

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

Schopnost rychle rostoucích dřevin akumulovat rizikové prvky

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Pavla Kubátová

Školitel: prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „**Schopnost rychle rostoucích dřevin akumulovat rizikové prvky**“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Praze dne 16. 7. 2018

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat prof. Ing. Pavlu Tlustošovi, CSc. za odborné vedení a konzultace, které mi poskytl při psaní této doktorské disertační práce. Mé poděkování patří také prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc., RNDr. Ing. Liborovi Mrnkovi, Ph.D. a prof. RNDr. Michalu Hejcmanovi, Ph.D. et Ph.D. za cenné rady a připomínky. Děkuji celému kolektivu katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin za pomoc s odběrem a zpracováním vzorků, zejména Ing. Kateřině Pračce, Ing. Stanislavě Kroulíkové, Ph.D. a Ing. Veronice Zemanové, Ph.D., dále za pomoc s realizací sklizní Ing. Františkovi Jelínkovi a Ing. Filipu Merclovi a za pomoc s analýzami vzorků Ing. Janě Najmanové a Ing. Haně Zámečnickové. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a svému manželovi za psychickou podporu a zázemí, které mi poskytovali během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární přehled	3
2.1	Rizikové prvky	3
2.1.1	Kontaminace půd rizikovými prvky	3
2.1.2	Mobilita rizikových prvků v půdě	4
2.2	Rizikové prvky v rostlině	5
2.2.1	Mechanismy příjmu rizikových prvků rostlinami	5
2.2.2	Distribuce rizikových prvků v rostlině	7
2.2.3	Reakce rostlin na stres vyvolaný rizikovými prvky	8
2.2.4	Tolerance rostlin k rizikovým prvkům	12
2.2.5	Rychle rostoucí dřeviny	13
2.3	Metody remediace půd	19
2.3.1	Fyzikální a chemické metody	19
2.3.2	Biologické metody	21
3	Vědecké hypotézy a cíle práce	26
4	Publikované práce	27
4.1	Zárubová (Kubátová) et al. (2015). Distribuce P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb a Zn do věkových tříd dřeva a kůry vrb a topolů využívaných pro fytoextrakci na kontaminované půdě rizikovými prvky.	27
4.2	Kubátová et al. (2016). Účinky aplikace čistírenského kalu na produkci biomasy a obsah Cd, Pb a Zn ve výhonech klonů <i>Salix</i> a <i>Populus</i> : Zlepšení účinnosti fytoremediace na kontaminovaných půdách.	41
4.3	Kubátová et al. (2018). Účinky letní a zimní sklizně na účinnost prvkové fytoextrakce klonů <i>Salix</i> a <i>Populus</i> vysázených na kontaminované půdě.	53
4.4	Kubátová et al. (2018). Vliv délky obmýtí stromů na odstranění těžkých kovů z kontaminované půdy v polním experimentu.	63
4.5	Břendová et al. (2018). Vyluhování stopových prvků z kontaminované biomasy vrb a topolů – Laboratorní studie potencionálních rizik.	70

5	Sumární diskuze	79
5.1	Fytoextrakční potenciál rychle rostoucích dřevin	80
5.1.1	Výnos biomasy a mortalita klonů RRD.....	80
5.1.2	Obsah rizikových prvků v nadzemní biomase	84
5.1.3	Odběr rizikových prvků z půdy a fytoimediační faktor.....	86
5.2	Riziko zpětného uvolnění rizikových prvků z kontaminované biomasy do prostředí	88
6	Závěr	90
7	Seznam použité literatury	92

1 Úvod

Nároky na množství a kvalitu potravin prudce stoupají. Zároveň však v důsledku rozsáhlé výstavby, průmyslové činnosti a dalšího nešetrného nakládání se zemědělskou půdou dochází k neustálým ztrátám půdy určené k produkci potravin a k nárůstu její degradace a znečištění. Půda je znečišťována nejrůznějšími organickými i anorganickými látkami a patogeny, které se následně mohou dostávat do rostlin a dále do potravinového řetězce zvířat a lidí (Placek et al., 2016). Z anorganických látek patří mezi nejběžnější a nejstarší kontaminanty kovy, které znečišťují životní prostředí od dob, co si člověk osvojil schopnost dobývat je a zpracovávat.

Půda patří se vzduchem a vodou mezi základní složky životního prostředí. Zatímco voda a vzduch se pohybují (proudí), čímž dochází k jejich ředění a čištění, půda naopak svými specifickými vlastnostmi poutá různé kontaminanty, včetně rizikových prvků, které se zde hromadí. Rizikové prvky, na rozdíl od organických látek, nepodléhají biologickému ani chemickému rozkladu a přetrvávají dlouhý čas v povrchových vrstvách půdy, kde musí být imobilizovány nebo zcela odstraněny (Kabata–Pendias a Pendias, 2001; Lasat, 2002; Bolan et al., 2014).

