

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra Agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Vliv kontaminace půdy rtuťí na mobilitu půdních
mikroorganismů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martin Klouza

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

Konzultant: Dr. Mercedes García-Sánchez

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vliv rtuti na mobilitu půdních organismů“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své vedoucí diplomové práce prof. Ing. Jiřině Szákové CSc. za odborné vedení a cenné rady při psaní diplomové práce, Dr. Mercedes García Sánchez za odborné vedení při laboratorních pokusech a Ing. Zlatě Holečkové za pomoc s instrumentálními analýzami. Experiment byl proveden s finanční podporou grantu GAČR 503/12/0682.

Vliv kontaminace půdy rtutí na mobilitu půdních organismů

Souhrn

V této diplomové práci byl sledován dopad kontaminace půdy rtutí na aktivitu půdních mikroorganismů a zároveň byla testována některá opatření, která mohou případný negativní dopad vysokých koncentrací v půdě omezit. Laboratorní pokusy byly prováděny na dvou typech půd. Prvním typem byla nekontaminovaná černozem z lokality Suchdol, druhým typem byla luvizem z lokality Červený Újezd. Jednotlivé vzorky obou půd pak byly kontaminovány rtutí ve čtyřech různých expozičních časech. Jako látky s potenciální schopností snížit toxicitu rtuti byly vybrány dva materiály, digestát, tedy odpad z výroby bioplynu, a popílek ze spalování biomasy pro energetické využití.

Nejdříve bylo stanoveno půdní pH, z čehož vyplynulo, že pH černozemě bylo neutrální, zatímco pH luvizemě se ukázalo jako kyselé. Celkový rozpustný uhlík a dusík byly stanovovány v 0,01 M roztoku CaCl_2 , a to v poměru 1:10 (hmotnost: objem). Ani u jednoho typu půdy pak nebyl zaznamenán rozdíl v obsazích těchto prvků v závislosti na rtuti. Kvantifikace uhlíku mikrobiální biomasy neodhalila signifikantní změny v žádném ze vzorků prvního ani druhého typu půdy. Výrazné změny byly zaznamenány pouze u vzorků s příměsí digestátu. Ten, jelikož obsahuje poměrně velké množství uhlíku, podpořil rozvoj mikroorganismů. V obsazích N-NH_4^+ a N-NO_3^- nebyly pozorovány rozdíly mezi půdou nekontaminovanou a kontaminovanou. Nicméně po aplikaci digestátu byl zaznamenán vyšší obsah NH_4^+ u vzorků se 14 a 21 denní inkubací, což podporuje tvrzení, že digestát podpořil rozvoj půdní mikroflóry. V druhém typu půdy byly změny obsahů N-NH_4^+ a N-NO_3^- zaznamenány po 14 a 21 denní inkubaci.

Z výsledků vyplynulo, že digestát se ukázal jako potenciální remediant působící proti toxicitě rtuti v půdě. S největší pravděpodobností to souvisí s obsahem uhlíku v digestátu. Lze tedy konstatovat, že digestát může být úspěšnou strategií pro přírodní bioremediační procesy v půdách kontaminovaných rtutí.

Klíčová slova: rtuť, půda, kontaminace, půdní mikroflóra

The effect of mercury soil contamination on the activity of soil microorganisms

Summary

The aim of this diploma thesis was observing the impact of mercury contamination in soil on the activity of soil microorganisms as well as testing certain measures that can potentially reduce the negative impact of high concentrations in the soil. Laboratory experiments were conducted on two types of soils. The first type was non-contaminated chernozem from the Suchdol location, the second type was Luvisoil from the Červený Újezd location. Individual samples from both types of soil were then contaminated with mercury in four different exposure times. Two materials, digestate, i. e. biogas production waste, and fly-ash from the combustion of biomass for energy use, were chosen/selected as agents with a potential ability to reduce the toxicity of mercury.

First, the soil pH was determined, which revealed that the pH of Chernozem was neutral, while the pH of Luvisoil proved acidic. Total soluble carbon and nitrogen were determined in 0.01 M CaCl₂ solution at a ratio of 1:10 (weight: volume). No difference in the contents of these elements in dependence on mercury was noticed in either of the types of soil. Quantification of carbon supply in microbial biomass revealed no significant changes in any of the samples of the first or second type of soil. Significant changes were detected only in samples with addition of digestate. This, as it contains relatively large amounts of carbon, supported the development of microorganisms.

No differences were detected between the contaminated and non-contaminated soil in the contents of N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻. However, after the application of digestate a higher level of NH₄⁺ was recorded in the samples with 14- and 21-day incubation, which supports the claim that the digestate supported the development of soil microflora. In the second type of soil changes in the contents of N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ were detected after 14 and 21 days of incubation.

The results showed that the digestate has emerged as a potential remediant agent counteracting the toxicity of mercury in the soil. Most likely it is related to the content of carbon in the digestate. It is therefore concluded that the digestate can be a successful strategy for natural bioremediation processes in soils contaminated with mercury.

Keywords: mercury, soil, contamination, soil microflora

Obsah

1 Úvod	8
2 Hypotéza a cíle práce	9
3 Přehled literatury	10
3.1 Základní charakteristika rtuti	10
3.1.1 Anorganické sloučeniny rtuti.....	10
3.1.2 Organické sloučeniny rtuti.....	11
3.1.3 Zdroje rtuti v životním prostředí.....	15
3.2 Fytoremediace rtuti	17
3.2.1 Fytostabilizace	17
3.2.2 Fytoimobilizace	17
3.2.3 Fytovolatilizace.....	17
3.2.4 Fytodegradace	18
3.2.5 Fytoextrakce.....	18
3.3 Úloha půdních mikroorganismů	19
3.3.1 Půdní mikroorganismy.....	20
3.3.2 Rozdělení mikroorganismů.....	21
3.3.3 Vnější prostředí a bakterie	22
3.3.4 Půda jako prostředí	23
3.3.5 Zapojení mikroorganismů do koloběhu prvků.....	24
3.3.5.1 Zapojení bakterií do koloběhu dusíku	24
3.3.5.2 Zapojení bakterií do koloběhu uhlíku.....	24
3.3.5.3 Zapojení bakterií do koloběhu síry.....	25
3.3.6 Bakteriální operon pro detoxifikaci rtuti	25
4 Metodika	30
4.1 Půdy a jejich vlastnosti	30
4.2 Použité chemikálie a metody	31
4.3 Uhlík mikrobiální biomasy	32
4.4 Nitrifikace	32
4.5 Statistická analýza	33
5 Výsledky	34
5.1 Změna půdního pH	34
5.2 Celkový rozpustný uhlík a dusík	35
5.2.1 Černozem.....	35
5.2.2 Luvizem	35
5.3 Uhlík mikrobiální biomasy	36
5.3.1 Černozem.....	36

5.3.2	Luvizem	36
5.4	Obsah N-NH₄⁺ a N-NO₃⁻	38
5.4.1	Černozem	38
5.4.2	Luvizem	38
6	Diskuse	44
7	Závěr.....	48
8	Seznam literatury	50

1 Úvod

Převážně v průmyslových oblastech a v oblastech těžby na území České republiky často dochází k environmentálním toxikologickým problémům. Dochází ke kontaminacím rizikovými prvky, a to nejen obyvatelstva, ale všech ekosystémů. V současné době se proto objevují stále větší snahy tuto problematiku řešit, protože se nejedná pouze o obyvatelstvo a ekosystémy blízké zdroji expozice, ale jde o problém celosvětový.

V této diplomové práci jsem se soustředil na nejtoxičtější z běžně sledovaných kovů, totiž na rtuť. Obsahy rtuti v půdě se v jednotlivých oblastech České republiky liší, nejvyšší koncentrace nalezneme na Příbramsku, Semilsku, Chebsku, Berounsku a Ostravsku. Někdy jsou tyto vysoké koncentrace důsledkem vysokých obsahů prvku v podloží, ale ve většině výše zmiňovaných oblastí jsou koncentrace vysoké vlivem antropogenní činnosti (těžba, průmysl). V předkládané práci se zabývám především vlivem rtuti na půdní mikroorganismy.

Půdní mikroflóra je nedílnou součástí každého typu půdy. Její funkce v půdě je nezastupitelná, protože díky ní dochází ke správnému fungování substrátu pro pěstování plodin. Mikroorganismy mohou být stresovány mnoha faktory, což může vést až k neplnění správných funkcí v půdě, a tím i k znehodnocení půdy jako substrátu. Jedním z faktorů je právě kontaminace půdy kovy, tedy i rtutí.

V experimentu provedeném v této práci byl sledován dopad kontaminace půdy rtutí na aktivitu půdních mikroorganismů a zároveň byla testována některá opatření, která mohou případný negativní dopad vysokých koncentrací v půdě omezit. Laboratorní pokusy byly prováděny na dvou typech půd. Prvním typem byla nekontaminovaná černozem z lokality Suchdol, druhým typem byla luvizem z lokality Červený Újezd. Jednotlivé vzorky obou půd pak byly kontaminovány rtutí ve čtyřech různých expozičních časech. Jako látky s potenciální schopností snížit toxicitu rtuti byly vybrány dva materiály, digestát, tedy odpad z výroby bioplynu, a popílek ze spalování biomasy pro energetické využití.

2 Hypotéza a cíle práce

Rtuť patří mezi prvky, které jsou z důvodů vysoké potenciální toxicity intenzivně studovány ve všech složkách životního prostředí. Zároveň se jedná o prvek, který se vyskytuje v přírodě ve formě anorganických i organických sloučenin (methylrtuť, ethylrtuť), přičemž toxicita jednotlivých sloučenin se významně liší. Problematika akumulace a biotransformace rtuti a jejích sloučenin je nejpodrobněji propracovaná ve vodních ekosystémech a to jak sladkovodních, tak zejména mořských. V tomto prostředí byla podrobně sledována zejména transformace sloučenin rtuti v jezerních a říčních sedimentech, kde probíhá bakteriální konverze anorganických sloučenin rtuti na methylrtuť. Situace v terestriálních ekosystémech je prozkoumaná mnohem méně. Důvodem jsou mimo jiné i nižší obsahy tohoto prvku v půdě i rostlinách ve srovnání s vodním prostředím, což klade vysoké nároky na instrumentální vybavení i zkušenost analytika. Role půdní mikroflóry v procesech akumulace a transformace rtuti také není ještě zcela objasněna. Cílem práce je v modelových laboratorních experimentech popsat vliv přídatku různých forem sloučenin síry a organické hmoty na chování rtuti v půdě v závislosti na půdních vlastnostech a obsahu a aktivitě půdních mikroorganismů. Hypotéza: Příklad materiálu s vysokým obsahem síry povede ke snížení mobility Hg v půdě a následně ke zvýšení aktivity půdních mikroorganismů.

3 Přehled literatury

3.1 Základní charakteristika rtuti

Rtuť je kovový chemický prvek stříbřitě bílé barvy. V periodické tabulce označován značkou Hg (podle latinského Hydrargyrum). Jako jediná z kovových prvků je za běžné teploty kapalná. Je velice toxická. Patří mezi přechodné prvky, které mají valenční elektrony v d-vrstvě. Rtuť je poměrně dobře rozpustná v kyselině dusičné za současného uvolňování oxidů dusíku. Na vzduchu je rtuť neomezeně stálá, velmi dobře však reaguje s elementární sírou a halogeny. V přírodě se rtuť vyskytuje poměrně vzácně, a to i jako elementární prvek. Hlavním minerálem a zdrojem je však sulfid rtuťnatý (HgS), česky rumělka neboli cinabarit. Největší světová ložiska tohoto nerostu se nacházejí ve Španělsku, Slovinsku, Itálii, USA a Rusku. Bod tání je u rtuti $-38,83^{\circ}\text{C}$ a varu pak $356,7^{\circ}\text{C}$. Její elektronová konfigurace je proto $[\text{Xe}] 6s^2 4f^{14} 5d^{10}$, má protonové číslo 80 <<http://arnika.org/rtut>>.

V půdě a v sedimentech je rtuť přítomna v různých formách, které mohou být vázány na různé matrice (organické hmoty, hydroxidy železa). Za nejvíce toxickou je považována methylrtuť, a to díky své biologické dostupnosti a vysoké mobilitě. Zajímavé ale je, že methylrtuť představuje pouze asi 1% z celkového obsahu rtuti v půdě (Issaro et al., 2008).

3.1.1 Anorganické sloučeniny rtuti

Rtuť se vyskytuje se dvěma rozdílnými oxidačními čísly, jako Hg^{+I} a Hg^{+II} . Oba typy jsou stejně stálé, jejich rozdíl je v jiných chemických a fyzikálních vlastnostech. Sloučeniny Hg^{+I} připomínají svými chemickými vlastnostmi stříbrné soli. V případě oxidačního čísla +I jde pouze o formu zápisu, protože i v těchto sloučeninách je rtuť dvojjazná ($-\text{Hg}-\text{Hg}-$). Typickým příkladem je asi nejvýznamnější rtuťná sloučenina, totiž chlorid rtuťný neboli kalomel Hg_2Cl_2 . Jde o bílou krystalickou látku málo rozpustnou ve vodě stejně jako chlorid stříbrný (AgCl). Kalomel je toxický jako všechny rtuťné soli, ale vzhledem k jeho minimální rozpustnosti se jen obtížně může dostávat z trávicího traktu do krevního řečiště. Značný význam má však kalomel v analytické chemii. V elektrochemii je prakticky nejvíce používanou referenční elektrodou kalomelová elektroda, jejíž potenciál je prakticky neměnný a je dán pouze velmi nízkou, ale stálou koncentrací iontů Hg_2^{+II} uvolněných z kalomelu v roztoku chloridu draselného (KCl). K přípravě roztoku rtuťné soli se používá dusičnan rtuťný ($\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$), přičemž na dno reakční nádoby s roztokem se dává kapka kovové rtuti, aby se zamezilo vedlejšímu vzniku nežádoucích redoxních dějů. Další uplatnění kalomelu je v gravimetrické

analýze platinových kovů, kde se používá jako selektivní redukční činidlo. Podle podmínek reakce jako je například teplota roztoku nebo kyselost, redukuje kalomel různé drahé kovy jako je platina, rhodium a iridium (Bencko et al., 1995).

Sloučeniny Hg^{+II} svým chováním připomínají měďnaté soli. Poměrně významnou dvojmocnou sloučeninou je chlorid rtuťnatý (HgCl_2 , sublimát). Ten je ve vodě poměrně dobře rozpustný a zároveň velmi toxický. Sublimát byl dříve používán v jedech na hlodavce a k moření obilí. Ta část obilí určená pro zasetí další rok, byla napuštěná roztokem sublimátu, a tím chráněna před hlodavci. Občas však docházelo k tragickým omylům, kdy se obilí napuštěné sublimátem dostalo do mlýna a pak bylo zkonsumováno například v pečivu. Nejvýznamnějším přírodním zdrojem rtuti je rumělka neboli sulfid rtuťnatý (HgS). Kromě toho byl od starověku používán jako barvířský pigment. Již ve starověkém Egyptě byl přidáván do líčidel a jiných kosmetických přípravků. Sloučenina fulminát rtuťnatý ($\text{Hg}(\text{ONC})_2$) jinak znám také jako třaskavá rtuť, slouží k výrobě často používaných pyrotechnických rozbušek. Je poměrně citlivý vůči zvýšení teploty (např. třením, úderem), za běžných podmínek je ale stabilní (Bencko et al., 1995).

3.1.2 Organické sloučeniny rtuti

Organickou formou rtuti se většinou rozumí skupina sloučenin označovaných jako methylrtuť (MeHg). Jde především o monomethylrtuť a dimethylrtuť, kdy mají obě formy podobné biologické účinky i toxicitu, liší se však, a to výrazně svou stabilitou v životním prostředí. Monomethylrtuť je mnohem stabilnější a v prostředí hojnější než dimethylrtuť. Dimethylrtuť ($\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$) je kapalina, vznikající ze sloučenin rtuti za anaerobních podmínek především díky působení mikroorganismů. Má téměř stejný bod varu jako voda, je v ní rozpustná, ale je také lipofilní (rozpustná v tucích). Z 50. let 20. století je asi nejznámější otrava dimethylrtutí. Stala se v japonské zátocě Minamata, kde docházelo k vypouštění sloučenin rtuti z firmy Chisso do moře. Podle této události je dokonce pojmenována nemoc tzv. Minamata disease, kterou bylo v té době postiženo až 1000 nakažených <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Rtu%C5%A5>>.

Existují dvě hlavní cesty, jimiž dochází k methylaci rtuti. První je cesta biologická (tzv. biologická methylace), kdy je zapotřebí přítomnost methylujících bakterií. Druhou možností je pak cesta chemická, kdy dochází k transformaci bez primárního biologického účastníka.

