$   $0,39 \text{ mg kg}^{-1}$ ; rozmezí  $0,16$ – $1,65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (ÚKZÚZ, 2010). Obsahy  $\text{Se}_{\text{tot}} < 0,6 \text{ mg kg}^{-1}$  považují Lyons et al. (2003) za deficitní, jiné zdroje uvádějí nižší hranici deficitu  $0,125 \text{ mg kg}^{-1}$  (Fordyce, 2013) či  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  (Wadgaonkar et al., 2018). Půdy

s obsahem  $Se_{tot} > 5 \text{ mg kg}^{-1}$  se označují jako seleniferní (Wadgaonkar et al., 2018). Ukazatele deficiencie založené na hodnotách půdního  $Se_{tot}$  je třeba interpretovat jako informativní parametry pro účely základního monitoringu. Teprve s konceptem biologické dostupnosti Se lze relevantně posuzovat množství Se, které vstupuje do potravního řetězce terestrických ekosystémů. Zemědělské půdy v oblastech již zmíněné Keshanské choroby vykazují nízké, nikoliv extrémně nízké  $Se_{tot}$  (v průměru  $0,136 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Johnson et al., 2000). Avšak vodorozpustný podíl ( $Se_{H_2O}$ ) se v této oblasti pohybuje v rozmezí pouze  $< 6 \times 10^{-5}$  až  $2,9 \times 10^{-3} \text{ mg kg}^{-1}$ . Jinými slovy, ne vždy je možno nalézt silný korelační vztah mezi  $Se_{tot}$  v půdě a skutečným příjmem Se plodinami (De Temmerman et al., 2014).

### 2.3.1 Predikce chemické speciace Se

Dle fyzikálně-chemických vlastností půd lze predikovat pouze výskyt anorganických forem selenu ( $Se_{anorg}$ ), jejichž chemismus v půdách je velmi komplexní a obtížně oddělitelný od aktivity půdních mikroorganismů, která spolupodmiňuje oxidační stav a chemickou formu Se v půdě (Haudin et al., 2007). V půdním prostředí se vyskytuje Se ve čtyřech stabilních oxidačních stavech:  $Se^{VI}$ ,  $Se^{IV}$ ,  $Se^0$ ,  $Se^{II}$  (Natasha et al., 2018). Rozpustnost solí Se obecně klesá v pořadí selenan ( $SeO_4^{2-}$ ) > seleničitan ( $SeO_3^{2-}$ ) > selenid ( $Se^{2-}$ ). Z hodnot  $pK_a$  příslušných diprotických kyselin (Tabulka 1) vyplývá, že za běžných hodnot  $pH$  půdního roztoku ( $pH$  4–9) lze očekávat především výskyt  $SeO_4^{2-}$ ,  $HSeO_3^-$ ,  $SeO_3^{2-}$ ,  $H_2Se$  a  $HSe^-$  (Séby et al., 2001).

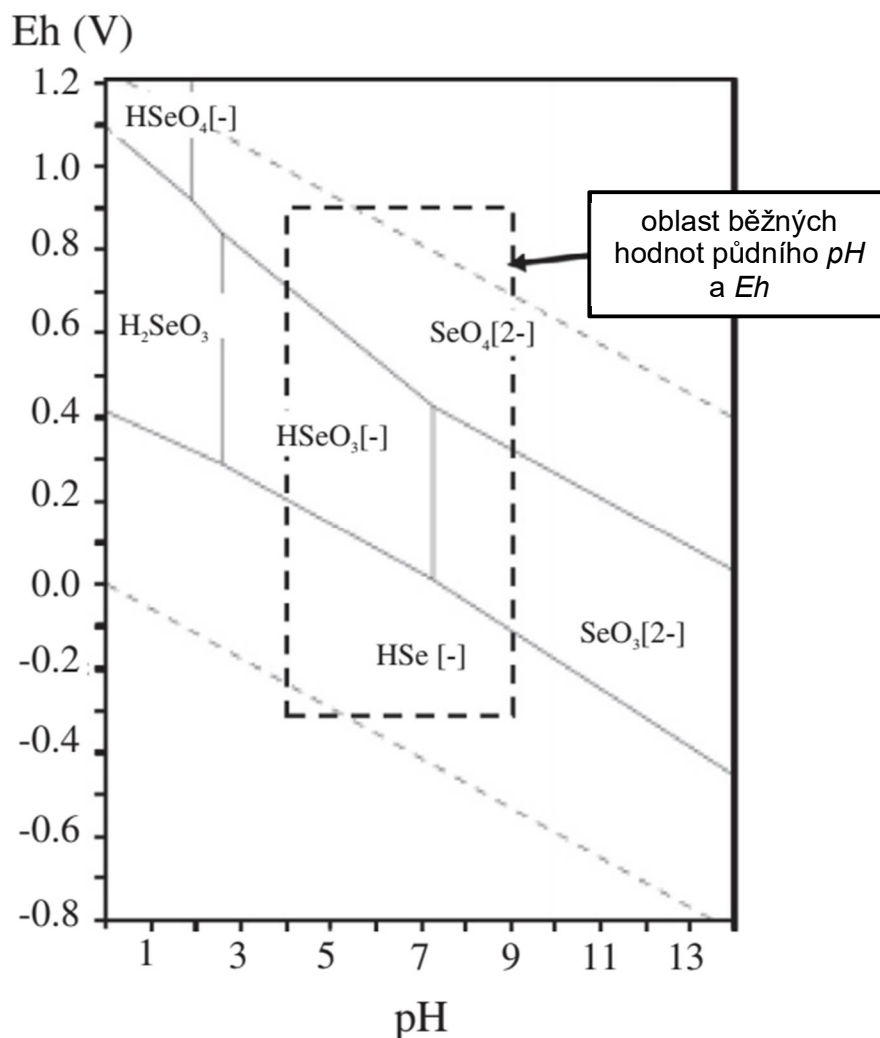
**Tabulka 1.** Disociační konstanty kyselin při 25 °C

kyselina	vzorec	$pK_{a1}$ <sup>a)</sup>	$pK_{a2}$ <sup>a)</sup>
selenovodíková	$H_2Se$	3,8	14
seleničitá	$H_2SeO_3$	2,7	8,5
selenová	$H_2SeO_4$	-2,0	1,8

<sup>a)</sup>Převzato z Séby et al. (2001)

Kromě  $pH$  prostředí je speciace půdního  $Se_{anorg}$  velmi senzitivní k hodnotě redoxního potenciálu  $E_H$ , resp. ke střídání oxických a anoxických podmínek v čase (Jayaweera a Biggar, 1996; Fan et al., 2018). Za anoxických podmínek mohou být stabilní nerozpustné fáze elementárního  $Se^0$ , který se vyskytuje v několika alotropických modifikacích (Chen et al., 2006), či selenidů kovů (Fan et al., 2018). Prostorová variabilita  $E_H$  na úrovni půdních mikroporézních agregátů rovněž přispívá k variabilitě specií Se v půdě (Kausch et al., 2012). Předpovědi speciace  $Se_{anorg}$  v přírodních systémech založené výlučně na  $pH$  a  $E_H$  parametrech, např. pomocí  $E_H - pH$  diagramů (Obrázek 2), nejsou spolehlivé. Bruggeman et al. (2007) zjistili neočekávanou stabilitu oxoaniontů Se,

ačkoliv dle termodynamických rovnováh měl v systému převládat  $\text{Se}^0$ . Příčinou nesouladu mezi takovými odhady a skutečnou speciací Se je vliv mikrobiální aktivity a také odlišná kinetika půdních procesů a transformací pro různé chemické specie Se (Sharma et al., 2014).



**Obrázek 2.** Eh - pH diagram Se-O-H systému zkonstruovaný za podmínek: aktivita  $10^{-10}$  mol  $\text{l}^{-1}$  Se, iontová síla  $I = 0$  při  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a  $10^5$  Pa; převzato z Nakamaru a Altansuvd (2014).

### 2.3.2 Experimentální frakcionace a speciace Se

Pojem speciace (speciační analýza, chemická speciace) označuje postup, který má za cíl rozlišení a stanovení jednotlivých forem prvku ve studovaném vzorku na úrovni chemických individuů (Koplík et al., 1997). Nejrozšířenější, dnes již rutinně používanou, technikou pro speciaci Se v biologických a environmentálních vzorcích je HPLC-ICPMS, kombinující různé módy chromatografické separace s citlivou hmotnostní detekcí  $\text{Se}^+$  iontů vznikajících v indukčně vázaném argonovém (Ar) plazmatu (Polatajko et al., 2006). Výsadní postavení HPLC-ICPMS přispělo k poněkud nešťastnému vnímání speciace Se v půdě jako výsledek speciační analýzy provedené v půdních extraktech. V těchto

vzorcích je zpravidla detekována přítomnost  $\text{SeO}_3^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$ , často však převažují různé, zejména neidentifikované specie  $\text{Se}_{\text{org}}$  (Séby et al., 1997; Stroud et al., 2012; Tolu et al., 2014a; Supriatin et al., 2015). Kvalitativní analýza  $\text{Se}_{\text{org}}$  technikami HPLC-ICPMS je omezena na několik málo komerčně dostupných či laboratorně připravených standardů nízkomolekulárních sloučenin (Uden et al., 2004; Pedrero a Madrid, 2009). Základní strukturální jednotkou  $\text{Se}_{\text{org}}$  v půdě jsou selenoaminokyseliny (SAK), které jsou ve formě peptidů obsaženy také ve frakci humusových látek (Kang et al., 1991; Gustafsson a Johnsson, 1994). Důkazy o úspěšném stanovení volných SAK v půdě téměř neexistují. Výjimkou je selenomethionin (SeMet) zaznamenaný Abrams et al. (1990) technikou GC-MS. Přítomnost rozpuštěného  $\text{Se}_{\text{org}}$  v půdních extraktech lze odvodit z existence půdních mikroorganismů (Gustafsson a Johnsson, 1994) a rozkládající se organické hmoty živočišného a rostlinného původu (Kang et al., 1991; Qin et al., 2017). Málo prozkoumanou formou  $\text{Se}_{\text{org}}$  jsou volatilní alkylselenidy, např. dimethylselenid (DMSe) a dimethyldiselenid (DMDSe). Tvorba, stabilita a zdržení DMSe v půdě závisí na formě přítomného Se, půdních charakteristikách (*pH*, vlhkost, teplota), dostupnosti vhodného zdroje organického uhlíku ( $\text{C}_{\text{org}}$ ) a na aktivitě mikroorganismů (Zhang a Frankenberger, 1999; Schilling et al., 2013; Sun et al., 2016). Alkylselenidy se mohou částečně rozpouštět v půdním roztoku, podléhají reverzibilní demethylaci/methylaci nebo se mohou ve formě kationtu trimethylselenonia ( $\text{TMSe}^+$ ) adsorbovat v půdě (Zhang a Frankenberger, 2000). V půdním roztoku může být rozpuštěna kyselina methylseleničitá, která byla navržena jako významný meziprodukt mikrobiální methylace Se a oxidace některých SAK (Tolu et al., 2011).

Interpretace pojmu speciace se často neoprávněně zaměřuje s tzv. frakcionací prvku v půdě. Frakcionace Se informuje o distribuci Se mezi jednotlivé biogeochemické půdní fáze, charakterizuje kvalitu vazeb Se a s ní spojenou mobilitu a biodostupnost Se v půdním prostředí (Sharmasarkar a Vance, 1995). Základním nástrojem frakcionace Se se staly metody postupné extrakce (MPE), které podle definovaného protokolu aplikují činidla s rostoucím extrakčním účinkem či odlišným mechanismem rozpouštění. Mezi hlavní nedostatky MPE patří: i) příprava vzorku může indukovat nežádoucí změny ve speciaci Se; ii) omezená selektivita činidel pro extrakci prvku z definované půdní fáze; iii) výtěžnost extrakce nedosahuje 100 %; iv) riziko redistribuce extrahovaného prvku mezi další půdní fáze; v) závislost výtěžku na experimentálních podmínkách extrakce (Favorito et al., 2017).

Nedostatky MPE spojené s nejistotou asociace Se s konkrétními fázemi přítomnými v půdě a neznalostí skutečné chemické speciace Se v pevné fázi překonávají techniky rentgenové absorpční spektrometrie (XAS). Aplikace XAS poskytlá přímý důkaz o přítomnosti elementárního  $\text{Se}^0$  v půdě (Pickering et al., 1995; Fellowes et al., 2013).

Oram et al. (2011) takto stanovili ve rhizosféře převládající oxidační stavy  $\text{Se}^0$  a  $\text{Se}^{-II}$ . Velmi užitečnou XAS technikou je EXAFS (rentgenová spektrometrie studující jemnou strukturu na krátkovlnné straně absorpční hrany), která zprostředkuje informaci o koordinačním čísle a vazebné vzdálenosti mezi sousedními atomy. Spektra EXAFS pomohla objasnit detailní mechanismus adsorpce oxoaniontů Se na povrch půdních minerálů (Peak et al., 2006) a zpřístupnila studium precipitace a redoxních změn specií Se na fázovém rozhraní roztok – minerální povrch (Myneni et al., 1997). Nevýhodou XAS technik je nižší citlivost, která limituje použití při kvantitativní analýze. Praktická využitelnost pro účely speciace vyžaduje minimální obsah Se v půdě  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (Pickering et al., 1995). Předešlé studie poukázaly na soulad (Qin et al., 2017) i na nesrovnalosti (Favorito et al., 2017) mezi výsledky MPE a XAS speciace v tuhé fázi. Pro výzkum Se v půdě se osvědčila kombinace MPE, XAS a technik chemické speciace v půdním extraktu. Následující kapitoly 2.3.2.1 až 2.3.2.5 se primárně věnují frakcionaci Se v půdě a odkazují na řadu prací aplikujících zmíněné kombinované přístupy.

### 2.3.2.1 Vodorozpustný podíl Se

Vodorozpustná frakce selenu ( $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) reprezentuje nejsnáze rozpustné formy Se v půdě. Přestože podíl  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  vykazuje vysoký potenciál mobility a dostupnosti v půdě (de León et al., 2003) a s biodostupností Se významně koreluje (Dhillon et al., 2007), jeho kvantifikace nemusí poskytnout nejlepší predikci příjmu Se rostlinou (Zhao et al., 2005) ani nevyhoví účelům monitoringu statutu Se a jeho změn v půdách, zvláště kyselých s tendencí tvorby redukovaných forem Se (Keskinen et al., 2009). Chemické speciace ve frakci  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  nejčastěji dominují  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_3^{2-}$  (Séby et al., 1997; Martens a Suarez, 1997; de León et al., 2003). Ve vodných výluzích byl ojediněle prokázán také minoritní výskyt dalších Se specií, např. kyseliny methylseleničité (Tolu et al., 2011). Značný podíl v  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  mohou zaujímat neidentifikované specie  $\text{Se}_{\text{org}}$  (Yamada a Hattori, 1989; Ochsenkühn-Petropoulou et al., 2003; Tolu et al., 2011; 2014a). Podle Supriatin et al. (2015) extrakce s  $\text{H}_2\text{O}$  za horka rozpouští Se asociovaný s labilní půdní organickou hmotou (POH). Kvantitativní chemická speciace Se ve vodných výluzích získaných při 20 a 55 °C však neprokázala žádné významné rozdíly (Ochsenkühn-Petropoulou et al., 2003). Speciace  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  a jeho zastoupení  $\text{Se}_{\text{tot}}$  zřejmě závisí na převládajících fyzikálně-chemických a biologických vlastnostech půdy, i proto podíl  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  nabývá hodnot z širokého intervalu 1–37 % (de León et al., 2003, Tolu et al., 2011).

### 2.3.2.2 Nespecificky adsorbovaný Se

Nespecificky adsorbovaný selen ( $\text{Se}_{\text{nesp.ads}}$ ) představuje frakci Se, která interaguje s půdními částicemi elektrostatickým reverzibilním mechanismem. Podstatou interakce je



tvorba tzv. vnějších komplexů mezi povrchovými skupinami půdních částic nesoucích kladný náboj a opačně nabitými oxoanionty Se (Fernández-Martínez a Charlet, 2009), typicky  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Peak a Sparks, 2002; Elzinga et al., 2009). Pro extrakci  $\text{Se}_{\text{nesp.ads}}$  se nejvíce uplatňují slabé roztoky neutrálních solí, nejčastěji chloridů (Dhillon a Dhillon, 1999; Wright et al., 2003). Množství Se extrahovaná s 250 mmol  $\text{l}^{-1}$  KCl (Zhao et al., 2005) nebo 1000 mmol  $\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Keskinen et al., 2010) silně korelovala s dostupným podílem Se v půdě a příjmem Se rostlinou. Weng et al. (2011) však takové vztahy při použití 10 mmol  $\text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  nenalezli. Iontová síla a složení extrakčního činidla determinují výtěžnost extrakce ovlivněním disperze a flokulace půdních částic (Hass a Fine, 2010). Část autorů  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  a  $\text{Se}_{\text{nesp.ads}}$  nerozlišuje a uvádí pro oba podíly jednotné označení rozpustný podíl Se ( $\text{Se}_{\text{rozp}}$ ) (Keskinen et al., 2009; Wang et al., 2012). Racionalitu tohoto sjednocení podpořili Wang et al. (2019a), když poukázali na velmi podobné extrakční účinnosti a distribuce specií  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$  a  $\text{Se}^{-2}$  ve vodném výluhu a v 250 mmol  $\text{l}^{-1}$  KCl. Jsou však známy i relace  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}} \gg \text{Se}_{\text{KCl}}$  (Supriatin et al., 2015). Nové studie postupně odhalují význam specií  $\text{Se}_{\text{org}}$  pro dostupnost Se rostlinám, které se ve velké míře uvolňují právě do podílů  $\text{Se}_{\text{H}_2\text{O}}$  a  $\text{Se}_{\text{nesp.ads}}$  (Weng et al., 2011; Supriatin et al., 2015; Wang et al., 2019b). Obecně platí, že podíl  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  představuje největší riziko ztráty Se z půdy vyplavením (Sharmasarkar a Vance, 1995).

### 2.3.2.3 Specificky adsorbovaný Se

Specificky adsorbovaný selen ( $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$ ) se rovněž podílí na biodostupné půdní zásobě Se (Xing et al., 2015; Ali et al., 2017). Hlavním vazebným mechanismem  $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$  je tvorba tzv. vnitřních komplexů, kdy dochází ke vzniku koordinačně kovalentní vazby mezi oxoaniontem Se a reaktivním místem na povrchu půdních minerálů, zejm. (hydr)oxidů železa (Fe), manganu (Mn) a hliníku (Al) (Fernández-Martínez a Charlet, 2009) a jílových minerálů (Peak et al., 2006). Imobilizace tímto mechanismem je typická pro  $\text{SeO}_3^{2-}$  (Elzinga et al., 2009),  $\text{SeO}_4^{2-}$  se adsorbuje jako vnitřní komplex v závislosti na *pH* a iontové síle (Peak a Sparks, 2002). Pro vytěsnění  $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$  z povrchu minerálů se využívá mechanismu ligandové výměny, nejčastěji s 100–1000 mmol  $\text{l}^{-1}$  fosforečnanem ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Dhillon a Dhillon, 1999; de León et al., 2003; Keskinen et al., 2009). Extrakce půdy s  $\text{PO}_4^{3-}$  není selektivní pro  $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$ , zvláště pokud této extrakci nepředchází odstranění  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  (Hagarová et al., 2005). Ve výluhu  $\text{PO}_4^{3-}$  byly stanoveny  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  i  $\text{Se}_{\text{org}}$  (Sharmasarkar a Vance, 1995; Martens a Suarez, 1997; de León et al., 2003; Tolu et al., 2011; Stroud et al., 2012; Wang et al., 2012;), přičemž původ  $\text{Se}_{\text{org}}$  se předpokládá z rostlinných proteinů v půdě (de León et al., 2003). Koncentrace a *pH* fosforečnanového činidla významně ovlivňují schopnost desorbovat  $\text{SeO}_3^{2-}$  při ligandové výměně, a tedy i výtěžnost  $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$  (Keskinen et al., 2009). Jednostupňová extrakce s  $\text{PO}_4^{3-}$  je základním

nástrojem hodnocení dostupnosti Se v půdě, jejíž výtěžek významně koreluje se skutečně přijatým množstvím Se rostlinami (Lee et al., 2011; Peng et al., 2020). K uvolnění  $Se_{\text{spec.ads}}$  lze použít další, méně obvyklá činidla v roztoku, např.  $NH_4F$  či  $NaOH$  (Keskinen et al., 2009), zředěnou  $HCl$  (Wang a Chen, 2003),  $NH_2OH-HCl$  (Hagarová et al., 2005), oxalátový pufr (Favorito et al., 2017). Působení těchto činidel se liší mechanismem (ligandové nebo redukční rozpouštění), a tím také relativně specificky cílí na různé skupiny (hydr)oxidů kovů v půdě, se kterými je Se asociován (Zhang a Moore, 1996; Hass a Fine, 2010). Vyluhování půdy okyselenými roztoky lze zvýšit účinnost extrakce o Se vázaný v karbonátech (Hagarová et al., 2005). Selen může být adsorbován na povrchu kalcitu ( $CaCO_3$ ) nebo může být součástí jeho krystalové mřížky následkem substituce  $SeO_4^{2-}$  (Reeder et al., 1994) či  $SeO_3^{2-}$  (Aurelio et al., 2010) za  $CO_3^{2-}$ .

#### 2.3.2.4 Organicky vázaný Se

Z hlediska frakcionace v půdě je  $Se_{\text{org}}$  nejvíce heterogenním a nejobtížněji definovatelným podílem  $Se_{\text{tot}}$ , a to i z hlediska biodostupnosti. Tyto potíže vyplývají z neznalosti chemické speciace (Séby et al., 1997; Qin et al., 2012) a strukturní povahy  $Se_{\text{org}}$ . V půdě se vyskytuje  $Se_{\text{org}}$  ve formě malých molekul (< 1 nm) i částic koloidních rozměrů (Weng et al., 2011; Qin et al., 2012). Studium  $Se_{\text{org}}$  komplikují organominerální asociace (Tolu et al., 2014a) a těsná souvislost mezi labilní POH a činností půdních mikroorganismů (Février et al., 2007). Selektivní extrakce  $Se_{\text{org}}$  není možná, neboť POH se částečně rozpouští ve všech činidlech (Wright et al., 2003). Před extrakcí  $Se_{\text{org}}$  je nezbytné co nejúčinněji odstranit anorganický  $Se_{\text{spec.ads}}$  (Keskinen et al., 2009), ovšem za cenu ztráty části  $Se_{\text{org}}$  ve frakcích  $Se_{\text{rozp}}$  a  $Se_{\text{spec.ads}}$ . Alkalická hydrolyza POH s  $100 \text{ mmol l}^{-1} NaOH$  je nejrozšířenější metodou extrakce  $Se_{\text{org}}$  z půdy (Kang et al., 1991; Wright et al., 2003; Coppin et al., 2006). Podíl  $Se_{\text{org}}$  v alkalických extraktech může být dále frakcionován na Se vázaný s fulvokyselinami a humínovými kyselinami (Abrams et al., 1990; Coppin et al., 2006; Qin et al., 2012). Selen vázaný ve fulvokyselinách je potenciálním zdrojem biodostupného Se (Qin et al., 2012). Mezi méně tradiční činidla pro extrakci  $Se_{\text{org}}$  patří např. roztok  $Na_4P_2O_7$  (Abrams et al., 1990),  $K_2S_2O_8$  (Xing et al., 2015), hydroxidu tetramethylamonia (de León et al., 2003),  $KClO_3$  v  $HCl$  (Wang a Chen, 2003),  $NaClO$  (Zhang a Moore, 1996). Wright et al. (2003) zjistili, že ve zředěných roztocích  $ClO^-$  a  $S_2O_8^{2-}$  se rozpouští také  $Se^0$  a selenidy kovů, a tak použití oxidačních činidel naráží na problém se selektivitou extrakce. Ne vždy speciaci Se v alkalických extraktech dominuje  $Se_{\text{org}}$ . Tolu et al. (2011) stanovili majoritní zastoupení  $SeO_3^{2-}$ , což interpretovali významnou vazbou mezi  $Se_{\text{anorg}}$  a složkami POH.

### 2.3.2.5 Reziduální Se

Reziduální selen ( $\text{Se}_{\text{reziduální}}$ ) zahrnuje nerozpustné formy Se, které jsou součástí pevné matrice půdy a nejsou dostupné rostlinám (Zawislanski a Zavarin, 1996). Zpravidla se do podílu  $\text{Se}_{\text{reziduální}}$  řadí  $\text{Se}^0$ , selenidy kovů ( $\text{Se}^{2-}$ ), látky na bázi fosilního uhlíku, alifatické biopolymery, humín a velmi stabilní organominerální asociace (Tolu et al., 2014a; Di Tullo et al., 2016). Vhodným činidlem pro rozpouštění  $\text{Se}^0$  je  $\text{CS}_2$  (Chen et al., 2006), který v selektivě vyniká nad  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Wright et al., 2003). Celkem bylo popsáno na 50 různých selenidových minerálů, v půdách se  $\text{Se}^{2-}$  nejčastěji váže s Cu, Fe, Pb, Ag, Hg (Wadgaonkar et al., 2018). Podíl  $\text{Se}_{\text{reziduální}}$  může být kvantifikován jako reziduální frakce Se v posledním kroku MPE, nejčastěji působením koncentrovaných minerálních kyselin s oxidačními účinky (Wang et al., 2012; Favorito et al., 2017). Pro uvolnění Se vázaného v krystalové mřížce silikátových minerálů je nezbytné do směsi kyselin přidat HF (Sharmasarkar a Vance, 1995; Wang a Chen, 2003).

### 2.3.3 Redukční a oxidační přeměny Se

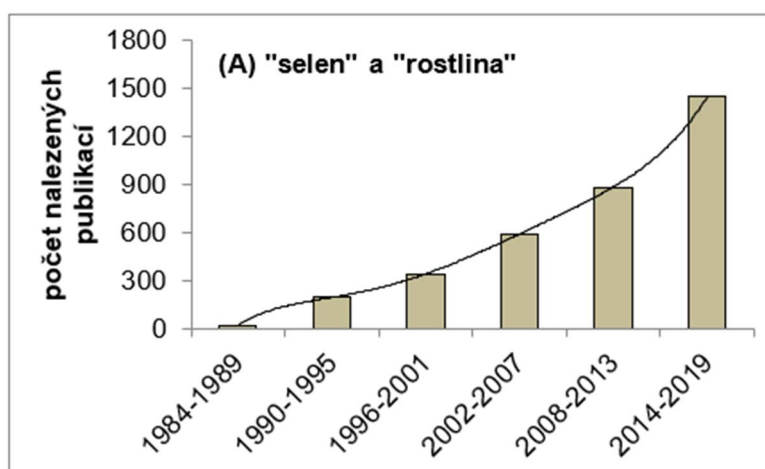
Enzymatický aparát půdních mikroorganismů umožňuje řadu transformací specií Se, zejm. redukci, oxidaci, methylaci a demethylaci (Ullah et al., 2019). Redukce oxoaniontů Se a začlenění Se ve formě  $\text{Se}^{-II}$  do aminokyselin je rozšířenou metabolickou schopností mikroorganismů v rámci asimilační redukce a představuje hlavní cestu přeměny  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$  v půdě (Wadgaonkar et al., 2018). Na redukci oxoaniontů Se se mohou podílet také půdní bakterie při disimilační redukci, při které  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_3^{2-}$  slouží jako konečné akceptory elektronů pocházejících z organických substrátů podléhajících oxidaci. Konečným produktem disimilační redukce je nejčastěji  $\text{Se}^0$  koloidní povahy či ve formě nanočástic, které se mohou tvořit intra- i extracelulárně (Eswayah et al., 2016). Kenward et al. (2006) pozorovali redukci  $\text{SeO}_4^{2-} \rightarrow \text{Se}^0$  odehrávající se na povrchu buněk bakterií i při absenci externích donorů elektronů. Mikrobiální oxidace redukovaných forem  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  na  $\text{SeO}_3^{2-}$ , případně na  $\text{SeO}_4^{2-}$  za oxických podmínek v půdě, byla rovněž pozorována, ale zdaleka nedosahuje významu bioredukce kvůli výrazně nižší reakční rychlosti (Lenz a Lens, 2009). Četné druhy půdních bakterií a mikroskopických hub jsou zodpovědné za produkci volatilních alkylselenidů. Biomethylace je tedy alternativní transformací  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$ , jejíž součástí je redukce oxoaniontů na  $\text{Se}^{-II}$  (Peitzsch et al., 2010; Winkel et al., 2015). Opačný proces, mikrobiální demethylace alkylselenidů, je v půdě pravděpodobně marginálního významu (Eswayah et al., 2016).

Za výlučně abiotický proces se považuje redukce oxoaniontů Se katalyzovaná povrchem půdních minerálů, např. (hydr)oxidů Fe (Myneni et al., 1997) či Mn (Blaylock a James, 1994). Separace abiotických a biotických faktorů ovlivňujících oxidační stav Se v půdě je obtížná, neboť hodnoty parametrů  $pH$  a  $E_H$  často přímo souvisí s mikrobiální

činností. V tomto smyslu je velmi specifická půdní rhizosféra s výskytem kořenových exudátů, které podporují mikrobiální aktivitu, snižují  $pH$  a  $E_H$  v rhizosféře (Antoniadis et al., 2017) a také ovlivňují stabilitu půdních minerálních fází (Blaylock a James, 1994). Z hlediska zpřístupnění Se rostlinám je významnou transformací oxidace redukovaných forem Se až na  $SeO_4^{2-}$  v rhizosféře, jejíž mechanismus zatím nebyl jednoznačně objasněn, může zahrnovat mikrobiální i abiotický příspěvek (Oram et al., 2011). Větší biodostupnost Se v rhizosféře v porovnání s nerhizosférní půdou potvrdili Chen et al. (2010). Munier-Lamy et al. (2007) naopak považují rhizosféru za místo intenzivní imobilizace  $SeO_4^{2-}$ , jejíž rozsah byl závislý na druhu pěstované rostliny. Nepochybně platí, že biodostupnost Se souvisí s množstvím a kvalitou kořenových exudátů (Zhang et al., 2019a). Mineralizace rozpuštěné půdní organické hmoty ( $POH_{rozp}$ ), kterou ovlivňuje i kořenová exudace (Wang et al., 2020a), pravděpodobně představuje významný zdroj Se pro rostliny (Supriatin et al., 2016)

## 2.4 SELEN A ROSTLINY

Rostoucí publikační aktivitu v souvislosti se selenem a rostlinami zřetelně dokládá trend na Obrázku 3.



**Obrázek 3.** Počet vědeckých publikací indexovaných v databázi Web of Science mezi léty 1984-2019 nalezených dle uvedených klíčových hesel.

### 2.4.1 Význam Se pro vyšší rostliny

Pro absenci esenciálních selenoproteinů není Se klasifikován jako esenciální prvek pro vyšší rostliny (Terry et al., 2000), ale bez výhrad splňuje atributy pro zařazení mezi prvky užitečné (Pilon-Smiths et al., 2009). Mnozí autoři zdokumentovali prospěšný vliv malého množství Se na fyziologické procesy rostlin při abiotickém stresu, který je doprovázen tvorbou reaktivních forem kyslíku na buněčné úrovni. Kaur et al. (2014) uvádí přehled publikací věnovaných funkcím Se při působení stresu z expozice těžkým kovům,

ultrafialovému záření, vysokým teplotám či chladu, při stresu ze sucha a zasolení. V literatuře jsou zmínky o ochranné funkci Se proti patogenům, hmyzu a herbivorům (Gupta a Gupta, 2017), je však účinná až při vyšším obsahu Se ve fytomase. Z hlediska hospodářského se pozitivní působení Se může promítnout do růstu plodin, výnosu a kvality produkce (Xue et al., 2001; Turakainen et al., 2004; Hartikainen, 2005; Lyons et al., 2009; Ebrahimi et al., 2015; Ekanayake et al., 2015; Liu et al., 2017; Ulhassan et al., 2019). Expozice rostlin vysokým koncentracím biodostupného Se negativně ovlivňuje fyziologii a vývoj rostlin a projevuje se chlorózami, retardací růstu, poklesem výnosu a kvality produkce (Sharma et al., 2010; Guerrero et al., 2014; Schiavon a Pilon-Smits, 2017; Ulhassan et al., 2019). Toxické působení Se indukují dva nezávislé mechanismy: i) oxidační stres skrze produkci reaktivních forem kyslíku; ii) nežádoucí změny v primární struktuře proteinů, kdy dochází k nespecifickému začlenění SeCys a SeMet místo sirmých analogů cysteinu a methioninu (Van Hoewyk, 2013). U některých druhů rostlin se vyvinuly obranné mechanismy proti systémové toxicitě Se, např. redukce oxoaniontů Se na nerozpustný  $\text{Se}^0$  nebo biomethylace SeCys a SeMet vedoucí k těkavým či neproteinogenním speciím Se (Sors et al., 2005). Akumulace methylovaných specií Se ( $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  Se v sušině) je fyziologickou adaptací tzv. hyperakumulátorů Se na seleniferní prostředí (Schiavon a Pilon-Smits, 2017). Popsáno bylo na 45 hyperakumulujících druhů ze šesti rostlinných čeledí, zpravidla se jedná o vytrvalé nekulturní byliny. Skupina tzv. sekundárních akumulátorů Se se vyznačuje zvýšenou osvojovací schopností a bez projevu toxicity mohou akumulovat i  $100\text{--}1000 \text{ mg kg}^{-1}$  Se. Z kulturních plodin se do této kategorie řadí někteří zástupci z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), např. brukev sítinovitá (*Brassica juncea*), řepka olejná (*Brassica napus*), brokolice (*Brassica oleracea convar. italica*) (Gupta a Gupta, 2017). Běžné obsahy Se v ostatních plodinách, tj. neakumulátorech, pěstovaných mimo seleniferní oblasti se pohybují v rozmezí  $0,01\text{--}1 \text{ mg kg}^{-1}$  (Marschner, 1995). Redukce výnosu se může projevit u některých plodin již při obsahu Se nižším než  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  v sušině fytomasy (White et al., 2004).

#### **2.4.2 Příjem a metabolismus Se**

Příjem, translokace a distribuce Se v rostlině jsou determinovány druhem rostliny a fází jejího vývoje, koncentrací a specií dostupného Se, fyziologickými podmínkami, přítomností dalších sloučenin, aktivitou membránových transportérů a translokačním mechanismem (Gupta a Gupta, 2017). Rostliny přijímají Se z půdního roztoku primárně ve formě oxoaniontů.

Transport  $\text{SeO}_4^{2-}$ , nejvíce biodostupné specie, přes plazmatickou membránu kořenových epidermálních buněk se uskutečňuje proti elektrochemickému gradientu spolu

se symportem protonů (Sors et al., 2005). Příjem  $\text{SeO}_4^{2-}$  je zabezpečen síranovým transportním systémem z důvodu absence vlastního transportního aparátu pro Se a výrazné chemické a fyzikální podobnosti mezi  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  (Terry et al., 2000). Také další pohyb a asimilace  $\text{SeO}_4^{2-}$  v rostlině sdílí metabolickou dráhu se sírany (Schiavon a Pilon-Smits, 2017). Skutečnost, že membránové transportéry a intracelulární enzymy nemají dostatečnou substrátovou specifitu pro rozlišení  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ , se odráží ve fyziologické kompetici mezi Se a S (White et al., 2004). Snížení příjmu Se vlivem kompetice mezi  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  při vstupu do kořenových buněk bylo jednoznačně popsáno v modelových hydroponických experimentech s různými rostlinami (Zayed et al., 1998; Hopper a Parker, 1999; Huang et al., 2007; Renkema et al., 2012). Tento jev je nežádoucí v oblastech půd chudých na Se, ale má ochranný účinek pro plodiny rostoucí v seleniferních oblastech s výskytem vysokých koncentrací mobilního  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Lee et al., 2011). Je známo, že statut rostliny z hlediska výživy sírou (S) řídí genovou expresi transportérů síranů *SULTR1;1* a *SULTR1;2*, tj. transportérů zúčastněných na příjmu  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) z rhizosféry (Takahashi et al., 2011; Schiavon a Pilon-Smits, 2017). Nízké intracelulární a extracelulární koncentrace  $\text{SO}_4^{2-}$  indukují expresi také dalších transportérů, konkrétně *SULTR4;1* a *SULTR4;2*, které jsou zodpovědné za transport  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) z vakuol do cytoplazmy (Parmar et al., 2007), a *SULTR2;1* s podílem na translokaci  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) xylemem (Shinmachi et al., 2010; Schiavon et al., 2015). Jednotlivé *SULTR* transportéry se liší v afinitě vůči dvojici  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Sors et al., 2005). Podmíněná indukce a různá úroveň aktivity *SULTR* jsou důležitým východiskem k interpretaci výsledků nových studií, ve kterých aplikace  $\text{SO}_4^{2-}$  nečekaně zvýšila translokaci (Liu et al., 2016) či akumulaci (Golob et al., 2016) Se v rostlinách. Ve shodě s výše uvedeným jsou výsledky Stroud et al. (2010a), jejichž regresní model predikce obsahu Se v zrna pšenice seté (*Triticum aestivum*) významně spoléhal na parametr kvantifikující dostupný podíl S v půdě. Po absorpci v kořenech je  $\text{SeO}_4^{2-}$  translokován xylemem v nezměněném stavu do listů, kde vstupuje do chloroplastů a je metabolizován (Terry et al., 2000). Aktivace  $\text{SeO}_4^{2-}$  enzymem ATP sulfurylázou je prvním a zároveň rychlost určujícím krokem asimilace  $\text{SeO}_4^{2-}$ , jejíž významnými meziprodukty jsou postupně adenosin fosfoselenát,  $\text{SeO}_3^{2-}$  a  $\text{Se}^{2-}$  (Schiavon a Pilon-Smits, 2017). Za účasti Cys syntázy vzniká z  $\text{Se}^{2-}$  proteinogenní SeCys (Sors et al., 2005), který zaujímá centrální pozici v metabolismu SAK (Gupta a Gupta, 2017).

Na rozdíl od  $\text{SeO}_4^{2-}$  jsou příjem a asimilace  $\text{SeO}_3^{2-}$  na molekulární úrovni málo prozkoumány. Příjem  $\text{SeO}_3^{2-}$  z půdního roztoku je rovněž považován za aktivní transportní proces (Li et al., 2008), ačkoliv podle starších publikací část kapacity příjmu  $\text{SeO}_3^{2-}$  na metabolické energii závislá není (Terry et al., 2000). Z kompetice mezi  $\text{SeO}_3^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  se usuzuje, že se na příjmu  $\text{SeO}_3^{2-}$  dominantně podílejí membránové transportéry

pro fosforečnany (Hopper a Parker, 1999; Liu et al., 2018). Translokace  $\text{SeO}_3^{2-}$  je omezená, většina zůstává v kořenech, kde se rychle metabolizuje na  $\text{Se}_{\text{org}}$  (de Souza et al., 1998; Li et al., 2008).

Rostliny jsou schopny přijímat také malé molekuly  $\text{Se}_{\text{org}}$ , pravděpodobně permeázami určenými pro transport aminokyselin (Schiavon a Pilon-Smits, 2017). Příjem a translokace SeMet byly prokázány v různých plodinách při hydroponické kultivaci (Abrams et al., 1990; Zayed et al., 1998; Kikkert a Berkelaar, 2013). Výhony rostlin vystavené SeMet vykazovaly vyšší obsahy Se v porovnání s  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  variantou (Kikkert a Berkelaar, 2013). Účinnost translokace Se měla však opačný trend  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 > \text{SeMet}$  (Zayed et al., 1998; Kikkert a Berkelaar, 2013).

Selen může vstupovat do rostlin také foliárně. Oxoanionty Se nejdříve pasivně difundují skrze hydrofilní póry kutikuly a v menší míře skrze stomata, následný vstup do buněk mezofylu je již aktivní proces využívající specifické transportéry (Yang et al., 2019). Redistribuce Se z listů do generativních orgánů závisí na specii Se aplikované v postřiku. Selen z foliární aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  je ve floemu podstatně mobilnější v porovnání s  $\text{SeO}_3^{2-}$  (Poggi et al., 2000; Boldrin et al., 2013). V souladu s tím se v polních podmínkách akumulovalo méně Se v zrnu různých plodin, pokud byl foliárně aplikován  $\text{SeO}_3^{2-}$  (Ducsay et al., 2016; Deng et al., 2017). Carey et al. (2012) při foliární selenizaci rýže seté (*Oryza sativa*) zjistili, že redistribuce Se floemem z aplikovaných SAK svou rychlostí výrazně převýšila varianty s oxoanionty Se.

Nehledě na způsob vstupu, adekvátní příjem Se rostlinami příznivě ovlivňuje metabolismus dusíkatých a uhlíkatých látek (Hajiboland a Sadeghzade, 2014; Lara et al., 2019). Platí i obráceně, že příjem makroživin může ovlivnit speciaci Se v plodinách (Duncan et al., 2017).

## 2.5 BIOFORTIFIKACE SELENEM

Biofortifikace selenem znamená implementaci strategií, jejichž cílem je zvýšení obsahu Se v jedlých částech rostlin, v produktech živočišného původu a houbách (Wu et al., 2015). Mezi biofortifikační metody se řadí suplementace krmiv hospodářských zvířat, aplikace selenizovaných hnojiv a šlechtění odrůd plodin s vyšší účinností osvojení Se (Lyons et al., 2005). Alternativním fortifikačním přístupem, který cílí výhradně na člověka bez přímé účasti agrárního potravního řetězce, je využití průmyslových biotechnologií produkujících selenizované potraviny, nápoje a doplňky výživy (Poniedzialek et al., 2017; Adadi et al., 2019). Haug et al. (2007) se zabývali přehlíženou problematikou efektivního využití celosvětově limitovaných zdrojů a kapacit výroby Se pro účely eliminace deficiencie Se v lidské populaci. Z jejich bilančních výpočtů vyplývá, že zdaleka nejvhodnější metodou je individuální konzumace produktů z procesní fortifikace v potravinářském

a farmaceutickém průmyslu. Na základě značných socioekonomických rozdílů, zvláště v globálním měřítku, může z konzumace těchto produktů profitovat jen úzký segment obyvatelstva (Lopes et al., 2017). Tímto typem nesystémovosti však netrpí agronomická biofortifikace (AB) zemědělských plodin. Biofortifikace plodin je environmentálně akceptovatelný způsob obohacení celého agrárního potravního řetězce selenem, včetně pokrytí nutričních požadavků hospodářských zvířat, a vyznačuje se biologickou bezpečností, spolehlivostí, dlouhodobou udržitelností a jednoduchostí celého procesu při vynaložení relativně nízkých nákladů (Lyons et al., 2003; Broadley et al., 2006; Alfthan et al., 2015; Mathers et al., 2017). Konzumace selenizovaných plodin a z nich odvozených potravin nevyžaduje změnu potravních zvyklostí obyvatel daného regionu, navíc je Se v těchto produktech zpravidla vázán ve formě  $Se_{org}$  (Hart et al., 2011; Poblaciones et al., 2014; Zhang et al., 2019b), který vykazuje vyšší biologickou dostupnost a účinnost v porovnání s  $Se_{anorg}$  (Thiry et al., 2012). Selenizace na úrovni rostlin navíc může příznivě ovlivnit výnos a kvalitu produkce, jak bylo zmíněno v kapitole 2.4.1. Avšak z hlediska managementu zásob Se Haug et al. (2007) považují biofortifikaci plodin za nejméně efektivní způsob boje proti deficienci Se.

### 2.5.1 Agronomická biofortifikace (AB)

Ačkoliv význam přímého lokálního toku Se systémem půda-plodina-člověk je v moderní společnosti s přístupem na světové trhy poněkud zeslaben, produkce zemědělských plodin s adekvátním obsahem Se zůstává prioritou v boji proti deficienci tohoto prvku (Johnson et al., 2010). Pěstování rostlin fortifikovaných Se adresuje tři příznačná témata: (i) plošné navýšení příjmu Se obyvatelstvem v daném regionu; (ii) navýšení příjmu Se hospodářskými zvířaty na úrovni zemědělského podniku; (iii) produkce tzv. funkčních potravin. Vhodným kandidátem pro AB na plošné úrovni jsou především obilniny. Zájem o AB dokumentují početné studie v polních podmínkách věnované selenizaci potravinářsky významných plodin, např. kukuřici seté (*Zea mays*) (Chilimba et al., 2012), pšenici seté (Stroud et al., 2010a), rýži seté (Lidon et al., 2018), lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) (Zhang et al., 2019b), sóji luštinaté (*Glycine max*) (Yang et al., 2003). Vhodnost pšenice (*Triticum* sp.), žita (*Secale* sp.) a ječmene (*Hordeum* sp.) k biofortifikaci z hlediska zastoupení specií Se potvrdili Stadlober et al. (2001). Jejich zmo, v závislosti na druhu, odrůdě a půdě, obsahovalo 62–86 % SeMet, 7–13 % selenocystinu ( $SeCys_2$ ) a jen 0–8 % netransformovaného  $SeO_4^{2-}$ . Metody AB se již několik dekad uplatňují při selenizaci pastvin (Rimmer et al., 1990) a nově se zkoumá jejich potenciál pro selenizaci listové zeleniny a ovoce (Puccinelli et al., 2017a). Biofortifikační programy byly testovány v mnoha zemích, nicméně direktivně a celoplošně se AB uplatňuje pouze ve Finsku a na dobrovolné bázi na Novém Zélandu (Haug et al., 2007). Důležitým předpokladem



úspěšné implementace AB na národní úrovni je analýza spotřebního koše obyvatelstva pro výběr vhodné plodiny k selenizaci (Pappa et al., 2006; Choi et al., 2009; Fairweather-Tait et al., 2011).

### 2.5.1.1 Aplikace Se do půdy

Aplikace minerálních solí Se do půdy je nejrozšířenější a nejvíce prostudovanou metodou AB, jejíž cílem je zvýšení biodostupného podílu Se v půdě (Hawkesford a Zhao, 2007; Alfthan et al., 2015). Od použití  $\text{SeO}_3^{2-}$  pro tyto účely se postupně upustilo, neboť vykazuje nižší účinnost translokace (kapitola 2.4.2) a vyšší míru imobilizace v půdě (kapitola 2.6) v porovnání s  $\text{SeO}_4^{2-}$ , což potvrdily výsledky nádobových (Boldrin et al., 2013; Kikkert et al., 2013; Ali et al., 2017) i polních pokusů (Galinha et al., 2015; Jiang et al., 2018; Silva et al., 2019) se stejnými dávkami Se ve formě  $\text{SeO}_3^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$ . Pro dosažení dostatečného obsahu Se v zrnu obilnin ( $> 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) v polních podmínkách se nejčastěji doporučuje dávka  $\text{SeO}_4^{2-}$  ekvivalentní s  $4\text{--}13 \text{ g ha}^{-1}$  Se (Lyons et al., 2003; Broadley et al., 2006; Hawkesford a Zhao, 2007; Ros et al., 2016). Z pokusů s odstupňovanou dávkou v širších mezích vyplývá, že obsah Se ve hlízách brambor (Turakainen et al., 2004), v zrnu pšenice (Broadley et al., 2010) či kukuřice (Chilimba et al., 2012) je lineární funkcí dávky  $\text{SeO}_4^{2-}$ , tudíž lze aplikační dávku Se snadno optimalizovat. Nevýhodou tohoto typu biofortifikace je nižší účinnost osvojení Se plodinami z přidaného  $\text{SeO}_4^{2-}$  do půdy (Stroud et al., 2010b; Tremblay et al., 2015; Ros et al., 2016), která často nepřevyšuje 10 % (Haug et al., 2007). Nepříznivý je také časově omezený účinek  $\text{SeO}_4^{2-}$ , jednorázová aplikace zajistí adekvátní obsah Se v plodinách nejčastěji pouze v prvním, výjimečně také ve druhém roce (Stroud et al., 2010b; Tremblay et al., 2015).

Jako vzorový příklad úspěšné AB na národní úrovni lze představit řešení alarmujícího deficitu Se ve Finsku, kde v 70. letech 20. století činil denní příjem Se pouze  $25 \mu\text{g}$  (Alfthan et al., 2015). Na základě vládního rozhodnutí začali finští producenti od roku 1984 do všech vícesložkových minerálních hnojiv určených k aplikaci k obilninám povinně přidávat  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  v množství  $16 \text{ mg Se kg}^{-1}$  sušiny hnojiva (Hartikainen, 2005). Tímto opatřením se významně zvýšil obsah Se ve všech zemědělských produktech podél celého produkčního řetězce; např. v zrnu pšenice jarní z původních  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  na  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Eurola et al., 1990), v hovězím mase se obsah Se zvýšil až  $18\times$  a v mléčných výrobcích až  $10\times$  (Eurola et al., 1991). Na základě pravidelného monitoringu změn obsahu Se v zemědělských plodinách, vodě, krmivech a potravinách rostinného i živočišného původu a v lidské krevní plazmě byl obsah  $\text{SeO}_4^{2-}$  v hnojivech v minulosti operativně regulován (Alfthan et al., 2015). Velmi důležité závěry, které potvrdily bezpečnost a udržitelnost finské praxe, publikovali Keskinen et al. (2011), kteří na stanovištích pravidelně hnojených

$\text{SeO}_4^{2-}$  po dobu 13 let zjistili jen mírnou, často statisticky nevýznamnou akumulaci Se v půdě, a to především v rostlinám méně či zcela nedostupné půdní zásobě. Zkušenosti z Finska však nelze volně převádět do podmínek středoevropských či jiných agroekosystémů, neboť půdní fyzikálně-chemické a klimatické faktory podmiňují základní půdní procesy a výnos plodin. Pro porozumění chování  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdách konkrétních lokalit jsou role sběru dat z agronomické praxe a víceletých polních pokusů nezastupitelné (Lyons et al., 2004; Broadley et al., 2006).

Další možnost vnosu Se do půdy představují hnojivé závlahy se zvýšenou koncentrací oxoaniontů Se (Bañuelos, 2002; Mora et al., 2015; Nawaz et al., 2017) nebo posklizňové zbytky či odpadní rostlinné materiály s vysokým obsahem Se (Ajwa et al., 1998; Bañuelos et al., 2015; Wang et al., 2018). Pozvolný rozklad rostlinné biomasy v půdě je příslibem déletrvajícího selenizačního účinku, význam těchto materiálů je však silně limitován lokální dostupností. K vývoji a následné aplikaci pomalu uvolňujících se forem  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  došlo také v oblasti granulovaných minerálních hnojiv (Gupta, 1995; Broadley et al., 2010; Tremblay et al., 2015).

### 2.5.1.2 Foliární aplikace Se

Při biofortifikaci různých plodin postřikem ve formě roztoku  $\text{SeO}_4^{2-}$  nebo  $\text{SeO}_3^{2-}$  na povrch porostu bylo zpravidla dosaženo vyšší účinnosti než při aplikaci těchto solí do půdy, jak vyplývá z přímých srovnávacích studií obou aplikačních metod (Galinha et al., 2015; Thavarajah et al., 2015; Ngigi et al., 2019). Pro zajištění optimálního obsahu Se ve sklizni je tedy zapotřebí nižší hektarová dávka Se. Vyšší účinnost foliární aplikace lze vysvětlit absencí nežádoucích fyzikálně-chemických a mikrobiálních mechanismů imobilizace exogenního Se v půdě či ztrát Se z dosahu kořenů (Kápolna et al., 2012).

Na rozdíl od aplikace Se do půdy nelze v literatuře dohledat jednoznačný konsenzus ohledně specíe Se doporučené k foliární aplikaci. Je-li hlavním kritériem volby akumulace Se v jedlých částech rostlin, významně vyšší obsahy Se byly dosaženy zpravidla s  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Kápolna et al., 2009; Deng et al., 2017; Zhang et al., 2019b). Z polních pokusů Galinha et al. (2013) vyplývá, že výsledek porovnání účinnosti foliárně aplikovaného  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_3^{2-}$  v téže fázi vývoje pšenice byl geneticky podmíněn pěstovanou odrůdou. Je-li kritériem volby účinnost žádoucí biotransformace  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$  ve výnosotvorném orgánu, pro některé plodiny byl zaznamenán vyšší obsah  $\text{Se}_{\text{org}}$  při aplikaci  $\text{SeO}_3^{2-}$  (Kápolna et al., 2012; Zhang et al., 2019b).

Zásadním faktorem je správné načasování postřiku vzhledem k vývojové fázi porostu. Zatímco u obilnin bylo nejvyšší účinnosti postřiku  $\text{SeO}_4^{2-}$  dosaženo při pozdější aplikaci, tj. ve fázi před naléváním zrna (Deng et al., 2017; Wang et al., 2020b), u hlíz brambor akumulace Se průběžně klesala spolu s pozdějším datem aplikace (Zhang et al.,

2019b). Při zmeškání optimálního termínu foliární aplikace může být účinnost biofortifikace nízká, a to z důvodu nedostatečného času pro redistribuci  $\text{Se}_{\text{org}}$  z listů floemem do zrna (Boldrin et al., 2013). Vývojová fáze v době postřiku dále ovlivňuje obsah netransformovaného  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  v rostlině (Deng et al., 2017; Zhang et al., 2019b). Mezi obsahem Se v jedlých částech rostlin a množstvím foliárně aplikovaného Se platí lineární vztah (Poggi et al., 2000; De Vita et al., 2017). Provedení postřiku vyžaduje technologickou kázeň, neboť přímý kontakt listů s roztokem o nepřiměřené koncentraci Se způsobuje nekrotické poškození (Kápolna et al., 2009).

Závislost účinnosti selenizace na klimatických podmínkách během a po foliární aplikaci a ekonomicky vynucené spojení aplikace Se s jiným pojezdem po poli jsou dalšími specifiky, které se musí zohlednit při plánování realizace této metody (Aspila, 2005). Foliární aplikace je méně efektivní metodou pro plodiny s menší měrnou plochou listů, resp. s menší pokrývností povrchu půdy. V oblastech častého výskytu stresu rostlin následkem sucha a tepla, který snižuje funkční plochu listů, doporučují Lyons et al. (2005) upřednostnit aplikaci Se do půdy.