Kontaminace půdy rizikovými prvky patří mezi významné ekologické problémy současnosti (dos Santos et al., 2007; Shi et al., 2017). Z tohoto důvodu neustále stoupá zájem o využití cenově dostupných remediačních metod (Schmidt, 2003; do Nascimento a Xing, 2006; de Melo et al., 2008; Nikolić et al., 2017), jako jsou například bioremediační a fytoremediační metody, mezi které patří i fytoextrakce, což je technologie, při níž rostliny akumulují kontaminanty ve svých pletivech a tak je odstraňují z půdy (Wenzel et al., 1999; Favas et al., 2014). Vzhledem k požadavkům na udržitelnost zemědělského hospodaření s půdou, musí remediační technologie ponechat půdu strukturálně, chemicky a biologicky nepoškozenou, měly by být také levné a z dlouhodobého hlediska i finančně návratné (Maxted et al., 2007a; Antoniadis et al., 2017). Právě tyto podmínky splňují fytoextrakční metody, realizované především pomocí výmladkových plantáží rychle rostoucích dřevin z rodu *Salix* spp. a *Populus* spp. Zároveň, rychle rostoucí dřeviny přináší estetické zlepšení kontaminovaných oblastí (Dickinson et al., 2005), snižují větrnou a vodní erozi (Hammer et al., 2003), mají pozitivní vliv na biodiverzitu (Laureysens et al., 2005) a v neposlední řadě sekvestrují CO₂ a mohou být využívány jako obnovitelný zdroj energie (Hammer et al., 2003; Laureysens et al., 2005).

Účinnost fytoextrakce závisí kromě typu půdy i na vlastnostech použitých rostlin, jako jsou schopnost akumulovat rizikové prvky a transportovat je do nadzemních částí, rychlý růst a hluboký, rozvětvený kořenový systém (Bedel et al., 2009; Di Lonardo et al., 2011; Antoniadis et al., 2017). Také tyto vlastnosti rychle rostoucí dřeviny splňují, a proto jsou např. podle Klanga–Westina a Eriksson (2003); Pulforda a Dickinsona (2006); Bedela et al. (2009); Van Slyckena et al. (2013); Kacálkové et al. (2015) a mnoha dalších autorů vhodnými rostlinami pro fytoextrakci rizikových prvků, avšak jen na středně a mírně kontaminovaných půdách (Jensen et al., 2009; Nikolić et al., 2017).

Fytoextrakční metody jsou však většinou časově velmi náročné a v praxi se zatím nevyužívají především z důvodu chybějících informací o dlouhodobém chování fytoextrakčních rostlin v reálných podmínkách.

2 Literární přehled

2.1 Rizikové prvky

Adriano (2001) považuje As, Cd, Cr, Pb a Hg za prvky, které nejčastěji negativně ovlivňují životní prostředí a zdraví lidí. Kabata–Pendias a Mukherjee (2007) uvádějí, že mezi potencionálně nejvíce rizikové prvky (RP) můžeme řadit takové, které jsou do biosféry uvolňovány těžbou a jejich následným využíváním v nadměrné míře oproti jejich přirozenému cyklu. Mezi tyto prvky řadí především Ag, As, Au, Cd, Hg, Pb, Sb, Sn, Te, ale i další prvky, které jsou pro rostliny a organismy nezbytné, jako jsou Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, avšak mohou být v některých regionech uvolňovány do prostředí ve vysokém množství. Rizikové prvky tedy můžeme dělit na dvě skupiny podle jejich účinku v biologických systémech. Prvky toxické (As, Cd, Pb, Hg) s negativním vlivem na živé organismy a prvky esenciální (Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Zn), které jsou při nižších koncentracích pro organismy nezbytné a škodí až při vyšších koncentracích (Lasat, 2002; Bolan et al., 2010).

2.1.1 Kontaminace půd rizikovými prvky

Rizikové prvky kontaminující půdu jsou geogenního nebo antropogenního původu (Beneš, 1994; Němeček et al., 2010; Vácha et al., 2013; Bolan et al., 2014; Antoniadis et al., 2017). Hlavním geogenním zdrojem RP v půdě je zvětrávání hornin. V tomto případě obsah prvků v půdě závisí na zastoupení jednotlivých prvků v půdotvorných horninách. Existují půdy s vysokými obsahy RP geogenního původu jako jsou půdy z bazických a ultrabazických hornin s vysokým obsahem Cr, Ni, Co, Mn, Cu a V, dále jsou to půdy ze svahovin kyselých hornin (především žul) s vyššími obsahy As, Be, Pb a Zn a půdy z vápenců a karbonátových břidlic se zvýšeným obsahem Cd (Němeček et al. 2010).

Významné množství RP antropogenního původu vstupuje do půdy atmosférickým spadem. Jeho složení je ovlivněno především těžbou rud, hutnictvím, průmyslovou výrobou, energetikou a dopravou. Mezi přímé antropogenní zdroje kontaminace půd RP patří především organická a minerální hnojiva, čistírenské kaly, strusky a zavlaha (Beneš, 1994; Bolan 2014). Na rozdíl od kontaminantů geogenního původu, rizikové prvky pocházející z antropogenních zdrojů mají obvykle vysokou biologickou dostupnost (Bolan et al., 2010; Němeček et al., 2010; Vácha et al., 2013; Bolan et al., 2014; Antoniadis et al., 2017).