Většina rtuti vstupující do vodního prostředí z atmosféry společně se srážkami, je ve formě iontů, což je biologicky dobře dostupná forma. Pro biologickou methylaci však není dostupná veškerá rtuť vstupující do vodních ekosystémů. Část rtuti dopadne ve vodním

ekosystému na dno, kde se nachází sediment, do nějž je deponována bez dalších transformací. Sediment se pak ale stává zásobárnou, z níž může dojít ke zpětnému uvolnění toxického kovu do vody. V jemnozrnném sedimentu je obecně míra biologicky dostupné rtuti vyšší, než v sedimentech hrubozrnných. Největší podíl na methylaci mají ve vodních ekosystémech nejpravděpodobněji tzv. sulfát redukující bakterie označované zkratkou SRB (Celo et al., 2006). V mořských ekosystémech jsou SRB prokázány za hlavní methylátory. Vyskytují se v biofilmech na povrchu sedimentu i mírně pod jeho povrchem. Vyskytují se především v souvislých, tenkých vrstvách a vytváří výrazné geochemické gradienty (Acha Cordero, 2010). Dodnes obejveno a popsáno přibližně 19 kmenů sulfát redukujících bakterií. Všechny kmeny však nemají stejnou methylační schopnost. Pro biologickou transformaci zvyšuje hladinu rtuti reakce iontu rtuti se sulfidem za vzniku nerozpustné rumělky (HgS). Tato reakce byla popsána jako základní mechanismus pro zvýšení obsahu dostupné rtuti. SRB však také zprostředkovávají vznik sulfidu jako výsledek dýchacího procesu, za současné spotřeby síranového aniontu (SO_4^{II}) jako konečného akceptoru elektronů (King et al., 2002). Samotná alkylace iontu rtuti pravděpodobně probíhá u bakterií prostřednictvím specifického organokovového komplexu. Dříve se předpokládalo, že celý proces methylace rtuti je striktně anaerobní (Celo et al., 2006). Nejnovější poznatky také ukazují, že většina sulfát redukujících bakterií je poměrně tolerantní vůči kyslíku, což umožňuje osidlovat prostředí mimo sediment. To znamená například litorální zónu a kořeny vodních rostlin (Acha Cordero, 2010).

Vyšší koncentrace methylrtuti můžeme v sedimentu pozorovat na přelomu jara/léta. V tomto období je totiž aktivita sulfát redukujících bakterií nejvyšší (King et al., 2002). Výskyt SRB byl pozorován převážně v hloubce od 0 do 20 cm pod povrchem sedimentu, přičemž asi nejvýraznější methylační potenciál má rod *Desulfobacter* s největší hustotou výskytu v hloubce okolo 9 cm. Methylačním potenciálem se rozumí schopnost bakterií methylovat rtuť. U několika rodů bakterií byl jejich methylační potenciál měřen v laboratořích *in vitro*. Bohužel se nedá přesně určit, jaké konkrétní bakterie transformují rtuť více a které méně. Na výsledky změřeného methylačního potenciálu je třeba dívat se s odstupem, protože nelze předpokládat, že je chování bakterií stejné v přírodních podmínkách jako v laboratorních podmínkách. Některé rody bakterií, které by mohly mít na methylaci významný podíl, nedokážeme *in vitro* dokonce ani kultivovat (Acha Cordero, 2010). Methylace rtuti však neprobíhá jen v sedimentu, ale také přímo ve vodním sloupci nebo uvnitř vodních živočichů např. v trávicím ústrojí. Míra methylace probíhající mimo sediment je ale považována za velmi malou. Některé zdroje uvádějí methylaci ve vodním sloupci za významnou, a to v případě, že je ve vodním tělese velký

objem anoxické vody (letní stratifikace, velká hloubka) v porovnání se sloupcem prokysličené vody (Eckley, 2004).

Abiotická methylace rtuti v anorganické formě se však může vyskytovat i v prostředích, kde je biologická cesta methylace vyloučená nebo nepravděpodobná. Jde především o oblasti za polárním kruhem nebo o svrchní vrstvy atmosféry. Právě v těchto extrémních podmínkách předpokládáme methylaci chemickou cestou, tedy bez přispění a vlivu mikroorganismů. Chemická methylace probíhá jen v případech, že se v daném prostředí vyskytuje tzv. donor methylové skupiny. Transformace těchto anorganických forem rtuti probíhá tzv. transmethylací, tedy přenosem methylové skupiny z jedné sloučeniny na druhou. Donory methylových skupin mohou být malé molekuly jako methyljodid a dimethylsulfid, nebo velké molekuly jako disociované fulvokyseliny a huminové kyseliny. Chemické látky s obsahem methyl- a buthyl- skupin se používají především v průmyslové produkci. V první řadě v zemědělství jako fungicidy, insekticidy nebo baktericidy. Časté je jejich využití jako nátěrových hmot, které slouží jako prostředek ochrany proti hnilobě. Methyljodid je s největší pravděpodobností hlavním dárcem methylové skupiny v mořských vodách. Jeho výskyt je zde přirozený. Reakce elementární rtuti s methyljodidem pak probíhá samovolně za pokojové teploty. K syntetické výrobě methylrtuti se používá právě zmíněná reakce (Celo et al, 2006).

Konzumace mořských ryb i dalších vodních živočichů je hlavním zdrojem methylrtuti pro člověka. Z krevního řečiště se methylrtuť dostává do nervové soustavy a z části i do mozku, jater a ledvin. Do těchto orgánů se dostává z krevního řečiště, kde je transportováno téměř 100 % methylrtuti z rybího masa. Methylrtuť je v lidském organismu stabilní a má dlouhý střední čas rozpadu. Ten se pohybuje okolo 44–80 dní (rozpad z methylrtuti až na atomární rtuť) (Eckley, 2004). Nebezpečnost methylrtuti tkví především v její schopnosti bioakumulace (hromadění v tkáních živočichů, u savců i člověka především v mozku) a dlouhé doby rozpadu. Velmi nebezpečná vlastnost methylrtuti je její snadná prostupnost přes placentu a hematoencefalickou bariérou mezi krví a mozkiem <<http://arnika.org/rtut-v-rybach>>.

Rtuť a její sloučeniny patří mezi jedy. Jestliže je atmosféra nasycena kovovou rtutí při teplotě 20°C, obsahuje asi 19 mg/m³ Hg. Jde sice o koncentraci akutně netoxickou, ale jednou z vlastností rtuti je její významná kumulace v těle. Proto dochází při inhalaci par rtuti k chronické otravě. Největší riziko intoxikace je v místech, kde se pracuje se rtutí při vyšších teplotách. Požití kovové rtuti většinou vyvolává zvracení, je ale často z těla vyloučena, a to bez zdravotního dopadu na organismus. Opakováním menších dávek je však otrava možná vzhledem k tomu, že se rtuť v organismu kumuluje. Její příjem organismem je možný jak

plícemi (ze vzduchu), tak trávicím ústrojím (s potravou). Methylrtuť se zde vstřebává ze 100 %. Další místa vstupu do organismu jsou přes kůži nebo placentární bariérou (Jursík, 2002).

Rtuť se váže na sulfanylové skupiny, čímž nekompetitivně inhibuje celou řadu enzymů. Působí na nervový systém, plíce, ledviny i na kůži. Rtuťnatými solemi dochází k akutní otravě. Ta se může projevovat například kovovou chutí v ústech, krvácivostí a hnisáním dásní, tmným lemem sulfidu rtuťnatého kolem zubů, nevolností, zvracením, třesem, později i průjmem, někdy také zánětem ledvin, poruchou řeči a chůze. Důsledkem kontaminace může být také tvorba vředů, a to především na kůži a sliznici žaludku a dvanáctníku. Chronické otravy jsou ale z toxikologického hlediska významnější než akutní (Jursík, 2002).

Toxicita jednotlivých rtuťnatých látek se odvíjí především od jejich rozpustnosti ve vodě. Díky této vlastnosti jsou nejtoxičtější sloučeniny dvojmocné rtuti Hg^{+II} . Rozpustné soli jsou silně toxické. Mezi nejtoxičtější patří chlorid rtuťnatý, sublimát, jehož smrtelná dávka je 0,1–0,5 g. Méně toxický je chlorid rtuťný (kalomel) a sulfid rtuťnatý (rumělka), díky malé rozpustnosti ve vodě (Bencko et al., 1995).

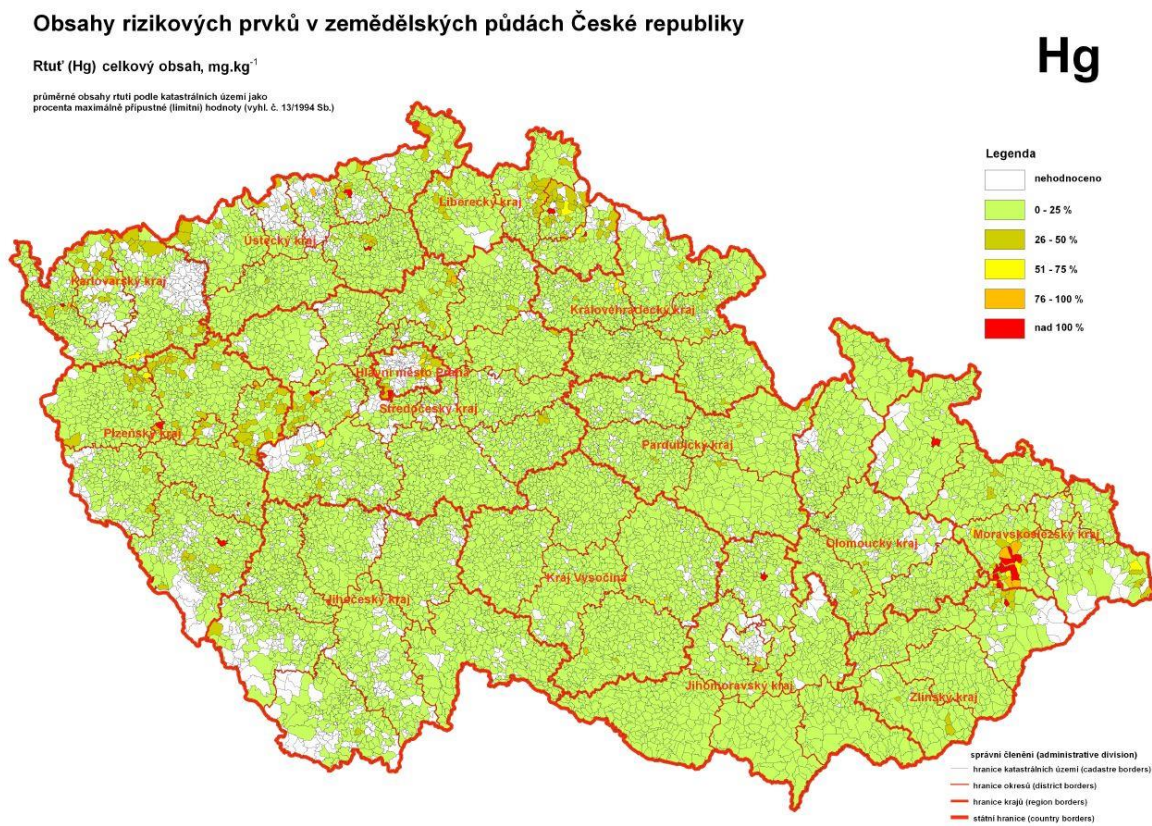
Při intoxikaci anorganickými sloučeninami rtuti dochází k poškození trávicího ústrojí a ledvin, intoxikace organickými sloučeninami vede k poškození nervového systému (degenerace neuronů v mozkové kůře, atrofie mozkové kůry). Byl také prokázán karcinogenní účinek methylrtuti. Rtuť má také fyto toxické účinky, projevující se například zvětšením endoplazmatického retikula a mitochondrií nebo poruchami vnitřního uspořádání chloroplastů. Ovlivňuje také fotosyntézu, a to hlavně v organické formě, anorganických formách méně. Nebezpečná je především schopnost methylace rtuti působením mikroorganismů a kumulace jejich organických sloučenin uvnitř rostlinných a živočišných organismů (Ruiz et Daniel, 2009).

Obzvláště nebezpečné jsou pak organokovové sloučeniny rtuti, které se mohou snadno dostat do živých tkání a to například (jak již bylo uvedeno) i pouhým stykem s pokožkou. Organokovové sloučeniny se dostávají do životního prostředí například rozkladem nejrůznějších sloučenin organického původu s obsahem rtuti nebo i prostřednictvím metabolických pochodů mikroorganismů. Nejčastěji uváděným příkladem je dimethylrtuť, $(CH_3)-Hg-(CH_3)$. Za smrtelnou dávku se uvádí pro dospělého člověka již 0,1 ml této kapalné substance. Nejtoxičtější je rtuť ve formě MeHg (methylrtuť). Rtuť patří k nejjedovatějším prvkům. Může způsobovat svalovou slabost, únavu, poruchy vidění, neurologické poruchy, snižuje reprodukční schopnost. Dokáže procházet placentární bariérou a způsobovat tak například psychomotorické poškození plodu (Urban, 2006).

3.1.3 Zdroje rtuti v životním prostředí

Významnými zdroji rtuti v životním prostředí jsou hutnictví, energetika (spalování fosilních paliv) a kaly z čistíren odpadních vod. Ačkoliv je rtuť toxický prvek, využívá se poměrně v hojném množství v nejrůznějších odvětvích průmyslu i v chemických a fyzikálních metodách a ve zdravotnictví.

Ohlédneme-li se do historie, zjistíme, že rtuť se těžila na území dnešní České republiky na pěti významných lokalitách, a to jako cinabarit (starší český název rumělka), což je klencový minerál s chemickým vzorcem HgS (sulfid rtuťnatý), který je nerozpustný v HNO_3 a H_2SO_4 . Historicky nejvýznamnější těžební lokalitou byly Horní Luby u Chebu. Mezi další lokality řadíme Svatou u Berouna (Veľbil, 2004), Jedovou horu u Hořovic (Veľbil, 2003), Bezdržice u Mariánských lázní (Veľbil, 2007) a Jesenné na Semilsku (Veľbil, 2005). V současnosti se rtuť na našem území již netěží a nenalézají se zde ani žádné známé zásoby. Obrázek č. 1 ukazuje obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách České republiky. Ze světových producentů rtuti jsou nejvýznamnější Čína (1200 t ročně), Kyrgyzstán (150 t) a Chile (90 t). Mezi významné evropské producenty řadíme i Španělsko a Slovinsko.



Obr. 1: Obsahy Hg v zemědělských půdách České republiky (Poláková et al., 2011).

Z obr. 1 je patrné, že půda kontaminovaná rtutí se nachází v oblastech, kde dříve probíhala její těžba. Tedy Chebsko, Berounsko, Semilsko. Největší kontaminovanou oblastí je však především Ostravsko. Tam se těžba rtuti nikdy neuskutečnila, vysoké kontaminace v půdě jsou zde spojovány především s těžbou černého uhlí a s hutnictvím. Další kontaminovanou oblastí je Příbramsko, kde se již od středověku do 70. let 20. století těžilo stříbro. Tato oblast je známa především svými polymetalickými rudami s obsahem olova, stříbra a zinku. V této oblasti byly zjištěny vysoké koncentrace rtuti v lesních půdách, a to především ve směru převládajícího proudění vzduchu od příbramské huti. Vyšší koncentrace však byly nalezeny i v zemědělských půdách. Má se za to, že je to způsobeno používáním přípravku Agronal, který obsahoval chlorid fenylrtuťnatý a používal se především k moření osiva coby ochrana proti houbovým chorobám. Rtuť se z tohoto prostředku dostala do potravních řetězců tak, že namořené osivo bylo zkrmováno hospodářským zvířatům. Používání tohoto přípravku však bylo v 90. letech 20. století zakázáno. V okolí příbramské huti se koncentrace rtuti pohybují v hodnotách okolo $2,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Ettler et al., 2007). Koncentrace v horizontech zemědělských půd v okolí Příbrami jsou přibližně o řád nižší, než u lesních půd. Je to dáno především o řád nižší koncentrací organického uhlíku a také nižší kationtovou výměnnou kapacitou v zemědělských půdách. Vedle těchto faktorů může koncentraci rtuti zvyšovat také opad, který se u zemědělských půd nevyskytuje. V nich je naopak veškerý organický materiál odstraňován.

Nejvýznamnější uplatnění v praxi má rtuť ve formě slitin s jinými kovy, tvoří se tzv. amalgámy. Ochotně je vytváří se zlatem, stříbrem, mědí zinkem, kadmíem, sodíkem, ale například s železnými kovy jako jsou železo, nikl a kobalt nevznikají vůbec. V běžném životě se setkáváme hlavně s amalgámy dentálními, které se používají v zubním lékařství jako velmi odolné výplně zubů po odstranění zubních kazů (Tuček et al., 2007). Další amalgámy se sporadicky využívají při amalgamací zlata při jeho těžbě z rud. Problémem spojeným s tímto způsobem těžby je skutečnost, že dokonalé oddělení rtuti od zbytkové sušiny je téměř nereálné, čímž dochází ke kontaminaci životního prostředí. Rtuť se také používá do fyzikálních přístrojů konkrétně jako náplň do teploměrů a tlakoměrů. Evropská unie však již výrobu rtuťových teploměrů zakázala.