Při biofortifikaci hlíznatých a bulevnatých okopanin a kořenové zeleniny je nezbytné uvážit rozsah redistribuce Se do podzemních orgánů (Kápolna et al., 2009, Zhang et al., 2019b). Účinnost akumulace Se v podzemních orgánech lze zvýšit přidavkem modifikátorů do roztoku  $\text{SeO}_4^{2-}$ , např. humusových látek (Poggi et al., 2000). V porovnání s aplikací samotného  $\text{SeO}_4^{2-}$ , koaplikace  $\text{SeO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$  (Golob et al., 2016) či  $\text{SeO}_4^{2-} +$  močovina (Ramkisson et al., 2019) zvýšila obsah Se v semenech pohanky tatarské (*Fagopyrum tataricum*), resp. v zrně pšenice.

### 2.5.1.3 Alternativní metody biofortifikace

Pro úplnost výčtu metod AB je nutno uvést selenizaci osiva, tj. máčení a obalování (Wang et al., 2020b). Ošetření osiva zůstává velmi málo prozkoumaným přístupem k selenizaci. Navzdory výsledkům nepočtených prací, např. Nawaz et al. (2017), které naznačily přínos máčení osiva v roztoku  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , se širší uplatnění těchto metod v praxi nepředpokládá.

Naopak, přidavek  $\text{SeO}_4^{2-}$  do živného roztoku při hydroponickém pěstování vhodných druhů listové zeleniny (Malorgio et al., 2009; Tomasi et al., 2015), aromatických bylin (Puccinelli et al., 2017b) a ovoce (Lee et al., 2007; Mimmo et al., 2017) nabízí významný aplikační potenciál pro produkci funkčních potravin. Hydroponické systémy vynikají v možnostech kontroly a optimalizace přísunu Se v čase a minimalizace ztrát Se (Puccinelli et al., 2017a). Ve výzkumu funkčních potravin se klade důraz na identifikaci nových sloučenin Se s prospěšnými biologickými účinky (Pyrzynska, 2009). V popředí zájmu jsou specie s vysokou chemopreventivní aktivitou, např. Se-alkylselenocysteiny, Se-alkenylselenocysteiny a jejich  $\gamma$ -glutamyl deriváty (Block et al.,

2001). V souvislosti s jejich výskytem jsou nejčastěji citováni zástupci čeledi amarylkovité (*Amaryllidaceae*) (Wróbel et al., 2004) a brukvovité (*Brassicaceae*) (Wiesner-Reinhold et al., 2017). Nejvyšších obsahů bioaktivních látek je dosahováno právě při hydroponických kultivacích. Ávila et al. (2014) stanovili obsah Se-methylselenocysteinu (SeMetCys) v mladých výhonech brokolice a květáku (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) vyšší než 100 mg kg<sup>-1</sup> Se v sušině.

Zatím zcela nevyužitý potenciál dřímá v metodách tzv. genetické biofortifikace. Ve své základní a celospolečensky přijatelné podobě se jedná o prostou selekci a šlechtění odrůd dané plodiny, které vykazují vyšší míru akumulace Se (Zhu et al., 2009; De Vita et al., 2017). Velký pokrok v oblasti biofortifikace Se slibuje genové inženýrství a produkce transgenních rostlin. Prvotní pozornost je soustředěna na geny kódující enzymy a transportéry metabolismu S, jejichž manipulace by snížila substrátovou kompetici mezi S a Se (a jejich intermediáty), např. zvýšením selektivity vůči Se. Zásah do genomu by mohl ovlivnit účinnost všech kritických dílčích procesů, tj. příjem a translokace  $\text{SeO}_4^{2-}$ , redukce  $\text{SeO}_4^{2-} \rightarrow \text{SeO}_3^{2-}$ , transformace  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$ , akumulace v jedlých částech rostlin (Hawkesford a Zhao, 2007; Malagoli et al., 2015).

## 2.5.2 Biofortifikace řepky olejně

Tato olejnina, poskytující na proteiny bohaté pokrutiny a extrahovaný šrot, tj. vedlejší produkty vznikající ve velkém měřítku při zpracování řepky na olej, je výhodným kandidátem na zařazení do biofortifikačního programu s výhledem na zkrmování šrotu a pokrutin. Toto tvrzení lze podložit následujícími úvahami: (i) řepka vykazuje značnou osvojovací schopnost pro Se (Bañuelos et al., 1998; Dhillon a Dhillon, 2009); (ii) téměř 100 % akumulovaného Se v semenech přechází do řepkového šrotu (Liu et al., 2017); (iii) vedlejší produkty ze zpracování řepky se používají jako příměsi do krmných dávek přežvýkavců (Thomke, 1981) i nepřežvýkavců (Clandinin a Robblee, 1981); a (iv) řepka produkuje glukosinoláty (Davik a Bakken, 1999), jejichž Se analogy mají vyšší bioaktivní účinky (Matich et al., 2012). Zájem o řepku dokumentuje řada prací zabývajících se různými aspekty její selenizace, např. modelováním predikce akumulace Se (Kikkert et al., 2013), vlivem koaplikace selenanů a síranů na příjem  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Renkema et al., 2012; Kikkert et al., 2013; Liu et al., 2016; 2017), translokací Se (Renkema et al., 2012; Ebrahimi et al., 2015; Liu et al., 2016), výnosem, fyziologickými parametry a kvalitou semen (Seppänen et al., 2010; Sharma et al., 2010; Ebrahimi et al., 2015; Liu et al., 2017), specií Se v semenech (Seppänen et al., 2010; Bañuelos et al., 2012), vlivem abiotických faktorů prostředí (Johnsson, 1991; Renkema et al., 2012) a volbou různých kultivarů řepky (Nezami a Bybordi, 2012). Speciační analýza technikou HPLC-ICPMS zjistila SeMet jako hlavní specii Se v enzymatických hydrolyzátech selenizovaných semen

řepky (Seppänen et al., 2010; Bañuelos et al., 2012; Balán et al., 2013). Spolehlivá identifikace a strukturní charakterizace neznámých specií Se vyžaduje spřažení chromatografické separace s tzv. měkkými ionizačními technikami v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (Ruszczynska et al., 2017).

## 2.6 OSUD EXOGENNÍHO SELENANU V PŮDĚ

Po aplikaci do půdy, nejčastěji ve formě  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , selenan rychle přechází pro svou vysokou rozpustnost v polárním prostředí (Séby et al., 2001) do půdního roztoku, čímž se stává součástí velmi mobilního a rostlinám pohotově dostupného podílu  $\text{Se}_{\text{rozp}}$ . Tímto zásahem zvenčí je narušena distribuční rovnováha Se mezi kapalnou a pevnou fází půdy, stejně tak rovnováha mezi  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  a ostatními frakcemi nativní zásoby Se v půdě ( $\text{Se}_{\text{spec.ads}}$ ,  $\text{Se}_{\text{org}}$ ,  $\text{Se}^0$ ,  $\text{Se}_{\text{rezidual}}$ ). Počínaje vstupem do půdy  $\text{SeO}_4^{2-}$  podléhá fyzikálně-chemickým a mikrobiálním procesům, které spějí k postupnému ustanovení nové dynamické rovnováhy (Di Tullo et al., 2016; Wang et al., 2017). Tyto procesy lze souhrnně označit jako stabilizaci Se v půdě a dochází při ní k poklesu mobility a biodostupnosti Se s časem vlivem komplexních imobilizačních mechanismů (Li et al., 2016). Tyto mechanismy zahrnují adsorpci, precipitaci, komplexaci, okluzi organickou hmotou, oxidačně-redukční změny a různé biotransformace (Wang et al., 2017). Rozlišení a stanovení příspěvku jednotlivých simultánně probíhajících mechanismů je obtížné. Z kinetického hlediska je možno celý proces popsat dvěma fázemi (Li et al., 2016).

V první fázi je osud  $\text{SeO}_4^{2-}$  (i  $\text{SeO}_3^{2-}$ ) v půdě řízen především rychlou abiotickou imobilizací (Vuori et al., 1994; Loffredo et al., 2011; Garcia-Sanchez et al., 2014). Rozsah imobilizace oxoaniontů Se během této fáze koreluje s fyzikálně-chemickými půdními parametry, které podmiňují adsorpční kapacitu půd, tj. hodnota  $pH$ , obsah jílnatých částic, (hydr)oxidů Al a Fe, obsah POH a specifický měrný povrch (Vuori et al., 1994; de Abreu et al., 2011; Fan a Zhao, 2018). Podle Vuori et al. (1994) trvá první fáze ve finských zemědělských půdách, převážně kyselých, dny až několik týdnů. Odhady se však velmi liší v závislosti na experimentálním designu, půdních charakteristikách a koncentracích  $\text{SeO}_4^{2-}$  uplatněných v jednotlivých studiích. Při imobilizaci založené na elektrostatické interakci mezi  $\text{SeO}_4^{2-}$  a půdními částicemi (hydr)oxidů Fe se v modelových experimentech s intenzivně promíchávanými půdními suspenzemi ustanovuje adsorpční rovnováha prakticky okamžitě, resp. do 5 minut (Duc et al., 2003; Jang et al., 2015). V reálných systémech v polních podmínkách se uplatňují kinetika rozpouštění granule hnojiva a difúze (Basu et al., 2010), které limitují kontakt  $\text{SeO}_4^{2-}$  s půdními částicemi. V půdách alkalických může být význam rychlé počáteční abiotické imobilizace  $\text{SeO}_4^{2-}$  výrazně menší (Wang et al., 2017) nebo zcela zanedbatelný (Fio et al., 1991). Hlavním zdrojem kvantitativních dat o retenci exogenního  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdě jsou vsádkové sorpční

experimenty. Většina publikovaných hodnot distribučního koeficientu  $K_d$  (definovaného vztahem R1), řádově  $10^{-1}$  až  $10^1 \text{ L kg}^{-1}$ , potvrzuje slabou adsorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  v evropských půdách (Vuori et al., 1989; Øgaard et al., 2006; Loffredo et al., 2011; Söderlund et al., 2016; Smažíková et al., 2019). Půdy tropických klimatických oblastí s významnou aniontovou výměnnou kapacitou dosahují hodnot  $K_d$  v rozmezí  $10^0$  až  $10^2 \text{ L kg}^{-1}$  (Gabos et al., 2014; Lessa et al., 2016).

$$K_d = Q_{\text{eq}} / C_{\text{eq}} \quad (\text{R1})$$

kde  $Q_{\text{eq}} [\mu\text{g kg}^{-1}]$  je rovnovážné množství adsorbovaného Se ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) vztažené na hmotnost půdy;  $C_{\text{eq}} [\mu\text{g l}^{-1}]$  je rovnovážná koncentrace Se ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) ve výluhu po kontaktu s půdou.

Význam příspěvku abiotických mechanismů, později v rámci první fáze jde především o kineticky limitované procesy jako je tvorba vnitřních komplexů a redukce  $\text{SeO}_4^{2-}$ , se s časem snižuje ve prospěch imobilizace zprostředkované půdními mikroorganismy (Vuori et al., 1994; Loffredo et al., 2011; Garcia-Sanchez et al., 2014), tj. časově neohraničený začátek druhé fáze stabilizace Se v půdě. O přímé souvislosti mezi imobilizací oxoaniontů Se a aktivitou půdních mikroorganismů vypovídají mikrobiálně indukované změny ve speciaci Se (Dungan a Frankenberger, 1999), v extrahovatelnosti Se z půdy (Darcheville et al., 2008), v hodnotách  $K_d$  (Février et al., 2007), v kinetice sorpce (Garcia-Sanchez et al., 2014), a to zvláště v prostředí rhizosféry (Munier-Lamy et al., 2007). Obecně pro rychlost stabilizace Se v půdě platí  $\text{SeO}_3^{2-} > \text{SeO}_4^{2-}$  (Peng et al., 2019). Zatím nebylo objasněno, zda primární příčinou je pevnější adsorpce  $\text{SeO}_3^{2-}$  na půdní minerální komponenty (Duc et al., 2003), vyšší afinita  $\text{SeO}_3^{2-}$  k organické hmotě (Bruggeman et al., 2007; Keskinen et al., 2013; Martin et al., 2017) nebo skutečnost, že rychlost mikrobiální asimilační redukce není limitována rychlostí prvního kroku  $\text{SeO}_4^{2-} \rightarrow \text{SeO}_3^{2-}$  (Eswayah et al., 2016).

Nový pohled na výzkum stabilizace exogenního Se zpřístupnilo využití technik ICPMS a HPLC-ICPMS pro sledování osudu izotopově obohacených oxoaniontů Se přidanych do půdy. V pilotní studii Tolu et al. (2014b) byla ustanovena distribuční rovnováha  $^{77}\text{Se}$  (z aplikace  $^{77}\text{SeO}_3^{2-}$ ) mezi kapalnou a pevnou fází půdy po 1 měsíci inkubace. Nicméně, chemická speciace a frakcionace  $^{77}\text{Se}$  nebyly stabilní ani po 3 měsících, čímž byla zpochybněna validita poznatků o chování Se v půdě odvozených z krátkodobých inkubačních pokusů. Navazující studie (Di Tullo et al., 2016), trvající 2 roky v polních podmínkách, vyzdvihuje význam pomalých difúzí řízených procesů, jejichž výsledkem byla redistribuce  $^{77}\text{Se}$  směrem k velmi stabilním frakcím. Jak dokládají další autoři, i bez využití izotopového značení se frakcionace Se jeví jako užitečný přístup ke studiu osudu exogenního  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Keskinen et al., 2011; Wang et al., 2017) i  $\text{SeO}_3^{2-}$  (De Feudis et al., 2019) v půdě.

Na základě výše citovaných prací lze akceptovat, že proces stabilizace Se v půdě je ovlivňován půdními charakteristikami a je ukončen, když exogenní Se splyne s distribucí a speciací nativního Se. Podle predikčních modelů může navození tohoto stavu po jednorázové aplikaci Se v množství několika stovek  $\mu\text{g kg}^{-1}$  trvat desítky let (Di Tullo et al., 2016; Wang et al., 2017). Nutno připomenout, že mezi faktory ovlivňující stabilizaci a distribuci Se v půdě patří aplikační dávka Se a přítomnost pěstovaných rostlin (Peng et al., 2016). V tomto ohledu se skutečným podmínkám biofortifikace nejvíce přiblížili Mathers et al. (2017) a Ligowe et al. (2020), kteří komplexně zkoumali chování izotopově obohaceného  $\text{SeO}_4^{2-}$  v systému půda-rostlina po aplikaci realistické dávky  $10 \text{ g ha}^{-1}$  Se ( $\sim 4 \mu\text{g kg}^{-1}$  půdy). Autorům se podařilo objektivně kvantifikovat pokles biodostupnosti exogenního Se s časem, úroveň fixace Se v kontrastních půdách i ztráty Se ze systému. Na ztrátách exogenního Se se podílely vertikální vyluhování, volatilizace z půdy a odběr Se rostlinami (Di Tullo et al., 2016; Mathers et al., 2017; De Feudis et al., 2019). Část Se lze do půdy navrátit zaoráním vedlejších produktů selenizovaných plodin, posklizňových zbytků či meziplodin, a tím po mineralizaci  $\text{Se}_{\text{org}}$  potenciálně zpřístupnit dodatečný zdroj Se pro následnou plodinu (Stavridou et al., 2011; Mathers et al., 2017).

### **2.6.1 Vliv aplikace hnojiv na osud exogenního Se**

Záměrně dosud opomíjeným aspektem AB v této práci je vliv hnojiv a organických materiálů aplikovaných do půdy na dostupnost exogenního Se rostlinám. Hnojení půdy může působit, zvláště prostřednictvím aniontových kompetic, na rovnováhy dílčích fyziologických a půdních procesů s účastí oxoaniontů Se, a tím ovlivnit celkovou účinnost biofortifikace. Jak vyplývá z následujících kapitol 2.6.1.1 a 2.6.1.2, v systému půda-rostlina lze uvažovat několik úrovní kompetice.

#### **2.6.1.1 Vliv aplikace minerálních hnojiv**

Chemická podobnost  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$  může být příčinou velmi komplexního účinku síranů na biodostupnost selenanu: (i) sírany při kompetici o dostupná sorpční místa v půdě udržují selenan v půdním roztoku (Goh a Lim, 2004; Lefèvre a Fédoroff, 2006); (ii)  $\text{SO}_4^{2-}$  snižují mikrobiální imobilizaci Se inhibicí transportu  $\text{SeO}_4^{2-}$  do buněk půdních mikroorganismů v rámci sdíleného transportního systému pro oba oxoanionty (Lindblow-Kull et al., 1985; Aguilar-Barajas et al., 2011) a také inhibují využití  $\text{SeO}_4^{2-}$  půdními sulfát-redukujícími bakteriemi při disimilační redukci (Zehr a Oremland, 1987); (iii)  $\text{SO}_4^{2-}$  snižují příjem selenanu rostlinami při kompetici o rhizodermální transportní systém (White et al., 2004; Renkema et al., 2012); (iv) stav rostliny z hlediska výživy sírou reguluje expresi genů transportérů  $\text{SO}_4^{2-}$ , a tedy i  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Parmar et al., 2007; Schiavon a Pilon-Smiths,

2017). Lze předpokládat, že ve skutečnosti se uplatňují všechny úrovně (i–iv) simultánně a navenek se projeví pouze jejich kombinovaný aditivní efekt.

V souladu s tím se řada autorů omezila na konstatování, zda aplikace  $\text{SO}_4^{2-}$  snížila či zvýšila dostupnost Se rostlinám, a svá zjištění opírají o návrh hlavního mechanismu působení (i–iv). Ve většině polních i nádobových experimentů byl po koaplikaci  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$  zaznamenán pokles obsahu Se v plodinách, a to s odkazem na převládající mechanismus (iii) (Mikkelsen a Wan, 1990; Lyons et al., 2005; Liu et al., 2017; Santiago et al., 2018). Opačný účinek  $\text{SO}_4^{2-}$  popsali Kikkert et al. (2013), výrazněji pro řepku olejnou v porovnání s pšenicí. Autoři hypotetizovali význam aniontové kompetice dle mechanismů (i) a (ii) a dále prokázali, že  $\text{SO}_4^{2-}$  vytěsňují nativní Se z půdní zásoby, což přispělo k vyššímu příjmu Se rostlinami. Poprvé v polních podmínkách na důsledky komplexnosti interakcí mezi  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$ , zahrnující půdní i fyziologické procesy na všech úrovních (i–iv), upozornili Stroud et al. (2010b). Fyziologický fenomén (iv) byl v této studii využit k interpretaci protichůdných účinků  $\text{SO}_4^{2-}$  na dostupnost Se pšenici, která byla pěstována v půdě s dostatečnou či limitující zásobou S. Relevance mechanismu (iv) pro ovlivnění příjmu  $\text{SeO}_4^{2-}$  byla jednoznačně prokázána v rostlinách pšenice pěstovaných v půdě chudé sírou při studiu exprese  $\text{SO}_4^{2-}$  transportérů metodou PCR spojenou s reverzní transkripcí (Shinmachi et al., 2010).

Hnojení  $\text{PO}_4^{3-}$  může interferovat s účinností aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  především na úrovni (i), tj. analogicky se sírany. Fosforečnany se vyznačují silnou sorpčně-kompetiční schopností vytěsňovat Se z půdního sorpčního komplexu (Nakamaru et al., 2006). Mobilizace nativního Se a/nebo preferenční obsazení sorpčních míst v půdě  $\text{PO}_4^{3-}$  mohou vysvětlit vyšší účinek biofortifikace různých plodin při koaplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  (Zhang et al., 2017; Ngigi et al., 2019). Význam  $\text{PO}_4^{3-}$  je zřejmý i z četných studií, ve kterých se jako indikátor biodostupnosti Se objevily obsah dostupného P v půdě, míra nasycení sorpčního komplexu fosforem nebo kapacita půdy sorbovat  $\text{PO}_4^{3-}$  (Nakamaru a Sekine, 2008; Eich-Greatorex et al., 2010; Lee et al., 2011). V případě časté redukce  $\text{SeO}_4^{2-} \rightarrow \text{SeO}_3^{2-}$  v půdě nebo přímé aplikace  $\text{SeO}_3^{2-}$  přichází v úvahu také kompetiční úroveň (iii), tj. soutěž  $\text{PO}_4^{3-}$  s  $\text{SeO}_3^{2-}$  v rámci fyziologického příjmu rostlinou (Hopper a Parker, 1999). Tento kompetiční mechanismus (iii) spolu s „ředěním“ Se v biomase (větší výnos pšenice po aplikaci  $\text{PO}_4^{3-}$ ) považovali Nie et al. (2020) za primární příčinu poklesu účinnosti biofortifikace při koaplikaci  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Naopak žádoucí vliv  $\text{PO}_4^{3-}$  na účinnost selenizace jílku vytrvalého (*Lolium perenne*), a to podle kompetičního mechanismu (i), publikovali He et al. (1994). Významnou roli mechanismu (i) podpořili i další autoři (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2017; Peng et al., 2020), ovšem pouze při aplikaci relativně nižších dávek  $\text{PO}_4^{3-}$ . S rostoucí dávkou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  či  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , kterou doprovázelo snížení *pH* půdy, byla pozorována nižší akumulace Se v tolici vojtěšce (*Medicago sativa*)



a pšenici jako projev zvýšené imobilizace  $\text{SeO}_3^{2-}$  adsorpcí (Zhang et al., 2017; Peng et al., 2020).

Adsorpci oxoaniontů Se mohou potenciálně zvýšit všechna minerální hnojiva snižující půdní *pH*. S vyšší aktivitou  $\text{H}^+$  v půdním roztoku dochází k protonizaci funkčních skupin na povrchu půdních minerálů, což usnadňuje jejich interakci s oxoanionty Se (Fernández-Martínez a Charlet, 2009). Teoreticky mohou inhibovat adsorpci, především selenanu, jakákoliv hnojiva včetně těch, která obsahují značně indiferentní anionty ( $\text{NO}_3^-$  a  $\text{Cl}^-$ ), a to vlivem vzrůstající iontové síly půdního roztoku (Wu et al., 2000). Navíc, za specifických podmínek může  $\text{NO}_3^-$  kompetičně inhibovat mikrobiálně zprostředkovanou i abiotickou redukci  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Fellowes et al., 2013) a tím udržovat Se v mobilní formě.

Při aplikaci granulí minerálních hnojiv obohacených o  $\text{SeO}_4^{2-}$  se skrytě uplatňují jevy, které účinnost biofortifikace snižují. Ramkissoon et al. (2019) se domnívají, že za pokles účinnosti může být zodpovědná redukce  $\text{SeO}_4^{2-} \rightarrow \text{SeO}_3^{2-}$  v anoxických mikrozónách, které se vytvořily vlivem osmoticky řízeného toku půdní vody směrem k rozpouštějící se granulí.

### 2.6.1.2 Vliv aplikace organické hmoty

Důležitým impulzem pro výzkum vlivu vstupu organických látek do půdy na účinnost biofortifikace byla existence úměry mezi obsahem nativního Se a POH (Roca-Perez et al., 2010; Gabos et al., 2014). Interpretace tohoto vztahu je obtížná, neboť obsah POH může korelovat s potenciální biodostupností nativního Se významně negativně (Xing et al., 2015) i významně pozitivně (Xiao et al., 2020). Pro využití na zemědělské půdě lze tradičně uvažovat následující materiály: zbytky vypěstované biomasy a vedlejší produkty z jejího zpracování, statková hnojiva, kaly různého původu a komposty (Goss et al., 2013). V minulosti byl zkoumán vliv těchto materiálů na změnu biodostupnosti Se především v seleniferých půdách, využití takových poznatků v souvislosti s exogenním Se je sporné. Po jednorázovém přidavku hnojů odlišného původu byla zjištěna nižší akumulace Se v semenech různých plodin (Dhillon et al., 2010; Sharma et al., 2011). Nižší transfer Se z půdy do zrna obilnin našli Wang et al. (2016) na poli pravidelně hnojeném kompostem po dobu 20 let oproti ostatním variantám věčného pokusu. Vyšší biodostupnost Se po aplikaci chlívského hnoje je obecně méně častým případem (McGregor et al., 2008; Lacatusu et al., 2013). Mechanismy působení organických materiálů navržené ve výše uvedených studiích se liší a byly často podány bez důkazu.

Podle Coppin et al. (2009) pevné částice POH ( $> 50 \mu\text{m}$ ) mají převážně jen funkci nosičů menších minerálních částic ( $< 3 \mu\text{m}$ ), na kterých se realizuje vlastní adsorpce oxoaniontů Se. Dinh et al. (2017) uvedli, že s mobilitou a biodostupností Se v půdě nejvíce a velmi komplexně interferuje  $\text{POH}_{\text{rozp}}$  v širokém spektru molekulových hmotností

( $10^1$ – $10^6$  Da), jejímž latentním zdrojem v půdě je i aplikace organických materiálů (Sharma et al., 2011; Wang et al., 2019b). Z důvodu působení převážně odpuzivých elektrostatických sil lze s přímou interakcí mezi oxoanionty Se a částicemi POH počítat jen omezeně, nejvíce za podmínek protonizace aminoskupin na  $\text{NH}_3^+$  (Saada et al., 2003; Yamani et al., 2014). Vznik aduktů neznámé struktury sestávajících se z  $\text{SeO}_3^{2-}$  a rozpuštěných polysacharidů demonstrovali voltametrickou metodou Ferri a Sangiorgio (1999). Můstkové kationty (např.  $\text{Fe}^{3+}$ ) mohou interakci mezi záporně nabitými částicemi zprostředkovat za vzniku ternárních komplexů typu humusová látka ↔ můstkový kation ↔ oxoanion Se (Bruggeman et al., 2007; Martin et al., 2017). Významným zástupcem  $\text{POH}_{\text{rozp}}$  jsou nízkomolekulární karboxylové kyseliny. O tom, zda se projeví jejich inhibiční (kompetice o sorpční místa nebo ztráta sorpčních míst) nebo zesilující (vznik specifických povrchových komplexů či precipitátů nebo indukce abiotické redukce) účinek na imobilizaci Se, rozhoduje jejich molekulární struktura, jak dokládají experimenty v jednoduchých systémech obsahujících oxoanionty Se, konkrétní karboxylovou kyselinu a modelový adsorbent (Wijnja a Schulthess, 2000; Favorito et al., 2018; Fang et al., 2019).

Aplikace organické hmoty ovlivňuje účinnost biofortifikace prostřednictvím mnoha proměnných: změnou aktivity a diverzity mikroorganismů (Calderone et al., 1990; Tian et al., 2015), změnou fyzikálně-chemických parametrů půd (Blanchet et al., 2016; Gómez-Brandón et al., 2016) a půdní struktury (Kausch a Pallud, 2013), vnosem dalšího exogenního Se (Lacatusu et al., 2013). Přídavek hovězího hnoje snížil dostupnost Se z exogenního  $\text{SeO}_4^{2-}$  rostlinám kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea*) a řepky olejné jako důsledek stimulace mikrobiální asimilační redukce  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Ajwa et al., 1998). Naopak, sorpční kompetice mezi anionty  $\text{POH}_{\text{rozp}}$  z kravského hnoje a oxoanionty Se zvýšila účinnost selenanu při biofortifikaci pšenice v experimentu Øgaard et al. (2006). Při koaplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  se slámou se produkty rozkladu fytohmoty v půdě asociovaly s exogenním Se, struktura a vznik těchto specií (Se- $\text{POH}_{\text{rozp}}$ ) zatím nebyla objasněna (Wang et al., 2019b). Při stabilizaci Se v půdě se speciace a frakcionace Se- $\text{POH}_{\text{rozp}}$  dynamicky vyvíjí od Se asociovaného s nízkomolekulární  $\text{POH}_{\text{rozp}}$  (hydrofilní kyseliny, fulvokyseliny) k asociacím s vysokomolekulární  $\text{POH}_{\text{rozp}}$  (humínové kyseliny). Průběh této transformace závisel na vlastnostech experimentálních půd, avšak vždy vedl ke snížení účinnosti selenizace pšenice (Wang et al., 2020a).

Nehledě na správnost diskutovaných mechanismů interakce, je zřejmé, že kvantita a kvalita (složení, aromaticita a funkční skupiny) POH hrají významnou roli pro biodostupnost exogenního Se v půdě (Coppin et al., 2006; Wang et al., 2020a).

## 2.7 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SELENU TECHNIKOU ICPMS

Nízké detekční limity (DL), rychlá multiprvková analýza, široký dynamický lineární rozsah a přesnost měření jsou hlavní atributy, které učinily z hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICPMS) velmi atraktivní techniku pro stopovou/ultrastopovou elementární analýzu biologických a environmentálních vzorků. V následujícím textu, nebude-li uvedeno jinak, je zkratkou ICPMS míněna nejrozšířenější konfigurace vybavená jedním kvadrupólovým hmotnostním filtrem.

Správné stanovení velmi nízkých koncentrací Se ( $\leq 1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) patřilo v minulosti mezi obtížné aplikační oblasti ICPMS, a to ze dvou důvodů: (i) vysoká hodnota prvního ionizačního potenciálu (1. IP) Se (9,75 eV) je příčinou nízké účinnosti ionizace  $\text{Se} \rightarrow \text{Se}^+$  (~33 %) v Ar plazmatu (Jarvis et al., 1992); (ii) všech 6 stabilních izotopů Se je zatíženo spektrálními interferencemi z Ar plazmatu a matrice vzorku (May a Wiedmeyer, 1998).

### 2.7.1 Spektrální interference (SI)

Hlavní omezení kvadrupólových ICPMS spočívá v nedostatečném rozlišení iontů o blízké hmotnosti, resp. blízkém podílu hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). V případě Se trpí jeho hlavní izotopy  $^{78}\text{Se}$  a  $^{80}\text{Se}$  závažnými spektrálními překryvy s dimery  $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$  a  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  a s mnoha dalšími polyatomickými ionty (Příloha 1) a také izobarickými překryvy ( $^{78}\text{Kr}^+$  a  $^{80}\text{Kr}^+$ ), čímž vzniká falešně pozitivní signál (Guo et al., 2013). Příloha 1 uvádí rozlišovací schopnost konvenčních hmotnostních analyzátorů a rozlišovací schopnost nezbytnou pro rozlišení typických SI při stanovení Se (Feldmann et al., 2000; Elwaer a Hintelmann, 2008). Využití elektrotermické vaporizace (ETV-ICPMS) nebo generování hydridů (HG-ICPMS) pro zavádění analytu do plazmatu v plynné formě snižuje intenzitu SI z komplexních matic (McCurdy et al., 1993; Lam et al., 1999). Instalace kolizních/reakčních cel do instrumentace ICPMS zásadně eliminovala spektrální překryvy  $^{78}\text{Se}$  a  $^{80}\text{Se}$  s polyatomickými ionty. Olesik a Gray (2014) testovali 13 různých kolizních/reakčních plynů ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{F}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SF}_6$ ,  $\text{Xe}$ ,  $\text{Ne}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}$  a  $\text{Ar}$ ) užitečných při stanovení Se, rovněž popsali mechanismy odstranění SI. V jejich výčtu chybí v kolizním módu univerzálně používané He, které sice účinně snižuje signál  $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$  diskriminací dle kinetické energie iontů (Bishop et al., 2015), ale vyšší citlivosti a lepších DL se standardně dosahuje s  $\text{H}_2$ , případně se směsmi  $\text{H}_2 + \text{He}$  (Darrouzes et al., 2005) či s  $\text{CH}_4$  nebo  $\text{NH}_3$  (Sucharová, 2011). Dalším nedostatkem He je jeho neschopnost zamezit interferencím s dvojnásobně nabitými ionty kovů vzácných zemin (Jackson et al., 2015), jejichž obsah v půdách a biologických vzorcích často nelze zanedbat (Tyler, 2004). Za předpokladu optimalizace plazmatu a parametrů reakční cely lze k účinné eliminaci překryvu, např.  $^{156}\text{Gd}^{2+}$  a  $^{78}\text{Se}$ , využít reaktivní plyny  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$  nebo  $\text{NH}_3$  (Sucharová, 2011; Jackson et al., 2015). Nejvyšší úroveň kontroly vzniku

a odstranění polyatomických i izobarických interferencí umožňují ICPMS systémy se dvěma kvadrupóly (ICPMS/MS). Přednosti tandemového ICPMS/MS při stanovení Se (na  $m/z$  94) v obtížných matricích při měření v  $O_2$  módu s využitím posunu  $^{78}\text{Se} \rightarrow ^{78}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  prezentovali Bishop et al. (2015) a Jackson et al. (2015).

### 2.7.2 Nespektrální interference (NI)

Mineralizáty vzorků rostlin z kyselého rozkladu na mokré cestě a výluhy půd roztoky kyselin, zásad a solí představují komplikované matrice mající potenciál způsobit různé typy NI kdekoliv na cestě analytu mezi zmlžovačem a iontovou optikou (Agatemor a Beauchemin, 2011). Mezi problematické vlastnosti těchto roztoků patří: (i) vysoká koncentrace anorganických kyselin, která ovlivňuje tvorbu aerosolu a energetiku plazmatu (Aguirre et al., 2014); (ii) vysoké koncentrace matričních prvků o nízké hodnotě 1. IP a/nebo o vysoké atomové hmotnosti, jenž mohou potlačovat signál analytu (Fraser a Beauchemin, 2000; Colon et al., 2011; Mariet et al., 2011), nejčastěji překročením mezního prostorového náboje v iontovém paprsku (tzv. *space charge* efekt) nebo posunem v ionizačních rovnováhách analytu v plazmatu; (iii) nezanedbatelná koncentrace  $C_{\text{rozp}}$  zesilující intenzitu signálu Se, a to zvýšením abundance  $\text{Se}^+$  v plazmatu mechanismem přenosu náboje z  $\text{C}^+$  specií (Hu et al., 2004; Kovačević a Goessler, 2005; Grindlay et al., 2013). Přenosem náboje z  $\text{S}^+$  a  $\text{P}^+$  na atomy Se se zabývali García-Poyo et al. (2015) a Grindlay et al. (2016). Korekce NI ve složitých matricích metodou interní standardizace často selhává (Ejima et al., 1999; Moellmer et al., 2007). Řešením je uplatnění vhodné kalibrační metody, např. přidavku standardu nebo přizpůsobení matric (tzv. *matrix matching*). Kalibrace metodou izotopového ředění, za předpokladu absence SI na monitorovaných izotopech, spolehlivě eliminuje vliv matrice, včetně vlivu na transportní účinnost, a koriguje progresivní drift signálu i okamžitou nestabilitu ICPMS systému (Kleckner et al., 2017). Alternativní strategie eliminace NI zahrnují úpravu vzorků pro separaci analytu z matrice či odstranění významného interferentu nebo využití jiného systému zavádění vzorků (Dams et al., 1995; Aguirre et al., 2014).

### 3 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

S ohledem na komplexnost vztahů ovlivňujících účinnost biofortifikace selenem byly hypotézy a cíle práce navrženy na několika úrovních, které se liší počtem experimentálních proměnných majících vliv na dostupnost Se rostlinám.

---

#### Hypotéza č. 1

---

Rychlá abiotická sorpce  $\text{SeO}_4^{2-}$  může přispět ke snížení vyluhování Se z orniční vrstvy, čímž potenciálně zvýší účinnost aplikovaného hnojiva ve formě selenanu.

##### Cíle na úrovni I:

- (1a) kritické zhodnocení půdních výluhů coby matrice způsobující nespektrální interference při měření koncentrace Se technikou ICPMS
- (1b) identifikace a zmírnění následků metodických slabín, které se mohou vyskytovat ve vsádkových sorpčních experimentech a mohou zkreslit sorpční data naměřená ICPMS
- (1c) kvantitativně vyhodnotit rychlou abiotickou sorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  ve vybraných půdách
- (1d) objasnit vliv síranu, fosforečnanu a dusičnanu na rozsah abiotické imobilizace  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdě

---

#### Hypotéza č. 2

---

Hlavním činitelem snižujícím mobilitu a dostupnost přidaného  $\text{SeO}_4^{2-}$  ve vybraných půdách je imobilizace zprostředkovaná půdními mikroorganismy.

##### Cíle na úrovni II:

- (2a) sledování změn mobility a dostupnosti Se v půdě s časem po aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$
- (2b) objasnit vliv síranu, fosforečnanu a labilního organického uhlíku na rozsah abiotické i mikrobiální imobilizace  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdě
- (2c) ověřit redoxní stabilitu přidaného  $\text{SeO}_4^{2-}$  v potenciálně rostlinám dostupné půdní zásobě

---

### **Hypotéza č. 3**

---

Racionální aplikace síranových a fosforečných hnojiv spolu s  $\text{SeO}_4^{2-}$  nesníží účinnost selenizace řepky olejné.

#### **Cíle na úrovni III:**

- (3a) zhodnocení komplexního půdního a fyziologického účinku síranu a fosforečnanu na účinnost biofortifikace řepky olejné selenem
- (3b) posouzení vlivu výživného stavu rostliny z hlediska síry na příjem a distribuci Se v řepce olejné
- (3c) speciální analýza Se v řepce olejné a potenciální vliv síranu a fosforečnanu na speciaci Se

---

### **Hypotéza č. 4**

---

Účinnost foliární selenizace řepky olejné významně závisí na půdně-klimatických charakteristikách stanoviště.

#### **Cíl na úrovni IV:**

- (4a) sledování distribuce foliárně přijatého Se v rostlině na dvou různých stanovištích v závislosti na fázi vývoje řepky v polních podmínkách

## 4 PUBLIKOVANÉ PRÁCE

### 4.1 PUBLIKACE I

Praus, L., Száková, J., Tremlová, J. 2019. Fast abiotic sorption of selenates ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) in soils: pitfalls of batch sorption data acquired by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS). Archives of Agronomy and Soil Science. 65 (14). 566-580.



## Fast abiotic sorption of selenates ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) in soils: pitfalls of batch sorption data acquired by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS)

Lukáš Praus, Jiřina Száková  and Jana Tremlová

Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

### ABSTRACT

Low selenium (Se) dietary intake has encouraged the development of fortification strategies such as  $\text{SeO}_4^{2-}$  application to arable land. Selenate is highly mobile in soil systems, but it is not known whether fast abiotic retention could reduce Se loss from topsoil after  $\text{SeO}_4^{2-}$  fertilisation. This work explicitly aims at fast abiotic  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption in three soils exposed to 20–1250  $\mu\text{g L}^{-1}$  Se in a 24-h batch experiment. This study demonstrated the susceptibility of Se sorption data to distortion when inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS) measurements suffered from non-spectral interferences induced by concomitant elements in an aqueous soil-derived matrix. The distribution coefficient ( $K_d$ ), not exceeding 2  $\text{L kg}^{-1}$  at any Se level, was shown to be a useful indicator for the extent of ion competition for sorption sites depending on the  $\text{SeO}_4^{2-}$  concentration employed. Sorption experiments conducted in the presence or absence of nitrate (10 mM), sulphate (0.52 mM) and phosphate (0.21 mM) allowed three phenomena explaining different  $\text{SeO}_4^{2-}$  retention behaviours found even between similar Cambisols to be proposed. Finally, we showed that the co-application of sulphate or phosphate with  $\text{SeO}_4^{2-}$  might decrease Se sorption from 150–170  $\mu\text{g kg}^{-1}$  to a net release from native Se pool.

**Abbreviations:** 1<sup>st</sup> IP: first ionisation potential; RSD: relative standard deviation

### ARTICLE HISTORY



Received 14 November 2017  
Accepted 12 August 2018

### KEYWORDS

Selenium; soil sorption; anion competition; ICP-MS; interferences

## Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element whose metabolites carry out a number of important protective functions at the cellular level and contribute to good health (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008). The application of  $\text{SeO}_4^{2-}$  to arable land has been proved as a viable method for correcting inadequate daily Se intake via the consumption of fortified agricultural products (Alfthan et al. 2015). In addition to a low crop recovery of Se fertilisers reported in field trials (Stroud et al. 2010; Tremblay et al. 2015; Ros et al. 2016), the effect of  $\text{SeO}_4^{2-}$  addition ensuring an adequate Se content in a crop can be limited to one or two growing seasons (Stroud et al. 2010; Tremblay et al. 2015). According to current knowledge, a gradual decrease in the bioavailability of  $\text{SeO}_4^{2-}$  freshly added to agricultural soil slowly approaches a state in which exogenous and native soil Se can no longer be distinguished from each other in terms of Se availability and soil fractionation (Li

**CONTACT** Lukáš Praus  [prausl@af.czu.cz](mailto:prausl@af.czu.cz)  Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



et al. 2016; Wang et al. 2017). Meanwhile,  $\text{SeO}_4^{2-}$  is subjected to diverse immobilisation phenomena, transformation into reduced Se species, or leaching away from the root zone. Soil distribution and plant uptake of selenate greatly differ from those of organic Se forms ( $\text{Se}_{\text{org}}$ ) and selenite (Kikkert and Berkelaar 2013; Ali et al. 2017). Thus, a change in Se speciation controls the efficiency of  $\text{SeO}_4^{2-}$  fertilisers. Moreover, the principal role in Se aging has to be assigned to soil microorganisms, as  $\text{Se}_{\text{org}}$  predominates the Se species found in soils (Tolu et al. 2014; Supriatin et al. 2015). Unlike those studies, this work targets a very early stage of  $\text{SeO}_4^{2-}$  fertilisation when non-equilibrium dissolution takes place around a fertiliser granule,  $\text{SeO}_4^{2-}$  enters soil solution, and experiences abiotic interactions with soil particles. Kinetic models fitting  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption in soils have successfully described fast initial sorption followed by kinetically controlled interactions that may include microbially-mediated processes (Loffredo et al. 2011; Garcia-Sanchez et al. 2014). Sorption studies on European soils using Se in an amount equivalent to less than  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (soil) or  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  (soil suspension) are scarce in the literature (Eich-Greatorex et al. 2010; Söderlund et al. 2016), particularly those employing variable initial  $\text{SeO}_4^{2-}$  concentrations (Loffredo et al. 2011; Smažiková et al. 2017). They indicate values of distribution coefficient ( $K_d$ ) covering three orders of magnitude up to  $70 \text{ L kg}^{-1}$ , strongly depending on the initial Se concentration employed. Natural iron (Fe) and aluminium (Al) (hydr)oxides have been recognised as the most important  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorbents, with the exception of organic-rich soils (Tolu et al. 2014). Sorption mechanisms on those minerals may include inner-sphere complexes (Zhang et al. 2018), outer-sphere ones (Elzinga et al. 2009) or a continuum of both mechanisms as affected by *pH* (Zhang et al. 2018). Anion competition with sulphate and phosphate acts on  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption equilibrium in bulk soils (Goh and Lim 2004; Eich-Greatorex et al. 2010). Additionally, non-specifically-sorbing anions, such as  $\text{NO}_3^-$ , may also decrease the sorption of  $\text{SeO}_4^{2-}$  on soil minerals (Wu et al. 2000).

An investigation into a low sorption extent ( $K_d < 10 \text{ L kg}^{-1}$ ) of  $\text{SeO}_4^{2-}$  in a batch study requires high accuracy and precision of Se determination in soil-derived matrices. All six selenium isotopes, which constitute this hard-to-ionise element (HIE;  $1^{\text{st}} \text{IP} = 9.75 \text{ eV}$ ), suffer from spectral interferences in mass spectrometry techniques possessing a low resolution capability such as an ICP-QMS (Guo et al. 2013). Moreover, a highly complex matrix such as a soil leachate might have the potential to cause a wide range of non-spectral interferences emerging anywhere between a nebuliser and ion optics, falling into various categories, as summarised by Agatemor and Beauchemin (2011). Furthermore, easy-to-ionise elements (EIEs), whose salts are often added for ionic strength adjustment, have been predominantly reported to suppress the signal of analytes (Fraser and Beauchemin 2000; Colon et al. 2011; Mariet et al. 2011). On the contrary, positively charged carbon species in the plasma are expected to enhance the Se signal (Hu et al. 2004; Kovačević and Goessler 2005; Grindlay et al. 2013).

Our hypothesis is that fast abiotic mode of  $\text{SeO}_4^{2-}$  retention may participate in the reduction of Se loss caused by leaching away from topsoil, thus contributing to a higher efficiency of selenate fertiliser. The objectives of this study were: (i) to evaluate soil leachates as a matrix inducing non-spectral interferences in Se determination by ICP-QMS; (ii) to identify and alleviate the methodological weaknesses that emerged in conventional batch design as having the potential to bias Se sorption data acquired by ICP-QMS; (iii) to determine the ability of three Czech soils to retain  $\text{SeO}_4^{2-}$  by a fast abiotic sorption mechanism; and (iv) to examine the ability of phosphate, sulphate and nitrate to alter the extent of such a retention mechanism.

## Material and methods

### *Bulk soil characteristics*

Three arable soils, as typical representatives of agricultural land resources in the Czech Republic (Table 1), two Cambisols and Chernozem, were collected from topsoil (0–20 cm) at experimental stations in Humpolec (HUM-soil) and Lukavec (LUK-soil), both in the Vysočina Region, and in Prague-Suchdol (SUCH-soil), a suburban area of the capital, respectively. The particle size

Table 1. Physicochemical characteristics of the soils used in this study.

soil	pH	Se		C		N (total) [g kg <sup>-1</sup> ]	Fe	Al (oxal) [mg kg <sup>-1</sup> ]	P	C		S	DPS index <sup>a</sup> [%]
		[µg kg <sup>-1</sup> ]								(H <sub>2</sub> O) [mg kg <sup>-1</sup> ]			
HUM	6.0	219 ± 5		20.2 ± 0.0		2.0 ± 0.0	4461 ± 106	1814 ± 37	498 ± 11	102 ± 3		22.0 ± 0.6	21.9
LUK	5.8	213 ± 5		14.6 ± 0.0		1.7 ± 0.1	5139 ± 139	2142 ± 81	688 ± 17	164 ± 3		7.4 ± 0.4	25.9
SUCH	8.0	347 ± 14		20.6 ± 0.8		1.8 ± 0.1	1617 ± 64	1372 ± 26	509 ± 13	62 ± 0		15.3 ± 1.0	41.2

<sup>a</sup> degree of P saturation calculated according to Van Der Zee and Van Riemsdijk (1988).



distributions (sand:silt:clay) of the given soils on a mass percentage basis were 50.6:43.6:5.8; 59.7:37.1:3.2; and 26.0:71.8:2.2, respectively. The soils were air-dried in an oven (35°C), homogenised by sieving (2 mm), and stored in plastic bags in the dark at laboratory temperature until use. Soil physicochemical characteristics were determined as follows: *pH* in a 1:14 (*m/v*) suspension (soil:10 mM NaNO<sub>3</sub>); water-extractable carbon in a 1:10 (*m/v*) suspension shaken on a tube rotator (30 rpm) for 16 h, centrifuged (2680 × *g* for 12 min), and measured on a continuous flow colorimetric analyser (Skalar SAN<sup>++</sup> System, Skalar, Netherlands); water-extractable sulphur in a 1:10 (*m/v*) suspension shaken (30 rpm) for 1 h, centrifuged (2680 × *g* for 12 min), and analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES; Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA); and ammonium oxalate-extractable Fe, Al, and phosphorus (P) according to Sheldrick (1984), and analysed by ICP-OES. Total soil carbon (C) and nitrogen (N) contents were measured on an elemental analyser CHNOS (Vario MACRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). The pseudototal Se content was determined in 0.50 g of soil exposed to a microwave-assisted wet digestion (Discover SP-D, CEM Corp., USA) at 180°C for 18 min, employing 8 mL of HNO<sub>3</sub>-HCl (both Analpure®, Analytika, Czech Republic) acid mixture 1:3 (*v/v*) (ISO 2012), after which Se was measured in a diluted digest by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS; Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA).

### **Soil leachate characteristics**

The soil leachates were prepared as follows: 1.0 g of soil and 14.0 mL of 10 mM NaNO<sub>3</sub> were transferred into 15-mL polyethylene centrifuge tubes, shaken on a tube rotator for 24 h (30 rpm), centrifuged (2680 × *g* for 12 min), and passed through a membrane filter (0.2 μm, Nylon). This procedure yields filtrates with approximately the same chemical composition as samples from the sorption experiment, with the exception of Se (see below). Soil anions were determined in the filtrates diluted with water (1:12 *v/v*) using an ion chromatography system (ICS-1600, Dionex, USA) equipped with an IonPac AS11-HC (Dionex, USA) anion-exchange column and a conductivity detector. Chromatographic conditions are described in detail in Mercl et al. (2017). The concentration of sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulphur (S) and P in centrifuged and filtered (KA-5 paper, Papírna Perštejn, Czech Republic) soil leachates was measured by ICP-OES.

### **ICP-QMS technique and non-spectral interferences**

A quadrupole mass filter, a pneumatic nebuliser (MicroMist), and an octopole collision cell pressurised with helium (He) constitute the characteristic components of the ICP-MS employed in this study. The operating conditions were set as follows: radio frequency power = 1550 W, carrier argon (Ar) flow rate = 1.08 L min<sup>-1</sup>, auxiliary Ar flow rate = 0.90 L min<sup>-1</sup>, plasma Ar flow rate = 15.0 L min<sup>-1</sup>, collision He flow rate = 7.0 mL min<sup>-1</sup>, and sampling depth = 7.0 mm. The acquisition parameters were: points/peak = 1, replicates/sample = 3, integration time = 3 s, and sweeps/replicate = 20. The instrument was tuned on a daily basis to achieve the count ratios for <sup>140</sup>Ce<sup>16</sup>O/<sup>140</sup>Ce ≤ 0.75% and <sup>140</sup>Ce<sup>2+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup> ≤ 1.8% when aspirating soil leachate spiked with cerium (Ce) to obtain a concentration of 1 μg L<sup>-1</sup> Ce. The instrument was calibrated using a six-point calibration curve in the range from 2.5–500 μg L<sup>-1</sup> Se by the suitable dilution of certified reference material (CRM) containing 1.000 g L<sup>-1</sup> of Se (ASTASOL-Se®, ANALYTIKA, Czech Republic). The limits of Se detection (*LODs*) of 0.1–0.2 μg L<sup>-1</sup> were estimated based on three times the standard deviation of the five-fold diluted unspiked soil leachate divided by the slope of the calibration curve (AMC 1987). A preliminary interference study was needed to demonstrate that germanium (Ge) as an internal standard does not bias Se concentration measured in soil-derived matrices.

The suspension consisting of 1.0 g of soil and 14.0 mL of H<sub>2</sub>O, manipulated in the same manner as for the determination of macroelements provided stock soil leachate in this experiment. The

**Table 2.** Detailed explanations of the treatments employed in the interference study.

abbreviation		abbreviation	
SUCH RM	reference matrix = SUCH (5×)	(KS)2	1 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
W	Milli-Q water	Mg1	0.08 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Na1	0.2 mM NaNO <sub>3</sub>	Mg2	0.80 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Na2	2 mM NaNO <sub>3</sub>	S1	0.1 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Na3	10 mM NaNO <sub>3</sub>	S2	1 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
CH1	0.04% (v/v) CHCl <sub>3</sub>	P1	0.01 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
CH2	0.20% (v/v) CHCl <sub>3</sub>	P2	0.10 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(KS)1	0.1 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		

stock leachate was serially diluted with water (2.5-, 5-, and 10-fold dilution) and spiked with NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> solutions (Table 2) to record any specific influence of these salts on the signal response of Se (25 µg L<sup>-1</sup>) and Ge (10 µg L<sup>-1</sup>) spiked as CRMs (ASTASOL-Se® and ASTASOL-Ge®, ANALYTIKA, Czech Republic) into soil leachates. The salt additions were intended to simulate the composition of soil filtrates from the sorption experiment and to inspect the ions which are suspected of a matrix interference causality in soil-derived matrices at natural or elevated concentrations. Interferences induced by chloroform spikes up to 0.20% (v/v) were also monitored. The deviations between Se and Ge behaviour in the plasma were studied in terms of their axial profile by changing the sampling depth in the range from 4.0–13.0 mm.

### Sorption experiment

Selenate solutions in 10 mM NaNO<sub>3</sub> at Se concentrations of 20, 50, 100, 250, 500 and 1250 µg L<sup>-1</sup> were prepared by the dilution of an Se stock solution (1.0 g L<sup>-1</sup> Se) which was obtained by the dissolution of solid Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Germany). Centrifuge tubes (15-mL) were filled successively with 1.0 g of soil, 14.0 mL of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> solution and 28 µL of chloroform suppressing microbial activity. The tubes were shaken on a tube rotator (30 rpm) for 24 h, centrifuged (2680 × *g* for 12 min), and then filtered (KA-5). The amount of Se sorbed per unit mass of soil (*Q*<sub>eq</sub>) was calculated as the difference between the amounts of Se initially present and remaining in the aqueous phase after 24 h, as measured by ICP-QMS in five-fold diluted samples and related to soil mass. The sorption data were fitted to Freundlich isotherms (Eq. 1) and the distribution coefficient (*K*<sub>d</sub>) was calculated for each Se level (Eq. 2):

$$Q_{eq} = K_f \times C_{eq}^{1/n} \quad (1)$$

$$K_d = Q_{eq} / C_{eq} \quad (2)$$

where *K*<sub>f</sub> and *n* are empirical constants and *C*<sub>eq</sub> is the aqueous Se concentration, as determined after 24 h. Additionally, shifts in SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> sorption equilibria were evaluated in the experimental soils exposed to 500 µg L<sup>-1</sup> Se in various background electrolytes as follows: i) 10 mM NaNO<sub>3</sub> + 0.52 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; ii) 10 mM NaNO<sub>3</sub> + 0.21 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; and iii) no ionic strength adjustment. In order to demonstrate a potential influence of filtration efficiency on the extent of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> sorption, the centrifuged leachates were filtered through a KA-2 and KA-5 filter paper in parallel, with a particle capture of ≥ 8 and ≥ 3 µm, respectively, and a membrane filter (0.2 µm, Nylon).

### Data quality assurance

Unless otherwise specified, all chemicals used were of analytical reagent grade purchased from Czech manufacturers. High purity water (≥ 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup>) originating from a Milli-Q purification



system (Millipore, SAS, France) was used for sample preparation and dilution throughout this study. All glass and plastic ware were soaked in 1.6 M HNO<sub>3</sub> for 24 h and rinsed with Milli-Q water prior to use. The <sup>72</sup>Ge and <sup>78</sup>Se signals of any sample employed in the interference and sorption study, including matrix-matched calibration and quality control (QC) samples, were corrected for based on the procedural blanks being virtually their own matrix without any Se and Ge spike; thus, the native Se released into a soil leachate was automatically subtracted. All experiments were conducted in triplicate if not otherwise stated. For QC purposes, 400 µL of standard reference material (NIST 1640a, USA) was spiked into a mixture consisting of 400 µL of undiluted soil leachate and 1200 µL of H<sub>2</sub>O to ensure the trueness of Se determination.