2.1.2 Mobilita rizikových prvků v půdě

Znečištění půdy nelze hodnotit pouze na základě celkových obsahů RP v půdě, protože toxicita a riziko vstupu těchto prvků do potravního řetězce zvířat a lidí se zvyšuje se zvyšující se mobilitou a přijatelností RP pro rostliny, která závisí na reaktivitě a způsobu vazby prvků v matrici (Němeček et al., 2010; Abollino et al., 2011). Pro studium mobility a dostupnosti prvků v pevných matricích jako je půda, sedimenty a kaly se používají jednoduché a sekvenční extrakční postupy, které pomáhají objasňovat jednotlivé vazby (formy) prvků v matrici (Giacomino et al., 2011). Rizikové prvky v půdě se mohou nacházet ve stabilní (reziduální) frakci, kde jsou pevně vázány v silikátové matrici na primární a sekundární minerály nebo v labilních formách (mobilní a potenciálně mobilizovatelné frakce; Němeček et al., 2010). Mezi mobilní formy RP v půdě patří vodorozpustné a iontově výměnné frakce. Tyto frakce jsou přístupné pro rostliny a zpravidla jen malé množství RP v půdě se vyskytuje v těchto formách (Száková et al., 1999; Lasat, 2002). Mezi potenciálně mobilizovatelné formy RP patří frakce vázané na Fe a Mn oxidy a karbonáty a frakce vázané na organickou hmotu (Száková et al., 1999). Tyto frakce RP jsou rostlinami nepřijatelné, ale při porušení rovnováhy některých půdních parametrů se mohou stát pro rostliny dostupné (Adriano, 2001). Dvouleté nádobové pokusy Fischerové et al. (2006), kdy klony vrby *Salix dasyclados* akumulovaly Cd obsažené v půdním roztoku a přesto jeho koncentrace zůstávaly v roztoku poměrně stálé, potvrzují teorii kontinuálního doplňování prvků do půdního roztoku z ostatních frakcí.

Osud RP v půdním prostředí je závislý, jak na půdních vlastnostech, tak i na environmentálních faktorech (Bolan et al., 2014; Antoniadis et al., 2017). Jedním ze způsobů, jak jsou RP poutány v půdě, je sorpce. Sorpce kovů je konkurenční proces mezi ionty daného kovu v roztoku a ionty vázanými na povrchu půdních částic (Echeverría et al., 1998). Při nespecifické sorpci náboj iontů rizikových prvků vyrovnává náboj na půdních částicích prostřednictvím elektrostatické přitažlivosti, zatímco specifická sorpce zahrnuje tvorbu chemické vazby mezi ionty v roztoku, a těmi na povrchu půdních částic (Echeverría et al., 1998; Fontes a dos Santos, 2010; Carrillo Zenteno et al., 2013; Bolan et al., 2014).

Fonte a dos Santos (2010) uvádějí jako hlavní faktory ovlivňující sorpci některých prvků v půdě tyto: pH (Cd, Cu), KVK - kationtová výměnná kapacita (Cu, Ni) obsah goethitu a hematitu (Pb) a obsah organické hmoty (Cu, Zn), což nasvědčuje vyššímu sklonu Ni k nespecifické sorpci a u Cd, Pb a Zn k sorpci specifické nebo k ligandovým výměnným reakcím, u Cu se pravděpodobně vyskytují oba mechanismy sorpce. Sorpce

Cu se stává nespecifickou při vysokých koncentracích, kdy jsou specifická vazebná místa obsazena (Shaheen et al., 2017). Řada autorů zjistila těsnou negativní korelaci mezi akumulací RP rostlinami a hodnotou KVK testovaných zemin (Sanders et al., 1986). Hodnota KVK závisí na množství a druhu jílových minerálů, oxidů Fe, Al, Mn a na obsahu a kvalitě organické hmoty (Antoniadis et al., 2017). Organická složka půdy má vysokou afinitu k RP, jako je Cu, Cd a Pb z důvodu přítomnosti ligandů nebo skupin, které mohou tvořit cheláty s kovy (Bjerre et al., 1985; Bolan et al., 2014; Shaheen et al., 2017). Se zvyšujícími se hodnotami pH disociují karboxylové, hydroxylové a karbonylové funkční skupiny v půdní organické hmotě, čímž se zvyšuje afinita ligandových iontů pro kationty RP (Bolan et al., 2014).

Podobně jako zvyšující se hodnota KVK i růst hodnot pH negativně působí na akumulaci kationtů v rostlinných pletivech (Blake a Goulding, 2002). Aktivita RP (např. Cd a Pb) v roztoku v přirozeně kyselých půdách klesá s rostoucí hodnotou pH (Bolan et al., 2010; Bolan et al., 2014). Sanders et al. (1986) zjistili, že koncentrace Zn v jílku pěstovaném na hlinitojílovité půdě byla přibližně třikrát vyšší při pH 5,8 než při pH 7,2. Vliv hodnoty pH vyšší než 6 na snížení koncentrace volných iontů v půdách je přičítán nárůstu povrchového náboje oxidů Fe, Al, Mn a chelataci organických látek, nebo vysrážení RP v hydroxidech (Sanders et al., 1986; Antoniadis et al., 2017). Za předpokladu, že v půdách s vysokým pH jsou přítomny anionty, jako jsou SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , OH^- a HPO_4^{2-} je převládajícím procesem snižujícím mobilitu RP jejich vysrážení (Hong et al., 2007; Bolan et al., 2010).