Dalším možným způsobem, jak se rtuť může dostat do prostředí, je rozbitím zářivkových trubic, které rtuť také obsahují. Je proto potřeba dbát zvýšené opatrnosti při jejich likvidaci a nakládání s nimi. Kovová rtuť se používá v chemickém průmyslu, a to v přístrojích pro elektrolytickou výrobu chlóru. Tyto přístroje jsou však v současné době nahrazovány z důvodu spotřebování velkého množství elektrické energie a z důvodu znečištění životního

prostředí. V České republice provozuje tuto technologii několik chemických závodů, z nichž jedním z největších je Spolana Neratovice. V areálu této chemičky kontaminovalo přes 250 tun kovové rtuti a další rtuťnaté sloučeniny několik výrobních objektů a desítky tisíc m³ zeminy na břehu Labe. Velké množství chemikálií uniklo z této chemičky i v létě roku 2002 při povodních, ale potenciální dopad této události nebyl ve vědecké literatuře zmapován.

3.2 Fytoremediace rtuti

Fytoremediací rozumíme použití rostlin nebo rostlin a mikroorganismů k odstraňování polutantů nebo k snížení jejich škodlivosti. Je však nutné vytvořit podmínky potřebné k tvorbě biomasy na konkrétním stanovišti, stejně tak jako zohlednit biologické vlastnosti rostlin a jejich nároků s ohledem na zvolený remediační postup.

3.2.1 Fytostabilizace

Fytostabilizace je metodou omezující pohyb kontaminujících látek anorganického i organického původu do okolí, a to jak horizontálně, tak i vertikálně. Dochází zejména k mechanické fixaci stanoviště. Podstatná je tolerance rostlin k vysokým koncentracím kontaminantů, vysoce rozvinutý kořenový systém rostliny a dokonalé pokrytí půdního povrchu. Mezi nevhodné podmínky pak může patřit zasolení půdy, nízká zásoba živin, špatná struktura půdy, nedokonalý vodní režim a nevhodná hodnota pH.

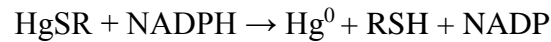
3.2.2 Fytoimobilizace

Fytoimobilizace je metoda omezující pohyb kontaminujících látek v kořenové zóně rostliny. Dochází v ní především k adsorpci nebo absorpci kořeny a rostlinami zprostředkované srážení či tvorba nerozpustných sloučenin. Rostliny také mění půdní vlastnosti, čímž mění mobilitu kontaminující látky v půdě.

3.2.3 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace, neboli odstraňování znečišťujících látek z půdy těkáním do atmosféry. U této metody je důležitá přítomnost a aktivita enzymů vylučovaných rostlinami samotnými nebo vzájemná podpora rostlin a mikroorganismů. Tato metoda se využívá především k degradaci organických látek na jednoduché sloučeniny a k jejich následnému vytěkání. Jde především o syntézu těkavých methyl nebo dimethyl sloučenin kovů, metaloidů a halogenidů

a jejich těkání do pŮdy. Odstraňování rtuti se pak děje podle následující rovnice, kdy dochází k zvýšené redukci thiosloučenin a následné volatizace Hg.

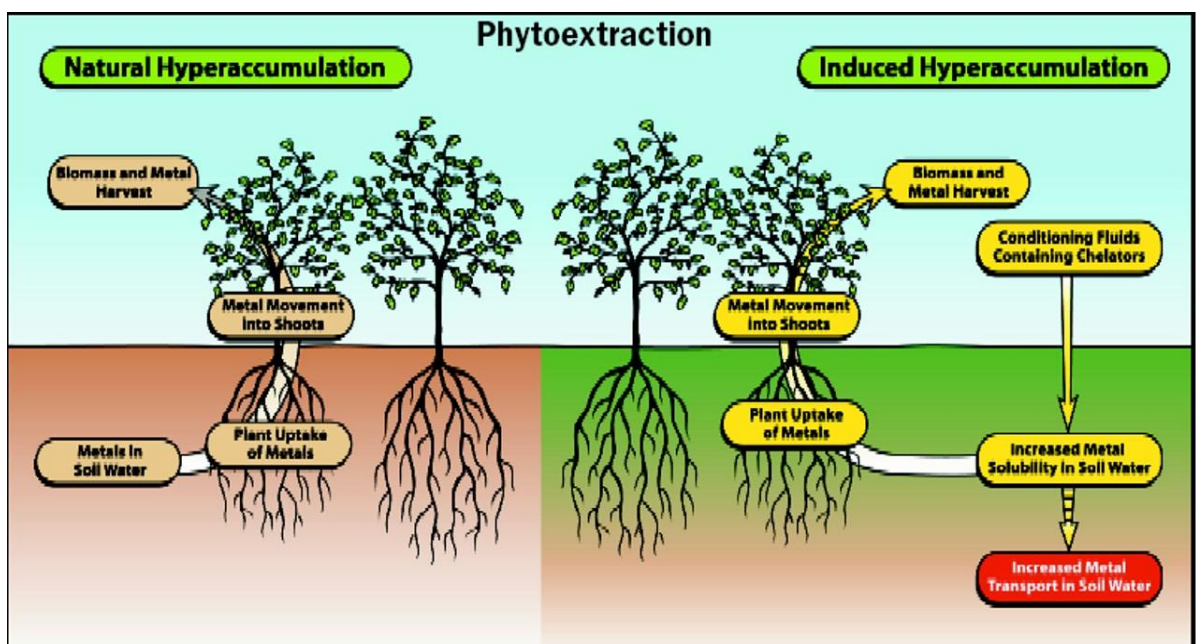


3.2.4 Fytodegradace

Fytodegradaci rozumíme rozklad kontaminujících látek s využitím rostlin. Za základní proces fytodegradace se považuje zvýšení dostupnosti substrátu pro mikroorganismy v rhizodféře kořenů, produkce degradativních enzymů rostlinami a přímá degradace rostlinami v pletivech (parciální nebo úplný rozklad). Důležité jsou také kořenové exudáty, které slouží jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy.

3.2.5 Fytoextrakce

Fytoextrakce můžeme charakterizovat jako příjem kontaminantů kořeny rostlin, jejich následné přemístění a akumulace do výhonků a listů rostliny. Rostlina však musí mít kapacitu na přijímání vysokých koncentrací rizikových látek, musí být schopna transportovat přijaté látky do nadzemních částí. S tím je spojena i schopnost produkovat vysoké množství biomasy. Důležitá je také půdní úrodnost, vhodné podmínky pro růst a přístupnost prvků rostlinám. Fytoextrakce se řídí třemi základními strategiemi, a to rostlinami hyperkumulujícími rizikové prvky, rostlinami s vyšší akumulací schopností a rostlinami s maximální tvorbou biomasy. Na obr. 2 je znázorněno jednoduché schéma fytoextrakce.

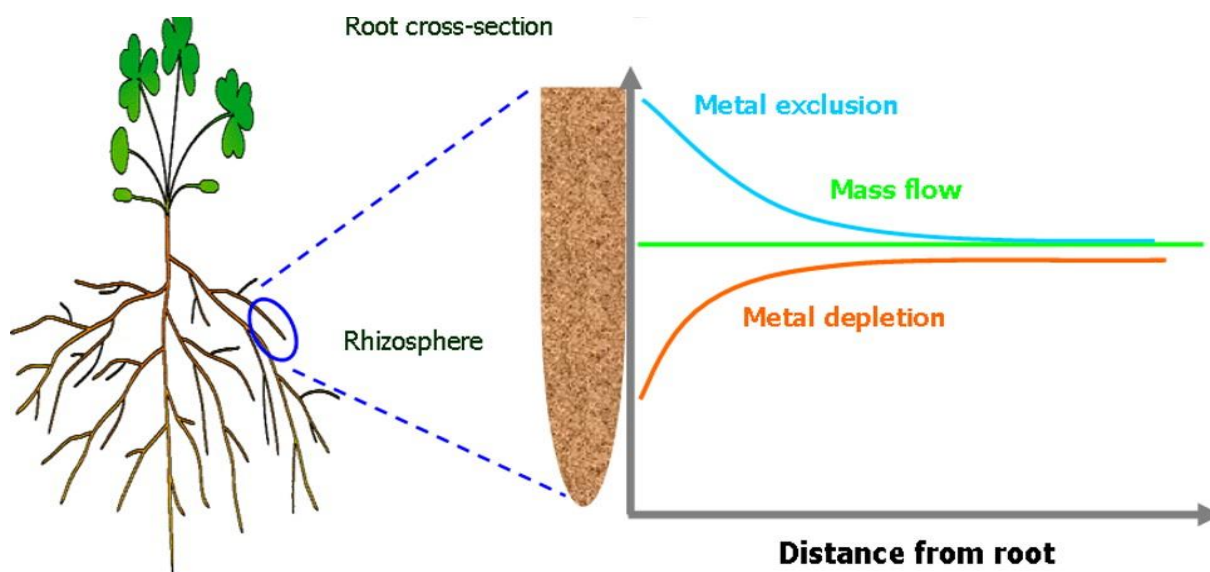


Obr. 2: Znázornění jednoduchého schématu fytoextrakce (Pierzynski et al., 2001)

3.3 Úloha půdních mikroorganismů

Zvýšený obsah rtuti v půdě obvykle potlačí mikrobiální aktivitu. Záleží však na fyzikálně chemických vlastnostech půdy, zejména pak na obsahu a složení půdní organické hmoty. Některé mikroorganismy však dovedou být resistantní vůči vysokým obsahům rtuti tím, že jsou schopny její sloučeniny transformovat pomocí chemických reakcí, jako jsou redukce, oxidace, methylace a demethylace (Liu et al., 2010).

Půdní podmínky v oblasti rhizosféry (povrch a nejbližší okolí kořenů rostlin) především ovlivňují dostupnost živin a potenciálně rizikových prvků. Důležitou roli v tomto procesu hrají kořenové exudáty, obsahující směs organických kyselin, chelátů, vitamínů, aminokyselin, purinů, nukleosidů, anorganických iontů apod. Rhizosféru tedy můžeme označit jako půdu ovlivněnou kořeny rostlin přibližně do 5 mm, někdy i nepatrně více, obsahující organickou hmotu. (Jones et al., 2004). V takto ovlivněné půdě nalezneme růstové faktory, které stimulují aktivitu mikroorganismů, organické kyseliny a lipidy, které snižují pH a chelatizují kovy, ale i těkavé látky. Dále jsou zde lyzáty, vznikající autolýzou starších buněk. Hlavním zdrojem organických látek pro mikroorganismy je mucigel, což je gelovitý materiál rostlinného a mikrobiálního původu, obsahující ještě uvolněné buňky kořenové čepičky. Obrázek č. 3 znázorňuje funkci rhizosféry. Složení záleží, vlhkosti a množství kyslíku v půdě. Uvolňování látek do rhizosféry je ovlivněno druhem rostliny, jejím věkem a vývojovým stádiem, teplotou, vlastnostmi půdy a půdní mikroflórou <<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2006/Bi8555/rostliny.txt>>



Obr. 3: Znázornění funkce rhizosféry (Moradi, 2008)

3.3.1 Půdní mikroorganismy

V půdě se vyskytující mikroorganismy mají především funkci rozkladačů (dekompozitů) organické hmoty. Mikroorganismy obecně můžeme rozdělit do pěti hlavních taxonomických tříd, a to na viry, bakterie, houby, prvoky a řasy. V půdě se vyskytují jako samostatné buňky nebo jako kolonie mikroorganismů chráněné slizovým obalem z polysacharidů. V půdě se seskupují okolo půdních částic, především pak v blízkosti jílových komplexů a organických složek. Jejich aktivita a interakce s jinými mikroorganismy, ale i většími půdními organismy a s půdními částicemi záleží na podmínkách konkrétního mikrobiotopu. Ty se mohou výrazně lišit i v případě u sebe blízko se nacházejících mikrobiotopů. Mikrobiotopem se u půdních mikroorganismů rozumí především vnitřní a vnější povrchy půdních agregátů, lišících se velikostí a složením. Půdu tedy považujeme, s ohledem na distribuci hmoty a přítomných organismů, za vysoce heterogenní prostředí (Buscot, 2005).

Počet mikroorganismů v 1 g půdy může dosahovat řádově až několika miliard. I při takovém počtu je ale třeba si uvědomit, že každý mikroorganismus (každá mikrobiální buňka) je již autonomním organismem, což znamená, že obsahuje všechny systémy umožňující její růst, reprodukci nebo případnou metabolickou aktivitu. Navíc je vybavena ještě stovkami enzymů, které ji umožňují rychlou adaptaci na měnící se prostředí, a tím schopnost přežít i v nepříznivých podmínkách. Látková výměna s prostředím se uskutečňuje pomocí povrchu mikrobiálních buněk, jehož velikost se pohybuje v desítkách až stovkách ha na 1 ha půdy, jak nám znázorňuje tabulka č. 1.

Druh	Počet v 1 g půdy	Hmotnost v kg/ha	Povrch buněk v ha/ha
Bakterie	$10^8 - 10^9$	80 – 800	60 – 600
Aktinomycecy	$10^3 - 10^4$	250 – 500	95 – 190
Mikromycecy	$10^4 - 10^5$	1500 – 3000	235 – 470

Tab. 1: Obsahy mikroorganismů v půdě <<http://www.phytosanitary.org/>>

V různých typech půd se značně liší druhová skladba mikroorganismů, jejich množství, bohatost společenstva i jejich aktivita. Existuje však několik zákonitostí, které lze vyzorovat a zobecnit. Například počet mikroorganismů klesá se vzrůstající hloubkou půdy, nejvíce mikroorganismů nacházíme u povrchu a další místo jejich kumulace je v rhizosféře rostlin. Například v orné půdě lze nalézt jen velmi málo druhů hub. Může to být způsobeno roztrháním mycelií orbou. Houby totiž mají velmi dlouhá mycelia, která jí mimo jiné umožňují transport látek na dlouhé vzdálenosti především v době nepříznivých podmínek (Rosypal et al., 2003).

3.3.2 Rozdělení mikroorganismů

Mikroorganismy jsou po fyziologické stránce asi nejrozmanitější ze všech živých organismů. I jednotlivé skupiny mikroorganismů se vzájemně mohou lišit nároky na kyslík, na výživu, i způsobem získávání potřebné energie. Podle jejich nároků na kyslík rozdělujeme mikroorganismy na aerobní – vyžadující vzdušný kyslík, anaerobní, – na něž naopak kyslík působí inhibičně, mikroaerofilní – mající anaerobní metabolismus, u nichž zároveň nízké koncentrace kyslíku urychlují například jejich rozmnožování. Poslední skupinou jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, – ty mají schopnost jak aerobního, tak anaerobního metabolismu. Podle původu uhlíku v buňkách je můžeme rozdělit na heterotrofní – zdrojem jejich uhlíku jsou hotové organické látky. A autotrofní – zdrojem uhlíku je CO₂. Můžeme je však také rozlišovat podle zdroje energie, s nímž úzce souvisí zdroje výživy, jejich přijímání, přeměna a jejich využívání na biosyntézy. Ve vztahu ke zdroji energie dělíme mikroorganismy na dvě skupiny. První skupinou jsou fototrofní organismy, které můžeme ještě rozdělit na fotoautotrofní (fotolitotrofní) a na fotoheterotrofní (fotoorganotrofní) mikroorganismy. Druhou skupinou jsou pak mikroorganismy chemotrofní, které ale můžeme také rozdělit na chemoautotrofní (chemolitotrofní) a na chemoheterotrofní (chemoorganotrofní) mikroorganismy. Obecně lze říci, že fototrofní mikroorganismy získávají energii fosforylací a chemotrofní získávají energii oxidací chemických sloučenin (Rosypal et al., 2003).

Samozřejmostí je i výskyt tzv. přechodných skupin mikroorganismů, které striktně nezapadají do skupin, které jsme popsali. Vyskytují se rovněž obligátně autotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny využívat organické látky jako zdroj uhlíku; fakultativně autotrofní mikroorganismy, jež dokáží zastavit příjem CO₂, pokud je v prostředí přítomna organická látka jako zdroj uhlíku; a mixotrofní mikroorganismy, pokračují v příjmu CO₂ za současného využívání organické látky jako zdroje uhlíku. Buňky také přijímají i další organické látky, které nazýváme růstové faktory. Tyto látky si mikroorganismy nedokáží syntetizovat. Nároky na růstové faktory jsou pak rozdílné podle druhu mikroorganismů (Fečko et al., 2004).

Taxonomické zařazení půdních mikroorganismů je i dnes poměrně nedokonalé, protože zatím pouze malá část z nich je zmapována. Mikrobiologové proto pracují s termínem fylotyp, což může nahrazovat pojem druhu v molekulárních studiích. Pozornost se pak zaměřuje především na mikroorganismy s podobným fylogenetickým vztahem. Bakterie rodu *Pseudomonas*, *Achromobacter* a *Bacillus* se vyskytují v aerobních půdách, tedy v půdách dobře prokysličených. Naproti tomu v anaerobních podmínkách můžeme najít anaeroby rodu *Clostridium*. Pokud bychom chtěli v půdě zvýšit počet heterotrofních mikroorganismů nebo

aktinomycet, můžeme přidat organický substrát. Vytvořením podmínek pro autotrofní organismy vzroste výskyt nitrifikačních bakterií rodu *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Může se i zvětšit podíl bakterií oxidujících síru např. *Thiobacillus*. Nejrozšířenějším rodem půdních bakterií je pak rod *Arthrobacter* (Rosypal, 2003).