## Results and discussion

### Reference soil matrix

As can be seen from Table 3, the 10 mM NaNO<sub>3</sub> soil leachates (1:14, *m/v*) appear as a complex matrix containing elements that potentially induce non-spectral interferences in Se determination, although their concentrations are markedly lower than those commonly employed in other ICP-MS interference studies (Fraser and Beauchemin 2001; Colon et al. 2011; Mariet et al. 2011; García-Poyo et al. 2015) except for Na. Figure 1a shows absolute signal intensities (*I*<sub>abs</sub>) of <sup>78</sup>Se spiked into variously diluted soil leachates and Milli-Q water. Firstly, the five-fold diluted SUCH-soil leachate was chosen as a reference matrix (RM). The  $\pm 2 \times RSD$  value from measurement of nine independently prepared RMs spiked with 25 µg L<sup>-1</sup> Se and 10 µg L<sup>-1</sup> Ge had defined count intervals  $\pm 5.4\%$  (Se) and  $\pm 3.6\%$  (Ge); within them, no serious matrix interference was considered by agreement throughout this study. Milli-Q water had the lowest response to Se spiking (Figure 1a). All <sup>78</sup>Se signals acquired in soil-derived matrices were found within the calculated count interval. The most pronounced negative (−3.0%) and positive (2.3%) biases of <sup>78</sup>Se compared to RM were observed in the HUM- and LUK-soil leachates, respectively, at 2.5-fold dilution. A decline in these <sup>78</sup>Se biases at five-fold dilution (−1.4% and 0.4%, respectively) indicates a matrix effect of interference causality rather than being a consequence of measurement uncertainty. Figure 2a features the relative signal intensity (*I*<sub>rel</sub>) ratios of <sup>72</sup>Ge/<sup>78</sup>Se as obtained for matrices under investigation, related to the <sup>72</sup>Ge/<sup>78</sup>Se belonging to RM spiked with Se and Ge. Any *I*<sub>rel</sub> ratio falling outside the range from 0.915–1.095 was supposed to warn of severely systematically biased Se signals due to internal standardisation using Ge. In this study, the two boundary *I*<sub>rel</sub> values of <sup>72</sup>Ge/<sup>78</sup>Se were liberally proposed based on the  $\pm 2 \times RSD$  interference criterion introduced in this section, assuming that the signal deviations would equal the paired values {−5.4% (Se) and 3.6% (Ge)} or {5.4% (Se) and −3.6% (Ge)}. The two most outlying *I*<sub>rel</sub> values of <sup>72</sup>Ge/<sup>78</sup>Se at a particular dilution ratio were calculated again for HUM-soil (1.013) and LUK-soil (0.957) at a 2.5-fold dilution, indicating an inability of <sup>72</sup>Ge to compensate <sup>78</sup>Se signal robustly. Nevertheless, no *I*<sub>rel</sub> ratio deviated from the suggested interval.

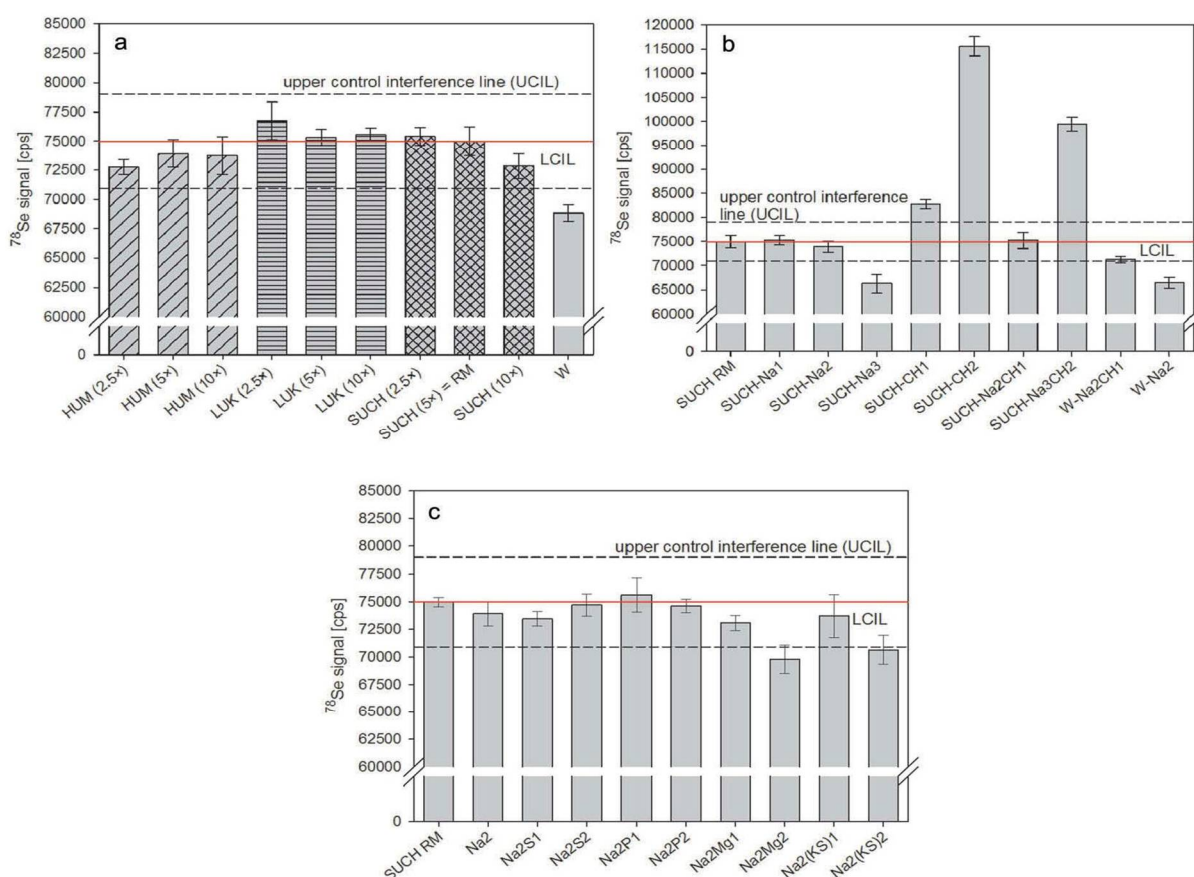
### Matrix interferences

Figure 1b depicts the influence of NaNO<sub>3</sub> and CHCl<sub>3</sub> spikes on <sup>78</sup>Se signal. The highest Na spike (10 mM) into RM suppressed *I*<sub>abs</sub> of <sup>78</sup>Se by 11.6%. The sensitivity loss practically vanished if 2 mM of Na or less was pipetted into RM. A shift in ionisation equilibrium (SIE) seems to be the leading suppression mechanism, as explained by Fraser and Beauchemin (2001) who measured at 20 mM of Na in a matrix. It is straightforwardly comprehensible that Ge (1<sup>st</sup> *IP* = 7.90 eV) and Se (1<sup>st</sup> *IP* = 9.75 eV) are affected by SIE to an unequal extent; the *I*<sub>rel</sub> of <sup>72</sup>Ge/<sup>78</sup>Se (~ 1.09 for SUCH-Na3) in Figure 2b confirms that. Axial signal profiles (data not shown) indicated that the relative suppression of <sup>78</sup>Se signal in the presence of 10 mM NaNO<sub>3</sub> was more severe with decreasing sampling depth compared to the axial profile of germanium, corroborating an SIE-based mechanism.

**Table 3.** Chemical composition of the 1:14 (m/v) soil/10 mM NaNO<sub>3</sub> leachates.

soil leachates	Ca	K	Mg	Na	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	C <sub>total</sub>	P <sub>total</sub>	S <sub>total</sub>
HUM	27.2 ± 1.4	5.6 ± 0.0	3.7 ± 0.3	214 ± 3	7.2 ± 0.7	604 ± 21	1.7 ± 0.3	4.8 ± 0.0	14.6 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.4 ± 0.0
LUK	15.6 ± 1.4	6.2 ± 0.0	2.0 ± 0.4	216 ± 1	4.9 ± 0.8	585 ± 3	1.6 ± 0.0	2.1 ± 0.1	12.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.0
SUCH	43.6 ± 4.6	3.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	205 ± 0	2.1 ± 0.1	598 ± 22	1.8 ± 0.1	3.4 ± 0.0	8.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.6 ± 0.0

[mg L<sup>-1</sup>]

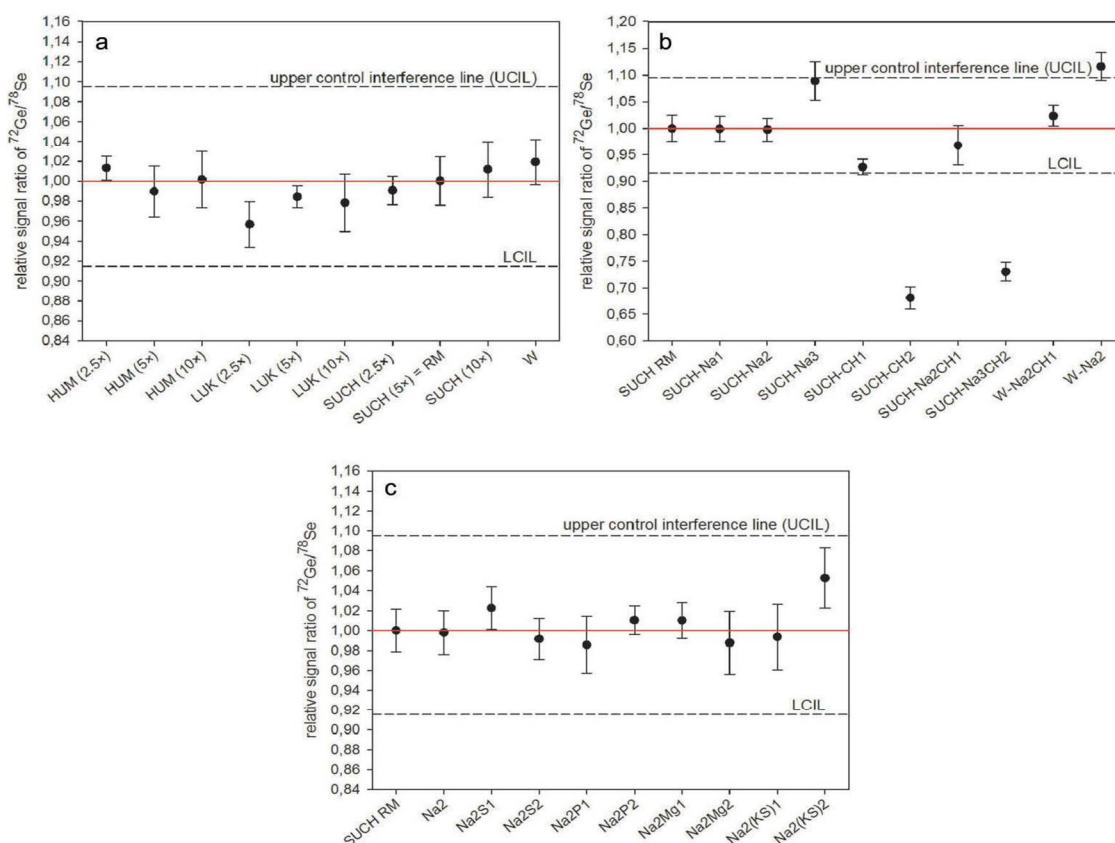


**Figure 1.** Signal intensity ( $I_{\text{abs}}$ ) of  $^{78}\text{Se}$  ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) acquired in (a) different soil leachates and Milli-Q water, (b-c) spiked SUCH-soil leachates or synthetic aqueous matrices as compared to reference matrix, where the number in the parenthesis stands for dilution factor, symbols for treatments are explained in Table 2. The error bars indicate standard deviation ( $n = 3$ ).

Accordingly, the  $I_{\text{rel}}$  of  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  higher than unity (Figure 2b) appears to be inconsistent with so called space-charge effect, because a lighter  $^{72}\text{Ge}^+$  should suffer from defocusing outside the central ion beam with a higher probability (Fraser and Beauchemin 2000; Mariet et al. 2011). Colon et al. (2011) found that relative arsenic ( $^{75}\text{As}$ ) signal suppression (the difference between  $1^{\text{st}} IP_{\text{As}}$  and  $1^{\text{st}} IP_{\text{Se}} < 0.1$  eV) was more pronounced compared to  $^{72}\text{Ge}$  in a matrix containing 217 mM of Na; thus, this observation is in line with our results.

The 0.20% (v/v)  $\text{CHCl}_3$  spike increased  $I_{\text{abs}}$  of  $^{78}\text{Se}$  by 54.1%, while the lower spike rate decreased the enhancing ability to 10.4% (Figure 1b). It should be noted that  $\text{CHCl}_3$  rapidly volatilises from a sample; the tubes were therefore unscrewed just before sample aspiration and this routine was also followed in the sorption experiment. The presence of carbonaceous species ( $\text{C}^+$ ) from  $\text{CHCl}_3$  in the plasma was unambiguously related to the Se sensitivity gain observed at almost any sampling depth (data not shown). The general notation  $\text{Se} + \text{C}^+_{\text{species}} \rightarrow \text{Se}^+ + \text{C}_{\text{species}}$  expresses the underlying mechanism known as charge transfer effect (CTE). Selenium signal enhancements up to a factor of 4 were achieved in the studies conducted at a high concentration of organic carbon ( $\text{C}_{\text{org}}$ ), commonly starting from one order of magnitude higher than in our work (Hu et al. 2004; Kovačević and Goessler 2005; Grindlay et al. 2013). To the best of our knowledge, the CTE for Ge facilitated by  $\text{C}^+_{\text{species}}$  has not yet been described. Our measurement after 0.20% and 0.04% (v/v)  $\text{CHCl}_3$  addition revealed  $I_{\text{rel}}$  values of  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  equal to 0.681 and 0.926, respectively (Figure 2b), implying a specific Se-related effect. We also recorded a slight increase in  $I_{\text{abs}}$  of the  $^{72}\text{Ge}$  signal (5.0%) in the SUCH-CH2 treatment, but an improved sample introduction efficiency in the presence





**Figure 2.** Relative signal intensity ratio ( $I_{rel}$ ) of  $^{72}\text{Ge}$  ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ )/ $^{78}\text{Se}$  ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) acquired in (a) soil leachates and Milli-Q water, (b-c) spiked SUCH-soil leachates or synthetic aqueous matrices as compared to reference matrix, where the number in the parenthesis stands for dilution factor, symbols for treatments are explained in Table 2. The error bars represent the uncertainty of  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  ratio calculated as a sum of particular relative standard deviations ( $n = 3$ ).

of organic solvent cannot be excluded. The treatments combining Na and  $\text{CHCl}_3$  spikes led to a qualitatively predictable additive effect on the resulting  $I_{abs}$  of  $^{78}\text{Se}$  (Figure 1b), whereas the  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  ratio was dictated mainly by  $C_{org}$  (Figure 2b).

A conventional batch sorption experiment involves Se determination both in soil-derived and synthetic aqueous matrices. Unfortunately, the  $I_{rel}$  of  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  measured in the leachates SUCH-Na2 (0.998) and SUCH-Na2CH1 (0.968) compared to correspondent synthetic aqueous matrices W-Na2 (1.12) and W-Na2CH1 (1.02) may discourage the use of Ge for Se signal compensation, despite a five-fold dilution. Hence, we have integrated a full-scale matrix-match approach (MMA) into the sorption experiment, i.e. all samples aspirated into ICP-QMS share the same matrix composition, being a five-fold diluted soil leachate. The combination of MMA and sample dilution provides more robust sorption data regardless of soil properties and plasma conditions, and decreases salt loading of ICP-MS susceptible parts. A considerable negative signal drift exceeding 10% within 2.5 h was occasionally recorded when aspirating soil leachates. A suitable drift compensation, which improved measurement accuracy based on the QC samples and decreased *RSD* values of replicated samples, proved to be the application of two particular coefficients taken as the arithmetic mean of both values. The coefficients were individually calculated for each sample measured based on: (i) monitoring of  $^{72}\text{Ge}$  as an internal standard; and (ii) fifth-order polynomial fitted to  $^{72}\text{Ge}$  signal response over time (data not shown).

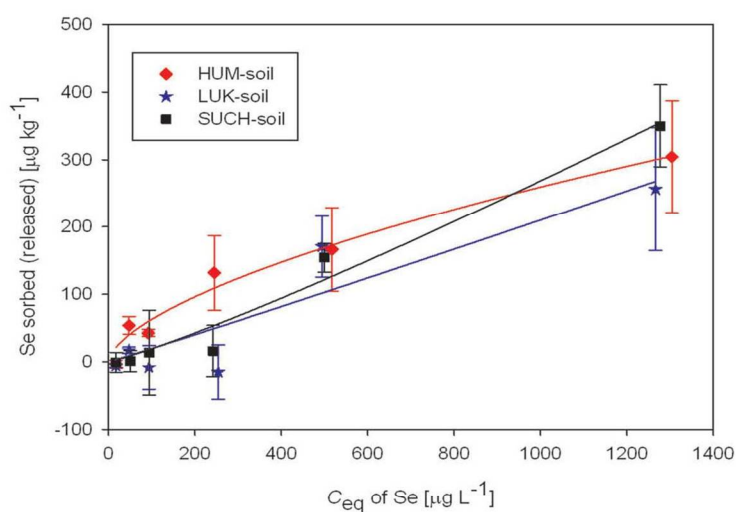
The concentration of individual elements in the RM can be estimated by dividing the values from Table 3 by five. The data in Figures 1c and 2c were acquired after spiking the RM with selected



salts (Table 2). The addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  or  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  did not significantly change any interference parameter evaluated. In the literature,  $\text{S}^+$  and  $\text{P}^+$  were proved to participate in the CTE with Se in the plasma (García-Poyo et al. 2015; Grindlay et al. 2016). However, the S and P concentrations in those studies substantially exceed ours. Both K (2 mM) and Mg (0.80 mM) spikes, each along with Na (2 mM), induced a slight  $^{78}\text{Se}$  suppression, by 4.4% and 5.6%, respectively (Figure 1c). All of the  $I_{\text{rel}}$  ratios lie within the tolerable interval (Figure 2c); furthermore, they allowed the prevailing suppression mechanism forced by EIEs to be deduced. The  $I_{\text{rel}}$  of  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  for Na2(KS)2 treatment deviated noticeably ( $\sim 1.05$ ). The crucial property of the Ge-Se pair fitting that behaviour should be linked to their different 1<sup>st</sup> IP; a mechanism related to SIE may be speculated. On the contrary, the Na2Mg2 treatment impacted both  $^{72}\text{Ge}$  and  $^{78}\text{Se}$  to approximately the same extent, giving an  $I_{\text{rel}}$  ratio of 0.990.

### Sorption experiment

The absence of an apparent sorption plateau (Figure 3) suggests that the available sorption sites were not completely saturated under the conditions employed. The parameters yielded from data fitting into empirical sorption models are shown in Table 4. The '1/n' coefficient belonging to HUM-soil (0.616) gave rise to a different isotherm subtype, with a convex curvature, in contrast to LUK-soil (1.03) and SUCH-soil (1.14), making it difficult to compare  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption between the soils. Based on the coefficient of determination ( $R^2$ ), selenate sorption in HUM- and SUCH-soil was adequately described with the Freundlich isotherm ( $R^2 = 0.973$  and  $0.974$ , respectively). Sorption



**Figure 3.** Selenate sorption in the three experimental soils fitted to Freundlich isotherms (10 mM  $\text{NaNO}_3$ ,  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The error bars indicate standard deviation ( $n = 3$ ).

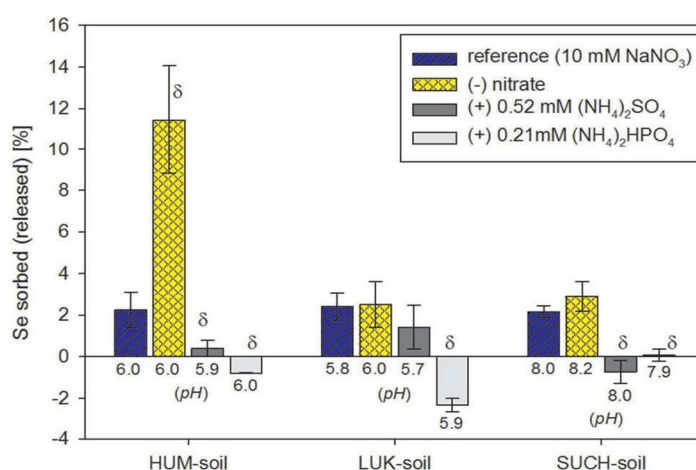
**Table 4.** The parameters of Freundlich isotherm and distribution coefficients ( $K_d$ ) calculated for selenate sorption in the studied soils.

soil	Freundlich isotherm			$C_i$ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]					
	$k_f$	$1/n$	$R^2$	20	50	100	250	500	1250
				distribution coefficient					
[ $\text{L kg}^{-1}$ ]	[ $\text{L kg}^{-1}$ ]			[ $\text{L kg}^{-1}$ ]					
HUM	3.68	0.616	0.973	$-0.19 \pm 0.32$	$1.1 \pm 0.3$	$0.46 \pm 0.06$	$0.54 \pm 0.23$	$0.32 \pm 0.12$	$0.23 \pm 0.06$
LUK	0.170	1.03	0.848	$-0.34 \pm 0.16$	$0.35 \pm 0.10$	$-0.09 \pm 0.35$	$-0.06 \pm 0.16$	$0.35 \pm 0.09$	$0.20 \pm 0.07$
SUCH	0.099	1.14	0.974	$-0.04 \pm 0.82$	$0.01 \pm 0.31$	$0.14 \pm 0.66$	$0.07 \pm 0.16$	$0.31 \pm 0.04$	$0.27 \pm 0.05$

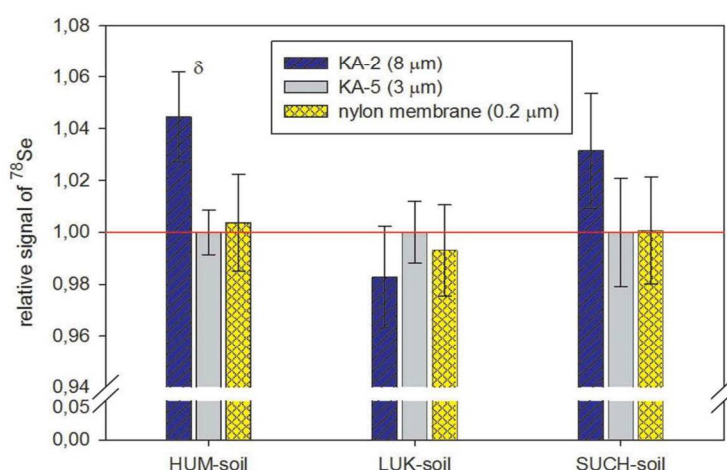
in LUK- and SUCH-soil showed a similar  $Q_{eq}/C_{eq}$  pattern to each other, being obviously sigmoid (Figure 3), although the Freundlich equation fitted poorly to the data for LUK-soil ( $R^2 = 0.848$ ). An S-type curve was also observed by De Abreu et al. (2011), who investigated a tropical soil in suspension with  $SeO_4^{2-}$  at high initial concentrations ( $C_i$ ) in the range of 0.1 to 20 mg L<sup>-1</sup> Se in 30 mM NaNO<sub>3</sub>. Similarly, Pezzarossa et al. (1999) noticed a sigmoid curve for cultivated Mediterranean soils ( $C_i$  were 1 to 100 mg L<sup>-1</sup> Se without any ionic strength adjustment). Shaheen et al. (2013) reported the advantage that the  $K_d$  approach can provide in complex sorption systems, where competition for sorption sites exerts a strong influence on sorption equilibrium. As a consequence, the fitting of a simple empirical model, such as the Freundlich isotherm, can be hampered as is obvious in the case of LUK-soil at low  $C_i$  of  $SeO_4^{2-}$  (Figure 3). The lowest  $K_d$  values at the lowest  $C_i$  (Table 4) support the irrelevance of the kinetically controlled abiotic reduction of  $SeO_4^{2-}$  to strongly sorbing selenite ( $SeO_3^{2-}$ ) in the course of the experiment. Bruggeman et al. (2007) found the long-term stability of  $SeO_4^{2-}$  in a microorganism-free aqueous alkaline medium containing dissolved humic substances, even at a low redox potential of about 0 mV, implying an inconsistency between real and predicted Se speciation based on thermodynamic calculations. Another benefit of the  $K_d$  approach consists of the possibility of distinguishing the participation of high and low affinity sorption sites in dependence on  $C_i$  of a sorbate (Shaheen et al. 2013). Thus, it may help to interpret the difference in sorption behaviour at  $C_i \leq 250 \mu\text{g L}^{-1}$  Se between both Cambisols (Figure 3), exhibiting limited differences in both bulk physicochemical characteristics (Table 1) and corresponding aqueous leachates (Table 3). We suppose that the underlying phenomenon may be related to a single or combined effect of (i) a higher saturation degree of high affinity sorption sites with phosphate species in LUK-soil, which can be estimated from *DPS* index (Eich-Greatorex et al. 2010), leaving a lower capacity to retain  $SeO_4^{2-}$  at a low  $C_i$ . (ii) An enhanced formation of ion pairs in HUM-soil (a higher concentration of Ca and Mg in its leachate) may facilitate the interaction between  $SeO_4^{2-}$  and negatively charged surface sites. Although  $CaSeO_4$  (aq) and  $MgSeO_4$  (aq) have a relatively low stability constant ( $pK_s \sim 2.0$  and 2.2, respectively), the consequences of such a complexation in environmental studies have been already noticed (Parker et al. 1997). (iii) Soil organic matter such as coatings on mineral grains and/or competitive effects of dissolved organic species may prevent  $SeO_4^{2-}$  sorption, the highest water-extractable C content in LUK-soil supports that assumption. The  $K_d(SeO_4^{2-})$  values at higher  $C_i$  ( $\geq 500 \mu\text{g L}^{-1}$  Se) for the three soils resemble each other (Table 4). A similar equalising effect on  $K_d$  with increasing  $C_i$  of  $SeO_4^{2-}$  was remarked by Loffredo et al. (2011) for two soils. Moreover, these researchers demonstrated an Al hydroxide as a viable sorption component in alkaline media, which helps to explain how alkaline SUCH-soil can retain  $SeO_4^{2-}$  abiotically.

At a  $C_i$  of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  Se, the induced anion competitions impacted  $SeO_4^{2-}$  retention to a different extent among the soils (Figure 4). Sulphate ( $SO_4^{2-}$ ) significantly inhibited  $SeO_4^{2-}$  sorption in HUM- and SUCH-soil. In addition, an amount of native soil Se released in the latter soil has yielded a negative net balance of Se retention. Discussion of the stronger  $SO_4^{2-}/SeO_4^{2-}$  competition operating in HUM-soil compared to LUK-soil offers three explanations, corroborating all of the three above assumptions. Namely, (i) sulphate competes with  $SeO_4^{2-}$  for high affinity sorption sites in HUM-soil, whereas this type of site is already occupied in HUM-soil by strongly sorbing phosphates; ii) the formation of ion-pairs such as  $CaSO_4$  (aq) with  $pK_s \sim 2.3$  (Parker et al. 1997) competes with  $CaSeO_4$  (aq) for  $Ca^{2+}$  in HUM-soil more severely than in LUK-soil; and iii) dissolved  $C_{org}$  in LUK-soil prevents  $SeO_4^{2-}$  from retention in a manner where  $SO_4^{2-}$  addition did not induce an additional inhibitory effect. Noteworthy, in the sorption experiment conducted without NaNO<sub>3</sub> addition, a significant increase in  $SeO_4^{2-}$  retention was observed only in HUM-soil (Figure 4), suggesting that non-specifically-sorbing NO<sub>3</sub><sup>-</sup> occupied a considerable portion of anion exchange capacity in this soil. None of the Se-amended soils exposed to 0.21 mM phosphate showed a positive net balance of Se retention; evidently, Se solubilisation and/or desorption from native soil pool have dominated at that phosphate concentration. Analogously, Zhang et al. (2017) reported a decrease in soil exchangeable Se, iron oxide-bound Se, and organic matter-bound Se after





**Figure 4.** Influence of anions in background electrolyte on  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption in the three soils if exposed to  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  Se. The values below the bars represent individual equilibrium pH. The error bars indicate standard deviation ( $n = 3$ ). The Greek letter  $\delta$  indicates the significantly different values from the value characterizing sorption in the reference treatment of a given soil (paired t-test at a 0.05 significance level).



**Figure 5.** Ability of three different filters to affect the Se concentration measured in a sample leaving centrifuge at the end of the sorption experiment ( $C_i = 500 \mu\text{g L}^{-1}$  Se). The error bars indicate standard deviation ( $n = 3$ ). The Greek letter  $\delta$  indicates the significantly different values from the value acquired after using KA-5 filter as the reference treatment of a given soil (paired t-test at a 0.05 significance level).

phosphate application in a pot experiment. Our findings confirmed a stronger phosphate inhibitory effect on the build-up of Se in a soil in comparison to  $\text{SO}_4^{2-}$ , as found by Goh and Lim (2004) at an equal concentration ( $< 2 \text{ mM}$ ) of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ . Figure 5 examines the relative Se concentration determined in filtered samples, as impacted by the filter's particle capture ability. The use of the KA-5 filter ( $\geq 3 \mu\text{m}$ ) did not bias sorption data as against a  $0.2 \mu\text{m}$  membrane filter. The efficiency of the KA-2 filter ( $\geq 8 \mu\text{m}$ ) seems to be insufficient, at least for HUM-soil, which indicates the importance of  $\mu\text{m}$ -sized soil particles for  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption. However, even smaller colloidal particles including dissolved organic matter have been also documented as carriers of oxyanions (Chen et al. 2008; Kamei-Ishikawa et al. 2008).

Several soils with  $K_d(\text{SeO}_4^{2-})$  ranging from 0.1 to  $2 \text{ L kg}^{-1}$ , as in our study, have been reported worldwide (Eich-Greatorex et al. 2010; De Abreu et al. 2011; Gabos et al. 2014; Lessa et al. 2016). Essential soil characteristics at least indirectly related to the amount of available sorption sites may

occasionally appear useful as explanatory variables in those studies, particularly among highly contrasting soils. Nevertheless, our results imply that abiotic  $\text{SeO}_4^{2-}$  retention may be barely assignable to individual basic soil characteristics. Finally, we support the conclusion of Eich-Greatorex et al. (2010) who emphasised the effect of P soil status on Se availability from selenate. We suggest that the  $\text{SeO}_4^{2-}$  retention is spatially limited to those soil particles which are not: i) saturated with phosphate; and ii) in contact with soil solutions rich in sulphate and phosphate, typically after the application of S and P fertilisers.

### **Sorption data reliability**

Although the sorption experiment was only performed in triplicate, the final batches were preceded by a number of testing batches where the whole experimental procedure was optimised to achieve the lowest possible *RSD* of replicated samples. Nevertheless, it can be easily calculated that even a small uncertainty in  $C_{\text{eq}}$  measurement may produce considerable *RSD* of  $K_d$ . The precision of  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption data, as presented in this study, approaches count statistics following on from ICP-QMS at a given Se level, implying that a better precision would be hardly attainable using this analytical technique. The spiking procedure described in the method section yielded an Se concentration of  $3.9 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 3$ ), demonstrating acceptable trueness of Se determination in soil-derived matrices.

### **Conclusion**

The selenium signal acquired in diluted soil-derived aqueous matrices by ICP-QMS suffered mostly from an insignificant suppression effect. Nevertheless, sodium salt (10 mM) and chloroform (0.20% v/v) added to the soil suspension to adjust the conditions of the batch sorption experiment induced serious non-spectral interferences. An external calibration in conjunction with a sample dilution and Ge internal standardisation did not avoid the risk of systematically biased  $\text{SeO}_4^{2-}$  sorption data. Thus, the matrix-match approach had to be integrated into whole experimental design. The experimental soils differed in the ability to retain  $\text{SeO}_4^{2-}$  if exposed to lower Se concentrations (20–250  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), exhibiting contrasting sorption pattern even in two Cambisols resembling their physicochemical characteristics. At higher  $\text{SeO}_4^{2-}$  concentrations (500–1250  $\mu\text{g L}^{-1}$  Se), the relative variability in sorption among soils decreased, peaking at 350  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$  in Chernozem. The phenomena at the solid-liquid interface in individual soils, which are not accessible for evaluation at a macroscopic level, were reflected in different extent of  $\text{SeO}_4^{2-}$  competition with sulphate and nitrate for sorption sites. Phosphate co-application with  $\text{SeO}_4^{2-}$  led to a net Se release from the soil native pool in all three soils. The fast abiotic soil retention of freshly applied  $\text{SeO}_4^{2-}$  may reduce Se loss caused by leaching away from the topsoil; however, this soil's ability is strongly conditioned by the S and P soil status.

### **Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### **Funding**

This work was supported by the Czech University of Life Sciences Prague [CIGA no. 20162025].

### **ORCID**

Jiřina Száková  <http://orcid.org/0000-0002-3390-6365>



## References

- [AMC] Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry. 1987. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*. 112:199–204.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012. ISO 12914:2012 Soil quality – microwave-assisted extraction of the aqua regia soluble fraction for the determination of elements. Geneva, Switzerland: ISO.
- Agatemor C, Beauchemin D. 2011. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta*. 706:66–83.
- Alfthan G, Eurola M, Ekholm P, Venäläinen ER, Root R, Korkalainen K, Hartikainen H, Salminen P, Hietaniemi V, Aspila P, et al. 2015. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: from deficiency to optimal selenium status of the population. *J Trace Elem Med Bio*. 31:142–147.
- Ali F, Peng Q, Wang D, Cui Z, Huang J, Fu D, Liang D. 2017. Effects of selenite and selenate application on distribution and transformation of selenium fractions in soil and its bioavailability for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Sci Pollut Res*. 24:8315–8325.
- Bruggeman C, Maes A, Vancluysen J. 2007. The interaction of dissolved Boom Clay and Gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). *Appl Geochem*. 22:1371–1379.
- Chen Z, Cai Y, Liu G, Solo-Gabriele H, Snyder GH, Cisar JL. 2008. Role of soil-derived dissolved substances in arsenic transport and transformation in laboratory experiments. *Sci Total Environ*. 406:180–189.
- Colon M, Hidalgo M, Iglesias M. 2011. Arsenic determination by ICP-QMS with octopole collision/reaction cell. Overcome of matrix effects under vented and pressurized cell conditions. *Talanta*. 85:1941–1947.
- De Abreu LB, Carvalho GS, Curi N, Guilherme LRG, Marques JJGSM. 2011. [Selenium sorption in soils of the Cerrado biome]. *Rev Bras Cienc Solo*. 35:1995–2003. Portuguese.
- Eich-Greatorex S, Krogstad T, Sogn TA. 2010. Effect of phosphorus status of the soil on selenium availability. *J Soil Sci Plant Nut*. 173:337–344.
- Elzinga EJ, Tang Y, McDonald J, DeSisto S, Reeder RJ. 2009. Macroscopic and spectroscopic characterization of selenate, selenite, and chromate adsorption at the solid-water interface of  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . *J Colloid Interf Sci*. 340:153–159.
- Fraser MM, Beauchemin D. 2000. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectrometry. Part 1. Elemental ions. *Spectrochim Acta B*. 55:1705–1731.
- Fraser MM, Beauchemin D. 2001. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma mass spectrometry – part 2: polyatomic ions. *Spectrochim Acta B*. 56:2479–2495.
- Gabos MB, Goldberg S, Alleoni LRF. 2014. Modeling selenium (IV and VI) adsorption envelopes in selected tropical soils using the constant capacitance model. *Environ Toxicol Chem*. 33:2197–2207.
- García-Poyo MC, Grindlay G, Gras L, De Loos-Vollebregt MTC, Mora J. 2015. Non-spectral interferences due to the presence of sulfuric acid in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta B*. 105:71–76.
- García-Sánchez L, Loffredo N, Mounier S, Martin-Garin A, Coppin F. 2014. Kinetics of selenate sorption in soil as influenced by biotic and abiotic conditions: a stirred flow-through reactor study. *J Environ Radioactiv*. 138:38–49.
- Goh KH, Lim TT. 2004. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere*. 55:849–859.
- Grindlay G, Gras L, Mora J, De Loos-Vollebregt MTC. 2016. Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochim Acta B*. 115:8–15.
- Grindlay G, Mora J, De Loos-Vollebregt M, Vanhaecke F. 2013. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochim Acta B*. 86:42–49.
- Guo W, Hu S, Wang Y, Zhang L, Hu Z, Zhang J. 2013. Trace determination of selenium in biological samples by  $\text{CH}_4$ -Ar mixed gas plasma DRC-ICP-MS. *Microchem J*. 108:106–112.
- Hu Z, Hu S, Gao S, Liu Y, Lin S. 2004. Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. *Spectrochim Acta B*. 59:1463–1470.
- Kamei-Ishikawa N, Nakamaru Y, Tagami K, Uchida S. 2008. Sorption behavior of selenium on humic acid under increasing selenium concentration or increasing solid/liquid ration. *J Environ Radioactiv*. 99:993–1002.
- Kikkert J, Berkelaar E. 2013. Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65:458–465.
- Kovačević M, Goessler W. 2005. Direct introduction of volatile carbon compounds into the spray chamber of an inductively coupled plasma mass spectrometer: sensitivity enhancement for selenium. *Spectrochim Acta B*. 60:1357–1362.
- Lessa JHL, Araujo AM, Silva GNT, Guilherme LRG, Lopes G. 2016. Adsorption-desorption reactions of selenium (VI) in tropical cultivated and uncultivated soils under Cerrado biome. *Chemosphere*. 164:271–277.
- Li J, Peng Q, Liang D, Liang S, Chen J, Sun H, Li S, Lei P. 2016. Effects of aging on the fraction distribution and bioavailability of selenium in three different soils. *Chemosphere*. 144:2351–2359.
- Loffredo N, Mounier S, Thiry Y, Coppin F. 2011. Sorption of selenate on soils and pure phases: kinetic parameters and stabilisation. *J Environ Radioactiv*. 102:843–851.
- Mariet C, Carrot F, Moskura M. 2011. Effect of sample matrix on radial and axial profiles of ion abundance in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Am J Analyt Chem*. 2:739–751.

- Mercl F, Tejnecký V, Száková J, Hubová P, Tlustoš P. 2017. Influence of Rhizon NOM suction cup and *Triticum aestivum* L. on the concentration of organic and inorganic anions in soil solution. *J Soil Sediment*. 17:820–826.
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ*. 400:115–141.
- Parker DR, Tice KR, Thomason DN. 1997. Effects of ion pairing with calcium and magnesium on selenate availability to higher plants. *Environ Toxicol Chem*. 16:565–571.
- Pezzarossa B, Piccotino D, Petruzzelli G. 1999. Sorption and desorption of selenium in different soils of the mediterranean area. *Commun Soil Sci Plan*. 30:2669–2679.
- Ros GH, Van Rotterdam AMD, Bussink DW, Bindraban PS. 2016. Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: an agro-ecosystem approach. *Plant Soil*. 404:99–112.
- Shaheen SM, Tsadilas CD, Rinklebe J. 2013. A review of the distribution coefficients of trace elements in soils: influence of sorption system, element characteristics, and soil colloidal properties. *Adv Colloid Interface Sci*. 201-202:43–56.
- Sheldrick BH. 1984. Acid ammonium oxalate extractable Fe and Al. In: Sheldrick BH, editor. *Analytical methods manual* 1984. Ottawa: Land Resource Research Institute, Agriculture Canada Research Branch; p. 11/1–11/3.
- Smažiková P, Praus L, Száková J, Tremlová J, Hanč A, Tlustoš P. 2017. The effect of organic matter rich amendments on selenium mobility in soil. *Pedosphere*. [accessed 2017 Oct 30]. [[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60444-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60444-2)]
- Söderlund M, Virkanen J, Holgersson S, Lehto J. 2016. Sorption and speciation of selenium in boreal forest soil. *J Environ Radioactiv*. 164:220–231.
- Stroud JL, Li HF, Lopez-Bellido FJ, Broadley MR, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Hart DJ, Hurst R, Knott P, Mowat H, et al. 2010. Impact of sulphur fertilisation on crop response to selenium fertilisation. *Plant Soil*. 332:31–40.
- Supriatin S, Weng L, Comans RNJ. 2015. Selenium speciation and extractability in Dutch agricultural soils. *Sci Total Environ*. 532:368–382.
- Tolu J, Thiry Y, Bueno M, Jolivet C, Potin-Gautier M, Le Hécho I. 2014. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils, from mineral to organic rich. *Sci Total Environ*. 479-480:93–101.
- Tremblay G, Bélanger G, Lajeunesse J, Chouinard PY, Charbonneau É. 2015. Timothy response to increasing rates of selenium fertilizer in Eastern Canada. *Agron J*. 107:211–220.
- Van Der Zee SEATM, Van Riemsdijk WH. 1988. Model for long-term phosphate reaction kinetics in soil. *J Environ Qual*. 17:35–41.
- Wang D, Zhou F, Yang W, Peng Q, Man N, Liang D. 2017. Selenate redistribution during aging in different Chinese soils and the dominant influential factors. *Chemosphere*. 182:284–292.
- Wu CH, Lo SL, Lin CF. 2000. Competitive adsorption of molybdate, chromate, sulfate, selenate, and selenite on  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . *Colloid Surface A*. 166:251–259.
- Zhang D, Dong T, Ye J, Hou Z. 2017. Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by coapplication of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Sci Plant Nutr*. 63:37–44.
- Zhang N, Gang DD, McDonald L, Lin LS. 2018. Background electrolytes and pH effects on selenate adsorption using iron-impregnated granular activated carbon and surface binding mechanisms. *Chemosphere*. 195:166–174.

## 4.2 PUBLIKACE II

Praus, L., Száková, J. 2019. Role of sulphate in affecting soil availability of exogenous selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) under different statuses of soil microbial activity. *Plant, Soil, Environment*. 65 (9). 470-476.



## Role of sulphate in affecting soil availability of exogenous selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) under different statuses of soil microbial activity

LUKÁŠ PRAUS\*, JIŘINA SZÁKOVÁ

Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

\*Corresponding author: [prausl@af.czu.cz](mailto:prausl@af.czu.cz)

**Citation:** Praus L., Száková J. (2019): Role of sulphate in affecting soil availability of exogenous selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) under different statuses of soil microbial activity. *Plant Soil Environ.*, 65: 470–476.

**Abstract:** We investigated sulphate application, different statuses of soil microbial activity and their joint effects as variables associated with changes in potentially plant-available selenium ( $\text{Se}_{\text{ppa}}$ ) and soil Se fractionation during the course of an incubation study. The time-resolved behaviour of added selenate ( $400 \mu\text{g Se/kg as Na}_2\text{SeO}_4$ ) in two agricultural soils was elucidated by means of single extraction ( $50 \text{ mmol/L NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), sequential extraction procedure (SEP) and chemical speciation analysis in phosphate extracts. The decrease in phosphate-extractable Se, a consequence of soil aging, was inhibited by sulphate (by 34% and 29% in Chernozem and Cambisol, respectively) and by gamma-irradiation (by 46% and 20% in Chernozem and Cambisol, respectively) after 72 days of incubation as compared to the control treatments. Glucose amendment dramatically decreased  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  only in the Chernozem. After 1 year, the initial soil treatment with respect to inhibited or stimulated microbially-mediated processes substantially controlled the distribution pattern of exogenous Se as observed using the SEP. Application of sulphur fertilisers and sources of labile organic matter is thus an essential agronomic practice to correct unfavourable amounts of  $\text{Se}_{\text{ppa}}$ .

**Keywords:** micronutrient; soil extraction; immobilisation; bioreduction; anion competition; sterilisation

Human health issues in both seleniferous and selenium (Se)-deficient areas are primarily related to the amount of Se available in the soil (Fordyce 2013). Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) represents a chemical species for effective crop biofortification with Se (Hawkesford and Zhao 2007, Ducsay et al. 2016); on the other hand, it poses a risk due to its high mobility in the soil environment, especially under oxidising and alkaline pH conditions (Nakamaru and Altansuvd 2014). Once exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  emerges in a soil (fertilisation or contamination event), its redox stability depends on the soil pH, redox potential (Eh), microbial activity, and microbial community structure (Fellowes et al. 2013, Nakamaru and Altansuvd 2014). The conversion of  $\text{SeO}_4^{2-}$  to selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), elemental Se ( $\text{Se}^0$ ) or even selenide ( $\text{Se}^{2-}$ ) is an integral part of soil aging and decreases the bioavailability of Se in soil (Li et al. 2016). Several weeks up to months after

$\text{SeO}_4^{2-}$  input into soil,  $\text{SeO}_4^{2-}$  can still be detected in various extracts as the predominant Se species (Keskinen et al. 2010, Fellowes et al. 2013, Wang et al. 2019). Moreover, it may last up to several decades, until the exogenous Se merges into the native distribution in soil (Wang et al. 2017). It has been well documented that sulphate oxyanion and organic matter sources may interfere with  $\text{SeO}_4^{2-}$  behaviour in soil in both a microbial-driven (Aguilar-Barajas et al. 2011, Fellowes et al. 2013, Wang et al. 2019) and an abiotic manner (Goh and Lim 2004, Favorito et al. 2018, Praus et al. 2019b). Thus, it is essential to explore the impacts of agronomic practices on the fate of exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  and potentially plant-available selenium ( $\text{Se}_{\text{ppa}}$ ) in particular soils.

Against this background, the objective of the present study is to elucidate the effects of added sulphate and labile organic matter on temporal changes in the

Supported by the European Regional Development Fund, Project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000845, and by the Czech University of Life Sciences Prague, Project No. CIGA 20172019.



<https://doi.org/10.17221/397/2019-PSE>

availability of exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  in soil. We designed an incubation experiment on two arable soils to address the following hypotheses: (i) distinct statuses of soil microbial activity largely control the stabilisation of exogenous Se in soil aging processes; (ii) sulphate inhibits  $\text{SeO}_4^{2-}$  from entering unavailable Se reserves in soil; (iii) both labile organic matter and sulphate amendments significantly alter the Se chemical fractionation in soil.

## MATERIAL AND METHODS

**Soils and soil analysis.** Two arable soils, a Chernozem (silty loam) and a Cambisol (sandy loam), were collected from the topsoil (0–20 cm) at experimental stations in Prague-Suchdol and Humpolec, respectively, both in the Czech Republic. The soils were air-dried in an oven at 35°C and passed through a 2-mm sieve. Following the soil pretreatment, 6 kg of each soil were obtained for soil characterisation and the incubation experiment. Soil  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  at a solid:liquid ratio of 1:5 (*w/w*) was 8.1 and 5.6 for Chernozem and Cambisol, respectively. The other chemical characteristics were as follows:  $\text{Se}_{\text{aqua regia}}$  347 and 219  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $\text{Fe}_{\text{ammonium oxalate}}$  1617 and 4461  $\text{mg}/\text{kg}$ ;  $\text{Al}_{\text{ammonium oxalate}}$  1372 and 1814  $\text{mg}/\text{kg}$ ;  $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}}$  62 and 102  $\text{mg}/\text{kg}$ ;  $\text{S}_{\text{H}_2\text{O}}$  15 and 22  $\text{mg}/\text{kg}$ ;  $\text{P}_{\text{Mehlich 3}}$  96 and 89  $\text{mg}/\text{kg}$ , in Chernozem and Cambisol, respectively. The description of the methods employed and additional physicochemical properties of the soils can be found in Praus et al. (2019a, In Press).

**Incubation experiment.** The thoroughly homogenised soil samples were weighed into 18 polyethylene vessels (per soil type) in an amount equivalent to 150 g dry weight (DW). As indicated in Table 1, six of the vessels (per soil type) were exposed to 27 kGy of  $\gamma$ -irradiation (cobalt-60). Individual aqueous solutions of  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , glucose and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  were prepared and mixed in a manner that the spraying of these solutions provided the soil treatments described in Table 1. Soil moisture was set to 55% of water-holding capacity by the addition of high-purity water (HPW). Sealed vessels, in triplicate per treatment, were incubated at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  under light/dark (8 h/16 h) cycles for 10 weeks. To maintain aerobic or semi-aerobic conditions, gas exchange between the vessel interior and the ambient atmosphere was allowed once a week. Irradiated treatments were strictly manipulated in a laminar flow box using a flame-sterilised stainless-steel spoon. After 1.5, 8.5, 24 and 72 days of incubation, ~15 g of

moist soil were withdrawn from each vessel for the determination of the parameters of interest.

### Soil analysis over a 10-week incubation period.

Four grams of each treatment were weighed into a 50-mL polypropylene centrifuge tube and shaken with 24 mL of 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (without pH adjustment) on a reciprocating shaker (200 rpm) for 2 h. The soil suspensions were then centrifuged ( $7000 \times g$ ) for 10 min and filtered (KA-5 paper; particle capture of  $\geq 3 \mu\text{m}$ , Papírna Perštejn, Perštejn, Czech Republic). The selenium concentration in 5-fold diluted (HPW) filtrates was measured using inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICPMS; Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), operated in helium mode. Quality control for the determination of Se was performed by analysing a standard reference material (SRM 1640a, Trace Elements in Natural Water, NIST). Selected 50 mmol/L phosphate extracts sampled during the 1<sup>st</sup> and the 4<sup>th</sup> campaign were subjected to inorganic Se speciation analysis conducted on the same day as the extraction. First, an aliquot of the extract was filtered (0.20  $\mu\text{m}$ , NYLON) and 2.5-fold diluted (HPW); 1 mL of the filtrate was pipetted into a 1.5-mL glass vial for Se speciation analysis. The concentration of total Se in the remaining filtrate was measured by ICPMS. Anion exchange high-performance liquid chromatography (AE-HPLC), coupled to ICPMS via a PEEK capillary tubing, was used for Se speciation. Standard solutions of 0.5, 2, 5, 20, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  Se of both selenate ( $\text{Se}^{\text{VI}}$ ) and selenite ( $\text{Se}^{\text{IV}}$ ) were prepared by dissolution and dilution of  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (Fluka, Neu-Ulm, Germany) with HPW. The chromatography system (Agilent 1260, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) was equipped with an analytical

Table 1. Supply of elements to individual treatments of the incubation experiment

Treatment ( <i>n</i> = 3)	Se ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	S P C N ( $\text{mg}/\text{kg}$ )			
		Control	400	–	–
$\text{S}_{100}$	400	100	–	–	–
$\text{S}_{50}\text{P}_{50}$	400	50	50	–	–
$\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$	400	50	50	440	44
$\gamma$ -control	400	–	–	–	–
$\gamma$ - $\text{S}_{100}$	400	100	–	–	–

column Hamilton PRP-X100 (150 mm × 4.6 mm, 10 µm; Hamilton Company, Reno, USA), which was isocratically eluted (1.00 mL/min) by an aqueous mobile phase (pH 8.5) containing 25 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Supriatin et al. 2015). The sample injection volume was 100 µL, and the column was heated to 30°C. Soil  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  and DW were monitored throughout the incubation period.

**Fractionation of soil Se using sequential extraction.** After the last sampling in week 10, five soil treatments in triplicate (per soil type) were allowed to age for another 52 weeks. In addition to the treatment described above, the soils were moistened twice to avoid dryness. We used a slightly modified sequential extraction procedure (SEP) proposed by Wright et al. (2003) and tested by Keskinen et al. (2009) to estimate soil biogeochemical fractions with which exogenous Se was associated at the end of the incubation. Soil aliquots (~2.5 g) were successively extracted with 10 mL of the following solutions: (i) 100 mmol/L KCl for 1 h (soluble Se); (ii) 100 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  at pH 8.0 for 2 h (adsorbed Se); (iii) 100 mmol/L NaOH for 3 h (organically associated Se); (iv) 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  at pH 7 for 4 h (elemental Se); (v) *aqua regia* at 180°C for 18 min (residual Se). During the first four steps, the suspensions were shaken on a tube rotator (30 rpm,  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and subsequently centrifuged ( $2680 \times g$  for 10 min) and filtered (KA-5 paper). Soil samples were rinsed with 10 mL of 100 mmol/L KCl between individual steps, and the rinse was added to the extract of the preceding step. Oven-dried (35°C) reweighed soil residues arising from step four were exposed to *aqua regia* microwave-assisted digestion (Discover SP-D, CEM Corp., Matthews, USA). All supernatants were diluted up to 20-fold (HPW) and analysed for Se by ICPMS. Native (non-incubated) soils were also subjected to the same SEP for comparison.