Ke změně formy a mobility RP může také často docházet v důsledku mikrobiálních oxidačně/redukčních reakcí. Další možností změny mobility je methylace, což je v převládající většině biologický nebo chemický (abiotický) mechanismus převedení některých RP (např. As, Hg nebo Se) na methylové deriváty, které se následně mohou uvolňovat do atmosféry těkáním (Bolan et al., 2010; Boriová et al., 2015).

2.2 Rizikové prvky v rostlině

2.2.1 Mechanismy příjmu rizikových prvků rostlinami

Rostliny přijímají RP ve formě iontů primárně kořeny z půdního roztoku. Do rhizosféry (vrstva půdy několik mm v okolí kořenů) se ionty dostávají třemi způsoby: (i) pohybem půdního toku, tzv. hmotovým tokem, který se uskutečňuje na základě rozdílného vodního potenciálu, neboť v blízkosti kořenů dochází k odčerpání vody kořeny,

(ii) difuzí, při které jsou ionty transportovány do míst s nižší koncentrací (do ochuzené zóny v blízkosti kořenů) a (iii) růstem kořenů (Vaněk et al., 2012).

Rostliny mohou minimalizovat přijatelnost a nebezpečnost RP nebo zvyšovat mobilitu prvků (včetně RP) vázaných na pevnou fázi půdy prostřednictvím několika mechanismů, např. úpravou pH vylučováním chelatizujících organických kyselin, komplexotvorných látek, chelatizačních činidel a protonů, tvorbou slizových sloučenin na kořenových čepičkách apod. (Fuksová et al., 2007; Antoniadis et al., 2017). V rhizosféře tedy může docházet k chelataci RP kyselinami vylučovanými rostlinou, zvýšení difuzního gradientu a urychlení příjmu RP (Fuksová et al., 2007; Maestri et al., 2010). Ionty prvků pronikají volně do tzv. volného prostoru kořenů. Část iontů je poutána na záporně nabitě karboxylové skupiny kyseliny polygalakturonové obsažené v buněčných stěnách (Vaněk et al., 2012; Antoniadis et al., 2017), část iontů prochází stěnou dále do buněk a část je transportována přímo apoplastem. Ionty, které proniknou buněčnou stěnou, se soustředí v prostředí plazmatické membrány – plazmalemy. Zvýšený koncentrační gradient vede k transportu iontů přes plazmalemu do buňky (Procházka et al., 1998).

Vstupu iontů RP do buňky nelze zcela zamezit, ale membránové transportéry mohou přepravit ionty RP do vakuol nebo ven z buňky. Rostliny disponují několika třídami transportérů RP, mezi tyto transportéry patří P-ATPasy (P-type metal ATPases), NRAMP (natural resistance associated macrophage protein), ZIP (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter protein), CTR (copper transporter), ABC (ATP-binding cassette) a CDF (cation diffusion facilitator; Williams et al., 2000; Hall, 2002; Antoniadis et al., 2017; Jalmi et al., 2018). P-ATPasy fungují jako membránové pumpy řady kationtů v mnoha organismech. ATPasy z podskupiny P1B (označované jako CPx-ATPasy) se účastní transportu těžkých kovů a lze je rozdělit na dvě skupiny, a to na přenašeče pro monovalentní kationty Cu^+ , Ag^+ a na přenašeče pro divalentní kationty Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} (Hall a Williams, 2003). Proteiny NRAMP se podílejí na transportu iontů kovů (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+}) v řadě organismů (Hall a Williams, 2003; Jalmi et al., 2018). Skupina transportérů ZIP hraje důležitou roli v transportu iontů Zn^{2+} . V rostlinách jsou schopné přenášet také Cd^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} a Cu^{2+} (Pedas et al., 2009). ABC transportéry jsou rozdělené do osmi podskupin, které hrají roli v různých buněčných procesech, jako je příjem živin, osmotická homeostáza, transport hormonů, rezistence vůči patogenům, import mastných kyselin a tolerance kovů (Jalmi et al., 2018). Transportéry AtABCC1 a AtABCC2 patřící do skupiny ABC transportérů jsou přenašeči

komplexů fytochelatin–Cd a glutation–Cd přes tonoplast do vakuol. Skupina přenašečů CDF je také zahrnuta do transportu a sekvestrace iontů těžkých kovů, zejména Zn, Cd a Co (Hall a Williams, 2003; Jalmi et al., 2018).

Pohyb iontů apoplastickou cestou se děje od rhizodermis až po endodermis snadno, pomocí hmotového toku nebo difúze. V endodermisu je apoplastická cesta přerušena Caspariho proužky, které omezují a regulují příjem iontů. Transport iontů v apoplastu je tedy značně omezen. Ionty prvků, které pronikly do vnitřního prostoru buňky, jsou transportovány do xylemu symplastem (Procházka et al., 1998; Vaněk et al., 2012).