Rody jako *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* a *Aspergillus* jsou nejčastěji se vyskytujícími rody hub v půdě. Hojně se však vyskytují ještě rody *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* a *Cladosporium*. Struktura půdy je poměrně významně ovlivněna houbovými mycelii, která prorůstají mezi půdními částicemi a výrazně tak napomáhají vzájemné vazbě. Mezi druhy půdních hub můžeme najít i dravé formy, které mají pro tento účel speciální zařízení na chytání prvoků a dalších mikroskopických organismů. Mezi půdní mikroorganismy řadíme také řasy, mezi nimiž najdeme jednobuněčné, nepohyblivé typy, ale také vláknité typy. Spolu s nimi se vyskytují i cyanobakterie, z nichž je možné jmenovat například rody jako *Nostoc*, *Cylindrospermum* nebo *Anabeana*. Společný výskyt však determinují podmínky, umožňující fotosyntézu (Fečko et al., 2004).

3.3.3 Vnější prostředí a bakterie

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících život mikroorganismů, případně jejich reprodukční schopnost. Podle vztahu k teplotě můžeme mikroorganismy rozdělit na psychofilní (ideální teplota prostředí je pro ně do 20 °C), dále na mezofilní (ideální rozpětí teplot je pro ně 20–40 °C), a na termofilní (žijí v prostředí o teplotě vyšší než 40 °C). Dalším faktorem ovlivňujícím rozmnožování mikroorganismů je pH prostředí. Většina bakterií a kvasinek má rozpětí ideálního pH úzké, zatímco u většiny plísní je naopak poměrně široké. Podle pH pak můžeme rozdělit mikroorganismy na acidofilní (žijící v kyselém prostředí), neutrofilní (prostředí s pH 6 až 8) a alkalofilní (žijící v zásaditém prostředí). Velká část bakterií nejlépe roste v téměř neutrálním až slabě alkalickém prostředí, tedy při pH 6,5 až 8,0. Kvasinky se mohou množit v kyselém prostředí v rozmezí pH 3,0 až 6,0. Široké rozpětí hodnot pH pak mají kvasinky, které se rozmnožují a rostou při pH 1,2 až 11,0 (Rosypal et al., 2003; Fečko et al., 2004).

Dalším vnějším faktorem ovlivňujícím životní cyklus mikroorganismů je množství dostupné vody. Její potřeba je závislá na druhu a stáří mikroorganismu, relativní vlhkosti vzduchu a povahy substrátu. Podle nároků na vodu dělíme mikroorganismy na xerofilní, mezofilní a hydrofilní. Naprostá většina bakterií, řas a prvoků jsou organismy hydrofilní, mikromycety a streptomycety jsou na vlhkost nenáročné. Na mikroorganismy také poměrně

zásadně působí antimikrobiální látky. V důsledku svého specifického chemického složení mají tyto sloučeniny nepříznivý vliv. Některé zastavují rozmnožování mikroorganismů, těm říkáme souhrnně mikrobistatické látky nebo je dokonce usmrcují, ty nazýváme mikrobicidní látky (Rozsypal et al., 2003). Antimikrobiální látky můžeme rozdělit podle jejich mechanismu účinku na látky poškozující určitou buněčnou strukturu nebo její specifickou funkci; na látky, které působí na mikrobiální enzymy a na látky ovlivňující a reagující s DNA. Tyto antibakteriální látky však nepůsobí úzce specificky, proto je nelze jednoznačně zařadit do některé z těchto tří jmenovaných skupin. Z dalších vnějších vlivů prostředí můžeme jmenovat oxidačně redukční potenciál, záření, osmotický tlak, povrchové napětí kapalin, ultrazvuk, elektrický proud nebo hydrostatický tlak. Velký vliv na rozvoj mikroorganismů mají kromě fyzikálních a chemických vlivů ještě biologičtí činitelé. Mikroorganismy a jejich vzájemné ovlivňování se řadí k jednomu z předních biologických činitelů. Velký vliv má i případný hostitelský makroorganismus, což je rostlina nebo živočich, na kterém daný mikroorganismus parazituje nebo se kterým žije ve vzájemné symbióze (Fečko et al., 2004).

3.3.4 Půda jako prostředí

Půdní mikroorganismy reprezentují přibližně 0,4 % celkové hmotnosti půdy. I přes tento fakt jsou však považovány za nejvýznamnější složku aktivní fáze ekosystému. Mají totiž nezastupitelnou roli v některých procesech jako je například mineralizace (úplný rozklad rostlinných a živočišných těl), syntéza humusu, koloběh živin v půdě nebo tvorba mikrostruktury půdy. Všechny tyto procesy pak lze chápat jako obecně zvyšující procesy půdní úrodnosti. Pochody v půdě lze tedy charakterizovat jako humifikaci, mineralizaci a biologické poutání organických a anorganických látek. Díky mineralizaci organických látek v půdě se vytvářejí energetické i substrátové podmínky pro pochody humifikační, jejichž průběh je pro udržení ale i pro zvyšování úrodnosti klíčový.

Mikroorganismy vytvářejí s prostředím vzájemně propojený dynamický celek. Mikroorganismy působí na prostředí tak, že spolu s ostatními organismy vytvářejí jeho biologické, fyzikální a chemické vlastnosti. Prostředí pak poskytuje mikroorganismům energii, vodu a v neposlední řadě i živiny. Půda je primárním mikrobiálním prostředím, i když mikroorganismy najdeme i ve vodě, vzduchu nebo i v jiných živých organismech (Chloupek, 2005).

3.3.5 Zapojení mikroorganismů do koloběhu prvků

3.3.5.1 Zapojení bakterií do koloběhu dusíku

Dusík se do půdy dostává jako složka proteinů v odumřelých pletivech rostlin a tkáních živočichů. Bakterie živící se těmito proteiny se označují jako saprofytické. Při rozkladu proteinů se uvolňuje amoniak, který je pak jako součást amonných solí nitrifikačními bakteriemi oxidován na dusičnany a dusitany, jež jsou využívány rostlinami jako zdroj dusíkaté výživy. Kromě saprofytických a nitrifikačních bakterií se v půdě vyskytují ještě dusík vázající bakterie. Jsou to především *Azotobacter chroococcum* a *Rhizobium leguminosarium* (patří do tzv. hlízkových bakterií). Oba druhy pak využívají jako zdroj své dusíkaté výživy přímo vzdušný N_2 . Z tohoto dusíku si pak vytvářejí své vlastní proteiny a nukleové kyseliny. Když buňky těchto zástupců odumřou, stanou se jejich proteiny potravou saprofytických bakterií, které je v konečné fázi rozloží na amoniak a oxid uhličitý.

Azotobacter žije samostatně a využívá vzdušný dusík nezávisle na jiných organismech. Hlízkovité bakterie žijí v nádorcích na kořenech bobovitých rostlin a jsou vzhledem k nim v symbiotickém stavu, spočívajícím v tom, že rostlina dodává bakteriím zdroj uhlíkaté výživy ve formě cukernatých látek a hlízkové bakterie obohacují půdu, kde rostliny rostou o dusičnany.

Koloběhu dusíku se též zúčastňují denitrifikační bakterie. Ve vztahu k dusíkaté výživě rostlin mají tyto bakterie spíše negativní účinek. Ochuzují půdu o dusičnany a dusitany, které redukují až na molekulární N_2 (Buscot et al., 2005; Rosypal et al., 2003).

3.3.5.2 Zapojení bakterií do koloběhu uhlíku

Výchozím zdrojem uhlíku na naší planetě je oxid uhličitý. Ten se uvolňuje do atmosféry oxidační činností organismů, to znamená jejich dýcháním (živočichové, chemoheterotrofní bakterie) nebo kvašením (chemoheterotrofní bakterie).

Oxid uhličitý je jako zdroj uhlíku využíván všemi fotoautotrofními organismy (rostliny, fotoautotrofní bakterie) a chemoautotrofními bakteriemi. Fotoautotrofní organismy (v převážné většině rostliny) slouží jako potrava živočichům (býložravci) a různým půdním heterotrofním bakteriím. Býložravci jsou potravou masožravců. Nakonec jsou pak odumřelé tkáně živočichů a odumřelá pletiva rostlin a jejich zbytky rozkládány půdními heterotrofními bakteriemi. Při tom se jako jeden z konečných produktů tohoto rozkladu uvolňuje oxid uhličitý,

který se vedle oxidu uhličitého uvolňovaného dýcháním dostává do atmosféry (Rosypal et al., 2003).

3.3.5.3 Zapojení bakterií do koloběhu síry

Na tomto koloběhu se podílejí fototrofní a sírné bakterie. Mnohé proteiny živočichů i rostlin obsahují síru. Ta se působením saprofytických bakterií na odumřelá pletiva rostlin a tkáně živočichů uvolňuje ve formě sirovodíku (H_2S). Z něho si pak pro své pochody berou vodík anoxygenní fototrofní sírné bakterie tak, že sirovodík rozloží až na síru, která je pak oxidována na síran chemoautotrofními bezbarvými bakteriemi. Tyto bakterie též oxidují sirovodík na síran. Síran poté slouží jako zdroj síry pro rostliny. Ve formě rostlinné potravy přijímají síru živočišné organismy, v nichž se pak síra stává složkou mnoha proteinů (Rosypal et al., 2003).

3.3.6 Bakteriální operon pro detoxifikaci rtuti

Existují některé druhy bakterií, které jsou schopny přežít a dokonce se množit i v prostředí, kde je koncentrace rtuti velmi vysoká (Steele et Opella, 1997). Tyto bakterie mají ve svých plazmidech tzv. mer operon, kde jsou uloženy geny odpovídající za detoxifikaci rtuti. Tento genetický systém je zatím jediný dobře dopsaný systém rezistence mikroorganismů zahrnující transformaci toxických sloučenin rtuti na těkavé a méně toxické formy. Jak organické (CH_3HgX), tak i anorganické (HgX) sloučeniny rtuti procházejí pomocí merC a merT enzymů přes vnitřní membránu do cytosolu, kde jsou transformovány. Tyto geny kódují například preiplazmatický protein (merP), schopný vázat rtuť a také protein merT, který potom umožní transportovat rtuť do cytoplazmy buňky. Operon mer však nese ještě gen merB pro lyázu, konkrétně pro organické rtuťnaté sloučeniny. Lyáza zapříčiní rozpad komplexu a uvolňuje rtuť ve formě iontů. Operon nese ještě gen merA pro enzymreduktázu, která má schopnost měnit tuto iontovou formu rtuti (Hg^{+II}) na rtuť elementární (Hg^0), tedy plynnou a méně toxickou formu, která je volatilizována (odpařena) přes buněčnou membránu do atmosféry. Ve většině studií byly pro transgenozí využívány právě tyto dva geny (Mathema et al., 2011).

Enzym merA reaguje s většinou kovových iontů, a to i se rtutí. Pokud upravíme sekvenci v okolí aktivního místa enzymu, může se tím zlepšit jeho enzymatická schopnost redukce, čehož využil ve své práci Rugh et al. (1996). Modifikoval gen merA za vzniku merApe9, který je v rostlinné buňce schopný výrazně vyšší exprese, a dokonce poskytuje i větší rezistenci vůči

rtuti. Gen *merApe9* byl potom nesen vektorem pro přenos, řízeným promotorem *caMV35S*, také terminátor *NOS* a *polyA* signál. Pomocí *Agrobacterium tumefaciens* byl vektor vložen do huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Tyto upravené rostliny byly schopné růst na médiích kontaminovaných až okolo hodnoty 100 $\mu\text{M/l}$ HgCl_2 . To představuje téměř pětinašobek toho, co by bylo snesitelné pro neupravené rostliny.

Yang et al. (2003) pracovali s modifikovaným genem *merApe9* pod kontrolou aktivovaného promotoru původně z *A. thaliana* (*ACT2*) dosáhl šestinašobného zvýšení rezistence k HgCl_2 u podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*). Volatilizace elementární rtuti korelovala se zvýšenou rezistencí, a to v obou případech. Z toho důvodu byl vyvozen závěr, že u transgenních rostlin vznikl rezistentní fenotyp díky redukci rtuti z formy toxické na formu netoxickou, respektive méně toxickou.

Další výzkumy byly prováděny s genem pro lyázu, která byla specifická pro organicky vázanou rtuť. Gen *merBpe* vznikl přidáním signálních oblastí vhodných pro rostlinnou expresi. Tento gen spolu s *CaMV35S* promotorem, byl na vektoru s *NOS* terminátorem a *polyA* sekvencí. Metodou vakuové infiltrace bakterií *A. tumefaciens* byl vnesen do rostlin *A. thaliana*. U takto pozměněných rostlin bylo dosaženo až patnáctkrát vyšší exprese transgenů. To bylo sice příčinou zvýšení obsahu rtuťnatých iontů v cytosolu, ale paradoxně to pomohlo i k dobrému růstu na médiu o vysoké koncentraci rtuti. Z toho vyplývá, že za zvýšenou toleranci zodpovídají detoxifikační mechanismy, pravděpodobně založené na principu proteinů s chelatační schopností (Bizily et al., 1999).

V další sérii pokusů křížili tyto transgenní rostliny *A. thaliana merApe9* (z publikace Rugh et al. 1996) s transgenními rostlinami *A. thaliana merBpe*, a to za účelem získání linie rostlin s oběma transgeny. Rostliny byly navzájem porovnávány, a to vzhledem k působení CH_3HgCl . Ukázalo se, že tato linie rostlin obsahující oba geny *merApe9* i *merBpe* jsou schopny růst i při až padesátkrát vyšších koncentracích, než byla koncentrace letální pro kontrolní rostliny a také pro rostliny s genem *merApe9*. U rostlin obsahujících pouze transgen *merBpe*, byl při takovýchto koncentracích zaznamenán pozvolný růst, ale velmi rychlý úhyn. Volatilizace opět korelovala s rezistencí, ale množství volatilizované rtuti bylo osmdesátkrát menší, než u transgenních rostlin s *merApe9* (Bizily et al., 2000).

Další pokusy byly prováděny na základě chloroplastové transformace. I s touto metodou bylo dosaženo vysoké tolerance ke rtuti. Ve své studii byly transformovány chloroplasty rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*). Byla použita mikrobiologická metoda, při níž byl nejdříve vložen konstrukt s operonem, původem z *Escherichia coli*, nesoucí opět geny *merA*

a merB. Ty byly pod kontrolou promotoru genu Prn, pro 16S ribosomální RNA. Operon byl ohraničen specifickými sekvencemi, které byly homologické s genomem chloroplastu. To vedlo k jeho přesnému začlenění. Takto upravené rostliny byly schopné růst při osmkrát vyšší koncentraci fenyloctanu rtuťnatého, než byla letální koncentrace pro kontrolní rostliny. U modifikovaných linií *N. tabacum* se u žádné z koncentrací neprojevil úbytek hmotnosti rostlinné sušiny. Naopak u kontrolních rostlin se hmotnost sušiny zmenšovala se zvětšující se koncentrací fenyloctanu rtuťnatého (Ruiz et al., 2003).

Díky těmto metodám, využívajícím bakteriální geny merA a merB, nebo jejich kombinace, byly vytvořeny linie rostlin schopné odolávat i velmi vysokým koncentracím rtuti. Jejich odolnost je samozřejmě podmíněna druhem toxické formy rtuti (organicky vázané nebo iontové) a jejich proměnou, za vzniku méně toxické plynné formy Hg^0 . Ta je poté difúzí volatilizována do ovzduší. Tím se však problém se rtutí nevyřeší, protože zůstává v prostředí a může být poměrně jednoduchým způsobem přeměněna zpět na toxickou formu (Ruiz et al., 2011).

Takto emitovaná rtuť se vyskytuje v atmosféře pouze ve třech anorganických formách. První je elementární Hg^0 , další je reaktivní plynná rtuť (pro níž se používá zkratka RGM) a partikulární rtuť, která je absorbovaná na částice nebo přímo v nich obsažená. Nejvíce zastoupenou plynnou formou rtuti v atmosféře je elementární rtuť, tedy Hg^0 , tvoří přibližně 90 % z celkové koncentrace rtuti. Tato forma je poměrně málo reaktivní. Velice reaktivní jsou však formy rtuti RGM. Ty sice zastupují pouze asi 3% celkového obsahu rtuti, ale pro svou reaktivnost jsou mnohem nebezpečnější. Jde o sloučeniny jako například $HgCl_2$ v plynné formě. Část těchto sloučenin je obsažena v atmosférických vodách (Schroeder et al., 1991). Nejméně zastoupenou formou rtuti v atmosféře je partikulární rtuť, jejíž obsahy se ve znečištěných oblastech pohybují okolo 0,3–0,9% z celkové koncentrace rtuti. Globální cyklus rtuti a depozice jsou významně ovlivněny formami výskytu rtuti a jejich vzájemnými chemickými transformacemi. Elementární forma rtuti (Hg^0) může vydržet, vzhledem ke své nízké reaktivnosti, v atmosféře 1–2 roky. Za tu dobu může být transportována na velké vzdálenosti. Atmosféru opouští ve formě suché depozice. Formy RGM setrvávají v atmosféře poměrně krátkou dobu, tedy několik týdnů, některé dokonce pouze několik dní. Forma depozice je suchá i mokrá. Partikulární forma rtuti je pak deponována velmi rychle a nejčastěji v blízkosti zdroje znečištění.