**Statistical analysis.** The statistical significance of differences between  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  determined in a given treatment at  $t_{1.5\text{d}}$  and the referential  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  estimated for  $t_0$  in a given soil was tested using a one-sample *t*-test. The statistical significance of differences in  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  (i) among soil treatments at a given sampling time and (ii) among soils of a given treatment sampled at  $t_{1.5\text{d}}-t_{72\text{d}}$  were evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Holm-Sidak's multiple comparison post-hoc test. The *P*-values < 0.05 were considered significant. All statistical analyses were executed using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

Soil extraction using phosphate anions is useful in monitoring changes in the potentially plant-available selenium reserves (Keskinen et al. 2010). The estimated  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  immediately after  $\text{SeO}_4^{2-}$  input into both experimental soils (at time  $t_0$ ) is depicted by horizontal dashed lines in Figure 1 (the sum of  $\text{Se}_{\text{KCl}}$  and  $\text{Se}_{\text{P}_2\text{O}_4}$  from native soils (Table 2), plus the addition of 400 µg/kg Se in the form of  $\text{SeO}_4^{2-}$ ). In both soils,  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  recovered at  $t_{1.5\text{d}}$  did not significantly differ from the estimated  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  at  $t_0$ . In general,  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  decreased progressively with incubation time, regardless of soil type and treatment (Figure 1). The reduction in  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  in acidic Cambisol became significant in a shorter time as compared to Chernozem. Interestingly, comparing only the percentage of decline in  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  between  $t_0$  and  $t_{72\text{d}}$  in both soils brought unexpectedly consistent results; the declines were 30–31% for control treatments, 20–21% for  $S_{100}$  and 26% for  $S_{50}P_{50}$ . When the same comparison was performed for treatments where microbial activity had been induced/suppressed, the declines for Chernozem and Cambisol were different (77% and 38% for  $S_{50}P_{50}C_{440}N_{44}$ , 17% and 24% for the  $\gamma$ -control, respectively). Sulphate addition to  $\gamma$ -irradiated soils smoothed out the differences in  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  between both soils. The results of the one-way ANOVA executed on extraction data collected from individual soil treatments at the same sampling time are not shown because the differences among treatments were predominantly insignificant. Nevertheless, there were some noteworthy relationships between soil treatment and  $\text{Se}_{\text{ppa}}$ . Firstly, sulphate addition ( $S_{100}$ ) suppressed the conversion of exogenous Se to an unavailable soil reserve in both soils (Figure 1), namely by up to 48 µg Se/kg in Cambisol ( $t_{24\text{d}}$ ) and up to 45 µg Se/kg in Chernozem ( $t_{72\text{d}}$ ) as compared to the corresponding control treatments. Combined amendment ( $S_{50}P_{50}$ ) followed the effect of sulphate ( $S_{100}$ ), but at a lower intensity. Easily available sources of C and N ( $S_{50}P_{50}C_{440}N_{44}$ ) to soil microorganisms decreased  $\text{Se}_{\text{ppa}}$  dramatically only in the Chernozem, as early as at  $t_{8.5\text{d}}$ . On the contrary,  $\gamma$ -rays ( $\gamma$ -control) decreased irreversible Se immobilisation by up to 62 µg Se/kg in Chernozem ( $t_{72\text{d}}$ ) and by up to 38 µg Se/kg in Cambisol ( $t_{24\text{d}}$ ) as compared to non-irradiated controls. The addition of sulphate to  $\gamma$ -irradiated soil ( $\gamma$ - $S_{100}$ ) did not intensify the effect of  $\gamma$ -rays. Table 3 depicts the proportional distribution of  $\text{SeO}_4^{2-}$  and  $\text{SeO}_3^{2-}$  in 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  soil extracts from the incuba-



<https://doi.org/10.17221/397/2019-PSE>

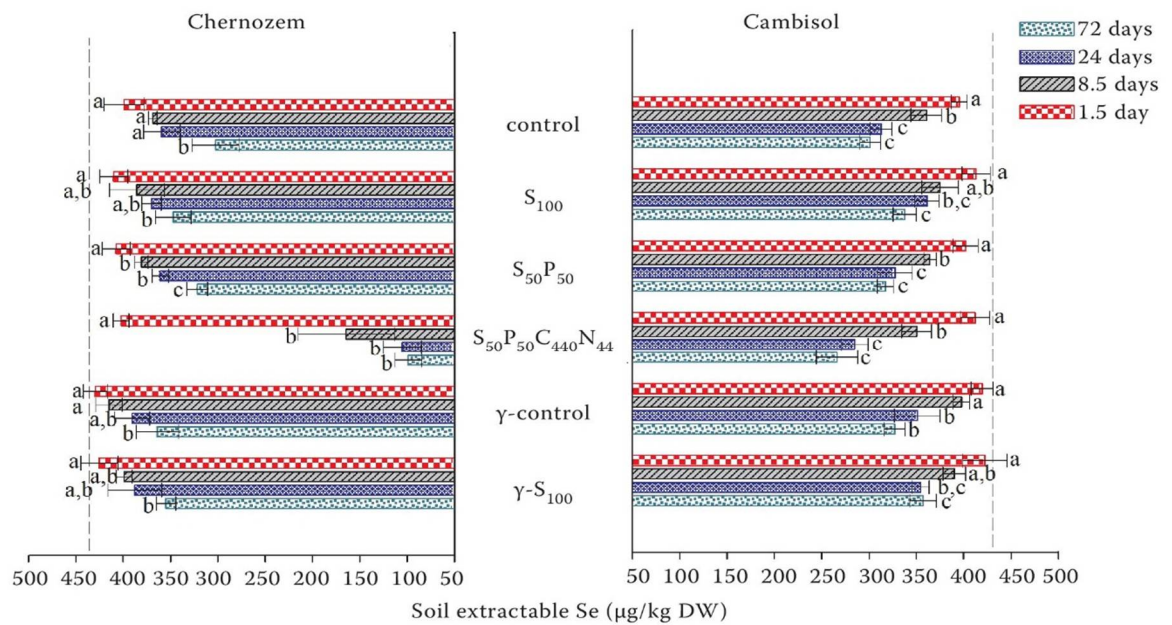


Figure 1. Selenium (Se) extractable with 50 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  from individual soil treatments at four different sampling times. Different letters indicate significant differences among Se extractabilities determined in a given soil and a given treatment at different sampling times. Vertical dashed lines represent an estimation of phosphate-extractable Se at  $t_0$ . DW – dry weight

tion experiment. The amounts of  $\text{Se}^{(\text{VI})}$  and  $\text{Se}^{(\text{IV})}$  extracted at  $t_{1.5\text{d}}$ , regardless of the soil treatment ( $n = 4$ ), were  $390 \pm 11 \mu\text{g}/\text{kg}$  and  $7 \pm 0 \mu\text{g}/\text{kg}$  in Cambisol

and  $374 \pm 15 \mu\text{g}/\text{kg}$  and  $9 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$  in Chernozem, respectively. These results imply a short-term stability of  $\text{SeO}_4^{2-}$  in both soils and an acceptable procedural

Table 2. Soil selenium (Se) fractions operationally defined by a sequential extraction procedure

Treatment ( $n = 3$ )	KCl- extractable	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - extractable	NaOH- extractable	$\text{Na}_2\text{SO}_3$ - extractable	Aqua regia- extractable
<b>Chernozem</b>					
Control	206 ± 12	68 ± 4	287 ± 18	16 ± 3	168 ± 18
$S_{100}$	271 ± 22	26 ± 2	216 ± 15	7 ± 1	182 ± 15
$S_{50}P_{50}C_{440}N_{44}$	20 ± 10	68 ± 7	289 ± 14	34 ± 2	172 ± 21
$\gamma$ -control	333 ± 28	30 ± 2	206 ± 21	0 ± 0	162 ± 13
$\gamma$ - $S_{100}$	293 ± 24	30 ± 3	182 ± 12	0 ± 0	166 ± 4
Native soil	11 ± 1	25 ± 0	157 ± 1	1 ± 1	162 ± 8
<b>Cambisol</b>					
Control	163 ± 19	73 ± 8	174 ± 10	12 ± 0	203 ± 12
$S_{100}$	209 ± 3	63 ± 2	177 ± 1	10 ± 1	145 ± 14
$S_{50}P_{50}C_{440}N_{44}$	134 ± 16	45 ± 0	195 ± 17	21 ± 4	193 ± 25
$\gamma$ -control	293 ± 14	60 ± 8	168 ± 3	5 ± 1	144 ± 12
$\gamma$ - $S_{100}$	299 ± 16	34 ± 5	142 ± 13	9 ± 1	130 ± 4
Native soil	5 ± 1	25 ± 1	137 ± 3	1 ± 1	57 ± 3

Table 3. Distribution of Se<sup>(IV)</sup> and Se<sup>(VI)</sup> anions in phosphate soil extracts

Treatment ( <i>n</i> = 3)	Incubation time (days)	Se <sup>(IV)</sup> selenite	Se <sup>(VI)</sup> selenate	Unidentified/lost	
		(µg/kg soil DW ± SD)			
Chernozem	control	1.5	8.4 ± 0.5	369 ± 18	22
		72	14.6 ± 1.3	266 ± 15	21
	S <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	1.5	7.3 ± 0.6	395 ± 27	4
		72	10.1 ± 0.5	277 ± 28	35
	S <sub>50</sub> P <sub>50</sub> C <sub>440</sub> N <sub>44</sub>	1.5	8.9 ± 0.9	363 ± 17	30
		72	57.1 ± 6.2	21 ± 5	21
	γ-control	1.5	11.7 ± 0.2	368 ± 29	50
		72	16.8 ± 1.0	285 ± 23	62
Cambisol	control	1.5	7.3 ± 0.6	384 ± 23	3
		72	12.0 ± 0.9	262 ± 26	27
	S <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	1.5	7.6 ± 1.0	388 ± 14	6
		72	11.2 ± 1.1	270 ± 30	35
	S <sub>50</sub> P <sub>50</sub> C <sub>440</sub> N <sub>44</sub>	1.5	7.2 ± 0.6	381 ± 36	24
		72	10.2 ± 2.0	193 ± 21	63
	γ-control	1.5	6.7 ± 0.5	405 ± 38	8
		72	12.2 ± 0.5	272 ± 25	43

recovery of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. At t<sub>72d</sub>, a consistent decline in extractable Se<sup>(VI)</sup> down to 272 ± 8 µg/kg (six treatments) was recorded in both soils where microbial activity had not been stimulated. This consistency in the occurrence of the main Se species with such a low standard deviation corroborates the identical availability of Se in both soils at t<sub>72d</sub>, as mentioned above. The proportion of Se<sup>(IV)</sup> in soil extracts increased clearly between t<sub>1.5d</sub> and t<sub>72d</sub> (Table 3). The most contrasting changes in Se speciation during soil aging were noticed in the S<sub>50</sub>P<sub>50</sub>C<sub>440</sub>N<sub>44</sub> treatment, especially in the Chernozem, where Se<sup>(VI)</sup> decreased to 21 ± 5 µg/kg and Se<sup>(IV)</sup> increased to 57 ± 6 µg/kg. The differences observed in the time-dependent Se extraction pattern between γ-irradiated and non-irradiated control treatments (Figure 1) proved that soil microorganisms were involved in the immobilisation of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in both soils. Similarly, Garcia-Sanchez et al. (2014) have reported a substantial microbial contribution to the kinetically controlled sorption of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> at non-sterile conditions as against autoclaved soil. Our γ-treated soils (27 kGy), by no means, could be considered free of surviving microorganisms. Blankinship et al. (2014) have decreased the count of colony-forming units (CFU) only from 10<sup>7</sup> to 10<sup>4</sup>/g per day after exposure of the soil to γ-radiation (54 kGy). Thus, even in γ-irradiated soils, a biotic

mechanism of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> immobilisation should not be omitted. Praus et al. (2019b) have investigated a fast abiotic sorption of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in both soils under investigation in the present study and found no or a weak retention of SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> where the difference between the soils was, in most cases, insignificant. Although both soils substantially differed in pH and oxalate-extractable Fe and Al (Material and methods), we did not observe contrasting values of Se<sub>ppa</sub> acquired in their control treatments over 72 days of incubation (Figure 1). This finding might be explained by the extraction method used; phosphate may significantly release adsorbed Se oxyanions on soil particles (Keskinen et al. 2009). Thus, our Se<sub>ppa</sub> data are probably insensitive to adsorbed Se. Neither soil pH fluctuation in a particular treatment over the course of incubation (≤ 0.3 pH unit, data not shown) or differences in pH among treatments at a given time (≤ 0.5 pH unit) are likely to be important influential factors. According to Figure 1, sulphate (S<sub>100</sub>) interfered with slow irreversible abiotic retention and/or microbial immobilisation of Se during soil aging in both soils. The importance of the latter mechanism is emphasised by the fact that the Se<sub>ppa</sub> in γ-control resembles that in S<sub>100</sub>, indicating that a drop in viable microorganisms (γ-rays) as well as sulphate-selenate competition for transport into mi-



<https://doi.org/10.17221/397/2019-PSE>

crobial cells (Aguilar-Barajas et al. 2011) had the same consequence, preventing  $\text{SeO}_4^{2-}$  bioreduction. When assuming the enrichment of the phosphate extract in  $\text{SeO}_3^{2-}$  at the expense of  $\text{SeO}_4^{2-}$  in  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$  in Chernozem (Table 3), we hypothesised that the addition of glucose helped to overcome a lack of electron donors and, along with a favourable soil pH (approx. 8), induced the pronounced bioreduction of  $\text{SeO}_4^{2-}$ , in which  $\text{SeO}_3^{2-}$  appears as an intermediate product. Moreover, a supportive role of decreasing soil Eh after oxygen depletion at conditions of boosted microbial activity should be mentioned. Fellowes et al. (2013) have observed a microbial-driven reduction of exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  in a microcosm experiment even at oxic conditions when employing seleniferous soil. Selenite and elemental  $\text{Se}^0$  phase were intermediate and final products of the reduction, respectively.

The overall Se recovery of the SEP, calculated as the sum of Se extracted in five consecutive extraction steps ( $\Sigma\text{Se}$ ) from a particular treatment divided by its sub-total soil Se content increased by 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , was in the range of 78–100% for Chernozem and 95–108% for Cambisol. In Chernozem  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$ , the higher portion of Se unrecovered in the SEP may be attributed to Se biomethylation when the soil was amended with organic compounds (Zhang and Frankenberger 1999) at favourable pH conditions. Keskinen et al. (2010) have shown that chloride extraction represents a sensitive indicator of Se plant availability in soil. Consistently for both Se-fortified soils, the highest yields of  $\text{Se}_{\text{KCl}}$  (nearly 50% of  $\Sigma\text{Se}$ ) were achieved in  $\gamma$ -irradiated treatments, being notably higher than those in the regular controls and slightly higher than those in the  $\text{S}_{100}$  treatments (Table 2). The lowest  $\text{Se}_{\text{KCl}}$  was acquired in  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$  (3% of  $\Sigma\text{Se}$  in Chernozem). Incorporation of phosphate extraction after  $\text{Se}_{\text{KCl}}$  determination allows to distinguish ligand-exchangeable Se (specifically adsorbed Se oxyanions, mainly  $\text{SeO}_3^{2-}$ ) from non-specifically adsorbed and soluble Se fractions. Several treatments, especially those of Cambisol, exceeded the  $\text{Se}_{\text{PO}_4}$  determined in corresponding native soils, implying that specific adsorption is a relevant mechanism for Se immobilisation. Interestingly, sulphate addition significantly decreased  $\text{Se}_{\text{PO}_4}$  only in the Chernozem. We believe this observation stems from the pronounced reduction of  $\text{Se}^{(\text{VI})}$  to  $\text{Se}^{(\text{IV})}$  in acidic Cambisol within 1 year of incubation; consequently, sulphate does not effectively compete with  $\text{SeO}_3^{2-}$  for soil sorption sites (Goh and Lim 2004). Selenium extractable with a hydroxide solution traditionally

represents organically associated Se fractions in soil (Wright et al. 2003). We assume that  $\text{Se}_{\text{NaOH}}$  can be used as an index of  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$  biotransformation in our study. From this point of view, the high values of  $\text{Se}_{\text{NaOH}}$  determined especially in the Chernozem (control and  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$ ) indicate an extensive microbial-driven incorporation of exogenous Se into soil organic matter (SOM). Straightforwardly, sulphate amendment and  $\gamma$ -irradiation significantly decreased  $\text{Se}_{\text{NaOH}}$  in the Chernozem as compared to the control (Table 2). The selenium fraction recovered with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  was low in all treatments and soils (max. 4–6% of  $\Sigma\text{Se}$ ). We used the SEP refined by Wright et al. (2003), providing improved selectivity of sulphite towards elemental  $\text{Se}^0$ . The highest  $\text{Se}_{\text{Na}_2\text{SO}_3}$  were determined in  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$  treatments, which offer a direct link between boosted microbial activity and the reduction of exogenous Se to the  $\text{Se}^0$  phase. The most resistant fraction  $\text{Se}_{\text{aqua regia}}$  may comprise recalcitrant  $\text{Se}_{\text{org}}$  and metal selenides. In the Chernozem, no treatment exhibited an increase in  $\text{Se}_{\text{aqua regia}}$  after 1 year of soil aging, whereas in the Cambisol, this Se fraction more than doubled in the control and  $\text{S}_{50}\text{P}_{50}\text{C}_{440}\text{N}_{44}$  treatments compared to un-selenised soil. A significant decrease in  $\text{Se}_{\text{aqua regia}}$ , induced by sulphate and  $\gamma$ -rays, in the Cambisol (Table 2) suggests that the recalcitrant Se might be of microbial origin. To resume the results of SEP, a significant portion of exogenous Se redistributed over the course of the incubation to the  $\text{Se}_{\text{org}}$  fraction in the alkaline Chernozem, whereas in the acidic Cambisol, it emerged in  $\text{Se}_{\text{aqua regia}}$ ; this is in agreement with the findings of Wang et al. (2017). It should be kept in mind that the distribution pattern determined for Se, based on an SEP at a given time, might be highly sensitive to the amount of exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  initially present, as Loffredo et al. (2011) have shown that this parameter largely controls the rate of  $\text{SeO}_4^{2-}$  stabilisation, especially in alkaline soil, where some  $\text{Se}^{(\text{VI})}$  bioreduction was assumed. Native Se in agricultural soils is frequently present in organic forms or associated with SOM (Keskinen et al. 2009, Supriatin et al. 2015). Accordingly, the role of soil microorganisms in the transformation of exogenous Se must be understood in much greater detail than is currently available in the literature. We recommend that Se availability to soil microbiota and the extent of specific microbial activity should be acknowledged as important soil variables controlling the fate of exogenous  $\text{SeO}_4^{2-}$  in soils under different agronomic treatments.

<https://doi.org/10.17221/397/2019-PSE>

## REFERENCES

- Aguilar-Barajas E., Díaz-Pérez C., Ramírez-Díaz M.I., Riveros-Rosas H., Cervantes C. (2011): Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals*, 24: 687–707.
- Blankinship J.C., Becerra C.A., Schaeffer S.M., Schimel J.P. (2014): Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 71: 68–75.
- Ducsay L., Ložek O., Marček M., Varényiová M., Hozlár P., Lošák T. (2016): Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. *Plant, Soil and Environment*, 62: 379–383.
- Favorito J.E., Eick M.J., Grossl P.R. (2018): Adsorption of selenite and selenate on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Quality*, 47: 147–155.
- Fellowes J.W., Patrick R.A.D., Boothman C., Al Lawati W.M.M., van Dongen B.E., Charnock J.M., Lloyd J.R., Pearce C.I. (2013): Microbial selenium transformations in seleniferous soils. *European Journal of Soil Science*, 64: 629–638.
- Fordyce F.M. (2013): Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus O. (ed.): *Essentials of Medical Geology*. Revised 1<sup>st</sup> Edition. Dordrecht, Springer.
- García-Sánchez L., Loffredo N., Mounier S., Martin-Garin A., Coppin F. (2014): Kinetics of selenate sorption in soil as influenced by biotic and abiotic conditions: A stirred flow-through reactor study. *Journal of Environmental Radioactivity*, 138: 38–49.
- Goh K.H., Lim T.T. (2004): Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: Effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere*, 55: 849–859.
- Hawkesford M.J., Zhao F.J. (2007): Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*, 46: 282–292.
- Keskinen R., Ekholm P., Yli-Halla M., Hartikainen H. (2009): Efficiency of different methods in extracting selenium from agricultural soils of Finland. *Geoderma*, 153: 87–93.
- Keskinen R., Turakainen M., Hartikainen H. (2010): Plant availability of soil selenate additions and selenium distribution within wheat and ryegrass. *Plant and Soil*, 333: 301–313.
- Li J., Peng Q., Liang D., Liang S., Chen J., Sun H., Li S., Lei P. (2016): Effects of aging on the fraction distribution and bioavailability of selenium in three different soils. *Chemosphere*, 144: 2351–2359.
- Loffredo N., Mounier S., Thiry Y., Coppin F. (2011): Sorption of selenate on soils and pure phases: Kinetic parameters and stabilisation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 102: 843–851.
- Nakamaru Y.M., Altansuvd J. (2014): Speciation and bioavailability of selenium and antimony in non-flooded and wetland soils: A review. *Chemosphere*, 111: 366–371.
- Praus L., Száková J., Steiner O., Goessler W. (2019a): Rapeseed (*Brassica napus* L.) biofortification with selenium: How do sulphate and phosphate influence the efficiency of selenate application into soil? *Archives of Agronomy and Soil Science*. doi: 10.1080/03650340.2019.1592163. (In Press)
- Praus L., Száková J., Tremlová J. (2019b): Fast abiotic sorption of selenates (SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) in soils: Pitfalls of batch sorption data acquired by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65: 566–580.
- Supriatin S., Weng L., Comans R.N. (2015): Selenium speciation and extractability in Dutch agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 532: 368–382.
- Wang D., Xue M.Y., Wang Y.K., Zhou D.Z., Tang L., Cao S.Y., Wei Y.H., Yang C., Liang D.L. (2019): Effects of straw amendment on selenium aging in soils: Mechanism and influential factors. *Science of The Total Environment*, 657: 871–881.
- Wang D., Zhou F., Yang W., Peng Q., Man N., Liang D. (2017): Selenate redistribution during aging in different Chinese soils and the dominant influential factors. *Chemosphere*, 182: 284–292.
- Wright M.T., Parker D.R., Amrhein C. (2003): Critical evaluation of the ability of sequential extraction procedures to quantify discrete forms of selenium in sediments and soils. *Environmental Science and Technology*, 37: 4709–4716.
- Zhang Y.Q., Frankenberger W.T. (1999): Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1321–1326.

Received on July 11, 2019

Accepted on September 18, 2019

Published online on October 9, 2019

### 4.3 PUBLIKACE III

Praus, L., Száková, J., Steiner, O., Goessler, W. (2019). Rapeseed (*Brassica napus* L.) biofortification with selenium: How do sulphate and phosphate influence the efficiency of selenate application into soil? Archives of Agronomy and Soil Science. 65 (14). 2059-2072.





## Rapeseed (*Brassica napus* L.) biofortification with selenium: How do sulphate and phosphate influence the efficiency of selenate application into soil?

Lukáš Praus<sup>a</sup>, Jiřina Száková<sup>a</sup>, Oliver Steiner<sup>b</sup> and Walter Goessler<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic; <sup>b</sup>Institute of Chemistry, Analytical Chemistry for Health and Environment, Karl-Franzens-University Graz, Graz, Austria

### ABSTRACT

The connection between sulphur (S) and selenium (Se) metabolism makes rapeseed (*Brassica napus*) an attractive candidate for Se fortification. Unfortunately, fertilizers may interfere with the availability of selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) in numerous ways, including both soil and physiological processes. Experiments on two agricultural soils amended with  $\text{SeO}_4^{2-}$  ( $32 \mu\text{g Se kg}^{-1}$  soil), sulphate and phosphate (each at three levels of supply) were established to elucidate the effect of these anions on the selenization efficiency. Maximal efficiency in Chernozem soil was roughly two-fold higher ( $455 \mu\text{g Se kg}^{-1}$  seed) than in Cambisol. Sulphate significantly decreased (up to 28%) the seed Se contents in Cambisol, while an enhancement (up to 33%) was found in Chernozem. In the Chernozem, the induction of collective S and Se translocation toward the seed more than compensated for any competition effects due to the highest sulphate supply. In Cambisol, plant Se distribution did not follow that of S as closely as in Chernozem. Phosphate did not significantly alter the fortification efficiency. Resistance of rapeseed proteins to protease hampered a quantitative investigation of changes in Se speciation under different S supplies. Nevertheless, protein-bound selenomethionine was the predominant Se storage form and traces of other Se species were also identified.

### ARTICLE HISTORY



Received 23 November 2018  
Accepted 5 March 2019

### KEYWORDS

Selenium; rapeseed (*Brassica napus* L.); biofortification; chemical speciation; selenomethionine

## Introduction

The daily human intake of selenium (Se) does not reach the recommended dietary allowance (RDA) of  $55 \mu\text{g Se}$  in many areas across the globe (Institute of Medicine (US) 2000). Thus, the essential biological features of this microelement are not fully realized (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008). Rather than looking for new Se dietary sources, a reasonable selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) application to arable land could increase Se content in current edible products in a safe manner (Alfthan et al. 2015). Rapeseed (*Brassica napus* L.) as cake or meal, a protein-rich, large-scale by-product of oil presses, is a strong candidate for Se biofortification. This is because: (i) a considerable Se acquisition ability of this plant species has been recognized in phytoremediation studies (Dhillon and Dhillon 2009); (ii) nearly 100% of the Se accumulated in seed can be detected in rapeseed meal (Liu et al. 2017); and (iii) rapeseed by-products have been fodder for livestock for decades (Thomke 1981). Previous research on Se enrichment of *B. napus* with  $\text{SeO}_4^{2-}$  supplied to roots has covered a number of issues, including: predictive modelling of Se accumulation (Kikkert et al. 2013),

**CONTACT** Lukáš Praus  [prausl@af.czu.cz](mailto:prausl@af.czu.cz)  Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



anion competition with sulphate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) during uptake (Renkema et al. 2012; Kikkert et al. 2013; Liu et al. 2016, 2017), Se translocation within the plant (Renkema et al. 2012; Liu et al. 2016), phytomass yield, physiological parameters and seed quality (Seppänen et al. 2010; Sharma et al. 2010; Liu et al. 2017), and Se chemical speciation in *B. napus* (Seppänen et al. 2010; Bañuelos et al. 2012). The selenate-sulphate relationship in a soil-plant system may seem so complex that a single study can hardly address all levels of Se-S interaction. Sulphate is known to: (i) prevent  $\text{SeO}_4^{2-}$  adsorption at the soil particle-solution interface (Goh and Lim 2004; Praus et al. 2019); (ii) inhibit  $\text{SeO}_4^{2-}$  transport into microbial cells (Lindblow-Kull et al. 1985), and inhibit the utilization of  $\text{SeO}_4^{2-}$  as a final electron acceptor by sulphate-reducing bacteria (Zehr and Oremland 1987), both processes restricting transformation of  $\text{SeO}_4^{2-}$  into less available Se species in the soil; and (iii) inhibit  $\text{SeO}_4^{2-}$  uptake by roots due to selenate-sulphate antagonism at the level of plant membrane transporters (White et al. 2004; Renkema et al. 2012), although multiple transport pathways with diverse sulphate/selenate selectivity have also been proposed (White et al. 2004). Apart from these factors affecting Se content in plant tissue in a straightforward way, some physiological phenomena related to S nutritional status have also been observed, namely S-starvation (Li et al. 2008; Stroud et al. 2010) and sulphate-induced Se accumulation and/or translocation (Renkema et al. 2012; Liu et al. 2016). Selenium fortification of *B. napus*, a high S-demanding crop, raises the question as to whether induced Se translocation from vegetative tissues could counterbalance lower Se content in seed caused by  $\text{SO}_4^{2-}$  fertilizers. Other variables of  $\text{SeO}_4^{2-}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  coapplication which may affect the biofortification efficiency, such as soil type, phosphate fertilizers, and changes in chemical speciation of Se in plants, have been largely omitted in the works cited above. On this basis, we examined the effect of two contrasting soils enriched in  $\text{SeO}_4^{2-}$  ( $32 \mu\text{g Se kg}^{-1}$  soil) and fertilized with sulphate and phosphate in a full  $2 \times 3$  factorial design, using *B. napus* as a model plant. The study was designed to elucidate: (1) the aggregated soil and physiological effect of sulphate/phosphate anions on Se biofortification of *B. napus*; (2) the uptake and distribution of Se in mature *B. napus* as affected by S nutritional status of the plant; and (3) the potential influence of S and P fertilizers on the selenocompounds detected in *B. napus*.

## Material and methods

### Soils and soil analysis

Two arable soils, Chernozem (silty loam) and Cambisol (sandy loam), were collected from topsoil (0–20 cm) at experimental stations in Prague-Suchdol ( $50^\circ 7' 40.2''\text{N}$ ,  $14^\circ 22' 33.0''\text{E}$ ); and in Humpolec ( $49^\circ 33' 11.2''\text{N}$ ,  $15^\circ 20' 56.2''\text{E}$ ), respectively, both in the Czech Republic. A 1 kg sample of each soil was air-dried in an oven at  $35^\circ\text{C}$  and passed through a 2 mm sieve prior to subsequent analysis. Soil physicochemical characteristics were determined as follows: pH of a 1:14 (*m/v*) suspension (soil:10 mM  $\text{NaNO}_3$ ); water-extractable carbon (C) in a 1:10 (*m/v*) soil suspension shaken on a tube rotator (30 rpm) for 16 h, then centrifuged ( $2680 \times g$  for 12 min), and measured on a continuous flow colorimetric analyser (Skalar SAN<sup>++</sup> System, Skalar, Netherlands); water-extractable S in a 1:10 (*m/v*) suspension shaken (30 rpm) for 1 h, centrifuged ( $2680 \times g$  for 12 min), and analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES; Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA); ammonium oxalate-extractable iron (Fe) and aluminium (Al) according to Sheldrick (1984) and soil available phosphorus (P), calcium (Ca) and magnesium (Mg) using the Mehlich 3 method (Mehlich 1984), all quantified by ICP-OES. Total contents of C and nitrogen (N) were measured on an elemental analyser CHNOS (Vario MACRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). The pseudototal Se was determined in 0.50 g of soil exposed to microwave-assisted wet digestion (Discover SP-D, CEM Corp., USA) at  $180^\circ\text{C}$  for 18 min, using 2 mL  $\text{HNO}_3$  and 6 mL HCl (both Analpure®, Analytika, Czech Republic), then Se was measured in a diluted digest by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICPMS; Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA).

### Plant experiments

Field-moist soils, sieved through a mesh of 10 mm, were weighed into plastic bowls in an amount equivalent to 4750 g dry weight (DW). Individual nutrient solutions of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  were prepared and mixed in a manner that spraying of these solutions provided the soil treatments described in Table 1. Thoroughly homogenized soils were transferred into plastic pots (5 dm<sup>3</sup>) in triplicate, sown with spring oilseed rape (*Brassica napus* L. 'Blanice') at 20 seeds per pot, and placed on benches in a vegetation hall (roofed shelter with open sidewalls) on 26<sup>th</sup> of March 2016. Young seedlings were thinned to three plants per pot during development of leaves (BBCH growth stage 12–19). Soil moisture was kept at 55–60% of water holding capacity by addition of deionized H<sub>2</sub>O, based on visual inspection and regular re-weighing of pots. In addition to initial fertilization, three corrective doses of N (in total 800 mg) were supplied as a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  solution into soil at BBCH growth stage 30–69. The plants were harvested at maturity, 127 days after sowing (BBCH growth stage 89–97), then separated into roots, stems and pods, rinsed with deionized H<sub>2</sub>O, allowed to dry naturally, and weighed.

### Plant tissue analysis

#### Total content of elements

Microwave-assisted digestion procedures were employed to prepare the samples for total Se (UltraCLAVE IV, Milestone Ltd., Germany) and P and S (Discover SP-D) determination in individual plant tissues. For this purpose, 200 mg (weighed to an accuracy of 0.1 mg) of air-dried and ground root, stem or unprocessed whole seed was digested in 5 mL  $\text{HNO}_3$  at 250°C for 30 min (Se) or at 200°C for 20 min (P and S). The elemental concentrations were measured in diluted digests by ICPMS (Se) or ICP-OES (P and S). The ICPMS was a single quadrupole device equipped with a concentric nebulizer (MicroMist) and an octopole reaction cell pressurized with H<sub>2</sub> to eliminate interfering polyatomic species at  $m/z$  78; the data were acquired based on the Se external calibration 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , aspirating 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  Ge as an internal standard. The instrument was tuned using a solution containing 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of elements of interest to achieve 3800 cps (<sup>78</sup>Se), the ratio of oxide ions  $\leq 0.90\%$  (156/140) and doubly charged ions  $\leq 1.20\%$  (70/140). Validation of the total content determination was through analysis of two certified reference materials (CRM), Peach leaves (NIST, SRM-1547) containing  $1371 \pm 82 \text{ mg kg}^{-1}$  P and 0.2% S (information mass fraction value), and Pine needles (NIST, SRM-1575a) containing  $0.099 \pm 0.004 \text{ mg kg}^{-1}$  Se. From our analysis of these CRMs, we obtained the following mass fraction values ( $n = 3$ ):  $1311 \pm 85 \text{ mg kg}^{-1}$  P,  $0.18 \pm 0.01\%$  S and  $0.095 \pm 0.003 \text{ mg kg}^{-1}$  Se.

#### Analysis of selenium chemical speciation

Seeds and roots from plants grown in Chernozem were frozen in liquid nitrogen and finely ground with an ultra-centrifugal mill (ZM 200, Retsch, Germany). The extraction of Se species was conducted by enzymatic hydrolysis, comprising 100 mg plant tissue, 20 mg protease (P-5147, type XIV,

**Table 1.** Nutrient supply to individual treatments of the pot experiment.

Treatment n = 3	Se $\mu\text{g pot}^{-1}$	N $\text{mg pot}^{-1}$	K $\text{mg pot}^{-1}$	S $\text{mg pot}^{-1}$	P $\text{mg pot}^{-1}$
$\text{Se}_0\text{S}_0\text{P}_{32}$	-	500	300	-	32
$\text{S}_0\text{P}_{32}$	153	500	300	-	32
$\text{S}_0\text{P}_{64}$	153	500	300	-	64
$\text{S}_0\text{P}_{96}$	153	500	300	-	96
$\text{S}_{43}\text{P}_{32}$	153	500	300	43	32
$\text{S}_{43}\text{P}_{64}$	153	500	300	43	64
$\text{S}_{43}\text{P}_{96}$	153	500	300	43	96
$\text{S}_{128}\text{P}_{32}$	153	500	300	128	32
$\text{S}_{128}\text{P}_{64}$	153	500	300	128	64
$\text{S}_{128}\text{P}_{96}$	153	500	300	128	96



Sigma Aldrich) and 3000 mg high purity water ( $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ; Milli-Q purification system, Millipore, SAS, France) weighed into a 15-mL centrifugal tube. Both an ultra-sound assisted extraction (10 min pre-incubation at 37°C in a water bath followed by sonification for  $6 \times 30 \text{ s}$ ) and an incubation procedure (horizontal shaking at 37°C in a water bath for 16 h) were tested for extraction efficiency. The hydrolysate was centrifuged ( $3760 \times g$  for 10 min), then filtered ( $0.20 \mu\text{m}$ , NYLON) and the first aliquot (0.500 mL) was subjected to speciation analysis within 18 h after the extraction. Total Se was measured by ICPMS from the second aliquot (1.00 mL) after acid digestion. An ion pairing-reversed phase (IP-RP) high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to ICPMS via a PEEK capillary tubing was used for Se speciation. Standard solutions at 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0  $\mu\text{g/L}$  Se of each chemical species to be analysed were prepared by dissolution and dilution of Se-(methyl)selenocysteine hydrochloride (SeMetCys), seleno-L-methionine (SeMet), seleno-L-cystine (SeCys2),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (SeIV), and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$  (SeVI; all purchased at Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) with Milli-Q water, which had to be acidified with HCl to facilitate dissolving of SeCys2. The chromatography system (Agilent 1260, Agilent Technologies Inc., USA) was equipped with an analytical column Nucleodur C18 Pyramid ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ; Macherey-Nagel, Germany), which was isocratically eluted ( $1.00 \text{ mL min}^{-1}$ ) by an aqueous mobile phase ( $\text{pH}$  5.2) containing 2.5% (v/v) methanol, 25 mM ammonium acetate, and 1 mM tetrabutylammonium phosphate, differing from Kubachka et al. (2017) only in the quaternary ammonium salt used. The sample injection volume was 20  $\mu\text{L}$  and the column was heated to 30°C.

### Data analysis

The statistical significance of P and S amendments affecting Se content in rapeseed plants was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) after the Shapiro-Wilk's test for normality. The ANOVA was followed by Holm-Sidak's multiple comparison post hoc test. The search for Se-P-S interrelations in plant tissue was based on Pearson's product-moment correlation coefficients. The p-values  $< 0.05$  were considered significant. All statistical analyses were executed using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., USA).

## Results and discussion

### Soil characteristics and biomass yield

Soil physicochemical characteristics are listed in Table 2. Analysis of the seed and pods planted in both soil types showed two general trends: (i) the amount of  $\text{SO}_4^{2-}$  applied was the variable that had the greatest positive effect on yields (treatments  $\text{S}_0\text{P}_{32} \times \text{S}_{43}\text{P}_{32} \times \text{S}_{128}\text{P}_{32}$ ,  $\text{S}_0\text{P}_{64} \times \text{S}_{43}\text{P}_{64} \times \text{S}_{128}\text{P}_{64}$ , and  $\text{S}_0\text{P}_{96} \times \text{S}_{43}\text{P}_{96} \times \text{S}_{128}\text{P}_{96}$ ; Table 3); (ii) the effect of phosphate was mostly statistically insignificant or even inhibitory ( $\text{S}_0\text{P}_{32} \times \text{S}_0\text{P}_{64} \times \text{S}_0\text{P}_{96}$ ,  $\text{S}_{43}\text{P}_{32} \times \text{S}_{43}\text{P}_{64} \times \text{S}_{43}\text{P}_{96}$ , and  $\text{S}_{128}\text{P}_{32} \times \text{S}_{128}\text{P}_{64} \times \text{S}_{128}\text{P}_{96}$ ). The plants under S-starvation conditions ( $\text{S}_0\text{P}_{32} \times \text{S}_0\text{P}_{64} \times \text{S}_0\text{P}_{96}$ ) exhibited stunted growth, leaf interveinal chlorosis, anthocyanin enrichment, and spoon-like leaves indicative of S deficiency (Schnug and Haneklaus 2005). These symptoms were especially evident in Cambisol where  $\text{S}_0\text{P}_{64}$  and  $\text{S}_0\text{P}_{96}$  produced only deformed pods with no developed seeds. A severe physiological disorder related to Cambisol was also evident in  $\text{S}_0\text{P}_{32}$  plants that had considerably lower MHI values (Table 3); otherwise, MHI was fairly stable between both soils of a particular treatment. A precise diagnosis of the growth-

**Table 2.** Physicochemical characteristics of the soils used in the pot experiment.

Soil	pH	Se	C	N	Fe	Al	C	S	P	Ca	Mg
		$\mu\text{g kg}^{-1}$	(total) $\text{g kg}^{-1}$	(total) $\text{g kg}^{-1}$	(total) $\text{g kg}^{-1}$	(oxal) $\text{mg kg}^{-1}$	(H <sub>2</sub> O) $\text{mg kg}^{-1}$	(H <sub>2</sub> O) $\text{mg kg}^{-1}$	(Mehlich3) $\text{mg kg}^{-1}$	(Mehlich3) $\text{mg kg}^{-1}$	
CHER.	8.0	$347 \pm 14$	$20.6 \pm 0.8$	$1.8 \pm 0.1$	$1617 \pm 64$	$1372 \pm 26$	$62 \pm 0$	$15.3 \pm 1.0$	$96 \pm 6$	$8830 \pm 240$	$238 \pm 11$
CAMB.	6.0	$219 \pm 5$	$20.2 \pm 0.0$	$2.0 \pm 0.0$	$4461 \pm 106$	$1814 \pm 37$	$102 \pm 3$	$22.0 \pm 0.6$	$89 \pm 4$	$1585 \pm 45$	$143 \pm 6$

**Table 3.** Yield categories of rapeseed grown in potted soils.

Treatment n = 3	roots	stems	seed+Pods	modified harvest index MHI <sup>a</sup>
	g pot <sup>-1</sup> DW ( $\pm$ SD)			
<b>Chernozem</b>				
Se <sub>0</sub> S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	7.7 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 0.7	19.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8	0.40
S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	7.7 $\pm$ 0.8	26.1 $\pm$ 1.2	23.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8	0.40
S <sub>0</sub> P <sub>64</sub>	8.9 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 1.6	22.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1	0.41
S <sub>0</sub> P <sub>96</sub>	7.6 $\pm$ 0.8	26.0 $\pm$ 2.5	19.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	0.36
S <sub>43</sub> P <sub>32</sub>	6.0 $\pm$ 0.2	19.4 $\pm$ 1.2	32.2 <sup>c</sup> $\pm$ 2.0	0.56
S <sub>43</sub> P <sub>64</sub>	6.9 $\pm$ 0.7	21.9 $\pm$ 2.0	29.0 <sup>e</sup> $\pm$ 0.8	0.50
S <sub>43</sub> P <sub>96</sub>	7.3 $\pm$ 0.3	24.4 $\pm$ 0.5	28.4 <sup>e</sup> $\pm$ 0.5	0.47
S <sub>128</sub> P <sub>32</sub>	5.1 $\pm$ 0.5	19.5 $\pm$ 0.6	38.1 <sup>d</sup> $\pm$ 0.5	0.61
S <sub>128</sub> P <sub>64</sub>	5.8 $\pm$ 0.3	17.8 $\pm$ 1.1	39.4 <sup>d</sup> $\pm$ 1.4	0.63
S <sub>128</sub> P <sub>96</sub>	6.4 $\pm$ 0.1	18.6 $\pm$ 0.3	38.8 <sup>d</sup> $\pm$ 0.9	0.61
<b>Cambisol</b>				
Se <sub>0</sub> S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	9.7 $\pm$ 0.4	26.2 $\pm$ 1.7	9.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	0.20
S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	7.6 $\pm$ 0.4	27.9 $\pm$ 2.1	10.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	0.22
S <sub>0</sub> P <sub>64</sub>	6.0 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.8	–	–
S <sub>0</sub> P <sub>96</sub>	6.7 $\pm$ 0.5	22.1 $\pm$ 0.3	–	–
S <sub>43</sub> P <sub>32</sub>	7.7 $\pm$ 0.9	26.1 $\pm$ 1.6	31.9 <sup>b,d</sup> $\pm$ 0.5	0.49
S <sub>43</sub> P <sub>64</sub>	9.8 $\pm$ 0.7	27.3 $\pm$ 2.0	34.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	0.48
S <sub>43</sub> P <sub>96</sub>	9.9 $\pm$ 0.8	28.4 $\pm$ 1.9	31.3 <sup>d</sup> $\pm$ 1.0	0.45
S <sub>128</sub> P <sub>32</sub>	7.9 $\pm$ 0.7	23.0 $\pm$ 1.2	45.4 <sup>c</sup> $\pm$ 1.2	0.60
S <sub>128</sub> P <sub>64</sub>	6.8 $\pm$ 0.6	21.2 $\pm$ 0.5	49.6 <sup>e</sup> $\pm$ 0.7	0.64
S <sub>128</sub> P <sub>96</sub>	8.4 $\pm$ 0.6	24.0 $\pm$ 1.2	48.7 <sup>e</sup> $\pm$ 1.3	0.60

<sup>a</sup> Calculated as follows:  $(m_{seeds} + m_{pods}) / (m_{roots} + m_{stems} + m_{seeds} + m_{pods})$ .

Different letters stand for significant differences among treatments in a given soil ( $p < 0.05$ ).

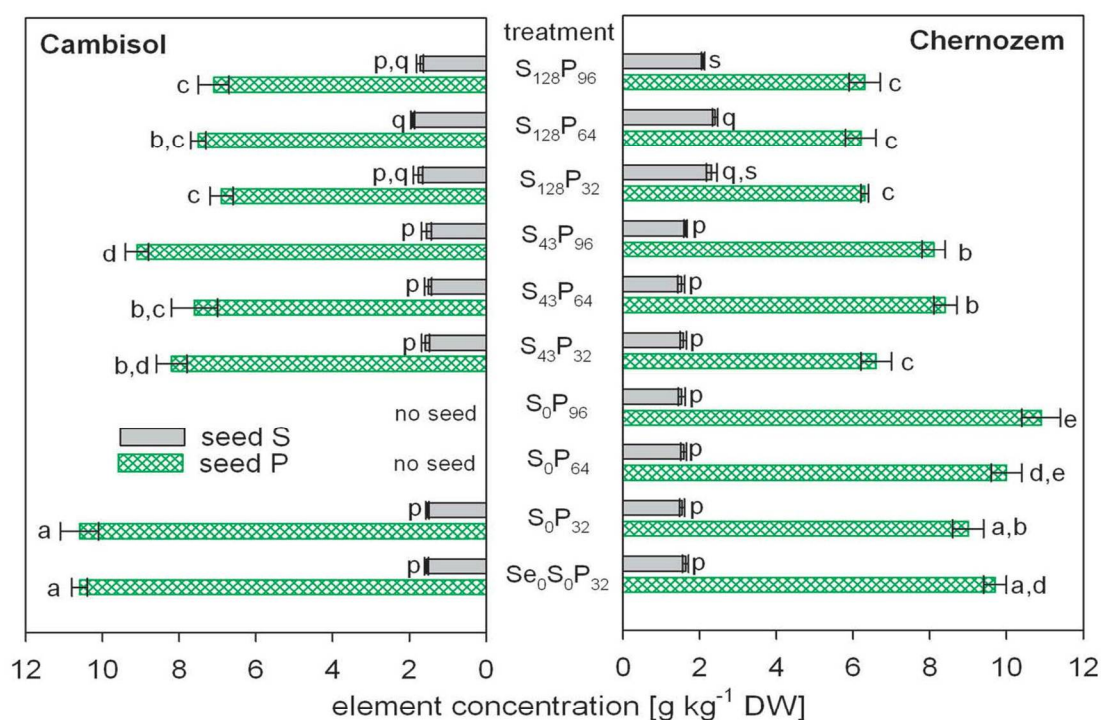
DW and SD mean dry weight and standard deviation, respectively.

limiting factors and discrimination between physiological and soil-related phenomena were beyond the scope of this study, but clearly no decrease in the seed and pod yield was observed if the amount of sulphate applied exceeded that of phosphate (S<sub>128</sub>P<sub>32</sub>  $\times$  S<sub>128</sub>P<sub>64</sub>  $\times$  S<sub>128</sub>P<sub>96</sub>). Several authors have shown an increase in the content of selected micronutrients in plant tissue after addition of S fertilizers (Islam 2012; Barczak et al. 2018), mainly emphasising their soil acidifying effect. Moreover, S-containing metabolites common in the Brassicaceae family play an active role in microelement translocation (Irtelli et al. 2009) or have the potential to mitigate plant stress (Fatma et al. 2014). Selenium fortification showed a slight promotion of seed and pod yields in both soils (Se<sub>0</sub>S<sub>0</sub>P<sub>32</sub>  $\times$  S<sub>0</sub>P<sub>32</sub>).

### Phosphorus content in plant tissue

Total phosphorus (P<sub>tot</sub>) content in plant compartments varied widely among the treatments, especially in roots and stems, 0.3–5.5 g kg<sup>-1</sup> and 0.2–5.3 g kg<sup>-1</sup> DW, respectively (data not shown). The range of P content in seed was narrower, 6.2–10.9 g kg<sup>-1</sup> (Figure 1). Our results confirmed a high P mobility within *B. napus*, where seed acted as a final storage organ. In our study, P accumulation, S nutrient status and biomass yield were evidently interrelated; therefore, we have defined three categories based on the MHI values. The plants cultivated under the highest S<sub>128</sub> supply (MHI  $\geq$  0.60) were similar to each other in seed P content regardless of P application rate (Figure 1). Moreover, P was transported from roots and stems upward in a very efficient way. The P content in plant tissues grown under S<sub>43</sub> supply ( $0.45 \leq$  MHI  $\leq$  0.59) increased unevenly with P dose, leaving a considerable amount of P in vegetative organs (data not shown). The stressed plants receiving S<sub>0</sub> (MHI  $\leq$  0.44) had a P uptake pattern that resembled plants found under S<sub>43</sub> conditions; however, they could accumulate more than 10 g kg<sup>-1</sup> P in seed. An excessive P uptake might exacerbate S starvation in soils with low available S, and also reduce the efficiency of





**Figure 1.** Phosphorus and sulphur concentration in rapeseed seed grown in two potted soils. Each pot (4750 g of soil DW) received 153  $\mu\text{g}$  Se with the exception of control treatment without Se addition ( $\text{Se}_0\text{S}_0\text{P}_{32}$ ). Subscripts indicate the amount of S and P (mg) supplied to each pot. Different letters stand for significant differences among treatments within the same soil ( $n = 3$ ;  $p < 0.05$ ); error bars are standard deviation; DW mean dry weight.

S fertilizers (Aulakh and Pasricha 1977). In general, soil P in Cambisol was slightly more plant available as compared to Chernozem. Certainly, the spraying of  $10^1$  mM phosphate solution on alkaline Chernozem might trigger precipitation of Ca-P phases. Nevertheless, the dependence of phosphate solubility on  $\text{H}^+$  activity in soil water has multiple variables to consider (Devau et al. 2011), aspects that are beyond the scope of this work. The addition of Se did not significantly influence seed P content ( $\text{Se}_0\text{S}_0\text{P}_{32} \times \text{S}_0\text{P}_{32}$ ).

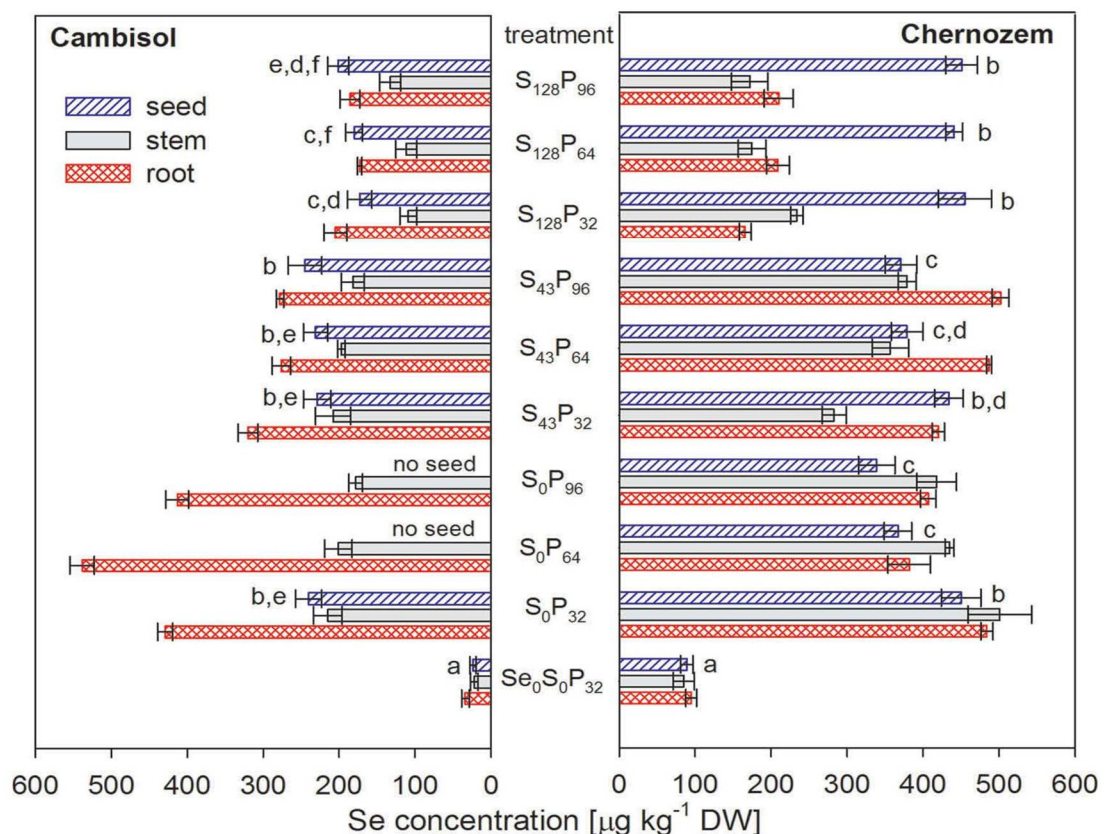
### **Sulphur content in plant tissue**

Sulphur content in root, stem and seed tissue was in the range of  $0.40\text{--}1.03$   $\text{g kg}^{-1}$ ,  $0.52\text{--}1.15$   $\text{g kg}^{-1}$ , and  $1.51\text{--}2.40$   $\text{g kg}^{-1}$  DW, respectively. Such seed S contents were lower than those previously reported for field-grown commercial *B. napus*, although values as low as  $2.1$   $\text{g kg}^{-1}$  have also been encountered (Sarda et al. 2013). Raising the S supply from 0 to 43  $\text{mg pot}^{-1}$  was not reflected by an increase in seed S content (Figure 1). Although a minor effect of S biodilution could not be excluded, this effect might be a consequence of *B. napus* up-regulating the gene expression of high-affinity sulphate transporters (*SULTR1;1* and *SULTR1;2*) in roots when S supply is limiting in order to maximize the uptake of any available extra-cellular  $\text{SO}_4^{2-}$ . In addition, *SULTR4;1* and *SULTR4;2* transporters are co-expressed under S deprivation to promote vacuolar  $\text{SO}_4^{2-}$  efflux (Parmar et al. 2007; Zhang et al. 2015). Therefore, the response of the S distribution pattern to S application might be obscured by compensatory mechanisms in the plant to ensure the development of viable seed. Such strategies are supported by a lower degree of variability in seed S content observed in *B. napus* cultivated under diverse conditions as compared to that found in vegetative organs (Sarda et al. 2013). Our study was consistent with this observation. The highest S rate,  $128$   $\text{mg pot}^{-1}$ , had a significantly increased seed S content (Figure 1); however, the corresponding plants had the lowest S level in the stem (data not shown). That implied a sulphur redistribution

mechanism toward the seed, described for *B. napus* cultivated under limiting S supply (Dubousset et al. 2010), was active in these treatments. Notably, in the  $S_{128}$  treatments, the ratio of the seed/roots S contents in Chernozem (4.75 on average) contrasted with that from Cambisol (1.86), suggesting a lower S translocation/remobilization efficiency for the roots grown in the latter soil, since the seed yield along with S content could not justify that finding. This could be partially explained by an enhanced allocation of endogenous  $SO_4^{2-}$  and  $S_{org}$  to roots, as documented by Abdallah et al. (2010) who cultivated *B. napus* in an S-deficient hydroponic solution. Phosphate application rate did not impact S levels in the seed of  $S_0$  and  $S_{43}$  plants ( $S_0P_{32} \times S_0P_{64} \times S_0P_{96}$  and  $S_{43}P_{32} \times S_{43}P_{64} \times S_{43}P_{96}$ ); however, some S-P interference did occur under  $S_{128}$  supply ( $S_{128}P_{32} \times S_{128}P_{64} \times S_{128}P_{96}$ ). The decrease in seed S content as affected by Se fortification was found to be statistically insignificant ( $Se_0S_0P_{32} \times S_0P_{32}$ ).