U málo pohyblivých prvků, jako je Hg a Pb, je významný i mimokořenový příjem, tedy příjem prvků listy (Cibulka, 1991; Vaněk et al., 2012). Dalenberg a van Driel (1990) zjistili, že atmosférickou depozicí může být přijímáno až 73–95 % Pb, zatímco atmosférický příjem Cd byl velmi nízký. Jednotlivé ionty prvků procházejí kutikulou až k povrchu buněčných stěn, jimiž mohou difundovat. Tento pasivní apoplastický transport je v určitém místě nahrazen aktivním vstupem do buňky přes plazmalemu. Předpokládá se, že systém přenosu iontů přes membránu je podobný systémům zajišťujícím příjem iontů v kořeni (Procházka et al., 1998).

2.2.2 Distribuce rizikových prvků v rostlině

Pokud jde o distribuci RP v různých částech rostlin, bývá pouze výjimečně rovnoměrná a závisí na druhu rostliny i na samotném prvku (Seregin a Kozhevnikova, 2008; Vaněk et al., 2012, Chen et al., 2017). V rostlinách, které jsou schopny redukovat příjem RP (exkludory) jsou tyto prvky akumulovány především v kořenech, ale v akumuláčnících rostlinách jsou transportovány do nadzemních orgánů (Seregin a Ivanov, 2001; Seregin a Kozhevnikova, 2008).

Obecně velmi málo mobilním prvkem v rostlinách je Pb, které se většinou akumuluje v kořenech, tam je vázáno na buněčné stěny díky své vysoké afinitě k polygalakturonové kyselině (Połec–Pawlak et al., 2007; Seregin a Kozhevnikova, 2008).

Podle některých autorů (Benavides et al., 2005) je i Cd akumulováno především v kořenech, např. u sóji až z 98 % (Hasan et al., 2009), dále v listech, ve stoncích, v plodech a nejnižší obsahy se nacházejí v semenech (Cibulka, 1991). U některých plodin, především u tabáku, jsou však uváděny nejvyšší obsahy Cd v listech (Macek et al., 2002). Pokusy Tlustoše et al. (2002) s vybranými druhy zeleniny (zelená fazole, špenát, ředkvička, mrkev) potvrdily vyšší akumulaci Cd v kořenech zelené fazole oproti nadzemní

biomase, ale ostatní zkoumané rostliny obsahovaly v nadzemní biomase více Cd než v kořenech. Naopak As byl v nejvyšší míře akumulován v kořenech špenátu (především v kořenovém vlášení), ale i v kořenech ostatních plodin. Výjimkou byla pouze zelená fazole, u které byl nejvyšší obsah As nalezen v listech. Pokusy Chen et al. (2017) se sedmi druhy polních plodin a plevelů naopak ukázaly, že As, Cd, Cu, Pb i Zn jsou akumulovány především v kořenech. Výjimkou byla pouze *Brassica campestris*, která akumulovala As významně v nadzemních orgánech.

Také v případě rychle rostoucích dřevin (RRD) není distribuce RP rovnoměrná a může se lišit u jednotlivých druhů. Di Lonardo et al. (2011) zjistili u topolů vypěstovaných z řízků obecně větší akumulaci sledovaných RP (As, Cd, Cu a Zn) v kořenech než ve výhonech. Ve studii Shi et al. (2017) bylo Pb u dvou sledovaných druhů vrb (*S. matsudana* a *S. integra*) také akumulováno více v kořenech než ve výhonech, ale obsahy Cd a Zn byly ve výhonech *S. integra* vyšší než v kořenech na rozdíl od *S. matsudana*. Laureysens et al. (2005) pozorovali, že kůra klonů topolů vykazovala obecně vyšší obsahy prvků než dřevo. Fischerová et al. (2006) a Tlustoš et al. (2007) zjistili, že Cd a Zn byly v klonech vrb i topolů transportovány více do nadzemní biomasy, zejména do listů, naopak As a Pb byly ukládány především do kořenů. Také podle dalších autorů (Vysloužilová et al., 2003a; dos Santos Ultmazian et al., 2007; Bedell et al., 2009; Kacálková et al., 2015; Mleczek et al., 2017) jsou Cd a Zn v RRD akumulovány především v listech. Maxted et al. (2007a) řadí sestupně rostlinné nadzemní orgány klonů vrb podle akumulace Cd a Zn takto: list > kůra > dřevo.

2.2.3 Reakce rostlin na stres vyvolaný rizikovými prvky

Rostliny mají dvě základní strategie, jak se mohou vyrovnávat s přítomností RP v půdním roztoku. První strategií je rezistence, která v sobě zahrnuje schopnost vzdorovat či zcela omezovat až vylučovat možnost působení RP na citlivé receptory rostlin, tím že se brání jejich příjmu a transportu do nadzemních částí. Druhou strategií rostlin je tolerance, schopnost vyrovnávat se s přítomností a působením RP ve větším rozsahu (Procházka et al., 1998).