Protože mají půdy značnou kapacitu pro ukládání rtuti, jsou z dlouhodobého hlediska zdrojem kontaminace rtutí pro malé vodní zdroje. Například v lesních ekosystémech je až 90 %

rtuti uloženo právě v půdě, ve vegetaci je jí obsaženo jen minimum. Nejvíce rtuti je pak uloženo v minerální půdě. Jelikož je rtuť v půdě zadržována poměrně dlouhou dobu, zabraňují půdy akutní kontaminaci vodních toků (Grigal, 2003). Retence rtuti u půdních ekosystémů se stejně jako u ostatních ekosystémů liší podle zastoupení půdních typů. Koncentrace v povrchových organických horizontech jsou výrazně vyšší, než v hlubších minerálních horizontech. Pro území střední Evropy bylo stanoveno rozmezí 300–900 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro svrchní půdní organické horizonty (Grigal, 2003), pro území České republiky to pak bylo 300–2200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. V jednotlivých ekosystémech hrají půdy poměrně významnou roli z hlediska dynamiky a osudu deponované rtuti. V povodích například hraje důležitou roli procentuální zastoupení mokřin, tloušťka půdního profilu, svažitost, pH, vegetační typ a obsah organického uhlíku v půdě. Nejkontaminovanější půdy se pak nacházejí v oblastech středočeského kraje. Je to dáno zejména chemickým průmyslem, výrobou chlóru a cementu, spalováním odpadů a v neposlední řadě i historickou metalurgií.

Nejúčinnější metodou pro získávání stanovení speciace rtuti v pevných vzorcích se jeví termo-desorpční analýza (TDA). Tato metoda spočívá v postupné pyrolýze vzorku, při níž se sledují v čase uvolňované koncentrace rtuti v závislosti na teplotě (Biester et Scholz, 1996). Z této metody lze i určit i formy rtutí, které se uvolňují, protože každá z forem se uvolňuje při odlišné teplotě.

Pro možnosti zkoumání rtuti v půdách i v životním prostředí je důležité znát formu rtuti vyskytující se v daném území a jednotlivých lokalitách. Podle formy rtuti se dá odhadnout její přístupnost pro rostliny, možnosti mobilizace nebo methylace.

Oproti atmosférickým depozicím většiny ostatních prvků se ty u rtuti liší především tím, že probíhají ve formě suché depozice. Z velké části je například elementární forma rtuti zachycována asimilačními orgány rostlin (Miller et al., 2005). Mokrá depozice je pak na daném místě několikrát menší, než suchá.

Redoxní transformace rtuti z $\text{Hg}^{+\text{II}}$ na Hg^0 byla poměrně podrobně zkoumána. Tento proces ukazuje hlavní cyklus rtuti mezi půdou a atmosférou, stejně jako limitující koncentrace zbývající dvojmocné rtuti v půdě, která je poté transportována do podzemních vod nebo využita k methylaci. Kromě toho některé zdroje uvádí, že v anoxickém prostředí (redukční médium), sorpce železa ($\text{Fe}^{+\text{II}}$) na minerální podklad může zvýšit rychlost redukce rtuti v půdě (Charlet et al., 2002). Dvojmocné železo je pak považováno za hlavní prvek v médiu.

Pro studium vlivu Fe na syntézu Hg^0 byly zkoumány dva půdní prvky jako doplňkový experiment. První z nich byl vápník (Ca), který představuje důležitý prvek půdy a druhým prvkem je železo, protože jeho přítomnost v půdě již prokázala redukci Hg^{+II} na Hg^0 (Charlet et al., 2002). Výsledky ukazují, že množství extrahovaného Ca se zvyšuje se zvyšující se koncentrací thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), za současného poklesu koncentrace Fe^{+II} (Charlet et al., 2002).

4 Metodika

4.1 Půdy a jejich vlastnosti

Pro experiment byly vybrány dva typy půdy s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi:

- nekontaminovaná černoze z lokality Suchdol (50°7'40''N, 14°22'33''E) s kationtovou výměnnou kapacitou 230 mmol.kg⁻¹, pH 7,5 a s podílem oxidovatelného uhlíku na úrovni 2,6 %. Textura půdy byla vyhodnocena jako prachovito hlinitá s podílem 2,18 % jílu, 71,80 % naplavenin (sedimentů) a 26,03 % písku. Biologicky dostupné podíly základních živin, fosforu (P), hořčíku (Mg), draslíku (K) a vápníku (Ca) byly stanoveny metodou podle Mehlicha (1984) a jejich hodnoty jsou následující: 91 mg.kg⁻¹ P, 240 mg.kg⁻¹ Mg, 230mg.kg⁻¹ K a 9000 mg.kg⁻¹ Ca;
- nekontaminovaná luvize z lokality Červený Újezd (50°4'22''N, 14°10'19''E) s kationtovou výměnnou kapacitou mmol.kg⁻¹, pH 6,5 a s podílem oxidovatelného uhlíku na úrovni 1,7 %. Textura půdy byla stejná jako u prvního typu, ovšem s rozdílnými obsahy. Jílu bylo 5,38 %, sedimentů 68,14 % a 26,48 % písku. Obsahy živin byly 100 mg.kg⁻¹ P, 110 mg.kg⁻¹ Mg, 80 mg.kg⁻¹ K a 3600 mg.kg⁻¹ Ca.

Oba půdní typy byly odebírány z hloubky 20 cm, hned poté byly homogenizovány, prošly přes 5 mm síto a ponechány v pokojové teplotě, dokud nebyly použity k experimentu.

Tento experiment byl proveden pro posouzení dopadu rtuti na mikrobiální aktivitu a biologické vlastnosti půdy. Půda byla ještě jednou prošeta, tentokrát přes 2 mm síto, a od každého typu půdy bylo do polypropylenových nádob odebráno přesně 100 g vzorku. V těchto nádobách byly vzorky nasyceny na 60 % vlhkost. Polovina vzorků byla poté uměle kontaminována rtuť přídáním 60 mg HgCl₂, takže výsledná koncentrace rtuti v půdě dosahovala hodnoty 440 mg.kg⁻¹. Následně byly do obou typů půdy přidány ještě digestát a popel ze spalování biomasy, jako materiály, které mohou být mimo jiné použity pro zlepšení zásobenosti půdy živinami, ale jsou i testovány v případě omezení mobility rizikových prvků v půdě (Ochecová et al. 2014, Fernández-Delgado Juárez et al. 2013, Vaneeckhaute et al. 2013). Úletový popel (pH 12,1) byl odpadním materiálem ze spalování dřevní štěpky ve dvou kotlích o výkonu 1,8 MW a 0,6 MW. Vzorek digestátu (pH 8,2) pocházel z bioplynové stanice o výkonu 1732 kW/h, ve které je rozkládána směs cukrovarských řízků (50%), výlisků z ovoce (42%), a silážní kukuřice (8%). Obsahy makro a mikroelementů v obou materiálech shrnuje tabulka 2. Z tabulky je zřejmé, že oba materiály obsahují vysoké koncentrace síry. Dávky obou

materiálů tedy byly odvozeny dle obsahu síry tak, aby dávka odpovídala hodnotě 600 mg síry na kg půdy. Přidávali jsme tedy do příslušných pokusných nádob 10 g digestátu nebo 1,5 g popela.

prvek	popel	digestát
P (%)	1.29±0.01	1.20±0.01
K (%)	7.74± 0.02	2.12±0.01
Mg (%)	1.44±; 0.02	0.49±0.02
Ca (%)	13.4±0.1	3.15±0.01
S (%)	4.07±0.01	0.60±0.01
Cu (%)	0.020±0.001	0.004±0.001
Fe (%)	2.79±0.01	0.18±0.01
Mn (%)	1.29±0.01	0.02±0.00
Zn (%)	3.58±0.08	0.03±0.00

Tab. 2: Celkový obsah živin v použitých meliorantech (Gacia-Sánchez et al., 2014).

Výsledné schéma tedy představuje šest pokusných variant pro každý typ půdy dle následujícího schématu:

- S₁/ S₂: černozem/ luvizem;
- S₁ Hg/ S₂ Hg: 440 mg.kg⁻¹ HgCl₂;
- S₁D/ S₂D: digestát;
- S₁D Hg/ S₂D Hg: 440 mg.kg⁻¹ HgCl₂ + 600 mg.kg⁻¹ digestátu;
- S₁A/ S₂A: popel;
- S₁A Hg/ S₂A Hg: 440 mg.kg⁻¹HgCl₂ + popel.

Všechny takto provedené půdní vzorky byly inkubovány při 28 °C po dobu 21 dní. Pro vyhodnocení vlivu rtuti a interakci mikrobiologické aktivity v obou půdách, byly jednotlivé vzorky odebírány po 1, 7, 14 a 21 denní inkubaci. Jednotlivé varianty pokusu byly provedeny ve třech opakováních.

4.2 Použité chemikálie a metody

Půdní pH bylo měřeno pH metrem (Crison mikro pH) ve výluhu 0,01 M roztoku CaCl₂, který byl třepán po dobu jedné hodiny. Celkový rozpustný uhlík a dusík byly stanovovány také v 0,01 M roztoku CaCl₂, a to v poměru 1:10 (hmotnost: objem), třepány po dobu dvou hodin při pokojové teplotě a následně odstředěny při 3000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. Celkový rozpustný uhlík a dusík byly pak stanovovány pomocí automatizovaného systému

SKALAR SANplus s kontinuálním průtokovým segmentačním analyzátozem (Skalar, Holandsko). Pro kvantifikaci celkového rozpustného uhlíku se nejprve vzorek okyselí roztokem kyseliny sírové a probublává dusíkem. Tím se uvolňuje jakákoliv anorganická nebo těkává organická forma uhlíku. Roztok vzorku se pak ještě mísí s činidlem persíranu tetraboritého a vystaví působení UV záření. Tento proces oxiduje organický uhlík na oxid uhličitý, který je potom vyloučen z roztoku probubláváním. Množství oxidu uhličitého bylo měřeno infračervenou detekcí. V případě celkového rozpustného dusíku se vzorek smísí s boraxovým pufrem. Po promíchání se přidá persíran draselný a směs se vystaví UV záření. Dusičnany se určují Griessovou metodou po redukci dusičnanů na dusitany buď kademnato-měďnatým činidlem, nebo roztokem síranu hydrazinu. Absorbance pak byla měřena spektrofotometricky při 540 nm.

4.3 Uhlík mikrobiální biomasy

Biologické parametry byly stanoveny pro každé ze šesti opakování, které byly odebrány v různých časech inkubace. Uhlík z mikrobiální biomasy byl stanoven metodou fumigace, to znamená extrakcí chloroformem: 10 g půdního vzorku bylo umístěno do vakuového fumigátoru a vystaveno chloroformovým parám po dobu 24 hodin. Z těch to vzorků se pak extrahuje celkový organický uhlík za použití 0,5 M roztoku K_2SO_4 v poměru 1:4 (hmotnost: objem). Poté se vzorky třepou po dobu jedné hodiny podle metody navržené v práci Mingorance et al. (2007). Množství uhlíku z mikrobiální biomasy bylo vypočítáno jako rozdíl obsahu fumigovaných a nefumigovaných vzorků (ES) pomocí koeficientu K_{ec} ($C = E_c / K_{ec}$). Hodnota K_{ec} použitá pro výpočet uhlíku z mikrobiální biomasy (C) se rovná 0,45 (Wu et al., 1990).

4.4 Nitrifikace

Obsahy $N-NH_4^+$ a $N-NO_3^-$ byly stanoveny v extraktu zeminy 0,01 M roztokem $CaCl_2$ v poměru 1:10 (hmotnost: objem) stejným postupem jako u celkového rozpustného uhlíku a dusíku. Stanovení $N-NH_4^+$ a $N-NO_3^-$ byla provedena kontinuálním průtokovým segmentačním analyzátozem a kolorimetrickou metodou na přístroji SKALAR SANplus SYSTEM (Skalar, Holandsko). Postup pro kvantifikaci obsahů NH_4^+ je založen na modifikované Berhelotově reakci, kde amoniak chlorovaný na monochloramin reaguje se salicylátom za vzniku 5-aminosalicylátu. Po oxidaci vznikne zelená komplexní sloučenina. Absorbance vzniklého komplexu byla měřena při 660 nm. Dusičnany byly stanoveny metodou redukce kadmia. Vzorek se nechá projít přes sloupec obsahující granulovaný měďnato-kademnatý substrát, kde se redukuje na dusitan. NO_3^- byl kvantifikován diazotací se sulfanilamidem a následnou reakcí

s α -naftyl ethylendiamid dihydrochloridem za vzniku hodně zbarveného azobarviva, které se měří na vlnové délce 540 nm.

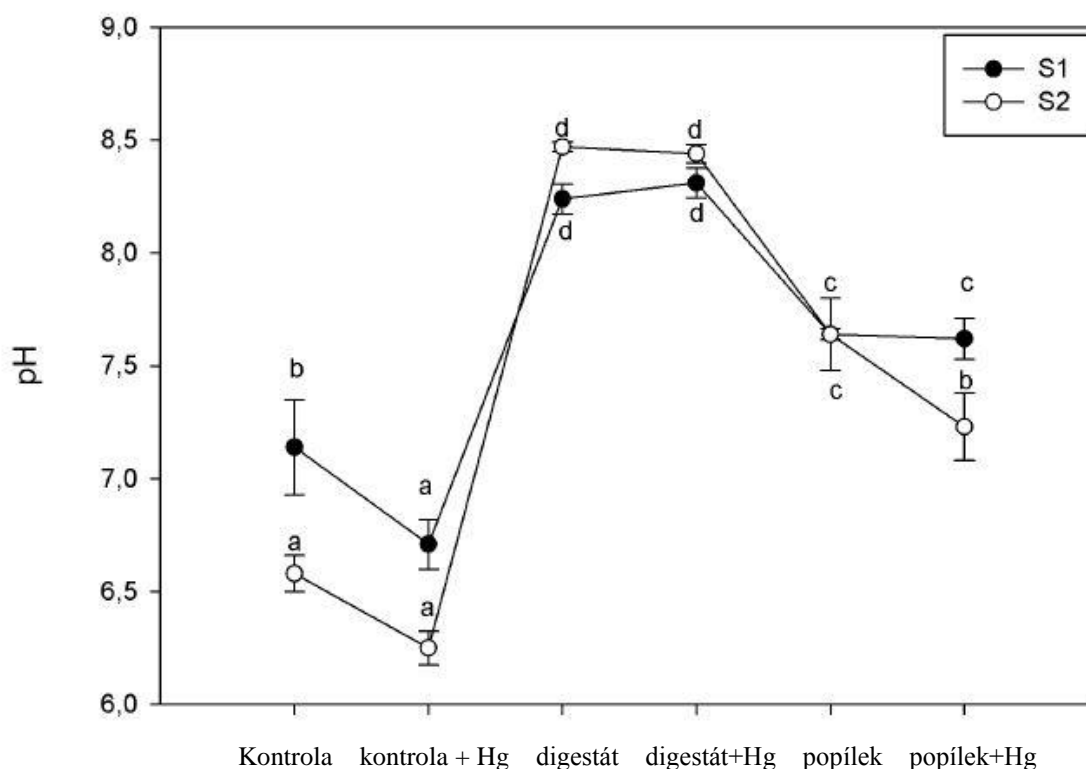
4.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru SPSS 17.0. Data byla analyzována pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Pro vyhodnocení vzorků mezi sebou, ale i s kontrolními vzorky byl použit post hoc Dunnettův test (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$) a Tukeyův test ($P \leq 0.05$). Pro posouzení vztahů mezi proměnnými byla použita lineární regresní analýza s aplikací Pearsonových korelačních koeficientů.

5 Výsledky

5.1 Změna půdního pH

Hodnota pH u černozemě (S_1) byla na začátku pokusů neutrální, zatímco u luvizemě (S_2) bylo naměřeno kyselé pH. U kontaminovaných vzorků obou typů půd rtuť, se hodnoty pH měřily pouze u vzorků s 21 denní inkubací (Graf 1). U černozemě (S_1 Hg) se pH výrazně snížilo, zatímco u luvizemě (S_2 Hg) nebyl pozorován výrazný rozdíl hodnot před inkubací a po ní. Po přidání digestátu se pH zvýšilo u obou typů půd, tedy ve vzorcích S_1 D i S_2 D v porovnání s kontrolními vzorky půdy (S_1 a S_2). Přidání digestátu do rtuť kontaminovaných vzorků (S_1 D Hg a S_2 D Hg) vedlo po 21 denní inkubaci k odlišným hodnotám pH od S_1 Hg a S_2 Hg (tedy odlišným od vzorků, které byly kontaminované pouze rtuť). Nebyly však pozorovány žádné rozdíly ve vztahu k S_1 D a S_2 D. Aplikace popílku vyvolala zvýšení pH u obou typů půd (S_1 A i S_2 A) u druhého typu půd došlo k výraznějšímu zvýšení, než u prvního. V obou půdách zvýšil hodnotu pH i popílek přidáný k půdám kontaminovaných Hg, a to jak ve vzorku S_1 A Hg, tak i v S_2 A Hg. Nicméně toto zvýšení bylo mnohem výraznější u S_1 A Hg, tedy u prvního typu půdy. Stejně tak rozdíl v hodnotách pH nebyl příliš výrazný mezi kontrolním vzorkem (S_1) a vzorkem kontaminovaným rtuť s příměsí popílku (S_1 A Hg). U vzorku S_2 A Hg bylo pH o něco nižší, než v kontrolním vzorku (S_2) (graf 1).