### Selenium content in plant tissue

*B. napus* grown in the absence of exogenous Se exhibited very low Se content in plant tissue, confirming poor plant availability of native Se in both soils (Figure 2). The seed Se contents in the control treatment ( $Se_0S_0P_{32}$ ) were  $89 \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $24 \mu\text{g kg}^{-1}$  DW in Chernozem and Cambisol, respectively, reflecting an expectedly higher Se availability in alkaline soil with lower  $Fe_{oxal}$  and  $Al_{oxal}$  contents (Table 2). The application of  $153 \mu\text{g Se pot}^{-1}$  in the form of  $SeO_4^{2-}$  successfully increased the seed Se content, peaking at  $455 \mu\text{g kg}^{-1}$  in Chernozem and at  $245 \mu\text{g kg}^{-1}$  in Cambisol. We do not believe that differences in anion competition, soil adsorption or root uptake are the primary factors



**Figure 2.** Selenium concentration in rapeseed tissue grown in two potted soils. Each pot (4750 g of soil DW) received  $153 \mu\text{g Se}$  with the exception of control treatment without Se addition ( $Se_0S_0P_{32}$ ). Subscripts indicate the amount of S and P (mg) supplied to each pot. Different letters stand for significant differences among treatments within the same soil ( $n = 3$ ;  $p < 0.05$ ); error bars are standard deviation; DW mean dry weight.



responsible for the higher Se fortification efficiency of  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  in Chernozem, since there were considerable differences in tissue Se contents between the two soils regardless of S-P treatment (Figure 2). More likely, the lower Se availability in Cambisol suggested a pronounced reduction of  $\text{SeO}_4^{2-}$  to selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), or even a transformation to  $\text{Se}_{\text{org}}$  in this soil. Selenite is less mobile than  $\text{SeO}_4^{2-}$  mainly due to a stronger interaction with soil particles (Fernández-Martínez and Charlet 2009). Nevertheless, both  $\text{SeO}_3^{2-}$  and small  $\text{Se}_{\text{org}}$  molecules may be taken up by plants from soil solution, although they may vary in their translocation capacity (Kikkert and Berkelaar 2013). In this study, although the results did not achieve a level of significance, the seed Se content increased with the amount of phosphate co-applied only in Cambisol ( $S_{43}P_{32} \times S_{43}P_{64} \times S_{43}P_{96}$  and  $S_{128}P_{32} \times S_{128}P_{64} \times S_{128}P_{96}$ ), supporting the existence of selenite-phosphate or  $\text{Se}_{\text{org}}$ -phosphate competition for soil sorption sites. Moreover, the overall mobilizing effect of phosphate could be attenuated by antagonism between phosphate and  $\text{SeO}_3^{2-}$  during plant uptake (Hopper and Parker 1999) or could be related only to native soil Se content. Interestingly, Zhang et al. (2017) reported that Se accumulation, translocation and content in wheat (*Triticum aestivum*) vegetative organs declined when phosphate was added to selenite-fertilized soils, while the opposite was true for selenate-treated soils. As for Chernozem, phosphate reduced seed Se content in  $S_0$  plants, less markedly with  $S_{43}$ , and did not affect  $S_{128}$  treated plants (Figure 2), indicating a role for sulphur in Se utilization. The impact of S fertilizers on the efficiency of crop fortification with  $\text{SeO}_4^{2-}$  soil application cannot be generalized, since  $\text{SO}_4^{2-}$  has a dual effect: (i) it helps to maintain Se in a plant available form (Stroud et al. 2010; Kikkert et al. 2013); and (ii) it inhibits root Se uptake (Hopper and Parker 1999). Recently, Liu et al. (2017) investigated the response of field-grown *B. napus* fortified with  $\text{SeO}_4^{2-}$  at a rate of  $60 \text{ g Se ha}^{-1}$  along with  $60 \text{ kg S ha}^{-1}$  as sulphate. Seed Se decreased by 40% as a consequence of anion competition for root uptake, confirming the findings on  $\text{SeO}_4^{2-}$ - $\text{SO}_4^{2-}$  antagonism found with *B. napus* in soilless culture (Renkema et al. 2012; Liu et al. 2016). However, we revealed an inhibitory effect of  $\text{SO}_4^{2-}$  on seed Se content only in Cambisol ( $S_0P_{32} \times S_{43}P_{32} \times S_{128}P_{32}$ ,  $S_{43}P_{64} \times S_{128}P_{64}$ , and  $S_{43}P_{96} \times S_{128}P_{96}$ ). It should be noted that both  $\text{SeO}_4^{2-}$  and  $\text{SeO}_3^{2-}$  may occur simultaneously in a soil, and sulphate may decrease fortification efficiency of both Se oxyanions (Liu et al. 2017). A contradictory effect of  $\text{SO}_4^{2-}$  was found in Chernozem where seed Se content increased substantially despite any potential Se biodilution. While the positive influence of  $\text{SO}_4^{2-}$  was rather ambiguous in  $P_{32}$  plants, it became more evident in  $P_{64}$  and  $P_{96}$  plants, especially in  $S_{43}P_{64} \times S_{128}P_{64}$  and  $S_{43}P_{96} \times S_{128}P_{96}$  treatments (Figure 2). Selenium remobilization from vegetative tissues to seed was encouraged by exogenous  $\text{SO}_4^{2-}$ , as can be seen in  $S_{43}$  stems, but a higher supply of P suppressed Se transport. The  $S_{128}$  plants showed a pronounced Se remobilization from stems and roots grown in Chernozem, being less dependent on P application. Our results were in line with those reported by Renkema et al. (2012) and Liu et al. (2016), who significantly improved Se translocation in *B. napus* fed hydroponically with  $\text{SeO}_4^{2-}$  if the plants were exposed to  $\text{SO}_4^{2-}$ . A facilitating effect of  $\text{SO}_4^{2-}$  may not be exclusive to the Brassicaceae family. Golob et al. (2016) found higher Se contents in all compartments of Tartary buckwheat plants (*Fagopyrum tataricum*) when a foliar spray containing  $\text{SeO}_4^{2-}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  at a molar ratio of 1:1 was applied, as compared to treatment with a sulphate-free solution. Apart from the  $\text{SO}_4^{2-}$  dual effect, plant nutritional status has been suggested as a variable accounting for the different responses to Se-S interactions (White et al. 2004; Stroud et al. 2010). Shinmachi et al. (2010) studied the consequences of S starvation promoting  $\text{SeO}_4^{2-}$  uptake and redistribution in wheat as a result of altered gene expression of the sulphate transporter family. At first glance, the concept of S starvation seemed to be incompatible with our Se-richest seeds having grown under the highest S supply, but the  $S_{128}$  treatment might still represent a suboptimal S supply, and this situation might have been exacerbated during plant growth.

Despite many variables affecting Se fortification efficiency, we tried to draw relations between Se and S or P content in *B. napus* grown under various S and P supplies in 2 soils based on Pearson's correlation coefficients. The most noteworthy results are summarized in Table 4. The paired values of S and Se contents taken from all plant tissues and treatments of Chernozem were positively correlated to each other ( $p = 0.011$ ,  $r = 0.545$ ), as compared to Cambisol which showed no correlation ( $p = 0.939$ ,  $r = -0.018$ ). If only  $S_{128}$  treatments, exhibiting a high degree of Se

**Table 4.** Pearson's correlation coefficient notifying a degree of linear dependence between S and Se as well as P and Se contents in rapeseed tissue.

	Tissue	Treatment	n	Chernozem		Cambisol	
				p-value	r	p-value	r
S/Se ratio	all	all <sup>a</sup>	21	0.011	0.545	0.939	-0.018
	all	S <sub>128</sub>	9	< 0.001	0.985	0.054	0.658
	roots	all <sup>a</sup>	7	0.001	0.944	0.161	-0.593
	stems	all <sup>a</sup>	7	< 0.001	0.959	0.006	0.898
	seed	all <sup>a</sup>	7	0.200	0.551	0.004	-0.914
P/Se ratio	all	all <sup>a</sup>	21	0.004	0.606	0.132	0.340
	all	S <sub>128</sub>	9	< 0.001	0.986	0.108	0.571
	roots	all <sup>a</sup>	7	0.004	0.918	0.008	0.890
	stems	all <sup>a</sup>	7	0.002	0.936	0.002	0.944
	seed	all <sup>a</sup>	7	0.233	-0.519	0.055	0.744

<sup>a</sup> Se<sub>0</sub>S<sub>0</sub>P<sub>32</sub>, S<sub>0</sub>P<sub>64</sub>, S<sub>0</sub>P<sub>96</sub> were excluded

remobilization, were evaluated a strong positive correlation was found in Chernozem ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.985$ ) and a weaker one in Cambisol ( $p = 0.054$ ,  $r = 0.658$ ), supporting an influence of phosphate supply in the latter soil. Another difference between the 2 soils consisted in the opposite direction of the S/Se correlation coefficients calculated for roots (Table 4). The fact that Se distribution in *B. napus* cultivated in Cambisol followed that of sulphur to a lesser extent by comparison to plants in Chernozem suggested an interference in the sulphate-selenate metabolic pathway, or more likely that a portion of Se acquired by *B. napus* was a reduced Se species, probably  $\text{SeO}_3^{2-}$  or  $\text{Se}_{\text{org}}$ . The Se and S contents in stem tissue, a reservoir where S from both roots and leaves can be temporarily stored, were strongly positively correlated in both soils. In seed, the positive S/Se dependence was weaker in Chernozem ( $p = 0.200$ ,  $r = 0.551$ ) and turned negative in Cambisol ( $p = 0.004$ ,  $r = -0.914$ ). The reason for such an S/Se discrimination during the seed filling stage and ripening could not be explained without a temporal knowledge of the participation of individual S and Se intermediates in a particular metabolic/transport pathway, including their role in substrate competition. The data in Table 4 show a resemblance between the corresponding P/Se and S/Se correlations calculated for Chernozem-grown *B. napus*, with one exception being the negative correlation in seed. Apparently, the final Se-S-P distribution in vegetative tissues proceeded without any specific discriminatory effect in that soil. In Cambisol, the P/Se correlations in vegetative organs were similar to those calculated in Chernozem. Interestingly, the seed P/Se correlation coefficient, analogously to S/Se, was of opposite sign for the 2 soils (Table 4), implying a distinctive feature of Se-S-P storage management during seed development and ripening. If much of the Se was present as a reduced species in Cambisol, this would be consistent with Li et al. (2008) who showed that  $\text{SeO}_3^{2-}$  and  $\text{SeO}_4^{2-}$  differed greatly in the ease of assimilation and transport within plants.

### Analysis of selenium chemical speciation

Selenium extraction efficiency varied widely depending on the plant tissue and S supply, which had a range of 19–57% of total Se content (Table 5). There was no significant difference between the efficiency of ultrasound-assisted extraction and the incubation procedure ( $p > 0.05$ ; data not shown). Enzyme-supported Se extraction efficiency previously reported for *B. napus* seed or meal falls into the same range achieved in our study (Bañuelos et al. 2012; Balán et al. 2014), but it has also been reported to be close to 100% (Seppänen et al. 2010). All the authors cited above relied on protease type XIV, in agreement with our experiment. Low  $\text{Se}_{\text{org}}$  extraction efficiencies could be primarily due to the decreased solubility of Se-containing proteins. Two major storage proteins in *B. napus*, cruciferins and napins, differ substantially in their isoelectric points (Wanasundara 2011). Lower protein extractability from rapeseed meal under acidic conditions was documented by Sari et al.

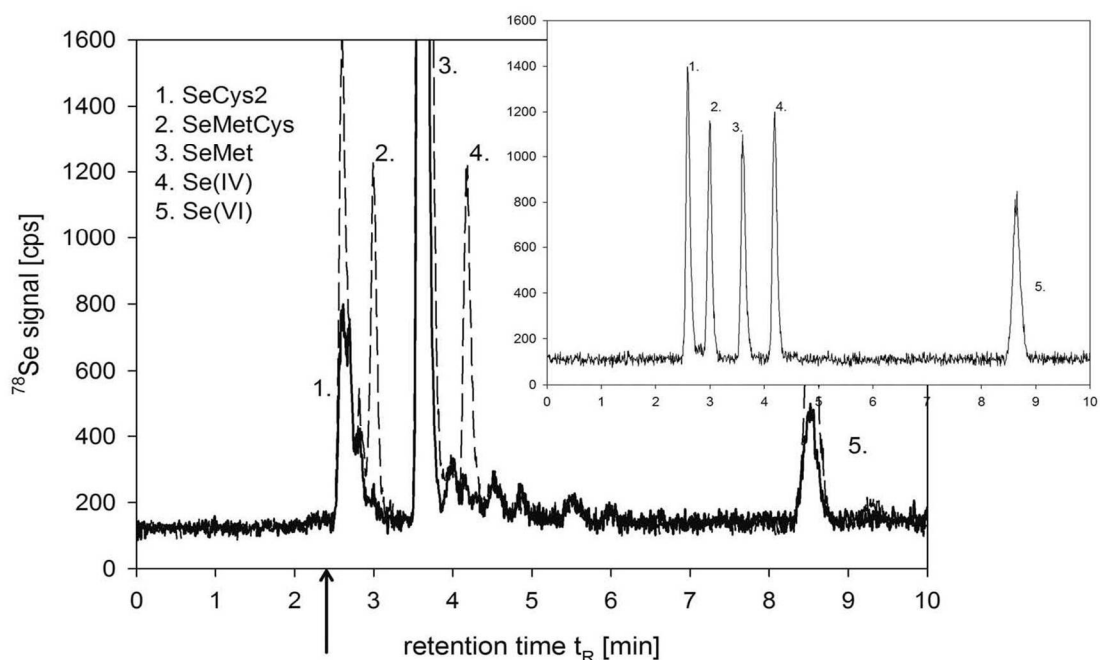


**Table 5.** Selenium chemical speciation in rapeseed tissue grown in Chernozem.

Treatment n = 2	SeCys2	SeMetCys	SeMet	Se(IV)	Se(VI)	E.E.	C.R.
	$\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{ DW } (\pm \text{SD})$					%	
<b>Roots</b>							
Se <sub>0</sub> S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	n.d.	n.d.	12.5 ± 0.5	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.1	43	38
S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	n.d.	n.d.	79.6 ± 3.2	4.6 ± 1.0	1.1 ± 0.1	46	38
S <sub>43</sub> P <sub>32</sub>	n.d.	n.d.	81.1 ± 6.5	12.0 ± 0.1	2.2 ± 0.6	55	41
S <sub>128</sub> P <sub>32</sub>	n.d.	n.d.	16.4 ± 0.5	4.8 ± 0.2	1.2 ± 0.3	29	46
<b>Seeds</b>							
Se <sub>0</sub> S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	n.d.	n.d.	3.9 ± 1.1	n.d.	0.7 ± 0.7	19	27
S <sub>0</sub> P <sub>32</sub>	3.3 ± 0.1	n.d.	43.1 ± 0.4	n.d.	0.6 ± 0.0	22	47
S <sub>43</sub> P <sub>32</sub>	13.3 ± 0.4	n.d.	132.9 ± 2.5	n.d.	0.3 ± 0.2	47	72
S <sub>128</sub> P <sub>32</sub>	10.4 ± 0.3	n.d.	159.4 ± 7.8	n.d.	0.7 ± 0.3	57	66

E.E. and C.R. denote extraction efficiency and column recovery, respectively. DW, SD, and n.d. mean dry weight, standard deviation, and not detected, respectively.

(2013). Although Seppänen et al. (2010) and Balán et al. (2014) employed similar extraction conditions buffered at *pH* 7.5, their extraction efficiencies were not consistent. There are also additional factors to consider, mainly seed wall structure/integrity, and the content of oil and phenolic compounds, that have a potential to modify protein extractability (Sari et al. 2013). Our results suggested that higher seed Se content and S supply predetermined higher Se extractability. For seed extractions, Se column recovery was as low as 27% for Se<sub>0</sub>S<sub>0</sub>P<sub>32</sub> and reached up to 72% for selenium treated plants (Table 5), while the recovery from root extracts was more uniform, measuring 41 ± 4%. Selenium column recovery was difficult to determine and in some studies was not considered. Our low recoveries were not surprising given that the level of enzymatic hydrolysis for rapeseed meal proteins was < 30% (Chabanon et al. 2007; Zhou et al. 2016). These two research groups analysed their findings by size-exclusion chromatography (SE-HPLC) with the hydrolysates being a mixture of peptides in the molecular weight range up to 10,000 Da. The *pH*-controlled ability of rapeseed proteins to form complexes with phytic acid (Wanasundara 2011), salts of phytic acid being a common P species in seeds, may also contribute to a lower extraction efficiency and column recovery. Figure 3 shows a chromatogram obtained after injection of a standard solution at 0.5  $\mu\text{g Se L}^{-1}$  of each Se species, giving a satisfactory detection capability in the sub-parts-per-billion (ppb) concentration range. Individual Se species in *B. napus* extracts were identified by comparison with the retention times (*t<sub>R</sub>*) of the available standards and by a spiking procedure. The distribution of Se species had to be corrected due to the high levels of SeMet (80 ± 2  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ ), Se(IV; 15 ± 0  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ ), and Se(VI; 42 ± 1  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ ) in the protease as quantified in triplicate in control samples. Selenomethionine was by far the main Se species detected in enzymatically hydrolyzed roots and seeds regardless of S supply, constituting 73–93% of the Se identified, suggesting the importance of the S metabolic pathway producing methionine. These results were consistent with SeMet contents in protease-treated rapeseed seeds and meals reported by other researchers (Seppänen et al. 2010; Bañuelos et al. 2012). Bañuelos et al. (2012) published chromatographic profiles of Se species in *B. napus* seed (Se<sub>tot</sub> = 1800  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) harvested from a soil naturally laden with inorganic Se as follows: 66% SeMet, 20% SeMetCys, 14% SeCys2. Moreover, a complementary analysis using bulk X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy corroborated the prevalence of C-Se-C compounds (90–95%), the rest was assigned to RS-Se-SR forms (seleno-diglutathione). Apparently, these techniques confirmed C-Se-C compound levels and not SeCys2, although both techniques were capable of detecting the later form. Seppänen et al. (2010) investigated the seed (Se<sub>tot</sub> = 474  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ ) of *B. napus* grown in soil fertilized with SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (20 g Se ha<sup>-1</sup>), and the seed (Se<sub>tot</sub> = 1095  $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ ) harvested after a combined SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> application (20 g Se ha<sup>-1</sup> into soil and 30 g Se ha<sup>-1</sup> to the leaves). Interestingly, 97% of Se<sub>tot</sub> was SeMet in the protease-treated seed from the combined Se supplementation, just soil application resulted in only 66% SeMet; in both cases, no other Se species



**Figure 3.** Chromatogram of a rapeseed hydrolysate (solid line) spiked with  $8.5 \mu\text{g Se L}^{-1}$  as SeMet and  $0.5 \mu\text{g Se L}^{-1}$  as the other four species (dashed line). The black arrow indicates the void volume of the column. Chromatographic separation of the five Se species injected as a mixture of Se standards ( $0.5 \mu\text{g Se L}^{-1}$  each) is depicted at the top on the right side.

were identified. One might speculate that the pronounced SeMet biosynthesis reflected a luxury Se uptake or, alternatively, root-absorbed  $\text{SeO}_4^{2-}$  underwent a more complex biotransformation in *B. napus* as compared to foliar application. A wider range of Se metabolites might partially explain the low column recoveries we observed. After translocation of Se and S within  $S_{128}P_{32}$  plants, the remaining Se in the roots was poorly extractable, whereas SeMet content in the seed increased along with a higher Se extraction efficiency as compared to  $S_{43}P_{32}$  plants (Table 5). In addition to SeMet, we detected SeCys2 in the seed extracts (Figure 3), representing up to 9% of those Se species separable on the column used. The origin of the C-Se-Se-C compound was believed to be oxidation of selenocysteine (Bañuelos et al. 2012). We only found SeCys2 in seeds of plants treated with Se (Table 5). Traces of  $\text{SeO}_4^{2-}$  in seed might be attributable to the protease given a margin of error in the selenate subtraction procedure. The minor Se species determined in root extracts were  $\text{SeO}_3^{2-}$ , accounting for up to 21% of Se identified, and whose percentage increased with S supply in selenium treated plants, and traces of  $\text{SeO}_4^{2-}$ . The absence of  $\text{SeO}_3^{2-}$  in seeds confirmed its low translocation capacity in *B. napus* (Kikkert and Berkelaar 2013). The methylated form, SeMetCys, was not identified in either seeds or roots.

## Conclusion

Soil type and its physicochemical characteristics were shown to be the major factor determining the efficiency of seed enrichment with selenium. Higher  $\text{SO}_4^{2-}$  application rates significantly decreased Se fortification efficiency for rapeseed grown in Cambisol. By contrast, in Chernozem, the highest  $\text{SO}_4^{2-}$  supply maximized seed Se content, showing a strong Se remobilization from vegetative organs. We proved that Se and S assimilation in rapeseed were significantly interrelated, particularly when cultivated in Chernozem, most likely through a shared  $\text{SeO}_4^{2-}/\text{SO}_4^{2-}$  pathway. A weaker S/Se correlation found for rapeseed grown in Cambisol implied that at least a portion of Se taken up by plants was not  $\text{SeO}_4^{2-}$ , thus deviating from a  $\text{SO}_4^{2-}$  assimilation pathway. Seed Se



content was not significantly affected by phosphate supply (this conclusion was drawn based on the  $S_{128}$  plants to avoid misinterpretation due to severe S deprivation). Low Se extraction efficiency from rapeseed tissues and low column recovery hampered the quantitative elucidation of the impact of S supply on Se speciation in root and seed tissues. The widely used speciation technique incorporating protease extraction and HPLC-ICPMS separation/detection has to be reconsidered when encountering protease resistant tissues. Selenomethionine was the main Se species detected in protease-treated roots and seeds grown in Chernozem regardless of S treatment. Finally, we strongly recommend that generalization on the effects of S and P fertilizers on Se fortification efficiency via  $SeO_4^{2-}$  application into soil should be avoided, at least until the main Se species in a given soil are taken into account.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by the The University Internal Grant Competition at Czech University of Life Sciences Prague [CIGA no. 20172019].

## ORCID

Lukáš Praus  <http://orcid.org/0000-0001-7244-5509>

Jiřina Száková  <http://orcid.org/0000-0002-3390-6365>

Walter Goessler  <http://orcid.org/0000-0002-0142-9373>

## References

- Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, J-C Avice, Ourry A. 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J Exp Bot.* 61:2635–2646.
- Alfthan G, Euroala M, Ekholm P, Venäläinen ER, Root R, Korkalainen K, Hartikainen H, Salminen P, Hietaniemi V, Aspila P, et al. 2015. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: from deficiency to optimal selenium status of the population. *J Trace Elem Med Bio.* 31:142–147.
- Aulakh MS, Pasricha NS. 1977. Interaction effect of sulphur and phosphorus on growth and nutrient content of Moong (*Phaseolus aureus* L.). *Plant Soil.* 47:341–350.
- Balán J, Vosmanská M, Száková J, Mestek O. 2014. Speciation analysis of selenium in the defatted rapeseed meal. *Chem Listy.* 108:256–263. Czech.
- Bañuelos GS, Walse SS, Yang SI, Pickering IJ, Fakra SC, Marcus MA, Freeman JL. 2012. Quantification, localization, and speciation of selenium in seeds of canola and two mustard species compared to seed-meals produced by hydraulic press. *Anal Chem.* 84:6024–6030.
- Barczak B, Klikocka H, Kozera W, Knapowski T. 2018. Assessment of the effect of sulphur fertilisation on oat grain yield and micronutrient uptake. *J Elem.* 23:45–56.
- Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X, Chenu S, Marc I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem.* 42:1419–1428.
- Devau N, Hinsinger P, Le Cadre E, Colomb B, Gérard F. 2011. Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochim Cosmochim Acta.* 75:2980–2996.
- Dhillon SK, Dhillon KS. 2009. Phytoremediation of selenium-contaminated soils: the efficiency of different cropping systems. *Soil Use Manage.* 25:441–453.
- Dubousset L, Etienne P, Avice JC. 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *J Exp Bot.* 61:4314–4324.
- Fatma M, Asgher M, Masood A, Khan NA. 2014. Excess sulfur supplementation improves photosynthesis and growth in mustard under salt stress through increased production of glutathione. *Environ Exp Bot.* 107:55–63.
- Fernández-Martínez A, Charlet L. 2009. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 8:81–110.

- Goh KH, Lim TT. 2004. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere*. 55:849–859.
- Golob A, Gadžo D, Stibilj V, Djikić M, Gavrić T, Kreft I, Germ M. 2016. Sulphur interferes with selenium accumulation in Tartary buckwheat plants. *Plant Physiol Bioch*. 108:32–36.
- Hopper JL, Parker DR. 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant Soil*. 210:199–207.
- Institute of Medicine (US). 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F. 2009. Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *J Exp Bot*. 60:269–277.
- Islam M. 2012. The effect of different rates and forms of sulfur on seed yield and micronutrient uptake by chickpea. *Plant Soil Environ*. 58:399–404.
- Kikkert J, Berkelaar E. 2013. Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65:458–465.
- Kikkert J, Hale B, Berkelaar E. 2013. Selenium accumulation in durum wheat and spring canola as a function of amending soils with selenite, selenate and or sulphate. *Plant Soil*. 372:629–641.
- Kubachka KM, Hanley T, Mantha M, Wilson RA, Falconer TM, Kassa Z, Oliveira A, Landero J, Caruso J. 2017. Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chem*. 218:313–320.
- Li H-F, McGrath SP, Zhao F-J. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol*. 178:92–102.
- Lindblow-Kull C, Kull FJ, Shrift A. 1985. Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 163:1267–1269.
- Liu X, Yang Y, Deng X, Li M, Zhang W, Zhao Z. 2017. Effects of sulfur and sulfate on selenium uptake and quality of seeds in rapeseed (*Brassica napus* L.) treated with selenite and selenate. *Environ Exp Bot*. 135:13–20.
- Liu X, Zhao Z, Hu C, Zhao X, Guo Z. 2016. Effect of sulphate on selenium uptake and translocation in rape (*Brassica napus* L.) supplied with selenate or selenite. *Plant Soil*. 399:295–304.
- Mehlich A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Commun Soil Sci Plan*. 15:1409–1416.
- Navarro-Alarcón M, Cabrera-Vique C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ*. 400:115–141.
- Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ. 2007. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biol*. 9:647–653.
- Praus L, Száková J, Tremlová J. 2019. Fast abiotic sorption of selenates ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) in soils: pitfalls of batch sorption data acquired by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (ICP-QMS). *Arch Agron Soil Sci*. 65:566–580.
- Renkema H, Koopmans A, Kersbergen L, Kikkert J, Hale B, Berkelaar E. 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant Soil*. 354:239–250.
- Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Le Gouee P, Avicé JC, Ourry A. 2013. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *J Agric Sci*. 152:616–633.
- Sari YW, Bruins ME, Sanders JPM. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Ind Crop Prod*. 43:78–83.
- Schnug E, Haneklaus S. 2005. Sulphur deficiency symptoms in oilseed rape (*Brassica napus* L.) – the aesthetics of starvation. *Phyton*. 45(3):79–95.
- Seppänen MM, Kontturi J, Lopez-Heras I, Madrid Y, Cámara C, Hartikainen H. 2010. Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium-enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal. *Plant Soil*. 337:273–283.
- Sharma S, Bansal A, Dhillon SK, Dhillon KS. 2010. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Soil*. 329:339–348.
- Sheldrick BH. 1984. Acid ammonium oxalate extractable Fe and Al. In: Sheldrick BH, editor. Analytical methods manual. Ottawa: Land Resource Research Institute, Agriculture Canada Research Branch; p. 11/1–11/3.
- Shinmachi F, Buchner P, Stroud JL, Parmar S, Zhao F-J, McGrath SP, Hawkesford MJ. 2010. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiol*. 153:327–336.
- Stroud JL, Li HF, Lopez-Bellido FJ, Broadley MR, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Hart DJ, Hurst R, Knott P, Mowat H, et al. 2010. Impact of sulphur fertilisation on crop response to selenium fertilisation. *Plant Soil*. 332:31–40.
- Thomke S. 1981. Review of rapeseed meal in animal nutrition: ruminant animals. *J Am Oil Chem Soc*. 58:805–810.
- Wanasundara JPD. 2011. Proteins of Brassicaceae oilseeds and their potential as a plant protein source. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 51:635–677.
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, et al. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*. 55:1927–1937.

- Zehr JP, Oremland RS. 1987. Reduction of selenate to selenide by sulfate-respiring bacteria: experiments with cell suspensions and estuarine sediments. *Appl Environ Microb.* 53:1365–1369.
- Zhang D, Dong T, Ye J, Hou Z. 2017. Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by coapplication of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Sci Plant Nutr.* 63:37–44..
- Zhang Q, Lee B-R, Park S-H, Zaman R, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H. 2015. Sulfate resupply accentuates protein synthesis in coordination with nitrogen metabolism in sulfur deprived *Brassica napus*. *Plant Physiol Bioch.* 87:1–8.
- Zhou C, Yu X, Qin X, Ma H, Yagoub AEA, Hu J. 2016. Hydrolysis of rapeseed meal protein under simulated duodenum digestion: kinetic modelling and antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 68:523–531.



#### **4.4 PUBLIKACE IV**

SzÁková, J., Praus, L., TremlovÁ, J., KulhÁnek, M., Tlustoš, P. 2017. Efficiency of foliar selenium application on oilseed rape (*Brassica napus* L.) as influenced by rainfall and soil characteristics. Archives of Agronomy and Soil Science. 63 (9). 1240-1254.



## Efficiency of foliar selenium application on oilseed rape (*Brassica napus* L.) as influenced by rainfall and soil characteristics

Jiřina Száková, Lukáš Praus, Jana Tremlová, Martin Kulhánek and Pavel Tlustoš

Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Prague, Czech Republic

### ABSTRACT

The Czech Republic is characterized by a low Se soil content, resulting in Se deficiency in crops, humans, and animals. This study investigated the response of oilseed rape to foliar application of selenate solution in a microscale field experiment conducted at two locations differing in soil and climatic conditions but with comparable total Se contents. Sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) was applied at two rates (25 and 50 g Se  $\text{ha}^{-1}$ ). The potential effect of Se application on the uptake of essential elements was also evaluated. The foliar Se application resulted in an effective stepwise increase in the Se contents of all the plant components studied (leaves > stems > roots > siliques ~ seeds), as expected. No significant influence of Se fortification on the other investigated macro- and micro-elements was observed. However, the soil and climatic conditions influenced the Se uptake, such that a higher Se content was observed in plants grown in the most acidic location (Cambisol soil) that had a higher oxidizable carbon content and higher average annual rainfall compared to the less acidic location (Luvisol soil). These observations indicated the necessity to optimize the Se application for the particular soil and climatic conditions to achieve a maximum biofortification effect.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 September  
2016  
Accepted 19 December 2016

### KEYWORDS

Selenium; *Brassica napus* L.;  
foliar application; nutrient  
uptake

## Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a valuable source of oil (45–50% v/v in the mature seeds) and protein (40% in rapeseed meal) for animal and human nutrition. Additionally, it constitutes a rich source of health-promoting phytochemicals, such as phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, vitamins, fats, and carotenoids (Jahangir et al. 2012). The oil from 00-quality oilseed rape contains high amounts of C18 fatty acids, including oleic acid (C18:1, 60% v/v), linoleic acid (C18:2, ~30% v/v), and linolenic acid (C18:3, ~10% v/v). The meal obtained after oil extraction represents a valuable feedstuff for animal nutrition and a potential protein source for human nutrition. The meal contains a favorable composition of amino acids, including the essential sulfur (S)-containing amino acids, methionine, and cysteine (Wittkop et al. 2009). Oilseed rape also has an excellent ability to accumulate Se (Bañuelos et al. 1997). Therefore, this crop can be considered a suitable species for potential bioremediation of Se-contaminated soil (Bañuelos 1996).

Se is an essential microelement in humans and animals, but is not considered to be essential for higher plants, although numerous studies show benefits from Se addition to plants (Lyons et al. 2009). Se acts as a growth regulator, antioxidant, anti-senescent, abiotic stress modulator, and defensive molecule against pathogens at low concentrations in plants. Increases in antioxidant

**CONTACT** Jiřina Száková ✉ [szakova@af.czu.cz](mailto:szakova@af.czu.cz) 📧 Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Prague, Czech Republic

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

enzyme activity associated with applied Se have been observed (Hartikainen et al. 2000; Djanaguiraman et al. 2010). Plants take up selenate *via* S transporters and assimilate it into selenocysteine (SeCys) and selenomethionine (SeMet) that perform different roles in the plant (Ellis & Salt 2003). Klognerová et al. (2015) determined the Se compounds in Se-fortified and control oilseed rape plants, where SeMet was identified in the fortified plants. In the defatted oilseed rape meal, the predominant Se compound was SeMet (Seppänen et al. 2010).

Se can counteract various abiotic stresses induced in plants by cold, drought, intense light, water, salinity, and heavy metals (Djanaguiraman et al. 2010; Feng et al. 2013; Kaur et al. 2014). However, at high concentrations ( $>1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Se has been shown to cause various toxic symptoms in plants, which include stunting of growth, chlorosis, withering, and drying of leaves, decreased protein synthesis, premature and even death of the plant (Kaur et al. 2014). At  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of soil, Se resulted in significant yield loss of ryegrass (*Lolium perenne*) (Hartikainen et al. 2000).

Se uptake by plants is affected by a complex of soil physicochemical parameters. For instance, Johnsson (1991) showed pH, and clay contents influenced Se availability. According to Moreno Rodriguez et al. (2005), soil Se is predominantly associated with humified organic material. Generally, in humid regions and acid soils, Se predominantly exists as its inorganic form, selenite, whereas, under well-aerated conditions in the alkaline soils of semiarid regions, it is present as selenate. Selenite is tightly adsorbed on sesquioxides and clay minerals in acid soils, hence its availability for plants is limited. On the contrary, selenate is poorly adsorbed and remains available for plants (Čuvarđić 2003). Thus, the soil application of selenate resulted in higher Se contents in *Lolium perenne* and *Lactuca sativa* compared to selenite (Cartes et al. 2005; Pezzarossa et al. 2007). Cultivation of oilseed rape in Se-rich soils can result in a deterioration of seed quality, where the soil amendments with organic matter, such as farmyard manure, can lead to a significant increase in oil concentration and alter the proportion of various fatty acids in the seeds (Sharma et al. 2011). The beneficial effect of low Se contents on the yield of *Brassica rapa* seeds were observed by Lyons et al. (2009).

In contrast to seleniferous soils, low soil Se levels characterize some regions, including Middle Europe and the Czech Republic (Száková et al. 2015). The potential improvement in the Se status of Se-deficient areas has been intensively investigated. For instance, the feeding of Se-enriched oilseed rape biomass can lead to improved Se status in animals. Bañuelos & Mayland (2000) reported increased Se contents in tissues and excreta of lambs fed oilseed rape biomass containing  $4 \text{ mg Se kg}^{-1}$ . Biofortification with Se-containing fertilizers was recommended as a relatively fast and efficient approach to improve the Se contents of crops (Hawkesford & Zhao 2007). Also, seleniferous organic matter originating from Se-rich and, or, Se-supplemented areas can act as a slow-release Se fertilizer (Ajwa et al. 1998). Broadley et al. (2010) studied the potential to increase the Se concentration in wheat (*Triticum aestivum*) *via* selenate fertilizers, where the total recovery (grain and straw) of added Se was 20–35% when supplemented at  $10 \text{ g Se per ha}$ . Among the other available methods of Se enhancement in crop production, foliar application is frequently used (Aspila 2005).

The main objective of this study was to assess the response of oilseed rape plants to foliar Se supplementation under different agronomic and climatic conditions in order to identify the most important parameters affecting the efficiency of Se biofortification. This investigation evaluated the response of oilseed rape plants grown at two different locations to foliar selenate solution application as affected by (i) Se rate, (ii) reproductive stage, and (iii) soil and climatic conditions. Among various biochemical and physicochemical factors connected with the potential impact of selenization on the plant organism, the potential interactions of Se with macro- and micronutrients in plants are not frequently investigated. Drahoňovský et al. (2016) reported ambiguous changes in essential element contents in selenized wildlife plants. In the case of crops, various changes in the nutrient contents in wheat, oilseed rape, and broccoli after Se supplementation were observed (Filek et al. 2010; Šindelářová et al. 2015). Thus, as a second objective, the potential effect of



increasing the Se uptake in oilseed rape plants on the uptake and distribution of other essential macro- and microelements was estimated, as well.

## Material and methods

### Experimental design

Two locations in the Czech Republic differing in both climatic and soil physicochemical parameters were chosen for a microscale field experiment. Location A was the Crop Research Institute experimental station at Humpolec (49°33'16"N, 15°21'2"E), which is characterized as follows: altitude, 525 m above sea level; average annual temperature, 7.0°C; average annual rainfall, 665 mm; soil type, Cambisol; texture, sandy loam; cation exchange capacity (CEC), 90 mmol(+) kg<sup>-1</sup>; oxidizable carbon (C<sub>ox</sub>) content, 1.24%; and pH (CaCl<sub>2</sub>), 5.1. Location B was the Czech University of Life Sciences experimental station at Červený Újezd (49°33'16"N, 15°21'2"E), which has the following characteristics: altitude, 398 m above sea level; average annual temperature, 7.7°C; average annual rainfall, 493 mm; soil type, Luvisol; texture, loam; CEC, 118 mmol(+) kg<sup>-1</sup>; oxidizable carbon (C<sub>ox</sub>) content, 1.01%; and pH (CaCl<sub>2</sub>), 6.5 (Vašák et al. 2015). Pseudototal (*Aqua regia*-soluble) Se contents were 0.66 ± 0.08 mg kg<sup>-1</sup> (location A) and 0.72 ± 0.07 mg kg<sup>-1</sup> (location B), respectively.

At each location, the winter oilseed rape (*B. napus*) seeds of the variety DK Exquisite were sown on 12 subplots (10 m<sup>2</sup> each) laid out in a completely randomized design with four repetitions for each treatment. Fungicides and insecticides were regularly applied during the vegetative phase according to the requirements. A water solution of analytical grade sodium selenate (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) was applied to each variety at the beginning of stem elongation as follows: (i) C – untreated variant; (ii) Se1 – added at a rate equivalent to 25 g Se ha<sup>-1</sup>; (iii) Se2 – added at a rate equivalent to 50 g Se ha<sup>-1</sup>. Three plants from each subplot were randomly harvested in (i) full flowering, (ii) end of flowering, and (iii) full maturity. The stems, leaves, and roots were separated and weighed. In the last sampling, mature seeds and siliques were also separated. At location B, no leaves were sampled from the mature plants because of senescence. The harvested plant biomass was gently washed with deionized water, freeze-dried, finely ground using a laboratory mortar (Retsch SM100, Germany), and kept in a dry place until the analyses. The composite soil samples (depth 0–25 cm) were collected at each subplot together with the mature plant samples. Soil samples were dried at 20°C, ground in a mortar, and passed through a 2-mm plastic sieve. The pseudototal (i.e. *Aqua regia*-soluble) contents of Se, soil pH, and CEC levels in the soil were determined as described elsewhere (Száková et al. 2015).

### Analytical methods

The freeze-dried and homogenized plant samples were decomposed in a microwave-assisted wet digestion system with focused microwave heating (Discover SPD-Plus, CEM Inc., U.S.A.). An aliquot (~0.5 g of dry matter) of the plant sample was weighed into a quartz-glass digestion vessel (35 mL volume). Then, 10 ml of concentrated Analpure® nitric acid (Analytika Ltd., Czech Republic) was added; the mixture was heated at a maximum power of 300 W, at 202°C, and 21 bar for 8 min. After cooling, the solution was quantitatively transferred to plastic tubes, filled to 50 mL with deionized water, and kept at laboratory temperature until measurement (Kelly et al. 2013). Data quality was assured by analyzing the standard reference material of peach leaves (NIST 1547). The Se content of the digests was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., U.S.A.) using a collision cell to decrease potential spectral interferences. The operating conditions were as follows: RF power of 1550 W, sampling depth of 8 mm, plasma gas flow of 15.0 L min<sup>-1</sup>, auxiliary flow of 0.9 L min<sup>-1</sup>, helium collision cell flow of 8 L min<sup>-1</sup>. An ASX-500 autosampler, a three-channel peristaltic pump, and a Micromist nebulizer equipped

the ICP-MS. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES, Agilent 720, Agilent Technologies Inc., U.S.A.) equipped with a two-channel peristaltic pump, a Struman–Masters spray chamber, and a V-groove pneumatic nebulizer made of inert material was used to determine Cu, Fe, Mn, Zn, P, and S in the digests under the following experimental conditions: power of 1.2 kW, plasma gas flow of 15.0 L min<sup>-1</sup>, auxiliary flow of 0.75 L min<sup>-1</sup>, and nebulizer flow of 0.9 L min<sup>-1</sup>. Flame atomic absorption spectrometry (F-AAS, Varian 280FS, Varian, Australia) at air flow of 13.5 L min<sup>-1</sup>, acetylene flow of 2.2 L min<sup>-1</sup>, burner height of 13.5 cm, and nebulizer uptake rate of 5 mL min<sup>-1</sup> was used for Ca, Mg, and K determination in the digests.

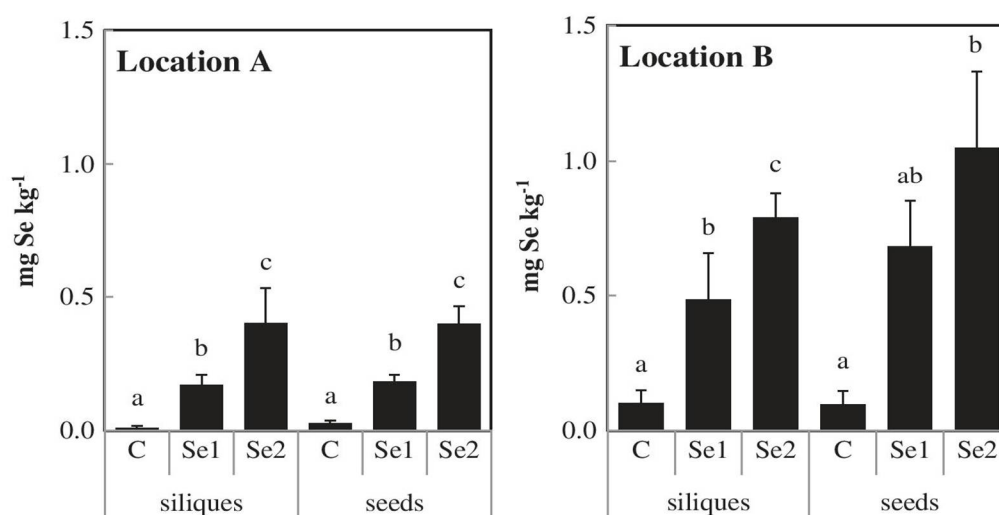
### Statistics

The analytical data were processed using Microsoft Office Excel 2007 and Statistica 12 CZ statistical software. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance at  $\alpha = 0.05$  followed by Tukey's test. Pearson's correlation coefficient was used to assess the association between variables ( $\alpha = 0.05$ ).

## Results and discussion

### Selenium uptake and translocation in plants

Figure 1 shows the Se contents of the oilseed rapeseeds were significantly affected by both the Se rate and location. De La Luz Mora et al. (2008) reported a decrease in white clover (*Trifolium repens*) growth when Se rate was higher than 20 g ha<sup>-1</sup>. However, they included selenite into the adhesive solution used to coat the seeds before sowing. Thus, the plants were in direct contact with enhanced Se content from the beginning of the vegetation period. At the Se2 rate, the seed Se contents reached a maximum of  $0.40 \pm 0.07$  mg kg<sup>-1</sup> at location A and  $1.05 \pm 0.28$  mg kg<sup>-1</sup> at location B. Although the total Se contents in the soil at both locations were comparable ( $0.66 \pm 0.08$  vs.  $0.72 \pm 0.07$  mg kg<sup>-1</sup>, see Experimental design), the slightly higher Se contents at location B compared with location A was also reported at the untreated plots C. Klognerová et al. (2015) studied the effect of cultivation area on both total Se contents and the proportions of Se compounds identified in Se-fortified oilseed rape plants. At soil pH < 6, plants show a higher Se



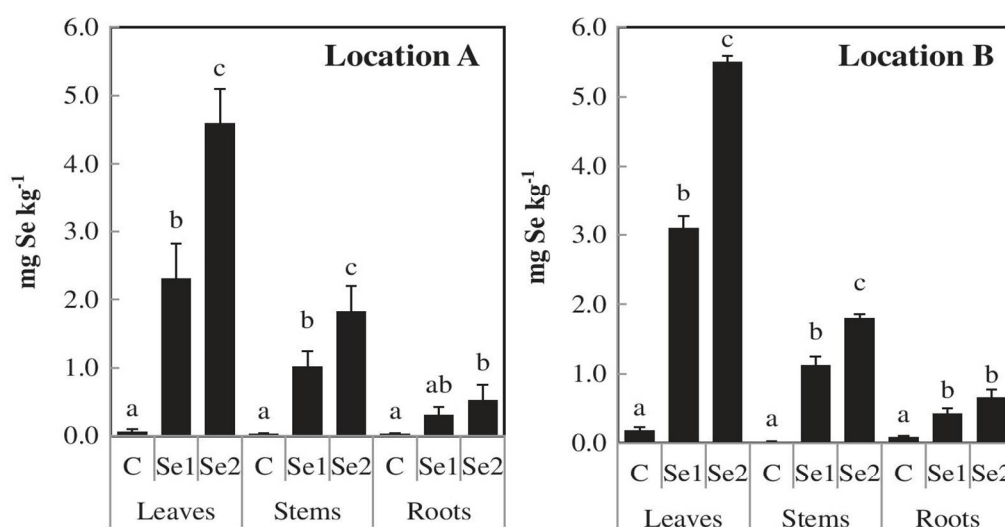
**Figure 1.** The Se contents in the mature siliques and seeds of the oilseed rape according to the individual locations and application rates; the averages marked by the same letter did not significantly differ at  $p < 0.05$  within individual treatments;  $n = 4$ .



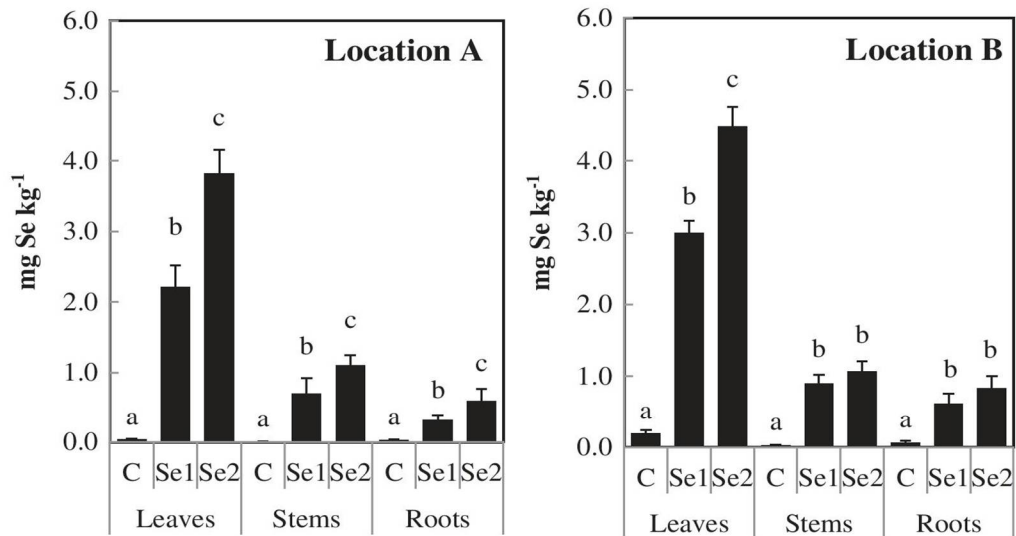
uptake from added Se fertilizer in soils with high organic matter content than with loam (Eich-Greatorex et al. 2007). Moreno Rodriguez et al. (2005) observed a high mobile pool of Se in alkaline soils (pH 7.1–9.0). In our study, the cultivation of oilseed rape at location A, which was more acidic (pH 5.1) and had a higher  $C_{ox}$  content than location B, presented lower Se bioavailability, where the presence of less available selenites can be assumed (Mikkelsen et al. 1987). Other factors, such as the transpiration pool, can affect the uptake and translocation of Se in oilseed rape plants (Renkema et al. 2012). The Se contents in siliques did not significantly differ from the seeds (Figure 1).

The foliar application of Se resulted in a stepwise increase in the Se contents in all the plant components, including the roots (Figures 2–4), as expected. The Se contents were highest in the leaves > stems > roots. A similar trend was reported in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*), at identical Se rates (Šindelářová et al. 2015). Expectably, a different pattern is observed if the soil Se is the main Se source for plants. A higher Se accumulation in roots compared to shoots was observed in oilseed rape as well as in other crops (Molnářová & Fargašová 2009). Our previous results on Se-supplemented broccoli (Šindelářová et al. 2015) and various wildlife plants (Drahoňovský et al. 2016) showed that, in many instances, the Se2 rate (50 g Se ha<sup>-1</sup>) did not increase the plant Se contents compared to the lower rate (25 g Se ha<sup>-1</sup>). In the oilseed rape plants, the increasing Se rate led to a stepwise enhancement of the Se content although the differences were not always significant. Thus, oilseed rape confirmed a considerable Se accumulation ability in concurrence with Bañuelos (1996) and Bañuelos et al. (1997). During vegetation, the Se contents in the stems and leaves tended to decrease due to the dilution effect of the growing plant biomass. In roots, the Se contents tended to decrease only in the mature plants.

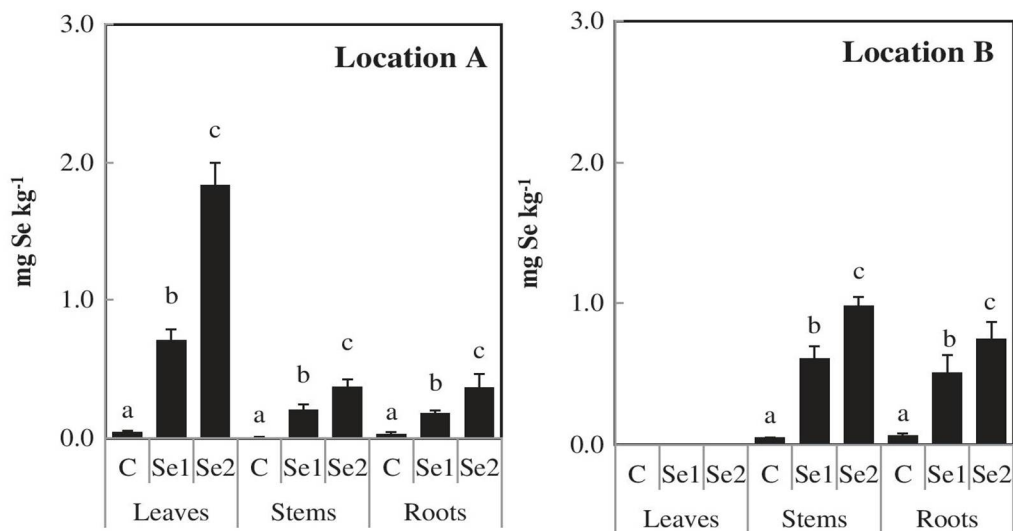
The literature frequently discusses the response of plant Se uptake in the context of the Se compound used for the fortification. Sharma et al. (2010) cultivated oilseed rape plants in soil treated with either selenite or selenate and found that the plants were stressed more in the selenate- compared to selenite-treated soil. A lower Se uptake by the oilseed rape plants after soil selenite compared to selenate application was also reported by Kikkert et al. (2013). A similar response in oilseed rape plants was reported by Seppänen et al. (2010) after foliar application of both compounds. Ebrahimi et al. (2015) compared the impact of selenate and organic (Se-enriched stems and leaves residues) Se applications on the growth and Se concentrations in various plant



**Figure 2.** The changes in Se contents in the flowering stage of the oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and application rates; the averages marked by the same letter did not significantly differ at  $p < 0.05$  within individual treatments;  $n = 4$ .



**Figure 3.** The changes in Se contents in the end of flowering stage of the oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and application rates; the averages marked by the same letter did not significantly differ at  $p < 0.05$  within individual treatments;  $n = 4$ .



**Figure 4.** The changes in Se contents in the maturity stage of the oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and application rates; the averages marked by the same letter did not significantly differ at  $p < 0.05$  within individual treatments;  $n = 4$ .

tissues of oilseed rape during its development from the rosette to the seed-filling stage. The results showed that inorganic Se was more bioavailable than its organic forms, resulting in higher Se contents in plants after inorganic Se application. For the individual inorganic Se compounds, differences in their bioavailability were reported, as well. In our previous investigation (Rusová et al. 2013), the foliar application of selenite ( $50 \text{ g Se ha}^{-1}$ ) resulted in Se seed contents between  $0.325$  and  $0.353 \text{ mg kg}^{-1}$  at location A and between  $0.222$  and  $0.377 \text{ mg kg}^{-1}$  at location B. Thus, the results confirmed a lower Se uptake if applied as selenite than selenate. Moreover, no differences were reported between Se accumulation at locations A and B, indicating improved uptake of selenite at location A, where selenites may dominate Se speciation in the soil. Thus, these



findings indicate that the soil and climatic conditions should be considered to establish the most effective Se fortification of plants. Under selenite-favorable soil conditions (e.g. low pH, high humidity), selenites seemed to be more available for plants compared to the soils with expected occurrence of selenates, even if the Se compound was applied to the plant leaves. This aspect needs to be investigated and confirmed by further research.

### ***The association between the macro- and microelement contents in the oilseed rape plants***

The Se biofortification of plants is frequently associated with possible alterations and disbalances in uptake and translocation of other essential macro- and microelements. Tables 1–4 summarize the effects of location, vegetation stage, and plant component on the essential element contents in oilseed rape plants. Among the nutrients investigated, the interactions between Se and S are among the most discussed because they compete for biochemical processes and share similar chemical properties. Wheat plants (*Triticum turgidum* L. var *durum* cv 'Kyle') exposed to selenate and sulfate showed increased accumulation and translocation under hydroponic conditions at high relative humidity (78%) than when exposed to selenate without sulfate or biselenite (Renkema et al. 2012). Also, an antagonism between Se and S uptake in oilseed rape and *Arabidopsis thaliana* was shown by Arthur et al. (1992) and White et al. (2004). In our instance, there was no significant effect of Se addition on S accumulation in the plants, which was probably due to the low levels of added Se that were insufficient to significantly change the high S plant contents. The highest S contents were found in leaves and the lowest in the roots and stems. Except for leaves with the opposite pattern, the S contents in vegetative plant components decreased during vegetation, showing a minimum in the mature plants.