Za proces přispívající ke zvýšení rezistence rostlin vůči RP lze považovat schopnost rostlin vylučovat kořenové exudáty, které mohou snižovat mobilitu a toxicitu RP již v rhizosféře (Antoniadis et al., 2017). Kořenové exudáty je možné rozdělit do dvou skupin: nízkomolekulární (aminokyseliny - kyselina asparagová, kyselina glutamová, prolin; organické kyseliny - kyselina šťavelová, sukciniová, vinná a další; cukry; fenoly a jiné sekundární metabolity) a vysokomolekulární sloučeniny - slizy a proteiny (Fuksová

et al., 2007). Některé rostliny detoxikují ionty Al^{3+} pomocí exudátů organických kyselin a tvoří s Al^{3+} stabilní netoxické komplexy (Fišer et al., 2014). Podobný mechanismus byl objeven i u kultivaru rýže (*Oryza sativa*) rezistentního k Pb. Ta uvolňuje ve svých kořenových exudátech kyselinu šťavelovou, která může snížit mobilitu iontů olova v rhizosféře (Yang et al., 2000). Exudáty mohou příjem RP i zvyšovat, jako v případě vylučování některých karboxylových kyselin při nedostatku P, které mohou napomáhat mobilizaci As v rhizosféře a zvýšit tak jeho příjem (Fitz a Wenzel, 2002). Exudáty rostlin dále ovlivňují počet a aktivitu půdních mikroorganismů (Hartmann et al., 2009). Mikroorganismy jsou schopny svými činnostmi zvýšit, ale i snížit, biologickou dostupnost a toxicitu RP. Například bakterie *Pseudomonas maltophilia* redukuje toxický a rozpustný Cr^{6+} na netoxický a nerozpustný Cr^{3+} (Fišer et al. 2014). Také některé kmeny bakterií z rodu *Streptomyces* sp. mohou ovlivnit speciaci a mobilitu (Cd, Pb a Zn) a tím zvýšit jejich akumulaci rostlinami (Zloch et al., 2017).

Výrazný vliv na schopnost rostlin snášet zátěž vyvolanou RP, mají symbiotické (mykorhizní) houby. S kořeny rostlin vytvářejí symbiózu dvě velké a ekologicky významné skupiny mykorhizních hub, arbuskulární a ektomykorhizní houby. Zatímco arbuskulární houby vytváří mykorhizní asociaci především s bylinami (dominují v biomech stepí a savan) a dřevinami v tropickém pásu, ektomykorhizní houby vytváří symbiózu s dřevinami v mírném pásu a v boreálu (Smith a Read, 1997). Zmírnění toxicity RP pro rostliny díky aktivitě ektomykorhizních hub byla prokázána v řadě experimentů, které ukázaly, že mykorhizní rostliny lépe prospívají v symbióze s mykorhizní houbou než bez ní (Jentschke a Godbold, 2000). Pro vznik úspěšné mykorhizní asociace, dostatečně ochraňující hostitelskou rostlinu, rostoucí na konkrétní kontaminované půdě jsou důležité tři základní aspekty: (i) kompatibilita houby a hostitele, (ii) schopnost houby tolerovat zátěž daných RP, (iii) schopnost zvýšit rezistenci svého hostitele k této zátěži. Zvýšení tolerance hostitele přitom může být přímé (aktivace mechanismů zvyšujících toleranci) nebo nepřímé (zlepšení výživy rostlin a její odolnosti vůči biotickému a abiotickému stresu; Colpaert, 2008).

Další možností, jak zvýšit rezistenci rostlin proti negativnímu vlivu RP jsou transportní blokády. Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.2.2, první ochranou bariérou proti RP je jejich zadržení v buněčných stěnách, především v kořenech, kde se vážou na pektiny (kyselina polygalakturonová) a hystidylové skupiny (Hasan et al., 2017). Velmi vysokou afinitu ke kyselině polygalakturonové má především Pb, ale i další RP (Połec–Pawlak et al., 2007; Seregin a Kozhevnikova, 2008). Afinita prvků ke kyselině

polygalakturonové v buněčných stěnách klesá v pořadí: Pb > Cr > Cu > Ca > Zn (Seregin a Kozhevnikova, 2008). Afinita Cd k buněčným stěnám je podobná jako u Zn (Williams a Rayson, 2003).