Graf 1.: Průměrné hodnoty pH u všech typů vzorků

5.2 Celkový rozpustný uhlík a dusík

5.2.1 Černozem

U prvního typu půdy, tedy u černozemě nebyly pozorovány změny v obsazích celkového rozpustného uhlíku a dusíku v kontaminovaných a nekontaminovaných vzorcích (S_1 a S_1 Hg). Celkový obsah rozpustného uhlíku se zvýšil po přidání digestátu, a to u vzorků s 1, 7, 14 denní kontaminací. Naopak u vzorků s 21 denní kontaminací byl zaznamenán mírný pokles. Toto zvýšení je poměrně významné vzhledem ke kontrolním vzorkům půdy (S_1), a to pro všechny délky inkubace. Nebyly nalezeny žádné změny v obsahu celkového rozpustného dusíku u žádného vzorku (vzhledem k délce inkubace); pouze u 7 denních vzorků s příměsí digestátu byl obsah nepatrně rozdílný, což je ale výsledek, který není pro provedený výzkum nijak významný. Nicméně bylo zjištěno, že došlo k výraznému zvýšení celkového obsahu rozpustného dusíku u 1, 7 a 21 denních vzorcích (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$). Podobnou reakci vyvolala inkubace rtuti v půdě s příměsí digestátu na obsah celkového rozpustného uhlíku v porovnání s kontrolním vzorkem S_1D . Obsah celkového rozpustného dusíku poklesl u 21 denní kontaminace, pozorovali jsme ale zvýšení u 1 a 7 denní inkubace (** $P \leq 0,01$). Použití popílku nemělo vliv na zvýšení celkového rozpustného uhlíku a dusíku. Mírné zvýšení bylo pozorováno pouze u vzorků se 14 denní kontaminací (S_1A Hg) (tab. 3).

5.2.2 Luvizem

Obsah celkového rozpustného uhlíku a dusíku u druhé typu půdy (S_2) vzrostl pouze u vzorku se 14 denní koncentrací. Přítomnost rtuti významně neovlivňovala obsahy celkového rozpustného uhlíku a dusíku. Celkový rozpustný uhlík vykazoval nárůst jen po 14 denní kontaminaci rtutí. Změny v obsahu celkového rozpustného uhlíku nebyly pozorovány ani při srovnání s nekontaminovanými vzorky. Obsah celkového rozpustného dusíku se však významně snížil u 14 denních vzorků (** $P \leq 0,01$). Na druhou stranu vykazovaly vzorky s příměsí digestátu vysoké obsahy obou prvků. Celkový rozpustný uhlík v 1, 7, 14 i 21 dnech po aplikaci, v případě celkového rozpustného dusíku to bylo u vzorků s 1 a 7 denní kontaminací. Významné rozdíly byly pak pozorovány v porovnání se vzorky S_2 (nekontaminované rtutí). Ihned po jejím přidání a během všech délek inkubace se obsah měnil, s výjimkou 14 a 21 denní inkubací v případě celkového rozpustného dusíku (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) (tab. 4). Přidání rtuti do vzorku S_2D vykazovalo podobné výsledky v obsazích prvků jako u S_2D bez rtuti. Přidání popílku zvýšilo obsah celkového rozpustného uhlíku ve vzorcích se 14 denní koncentrací, zatímco obsah celkového rozpustného dusíku byl pozorován, ale ne razantně. Obecně tedy platí,

že aplikace popílku nevyvolala významné změny v porovnání s kontrolními vzorky půdy (S_2) (tab. 4). Kontaminace rtutí pak vyvolala podobné výsledky v obsazích rozpustného uhlíku a dusíku jako půda s příměsí pouze popílku (S_2A).

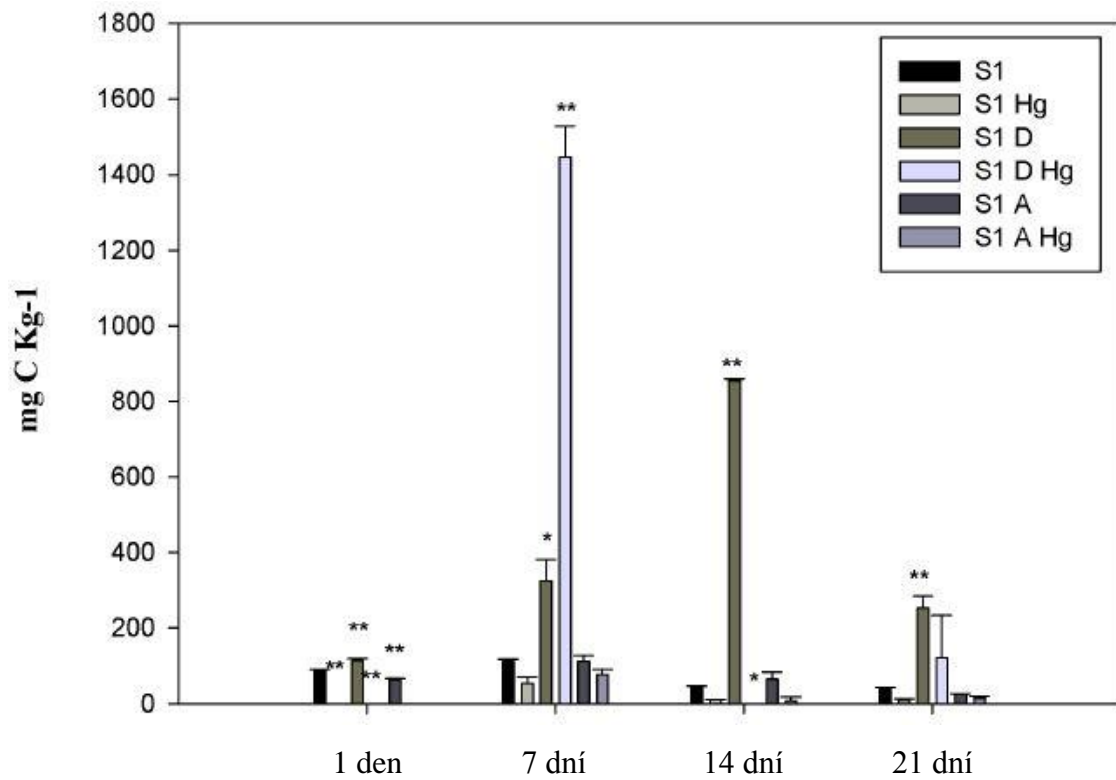
5.3 Uhlík mikrobiální biomasy

5.3.1 Černozem

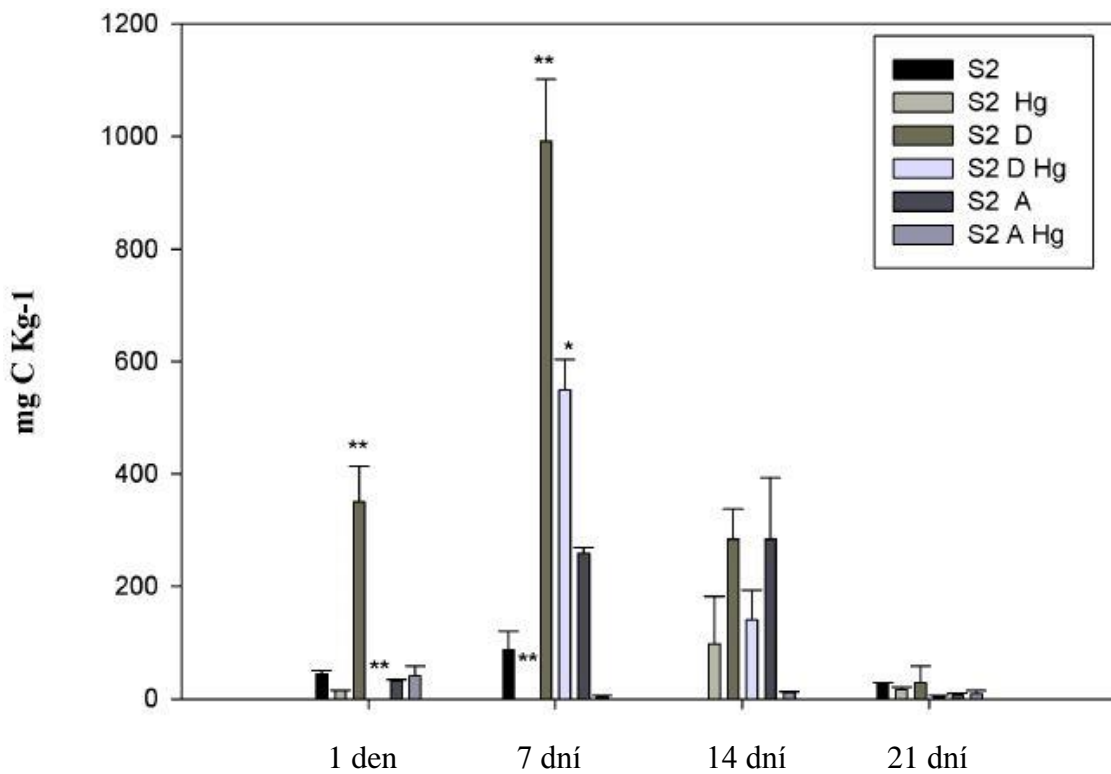
Kvantifikace uhlíku mikrobiální biomasy neodhalila signifikantní změny v žádném ze vzorků prvního typu půdy (S_1), s ohledem na časy inkubace. Stejně tak ve rtuť kontaminovaných vzorcích (S_1Hg) nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi dobou inkubace. Obsah uhlíku mikrobiální biomasy byl pouze výrazně snížen u vzorku s jednodenní inkubací, a to dokonce tak výrazně, že klesl pod detekční limit (Graf 2). Podle očekávání pozitivně zvýšila obsah mikrobiálního uhlíku aplikace digestátu, a to v 1, 7, 14 i 21 denních vzorcích. Stejně tak byly pozorovány významné rozdíly ve vztahu ke vzorkům půdy v nezměněné podobě (** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$). Přítomnost rtuť ve vzorcích s digestátem ($S_1D Hg$) vyvolala výkyvy v obsazích mikrobiálního uhlíku, a to především u 7 a 21 denních vzorcích, kde byla naměřena vyšší hladina uhlíku, než u 1 a 14 denní inkubace. U 7 a 21 denní inkubace se hodnoty výrazně lišily v porovnání se vzorky půdy s obsahem rtuť (S_1Hg) a s digestátem (S_1D). Po přidání popílku se nezvýšily hodnoty obsahu mikrobiálního uhlíku v žádném vzorku a čase inkubace. Dokonce již u jednodenních vzorků byl pozorován pokles mikrobiálního uhlíku v porovnání v nekontaminovanou půdou (S_1). Podobný trend byl nalezen u rtuť kontaminované půdy s popílkem ($S_1A Hg$) (graf 2).

5.3.2 Luvizem

V nekontaminovaných vzorcích druhého typu půdy (S_2) nevykazovaly hodnoty mikrobiálního uhlíku žádné změny v žádné z délek inkubace. Ani vzorky se rtuť (S_2Hg) nevykazovaly výrazné změny. Pozitivní efekt byl zaznamenán u vzorků s digestátem, kdy se jeho přítomnost výrazněji projevila u vzorků 1 a 7 denní inkubace (** $P \leq 0.01$). Přítomnost rtuť ve vzorcích s digestátem ($S_2D Hg$) vyvolala změny v obsahu mikrobiálního uhlíku během všech délek inkubace. Nebyla totiž zjištěna stanovitelná hodnota mikrobiálního uhlíku ve vzorcích s 1 denní délkou inkubace (** $P \leq 0.01$), ale již od 7 denních vzorků bylo zaznamenáno výrazné zlepšení (* $P \leq 0.05$). Přidáním popílku nebyly zjištěny změny od vzorků S_2 , pouze po 7 dnech inkubace se zvýšil obsah uhlíku. Stejně tak neovlivňuje obsah mikrobiálního uhlíku rtuť ve vzorcích s popílkem ($S_2A Hg$) u žádné z délek inkubace ve vztahu k $S_2 Hg$ (graf 3).



Graf 2.: Hodnoty obsahu uhlíku z mikrobiální biomasy u černožemě/časy inkubace



Graf 3.: Hodnoty obsahu uhlíku z mikrobiální biomasy u luvizemě/časy inkubace

5.4 Obsah N-NH₄⁺ a N-NO₃⁻

5.4.1 Černozem

Obsahy N-NH₄⁺ a N-NO₃⁻ se v závislosti na době inkubace v prvním typu půdy (S₁) neměnily. Podobné výsledky byly pozorovány také ve rtuť kontaminované půdě (S₁Hg), což ukazuje tabulka 5. V obsazích N-NH₄⁺ a N-NO₃⁻ tedy nebyly pozorovány rozdíly mezi půdou nekontaminovanou a kontaminovanou. Nicméně po aplikaci digestátu byl zaznamenán vyšší obsah NH₄⁺ u vzorků se 14 a 21 denní inkubací. Toto zvýšení bylo také významné s ohledem na nekontaminovanou půdu (S₁) (** P≤ 0.01).

Zatímco N-NO₃⁻ dosahoval nejvyšší úrovně po 1 a 7 denní kontaminaci, což je statisticky významné v porovnání s nekontaminovanou půdou (S₁) (*P≤0.05; ** P≤0,01), N-NH₄⁺ vykazoval nejvyšší obsahy po 14 a 21 denní inkubaci ve rtuť kontaminované půdě (S₁Hg). Významné rozdíly však byly pozorovány u 1, 7, a 21 denní inkubace v porovnání s (S₁Hg) (** P≤ 0,01). Ve rtuť kontaminované půdě se obsah N-NO₃⁻ změnil po přidání digestátu, a to pouze u jednodenní inkubace ve vztahu k S₁Hg. Po použití popílku nebyly pozorovány žádné změny v obsazích dusíku a to jak u nekontaminovaných vzorků, tak u rtuť kontaminovaných vzorků (tab. 5).

5.4.2 Luvizem

Obsah N-NH₄⁺ a N-NO₃⁻ byl ve druhém typu půdy (S₂) pozorován po 14 a 21 denní inkubaci, u rtuť kontaminovaných vzorků (S₂Hg) sice ke změnám došlo, ale ne k podstatným. Nicméně ve rtuť kontaminovaných vzorcích byl obsah N-NO₃⁻ snížen po 14 a 21 denní inkubaci (** P≤0.01; * P≤0.05) v porovnání s nekontaminovanou půdou (S₂) (tab. 6). Přidání digestátu do luvizemě vyvolalo zvýšení obsahu N-NH₄⁺, zejména pak ve vzorcích po 14 a 21 denní inkubaci. Ve vzorcích po 21 denní inkubaci byl pak pozorován významný rozdíl v obsahu N-NH₄⁺ v porovnání se základním vzorkem (S₂) (** P≤0.01). Na druhou stranu obsah N-NO₃⁻ se po přidání digestátu výrazně neměnil. Pouze u 14 a 21 denní kontaminaci jeho obsah prudce poklesl v porovnání s S₂ (**P≤0.01). Přítomnost digestátu ve rtuť kontaminovaných vzorcích (S₂D Hg) vyvolala nárůst obsahu N-NH₄⁺ u 14 a 21 denní expozice. Výrazně zvýšená hladina N-NO₃⁻ byla pozorována u 1 denní expozice, zatímco u 7, 14 a 21 denní expozice se obsah N-NO₃⁻ výrazně snížil. V porovnání se vzorky S₂Hg (tab. 6) se ukázal významný rozdíl v obsazích (** P≤0.01). Přidání popílku sice vyvolalo zvýšení N-NH₄⁺, nebylo však nijak významné. Podobný trend byl pozorován u rtuť kontaminovaných půd (S₂A Hg). Hladina N-NO₃⁻ se však po přidání popílku zvýšila u 7, 14 a 21 denní inkubace v porovnání s S₂ (tab. 6). Přídavek popílku

ve rtuťí kontaminované půdě nevyvolal významné změny v obsahu N-NO₃⁻ během doby inkubace. Pouze u 14 denní inkubace se hladina obsahu významně snížila v porovnání s nekontaminovanou půdou (S₂) (** P≤0.01).

Tab. 3: Obsahy celkového rozpustného C a N u černozemě (S₁) a u rtuť kontaminované půdy (S₁ Hg); půdy s příměsí digestátu (S₁D) a půdy kontaminované rtuť (S₁D Hg); půdy s popílkem (S₁A) a půdy kontaminované rtuť (S₁A Hg) po 1, 7, 14 a 21 denní expozici.