For other investigated elements, Se application did not significant changes in the nutrient contents, although there is evidence documenting the effect of Se on the uptake and distribution of nutrients in plants. For instance, Zembala et al. (2010) observed decreasing Mg and P concentrations in selenate-treated rape roots grown in soilless culture, while the Zn concentrations increased in both the roots and shoots. Inter-element interactions in the oilseed rape plants were investigated by Szczepaniak et al. (2015) under field conditions, where Mg acts to balance excess Ca. Additionally, Mg concentration is negatively impacted by Mn. On the contrary, a decrease in Zn accumulation but an increase in the uptake of Se, Fe, and Na by wheat plants cultivated under drought stress was observed by Nawaz et al. (2015) after foliar Se application. The changes in K content in Se-supplemented oilseed rape seedlings due to an excess of Se ion inflow were reported by Filek et al. (2010) in soilless culture. The effects of Se supplementation on the uptake and translocation of macro- and micronutrients by wheat (*T. aestivum*) plants was investigated by Guerrero et al. (2014), who found that an increased Se uptake by the plants, impacted, in particular, the Ca, Fe, Zn, and Mn contents in the roots. No systematic influence of the addition of Se (25 and 50 g Se ha<sup>-1</sup>) on the intake of other essential elements was observed in broccoli (Šindelářová et al. 2015). However, various responses in essential element contents of individual wildlife plants were found by Drahoňovský et al. (2016), confirming differences among individual plant species. Evidently, the associations between the elements are affected by many factors, such as plant species, Se application rate, cultivation conditions, and soil characteristics. However, no alterations in the essential element uptake and distribution in oilseed rape seemed to confirm the relatively high tolerance of oilseed rape to the enhanced Se contents, as previously demonstrated by Bañuelos et al. (1997).

Gao and Ma (2015) investigated the interactions among the macro- and micronutrients in the oilseed rapeseeds. Increasing P supply decreased grain Fe and Zn accumulations but had no effect on Mn and Cu. Contradictorily, our results showed a positive correlation between Zn and Mn ( $r = 0.61$  and  $0.76$ , respectively, at locations A and B), and no significant association between Zn and Cu. This finding could be explained by the relatively low content of Zn in the seeds (Table 1) and the soil at both locations (127 and 70 mg Zn kg<sup>-1</sup> at locations A and B, respectively) (Dvořák

**Table 1.** The nutrient contents in mature siliques and seeds of oilseed rape according to the individual locations and Se application rates;  $n = 4$ .

Treatment	Ca mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Fe mg kg <sup>-1</sup>	K mg kg <sup>-1</sup>	Mg mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	P mg kg <sup>-1</sup>	S mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>
<b>Location A</b>									
<b>Siliques</b>									
C	9159 ± 1837	2.63 ± 0.3	73.0 ± 13.1	11,054 ± 2688	1273 ± 195	20.4 ± 4.5	3067 ± 341	2533 ± 765	15.7 ± 2.1
Se1	10,253 ± 1106	2.94 ± 0.1	98.3 ± 13.6	14,165 ± 1281	1424 ± 66	24.4 ± 2.2	3340 ± 252	3344 ± 430	17.8 ± 1.2
Se2	8677 ± 1759	2.91 ± 0.4	74.2 ± 9.9	12,895 ± 608	1473 ± 150	20.8 ± 3.0	3470 ± 279	3118 ± 400	16.7 ± 1.3
<b>Seeds</b>									
C	4950 ± 245	3.29 ± 0.1	67.0 ± 5.2	5794 ± 292	2384 ± 64	30.3 ± 0.9	5774 ± 138	2808 ± 159	25.9 ± 0.4
Se1	4804 ± 308	3.24 ± 0.1	62.5 ± 2.2	6442 ± 483	2303 ± 69	29.5 ± 1.7	5577 ± 62	2826 ± 151	25.2 ± 1.0
Se2	4747 ± 289	3.17 ± 0.1	64.8 ± 1.3	6228 ± 247	2307 ± 91	29.9 ± 2.1	5653 ± 91	2875 ± 170	26.1 ± 0.8
<b>Location B</b>									
<b>Siliques</b>									
C	13,300 ± 570	2.41 ± 0.1	60.2 ± 5.2	12,637 ± 2046	1339 ± 80	26.4 ± 1.7	4000 ± 319	3661 ± 770	11.7 ± 0.7
Se1	12,305 ± 2165	2.59 ± 0.1	54.9 ± 6.4	12,876 ± 387	1260 ± 125	28.2 ± 2.0	3843 ± 178	3395 ± 861	11.9 ± 1.5
Se2	12,462 ± 2086	2.54 ± 0.3	63.1 ± 6.6	12,180 ± 721	1267 ± 88	27.1 ± 1.4	3592 ± 297	3789 ± 196	11.5 ± 0.3
<b>Seeds</b>									
C	4626 ± 327	2.82 ± 0.1	59.4 ± 4.8	6811 ± 269	2179 ± 41	35.1 ± 1.8	6055 ± 75	2689 ± 197	18.4 ± 0.9
Se1	5299 ± 243	3.16 ± 0.1	65.8 ± 2.0	7134 ± 290	2235 ± 53	36.3 ± 1.3	6259 ± 66	2932 ± 198	20.7 ± 1.0
Se2	4806 ± 369	3.03 ± 0.2	60.7 ± 3.4	7196 ± 723	2200 ± 109	35.3 ± 1.0	6179 ± 259	2789 ± 129	19.9 ± 1.3



Table 2. The nutrient contents in leaves of oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and Se application rates; n = 4.

Treatment	Ca mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Fe mg kg <sup>-1</sup>	K mg kg <sup>-1</sup>	Mg mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	P mg kg <sup>-1</sup>	S mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>	
Location A										
Full flowering	C	31,476 ± 4377	5.75 ± 0.3	689 ± 77	47,867 ± 2611	2096 ± 366	56.4 ± 6.7	3945 ± 163	7735 ± 2092	35.2 ± 7.5
	Se1	27,163 ± 3370	5.31 ± 0.9	552 ± 59	38,151 ± 2652	1977 ± 213	49.9 ± 6.7	3969 ± 727	8909 ± 2259	41.7 ± 9.4
	Se2	26,801 ± 4017	5.31 ± 0.4	439 ± 84	43,732 ± 6693	2146 ± 143	52.2 ± 11.2	3928 ± 216	9134 ± 2881	35.6 ± 5.8
End of flowering	C	36,838 ± 3268	4.63 ± 0.6	173 ± 38	28,211 ± 5532	2011 ± 342	49.5 ± 9.5	3861 ± 421	9332 ± 3048	38.1 ± 7.3
	Se1	31,472 ± 6734	5.08 ± 0.3	250 ± 55	29,858 ± 5479	2240 ± 383	56.8 ± 7.1	3803 ± 204	10,199 ± 4314	36.1 ± 8.5
	Se2	30,431 ± 4883	4.73 ± 0.5	477 ± 110	29,891 ± 3993	2301 ± 352	58.4 ± 9.7	3741 ± 514	9710 ± 2817	35.2 ± 6.6
Maturity	C	60,514 ± 9768	3.52 ± 0.4	655 ± 109	12,589 ± 1893	3255 ± 516	70.8 ± 6.6	1569 ± 126	10,306 ± 4907	32.1 ± 2.3
	Se1	53,942 ± 3995	3.66 ± 0.5	838 ± 261	17,478 ± 4003	3244 ± 107	75.3 ± 5.8	1745 ± 113	11,417 ± 2660	29.6 ± 3.9
	Se2	52,226 ± 3395	3.97 ± 0.9	582 ± 83	14,967 ± 3360	3413 ± 547	78.2 ± 5.6	1709 ± 252	12,765 ± 2825	31.3 ± 3.7
Location B										
Full flowering	C	30,007 ± 5081	4.88 ± 0.2	107 ± 12	28,936 ± 3718	2003 ± 103	47.6 ± 4.1	4448 ± 291	6175 ± 761	32.6 ± 4.5
	Se1	33,377 ± 1698	4.93 ± 0.5	144 ± 77	29,928 ± 2497	2179 ± 189	52.3 ± 5.9	4170 ± 357	5469 ± 849	36.4 ± 8.1
	Se2	31,168 ± 1595	4.90 ± 0.5	126 ± 42	28,983 ± 2012	2172 ± 53	54.6 ± 3.4	4642 ± 243	5204 ± 415	34.4 ± 6.8
End of flowering	C	45,273 ± 1526	4.30 ± 0.7	231 ± 56	26,323 ± 2493	2681 ± 362	70.5 ± 11.0	3777 ± 146	10,208 ± 1376	26.5 ± 7.6
	Se1	42,870 ± 2802	4.48 ± 0.3	191 ± 45	24,281 ± 2171	2420 ± 165	72.9 ± 7.6	3824 ± 120	9224 ± 955	23.7 ± 0.5
	Se2	45,747 ± 3454	4.37 ± 1.0	230 ± 68	23,501 ± 1669	2560 ± 200	71.3 ± 10.6	3518 ± 104	10,588 ± 1953	24.8 ± 4.9
Maturity	C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Se1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Se2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: not analyzed.

**Table 3.** The nutrient contents in stems of oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and Se application rates;  $n = 4$ .

Treatment	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	S	Zn
	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>
Location A									
Full flowering	C	3.42 ± 0.09	274 ± 87	46,347 ± 4835	1702 ± 92	20.0 ± 2.8	3847 ± 215	3330 ± 570	19.7 ± 2.0
	Se1	3.64 ± 0.47	300 ± 54	45,146 ± 5844	1760 ± 103	22.0 ± 2.9	4286 ± 654	3951 ± 831	23.0 ± 3.8
	Se2	3.77 ± 0.15	305 ± 60	52,526 ± 6141	1765 ± 137	24.4 ± 3.2	4080 ± 321	3816 ± 655	22.2 ± 2.3
End of flowering	C	2.44 ± 0.27	174 ± 58	35,862 ± 8483	1242 ± 93	17.5 ± 2.2	2771 ± 347	2817 ± 328	13.1 ± 1.7
	Se1	2.66 ± 0.29	121 ± 33	36,298 ± 4936	1367 ± 116	17.2 ± 2.1	3012 ± 390	2894 ± 513	14.1 ± 0.9
	Se2	2.55 ± 0.12	184 ± 85	35,437 ± 3837	1279 ± 58	18.4 ± 3.7	2583 ± 200	2962 ± 658	13.9 ± 1.4
Maturity	C	1.43 ± 0.11	126 ± 35	41,327 ± 6763	709 ± 177	10.3 ± 1.7	930 ± 65	1516 ± 346	4.6 ± 1.2
	Se1	1.51 ± 0.11	157 ± 81	35,617 ± 6964	790 ± 122	12.8 ± 5.0	838 ± 221	1290 ± 589	4.0 ± 1.0
	Se2	1.56 ± 0.18	129 ± 66	41,415 ± 5372	732 ± 193	10.8 ± 3.1	953 ± 225	1918 ± 600	3.2 ± 1.2
Location B									
Full flowering	C	3.14 ± 0.41	77.7 ± 195	33,326 ± 2036	1568 ± 198	19.2 ± 5.6	4454 ± 421	2899 ± 127	16.1 ± 4.1
	Se1	2.96 ± 0.25	69.4 ± 252	32,428 ± 2493	1480 ± 151	15.3 ± 3.5	3999 ± 473	2549 ± 266	15.6 ± 4.0
	Se2	2.98 ± 0.04	65.9 ± 22.9	32,426 ± 2611	1541 ± 82	17.4 ± 0.7	4272 ± 95	2383 ± 235	14.7 ± 1.5
End of flowering	C	2.79 ± 0.35	81.1 ± 13.1	21,486 ± 1937	1194 ± 204	23.5 ± 2.2	3145 ± 207	3401 ± 434	11.4 ± 2.1
	Se1	2.48 ± 0.35	57.7 ± 8.4	21,553 ± 1451	1058 ± 121	21.6 ± 2.9	2995 ± 355	1991 ± 750	10.4 ± 2.2
	Se2	2.34 ± 0.13	60.8 ± 16.5	21,204 ± 1908	1071 ± 110	20.9 ± 2.7	2891 ± 136	3230 ± 536	11.0 ± 2.4
Maturity	C	1.21 ± 0.11	57.7 ± 9.8	13,881 ± 1114	534 ± 60	16.6 ± 1.0	794 ± 111	2175 ± 530	3.8 ± 0.6
	Se1	1.36 ± 0.12	54.5 ± 11.3	18,267 ± 1828	343 ± 25	13.5 ± 3.6	775 ± 173	1526 ± 464	4.9 ± 1.0
	Se2	1.29 ± 0.16	53.9 ± 12.5	15,471 ± 2496	457 ± 130	15.8 ± 4.0	691 ± 201	2192 ± 612	4.2 ± 1.8

**Table 4.** The nutrient contents in roots of oilseed rape during the vegetation time according to the individual locations and Se application rates;  $n = 4$ .

Treatment		Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	S	Zn
		mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>
Location A										
Full flowering	C	7192 ± 493	6.05 ± 0.80	1490 ± 419	39,707 ± 5341	1555 ± 267	49.7 ± 10.2	2901 ± 577	2711 ± 360	27.3 ± 5.1
	Se1	7167 ± 827	6.41 ± 1.40	1210 ± 536	39,279 ± 2726	1562 ± 291	43.7 ± 14.9	3047 ± 305	2887 ± 599	27.5 ± 8.7
End of flowering	Se2	7133 ± 626	6.76 ± 0.91	1320 ± 602	41,587 ± 2224	1582 ± 223	49.2 ± 18.5	3190 ± 585	2660 ± 266	30.2 ± 1.8
	C	5156 ± 300	5.91 ± 0.90	1327 ± 568	34,409 ± 1496	1413 ± 114	45.3 ± 17.3	2783 ± 483	2375 ± 488	25.5 ± 2.4
Maturity	Se1	6807 ± 649	5.94 ± 1.03	1328 ± 641	37,786 ± 2862	1342 ± 212	45.3 ± 16.7	2728 ± 358	2490 ± 260	24.2 ± 5.0
	Se2	6657 ± 606	5.01 ± 0.16	1213 ± 248	37,398 ± 5433	1335 ± 187	42.4 ± 8.2	2541 ± 570	2360 ± 688	22.6 ± 4.6
	C	5028 ± 563	6.48 ± 2.15	1842 ± 98	24,786 ± 6188	1295 ± 394	60.3 ± 4.7	1235 ± 309	1499 ± 450	18.0 ± 5.1
	Se1	5144 ± 481	5.76 ± 0.91	1895 ± 323	26,098 ± 2883	1212 ± 251	58.8 ± 15.7	1029 ± 144	1570 ± 374	17.0 ± 4.6
	Se2	5138 ± 457	5.00 ± 0.45	1743 ± 366	28,233 ± 3294	1109 ± 152	54.5 ± 8.4	1158 ± 104	1535 ± 284	14.9 ± 1.1
	C	9135 ± 758	5.42 ± 0.44	1583 ± 441	35,337 ± 1444	1566 ± 124	54.1 ± 10.7	3644 ± 288	2461 ± 240	25.0 ± 4.0
Full flowering	Se1	9352 ± 272	4.36 ± 0.64	837 ± 164	35,933 ± 3550	1551 ± 196	48.3 ± 8.1	3213 ± 400	2479 ± 525	20.1 ± 3.2
	Se2	9446 ± 622	5.02 ± 0.81	1301 ± 165	34,261 ± 2798	1475 ± 139	46.0 ± 7.9	3707 ± 364	2495 ± 224	24.3 ± 3.1
End of flowering	C	6237 ± 801	4.82 ± 1.01	1938 ± 546	29,446 ± 4056	1595 ± 318	68.7 ± 7.0	2743 ± 343	2066 ± 386	17.4 ± 0.9
	Se1	6262 ± 575	3.94 ± 0.59	1341 ± 188	28,913 ± 5215	1301 ± 95	42.0 ± 8.7	2233 ± 428	1546 ± 554	16.5 ± 2.9
Maturity	Se2	6121 ± 400	3.42 ± 0.47	1175 ± 382	27,607 ± 2647	1262 ± 46	46.3 ± 7.8	2382 ± 388	1631 ± 192	13.3 ± 1.7
	C	10,544 ± 430	3.86 ± 0.23	971 ± 97	27,107 ± 3586	1037 ± 189	44.3 ± 7.0	2253 ± 873	1686 ± 509	11.8 ± 3.6
	Se1	10,721 ± 561	3.57 ± 0.33	892 ± 138	25,813 ± 2465	889 ± 82	34.0 ± 6.3	1270 ± 401	1162 ± 156	10.4 ± 2.4
	Se2	11,638 ± 809	3.51 ± 0.43	779 ± 234	24,043 ± 8824	945 ± 99	33.2 ± 5.1	1069 ± 477	1175 ± 247	12.0 ± 3.2



et al. 2003). In a previous study, an increased Zn uptake by oilseed rape plants resulted in depressed Fe and Mn contents in the leaves (Ebbs & Kochian 1997). Also, Wang et al. (2009) found that P, Cu, Fe, Mn, and Mg contents decreased with increasing Zn contents, particularly in the roots. In the seeds, increasing K, Fe, and Zn contents in oilseed rape plants with increasing macronutrient status was observed by Bybordi and Ebrahimian (2013). Olama et al. (2014) reported a decreasing translocation rate of microelements to the aboveground biomass in the order Mn > Zn > Cu > Fe. Our study confirmed a limited translocation of Cu and Fe because these elements were predominantly retained in the roots (Table 4), whereas the highest Zn and Mn contents occurred in the leaves (Table 2).

Similarly, as in the instance of Se, significant changes in nutrient contents in the individual plant components took place during the plant development from flowering to full maturity (Tables 2–4). Rose et al. (2007) compared the P and K uptake by the spring oilseed rape plants, where maximum P accumulation by all investigated oilseed rape cultivars occurred during late flowering (84 d after sowing), whereas maximum accumulation of K occurred 73 d after sowing. The maximum nutrient uptake occurs during flowering to early ripening of oilseed rape plants, according to Malhi et al. (2007). Increasing K and decreasing Fe contents with plant growth was observed by Miller-Cebert et al. (2009). Nelson et al. (2016) reviewed the aspects of phenological adaptation of oilseed rape to changing environment and found that flowering is the critical phenological stage that has been most widely studied. Maximum crop yield is achieved by maximizing the duration of the pre-flowering biomass accumulation phase and, subsequently, the yield potential. Thus, sufficient nutrient supply in the flowering stage is crucial to achieving the maximum oilseed rape yield, and at this stage, maximum nutrient contents occur in the plant stems. In leaves, the Ca, Fe, Mg, Mn, and S increased with plant growth, whereas the Cu, K, and P decreased. These findings are in some aspects contradictory to the mentioned literature sources documenting the importance of particular soil conditions and the nutrient supply.

Significant relationships were reported between Se content and lipid content in the rapeseeds harvested from seleniferous soil, where reduced proportion of unsaturated fatty acids was observed when Se content of the soil was high (Sharma et al. 2011). Thus, the potential imbalance of the nutritional value of the selenized rapeseeds should be taken into account. Although oilseed rapeseeds possess some anti-nutrition properties (Zukalová & Vašák 2002), the addition of defatted rapeseed meal at up to 14% of the total diet did not lead to any harmful effect on the biochemical and hematological response of rats (Tvrdá et al. 2015). Moreover, Myška et al. (2016) showed increased Se levels in the kidneys of rats fed a diet containing selenized rapeseed meal compared to the control animals. The Se addition seemed to improve utilization of essential elements, such as P, S, and Zn, compared to the defatted rapeseed meal-containing diet without Se fortification.

## Conclusions

This study confirmed reasonable response of the oilseed rape plants on the foliar Se biofortification without any detrimental effect of the enhanced Se uptake. Thus, oilseed rape crop could be used to improve the Se status in Se-deficient soils. Selenized rapeseed could also be a suitable dietary component for livestock. However, to achieve the stable and reproducible levels of Se in the oilseed rape production, detailed elucidation of the soil parameters leading to the optimum Se level in plants by further research is needed.

## Acknowledgments

Authors thank for financial support of the Czech Science Foundation (GACR) project No. 13-04580S; correction and improvement of language was provided by Proof-Reading-Service.com Ltd., Devonshire Business Centre, Works Road, Letchworth Garden City SG6 1GJ, United Kingdom.



## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

Authors thank for financial support of the Czech Science Foundation (GACR) project No. 13-04580S.

## References

- Ajwa HA, Banuelos GS, Mayland HF. 1998. Selenium uptake by plants from soils amended with inorganic and organic materials. *J Environ Qual.* 27:1218–1227.
- Arthur MA, Rubin G, Woodbury PB, Schneider RE, Weinstein LH. 1992. Uptake and accumulation of selenium by terrestrial plants growing on a coal fly-ash landfill. 2. Forage and root crops. *Environ Toxicol Chem.* 11:1289–1299.
- Aspila P. 2005. History of selenium supplemented fertilization in Finland. In: Euroala, MJ, ed. Twenty years of selenium fertilization. Helsinki: MTT Agrifood Research Finland; p. 8–13. ISBN: 951-729-965-6.
- Bañuelos GS. 1996. Managing high levels of boron and selenium with trace element accumulator crops. *J Environ Sci Health Part A.* 31:1179–1196.
- Bañuelos GS, Ajwa HA, Mackey B, Wu L, Cook C, Akohoue S, Zambruzuski S. 1997. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *J Environ Qual.* 26:639–646.
- Bañuelos GS, Mayland HF. 2000. Absorption and distribution of selenium in animals consuming canola grown for selenium phytoremediation. *Ecotoxicol Environ Safe.* 46:322–328.
- Broadley MR, Alcock J, Alford J, Cartwright P, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Hart DJ, Hurst R, Knott P, McGrath SP, et al. 2010. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant Soil.* 332:5–18.
- Bybordi A, Ebrahimian E. 2013. Growth, yield and quality components of canola fertilized with urea and zeolite. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 44:2896–2915.
- Cartes P, Gianfreda L, Mora ML. 2005. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil.* 276:359–367.
- Čuvardić MS. 2003. Selenium in soil. *Proc Nat Sci Matica Srpska Novi Sad.* 104:23–37.
- de la Luz Mora M, Pinilla L, Rosas A, Cartes P. 2008. Selenium uptake and its influence on the antioxidative system of white clover as affected by lime and phosphorus fertilization. *Plant Soil.* 303:139–149.
- Djanaguiraman M, Prasad PVV, Seppanen M. 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol Biochem.* 48:999–1007.
- Drahoňovský J, Száková J, Mestek O, Tremlová J, Kaňa A, Najmanová J, Tlustoš P. 2016. Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ Exper Bot.* 125:12–19.
- Dvořák P, Tlustoš P, Száková J, Černý J, Balík J. 2003. Distribution of soil fractions of zinc and its uptake by potatoes, maize, wheat and barley after soil amendment by sludge and inorganic Zn salt. *Plant Soil Environ.* 49:203–212.
- Ebbs SD, Kochian LV. 1997. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J Environ Qual.* 26:776–781.
- Ebrahimi N, Hartikainen H, Simojoki A, Hajiboland R, Seppänen M. 2015. Dynamics of dry matter and selenium accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in response to organic and inorganic selenium treatments. *Agric Food Sci.* 24:104–117.
- Eich-Greatorex S, Sogn TA, Øgaard AF, Aasen I. 2007. Plant availability of inorganic and organic selenium fertiliser as influenced by soil organic matter content and pH. *Nutr Cycl Agroecosyst.* 79:221–231.
- Ellis DR, Salt DE. 2003. Plants, selenium and human health. *Curr Op Plant Biol.* 6:273–279.
- Feng R, Wei C, Tu S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ Exper Bot.* 87:58–68.
- Filek M, Zembala M, Kornaś A, Walas S, Mrowiec H, Hartikainen H. 2010. The uptake and translocation of macro- and microelements in rape and wheat seedlings as affected by selenium supply level. *Plant Soil.* 336:303–312.
- Gao YM, Ma BL. 2015. Nitrogen, phosphorus, and zinc supply on seed and metal accumulation in canola grain. *J Plant Nutr.* 38:473–483.
- Guerrero B, Llugany M, Palacios O, Valiente M. 2014. Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol Biochem.* 83:300–307.
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil.* 225:193–200.
- Hawkesford MJ, Zhao FJ. 2007. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J Cereal Sci.* 46:282–292.

- Jahangir M, Abdel-Farid IB, Simoh S, Kim HK, Verpoorte R, Choi YH. 2012. Investigation of brassica biochemical status by NMR-based metabolomics. *Acta Hort.* 936:163–172.
- Johnsson L. 1991. Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic-matter content and pH. *Plant Soil.* 133:57–64.
- Kaur N, Sharma S, Kaur S, Nayyar H. 2014. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Arch Agron Soil Sci.* 60:1593–1624.
- Kelly DG, White SD, Weir RD. 2013. Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. *Food Chem Toxicol.* 55:568–577.
- Kikkert J, Hale B, Berkelaar E. 2013. Selenium accumulation in durum wheat and spring canola as a function of amending soils with selenite, selenate and or sulphate. *Plant Soil.* 372:629–641.
- Klognerová K, Vosmanská M, Száková J, Mestek O. 2015. Effect of growing conditions on selenium speciation in oilseed rape (*Brassica napus*) tissue. *Chem Listy.* 109:216–222.
- Lyons GH, Genc Y, Soole K, Stangoulis JCR, Liu F, Graham RD. 2009. Selenium increases seed production in *Brassica*. *Plant Soil.* 318:73–80.
- Malhi SS, Johnston AM, Schoenau JJ, Wang ZH, Vera CL. 2007. Seasonal biomass accumulation and nutrient uptake of canola, mustard, and flax on a black chernozem soil in Saskatchewan. *J Plant Nutr.* 30:4–6.
- Mikkelsen RL, Haghnia GH, Page AL. 1987. Effects of pH and selenium oxidation state on the selenium accumulation and yield of alfalfa. *J Plant Nutr.* 10:937–950.
- Miller-Cebert RL, Sistani NA, Cebert E. 2009. Comparative mineral composition among canola cultivars and other cruciferous leafy greens. *J Food Comp Anal.* 22:112–116.
- Molnářová M, Fargašová A. 2009. Se(IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.). *J Haz Mat.* 172:854–861.
- Moreno Rodriguez MJ, Cala Rivero V, Jiménez Ballesta R. 2005. Selenium distribution in topsoils and plants of a semi-arid Mediterranean environment. *Environ Geochem Health.* 27:513–519.
- Myška A, Száková J, Fučíková A, Mlejnek P, Zídek V, Tremlová J, Mestek O, Koplík R, Zídková J, Melčová M, Tlustoš P. 2016. The effect of selenium-enriched defatted rape seeds on tissue cadmium and essential elements utilization in rats. *Czech J Anim Sci.* 61:496–505.
- Nawaz F, Ahmad R, Ashraf MY, Waraich EA, Khan SZ. 2015. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicol Environ Safe.* 113:191–200.
- Nelson MN, Lilley JM, Helliwell C, Taylor CM, Siddique KHM, Chen S, Raman H, Batley J, Cowling WA. 2016. Can genomics assist the phenological adaptation of canola to new and changing environments? *Crop Pasture Sci.* 67:284–297.
- Olama V, Ronaghi A, Karimian N, Yasrebi J, Hamidi R, Tavajjoh M, Kazemi MR. 2014. Seed quality and micronutrient contents and translocations in oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by nitrogen and zinc fertilizers. *Arch Agron Soil Sci.* 60:423–435.
- Pezzarossa B, Petruzzelli G, Petacco F, Malorgio F, Ferri T. 2007. Absorption of selenium by *Lactuca sativa* as affected by carboxymethylcellulose. *Chemosphere.* 67:322–329.
- Renkema H, Koopmans A, Kersbergen L, Kikkert J, Hale B, Berkelaar E. 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant soil.* 354:239–250.
- Rose TJ, Rengel Z, Ma Q, Bowden JW. 2007. Differential accumulation patterns of phosphorus and potassium by canola cultivars compared to wheat. *J Plant Nutr Soil Sci.* 170:404–411.
- Rusová M, Száková J, Tremlová J, Kulhánek M, Tlustoš P. 2013. The selenium uptake by oilseed rape (*Brassica napus* L.) plants. Proc. 19th conference Reasonable use of fertilizers, Czech University of Life Sciences, Prague, November 2013, pp. 141–144 (in Czech).
- Seppänen MM, Kontturi J, Lopez Heras I, Madrid Y, Cámara C, Hartikainen H. 2010. Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium-enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal. *Plant Soil.* 337:273–283.
- Sharma S, Bansal A, Dhillon SK, Dhillon KS. 2010. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil.* 329:339–348.
- Sharma S, Bansal A, Dogra R, Dhillon SK, Dhillon KS. 2011. Effect of organic amendments on uptake of selenium and biochemical grain composition of wheat and rape grown on seleniferous soils in northwestern India. *J Plant Nutr Soil Sci.* 174:269–275.
- Šindelářová K, Száková J, Tremlová J, Mestek O, Praus L, Kaňa A, Najmanová J, Tlustoš P. 2015. The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Add Contam Part A.* 32:2027–2038.
- Száková J, Tremlová J, Pegová K, Najmanová J, Tlustoš P. 2015. Soil-to-plant transfer of native selenium for wild vegetation cover at selected locations of the Czech Republic. *Environ Monit Assess.* 187:358–366.
- Szczepaniak W, Grzebisz W, Potarzycki J, Łukowiak R, Przygocka-Cyna K. 2015. Nutritional status of winter oilseed rape in cardinal stages of growth as the yield indicator. *Plant Soil Environ.* 61:291–296.

- Tvrďá J, Tůmová N, Fučíková A, Zídková J, Melčová M, Száková J, Mlejnek P, Zídek V, Mestek O, Kaňa A, Tlustoš P. 2015. The biochemical and hematological response of rats on defatted rape seeds addition into the diet. *Academia J Agric Res.* 3:395–401.
- Vašák F, Černý J, Buráňová Š, Kulhánek M, Balík J. 2015. Soil pH changes in long-term field experiments with different fertilizing systems. *Soil Water Res.* 10:19–23.
- Wang C, Zhang SH, Wang PF, Hou J, Zhang WJ, Li W, Lin ZP. 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in oilseed rape seedlings. *Chemosphere.* 75:1468–1476.
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, et al. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exper Bot.* 55:1927–1937.
- Wittkop B, Snowdon RJ, Friedt W. 2009. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. *Euphytica.* 170:131–140.
- Zembala M, Filek M, Walas S, Mrowiec H, Kornaś A, Miszalski Z, Hartikainen H. 2010. Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Soil.* 329:457–468.
- Zukalová H, Vašák J. 2002. The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species - a review. *Rostl Výr.* 48:175–180.



## 5 SOUHRNNÁ DISKUZE

Diskuze významných okolností řešení disertační práce, komentáře k výsledkům, plnění cílů a k rozhodování o hypotézách jsou věcně strukturovány do čtyřech následujících podkapitol. Na mnohých místech jsou zmíněny souvislosti, jejichž porozumění bylo umožněno teprve kombinací poznatků z předložených publikací. Kapitoly 5.1. až 5.3. jsou věnovány třem dílčím úrovním aniontové kompetice (publikace I–III), které zákonitě působí v každém systému půda-rostlina při agronomické biofortifikaci metodou přidavku  $\text{SeO}_4^{2-}$  do půdy. V kapitole 5.4. jsou shrnuty výsledky z foliární aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  v polních podmínkách (publikace IV). Významným hlediskem řešení práce bylo porovnávání výsledků získaných pro jednotlivé půdy. Přehled využití půd v dílčích experimentech uvádí Tabulka 2.

**Tabulka 2.** Přehled využití půd v jednotlivých experimentech

experiment	půda			
	kambizem I	kambizem II	černozem	luvizem
	stanoviště			
	Humpolec	Lukavec	Praha-Suchdol	Červený Újezd
interferenční studie (ICPMS)			•	
abiotická adsorpce (vsádkový)	•	•	•	
krátkodobý inkubační	•		•	
dlouhodobý inkubační	•		•	
nádobový vegetační (řepka)	•		•	
polní vegetační (řepka)	•			•

### 5.1 RYCHLÁ ABIOTICKÁ SORPCE SELENANU V PŮDÁCH

Selenanový anion je v půdách velmi mobilní, resp. náchylný k vertikálnímu vyluhování v promyvném režimu, což představuje riziko snížení účinnosti biofortifikace při aplikaci Se do půdy. Významným faktorem udržujícím živiny v rostlinám dostupné půdní zásobě je sorpce iontů na tzv. půdní sorpční komplex. Aniontově výměnná kapacita půd našeho klimatického regionu je však nízká. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda rychlá abiotická sorpce stopového množství  $\text{SeO}_4^{2-}$  může přispět k vyšší účinnosti biofortifikace.

#### 5.1.1 Nespektrální interference při stanovení Se v půdních výluzích technikou ICPMS

Kvantifikace velmi slabé sorpce  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdách ( $K_d$  zpravidla  $< 5$ ) pomocí krátkodobých ( $\leq 48$  h) vsádkových sorpčních experimentů klade vysoké nároky na přesnost a správnost



stanovení koncentrace Se v půdních výluzech. Např. hodnota  $K_d(\text{Se})$  či parametry sorpčních izoterm kriticky závisí na rozdílu hodnot  $C_{\text{eq}} - C_0$ , přičemž  $C_{\text{eq}}$  se stanovuje v půdním výluhu, kdežto  $C_0$  (výchozí koncentrace Se) ve vodném roztoku před kontaktem s půdou. Pokud vliv matrice zatíží stanovení  $C_{\text{eq}}$  i jen relativně malou chybou, vypočtené hodnoty  $K_d$  budou výrazně zkresleny. Tato úvaha nás přivedla k nezbytnosti vyšetření vlivu chemických charakteristik půd a činidel, která se přidávají do půdní suspenze v rámci vsádkového sorpčního experimentu, na výskyt NI při stanovení Se technikou ICPMS.

Modelovou maticí byl zvolen zfiltrovaný ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ) půdní výluh připravený extrakcí 1,00 g půdy s 14,0 ml ultračisté  $\text{H}_2\text{O}$ . Indikátorem výskytu NI byla zvolena nestabilita hodnot podílu absolutních intenzit ( $I_{\text{abs}}$ ) signálů  $^{72}\text{Ge}$  a  $^{78}\text{Se}$  (z přidavku  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  Ge a  $25 \mu\text{g l}^{-1}$  Se). Ředění výluhů  $5\times$  pro následnou interferenční studii a sorpční experiment bylo zvoleno kompromisem mezi projevem vlivu matrice při ředění  $2,5\times$  a snížením procedurálního DL při ředění  $10\times$ . Zadání interferenční studie bylo: (i) stanovení koncentrace vybraných potenciálních interferentů ve zfiltrovaných výluzech 1:14 ( $m/v$ ) v  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  z jednotlivých půd (tj. v matrici vzorků následného sorpčního experimentu) a vyhodnotit vliv těchto a zvýšených koncentrací maticních prvků na výskyt NI při kvantifikaci Se technikou ICPMS; (ii) ověření vlivu  $\text{NaNO}_3$  a chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ), které se přidávají do půdní suspenze pro regulaci iontové síly a inhibici mikrobiální aktivity.

Z výsledků vyplynulo, že činidla přidávaná do půdní suspenze v rámci sorpčních pokusů jsou hlavní příčinou vzniku NI. Jmenovitě  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  snížil  $I_{\text{abs}}^{78}\text{Se}$  o 12 %, zatímco 0,2 % ( $v/v$ )  $\text{CHCl}_3$  zvýšil signál  $^{78}\text{Se}$  o 54 %. Na základě monitorování poměru  $I_{\text{abs}}^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  byl navržen také hlavní interferenční mechanismus. Po přidavku  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Na se poměr signálů  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se}$  vychýlil k hodnotám  $> 1$ , což není v souladu se „space charge“ efektem, neboť podle Fraser a Beauchemin (2000) by měl tento mechanismus výrazněji snížit účinnost transmise lehčího  $^{72}\text{Ge}^+$ . Podezřívát lze tedy mechanismus posunu ionizačních rovnováh, tzn. vyšší elektronová hustota v plazmatu způsobená vyšší koncentrací  $\text{Na}^+$  ovlivní rovnováhu  $\text{Se} \leftrightarrow \text{e}^- + \text{Se}^+$  více než ionizaci Ge, což je v souladu s vlastností  $1.\text{IP}_{\text{Se}} > 1.\text{IP}_{\text{Ge}}$ . Naše zjištění není v rozporu s pozorováním Colon et al. (2011), kteří zaznamenali vyšší míru suprese signálu  $^{75}\text{As}$  ( $1.\text{IP}_{\text{As}} \sim 1.\text{IP}_{\text{Se}}$ ) v porovnání s  $^{72}\text{Ge}$  s rostoucí koncentrací Na v syntetické vodné matrici. Teorii o nestejném ovlivnění ionizace Se a Ge podpořilo také monitorování axiálního profilu signálu  $^{78}\text{Se}$  a  $^{72}\text{Ge}$  (data neprezentována). Relativní suprese signálu  $^{78}\text{Se}$  vyvolaná přítomností  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Na v půdním výluhu byla zesílena vlivem zmenšování „hloubky vzorkování“ (*sampling depth*) zřetelně více v porovnání se supresí signálu  $^{72}\text{Ge}$ . Významně vyšší  $I_{\text{abs}}^{78}\text{Se}$  spolu s hodnotami  $^{72}\text{Ge}/^{78}\text{Se} < 1$  po přidavku  $\text{CHCl}_3$

korespondují s mechanismem přenosu náboje z  $C^+$ , přičemž lze předpokládat, že Ge tímto typem NI netrpí (Grindlay et al., 2013).

Diskuze mechanismů NI a kvantitativní porovnání jejich projevů s literárními údaji je velmi obtížné, v interferenčních studiích byly zpravidla testovány podstatně vyšší koncentrace matričních interferentů (Hu et al., 2004; Colon et al., 2011; Mariet et al., 2011; García-Poyo et al., 2015) než v této studii. Navíc, závažnost projevu NI závisí na provozních podmínkách ICPMS systému (Tan a Horlick 1987) a výsledný vliv komplexní matrice je dán kombinací interferenčních mechanismů (Kim et al., 1990). Při kombinovaných přídavicích  $NaNO_3 + CHCl_3$  byl v naší studii pozorován aditivní účinek protichůdných interferenčních mechanismů na  $I_{abs}^{78Se}$ , kdežto poměr  $^{72}Ge/^{78}Se$  byl více řízen přenosem náboje z  $C^+$ . Ani ředění interferentů  $5\times$  (tj.  $2\text{ mmol l}^{-1} Na$  a  $0,04\% CHCl_3$ ) zcela neodstranilo vychýlení  $^{72}Ge/^{78}Se$ , proto nebylo možné spoléhat se při stanovení sorpce  $SeO_4^{2-}$  v půdě na běžnou korekci signálu Se pomocí Ge ve funkci interního standardu. Z tohoto důvodu byl do celého schématu vsádkové sorpčního experimentu integrován robustní přístup „sjednocení matric“, při kterém každý vzorek k měření (včetně kalibračních roztoků a QC vzorků k ověření správnosti měření) měl stejnou matici, a to  $5\times$  zředěný výluh  $10\text{ mmol l}^{-1} NaNO_3 + 0,2\% CHCl_3$  z příslušné půdy.

### 5.1.2 Vsádkové sorpční experimenty a aniontová kompetice

Za podmínek experimentu, tj. krátká expozice (24 h) a aplikace  $CHCl_3$ , lze imobilizaci  $SeO_4^{2-}$  v posuzovaném systému považovat za výsledek abiotické adsorpce na půdní částice. Z průběhu funkcí  $Q_{eq} = f(C_{eq})$ , tj. sorpčních izoterm, bylo zřejmé, že při výchozích koncentracích  $SeO_4^{2-}$  ( $20\text{--}1250\text{ }\mu\text{g l}^{-1} Se$ ) nedošlo k nasycení sorpční kapacity experimentálních půd. Rozdílná míra imobilizace  $SeO_4^{2-}$  při nízkých  $C_0$  ( $\leq 250\text{ }\mu\text{g l}^{-1} Se$ ) v jednotlivých půdách vedla ke konstrukci izoterm konvexního i konkávního typu, což znemožnilo využití jednotného empirického modelu ke kvantitativnímu popisu sorpčních dat. Zvláště překvapivě se jeví rozdíly v adsorpci Se zjištěné při nízkých  $C_0$  v kambizemi I a II, pro které byly stanoveny podobné fyzikálně-chemické vlastnosti determinující adsorpci aniontů v půdě ( $pH$ ,  $Fe_{oxal}$ ,  $Al_{oxal}$ , míra nasycení fosforem). Podle Hinz (2001) může esovitý tvar křivek popisujících sorpci v kambizemi II a v černozemi indikovat silnou kompetici v těchto půdách. Esovité izotermy zaznamenali při studiu adsorpce  $SeO_4^{2-}$  také Pezzarossa et al. (1999) a de Abreu et al. (2011), příčinám však nevěnovali pozornost. V komplexních sorpčních systémech, kde kompetice významně ovlivňuje sorpční rovnováhy, doporučují Shaheen et al. (2013) využívat k popisu sorpce raději modely založené na konceptu  $K_d$ . Při vyšších  $C_0$  ( $\geq 500\text{ }\mu\text{g l}^{-1} Se$ ) se rozdílné kapacity jednotlivých půd adsorbovat  $SeO_4^{2-}$  již neprojevily, přestože imobilizovaná množství Se ve všech půdách s rostoucí  $C_0$  dále stoupala. Analogického vlivu  $C_0$  si povšimli také Loffredo et al.

(2011), v jejichž experimentu se množství adsorbovaného  $\text{SeO}_4^{2-}$  v kontrastních půdách vzájemně vyrovnala již při  $80 \mu\text{g l}^{-1}$  Se. Dle Sastre et al. (2006) je příčinou rozdílů v adsorpci sorbátu při nízkých  $C_0$  saturace omezeného počtu sorpčních míst s vysokou afinitou vůči sorbátu. V systémech bez výrazné kompetice se zpravidla dosahuje nejvyšších hodnot  $K_d$  při nízkých  $C_0$  sorbátu (Shaheen et al., 2013). Toto tvrzení napovídá, že při adsorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  v našich půdách se uplatnila kompetice významně, neboť při  $C_0 = 20 \mu\text{g l}^{-1}$  Se nebyla imobilizace zaznamenána vůbec, nejvyšší hodnota  $K_d$  v kambizemi I a II byla zjištěna při  $50 \mu\text{g l}^{-1}$  Se a v černozemi až při  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  Se.

Samotné koncentrace  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$  a  $\text{NO}_3^-$  stanovené ve výluzích experimentálních půd k objasnění rozdílného chování  $\text{SeO}_4^{2-}$  vlivem aniontové kompetice však nepřispěly. Na projevy kompetice a na rozdílnou kvalitu sorpce v půdách poukázaly výsledky pokusů při změněných koncentracích kompetičních aniontů při konstantním  $C_0 = 500 \mu\text{g l}^{-1}$  Se. Při absenci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  v půdní suspenzi se adsorpce  $\text{SeO}_4^{2-}$  v kambizemi I zvýšila pětikrát, zatímco u ostatních půd vliv absence nebyl prokázán. Dle zastoupení aniontů ve výluzích se lze domnívat, že v nativní kambizemi I byl nezanedbatelný podíl aniontové kapacity sorpčního komplexu obsazen  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{Cl}^-$ . V experimentu s přidavkem  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  byl sorpční komplex kambizemě I saturován hlavně  $\text{NO}_3^-$  (méně  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{Cl}^-$ ), tj. anionty, se kterými je  $\text{SeO}_4^{2-}$  schopen účinně soutěžit o sorpční místo, proto se při nízké  $C_0$  nejvíce  $\text{SeO}_4^{2-}$  adsorbovalo v této půdě. Za podmínek bez  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  nebyl sorpční komplex této půdy saturován a po přidavku  $\text{SeO}_4^{2-}$  měla kambizem I vyšší kapacitu adsorbovat tento anion. Naproti tomu v nativní kambizemi II byl pravděpodobně podstatný podíl aniontové kapacity obsazen pevně poutanými speciemi, např. aniontovou formou  $C_{\text{org}}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$ , o čemž svědčí nejvyšší obsahy  $C_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $P_{\text{tot}}$  a  $P_{\text{oxal}}$  ze všech půd. Anion  $\text{NO}_3^-$  nebyl schopen tyto specie efektivně vytěsnit ani při  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ , málo efektivní byl také  $\text{SeO}_4^{2-}$  při nízkých  $C_0$ . V souladu s popsanou situací se absence  $10 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  zvýšením adsorpce  $\text{SeO}_4^{2-}$  v kambizemi II neprojevila. Při adsorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  v černozemi se rovněž uplatnila aniontová kompetice, kterou navíc zesiluje nižší počet kladně nabitých sorpčních míst, který lze očekávat v půdě o výrazně vyšším  $pH$  a nižších obsazích  $\text{Fe}_{\text{oxal}}$  a  $\text{Al}_{\text{oxal}}$ .

Při vynucené kompetici s  $0,52 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{SO}_4^{2-}$  byl pozorován pokles adsorpce selenanu v půdě v pořadí černozem > kambizem I > kambizem II, což je v souladu s poznatky uvedenými výše. V kambizemi II byla zřejmě část  $\text{SeO}_4^{2-}$  poutána k sorpčním místům o vysoké afinitě, o čemž svědčí omezená reverzibilita adsorpce. Sorpční experimenty potvrdily známou skutečnost, že  $\text{SO}_4^{2-}$  snižuje míru imobilizace  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdě (Stroud et al., 2010b; Kikkert et al., 2013) a dále upřesnily, že  $\text{SO}_4^{2-}$  kompetičně blokuje rychlou abiotickou adsorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  během první fáze stabilizace exogenního Se v půdě. Při vynucené kompetici s  $0,21 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{PO}_4^{3-}$  nebyla adsorpce  $\text{SeO}_4^{2-}$

v experimentálním systému měřitelná. Pro koncentrace Se v suspenzích kambizemí byl zjištěn vztah  $C_0 < C_{eq}$ , který vypovídá o desorpci či rozpouštění nativního Se. Podobně Goh a Lim (2004) zkoumali vliv  $SO_4^{2-}$  a  $PO_4^{3-}$  ( $< 2 \text{ mmol l}^{-1}$  oba anionty) na adsorpční rovnováhy  $SeO_4^{2-}$ , přičemž fosforečnan snížil imobilizaci Se účinněji. K objasnění „záporné“ adsorpční bilance lze využít poznatků Zhang et al. (2017), v jejichž studii byl nativní Se vytěsněn z různých frakcí ( $Se_{nesp.ads}$ ,  $Se_{spec.ads}$ ,  $Se_{org}$ ) působením  $PO_4^{3-}$ . Souhlasit lze také se závěry Eich-Greatorex et al. (2010), kteří dostupnost exogenního  $SeO_4^{2-}$  vztahovali k míře nasycení sorpčního komplexu fosforem a k dostupnosti P v půdě. Míra adsorpce  $SeO_4^{2-}$  v experimentálních půdách je v souladu s rozmezím hodnot  $K_d$  ( $0,1-2 \text{ L kg}^{-1}$ ) zjištěným jinými autory (Eich-Greatorex et al., 2010; de Abreu et al., 2011; Gabos et al., 2014; Lessa et al., 2016).

Ačkoliv při vyšších  $C_0$ , které mohou simulovat stav v půdním roztoku bezprostředně po aplikaci  $SeO_4^{2-}$ , jsme stanovili imobilizaci Se odpovídající  $100-300 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  Se, tato schopnost půd velmi citlivě reaguje na přítomnost kompetičních aniontů. Lze uzavřít, že mechanismus rychlé abiotické adsorpce  $SeO_4^{2-}$  by mohl přispět ke snížení vyluhování Se z orniční vrstvy pouze za předpokladu, že půdní částice: (i) nejsou saturovány  $PO_4^{3-}$  či  $C_{org}$ ; (ii) nejsou v kontaktu s půdním roztokem o vysoké koncentraci aniontů, zvláště  $PO_4^{3-}$  a  $SO_4^{2-}$ . Splnění těchto předpokladů v reálných polních podmínkách je nejisté a navíc obtížně slučitelné s aplikací minerálních i organických hnojiv.

## 5.2 STABILIZACE EXOGENNÍHO SELENU V PŮDĚ

### 5.2.1 Krátkodobý inkubační experiment

V tomto experimentu byly inkubovány dvě z předchozích půd (kambizem I a černozem) s  $SeO_4^{2-}$  v množství  $400 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  Se po dobu dvou měsíců. Zvolená dávka  $SeO_4^{2-}$  přibližně koresponduje s maximální sorpční kapacitou půd zjištěnou v předešlém vsádkovém pokusu. Tento typ experimentu se vyznačuje reálným poměrem pevné půdní fáze ku roztoku a svým trváním by měl postihnout abiotický i mikrobiální příspěvek k imobilizaci  $SeO_4^{2-}$ . Navržené varianty pokusu měly objasnit vliv kompetičních aniontů ( $SO_4^{2-}$  a  $PO_4^{3-}$ ) na relativní význam těchto dvou příspěvků. Půdy ozářené  $\gamma$  paprsky ( $27 \text{ kGy}$ ) či s přidávkou snadno dostupného zdroje  $C_{org}$  a  $NH_4^+$  byly koncipovány jako varianty inhibující, resp. stimulující půdní mikrobiální aktivitu. Ke sledování změn množství Se v potenciálně rostlinám dostupné půdní zásobě ( $Se_{pot.fyto}$ ) byla využita extrakce půd s  $50 \text{ mmol l}^{-1} HPO_4^{2-}$  (Keskinen et al., 2010).

Po 1,5 dnech ( $d_{1,5}$ ) inkubace se exogenní Se v obou půdách nacházel téměř výhradně v podílu  $Se_{pot.fyto}$ , a to stále ve formě  $SeO_4^{2-}$ , jak potvrdila speciální analýza HPLC-ICPMS. S časem se podíl  $Se_{pot.fyto}$  snižoval, což je v souladu s projevy stabilizace Se v půdě (Wang et al., 2017). Následující diskuze příčin poklesu  $Se_{pot.fyto}$  je založena na



porovnávání chování exogenního Se v kontrolních variantách a variantách s různými aditivami. Fluktuační hodnoty  $pH$  v konkrétní variantě v průběhu inkubace ( $\leq 0,3$  jednotky  $pH$ ) ani rozdíly v  $pH$  mezi variantami v daném čase ( $\leq 0,5$  jednotky  $pH$ ) nebyly považovány za významné proměnné. Zjištění, že relativní poklesy  $Se_{pot.fyto}$  mezi  $d_0$  a  $d_{72}$  dosáhly velmi podobných hodnot v obou půdách pro varianty kontrolní (30 a 31 %), s přidavkem  $PO_4^{3-}$  (31 a 32 %; data nejsou součástí publikace II, výsledky jsou uvedeny v Příloze 2) a s přidavkem  $SO_4^{2-}$  (20 a 21 %), je překvapivé. V čase  $d_{72}$  se na půdní zásobě  $Se_{pot.fyto}$  v kontrolních variantách podílel hlavně  $SeO_4^{2-}$ , a to ve stejném absolutním množství v obou půdách. Stabilitu exogenního  $SeO_4^{2-}$  v pohotově dostupné půdní zásobě popsali také Keskinen et al. (2010) při selenizaci rostlin v desetidenním vegetačním nádobovém pokusu.

Z vlivu  $PO_4^{3-}$  ve funkci půdního aditiva a následně extrakčního činidla lze hypotetizovat, že abiotická specifická adsorpce Se byla pro snížení  $Se_{pot.fyto}$  v obou půdách marginálního významu. Vyšší obsahy  $Se_{pot.fyto}$  zaznamenané po aplikaci  $SO_4^{2-}$  tedy zřejmě souvisely s kompeticí při účasti mikroorganismů. Důkazy o vlivu činnosti půdních mikroorganismů poskytly varianty s glukózou a zářením gama. Pozitivní stimulace vedla ke kontrastním poklesům  $Se_{pot.fyto}$  v obou půdách (38 a 77 %). Indukovatelný potenciál půd ke ztrátě  $Se_{pot.fyto}$  může mít několik příčin, všechny jsou spjaty s činností mikroorganismů: (a) bioredukce (asimilační i disimilační); (b) biomethylace; (c) stimulace mikrobiální aktivity vedla k navození anoxických podmínek a následně k abiotické redukci  $SeO_4^{2-} \rightarrow SeO_3^{2-}$ . Dramatický pokles rozpuštěného  $Se_{anorg}$  zjištěný především ve výluhu černozemě a zvýšení koncentrace  $SeO_3^{2-}$  na úkor  $SeO_4^{2-}$  nejsou v rozporu s mechanismy (a–c). Rozdíly v  $Se_{pot.fyto}$  mezi ozářenými a neozařenými kontrolními variantami v jednotlivých časových bodech svědčí o účasti mikroorganismů. Analogicky Garcia-Sanchez et al. (2014) popsali příspěvek půdních mikroorganismů k imobilizaci  $SeO_4^{2-}$  v nesterilních podmínkách v porovnání s půdou ošetřenou v autoklávu. Fellowes et al. (2013) indikovali mikrobiální redukci exogenního  $SeO_4^{2-}$  rovněž i za oxických podmínek, přičemž  $SeO_3^{2-}$  zastával roli meziprojektu. Vyšší mikrobiální aktivitou lze interpretovat původ překvapivě vyšších koncentrací  $SeO_3^{2-}$  v černozemi, třebaže intenzivnější redukce  $Se^{VI} \rightarrow Se^{IV}$  byla očekávána v kyselé kambizemi. Relativní hodnoty poklesu  $Se_{pot.fyto}$  v ozářené černozemi (17 %) a kambizemi I (24 %) se blížily hodnotám z přidavku  $SO_4^{2-}$ . Přídavek  $SO_4^{2-}$  k ozářeným půdám účinek  $\gamma$  paprsků dále nezvýšil. Pokles mikrobiální aktivity i kompetice síran-selenan v rámci buněčného transportu (Aguilar-Barajas et al., 2011) mají stejný důsledek, inhibují bioredukci a biomethylaci exogenního Se. Navíc se potvrdilo, že ztráta  $Se_{pot.fyto}$  v černozemi více závisí na půdních mikroorganismech v porovnání s kambizemí I. Nutno podotknout, že pokles  $Se_{pot.fyto}$  zjištěný v ozářených půdách nelze *a priori* přičítat pouze abiotickým procesům. Při absorpci dávky záření

v našem pokusu lze uvažovat snížení počtu životaschopných mikroorganismů o několik řádů, nikoliv však na nulu (Blankinship et al., 2014).