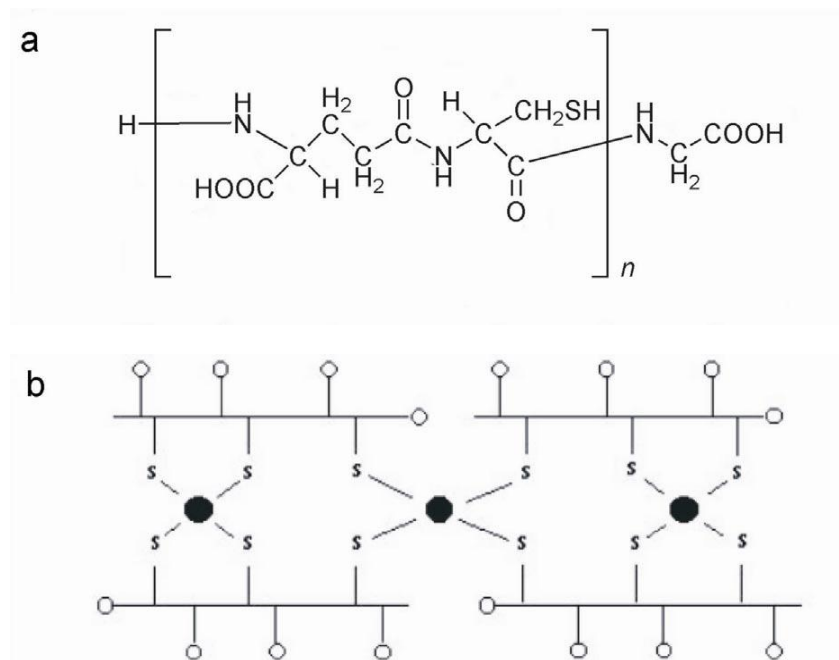
Poslední překážkou RP před vstupem do cytosolu buňky je plazmatická membrána. Transport RP přes plazmatickou membránu může být značně znesnadněn selektivitou transportních proteinů a blokováním transkripce genů kódující transportní proteiny (Procházka et al., 1998; Antoniadis et al., 2017; Jalmi et al., 2018). Některé z membránových přenašečů, které jsou podrobně popsány v kapitole 2.2.1, mohou exportovat ionty RP do vakuol nebo ven z buňky. Například již zmíněné ABC proteiny jsou přenašeči komplexů fytochelatinu–Cd a glutation–Cd přes tonoplast do vakuol. Plazmatická membrána je zároveň prvním místem v buňce, které může být působením RP poškozeno, a to v důsledku oxidace proteinů a vzniku vazeb s thiolovou skupinou (Hall, 2002) a dále změnami ve složení lipidů (Jemal et al., 2000).

Zvýšené množství RP v buňce způsobuje škody řadou mechanismů. Nejběžnější je produkce reaktivních forem kyslíku vyvolávající oxidační stres. Reaktivní formy kyslíku na normální fyziologické úrovni hrají zásadní významnou roli, nicméně jejich zvýšená produkce zhoršuje fungování buněk. Rostliny se proti nim brání mnoha obrannými reakcemi (Hasan et al., 2017; Jalmi et al., 2018). K vnitrobuněčným detoxikačním mechanismům patří tvorba stresových proteinů zahrnující odolnější isoenzymy, proteázy a ubikvitin pro urychlení rozkladu poškozených proteinů. Stresové proteiny mohou být indukovány nesespecificky, působením různých typů stresorů, nebo jejich indukce může být specificky vázána na receptor a vyvolána určitým stresovým faktorem. Mezi nesespecificky indukované proteiny patří molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin. Chaperony slouží nejen k řízení změn konformace proteinů při transportu přes membránu, ale také jsou schopny upravit jejich konformaci při mírném poškození. Pokud dojde k nenapravitelným změnám je protein "označen" ubikvitinem a rozložen proteázami na aminokyseliny. Ty jsou pak použity pro tvorbu nových proteinů (Procházka et al., 1998; Hasan et al., 2017).

Velmi účinnou obranou reakcí rostlin proti RP je tvorba fytochelatinů (PC) schopných poutat RP vazbou do chelátových komplexů (Hasan et al., 2017; Jalmi et al., 2018). Základní sekvencí fytochelatinů je glutation, skládající se z kyseliny γ -glutamové (Glu), cysteinu (Cys) a glycinu (Gly). Glutation může existovat ve dvou stavech, v oxidovaném (GSSG) a v redukovaném (GSH). Základní struktura fytochelatinu je tedy $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, kde $(\gamma\text{-Glu-Cys})$ se může opakovat 2 až 11 krát, nebo koncová aminokyselina Gly může být nahrazena jinou aminokyselinou, např. alaninem - (Ala),

glutamovou kyselinou - (Glu) nebo serinem - (Ser), a pak výsledným produktem jsou tzv. isofytochelatiny (Cobbett a Goldsbrough, 2002). Proces syntézy fytochelatinů probíhá enzymaticky transpeptidázovou reakcí glutationu a je katalyzován enzymem γ -glutamylcystein-dipeptidyl-transpeptidázou nazývaným též fytochelatinsyntetáza. Jejimi nejsilnějšími aktivátory jsou ionty Cd^{2+} následované ionty Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} a Au^+ (Zhu et al., 1999; Cobbett, 2000). Fytochelatiny vážou především ionty Cd^{2+} pomocí thiolových skupin cysteinu a komplexy fytochelatin-Cd jsou následně přenášeny transportéry ze skupiny ABC do vakuol (Hasan et al., 2017). Tím je zamezeno toxickým projevům Cd^{2+} v cytosolu. Ve vakuole se Cd uvolní a fytochelatin se vrací zpět do cytoplasmy. Kadmium se následně ve vakuole váže na organickou kyselinu a vytvoří sůl (Steffens, 1990; Sanità di Toppi a Gabrielli, 1999).

Obr. 1. a) Strukturální vzorec molekuly fytochelatinu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$), b) model struktury fytochelatinového komplexu kadmia $\text{Cd}_3(\text{PC}_3)_4$. Struktura se skládá ze čtyř molekul $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{-Gly}$, které prostřednictvím dvanácti SH skupin vážou 3 atomy kovu (\bullet), karboxylové skupiny jsou vyznačeny (\circ). Převzato z Kizek et al. (2004).