	1 den		7 dní		14 dní		21 dní	
	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N
S ₁	87,70±1012a	47,94±8,86ab	128,72±12,63ab	56,18±4,47ab	253,92±22,82ab	120,07±19,90abc	113,93±12,49ab	136,31±37,17abcd
S ₁ Hg	85,10±6,62a	29,99±4,49a	113,06±2,63ab	63,20±11,26ab	228,49±6,21ab	85,60±12,29abc	104,55±7,85ab	24,40±15,38a
S ₁ D	907,29±151,5cde**	663,23±190,79def**	994,05±116,01d**	1030,06±186,56f**	1846,73±189,83f**	574,13±86,01bcdef	613,14±72,28abcd**	613,79±242,41cdef*
S ₁ D Hg	991,59±39,91de**	778,55±98,13ef**	1086,36±48,58de**	585,87±39,27cdef**	1424,55±38,52ef**	518,72±119,48abcdef	582,47±24,82abcd**	337,43±19,89abcde
S ₁ A	90,99±11,89ab	68,58±46ab	127,49±7,06ab	167,87±93,01abcd	282,29±31,76abc	129,38±28,07abcde	146,17±15,13ab	124,38±4,79abcd
S ₁ A Hg	88±7,24a	23,43±1,12a	129,20±7,12ab	69,88±18,68ab	725,26±489,38bcd	344,16±241,76abcd	112,46±,32ab	49,34±9,73ab

Hodnoty představují průměr (±SE) ze tří opakování (n=3). V každém vzorku dat (*,**) představují statisticky různé hodnoty, na základě Dunnetova testu (**P≤0,01; *P≤0,05). Jednotlivá písmena představují významné rozdíly mezi opakováními podle Tukeyova testu (* P≤0.05).

Tab. 4: Obsahy celkového rozpustného C a N u luvizemě (S₂) a u rtuťi kontaminované půdy (S₂ Hg); půdy s příměsí digestátu (S₂D) a půdy kontaminované rtuťi (S₂D Hg); půdy s popílkem (S₂A) a půdy kontaminované rtuťi (S₂A Hg) po 1, 7, 14 a 21 denní expozici.

	1 den		7 dní		14 dní		21 dní	
	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N	Rozpustný C	Rozpustný N
S ₂	18,96±2,56a	12,14±0,32a	134,63±15,80ab	101,53±16,86ab	464,60±151,78cd	424,15±49,23fg	114,58±9,80ab	157,44±46,30abcd
S ₂ Hg	69,56±53,48ab	31,67±24,13a	122±4,13ab	117,27±3,80abc	371,96±15,08bcd	116,52±30,97abc**	110,67±8,90ab	62,02±16,26ab
S ₂ D	152,21±55,35ab*	75,66±19,21abc**	1159,68±97,29e**	365,96±46,64efg*	1409,79±37,71e**	448,71±83,45f	646,52±47,65d**	260,77±19,46cdef
S ₂ D Hg	46,99±3,44a	131,60±18,13abc**	1146,25±207,17e**	333,05±105,30defg*	1365,80±51,41e**	441,11±48,06f	529,94±38,39d**	237,60±28,72bc
S ₂ A	10,02±3,52a	9,84±2,30a	172,87±28,02abc	134,33±9,61abc	445,33±24,69cd	157,26±4,76abcd	130,47±9,19ab	140,45±9,42abcde
S ₂ A Hg	11,79±2,47a	5,80±0,90a	130,97±7,48ab	74,28±8,56abc	452,22±20,90cd	67,16±24,55abc	120,39±4,40ab	82,18±19,36abc

Hodnoty představují průměr (±SE) ze tří opakování (n=3). V každém vzorku dat (*,**) představují statisticky různé hodnoty, na základě Dunnetova testu (**P≤0,01; *P≤0,05). Jednotlivá písmena představují významné rozdíly mezi opakováními podle Tukeyova testu (* P≤0,05).

Tab. 5: Obsahy N-NH₄⁺ a NO₃⁻ u černozemě (S₁) a rtuťí kontaminovaných půd (S₁Hg); půdy s příměsí digestátu (S₁D) a půdy kontaminované rtuťí (S₁D Hg); půdy s popílkem (S₁A) a půdy kontaminované rtuťí (S₁A Hg) po 1, 7, 14 a 21 denní expozici.

	1 den		7 dní		14 dní		21 dní	
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
S₁	6,053±0,37a	29,18±2,24a	14,55±1,46a	33,93±4,09a	50,04±21,34ab	60,05±3,75a	61,06±26,19ab	74,18±22,38a
S₁Hg	12,26±1,77a	13,73±6,11a	45,17±6,21ab	5,73±3,38a	72,44±12,26ab	8±0,88a	62,22±14,87ab	14,88±6,23a
S₁D	13,47±0,94a	462,31±135,99b**	38,36±2,32a	732,10±132,62c**	263,10±63,21bcd*	109,37±90,26a	417,55±116,33de**	31,17±24,67a
S₁D Hg	20,31±9,46a	569,62±91,38bc**	179,91±48,3abc**	183,57±34,02a	301,53±96,61cd	48,78±12,14a	524,72±83,67e**	22,02±16,21a
S₁A	4,46±0,88a	46,61±34,92a	13,71±3,12a	50,12±14,07a	55,99±20,86ab	53,96±4,25a	49,86±19,90ab	61,74±4,59a
S₁A Hg	10,97±0,60a	12,88±4,30a	33,66±4,78a	17,59±10,94a	67,67±8,42ab	28,53±19,38a	54,53±18,87ab	20,61±9,61a

Hodnoty představují průměr (±SE) ze tří opakování (n=3). V každém vzorku dat (*,**) představují statisticky různé hodnoty, na základě Dunnetova testu (**P≤0,01; *P≤0,05). Jednotlivá písmena představují významné rozdíly mezi opakováními podle Tukeyova testu (* P≤0,05).

Tab. 6: Obsahy N-NH₄⁺ a NO₃⁻ u luvizemě (S₂) a rtuťí kontaminovaných půd (S₁Hg); půdy s příměsí digestátu (S₁D) a půdy kontaminované rtuťí (S₁D Hg); půdy s popílkem (S₁A) a půdy kontaminované rtuťí (S₁A Hg) po 1, 7, 14 a 21 denní expozici.

	1 den		7 dní		14 dní		21 dní	
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
S ₂	1,49±0,50a	5,71±0,72a	47,87±18,96ab	45,96±7,88abc	289±53,05bcd	64,47±18,58bcd	95,25±35,28abc	80,10±20,64cd
S ₂ Hg	7,16±3,63a	16,11±15,74ab	95,38±44,57abc	12,78±6,48ab	181,32±63,87abcd	8,70±0,82a**	92,88±19,06abc	31,10±8,59abc*
S ₂ D	10,58±5,15a	45,60±15,87bc*	157,14±62,64abcd	32,73±22,80abc	288,53±96,24bcd	4,78±1,75a**	397,55±120,75d*	3,37±0,46a**
S ₂ D Hg	10,38±8,58a	79,82±9,99cd**	167,69±75,62abcd	9,03±5,08a	314,17±58,29cd	3,17±0,20a**	289,58±86,79bcd	n.d#
S ₂ A	0,70±0,083a	5,25±2a	36,63±12,33ab	81,60±5,22cd	60,10±0,92abc	101,76±3,36d*	55,86±18,48abc	77,39±31cd
S ₂ A Hg	2,93±0,57a	0,30±0,05a	44,11±4,53ab	12,14±4,13ab	71,42±7,77abc	15,14±9,16ab**	66,31±18,17abc	36,40±13,24abc

Hodnoty představují průměr (±SE) ze tří opakování (n=3). V každém vzorku dat (*,**) představují statisticky různé hodnoty, na základě Dunnetova testu (**P≤0,01; *P≤0,05). Jednotlivá písmena představují významné rozdíly mezi opakováními podle Tukeyova testu (* P≤0.05), n.d# nestanoveno

6 Diskuse

Rtuť má obecně vysokou afinitu k huminovým kyselinám obsažených v organické hmotě půdy a stejně tak dobře redukuje obsah síry (Šípková et al., 2014). Použití meloirantů může představovat další zdroj huminových látek a síry, což by mohlo pomoci se stabilizací, případně imobilizací rtuti, čímž by došlo ke snížení její biologické dostupnosti. Použití digestátu a popílku jako organické a anorganické příměsi, které se liší ve svém chemickém složení (Tab. 2), poukazuje na různé kapacity pro imobilizaci rtuti u černozemě a luvizemě.

Obě zkoumané půdy (S_1 i S_2) se lišily svými hodnotami pH (neutrální a mírně kyselé), což může ovlivnit mobilitu rtuti. García-Sánchez et al. (2014) zjistili, že vyšší kapacitu pro imobilizaci rozpustné rtuti má černozem (S_1), než luvizem (S_2). Aplikace digestátu a popílku vyvolala u obou typů půd zvýšení hodnot pH, a to jak u půd kontaminovaných rtutí, tak i u nekontaminovaných. Vyšší vliv na zvýšení pH měla aplikace digestátu, než popílku. Janos et al. (2010) zaznamenali podobný výsledek, kde použití anorganických příměsí jako je létavý popílek nebo zeolit vedlo k mírnému zvýšení pH v půdě znečištěné těžkými kovy v porovnání s organickými příměsemi, což byl v tomto případě alkalický humát. Kromě toho se změna pH používá jako častý sanační postup u půd se zvýšenými obsahy prvků, protože většina prvků je méně rozpustná v alkalickém prostředí. Hodnota pH v půdě hraje klíčovou roli v mobilitě kovů. Mají vliv například na rovnováhu na bázi kyseliny a zásady, ovlivňují reakce na povrchu, kde se uskutečňují reakce kovových kationtů, iontové výměny a další reakce vázající kovy. Rozpustnost a vaznost kovů huminovými látkami je také ovlivněna půdním pH. Obecně platí, že vysoké hladiny pH indukují adsorpci kationtů kovů a snižují pohyblivost. Garau et al. (2007) pozorovali snížení mobility těžkých kovů po přidání vápna nebo červeného kalu (tj. alkalického odpadu ze zpracování bauxitu), a to v důsledku zvýšení pH půdy. Zvýšení pH půdy vyvolané přidáním příměsí lze přikládat zvýšením obsahu kationtů (Cavallaro et al., 1993).

Inkubace rtuti v obou typech půd nepřinesla ani v jedné z nich změnu rozpustného uhlíku a dusíku, a to v žádném z námi zkoumaných inkubačních časů. Vzájemný vztah mezi rtutí a dalšími půdními prvky byl již dříve popsán (Reis et al., 2010). Je zde však nedostatek informací o vlivu rtuti na obsahy celkového uhlíku a dusíku. Naše výsledky ukazují, že rtuť nemá na tyto změny obsahů vliv, nicméně je třeba zdůraznit, že imobilizace rtuti by mohla být ovlivněna makro- a mikro- prvky přítomnými v půdním vzorku. Studie provedená Šípkovou et al. (2014) například zjistila, že existuje negativní korelace mezi rozpustným podílem rtuti a obsahy hořčíku, manganu, železa a mědi. Reis et al. (2010) pozorovali, že vyšší podíl

rozpuštěné rtuti v půdě může být důsledek přítomnosti hliníku a manganu. Kromě toho je potvrzeno, že mangan má antagonistický účinek proti rtuti. Naopak obsah síry přispěl k zachování rtuti v půdní matici, což snižuje mobilitu kovů (Šípková et al., 2014).

Zvýšení obsahů celkového rozpustného uhlíku ve vzorcích půdy prvního typu (S_1) s příměsí digestátu, může být spojeno s jeho vysokým obsahem živin (tab. 2). Hodnoty dusíku se však nezměnily s výjimkou 7 denní inkubace, což by pravděpodobně mohlo být způsobeno nízkým obsahem dusíku v digestátu. Podobný výsledek pozorovali Juarez et al. (2012). Kromě zvýšení hladiny uhlíku zvyšuje digestát ještě makro- a mikro- prvky, zejména pak obsah síry (García-Sánchez et al., 2014). Přidání digestátu do půdních vzorků kontaminovaných rtutí (S_1D Hg), vyvolalo podobné výsledky jako u rtutí nekontaminovaných vzorků. Z toho vyplývá zapojení digestátu do imobilizace rtuti přes další zdroje obou huminových substancí a síry. Nízké koncentrace mobilní rtuti byly nalezeny pouze po jednodenní inkubaci (García-Sánchez et al., 2014). Na druhou stranu přítomnost rtuti nezměnila obsah celkového rozpustného uhlíku, čímž se ukazuje, že sledované agrochemické vlastnosti (organická hmota a živiny) nalezené u obou půd (S_1 i S_2), nehrají významnou roli ve změně celkového uhlíku. Hladina celkového rozpustného dusíku byla ovlivněna u 14 denní inkubační doby; toto zjištění může být spojeno s narušením průběhu cyklu dusíku, zprostředkovaném mikroorganismy jako důsledek negativního dopadu rtuti na mikrobiální společenstva půdy. Použití digestátu u druhého typu půdy (S_2) vykazovalo stejný dopad jako u prvního typu (S_1) v důsledku exogenního vstupu organické hmoty a živin, které mohou stimulovat cyklus uhlíku a dusíku půdními mikroorganismy.

Použití popela ze spalování dřeva představuje dobrý zdroj makro- i mikro- živin pro půdu (Demayer et al., 2001). V našem pokusu se tato skutečnost však neprojevila ani u jednoho typu půdy (S_1 ani S_2). Popílek totiž není v důsledku spalovacího procesu zdrojem uhlíku ani dusíku. Uhlík a dusík jsou totiž odpařovány a v popílku zůstávají pouze prvky jako fosfor, draslík, hořčík, síra, vápník, měď, železo, mangan a zinek (Tab. 2). Ačkoliv popílek nijak nepřispívá ke zvýšení huminových látek, jeho obsah síry může hrát roli při imobilizaci rtuti do thiolových skupin (García-Sánchez et al., 2014).

Uhlík mikrobiální biomasy hraje klíčovou roli v koloběhu živin (Nanipieri et al., 2002), a proto jeho obsah může být použit jako parametr pro posuzování vlivu kontaminace půdy na stopové prvky (Zhang et al., 2008). Přítomnost rtuti v prvním typu půdy (S_1) negativně ovlivnila obsah uhlíku mikrobiální biomasy. Dokonce ve vzorcích po 1 denní kontaminaci byl tento obsah pod mezí detekce stanovení. Uhlík mikrobiální biomasy je významnou složkou půdy a

významný indikátor rozpadu organické hmoty, odbourávání znečišťujících látek, recyklace živin a těžkých kovů (Perelomov et al., 2006). Vysoké koncentrace kovů mohou výrazně snížit mikrobiální uhlík a ovlivnit tak rozklad látek v půdě, protože mikrobiální aktivita je negativně ovlivněna toxicitou těžkých kovů (Barajas-Aceves, 2005). Obecně pak bylo potvrzeno, že obsah uhlíku mikrobiální biomasy u nekontaminovaných půd je vyšší, než u půd kontaminovaných. V našem případě byla koncentrace 440 mg Hg kg⁻¹ dostatečně toxická pro snížení mikrobiálního uhlíku v prvním typu půdy (S₁). V případě luvizemě (S₂) však vliv přítomnosti rtuti na mikrobiální uhlík nebyl potvrzen. Tyto rozdíly pozorované v obou půdách mohou souviset s jejich rozdílnými vlastnostmi. U prvního typu půdy (S₁) to může souviset s vyšším obsahem organické hmoty, do které by se rtuť mohla rychleji imobilizovat, než u druhého typu (S₂). Další souvislostí může být rozdílná hodnota pH. Podle García-Sánchez et al. (2004) byly vyšší mobilní podíly rtuti nalezeny v luvizemi, než v černozech po expozici tomuto kovu.

Podle očekávání se přidáním digestátu do půdy zvýšil obsah uhlíku mikrobiální biomasy v prvním typu půdy. Je to především proto, že digestát obsahuje snadno dostupné organické látky, což napomáhá mikroorganismům za zhoršených podmínek v krátkém čase. Rychlý nárůst v mikrobiální biomase byl zaznamenán i v jiných výzkumech (Elfstrand et al., 2007; Liu et al., 2009). Kromě toho přítomnost rtuti nezpůsobila žádné změny v koncentracích mikrobiálního uhlíku ani u vzorků půdy (S₁D), což znamená, že mikrobiální biomasa nebyla nijak ovlivněna rtutí, a to pravděpodobně z důvodu pozitivního vlivu digestátu. Podobný dopad mělo přidání digestátu do luvizemě. Na druhou stranu příměs popílku nepřinesla žádné změny v obsazích mikrobiálního uhlíku ani u jednoho typu půdy. Mírné zlepšení bylo zaznamenáno pouze u vzorků S₂A (po 7 denní inkubaci). Popílek by tedy bylo možné využít jako půdní čínidlo, které by zlepšilo fyzikální vlastnosti půd a jako zdroj makro- a mikro- prvků. Limitujícími faktory pro použití popílku jsou pak nízké obsahy uhlíku a dusíku, nízké mikrobiální aktivity a vysoké pH (Wong et Wong, 1989). V našem výzkumu nebyl zaznamenán žádný pozitivní vliv popílku na mikrobiální biomasu možný pouze z důvodu jeho složení; neobsahuje uhlík ani dusík (Tab. 2) kvůli tomu, že došlo k jejich ztrátě v průběhu spalovacího procesu. Kromě toho byl pozorován jeho škodlivý vliv v půdních vzorcích (S₁), a to bezprostředně po jeho aplikaci. Z těchto důvodů nebyly pozorovány významné změny ani u rtuť kontaminovaných půd.