## 5.2.2 Dlouhodobý inkubační experiment

Jedním z přístupů ke studiu stabilizace exogenního Se v půdě jsou MPE, jejichž extrakční protokol byl modifikován s ohledem na biogeochemická specifika Se. V tomto experimentu byly inkubovány kambizem I a černozem po dobu 62 týdnů. Na základě MPE dle Wright et al. (2003) byl půdní Se rozdělen do pěti operativně definovaných podílů:  $Se_{rozp}$ ,  $Se_{spec.ads}$ ,  $Se_{org}$ ,  $Se^0$  a  $Se_{rezidual}$ . Sledován byl dlouhodobý vliv přídatku  $SO_4^{2-}$  a  $PO_4^{3-}$  a vliv podmínek podporujících či naopak inhibujících půdní mikrobiální aktivitu na výslednou frakcionaci Se v půdě. Při hodnocení se vycházelo z předpokladu, že v čase inkubace  $d_0$  bylo 100 % přidaného  $SeO_4^{2-}$  ve frakci  $Se_{rozp}$ . Pro srovnání byly sekvenčně extrahovány také půdy neinkubované bez přídatku  $SeO_4^{2-}$ .

Varianty pokusu, které byly ozářeny  $\gamma$  paprsky, vykazovaly nejnižší míru redistribuce Se z frakce  $Se_{rozp}$  do méně mobilních a biodostupných frakcí, čímž byl předložen další důkaz o účasti půdních mikroorganismů na stabilizaci Se v obou půdách. Dramatický pokles  $Se_{rozp}$  až na úroveň nefortifikovaných půd byl zaznamenán v černozemi ve variantě stimulované mikrobiální aktivity, což svědčí o značné predispozici této půdy k mikrobiální imobilizaci Se. V kontrolních fortifikovaných variantách byl však Se více imobilizován v kambizemi než v černozemi. V kambizemi se pravděpodobně projevil také abiotický příspěvek k imobilizaci Se. V souladu s kompetičním účinkem na úrovni mikroorganismů (např. soutěž mezi  $SeO_4^{2-}$  a  $SO_4^{2-}$  o buněčný transportní systém) byly po aplikaci síranu zaznamenány vyšší hodnoty  $Se_{rozp}$ , tedy vyšší mobilita Se. V kambizemi lze očekávat tendenci k abiotické redukci  $SeO_4^{2-} \rightarrow SeO_3^{2-}$  a obecně k vyšší míře adsorpce Se (nižší  $pH$ , vyšší obsahy  $Fe_{oxal}$  a  $Al_{oxal}$ ), přičemž  $SO_4^{2-}$  není schopen účinně inhibovat pevnou adsorpci  $SeO_3^{2-}$  (Goh a Lim, 2004), i proto mohl být vliv síranu na  $Se_{rozp}$  v této půdě méně významný.

Frakce  $Se_{spec.ads}$  byla v obou půdách minoritní, přesto bylo možné redistribuci exogenního Se z  $Se_{rozp} \rightarrow Se_{spec.ads}$  spolehlivě detekovat. V černozemi tato redistribuce zjevně souvisela s půdními mikroorganismy, neboť ozáření i přídatek  $SO_4^{2-}$  ji účinně blokovaly. Účast mikroorganismů na adsorpci oxoaniontů Se je zatím velmi málo prozkoumána. V tomto směru lze hypotetizovat imobilizaci Se na povrchu buněk bakterií (Kenward et al., 2006) nebo v extracelulárním polysacharidovém bakteriálním sekretu (Gupta a Diwan, 2017). Předpokládá se, že během interakce dochází k redukci  $Se^{VI} \rightarrow Se^{IV} \rightarrow Se^0$  a že kyselá  $pH$  prostředí interakci usnadňuje. Experimentální černozem má však  $pH \sim 8$ . V kambizemi souvislost mezi  $Se_{spec.ads}$  a mikroorganismy nebyla zjištěna, což

podporuje domněnku, že v této půdě se na imobilizaci Se podílel významně i abiotický mechanismus.

Redistribuce  $Se_{rozp} \rightarrow Se_{org}$  je důležitým ukazatelem mikrobiální biotransformace  $Se_{anorg} \rightarrow Se_{org}$ . Vysoké hodnoty  $Se_{org}$  stanovené v černozemi indikují rozsáhlou inkorporaci exogenního Se do POH, přičemž přidavek  $SO_4^{2-}$  či ozáření vedly k poklesu  $Se_{org}$ , tedy k inhibici biotransformace Se. V kambizemi byla frakce  $Se_{org}$  výrazně méně zastoupena a nereagovala na inhibitory biotransformace.

Dle množství Se zachyceného ve frakci  $Se^0$  lze usuzovat, že redukce  $SeO_4^{2-}$  až na  $Se^0$  byla v obou půdách marginálním procesem, nebo alternativně mohl být  $Se^0$  pouze meziproductem při tvorbě  $Se_{rezidual}$ . Výťažnost extrakce  $Se^0$  zřetelně sledovala trend mikrobiální aktivity v jednotlivých variantách v pořadí stimulace > kontrola > inhibice.

Hodnoty  $Se_{rezidual}$  upozornily na rozdílný biogeochemický osud Se v obou půdách. Zatímco v černozemi  $Se_{rezidual}$  nabýval stejných hodnot pro fortifikované i nefortifikované varianty, v kambizemi byl  $Se_{rezidual}$  významnou cílovou frakcí pro redistribuci Se. Rozsah redistribuce byl signifikantně nižší v ozářených variantách a po aplikaci  $SO_4^{2-}$ , z čehož lze odvodit souvislost mezi  $Se_{rezidual}$  a mikrobiální činností v kambizemi.

Vliv přídavku  $PO_4^{3-}$  na frakcionaci Se v půdách nebyl zahrnut do publikace II, kompletní výsledky inkubace jsou prezentovány v Příloze 3. Aplikace  $PO_4^{3-}$  snížila mobilitu/dostupnost Se v černozemi, jak dokumentuje pokles  $Se_{rozp}$ . V porovnání s variantou kontrolní neměl  $PO_4^{3-}$  na distribuci Se v ostatních frakcích vliv, a tak nebylo možné objasnit, kam byl Se z  $Se_{rozp}$  redistribuován. Ani z dostupné literatury není zřejmé, zda přídavek  $PO_4^{3-}$  mohl aktivovat mikrobiální biomethylaci, která by vysvětlila ztrátu Se z experimentálního systému. Naproti tomu v kambizemi se distribuce Se po přídavku  $PO_4^{3-}$  shodovala s distribucí v kontrolní variantě, včetně  $Se_{rozp}$ . V obou půdách s přídavkem  $PO_4^{3-}$  způsobilo ozáření inhibici redistribuce  $Se_{rozp}$  do dalších méně mobilních frakcí, avšak ne tak účinně jako v ozářených kontrolách či ve variantách kombinujících ozáření a  $SO_4^{2-}$ .

Celková relativní výtěžnost MPE ze součtu nativního a exogenního Se v půdách napříč variantami činila 78–100 % v černozemi a 91–108 % v kambizemi. V případě variant s aplikací labilních organických látek do půdy s příznivou hodnotou  $pH$  lze ztráty Se pravděpodobně přičítat jeho biomethylaci (Zhang a Frankenberger, 1999). Z hmotnostní bilance za celé trvání inkubace vyplynulo, že stimulací mikrobiální aktivity v černozemi mohl volatilizovat Se v množství až  $160 \mu g kg^{-1}$ . V jiných studiích byla intenzita volatilizace Se výrazně nižší (Dhillon et al., 2010), avšak Calderone et al. (1990) při inkubaci seleniferých sedimentů ( $pH \sim 8$ ) naměřili kumulativní produkci volatilního selenu  $250\text{--}580 \mu g kg^{-1}$  (dle zdroje  $C_{org}$ ) za 20 týdnů.

V souladu s našimi výsledky byl v polních fortifikačních studiích, které se zabývaly osudem reálných aplikačních dávek  $\text{SeO}_4^{2-}$  (do  $10 \text{ g ha}^{-1} \text{ Se}$ ), zaznamenán nárůst množství Se v omezeně dostupných či nedostupných frakcích s časem (Keskinen et al., 2011; Mathers et al., 2017). Tito autoři při interpretaci dat poněkud přehlíželi úlohu mikroorganismů, ačkoliv Darcheville et al. (2008) již dříve jednoznačně popsali jejich zásadní vliv na distribuci Se v půdě. Podobně i Wang et al. (2017) se primárně zabývali pouze abiotickými faktory, přičemž na základě dat z roční laboratorní inkubace čínských zemědělských půd různého typu s  $\text{SeO}_4^{2-}$  ( $1000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ Se}$ ) identifikovali hodnotu  $pH$  jako nejvýznamnější proměnnou ovlivňující proces stabilizace Se v půdě. V půdách alkalických a neutrálních byl Se významně redistribuován do  $\text{Se}_{\text{org}}$  frakce, zatímco v půdách kyselých do  $\text{Se}_{\text{rezidual}}$ , což je zcela ve shodě s našimi výsledky pro alkalickou černozem a kyselou kambizem. V každoročně fortifikovaných kyselých finských půdách byla zjištěna mírná akumulace Se především v  $\text{Se}_{\text{org}}$  a  $\text{Se}_{\text{rezidual}}$  frakcích (Keskinen et al., 2011). Je nezbytné zdůraznit, že ekvivalent dávky  $\text{SeO}_4^{2-}$  v našem experimentu ( $400 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ Se}$ ) by odpovídal nereálné aplikaci nejméně  $750 \text{ g ha}^{-1} \text{ Se}$ . Naše výsledky MPE po roce inkubace, včetně zdánlivě vysokých hodnot  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  v kontrolních fortifikovaných půdách ( $163$  a  $206 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ Se}$ ), tedy nejsou nutně v rozporu s výraznou fixací Se ( $70\text{--}80\%$ ), kterou pozorovali Mathers et al. (2017) při inkubaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  ( $16 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ Se}$ ) v  $pH$  neutrálních britských půdách po 160 dnech, ani se zpravidla jednoletým účinkem agronomické fortifikace (Stroud et al., 2010b; Tremblay et al., 2015).

Na základě inkubačních experimentů, především dle variant s účelově modifikovanými úrovněmi aktivity půdních mikroorganismů, jsme prokázali, že nejvýznamnějším činitelem stabilizace exogenního Se v posuzovaných půdách byla činnost půdních mikroorganismů. V černozemi byl stanoven vyšší obsah mobilního Se a mikrobiálně podmíněná redistribuce Se směřovala především k organicky vázaným formám, které mohou po mineralizaci představovat latentní zdroj Se přístupný rostlinám (Wang et al., 2012; De Feudis et al., 2019). V kambizemi lze očekávat nižší účinnost selenizace plodin, a to z důvodu nižší mobility Se a redistribuce, z části také mikrobiálně podmíněné, do reziduální frakce půdního Se, která není rostlinám dostupná. Při plánování půdní aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  je nutné kalkulovat s vlivem koaplikovaných hnojiv na účinnost selenizace plodin. Aplikace  $\text{SO}_4^{2-}$  inhibovala imobilizaci Se v obou půdách, snadno rozložitelné organické látky měly opačný efekt. Domníváme se, že  $\text{SO}_4^{2-}$  i organické látky interferují hlavně s mikrobiálně zprostředkovanou imobilizací Se. Aplikace  $\text{PO}_4^{3-}$  způsobila neznámým mechanismem pokles snadno dostupného Se v černozemi, v kambizemi významný vliv nebyl pozorován.



### 5.3 BIOFORTIFIKACE ŘEPKY - APLIKACE SELENANU DO PŮDY

V rámci precizního nádobového pokusu ve vegetační hale byly v kambizemi I a černozemi pěstovány rostliny řepky olejné (jarní odrůda 'Blanice'). Před výsevem byl do půd aplikován  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  v množství  $32 \mu\text{g kg}^{-1}$  Se, základní hnojení (N, P, K) a proměnné dávky  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  (úplné faktoriální uspořádání, dva faktory, tři úrovně). V tomto experimentu může být účinnost selenizace řepky ovlivněna aniontovou kompeticí na třech úrovních: (i) abiotická půdní, (ii) fyziologická mikrobiální, (iii) fyziologická rostlinná. Data byla získána z prvkové analýzy (Se, S, P) jednotlivých rostlinných částí sklizených při plné zralosti řepky a z chemické speciace Se obsaženého v semeni.

Výnos semen a šesulí v obou půdách velmi příznivě reagoval na hnojení  $\text{SO}_4^{2-}$ . Dostupnost S definovala tři kontrastní úrovně z hlediska výnosu a hodnot sklizňových indexů. Rostliny nehnojené S vykazovaly zakrnělý růst, mezižilkovou chlorózu, anthokyanové zbarvení a lžícovitý tvar listů, tj. symptomy deficience S (Schnug a Haneklaus, 2005). V kambizemi při nedostatku S v kombinaci s nadbytkem P rostliny nevytvořily semena, na druhou stranu, za podmínek nejvyšší dávky S byl v této půdě zjištěn vyšší výnosový potenciál (až o 26 %) v porovnání s černozemí. Absolutní hodnoty obsahu S v semeni citlivým indikátorem dostupnosti S nebyly, zřejmě z důvodu adaptace řepky na nízkou dostupnost S regulací genové exprese  $\text{SO}_4^{2-}$  transportérů. O účasti mechanismu zvýšené účinnosti translokace/redistribuce S svědčily vysoké poměry obsahů S v semeni ku vegetativním orgánům řepky sklizené z černozemě. Podmíněnou aktivaci redistribučního mechanismu popsali také Dubousset et al. (2010) pro řepku pěstovanou při nízké dostupnosti  $\text{SO}_4^{2-}$ . Až na výjimky se sklizňové indexy v obou půdách ve stejné variantě hnojení významně nelišily, což je důležitý předpoklad porovnatelnosti účinnosti selenizace v obou půdách. Fosfor nebyl limitujícím prvkem výnosu, naopak nejvyšší dávky  $\text{PO}_4^{3-}$  inhibovaly růst řepky.

Velmi nízké obsahy Se ( $24$  a  $89 \mu\text{g kg}^{-1}$  Se) stanovené v semenech sklizených z nefortifikované kambizemě a černozemě potvrdily nízkou biodostupnost nativního Se v obou půdách. Významně vyšší obsahy Se v semeni a také ve stoncích a kořenech sklizených z nefortifikované černozemě jsou v souladu s vyššími obsahy Se ve frakci  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  a  $\text{Se}_{\text{org}}$  v nativní černozemi v porovnání s kambizemí (publikace II).

Aplikace  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  významně zvýšila obsahy Se v semeni (až  $245$  a  $455 \mu\text{g kg}^{-1}$  Se), v kambizemi byla dosažena výrazně nižší účinnost selenizace. I tyto výsledky bylo možné předpovídat dle předcházející inkubační studie (publikace II), která odhalila markantní redistribuci Se mimo dostupnou či potenciálně dostupnou půdní zásobu při stabilizaci exogenního Se v kambizemi. Lze předpokládat, že vyšší hodnoty  $\text{Se}_{\text{rozp}}$  a  $\text{Se}_{\text{org}}$  ve fortifikované černozemi mohou vysvětlit vyšší účinnost selenizace v této půdě.

Celkový vliv  $\text{SO}_4^{2-}$  na účinnost fortifikace plodin nelze *a priori* zobecnit, neboť síran má protichůdné účinky: (i) udržuje  $\text{SeO}_4^{2-}$  v rostlinám dostupné půdní zásobě; (ii) inhibuje příjem  $\text{SeO}_4^{2-}$  kořenovými buňkami. Inhibice dle mechanismu (ii) je často uváděnou příčinou snížení příjmu Se plodinami při koaplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  s  $\text{SO}_4^{2-}$  (Hopper a Parker, 1999; Lyons et al., 2005; Liu et al., 2017; Santiago et al., 2018). V našem pokusu lze projev této kompetice uvažovat pouze v kambizemi, a to s výhradou, neboť s rostoucí dávkou  $\text{SO}_4^{2-}$  se zvyšovala produkce biomasy a nelze tak vyloučit vliv ředění Se v biomase. V černozemi byly nejvyšší obsahy Se v semeni překvapivě zjištěny při nejvyšších dávkách  $\text{SO}_4^{2-}$ . Z dlouhodobého inkubačního experimentu (publikace II) bylo vyvozeno, že imobilizace exogenního Se v černozemi úzce souvisela s činností mikroorganismů a že účinek  $\text{SO}_4^{2-}$  na stabilizaci Se se podobal účinku  $\gamma$  záření, které inhibovalo mikrobiální imobilizaci. Takové působení síranu však nevysvětluje specifickou distribuci Se v rostlinách řepky pěstované v černozemi s nejvyšší dávkou  $\text{SO}_4^{2-}$ , která svědčí o výrazné remobilizaci Se z vegetativních orgánů do semen. Nutno poznamenat, že remobilizace Se ve fázi nalévání zrna je běžný fyziologický proces (Keskinen et al., 2010; Ebrahimi et al., 2019), ovšem jeho účelové využití prostřednictvím specifické dostupnosti  $\text{SO}_4^{2-}$  není prozkoumáno. Naše výsledky nalézají oporu ve studiích Renkema et al. (2012) a Liu et al. (2016), kteří v hydroponických podmínkách pozorovali usnadněnou translokaci Se ze selenanu v řepce, pokud byl do živného roztoku přidán také  $\text{SO}_4^{2-}$ . O vyšší účinnosti foliární aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  publikovali Golob et al. (2016) při pokusech s pohankou, kteří do postřiku přidávali  $\text{SO}_4^{2-}$ . Je zřejmé, že tento dosud málo prozkoumaný fenomén primárně souvisí s fyziologií rostliny a závisí na speciaci dostupného Se a S.

Celkový vliv hnojení P na účinnost selenizace v obou půdách nebyl významný, bylo však možné identifikovat několik trendů a souvislostí. V kambizemi byly s rostoucí dávkou  $\text{PO}_4^{3-}$  zaznamenány mírně vyšší obsahy Se v semeni. Jak bylo prezentováno v publikaci I, přídavek  $\text{PO}_4^{3-}$  blokoval v kambizemi abiotickou adsorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$ , resp. vytěsnil Se z nativní půdní zásoby, a to více než v černozemi. V černozemi při nejvyšší dávce síranu hnojení P nemělo vliv na účinnost selenizace, ovšem při nižších dávkách  $\text{SO}_4^{2-}$  spolu se vzrůstající dávkou  $\text{PO}_4^{3-}$  obsah Se v semeni mírně klesal. Pokles mobility/dostupnosti Se v černozemi byl pozorován po aplikaci  $\text{PO}_4^{3-}$  také v inkubačním pokusu (kapitola 5.2).

Jiný pohled na příjem, translokaci a distribuci Se v řepce zpřístupnily výpočty Pearsonova korelačního koeficientu, který kvantifikoval lineární vztah mezi obsahem Se a S či Se a P v rostlině. Při hodnocení všech vzorků, nehledě na část rostliny a variantu pokusu, bylo zjištěno, že obsahy Se a S významně kladně korelovaly ve fytomase vypěstované v černozemi, nikoliv v kambizemi. Vztah Se-S byl zvláště velmi těsný při nejvyšší dávce  $\text{SO}_4^{2-}$  do černozemě ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,985$ ) a méně významný v kambizemi ( $p = 0,054$ ,  $r = 0,658$ ). Skutečnost, že distribuce Se v řepce z kambizemě nekopírovala

distribuci S tak těsně jako při pěstování v černozemi, napovídá, že část přijatého Se již nebyla ve formě  $\text{SeO}_4^{2-}$  (tzn., nebyla využita metabolická dráha  $\text{SO}_4^{2-}$ ), nýbrž ve formě redukované, např.  $\text{SeO}_3^{2-}$  nebo malé molekuly  $\text{Se}_{\text{org}}$ . Obě tyto redukované formy mohou být absorbovány kořeny rostlin, liší se však v účinnosti translokace a snadnosti asimilace (Li et al., 2008; Kikkert a Berkelaar, 2013). Další markantní rozdíl mezi půdami se projevil ve vztazích Se-S v semeni a kořenech, korelační koeficienty v kambizemi nabývaly záporných hodnot. Obsahy Se a P v jednotlivých vegetativních orgánech řepky vypěstované v černozemi, stejně jako Se a S, významně kladně korelovaly. Rozvodem asimilátů do semen se tyto relace ztrácely. V kambizemi obsah Se v jednotlivých částech řepky sledoval distribuci fosforu více než síry. Bohužel, bez detailní znalosti zúčastněných transportních a metabolických drah na molekulární úrovni, včetně Se, S a P intermediátů a jejich rolí v substrátových kompeticích, je diskuze zjištěné odlišné fyziologické diskriminace a distribuce Se-S-P velmi obtížná.

Konvenční příprava vzorků rostlinného materiálu pro speciální analýzu Se, tj. proteinogenního prvku, zahrnuje enzymatickou hydrolýzu, jejíž účelem je uvolnění SAK, které jsou detekovány technikou HPLC/ICPMS. Dosažená extrakční účinnost (EÚ) selenu v závislosti na rostlinné části činila jen 19–57 % z  $\text{Se}_{\text{tot}}$ . Jinými autory specifikované EÚ z řepkového semene či šrotu při použití též proteázy a podobných extrakčních podmínek nabývají srovnatelných hodnot s naší studií (Bañuelos et al., 2012; Balán et al., 2014). Výtěžku téměř 100 % dosáhli, nikoliv vždy, jen Seppänen et al. (2010). Hlavní příčinou nízké EÚ je omezená rozpustnost zásobních selenoproteinů řepky (Wanasundara, 2011; Sari et al., 2013).

Z pohledu kvantitativního se problematicky jevila také nízká chromatografická výtěžnost kolony (CHVK) pro Se v rozmezí 27–72 %. Nízké CHVK nejsou překvapivé, stupeň enzymatické hydrolýzy proteinů z řepkového šrotu může být < 30 %, hydrolyzáty tak představují směsi peptidů o molekulové hmotnosti až 10 000 Da, nikoliv výhradně volné aminokyseliny (Chabanon et al., 2007; Zhou et al., 2016).

Hlavní specií Se stanovenou v řepce vypěstované v černozemi byl SeMet, zastupující 73–93 % identifikovaného Se v hydrolyzátech semen a kořenů. Tento výsledek potvrzuje sdílení biosyntetické dráhy selenu se sírou, jejíž produktem je sirný analog methionin (Hawkesford a De Kok, 2006). Selenomethionin byl hlavní specií Se v řepkovém semeni, pokrutinách či šrotu také v dalších studiích (Seppänen et al., 2010; Bañuelos et al., 2012; Balán et al., 2014). Na výskytu dalších specií se tito autoři již neshodli, nejčastěji byly dále nalezeny SeCys2 a SeMetCys. V semeni naší řepky byly stanoveny SeCys2 (až 9 % Se) a stopy  $\text{SeO}_4^{2-}$ , zatímco  $\text{SeO}_3^{2-}$  a SeMetCys nebyly detekovány. Zjištěná absence nežádoucích forem  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  je důležitým parametrem úspěšné biofortifikace. Nízké a velmi variabilní hodnoty EÚ a CHVK znemožnily kvantitativní vyhodnocení vlivu S a P hnojení

na speciaci Se v semeni. Není např. jasné, zda vyšší hodnoty SeMet stanovené v semeni po vyšší dávce  $\text{SO}_4^{2-}$  byly způsobeny zvýšenou biosyntézou SeMet nebo zvýšenou EÚ selenu. Bez výrazné budoucí optimalizace proteolýzy se HPLC/ICPMS jeví méně vhodnou technikou speciace Se ve fytomase řepky.

Racionální hnojení  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  není překážkou úspěšné selenizace řepky. Při aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  do půdy má však především  $\text{SO}_4^{2-}$  potenciál ovlivnit účinnost biofortifikace. V každé půdě je nutné počítat s poklesem účinnosti biofortifikace kvůli kompetici selenan-síran při příjmu Se kořeny rostlin. Nežádoucí účinek této kompetice může být kompenzován několika dalšími mechanismy působení  $\text{SO}_4^{2-}$ , jejichž projev kriticky závisí na fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech půd. Ke kompenzaci sníženého příjmu selenanu dochází, pokud  $\text{SO}_4^{2-}$  současně dokáže inhibovat redistribuci Se do rostlinám nedostupných frakcí v půdě. Ke zvýšení translokace a akumulace Se v semeni řepky dochází také v rámci autoregulační odpovědi rostliny na metabolickou potřebu S a specifickou dostupnost S v půdě. Praktické využití a spoléhání se na tyto fyziologické procesy je potenciálně značně rizikové.

#### **5.4 BIOFORTIFIKACE ŘEPKY - FOLIÁRNÍ APLIKACE SELENANU**

Při foliární aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  je podstatná část kompetičních a imobilizačních procesů lokalizovaných v půdě eliminována a lze očekávat vyšší efektivitu využití aplikovaného Se. Nabízí se však otázka, do jaké míry ovlivňuje stanoviště (tj. kvalita půd a klimatické podmínky) výsledný obsah Se v rostlině při aplikaci na list. Nezbytnými předpoklady porovnání účinnosti selenizace na více stanovištích jsou pěstování téže odrůdy dané plodiny, foliární ošetření porostu ve stejné fenologické fázi vývoje a stejnou dávkou Se. Za tímto účelem byl založen maloparcelkový polní pokus s řepkou olejnou (ozimá odrůda 'DK Exquisite') na dvou stanovištích s odlišnými půdně-klimatickými podmínkami. Experimentální půdy kambizem I (Humpolec, Kraj Vysočina) a Luvizem (Červený Újezd, Středočeský kraj) se vyznačovaly velmi podobnými obsahy nativního Se, lišily se však v jeho dostupnosti rostlinám, jak potvrdily obsahy Se stanovené v kontrolních variantách bez postřiku  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . V biomase sklizené v době květu, na konci kvetení a v plné zralosti byl sledován vliv dávky  $\text{SeO}_4^{2-}$  (25 a 50 g ha<sup>-1</sup> Se) aplikované na začátku fáze dlouhivého růstu na obsah a distribuci Se v rostlinách řepky. Dále byl vyhodnocen potenciální vliv selenizace na příjem a distribuci vybraných makro- a mikroprvků v řepce.

Na obou stanovištích se obsah Se v rostlinných orgánech zvyšoval s rostoucí dávkou  $\text{SeO}_4^{2-}$ . Významně vyšší akumulace Se v semeni byla zaznamenána ve sklizni z luvizemě (1050 µg kg<sup>-1</sup> Se) v porovnání s kambizemí (400 µg kg<sup>-1</sup> Se). Také pro obsahy Se v šešulích bez semene, ve stoncích a kořenech platila nerovnost luvizem > kambizem. Klognerová et al. (2015) realizovali své polní pokusy také v Červeném Újezdě a Humpolci,



příčemž vlastnosti stanoviště významný vliv na celkový obsah Se v semeni překvapivě neměly (v luvizemi průměr činil  $650 \mu\text{g kg}^{-1}$  Se, v kambizemi  $610 \mu\text{g kg}^{-1}$  Se při  $50 \text{ g ha}^{-1}$  Se), jejich řepka však byla foliárně ošetřena  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Podobně Seppänen et al. (2010) nezjistili statisticky významné rozdíly mezi semeny ze dvou stanovišť při foliární aplikaci  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Pokud byl aplikován  $\text{SeO}_4^{2-}$ , semeno řepky vypěstované v úrodnější půdě obsahovalo významně více Se, což je v souladu s našimi výsledky. Dle uvedených poznatků nelze přehlédnout, že při foliární aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  účinnost selenizace více závisela na půdních vlastnostech stanoviště v porovnání s aplikací  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Bohužel, jednoznačnou identifikaci příčin nižší účinnosti selenizace s  $\text{SeO}_4^{2-}$  v kambizemi náš experimentální přístup neumožnil. Pro stanoviště s kambizemí lze spekulovat méně účinnou absorpci  $\text{SeO}_4^{2-}$  listy, nižší účinnost remobilizace Se z listů či vyšší intenzitu volatilizace alkylselenidů z řepky (Winkel et al., 2015). Vyloučit nelze ani vliv Se, který nebyl zachycen povrchem rostlin a dopadl na půdu, přičemž v kambizemi se předpokládá účinnost půdní aplikace Se podstatně nižší.

Ve vegetativních orgánech byly obsahy Se zjištěny takto: listy > stonky > kořeny, což odpovídá distribuci Se po foliární fortifikaci jiných plodin (Šindelářová et al., 2015; Zhang et al., 2019b; Wang et al., 2020b). Při aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  do půdy byla však akumulace Se v kořenech řepky významná (publikace III), zvláště v kambizemi. Během vegetace obsahy Se v listech a stoncích na obou stanovištích postupně klesaly. Hlavní příčinou byla remobilizace Se v rostlině, nelze však vyloučit minoritní vliv volatilizace Se či ředění Se v biomase. Cílem redistribuce Se, zvláště ve fázi nalévání zrna, jsou generativní orgány, jak demonstrovali Keskinen et al. (2010) pro pšenici a Ebrahimi et al. (2019) pro řepku. V obou citovaných studiích byl  $\text{SeO}_4^{2-}$  dávkován do půdy, lze se však domnívat, že počínaje remobilizací Se z listů, v jejichž chloroplastech je  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  asimilován (Terry et al., 2000), jsou rozdíly v pohybu Se rostlinou v závislosti na způsobu aplikace Se stírány.

Podle hrubého odhadu činil ekvivalent aplikační dávky  $\text{SeO}_4^{2-}$  do kambizemě v nádobovém pokusu (publikace III)  $60\text{--}100 \text{ g ha}^{-1}$  Se při dosažení maximálního obsahu Se v řepkovém semeni  $245 \mu\text{g kg}^{-1}$ , což je přibližně poloviční obsah Se v porovnání s foliární aplikací při  $50 \text{ g ha}^{-1}$  Se (tataž kambizem z Humpolce). Ačkoliv srovnávání výsledků nádobového a polního pokusu je zavádějící, byla potvrzena vyšší účinnost aplikace Se na list.

Vliv selenizace na obsah vybraných makro- a mikroprvků v semeni řepky nebyl prokázán. V opačném smyslu může být účinnost selenizace ovlivněna především příjmem a metabolismem síry (publikace III). V časnějších fázích vývoje řepky byly stanoveny vyšší obsahy S ve vegetativních orgánech při pěstování v kambizemi, avšak v semeni již nebyly rozdílné obsahy mezi stanovišti patrné. Takové chování indikuje nižší účinnost

remobilizace S do generativních orgánů na stanovišti s kambizemí, což může mít souvislost s nižší akumulací Se v semeni na tomto stanovišti.

Naše výsledky ukázaly, že účinnost selenizace řepky při foliární aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  úzce souvisela s půdně-klimatickými charakteristikami stanoviště. Bez přizpůsobení aplikační dávky lokálním podmínkám bude velmi obtížné dosáhnout žádoucích hodnot obsahu Se ve sklizni.

## 6 ZÁVĚR

Tato práce byla věnována výzkumu vybraných faktorů, které limitují účinnost agronomické biofortifikace řepky olejné selenem. Pozornost byla zaměřena především na projevy aniontových kompetic, jejichž význam roste při aplikaci hnojiv na bázi  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$ . Aplikace Se do půdy ve formě  $\text{SeO}_4^{2-}$  vedla k významnému zvýšení akumulace Se v semeni řepky. Dílčí závěry potvrzují obecnou platnost konceptu stabilizace Se v půdě s časem, která se projevuje postupnou imobilizací exogenního Se, resp. změnou jeho frakcionace, směřující k málo až nedostupným formám Se v půdní zásobě. Anionty z hnojiv podmiňují dostupnost Se v půdě, jeho příjem a translokaci v rostlinách výrazně komplexněji, než bylo prezentováno v předchozích studiích. Výsledná účinnost biofortifikace je ovlivněna kombinací několika, často protichůdných, mechanismů působení aniontů, které interferují s procesem stabilizace Se v půdě. Účelně zvolená provázanost jednotlivých pokusů a volba proměnných při využití stále stejných experimentálních půd výrazně přispěly k objasnění kompetičního vztahu selenan-síran na třech nezávislých úrovních. Významným objevem je usnadněná translokace Se z vegetativních orgánů do semen, která byla pro řepku dosud popsána pouze v hydroponických podmínkách. Účinnost translokace se zvyšovala s aplikační dávkou  $\text{SO}_4^{2-}$ . Tento mechanismus se podílel na kompenzaci obvyklého poklesu účinnosti selenizace plodin při koaplikaci  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_4^{2-}$  do půdy.

Otázka účinnosti biofortifikace úzce souvisí s výzkumem biogeochemického osudu  $\text{SeO}_4^{2-}$  v půdě, s množstvím Se vstupujícím do půdy a se stabilitou oxidačního stavu  $\text{Se}^{\text{VI}}$ . Různorodost, složitost a různá intenzita zúčastněných jevů komplikují definování obecně platných vztahů pro predikci vlivu hnojení půd na účinnost biofortifikace podle základních fyzikálně-chemických vlastností půd. Důraz by měl být kladen na individuální posouzení situace v dané půdě. Metoda postupné extrakce použitá v této studii byla dostatečně citlivá pro sledování změn frakcionace Se v čase a její výsledky byly užitečné při interpretaci vývoje dostupnosti Se rostlinám řepky. Mezi klíčové parametry ovlivňující stabilizaci Se v půdách patří rozsah mikrobiální transformace  $\text{Se}_{\text{anorg}} \rightarrow \text{Se}_{\text{org}}$ , jejíž význam byl mnohými autory přehlížen. Z výsledků vyplývá, že dostupnost  $\text{SeO}_4^{2-}$  půdním mikroorganismům je limitována především dostupností síranů. Aplikace minerálních hnojiv dramaticky snižuje adsorpční schopnost půdních částic poutat  $\text{SeO}_4^{2-}$  abiotickým iontovým mechanismem. Naopak, v některých půdách mohou přídatky  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  zvyšovat koncentraci Se v půdním roztoku vytěsněním Se z nativní půdní zásoby.

Předložená práce upozornila na rizika vlivu matrice spojená se stanovením koncentrace Se v půdních vyluzích technikou ICPMS. Interpretaci výsledků speciální analýzy Se technikou HPLC-ICPMS limitovala nízká účinnost hydrolýzy selenoproteinů

a nízká výtěžnost chromatografické kolony. Úspěšnost biofortifikace byla potvrzena absencí nežádoucích forem  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  v semeni. Hlavním produktem asimilace  $\text{Se}_{\text{anorg}}$  v řepce byl pravděpodobně SeMet vázaný v polypeptidových řetězcích. Po vylisování/extrakci oleje ze semen bude možné získat vedlejší produkt bohatý na  $\text{Se}_{\text{org}}$ , jehož zkrmování navýší příjem Se hospodářskými zvířaty.

Foliární aplikace  $\text{SeO}_4^{2-}$  je příslibem vyšší účinnosti biofortifikace plodin, neboť je eliminován vliv imobilizačních mechanismů Se a aniontových kompetic lokalizovaných v půdě. Nicméně, dle získaných výsledků účinnost selenizace řepky významně závisela i na půdně-klimatických faktorech stanoviště, s vlivem půdy zprostředkovaným na úrovni fyziologie rostlin je tedy nutné kalkulovat i při aplikaci  $\text{SeO}_4^{2-}$  na list.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abrams, M. M., Burau, R. G., Zasoski, R. J. 1990. Organic selenium distribution in selected California soils. *Soil Science Society of America Journal*. 54. 979-982.
- Adadi, P., Barakova, N. V., Muravyov, K. Y., Krivoshapkina, E. F. 2019. Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food Research International*. 120. 708-725.
- Agatemor, C., Beauchemin, D., 2011. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 706. 66-83.
- Aguilar-Barajas, E., Díaz-Pérez, C., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., Cervantes, C. 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals*. 24. 687-707.
- Aguirre, M. Á., Fialho, L. L., Nóbrega, J. A., Hidalgo, M., Canals, A. 2014. Compensation of inorganic acid interferences in ICP-OES and ICP-MS using a Flow Blurring® multinebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 29. 1218-1227.
- Ajwa, H. A., Bañuelos, G. S., Mayland, H. F. 1998. Selenium uptake by plants from soils amended with inorganic and organic materials. *Journal of Environmental Quality*. 27. 1218-1227.
- Alfthan, G., Eurola, M., Ekholm, P., Venäläinen, E. R., Root, R., Korkalainen, K., Hartikainen, H., Salminen, P., Hietaniemi, V., Aspila, P., Aro, A. 2015. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 31. 142-147.
- Ali, F., Peng, Q., Wang, D., Cui, Z., Huang, J., Fu, D., Liang, D. 2017. Effects of selenite and selenate application on distribution and transformation of selenium fractions in soil and its bioavailability for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Science and Pollution Research*. 24. 8315-8325.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S. M., Ok, Y. S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M. N. V., Wenzel, W. W., Rinklebe, J. 2017. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation – A review. *Earth-Science Reviews*. 171. 621-645.
- Aspila, P. 2005. History of selenium supplemented fertilization in Finland. In: Eurola, M. (ed.). Twenty years of selenium fertilization. MTT Agrifood Research Finland. Jokioinen. ISBN: 951-729-966-4.
- Aurelio, G., Fernández-Martínez, A., Cuello, G. J., Román-Ross, G., Alliot, I., Charlet, L. 2010. Structural study of selenium(IV) substitutions in calcite. *Chemical Geology*. 270. 249-256.
- Ávila, F. W., Yang, Y., Faquin, V., Ramos, S. J., Guilherme, L. R. G., Thannhauser, T. W., Li, L. 2014. Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified Brassica sprouts. *Food Chemistry*. 165. 578-586.
- Balán, J., Vosmanská, M., Mestek, O. 2013. Speciální analýza selenu v semenech řepky olejky. *Chemické Listy*. 107. 215-218.
- Balán, J., Vosmanská, M., Száková, J., Mestek, O. 2014. Speciation analysis of selenium in the defatted rapeseed meal. *Chemické Listy*. 108. 256-263.
- Bañuelos, G. S., 2002. Irrigation of broccoli and canola with boron- and selenium-laden effluent. *Journal of Environmental Quality*. 31. 1802-1808.
- Bañuelos, G. S., Ajwa, H. A., Wu, L., Zambruski, S. 1998. Selenium accumulation by *Brassica napus* grown in Se-laden soil from different depths of Kesterson Reservoir. *Journal of Soil Contamination*. 7 (4). 481-496.
- Bañuelos, G. S., Arroyo, I., Pickering, I. J., Yang, S. I., Freeman, J. L. 2015. Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched hyperaccumulator *Stanleya pinnata*. *Food Chemistry*. 166. 603-608.
- Bañuelos, G. S., Walse, S. S., Yang, S. I., Pickering, I. J., Fakra, S. C., Marcus, M. A., Freeman, J. L. 2012. Quantification, localization, and speciation of selenium in seeds of canola and two mustard species compared to seed-meals produced by hydraulic press. *Analytical Chemistry*. 84 (14). 6024-6030.

- Basu, S. K., Kumar, N., Srivastava, J. P. 2010. Modeling NPK release from spherically coated fertilizer granules. *Simulation Modelling Practice and Theory*. 18. 820-835.
- Bishop, D. P., Hare, D. J., Fryer, F., Taudte, R. V., Cardoso, B. R., Cole, N., Doble, P. A. 2015. Determination of selenium in serum in the presence of gadolinium with ICP-QQQ-MS. *Analyst*. 140. 2842-2846.
- Bitterli, C., Bañuelos, G. S., Schulin, R. 2010. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *Journal of Geochemical Exploration*. 107. 206-216.
- Blanchet, G., Gavazov, K., Bragazza, L., Sinaj, S. 2016. Responses of soil properties and crop yields to different inorganic and organic amendments in a Swiss conventional farming system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 230. 116-126.
- Blankinship, J. C., Becerra, C. A., Schaeffer, S. M., Schimel, J. P. 2014. Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in soil organic matter decomposition. *Soil Biology & Biochemistry*. 71. 68-75.
- Blaylock, M. J., James, B. R. 1994. Redox transformations and plant uptake of selenium resulting from root-soil interactions. *Plant and Soil*. 158 (1). 1-12.
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W., Nakhado, T., Thompson, H. J., Toscano, P. J., Uzar, H., Zhang, X., Zhu, Z. 2001. Allium chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of SeAlk(en)ylselenocysteines and their  $\gamma$ -glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. 458-470.
- Boldrin, P. F., Faquin, V., Ramos, S. J., Boldrin, K. V. F., Ávila, F. W., Guilherme, L. R. G. 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis*. 31. 238-244.
- Broadley, M. R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S. J., Hart, D. J., Hurst, R., Knott, P., McGrath, S. P., Meacham, M. C., Norman, K., Mowat, H., Scott, P., Stroud, J. L., Tovey, M., Tucker, M., White, P. J., Young, S. D., Zhao, F. J. 2010. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant and Soil*. 332. 5-18.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, S. P., Zhao, F. J., Breward, N., Harriman, M., Tucker, M. 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65. 169-181.
- Bruggeman, C., Maes, A., Vancluysen, J. 2007. The interaction of dissolved Boom Clay and Gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). *Applied Geochemistry*. 22. 1371-1379.
- Calderone, S. J., Frankenberger, W. T., Parker, D. R., Karlson, U. 1990. *Soil Biology and Biochemistry*. 22 (5). 615-620.
- Carey, A.-M., Scheckel, K. G., Lombi, E., Newville, M., Choi, Y., Norton, G. J., Price, A. H., Meharg, A. A. 2012. *Environmental Science & Technology*. 46. 5557-5564.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*. 42 (10). 1419-1428.
- Chen, Y.-W., Li, L., D'Ulivo, A., Belzile, N. 2006. Extraction and determination of elemental selenium in sediments – A comparative study. *Analytica Chimica Acta*. 577. 126-133.
- Chen, Q., Shi, W., Wang, X. 2010. Selenium speciation and distribution characteristics in the rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 41. 1411-1425.
- Chilimba, A. D. C., Young, S. D., Black, C. R., Meacham, M. C., Lammel, J., Broadley, M. R. 2012. Agronomic biofortification of maize with selenium (Se) in Malawi. *Field Crops Research*. 125. 118-128.
- Choi, Y., Kim, J., Lee, H.-S., Kim, C., Hwang, I. K., Park, H. K., Oh, C.-H. 2009. Selenium content in representative Korean foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22. 117-122.
- Clandinin, D. R., Robblee, A. R. 1981. Rapeseed meal in animal nutrition: II. nonruminant animals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 58. 682-686.

- Colon, M., Hidalgo, M., Iglesias, M. 2011. Arsenic determination by ICP-QMS with octopole collision/reaction cell. Overcome of matrix effects under vented and pressurized cell conditions. *Talanta*. 85. 1941-1947.
- Combs, G. F. 2001. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*. 85. 517-547.
- Coppin, F., Chabroullet, C., Martin-Garin, A. 2009. Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolated from a natural grassland soil. *European Journal of Soil Science*. 60. 369-376.
- Coppin, F., Chabroullet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J. P. 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils*. 42. 379-386.
- Dams, R. F. J., Goossens, J., Moens, L. 1995. Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry. *Microchimica Acta*. 119. 277-286.
- Darcheville, O., Février, L., Haichar, F. Z., Berge, O., Martin-Garin, A., Renault, P. 2008. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. *Journal of Environmental Radioactivity*. 99. 981-992.
- Darrouzes, J., Bueno, M., Lespes, G., Potin-Gautier, M. 2005. Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 20. 88-94.
- Davik, J., Bakken, A. K. 1999. Seed yield and Sulphur partitioning in two inbred lines of low and high glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their hybrids at three levels of Sulphur supply. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science*. 49 (3). 184-188.
- de Abreu, L. B., Carvalho, G. S., Curi, N., Guilherme, L. R. G., Marques, J. J. G. S. M. 2011. Sorção de selênio em solos do bioma cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 35 (6). 1995-2003.
- De Feudis, M., D'Amato, R., Businelli, D., Guiducci, M. 2019. Fate of selenium in soil: A case study in a maize (*Zea mays* L.) field under two irrigation regimes and fertilized with sodium selenite. *Science of the Total Environment*. 659. 131-139.
- de León, C. A. P., DeNicola, K., Bayón, M. M., Caruso, J. A. 2003. Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: total selenium and speciation measurements with ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring*. 5 (3). 435-440.
- de Souza, M. P., Pilon-Smits, E. A. H., Lytle, C. M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T. S. U., Yeh, L., Terry, N. 1998. Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology*. 117. 1487-1494.
- De Temmerman, L., Waegeneers, N., Thiry, C., Du Laing, G., Tack, F., Ruttens, A. 2014. Selenium content of Belgian cultivated soils and its uptake by field crops and vegetables. *Science of the Total Environment*. 468-469. 77-82.
- De Vita, P., Platani, C., Fragasso, M., Ficco, D. B. M., Colecchia, S. A., Del Nobile, M. A., Padalino, L., Di Gennaro, S., Petrozza, A. 2017. Selenium-enriched durum wheat improves the nutritional profile of pasta without altering its organoleptic properties. *Food Chemistry*. 214. 374-382.
- Deng, X., Liu, K., Li, M., Zhang, W., Zhao, X., Zhao, Z. 2017. Difference of selenium uptake and distribution in the plant and selenium form in the grains of rice with foliar spray of selenite or selenate at different stages. *Field Crops Research*. 211. 165-171.
- Dhillon, K. S., Dhillon, S. K. 1999. Adsorption-desorption reactions of selenium in some soils of India. *Geoderma*. 93. 19-31.
- Dhillon, S. K., Dhillon, K. S. 2009. Phytoremediation of selenium-contaminated soils: the efficiency of different cropping systems. *Soil Use and Management*. 25. 441-453.
- Dhillon, K. S., Dhillon, S. K., Dogra, R. 2010. Selenium accumulation by forage and grain crops and volatilization from seleniferous soils amended with different organic materials. *Chemosphere*. 78. 548-556.
- Dhillon, S. K., Hundal, B. K., Dhillon, K. S. 2007. Bioavailability of selenium to forage crops in a sandy loam soil amended with Se-rich plant materials. *Chemosphere*. 66. 1734-1743.

- Di Tullo, P., Pannier, F., Thiry, Y., Le Hécho, I., Bueono, M. 2016. Field study of time-dependent selenium partitioning in soils using isotopically enriched stable selenite tracer. *Science of the Total Environment*. 562. 280-288.
- Dinh, Q. T., Li, Z., Tran, T. A. T., Wang, D., Liang, D. 2017. Role of organic acids on the bioavailability of selenium in soil: A review. *Chemosphere*. 184. 618-635.
- Dubousset, L., Etienne, P., Avice, J. C. 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany*. 61 (15). 4313-4324.
- Duc, M., Lefevre, G., Fedoroff, M., Jeanjean, J., Rouchaud, J. C., Monteil-Rivera, F., Dumonceau, J., Milonjic, S. 2003. Sorption of selenium anionic species on apatites and iron oxides from aqueous solutions. *Journal of Environmental Radioactivity*. 70. 61-72.
- Ducsay, L., Ložek, O., Marček, M., Varényiová, M., Hozlár, P., Lošák, T. 2016. Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. *Plant, Soil and Environment*. 62 (8). 379-383.
- Duncan, E. G., Maher, W. A., Jagtap, R., Krikowa, F., Roper, M. M., O'Sullivan, C. A. 2017. Selenium speciation in wheat grain varies in the presence of nitrogen and sulphur fertilisers. *Environmental Geochemistry and Health*. 39 (4). 955-966.
- Dungan, R. S., Frankenberger, W. T. 1999. Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments. *Bioremediation Journal*. 3 (3). 171-188.
- Ebrahimi, N., Hartikainen, H., Simojoki, A., Hajiboland, R., Seppänen, M. 2015. Dynamics of dry matter and selenium accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in response to organic and inorganic selenium treatments. *Agricultural and Food Science*. 24. 104-117.
- Ebrahimi, N., Stoddard, F., Hartikainen, H., Seppänen, M. M. 2019. Plant species and growing season weather influence the efficiency of selenium biofortification. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 114. 111-124.
- Eich-Greatorex, S., Krogstad, T., Sogn, T. A. 2010. Effect of phosphorus status of the soil on selenium availability. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 173. 337-344.
- Ejima, A., Watanabe, C., Koyama, H., Satoh, H. 1999. Matrix interferences in the analysis of digested biological tissues with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biological Trace Element Research*. 69. 99-109.
- Ekanayake, L. J., Thavarajah, D., Vial, E., Schatz, B., McGee, R., Thavarajah, P. 2015. Selenium fertilization on lentil (*Lens culinaris* Medikus) grain yield, seed selenium concentration, and antioxidant activity. *Field Crops Research*. 177. 9-14.
- El-Ramady, H., Abdalla N., Alshaal, T., Domokos-Szabolcsy, É., Elhawat, N., Prokisch, J., Sztrik, A., Fári, M., El-Marsafawy, S., Shams, M. S. 2015. Selenium in soils under climate change, implications for human health. *Environmental Chemistry Letters*. 13. 1-19.
- Elwaer, N., Hintelmann, H. 2008. Comparing the precision of selenium isotope ratio measurements using collision cell and sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 75. 205-214.
- Elzinga, E. J., Tang, Y., McDonald, J., DeSisto, S., Reeder, R. J. 2009. Macroscopic and spectroscopic characterization of selenate, selenite, and chromate adsorption at the solid-water interface of  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of Colloid and Interface Science*. 340. 153-159.
- Eswayah, A. S., Smith, T. J., Gardiner, P. H. E. 2016. Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 82. 4848-4859.
- Eurola, M., Ekholm, P., Ylinen, M., Koivistoinen, P., Varo, P. 1990. Effects of selenium fertilization on the selenium content of cereal grains, flour, and bread produced in Finland. *Cereal Chemistry*. 67 (4). 334-337.
- Eurola, M. H., Ekholm, P. I., Ylinen, M. E., Koivistoinen, P. E., Varo, P. T. 1991. Selenium in Finnish foods after beginning the use of selenate-supplemented fertilisers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 56. 57-70.
- Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., Hurst, R. 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14 (7). 1337-1383.

- Fan, J., Zeng, Y., Sun, J. 2018. The transformation and migration of selenium in soil under different Eh conditions. *Journal of Soils and Sediments*. 18. 2935-2947.
- Fan, J., Zhao, G. 2018. Sorption characteristics and fraction distribution changes of selenite in soil. *Sustainability*. 10. 2491.
- Fang, D., Wei, S., Xu, Y., Xiong, J., Tan, W. 2019. Impact of low-molecular weight organic acids on selenite immobilization by goethite: Understanding a competitive-synergistic coupling effect and speciation transformation. *Science of the Total Environment*. 684. 694-704.
- Favorito, J. E., Eick, M. J., Grossl, P. R. 2018. Adsorption of selenite and selenate on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Quality*. 47. 147-155.
- Favorito, J. E., Luxton, T. P., Eick, M. J., Grossl, P. R. 2017. Selenium speciation in phosphate mine soils and evaluation of a sequential extraction procedure using XAFS. *Environmental Pollution*. 229. 911-921.
- Feldmann, I., Jakubowski, N., Stuewer, D., Thomas, C. 2000. Speciation of organic selenium compounds by reversed-phase liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. Part II. Sector field instrument with high mass resolution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 15. 371-376.
- Fellowes, J. W., Patrick, R. A. D., Boothman, C., Al Lawati, W. M. M., van Dongen, B. E., Charnock, J. M., Lloyd, J. R., Pearce, C. I. 2013. Microbial selenium transformations in seleniferous soils. *European Journal of Soil Science*. 64. 629-638.
- Fernández-Martínez, A., Charlet, L. 2009. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 8. 81-110.
- Ferri, T., Sangiorgio, P. 1999. Voltammetric study of the interaction between Se(IV) and dissolved organic matter in environmental aqueous matrices. *Analytica Chimica Acta*. 385. 337-343.
- Février, L., Martin-Garin, A., Leclerc, E. 2007. Variation of the distribution coefficient ( $K_d$ ) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity*. 97. 189-205.
- Fio, J. L., Fujii, R., Deverel, S. J. 1991. Selenium mobility and distribution in irrigated and nonirrigated alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal*. 55. 1313-1320.
- Fordyce, F. M. 2013. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus, O. (ed.). *Essentials of medical geology*. Revised Edition. Springer Netherlands. Dordrecht. p. 375-416. ISBN: 978-94-007-4375-5.
- Fraser, M. M., Beauchemin, D. 2000. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions. *Spectrochimica Acta Part B*. 55. 1705-1731.
- Gabos, M. B., Goldberg, S., Alleoni, L. R. F. 2014. Modeling selenium (IV and VI) adsorption envelopes in selected tropical soils using the constant capacitance model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33 (10). 2197-2207.
- Galinha, C., Freitas, M. C., Pacheco, A. M. G., Coutinho, J., Macas, B., Almeida, A. S. 2013. Selenium supplementation of Portuguese wheat cultivars through foliar treatment in actual field conditions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 297. 227-231.
- Galinha, C., Pacheco, A. M. G., Freitas, M. C., Fikrle, M., Kučera, J., Coutinho, J., Macas, B., Almeida, A. S., Wolterbeek, H. T. 2015. Selenium in bread and durum wheats grown under soil-supplementation regime in actual field conditions, determined by cyclic and radiochemical neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 304. 139-143.
- García-Poyo, M. C., Grindlay, G., Gras, L., de Loos-Vollebregt, M. T. C., Mora, J. 2015. Non-spectral interferences due to the presence of sulfuric acid in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 105. 71-76.
- García-Sánchez, L., Loffredo, N., Mounier, S., Martin-Garin, A., Coppin, F. 2014. Kinetics of selenate sorption in soil as influenced by biotic and abiotic conditions: a stirred flow-through reactor study. *Journal of Environmental Radioactivity*. 138. 38-49.



- Goh, K.-H., Lim, T.-T. 2004. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere*. 55. 849-859.
- Golob, A., Gadžo, D., Stibilj, V., Djikić, M., Gavrić, T., Kreft, I., Germ, M. 2016. Sulphur interferes with selenium accumulation in Tartary buckwheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 108. 32-36.
- Gómez-Brandón, M., Juárez, M. F.-D., Zangerle, M., Insam, H. 2016. Effects of digestate on soil chemical and microbiological properties: A comparative study with compost and vermicompost. *Journal of Hazardous Materials*. 302. 267-274.
- Gondi, F., Pantó, G., Fehér, J., Bogye, G., Alfthan, G. 1992. Selenium in Hungary – The rock-soil-human system. *Biological Trace Element Research*. 35 (3). 299-306.
- Goss, M. J., Tubeileh, A., Goorahoo, D. 2013. A review of the use of organic amendments and the risk to human health. *Advances in Agronomy*. 120. 275-379.
- Grindlay, G., Gras, L., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M. T. C. 2016. Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 115. 8-15.
- Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F. 2013. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 86. 42-49.
- Guerrero, B., Llugany, M., Palacios, O., Valiente, M. 2014. Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*. 83. 300-307.
- Guo, W., Hu, S., Wang, Y., Zhang, L., Hu, Z., Zhang, J. 2013. Trace determination of selenium in biological samples by CH<sub>4</sub>-Ar mixed gas plasma DRC-ICP-MS. *Microchemical Journal*. 108. 106-112.
- Gupta, U. C. 1995. Effects of Selcote® ultra and sodium selenate (laboratory versus commercial grade) on selenium concentration in feed crops. *Journal of Plant Nutrition*. 18 (8). 1629-1636.
- Gupta, P., Diwan, B. 2017. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*. 13. 58-71.
- Gupta, M., Gupta, S. 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*. 7. 2074.
- Gustafsson, J. P., Johnsson, L. 1994. The association between selenium and humic substances in forested ecosystems – Laboratory evidence. *Applied Organometallic Chemistry*. 8. 141-147.
- Hagarová, I., Žemberyová, M., Bajčan, D. 2005. Sequential and single step extraction procedures used for fractionation of selenium in soil samples. *Chemical Papers*. 59 (2). 93-98.
- Hajiboland, R., Sadeghzade, N. 2014. Effect of selenium on CO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation under low and adequate nitrogen supply in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*. 52 (4). 501-510.
- Hart, D. J., Fairweather-Tait, S. J., Broadley, M. R., Dickinson, S. J., Foot, I., Knott, P., McGrath, S. P., Mowat, H., Norman, K., Scott, P. R., Stroud, J. L., Tucker, M., White, P. J., Zhao, F. J., Hurst, R. 2011. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*. 126. 1771-1778.
- Hartikainen, H. 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18. 309-318.
- Hass, A., Fine, P. 2010. Sequential selective extraction procedures for the study of heavy metals in soils, sediments, and waste materials – a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 40 (5). 365-399.
- Haudin, C. S., Renault, P., Hallaire, V., Leclerc-Cessac, E., Staunton, S. 2007. Effect of aeration on mobility of selenium in columns of aggregated soil as influenced by straw amendment and tomato plant growth. *Geoderma*. 141. 98-110.
- Haug, A., Graham, R. D., Christophersen, O. A., Lyons, G. H. 2007. How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 19. 209-228.

- Hawkesford, M. J., De Kok, L. J. 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment*. 29. 382-395.
- Hawkesford, M. J., Zhao, F.-J. 2007. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*. 46. 282-292.
- He, Z., Yang, X., Zhu, Z., Zhang, Q., Xia, W., Tan, J. 1994. Effect of phosphate on the sorption, desorption and plant-availability of selenium in soil. *Fertilizer Research*. 39. 189-197.
- Hefnawy, A. E. G., Tórtora-Pérez, J. L. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Research*. 89. 185-192.
- Hinz, C. 2001. Description of sorption data with isotherm equations. *Geoderma*. 99. 225-243.
- Hopper, J. L., Parker, D. R. 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil*. 210. 199-207.
- Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttikay-Nedecky, B., Malevu, T. D., Sochor, J., Baron, M., Melcova, M., Zidkova, J., Kizek, R. 2017. A summary of new findings on the biological effects of selenium in selected animal species – A critical review. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (10). 2209.
- Hu, Z., Hu, S., Gao, S., Liu, Y., Lin, S. 2004. Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. *Spectrochimica Acta Part B*. 59. 1463-1470.
- Huang, Y.-Z., Hu, Y., Liu, Y.-X. 2007. Interactions between sulfur and selenium uptake by corn in solution culture. *Journal of Plant Nutrition*. 31 (1). 43-54.
- Institute of Medicine US. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. National Academies Press (US). Washington (DC). ISBN: 0-309-06949-1.
- Jablonska, E., Vinceti, M. 2015. Selenium and human health: Witnessing a Copernican revolution? *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 33 (3). 328-368.
- Jackson, B. P., Liba, A., Nelson, J. 2015. Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 30. 1179-1183.
- Jang, M., Pak, S., Kim, M.-J. 2015. Comparison of adsorption characteristics of Se(IV) and Se(VI) onto hematite: effects of reaction time, initial concentration, pH, and ionic strength. *Environmental Earth Sciences*. 74. 1169-1173.
- Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S. 1992. Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry. Chapman and Hall. New York. p. 380. ISBN: 0412025019.
- Jayaweera, G. R., Biggar, J. W. 1996. Role of redox potential in chemical transformations of selenium in soils. *Soil Science Society of America Journal*. 60. 1056-1063.
- Jiang, Y., Feng, X., Yang, Y., Qi, X., Ren, Y., Gao, Y., Liu, W., Hu, Y., Zeng, Z. 2018. Performance of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) supplied with selenite or selenate for selenium biofortification in northeastern China. *The Crop Journal*. 6 (4). 386-393.
- Johnson, C. C., Fordyce, F. M., Rayman, M. P. 2010. Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69. 119-132.
- Johnson, C. C., Ge, X., Green, K. A., Liu, X. 2000. Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People's Republic of China. *Applied Geochemistry*. 15. 385-401.
- Johnsson, L. 1991. Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. *Plant and Soil*. 133. 57-64.
- Jones, G. D., Droz, B., Greve, P., Gottschalk, P., Poffet, D., McGrath, S. P., Seneviratne, S. I., Smith, P., Winkel, L. H. E. 2017. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114 (11). 2848-2853.
- Kang, Y., Yamada, H., Kyuma, K., Hattori, T., Kigasawa, S. 1991. Selenium in soil humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition*. 37 (2). 241-248.

- Kápolna, E., Hillestrøm, P. R., Laursen, K. H., Husted, S., Larsen, E. H. 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chemistry*. 115. 1357-1363.
- Kápolna, E., Laursen, K. H., Husted, S., Larsen, E. H. 2012. Bio-fortification and isotopic labelling of Se metabolites in onions and carrots following foliar application of Se and <sup>77</sup>Se. *Food Chemistry*. 133. 650-657.
- Kaur, N., Sharma, S., Kaur, S., Nayyar, H. 2014. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Archives of Agronomy and Soil Science*. 60 (12). 1593-1624.
- Kausch, M., Ng, P., Ha, J., Pallud, C. 2012. Soil-aggregate-scale heterogeneity in microbial selenium reduction. *Vadose Zone Journal*. 11 (2).
- Kausch, M. F., Pallud, C. E. 2013. Modeling the impact of soil aggregate size on selenium immobilization. *Biogeosciences*. 10. 1323-1336.
- Kenward, P. A., Fowle, D. A., Yee, N. 2006. Microbial selenate sorption and reduction in nutrient limited systems. *Environmental Science & Technology*. 40 (12). 3782-3786.
- Keskinen, R., Ekholm, P., Yli-Halla, M., Hartikainen, H. 2009. Efficiency of different methods in extracting selenium from agricultural soils of Finland. *Geoderma*. 153. 87-93.
- Keskinen, R., Rätty, M., Yli-Halla, M. 2011. Selenium fractions in selenate-fertilized field soils of Finland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 91. 17-29.
- Keskinen, R., Turakainen, M., Hartikainen, H. 2010. Plant availability of soil selenate additions and selenium distribution within wheat and ryegrass. *Plant and Soil*. 333. 301-313.
- Keskinen, R., Yli-Halla, M., Hartikainen, H. 2013. Retention and uptake by plants of added selenium in peat soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 44 (22). 3465-3482.
- Kikkert, J., Berkelaar, E. 2013. Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 65. 458-465.
- Kikkert, J., Hale, B., Berkelaar, E. 2013. Selenium accumulation in durum wheat and spring canola as a function of amending soils with selenite, selenate and or sulphate. *Plant and Soil*. 372. 629-641.
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. 2003. Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16 (3). 435-444.
- Kim, Y.-S., Kawaguchi, H., Tanaka, T., Mizuike, A. 1990. Non-spectroscopic matrix interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta*. 45B (3). 333-339.
- Kleckner, A. E., Kakouros, E., Stewart, A. R. 2017. A practical method for the determination of total selenium in environmental samples using isotope dilution-hydride generation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Limnology and Oceanography: Methods*. 15 (4). 363-371.
- Klognerová, K., Vosmanská, M., Száková, J., Mestek, O. 2015. Vliv pěstebních podmínek na speciaci selenu v tkáních řepky olejky. *Chemické Listy*. 109. 216-222.
- Koplík, R., Čurdová, E., Mestek, O. 1997. Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. *Chemické listy*. 91. 38-47.
- Kovačević, M., Goessler, W. 2005. Direct introduction of volatile carbon compounds into the spray chamber of an inductively coupled plasma mass spectrometer: Sensitivity enhancement for selenium. *Spectrochimica Acta Part B*. 60. 1357-1362.
- Kuria, A., Fang, X., Li, M., Han, H., He, J., Aaseth, J. O., Cao, Y. 2020. Does dietary intake of selenium protect against cancer? A systematic review and meta-analysis of population-based prospective studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60 (4). 684-694.
- Kvíčala, J., Zamrazil, V., Čeřovská, J., Bednář, J., Janda, J. 1995. Evaluation of selenium supply and status of inhabitants in three selected rural and urban regions of the Czech Republic. *Biological Trace Element Research*. 47. 365-375.
- Kvíčala, J., Zamrazil, V., Nemeček, J., Jiranek, J. 2008. Selenium status of South Bohemia seniors characterized by INAA of blood serum. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 278 (3). 537-541.
- Lacatusu, R., Lungu, M., Burileanu, M. M. S., Kurtinecz, P., Lazar, R., Rizea, N., Stroe, V. M. 2013. Influence of long term liming and fertilization on the total and mobile selenium content in an albic luvisol. *Romanian Agricultural Research*. 30. 233-240.

- Lam, J. W. H., Sturgeon, R. E., McLaren, J. W. 1999. Ultra-trace determination of Se in sediments by electrothermal vaporizer-inductively coupled plasma-mass spectroscopy: use of the ETV as a thermochemical reactor. *Spectrochimica Acta Part B*. 54. 443-453.
- Lara, T. S., Lessa, J. H. L., de Souza, K. R. D., Corguinha, A. P. B., Martins, F. A. D., Lopes, G., Guilherme, L. R. G. 2019. Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. *Journal of Food Composition and Analysis*. 81. 10-18.
- Lee, G.-J., Kang, B.-K., Kim, T.-I., Kim, T.-J, Kim, J.-H. 2007. Effects of different selenium concentrations of the nutrient solution on the growth and quality of tomato fruit in hydroponics. *Acta Horticulturae*. 761. 443-448.
- Lee, S., Woodard, H. J., Doolittle, J. J. 2011. Effect of phosphate and sulfate fertilizers on selenium uptake by wheat (*Triticum aestivum*). *Soil Science and Plant Nutrition*. 57 (5). 696-704.
- Lefèvre, G., Fédoroff, M. 2006. Sorption of sulfate ions onto hematite studied by attenuated total reflection-infrared spectroscopy: Kinetics and competition with other ions. *Physics and Chemistry of the Earth*. 31. 499-504.
- Lenz, M., Lens, P. N. L. 2009. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment*. 407. 3620-3633.
- Lessa, J. H. L., Araujo, A. M., Silva, G. N. T., Guilherme, L. R. G., Lopes, G. 2016. Adsorption-desorption reactions of selenium (VI) in tropical cultivated and uncultivated soils under Cerrado biome. *Chemosphere*. 164. 271-277.
- Li, H.-F., McGrath, S. P., Zhao, F.-J. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*. 178. 92-102.
- Li, J., Peng, Q., Liang, D., Liang, S., Chen, J., Sun, H., Li, S., Lei, P. 2016. Effects of aging on the fraction distribution and bioavailability of selenium in three different soils. *Chemosphere*. 144. 2351-2359.
- Lidon, F. C., Oliveira, K., Ribeiro, M. M., Pelica, J., Pataco, I., Ramalho, J. C., Leitao, A. E., Almeida, A. S., Campos, P. S., Ribeiro-Barros, A. I., Pais, I. S., Silva, M. M., Pessoa, M. F., Reboredo, F. H. 2018. Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. *Journal of Cereal Science*. 81. 22-29.
- Ligowe, I. S., Young, S. D., Ander, E. L., Kabambe, V., Chilimba, A. D. C., Bailey, E. H., Lark, R. M., Nalivata, P. C. 2020. Agronomic biofortification of leafy vegetables grown in an Oxisol, Alfisol and Vertisol with isotopically labelled selenium (<sup>77</sup>Se). *Geoderma*. 361. 114106.
- Lindblow-Kull, C., Kull, F.J., Shrift, A. 1985. Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 163 (3). 1267-1269.
- Liu, H., Shi, Z., Li, J., Zhao, P., Qin, S., Nie, Z. 2018. The impact of phosphorus supply on selenium uptake during hydroponics experiment of winter wheat (*Triticum aestivum*) in China. *Frontiers in Plant Science*. 9. 373.
- Liu, Q., Wang, D. J., Jiang, X. J., Cao, Z. H. 2004. Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza Sativa*). *Environmental Geochemistry and Health*. 26. 325-330.
- Liu, X., Yang, Y., Deng, X., Li, M., Zhang, W., Zhao, Z. 2017. Effects of sulfur and sulfate on selenium uptake and quality of seeds in rapeseed (*Brassica napus* L.) treated with selenite and selenate. *Environmental and Experimental Botany*. 135. 13-20.
- Liu, X., Zhao, Z., Hu, C., Zhao, X., Guo, Z. 2016. Effect of sulphate on selenium uptake and translocation in rape (*Brassica napus* L.) supplied with selenate or selenite. *Plant and Soil*. 399. 295-304.
- Loffredo, N., Mounier, S., Thiry, Y., Coppin, F. 2011. Sorption of selenate on soils and pure phases: kinetic parameters and stabilisation. *Journal of Environmental Radioactivity*. 102. 843-851.
- Lopes, G., Ávila, F. W., Guilherme, L. R. G. 2017. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. *Ciência e Agrotecnologia*. 41 (6). 605-615.
- Lyons, G. H., Genc, Y., Soole, K., Stangoulis, J. C. R., Liu, F., Graham, R. D. 2009. Selenium increases seed production in Brassica. *Plant and Soil*. 318. 73-80.

- Lyons, G. H., Judson, G. J., Ortiz-Monasterio, I., Genc, Y., Stangoulis, J. C. R., Graham, R. D. 2005. Selenium in Australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19. 75-82.
- Lyons, G. H., Lewis, J., Lorimer, M. F., Holloway, R. E., Brace, D. M., Stangoulis, J. C. R., Graham, R. D. 2004. High-selenium wheat: Agronomic biofortification strategies to improve human nutrition. *Agriculture and Environment*. 22 (1). 171-178.
- Lyons, M. P., Papazyan, T. T., Surai, P. F. 2007. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20 (7). 1135-1155.
- Lyons, G., Stangoulis, J., Graham, R. 2003. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews*. 16. 45–60.
- Malagoli, M., Schiavon, M., dall'Acqua, S., Pilon-Smits, E. A. H. 2015. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*. 6. 280.
- Malorgio, F., Diaz, K. E., Ferrante, A., Mensuali-Sodi, A., Pezzarossa, B. 2009. Effects of selenium addition on minimally processed leafy vegetables grown in a floating system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89. 2243-2251.
- Mariet, C., Carrot, F., Moskura, M. 2011. Effect of sample matrix on radial and axial profiles of ion abundance in inductively coupled plasma mass spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2. 739-751.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press. London. p. 889. ISBN: 9780080571874.
- Martens, D. A., Suarez, D. L. 1997. Selenium speciation of soil/sediment determined with sequential extractions and hydride generation atomic absorption spectrophotometry. *Environmental Science & Technology*. 31 (1). 133-139.
- Martin, D. P., Seiter, J. M., Lafferty, B. J., Bednar, A. J. 2017. Exploring the ability of cations to facilitate binding between inorganic oxyanions and humic acid. *Chemosphere*. 166, 192-196.
- Mathers, A. W., Young, S. D., McGrath, S. P., Zhao, F. J., Crout, N. M. J., Bailey, E. H. 2017. Determining the fate of selenium in wheat biofortification: an isotopically labelled field trial study. *Plant and Soil*. 420. 61-77.
- Matich, A. J., McKenzie, M. J., Lill, R. E., Brummell, D. A., McGhie, T. K., Chen, R. K.-Y., Rowan, D. D. 2012. Selenoglucosinolates and their metabolites produced in Brassica spp. fertilised with sodium selenate. *Phytochemistry*. 75. 140-152.
- May, T. W., Wiedmeyer, R. H. 1998. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*. 19 (5). 150-155.
- McCurdy, E. J., Lange, J. D., Haygarth, P. M. 1993. The determination of selenium in sediments using hydride generation ICP-MS. *The Science of the Total Environment*. 135. 131-136.
- McGregor, A. L., Johnson-Maynard, J. L., Strawn, D. G., Shafii, B., Möller, G. 2008. Plant uptake and leaching of selenium in manure- and gypsum-amended soils of the western phosphate resource area. *Soil Science*. 173 (9). 613-623.
- Mikkelsen, R. L., Wan, H. F. 1990. The effect of selenium on sulfur uptake by barley and rice. *Plant and Soil*. 121. 151-153.
- Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., Scampicchio, M., Pii, Y., Cesco, S. 2017. Selenium biofortification in *Fragaria* × *ananassa*: Implications on Strawberry fruits quality, content of bioactive health beneficial compounds and metabolomic profile. *Frontiers in Plant Science*. 8. 1887.
- Moellmer, W. O., Miller, T. G., Wilbur, S., Soffey, E. 2007. ICP-MS analysis of trace selenium in the Great Salt Lake. *Spectroscopy*. 22 (1). 32-37.
- Mora, M. L., Durán, P., Acuña, A. J., Cartes, P., Demanet, R., Gianfreda, L. 2015. Improving selenium status in plant nutrition and quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15 (2). 486-503.



- Munier-Lamy, C., Deneux-Mustin, S., Mustin, C., Merlet, D., Berthelin, J., Leyval, C. 2007. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. *Journal of Environmental Radioactivity*. 97. 148-158.
- Myneni, S. C. B., Tokunaga, T. K., Brown, G. E. 1997. Abiotic selenium redox transformations in the presence of Fe(II, III) oxides. *Science*. 278. 1106-1109.
- Nakamaru, Y. M., Altansuvd, J. 2014. Speciation and bioavailability of selenium and antimony in non-flooded and wetland soils: A review. *Chemosphere*. 111. 366-371.
- Nakamaru, Y. M., Sekine, K. 2008. Sorption behavior of selenium and antimony in soils as a function of phosphate ion concentration. *Soil Science and Plant Nutrition*. 54. 332-341.
- Nakamaru, Y., Tagami, K., Uchida, S. 2006. Effect of phosphate addition on the sorption-desorption reaction of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere*. 63. 109-115.
- Natasha, Shahid, M., Niazi, N. K., Khalid, S., Murtaza, B., Bibi, I., Rashid, M. I. 2018. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environmental Pollution*. 234. 915-934.
- National Health and Medical Research Council. 2006. Nutrient reference values for Australia and New Zealand. National Health and Medical Research Council. Canberra. p. 309. ISBN: 1864962437.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*. 400. 115-141.
- Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R., Waraich, E. A., Shabbir, R. N., Hussain, R. A. 2017. Selenium supply methods and time of application influence spring wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and water deficit conditions. *Journal of Agricultural Science*. 155 (4). 643-656.
- Newman, R., Waterland, N., Moon, Y., Tou, J. C. 2019. Selenium biofortification of agricultural crops and effects on plant nutrients and bioactive compounds important for human health and disease prevention – a review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 74. 449-460.
- Nezami, M. T., Bybordi, A. 2012. The effects of different amounts of selenium yield and yield components of two canola cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 10 (2). 603-606.
- Ngigi, P. B., Lachat, C., Masinde, P. W., Laying, G. D. 2019. Agronomic biofortification of maize and beans in Kenya through selenium fertilization. *Environmental Geochemistry and Health*. 41. 2577-2591.
- Nie, Z., Zhu, J., Li, J., Liu, H., Zhao, P., Gao, W., Qin, S., Li, C., Zhang, W., Sui, F. 2020. Phosphorus application alters concentration and proportions of organic Se forms in the grain of winter wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 173. 337-344.
- Øgaard, A. F., Sogn, T. S., Eich-Greatorex, S. 2006. Effect of cattle manure on selenate and selenite retention in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 76. 39-48.
- Ochsenkühn-Petropoulou, M., Michalke, B., Kavouras, D., Schramel, P. 2003. Selenium speciation analysis in a sediment using strong anion exchange and reversed phase chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 478. 219-227.
- Olesik, J. W., Gray, P. J. 2014. Advantages of N<sub>2</sub> and Ar as reaction gases for measurement of multiple Se isotopes using inductively coupled plasma-mass spectrometry with a collision/reaction cell. *Spectrochimica Acta Part B*. 100. 197-210.
- Oram, L. L., Strawn, D. G., Möller, G. 2011. Chemical speciation and bioavailability of selenium in the rhizosphere of *Symphyotrichum aetonii* from reclaimed mine soils. *Environmental Science & Technology*. 45. 870-875.
- Pappa, E. C., Pappas, A. C., Surai, P. F. 2006. Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Science of the Total Environment*. 372. 100-108.
- Parmar, S., Buchner, P., Hawkesford, M. J. 2007. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology*. 9. 647-653.

- Peak, D., Saha, U. K., Huang, P. M. 2006. Selenite adsorption mechanism on pure and coated montmorillonite: An EXAFS and XANES spectroscopic study. *Soil Science Society of America Journal*. 70. 192-203.
- Peak, D., Sparks, D. L. 2002. Mechanisms of Selenate Adsorption on Iron Oxides and Hydroxides. *Environmental Science & Technology*. 36 (7). 1460-1466.
- Pedrero, Z., Madrid, Y. 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*. 634. 135-152.
- Peitzsch, M., Kremer, D., Kersten, M. 2010. Microfungal alkylation and volatilization of selenium adsorbed by goethite. *Environmental Science & Technology*. 44 (1). 129-135.
- Peng, Q., Guo, L., Ali, F., Li, J., Qin, S., Feng, P., Liang, D. 2016. Influence of Pak choi plant cultivation on Se distribution, speciation and bioavailability in soil. *Plant and Soil*. 403. 331-342.
- Peng, Q., Li, J., Wang, D., Wei, T.-J., Chen, C.-L., Liang, D.-L. 2019. Effects of ageing on bioavailability of selenium in soils assessed by diffusive gradients in thin-films and sequential extraction. *Plant and Soil*. 436. 159-171.
- Peng, Q., Wang, D., Wang, M., Zhou, F., Yang, W., Liu Y., Liang, D. 2020. Prediction of selenium uptake by pak choi in several agricultural soils based on diffusive gradients in thin-films technique and single extraction. *Environmental Pollution*. 256. 113414.
- Pezzarossa, B., Piccotino, D., Petruzzelli, G. 1999. Sorption and desorption of selenium in different soils of the mediterranean area. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 30 (19-20). 2669-2679.
- Pickering, I. J., Brown, G. E., Tokunaga, T. K. 1995. Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science & Technology*. 29 (9). 2456-2459.
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*. 12. 267-274.
- Poblaciones, M. J., Rodrigo, S., Santamaría, O., Chen, Y., McGrath, S. P. 2014. Agronomic selenium biofortification in *Triticum durum* under Mediterranean conditions: From grain to cooked pasta. *Food Chemistry*. 146. 378-384.
- Poggi, V., Arcioni, A., Filippini, P., Pifferi, P. G. 2000. Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): Effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48. 4749-4751.
- Polatajko, A., Jakubowski, N., Szpunar, J. 2006. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 21. 639-654.
- Poniedziałek, B., Mleczek, M., Niedzielski, P., Siwulski, M., Gasecka, M., Kozak, L., Komosa, A., Rzymiski, P. 2017. Bio-enriched Pleurotus mushrooms for deficiency control and improved antioxidative protection of human platelets? *European Food Research and Technology*. 243 (12). 2187-2198.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., Pezzarossa, B. 2017a. Selenium enrichment of horticultural crops. *Molecules*. 22. 933.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., Rosellini, I., Pezzarossa, B. 2017b. Uptake and partitioning of selenium in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants grown in hydroponics. *Scientia Horticulturae*. 225. 271-276.
- Pyrzyska, K. 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chemistry*. 114. 1183-1191.
- Qin, H.-B., Zhu, J.-M., Lin, Z.-Q., Xu, W.-P., Tan, D.-C., Zheng, L.-R., Takahashi, Y. 2017. Selenium speciation in seleniferous agricultural soils under different cropping systems using sequential extraction and X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Pollution*. 225. 361-369.
- Qin, H., Zhu, J., Su, H. 2012. Selenium fractions in organic matter from Se-rich soils weathered stone coal in selenosis areas of China. *Chemosphere*. 86. 626-633.
- Ramkissoon, C., Degryse, F., da Silva, R. C., Baird, R., Young, S. D., Bailey, E. H., McLaughlin, M. J. 2019. Improving the efficacy of selenium fertilizers for wheat biofortification. *Scientific Reports*. 9. 19520.

- Rayman, M. P. 2002. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61. 203-215.
- Rayman, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet*. 379. 1256-1268.
- Reeder, R. J., Lamble, G. M., Lee, J.-F., Staudt, W. J. 1994. Mechanism of  $\text{SeO}_4^{2-}$  substitution in calcite: An EXAFS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 58 (24). 5639-5646.
- Renkema, H., Koopmans, A., Kersbergen, L., Kikkert, J., Hale, B., Berkelaar, E. 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant and Soil*. 354. 239-250.
- Rimmer, D. L., Shiel, R. S., Syers, J. K. 1990. Effects of soil application of selenium on pasture composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 51. 407-410.
- Roca-Perez, L., Gil, C., Cervera, M. L., González, A., Ramos-Miras, J., Pons, V., Bech, J., Boluda, R. 2010. Selenium and heavy metals content in some Mediterranean soils. *Journal of Geochemical Exploration*. 107. 110-116.
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C. 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 6. 25-54.
- Ros, G. H., van Rotterdam, A. M. D., Bussink, D. W., Bindraban, P. S. 2016. Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: an agro-ecosystem approach. *Plant and Soil*. 404. 99-112.
- Ruszczynska, A., Konopka, A., Kurek, E., Elguera, J. C. T., Bulska, E. 2017. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods. *Spectrochimica Acta B*. 130. 7-16.
- Saada, A., Breeze, D., Crouzet, C., Cornu, S., Baranger, P. 2003. Adsorption of arsenic (V) on kaolinite and on kaolinite-humic acid complexes. Role of humic acid nitrogen groups. *Chemosphere*. 51. 757-763.
- Santiago, F. E. M., Silva, M. L. S., Ribeiro, F. O., Cipriano, P. E., Guilherme, L. R. G. 2018. Influence of sulfur on selenium absorption in strawberry. *Acta Scientiarum Agronomy*. 40 (1). 35780.
- Sari, Y. W., Bruins, M. E., Sanders, J. P. M. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*. 43. 78-83.
- Sastre, J., Rauret, G., Vidal, M. 2006. Effect of the cationic composition of sorption solution on the quantification of sorption-desorption parameters of heavy metals in soils. *Environmental Pollution*. 140. 322-339.
- Séby, F., Gautier, M. P., Lespés, G., Astruc, M. 1997. Selenium speciation in soils after alkaline extraction. *The Science of the Total Environment*. 207. 81-90.
- Séby, F., Potin-Gautier, M., Giffaut, E., Borge, G., Donard, O. F. X. 2001. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25°C. *Chemical Geology*. 171. 173-194.
- Seppänen, M. M., Kontturi, J., Lopez-Heras, I., Madrid, Y., Cámara, C., Hartikainen, H. 2010. Agronomic biofortification of Brassica with selenium-enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal. *Plant and Soil*. 337. 273-283.
- Shaheen, S. M., Tsadilas, C. D., Rinklebe, J. 2013. A review of the distribution coefficients of trace elements in soils: Influence of sorption system, element characteristics, and soil colloidal properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 201-202. 43-56.
- Sharma, S., Bansal, A., Dhillon, S. K., Dhillon, K. S. 2010. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*. 329. 339-348.
- Sharma, S., Bansal, A., Dogra, R., Dhillon, S. K., Dhillon, K. S. 2011. Effect of organic amendments on uptake of selenium and biochemical grain composition of wheat and rape grown on seleniferous soils in northwestern India. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 174. 269-275.
- Sharma, V. K., McDonald, T. J., Sohn, M., Anquandah, G. A. K., Pettine, M., Zboril, R. 2014. Biogeochemistry of selenium. A review. *Environmental Chemistry Letters*. 13 (1). 49-58.
- Sharmasarkar, S., Vance, G. F. 1995. Fractional partitioning for assessing solid-phase speciation and geochemical transformations of soil selenium. *Soil Science*. 160 (1). 43-55.

- Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J. L., Parmar, S., Zhao, F.-J., McGrath, S. P., Hawkesford, M. J. 2010. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiology*. 153. 327-336.
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H. 2017. The fascinating facets of plant selenium accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytologist*. 213. 1582–1596.
- Schiavon, M., Pilon, M., Malagoli, M., Pilon-Smits, E. A. H. 2015. Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation – a comparison of *Stanleya pinnata* and *Brassica juncea* (*Brassicaceae*). *Frontiers in Plant Science*. 6. 2.
- Schilling, K., Johnson, T. M., Wilcke, W. 2013. Isotope fractionation of selenium by biomethylation in microcosm incubations of soil. *Chemical Geology*. 352. 101-107.
- Schnug, E., Haneklaus, S. 2005. Sulphur deficiency symptoms in oilseed rape (*Brassica napus* L.) – the aesthetics of starvation. *Phyton*. 45 (3). 79-95.
- Schrauzer, G. N., Surai, P. F. 2009. Selenium in human and animal nutrition: Resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of Klaus Schwarz (1914-1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29 (1). 2-9.
- Schwarz, K., Foltz, C. M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*. 79 (12). 3292-3293.
- Silva, V. M., Boleta, E. H. M., Martins, J. T., dos Santos, F. L. M., Silva, A. C. R., Alcock, T. D., Wilson, L., de Sá, M. E., Young, S. D., Broadley, M. R., White, P. J., dos Reis, A. R. 2019. Agronomic biofortification of cowpea with selenium: effects of selenate and selenite applications on selenium and phytate concentrations in seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99. 5969-5983.
- Smažiková, P., Praus, L., Száková, J., Tremlová, J., Hanč, A., Tlustoš, P. 2019. The effect of organic matter rich amendments on selenium mobility in soil. *Pedosphere*. 29 (6). 740-751.
- Smith, M. I., Franke, K. W., Westfall, B. B. 1936. The selenium problem in relation to public health: A preliminary survey to determine the possibility of selenium intoxication in the rural population living on seleniferous soil. *Public Health Reports (1896-1970)*. 51 (44). 1496-1505.
- Söderlund, M., Virkanen, J., Holgersson, S., Lehto, J. 2016. Sorption and speciation of selenium in boreal forest soil. *Journal of Environmental Radioactivity*. 164. 220-231.
- Sors, T. G., Ellis, D. R., Salt, D. E. 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*. 86. 373–389.
- Stadlober, M., Sager, M., Irgolic, K. J. 2001. Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals – identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry*. 73. 357-366.
- Stavridou, E., Thorup-Kristensen, K., Young, S. D. 2011. Assessment of selenium mineralization and availability from catch crops. *Soil Use and Management*. 27. 305-311.
- Stroud, J. L., Broadley, M. R., Foot, I., Fairweather-Tait, S. J., Hart, D. J., Hurst, R., Knott, P., Mowat, H., Norman, K., Scott, P., Tucker, M., White, P. J., McGrath, S. P., Zhao, F. J. 2010a. Soil factors affecting selenium concentrations in wheat grain and the fate and speciation of Se fertilisers applied to soil. *Plant and Soil*. 332. 19-30.
- Stroud, J. L., Li, H. F., Lopez-Bellido, F. J., Broadley, M. R., Foot, I., Fairweather-Tait, S. J., Hart, D. J., Hurst, R., Knott, P., Mowat, H., Norman, K., Scott, P., Tucker, M., White, P. J., McGrath, S. P., Zhao, F. J. 2010b. Impact of sulphur fertilisation on crop response to selenium fertilisation. *Plant and Soil*. 332. 31-40.
- Stroud, J. L., McGrath, S. P., Zhao, F.-J. 2012. Selenium speciation in soil extracts using LC-ICP-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 92 (2). 222-236.
- Sucharová, J. 2011. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 26. 1756-1762.
- Sun, G.-X., Meharg, A. A., Li, G., Chen, Z., Yang, L., Chen, S.-C., Zhu, Y.-G. 2016. Distribution of soil selenium in China is potentially controlled by deposition and volatilization? *Scientific Reports*. 6. 20953.

- Supriatin, S., Weng, L., Comans, R. N. J. 2015. Selenium speciation and extractability in Dutch agricultural soils. *Science of the total environment*. 532. 368-382.
- Supriatin, S., Weng, L., Comans, R. N. J. 2016. Selenium-rich dissolved organic matter determines selenium uptake in wheat grown on low-selenium arable land soils. *Plant and Soil*. 408. 73-94.
- Šindelářová, K., Száková, J., Tremlová, J., Mestek, O., Praus, L., Kaňa, A., Najmanová, J., Tlustoš, P. 2015. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 32 (12). 2027-2038.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R. 2011. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology*. 62. 157-184.
- Tan, S. H., Horlick, G. 1987. Matrix-effect observations in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2. 745-763.
- Terry, N., Zayed, A. M., de Souza, M. P., Tarun, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51. 401-432.
- Thavarajah, D., Thavarajah, P., Vial, E., Gebhardt, M., Lacher, C., Kumar, S., Combs, G. F. 2015. Will selenium increase lentil (*Lens culinaris* Medik) yield and seed quality? *Frontiers in Plant Science*. 6. 356.
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.-J., Pussemier, L. 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*. 130. 767-784.
- Thomke, S. 1981. Review of rapeseed meal in animal nutrition: ruminant animals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 58. 805-810.
- Thomson, C. D. 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 58. 391-402.
- Tian, W., Wang, L., Li, A., Zhuang, K., Li, G., Zhang, J., Xiao, X., Xi, Y. 2015. Responses of microbial activity, abundance, and community in wheat soil after three years of heavy fertilization with manure-based compost and inorganic nitrogen. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 213. 219-227.
- Tolu, J., Di Tullio, P., Le Hécho, I., Thiry, Y., Pannier, F., Potin-Gautier, M., Bueno, M. 2014b. A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long-term selenium mobility in soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406. 1221-1231.
- Tolu, J., Le Hécho, I., Bueno, M., Thiry, Y., Potin-Gautier, M. 2011. Selenium speciation analysis at trace level in soils. *Analytica Chimica Acta*. 684. 126-133.
- Tolu, J., Thiry, Y., Bueno, M., Jolivet, C., Potin-Gautier, M., Le Hécho, I. 2014a. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils, from mineral to organic rich. *Science of the total environment*. 479-480. 93-101.
- Tomasi, N., Pinton, R., Gottardi, S., Mimmo, T., Scampicchio, M., Cesco, S. 2015. Selenium fortification of hydroponically grown corn salad (*Valerianella locusta*). *Crop & Pasture Science*. 66. 1128-1136.
- Tremblay, G., Bélanger, G., Lajeunesse, J., Chouinard, P. Y., Charbonneau, É. 2015. Timothy response to increasing rates of selenium fertilizer in Eastern Canada. *Agronomy Journal*. 107 (1). 211-220.
- Turakainen, M., Hartikainen, H., Seppänen, M. M. 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 5378-5382.
- Tyler, G. 2004. Rare earth elements in soil and plant systems – A review. *Plant and Soil*. 267. 191-206.
- Uden, P. C., Boakye, H. T., Kahakachchi, C., Tyson, J. F. 2004. Selective detection and identification of Se containing compounds-review and recent developments. *Journal of Chromatography A*. 1050. 85-93.
- ÚKZÚZ. 2010. Obsah selenu (Se) v zemědělských půdách ČR. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Brno. Dostupný také z: <<http://www.eagri.cz/public/web/mze>>.



- Ulhassan, Z., Gill, R. A., Ali, S., Mwamba, T. M., Ali, B., Wang, J., Huang, Q., Aziz, R., Zhou, W. 2019. Dual behavior of selenium: Insights into physio-biochemical, anatomical and molecular analyses of four *Brassica napus* cultivars. *Chemosphere*. 225. 329-341.
- Ullah, H., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M. U., Irshad, S., Abbas, Q., Ahmad, R. 2019. A comprehensive review on environmental transformation of selenium: recent advances and research perspectives. *Environmental Geochemistry and Health*. 41. 1003-1035.
- Van Hoewyk, D. 2013. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Annals of Botany*. 112. 965–972.
- Vuori, E., Vääriskoski, J., Hartikainen, H., Kumpulainen, J., Aarnio, T., Niinivaara, K. 1994. A long-term study of selenate sorption in Finnish cultivated soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 48. 91-98.
- Wadgaonkar, S. L., Nancharaiyah, Y. V., Esposito, G., Lens, P. N. L. 2018. Environmental impact and bioremediation of seleniferous soils and sediments. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38 (6). 941-956.
- Wanasundara, J. P. D. 2011. Proteins of *Brassicaceae* oilseeds and their potential as a plant protein source. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51 (7). 635-677.
- Wang, M. C., Chen, H. M. 2003. Forms and distribution of selenium at different depths and among particle size fractions of three Taiwan soils. *Chemosphere*. 52. 585-593.
- Wang, M., Ali, F., Wang, M., Dinh, Q. T., Zhou, F., Bañuelos, G. S., Liang, D. 2020b. Understanding boosting selenium accumulation in Wheat (*Triticum aestivum* L.) following foliar selenium application at different stages, forms, and doses. *Environmental Science and Pollution Research*. 27 (1). 717-728.
- Wang, M., Cui, Z., Xue, M., Peng, Q., Zhou, F., Wang, D., Dinh, Q. T., Liu, Y., Liang, D. 2019a. Assessing the uptake of selenium from naturally enriched soils by maize (*Zea Mays* L.) using diffusive gradients in thin-films technique (DGT) and traditional extractions. *Science of the Total Environment*. 689. 1-9.
- Wang, D., Dinh, Q. T., Thu, T. T. A., Zhou, F., Yang, W., Wang, M., Song, W., Liang, D. 2018. Effect of selenium-enriched organic material amendment on selenium fraction transformation and bioavailability in soil. *Chemosphere*. 199, 417-426.
- Wang, S., Liang, D., Wang, D., Wei, W., Fu, D., Lin, Z. 2012. Selenium fractionation and speciation in agriculture soils and accumulation in corn (*Zea Mays* L.) under field conditions in Shaanxi Province, China. *Science of the Total Environment*. 427-428. 159-164.
- Wang, D., Peng, Q., Yang, W.-X., Dinh, Q. T., Tran, T. A. T., Zhao, X.-D., Wu, J.-T., Liu, Y.-X., Liang, D.-L. 2020a. DOM derivations determine the distribution and bioavailability of DOM-Se in selenate applied soil and mechanisms. *Environmental Pollution*. 259. 113899.
- Wang, D., Xue, M., Wang, Y., Zhou, D., Tang, L., Cao, S., Wei, Y., Yang, C., Liang, D.-L. 2019b. Effects of straw amendment on selenium aging in soils: Mechanism and influential factors. *Science of the Total Environment*. 657. 871-881.
- Wang, Q., Zhang, J., Zhao, B., Xin, X., Deng, X., Zhang, H. 2016. Influence of long-term fertilization on selenium accumulation in soil and uptake by crops. *Pedosphere*. 26 (1). 120-129.
- Wang, D., Zhou, F., Yang, W., Peng, Q., Man, N., Liang, D. 2017. Selenate redistribution during aging in different Chinese soils and the dominant influential factors. *Chemosphere*. 182. 284-292.
- Weng, L., Vega, F. A., Supriatin, S., Bussink, W., Van Riemsdijk, W. H. 2011. Speciation of Se and DOC in Soil Solution and their Relation to Se Bioavailability. *Environmental Science & Technology*. 45 (1). 262-267.
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., Spiby, R. E., Meacham, M. C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L. J., Smith, B. M., Thomas, B., Broadley, M. R. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 55 (404). 1927-1937.
- WHO/FAO. 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. World Health Organization. Geneva. p. 341. ISBN: 9241546123.

- Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M., Baldermann, S., Schwarz, D., Hanschen, F. S., Kipp, A. P., Rowan, D. D., Bentley-Hewitt, K. R., McKenzie, M. J. 2017. Mechanismus of selenium enrichment and measurement in Brassicaceous vegetables, and their application to human health. *Frontiers in Plant Science*. 8. 1365.
- Wijnja, H., Schulthess, C. P. 2000. Interaction of carbonate and organic anions with sulfate and selenate adsorption on an aluminum oxide. *Soil Science Society of America Journal*. 64 (3). 898-908.
- Winkel, L. H. E., Johnson, C. A., Lenz, M., Grundl, T., Leupin, O. X., Amini, M., Charlet, L. 2012. Environmental selenium research: From microscopic processes to global understanding. *Environmental Science & Technology*. 46 (2). 571-579.
- Winkel, L. H. E., Vriens, B., Jones, G. D., Schneider, L. S., Pilon-Smits, E., Bañuelos, G. S. 2015. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: A critical review. *Nutrients*. 7. 4199-4239.
- Wright, M. T., Parker, D. R., Amrhein, C. 2003. Critical evaluation of the ability of sequential extraction procedures to quantify discrete forms of selenium in sediments and soils. *Environmental Science & Technology*. 37 (20). 4709-4716.
- Wróbel, K., Wróbel, K., Kannamkumarath, S. S., Caruso, J. A., Wysocka, I. A., Bulska, E., Swiatek, J., Wierzbicka, M. 2004. HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves – a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chemistry*. 86. 617-623.
- Wu, Z., Bañuelos, G. S., Lin, Z.-Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Li, M. 2015. Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Frontiers in Plant Science*. 6. 136.
- Wu, C.-H., Lo, S.-L., Lin, C.-F. 2000. Competitive adsorption of molybdate, chromate, sulfate, selenate, and selenite on  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 166. 251-259.
- Xiao, K., Tang, J., Chen, H., Li, D., Liu, Y. 2020. Impact of land use/land cover change on the topsoil selenium concentration and its potential bioavailability in a karst area of southwest China. *Science of the Total Environment*. 708. 135201.
- Xing, K., Zhou, S., Wu, X., Zhu, Y., Kong, J., Shao, T., Toa, X. 2015. Concentrations and characteristics of selenium in soil samples from Dashan Region, a selenium-enriched area in China. *Soil Science and Plant Nutrition*. 61 (6). 889-897.
- Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*. 237. 55-61.
- Yamada, H., Hattori, T. 1989. Forms of soluble selenium in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*. 35 (4). 553-563.
- Yamani, J. S., Lounsbury, A. W., Zimmerman, J. B. 2014. Adsorption of selenite and selenate by nanocrystalline aluminum oxide, neat and impregnated in chitosan beads. *Water Research*. 50. 373-381.
- Yang, F., Chen, L., Hu, Q., Pan, G. 2003. Effect of the application of selenium on selenium content of soybean and its products. *Biological Trace Element Research*. 93. 249-256.
- Yang, J., Yu, F., Fu, Z., Fu, Y., Liu, S., Chen, M., Li, Y., Sun, Q., Chang, H., Zhou, W., Wang, X., Zhang, L. 2019. Pathway and driving forces of selenite absorption in wheat leaf blades. *Plant, Soil and Environment*. 65 (12). 609-614.
- Zawislanski, P. T., Zavarin, M. 1996. Nature and rates of selenium transformations: A laboratory study of Kesterson Reservoir soils. *Soil Science Society of America Journal*. 60. 791-800.
- Zayed, A., Lytle, C. M., Terry, N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*. 206 (2). 284-292.
- Zehr, J. P., Oremland, R. S. 1987. Reduction of selenate to selenide by sulfate-respiring bacteria: experiments with cell suspensions and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (6). 1365-1369.
- Zhang, Y., Frankenberger, W. T. 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality*. 28. 1321-1326.

- Zhang, Y., Frankenberger, W. T. 2000. Effect of moisture and casein on demethylation of trimethylselenonium in soil. *The Science of the Total Environment*. 257. 111-119.
- Zhang, Y., Gladyshev, V. N. 2009. Comparative genomics of trace elements: Emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical Reviews*. 109. 4828-4861.
- Zhang, Y., Moore, J. N. 1996. Selenium fractionation and speciation in a wetland system. *Environmental Science and Technology*. 30 (8). 2613-2619.
- Zhang, D., Dong, T., Ye, J., Hou, Z. 2017. Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by coapplication of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Science and Plant Nutrition*. 63 (1). 37-44.
- Zhang, M., Xing, G., Tang, S., Pang, Y., Yi, Q., Huang, Q., Huang, X., Huang J., Li, P., Fu, H. 2019a. Improving soil selenium availability as a strategy to promote selenium uptake by high-Se rice cultivar. *Environmental and Experimental Botany*. 163. 45-54.
- Zhang, H., Zhao, Z., Zhang, X., Zhang, W., Huang, L., Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X. 2019b. Effects of foliar application of selenate and selenite at different growth stages on selenium accumulation and speciation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*. 286. 550-556.
- Zhao, C., Ren, J., Xue, C., Lin, E. 2005. Study on the relationship between soil selenium and plant selenium uptake. *Plant and Soil*. 277. 197-206.
- Zhou, C., Yu, X., Qin, X., Ma, H., Yagoub, A. E. A., Hu, J. 2016. Hydrolysis of rapeseed meal protein under simulated duodenum digestion: Kinetic modelling and antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 68. 523-531.
- Zhu, Y.-G., Pilon-Smits, E. A. H., Zhao, F.-J., Williams, P. N., Meharg, A. A. 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*. 14 (8). 436-442.
- Zwolak, I., Zaporowska, H. 2012. Selenium interactions and toxicity: a review. *Cell Biology and Toxicology*. 28. 31-46.

## 8 PŘÍLOHY

### SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1.** Rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru pro rozlišení typických spektrálních interferencí při stanovení Se technikou ICPMS
- Příloha 2.** Extrahovatelný selen v  $50 \text{ mmol l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  z jednotlivých variant v závislosti na době inkubace půdy
- Příloha 3.** Frakcionace půdního Se stanovená metodou postupné extrakce

## PŘÍLOHA 1.

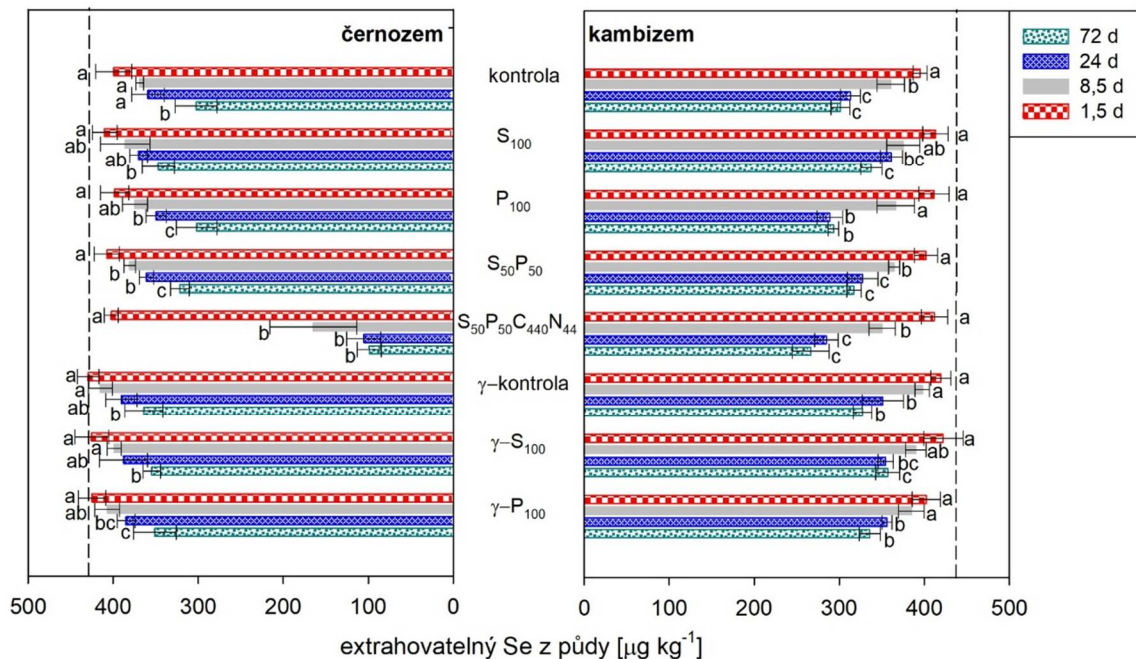
Rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru pro rozlišení typických spektrálních interferencí při stanovení Se technikou ICPMS<sup>a)</sup>

izotop	abundance [%]	potenciálně interferující specie <sup>a)</sup>	potřebná rozlišovací schopnost $m/\Delta m$ <sup>a)</sup>
<sup>74</sup> Se	0,89	<sup>36</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>+</sup>	9475
		<sup>37</sup> Cl <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup>	7922
		<sup>40</sup> Ar <sup>34</sup> S <sup>+</sup>	9511
		<sup>74</sup> Ge <sup>+</sup>	56938
<sup>76</sup> Se	9,37	<sup>38</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>+</sup>	12145
		<sup>40</sup> Ar <sup>36</sup> Ar <sup>+</sup>	7083
		<sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	3825
		<sup>40</sup> Ar <sup>36</sup> S <sup>+</sup>	7405
		<sup>76</sup> Ge <sup>+</sup>	34571
<sup>77</sup> Se	7,63	<sup>36</sup> Ar <sup>40</sup> Ca <sup>+</sup>	6947
		<sup>38</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	5749
		<sup>40</sup> Ar <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup>	9190
<sup>78</sup> Se	23,77	<sup>76</sup> Se <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	10797
		<sup>40</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>+</sup>	9970
		<sup>40</sup> Ar <sup>36</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	2755
		<sup>40</sup> Ar <sup>37</sup> Cl <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	4142
<sup>80</sup> Se	49,61	<sup>77</sup> Se <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	7471
		<sup>78</sup> Kr <sup>+</sup>	25192
		<sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup>	9688
		<sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ca <sup>+</sup>	9455
		<sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>14</sup> O <sup>+</sup>	1984
<sup>82</sup> Se	8,73	<sup>40</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	3297
		<sup>80</sup> Kr <sup>+</sup>	549254
		<sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	3455
		<sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2283
		<sup>66</sup> Zn <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	19316
		<sup>81</sup> Br <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	11055
		<sup>82</sup> Kr <sup>+</sup>	25393
hmotnostní analyzátor			rozlišovací schopnost $m/\Delta m$
kvadrupólový			~300
magnetický sektorový			~10000

<sup>a)</sup> Kompilace z Feldmann et al. (2000) a Elwaer a Hintelmann (2008)



## PŘÍLOHA 2.



Extrahovatelný selen v  $50 \text{ mmol l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  z jednotlivých variant v závislosti na době inkubace půdy. Různá písmena značí statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ) mezi extrahovatelnostmi Se stanovenými v dané půdě a dané variantě při různé době inkubace. Vertikální čárkované čáry znázorňují odhad množství Se extrahovatelného roztokem  $\text{HPO}_4^{2-}$  v dané půdě v čase  $t_0$ .

### PŘÍLOHA 3.

Frakcionace půdního Se stanovená metodou postupné extrakce podle Wright et al. (2003)

varianta n = 3	Se <sub>rozp</sub>	Se <sub>spec.ads</sub>	Se <sub>org</sub>	Se <sup>0</sup>	Se <sub>rezidual</sub>
μg kg <sup>-1</sup> v sušině ± σ					
černozem					
kontrola	206 ± 12	68 ± 4	287 ± 18	16 ± 3	168 ± 18
S <sub>100</sub>	271 ± 22	26 ± 2	216 ± 15	7 ± 1	182 ± 15
P <sub>100</sub>	132 ± 8	71 ± 8	263 ± 17	21 ± 1	186 ± 10
S <sub>50</sub> P <sub>50</sub> C <sub>440</sub> N <sub>44</sub>	20 ± 10	68 ± 7	289 ± 14	34 ± 2	172 ± 21
γ-kontrola	333 ± 28	30 ± 2	206 ± 21	0 ± 0	162 ± 13
γ-S <sub>100</sub> <sup>a)</sup>	293 ± 24	30 ± 3	182 ± 12	0 ± 0	166 ± 4
γ-P <sub>100</sub>	246 ± 2	26 ± 1	202 ± 9	0 ± 0	158 ± 16
nativní půda <sup>b)</sup>	11 ± 1	25 ± 0	157 ± 1	1 ± 1	162 ± 8
kambizem I					
kontrola	163 ± 19	73 ± 8	174 ± 10	12 ± 0	203 ± 12
S <sub>100</sub>	209 ± 3	63 ± 2	177 ± 1	10 ± 1	145 ± 14
P <sub>100</sub>	164 ± 11	55 ± 1	170 ± 14	16 ± 2	188 ± 7
S <sub>50</sub> P <sub>50</sub> C <sub>440</sub> N <sub>44</sub>	134 ± 16	45 ± 0	195 ± 17	21 ± 4	193 ± 25
γ- kontrola	293 ± 14	60 ± 8	168 ± 3	5 ± 1	144 ± 12
γ-S <sub>100</sub>	299 ± 16	34 ± 5	142 ± 13	9 ± 1	130 ± 4
γ-P <sub>100</sub>	254 ± 4	23 ± 4	145 ± 20	8 ± 2	134 ± 9
nativní půda	5 ± 1	25 ± 1	137 ± 3	1 ± 1	57 ± 3

a) písmeno γ značí ošetření γ paprsky, dolní index dávku prvku v mg kg<sup>-1</sup>

b) půda bez přídatku Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, neinkubována