Nitrifikace je považována za důležitý proces v biogeochemickém cyklu dusíku a je jedním z nejcitlivějších mikrobiálních procesů v půdě, například ve vztahu k těžkým kovům (Xu et al., 2009). Přítomnost rtuti v půdě vyvolala nerovnováhu mezi anorganickými

sloučeninami dusíku, tedy mezi N-NH_4^+ a N-NO_3^- . Vyšší hodnoty byly zaznamenány u amonné formy oproti dusičnanové. Tato změna může souviset s negativním dopadem rtuti na amoniak oxidující bakterie, které jsou zodpovědné za nitrifikaci (oxidace N-NH_4^+ na N-NO_3^-). Toto zjištění je v souladu s předchozí studií provedenou Gangavarapu et al. (2014). Přídavek organických příměsí jako je digestát vedl ke zvýšení koncentrace N-NO_3^- , a to již po krátké době expozice; navíc digestát obsahoval ještě další formy dusíku (hlavně N-NH_4^+), což mohlo vést ke stimulaci nitrifikačních procesů. Počáteční vysoké koncentrace N-NO_3^- v digestátu se s postupující dobou expozice snižovaly, takže byla akumulace N-NO_3^- na konci inkubace poměrně nízká. Podobný výsledek pozoroval Albuquerque et al. (2012). Rtuť v půdě s digestátem (S_1D) vyvolala podobný výsledek mezi anorganickými formami dusíku, naopak přídavek popílku nevyvolal žádné významné změny mezi těmito formami. Avšak přítomnost rtuti v půdních vzorcích (S_1) má negativní vliv na procesy nitrifikace, jak bylo pozorováno v S_1Hg . Tento účinek může důsledkem nízké účinnosti popílku imobilizujícího rtuť, protože podle předchozí studie lze srovnatelný mobilní podíl rtuti nalézt v černozemi ošetřené popílkem stejně tak jako před přidáním popílku. Naopak druhý typ půdy (S_2) ukázal nízký poměr nitrifikace v porovnání s prvním typem půdy (S_1), pravděpodobně vytvořený nevyvážeností v oxidaci NH_4^+ u krátkodobých expozic. Jak jsme očekávali, aplikace digestátu do druhého typu půdy (S_2), ať kontaminované nebo nekontaminované rtuť, stimulovalo nitrifikační amonnyí ionty, díky čemuž byly na konci inkubace pozorovány nízké obsahy N-NO_3^- . Přídavek popílku neovlivnil proces nitrifikace u luvizemě stejně jako u černozemě. Ale například Büttner et al. (1998) a Gering et al. (2000), pozorovali pozitivní vliv popílku na nitrifikaci. Při spalování dřeva a tvorbě popílku je pravděpodobnost ztráty veškerého dusíku poměrně velká; to uvádějí i Zimmerman a Frey (2002), ale závisí na podmínkách spalování. Znamená to, že složení popílku je nevyvážené, s čímž souvisí i změny ve sledovaných cyklech dusíku. Ukazuje se však, že negativní vliv na nitrifikační procesy u druhého typu půd (S_2) má především přítomnost rtuti, jak bylo pozorováno v S_2Hg . Tento účinek může souviset jak s nedostatkem dusíku v popílků, který tedy nemohl stimulovat procesy nitrifikace mikroorganismy, ale může souviset i s možným negativním dopadem rtuti na amoniak oxidující bakterie.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu rtuť kontaminované půdy na mobilitu půdních mikroorganismů. V návaznosti na nastolených cílech byla provedena série laboratorních experimentů, které měly potvrdit nebo vyvrátit negativní vliv rtuti na půdní mikroflóru a její funkci v půdě.

- Laboratorní experimenty byly provedeny na dvou typech půd. Byla to černozem u lokality Suchdol a luvizem z lokality Červený Újezd. Tyto dva typy půd byly vybrány pro své rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti.
- Bylo stanoveno půdní pH, z čehož vyplynulo, že pH černozemě bylo neutrální, zatímco pH luvizemě se ukázalo jako kyselé.
- Celkový rozpustný uhlík a dusík byly stanovovány v 0,01 M roztoku CaCl_2 , a to v poměru 1:10 (hmotnost: objem), třepány po dobu dvou hodin při pokojové teplotě a následně odstředěny při 3000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. U černozemě se obsahy celkového rozpustného uhlíku a dusíku v závislosti na kontaminované a nekontaminované půdě nijak neměnily. U luvizemě rtuť také nijak významně neovlivňovala obsahy těchto dvou prvků.
- Kvantifikace uhlíku mikrobiální biomasy neodhalila signifikantní změny v žádném ze vzorků prvního ani druhého typu půdy. Výrazné změny byly zaznamenány pouze u vzorků s příměsí digestátu. Ten, jelikož obsahuje poměrně velké množství uhlíku, podpořil rozvoj mikroorganismů.
- V obsazích N-NH_4^+ a N-NO_3^- nebyly pozorovány rozdíly mezi půdou nekontaminovanou a kontaminovanou. Nicméně po aplikaci digestátu byl zaznamenán vyšší obsah NH_4^+ u vzorků se 14 a 21 denní inkubací, což podporuje tvrzení, že digestát podpořil rozvoj půdní mikroflóry. V druhém typu půdy byly změny obsahů N-NH_4^+ a N-NO_3^- zaznamenány po 14 a 21 denní inkubaci.

Využití půdních meliorantů by mohlo představovat užitečnou strategii pro přirozenou bioremediaci půdy kontaminovanou rtuť. V této diplomové práci byl pozorován škodlivý vliv rtuti na některé biologické vlastnosti černozemě a luvizemě. Kromě toho ne všechny typy půd reagují stejným způsobem, protože se liší svými fyzikálně – chemickými vlastnosti nebo množstvím obsažené organické hmoty. Byly také analyzovány ekologické zdroje síry jako další potenciální remediant pro zmírnění účinku rtuti. Proto byl použit digestát (anorganický meliorant) a popílek (organický meliorant).

Právě digestát se ukázal jako potenciální remediant působící proti toxicitě rtuti v půdě. S největší pravděpodobností to souvisí s obsahem uhlíku v digestátu. Chemické a biologické vlastnosti půdy a její kvalita se tedy po přidání digestátu zlepšily. Lze tedy konstatovat, že digestát může být úspěšnou strategií pro přírodní bioremediační procesy v půdách kontaminovaných rtutí.

8 Seznam literatury

ACHA CORDERO, D. 2010. Sulfate-reducing bacteria involvement in mercury methylation in water column and floating macrophytes rhizosphere. Trent University Canada.

ALBURQUERQUE, J. A., de la FUENTE, C., CAMPOY, M., CARRASCO, L., NÁJERA, I., BAIXAULI, C., CARAVACA, F., ROLDÁN, A., CEGARRA, J., BERNAL, M. P. 2012. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *Eur. J. Agron.* 43: 119-28.

BARAJAS-AVECES, M. 2005. Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. *Bioresource Technol.* 96: 1405–1414.

BENCKO, V., CIKRT, M., LENER, J. 1995. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*, Grada, ISBN 80-7169-150-X.

BIZILY, S. P., RUGH, C. L., SUMMERS, A. O., MEAGHER, R. B. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 6808–6813.

BIZILY, S. P., RUGH, C. L., MEAGHER, R. B. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, 18: 213–217.

BUSCOT, F., VARMA, A., 2005. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Function*. Berlin: Springer – Verlag. 419 p. ISBN 3-540-22220-0.

BÜTTNER, G., GERING, C., NELL, U., RUMPF, S. V., WILPERT, K. 1998. Einsatz on holzasche in wäldern (wood ash application in forests). *Forst und Holz* 53: 72–76.

CELO, V., LEAN, D. R. S., SCOTT, S. L. 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*.

CAVALLARO, N., PADILLA, N., VILLARUBIA, J. 1993. Sewage sludge effects on chemical properties of acid soils. *Soil Sci.* 156: 63-70.

DEMEYER, A., VOUNDI NKATA, J. C., VERLOO, M. G. 2001. Characteristics of wood ash and 720 influence on soil properties and nutrient uptake: an overview. *Bio. Technol.* 77: 287-95.

- ECKLEY, C. 2004. Assessing methylmercury formation in lake water using a stable isotope technique. Trent University Canada.
- ELFSTRAND, S., BATH, B., MARTENSSON, A. 2007. Influence of various forms of green manure amendment on soil microbial community composition, enzyme activity and nutrient levels in leeks. *Appl. Soil Ecol.* 36: 70–82.
- ETTLER, J., RHOVEC, J., NAVRATIL, T., MIHAJLAVIC, M., 2007. Mercury distribution in soil profiles polluted by lead smelting. *Bull Environ Contam Toxicol.* 78:13–17.
- FEČKO, P., KUŠNIEROVÁ, M., ČABLÍK, V., PEČTOVÁ, I. 2004. Environmentální biotechnologie. Ostrava: Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. 180 s. ISBN 80-248-0700-9.
- FERNÁNDEZ-DELGADO JUAREZ, M., WALDHUBER, S., KNAPP, A., PARTL, C., GÓMEZ-BRNDON, M., INSAM, H. 2012. Wood ash effects on chemical and microbiological properties of digestate- and manure-amended soils. *Biol. Ferti. Soils* 49: 575-85.
- FERNÁNDEZ-DELGADO JUAREZ, M., WALDHUBER, S., KNAPP, A., PARTL, C., GÓMEZ-BRNDON, M., INSAM, H. 2013. Wood ash effects on chemical and microbiological properties of digestate- and manure-amended soils. *Biol Fert Soils* 49: 575–585.
- GRIGAL, D. F. 2003. Mercury Sequestration in Forests and Peatlands: A Review. *J. Environ. Qual.* 32: 393-405.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M., ŠÍPKOVÁ, A., SZÁKOVÁ, J., KAPLAN, L., OCHECOVÁ, P., TLUSTOŠ, P. 2014. Applications of organic and inorganic amendments induce changes in the mobility of mercury and macro- and micronutrients of soils. *Sci. World J.*, Article ID 407049. Dostupné také z <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/407049>>
- GARAU, G., CASTALDI, P., SANTONA, L., DEIANA, P., MELIS, P. 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma* 142: 47-57.
- GERING, C., HEIL, B., LAMERSDORF, N. P. 2000. Wood ash application in a Norway spruce forest at Solling, Central Germany. Presented at Proceedings of International Conference on Forest Ecosystem Restoration, Vienna.

- CHARLET, L., BOSBACH, D., PERETYASCHKO, T. 2002. Reducing capacity of terrestrial humic acids. *Chem. Geol.* 190: 303–319.
- ISSARO, N., ABI-GHANEM, C., BERMOND, A. 2008. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction, *Anal. Chim. Acta* 631.
- JANOS, P., VAVROVÁ, J., HERZOGOVÁ, L., PILAŘOVÁ, V. 2010. Effects of inorganic and organic amendments on the mobility (leachability) of heavy metals in contaminated soil: A sequential extraction study. *Geoderma* 159: 335-41.
- JONES, D. L., HODGE, A., KUZYAKOV, Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition, *New Phytol.*, 163: 459.
- JURSÍK F.: *Anorganická chemie kovů*, VŠCHT, Praha 2002, dotisk 2008 ISBN: 80-7080-504-8.
- KING, J., HARMON, S. M., FU, T. T., GLADDEN, J. B. 2002. Mercury removal, methylmercury formation, and sulfate-reducing bacteria profiles in wetland mesocosms. *Chemosphere*, 46(6): 859-70.
- LIU, M., HU, F., CHEN, X., HUANG, Q., JIAO, J., ZHANG, B., LI, H. 2009. Organic amendments with reduced chemical fertilizer promote soil microbial development and nutrient availability in a subtropical paddy field: The influence of quantity, type and application time of organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* 42: 166-75.
- LIU, Y., ZHENG, Y., SHEN, J., ZHANG, L., HE, J. 2010. Effect of mercury on the activity and community composition of soil ammonia oxidizers. *Environ. Sci. Pollut Res.* 17: 1237-1244.
- MATHEMA, V. B., THAKURI, B. C., SILLANPÄ, M. 2011. Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol.* 193: 837–844.
- MILLER, E. K., VANARSDALE, A., KEELER, G. J., CHALMERS, A., POISSANT, L., KAMMAN, N. C., BRULOTTE, R. 2005. Estimation and mapping of wet and dry mercury deposition across northeastern USA. *North Am. Ecotoxicol.* 14: 53-70.
- MORADI, A. 2008. Imaging techniques to study nickel-root interactions of the Ni hyperaccumulator plant *Berkheya coddii*. PhD. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich.

- NANNIPIERI, P., KANDELER, E., RUGGIERO, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R. G., Dick, R. P. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp.1–34.
- OCHECOVÁ, P., TLUSTOŠ, P., SZÁKOVÁ, J. 2014. Wheat and soil response to wood fly ash application in contaminated soils. *Agron J* 106: 995–1002.
- PERELOMOV, L. E. K. 2006. Effect of soil microorganisms on the sorption of zinc and lead compounds by goethite. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169: 95–100.
- POLÁKOVÁ, Š., HUTAŘOVÁ, K., NĚMEC P., REININGER D. 2011. Obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách České republiky. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, s. 17.
- REIS, A. T. R. S. M., DAVIDSON, C. M., PEREIRA, E., DUARTE, A. C. 2010. Extractability and mobility of mercury from agricultural soils surrounding industrial and mining contaminated areas. *Chemosphere* 81: 1369–1377.
- ROSYPAL et al., *Nový přehled biologie*, 1. vyd dostisk Praha: Scientia, 2003. 797 s. ISBN 978-80-86960-23-4.
- RUIZ, O. N., DANIELL, H. 2009. Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20: 213–219.
- RUIZ, O. N., HUSSEIN, H. S., TERRY, N., DANIELL, H. 2003. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.*, 132: 1344–1352.
- RUIZ, O. N., ALVAREZ, D., TORRES, C., ROMAN, L., DANIELL, H. 2011. Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability. *Plant Biotechnol. J.*, 9: 609–617.
- SCHROEDER, W. H., YARWOOD, G., NIKI, H. 1991. Transformation processes involving Hg species in atmosphere - results from a literature survey. *Water Air Soil Pollut.*, 56: 653-666.
- STEELE, R. A., OPELLA, S. J. 1997. Structures of the reduced and mercury-bound forms of MerP, the periplasmic protein from the bacterial mercury detoxification system. *Biochemistry*, 36: 6885-6895.

- ŠÍPKOVÁ, A., SZÁKOVÁ, J., TLUSTOŠ, P. 2014. Affinity of selected elements to individual fractions of soil organic matter. *Water Air Soil Pollut.*, 225: 1802.
- TUČEK, M., BENCKO, V., KRÝSL, S. 2007. Zdravotní Rizika rtuti ze zubních amalgámů *Chem. Listy* 101: 1038–1044.
- URBAN, P. 2006. Aktuální problémy neurotoxicity rtuti, *Neurologie pro praxi*; 5: 251–253.
- VELEBIL, D. 2003. Jedová hora (Dědova hora) u Neřežína. - *Bull. mineral.-petrolog. Odd. Nár. Muz. Praha* 11: 86-99.
- VELEBIL, D. 2004. Dolování rumělky u obce Svatá, zjz. od Berouna. - *Bull. mineral.-petrolog. Odd. Nár. Muz. Praha* 12: 78-94.
- VELEBIL, D. 2005. Dobývání rumělky, železné rudy a vápence v obci Jesenný, s. do Semil. - *Bull. mineral.-petrolog. Odd. Nár. Muz. Praha* 13: 98-111.
- VELEBIL, D. 2007. Dobývání rumělky (cinabaritu) u Bezdržic, jv. od Teplé v západních Čechách. - *Bull. mineral.-petrolog. Odd. Nár. Muz. Praha* 14-15: 47-54.
- VANEECKHAUTE, C., MEERS, E., MICHELS, E., GHEKIERE, G., ACCOE, F., TACK F. M. G. 2013. Closing the nutrient cycle by using bio-digestion waste derivatives as synthetic fertilizer substitutes: A field experiment. *Biomass Bioenerg* 55:175–189.
- WONG, M. H., WONG, J. W. C. 1989. Germination and seedling growth of vegetable crops in fly ash-amended soils. *Agri. Ecosys. Environ*, 26: 23-35.
- WU, J., JOERGENSEN R. G., POMMERING B., CHAUSSOD R., BROOKES P. C. 1990. Measurement of soil microbial biomass C – an automated procedure. *Soil Biom. Biochem.*, 22: 1167-1169.
- XU, Z. H. C. C., HE, J. Z., LIU, J. X. 2009. Trends and challenges in soil research: linking global climate change to local long-term forest productivity. *J. Soils Sediments* 9: 83–88.
- YANG, H., NAIRN, J., OZIAS-AKINS, P. 2003. Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.*, 160: 945–952.
- ZHANG, Y., ZHANG, H., SU, Z., ZHANG, C. G. 2008. Soil microbial characteristics under long-term heavy metal stress: a case study in Zhangshi wastewater irrigation area, Shenyang. *Pedosphere*, 18: 1–10.

Internetové zdroje:

<<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2006/Bi8555/rostliny.txt>>

<<http://www.phytopsanitary.org/>>

<<http://dx.doi.org/10.1155/2014/407049>>

<<http://arnika.org/rtut>>

<<http://arnika.org/rtut-v-rybach>>

<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Rtu%C5%A5>>