Další možností snížení toxicity RP po vstupu do cytosolu je jejich komplexace s organickými kyselinami a aminokyselinami a následné ukládání výsledných komplexů ve vakuolách, odkud mohou být v případě potřeby zpětně mobilizovány (Meharg, 2005). Komplexace iontů kovů, jako např. Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} a Al^{3+} , s organickými kyselinami

a aminokyselinami se děje díky jejich vysoké afinitě k ligandům obsahujícím kyslíkové atomy (Meharg, 2005). Výsledky Harmense et al. (1994) ukazují, že Zn se v buňce váže na kyselinu jablečnou za vzniku jablečnanu zinečnatého, pomocí kterého je transportován do vakuoly, kde se Zn po uvolnění váže na kyselinu šřavelovou. Volný ionofor (kyselina jablečná) je transportován zpět. Také u penízku modravého (*Thlaspi caerulescens*) je zinek v nadzemních částech převážně vázán karboxylovými kyselinami, ale v kořenech je Zn komplexován především aminokyselinou histidinem. Mezi aminokyseliny podílející se na snížení stresu vyvolaného RP patří také cystein, jehož úloha byla popsána výše v této kapitole v souvislosti s fytochelatinu. Především Cd stimuluje tvorbu fytochelatinů v cytosolu a tvoří s nimi komplexy s nízkou molekulovou hmotností. Tyto komplexy se váží s kyselými labilními sulfidy (S^{2-}) a tvoří vysokomolekulární komplex s vysokou afinitou k Cd iontům. Tento komplex je v přítomnosti MgATP transportován pomocí specifických nosičů proti koncentračnímu spádu přes tonoplast do vakuoly. Zde komplex v kyselém prostředí disociuje a Cd tvoří komplex s organickými kyselinami (citronovou, jablečnou, šřavelovou; Sanità di Toppi a Gabrielli, 1999). Další důležitou aminokyselinou je prolin. Jeho akumulace v pletivech rostlin souvisí s reakcí rostliny na širokou škálu environmentálních stresů včetně stresu vyvolanému RP (Pavlíková et al. 2007). Prolin se zapojuje proti stresu různými mechanismy: osmo–redox regulací, chelatací RP nebo jako antioxidant (Sharma et al., 2006).

2.2.4 Tolerance rostlin k rizikovým prvkům

Rostliny kolonizující lokality s přirozeným vyšším výskytem RP tzv. metalofyty vyvinuly fyziologické mechanismy, které jim umožňují tolerovat toxicitu těchto RP. Metalofyty uplatňují dvě základní strategie, jak se vyrovnávat s působením RP, podle toho můžeme rostliny rozdělit do dvou základních skupin (Baker, 1981; Lasat, 2002). První skupinou jsou exkludory, rezistentní rostliny mezi které patří např. vlčí bob (Seregin a Kozhevnikova) nebo některé jednoděložné rostliny např. kostřava (Tlustoš et al., 2006). Exkludory se brání příjmu RP a jejich transportu z kořene do výhonů. To vede k zachování relativně nízké koncentrace RP v jejich nadzemních částech oproti vysokým koncentracím RP v půdě (Baker, 1981). Druhou skupinou rostlin jsou akumulátory, tolerantní rostliny, mezi které patří mnoho druhů z především z čeledi *Brassicaceae* (např. hořčice) a z čeledi *Compositae* (salát, špenát; Tlustoš et al., 2006). Akumulátory hromadí RP ve svých pletivech a transportují je z kořenů do výhonů. Fyziologické vlastnosti exkludorních a akumulačních druhů rostlin jsou považovány za mechanismy tolerance k RP (Baker,

1981). Další skupinou rostlin, podle jejich reakce na RP, jsou tzv. indikátory, u kterých existuje proporcionální vztah mezi obsahem RP v půdě, jejich příjmem a akumulací v rostlině (Baker, 1981). Mezi indikační rostliny patří většina zemědělských plodin (pšenice, oves; Tlustoš et al., 2006).

Specifickou podskupinu akumulátorů představují hyperakumulátory, jsou to rostliny, které běžně rostou na půdách kontaminovaných RP a jsou schopny dokončit svůj životní cyklus bez příznaků fyto toxicity (Baker et al., 2000). Hyperakumulační rostliny obsahují v nadzemní biomase 100krát vyšší obsahy RP než bývají běžně naměřeny v ostatních rostlinách, což je pro Hg $> 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, pro Cd $> 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, pro Co, Cu, Cr, Ni a Pb $> 1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a pro Zn a Mn $> 10\,000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Baker a Brooks, 1989). Je známo asi 400 druhů hyperakumulačních rostlin ze 45 čeledí (Baker et al., 2000).

Tyto hyperakumulační rostliny se zdají být pro své schopnosti tolerovat, přijímat a transportovat RP do nadzemních částí, vhodné pro fytoextrakční technologie (Yoon et al., 2006; McGrath et al., 2006), avšak jejich nevýhodou je, že zpravidla produkují méně biomasy než jiné druhy (Fischerová et al., 2006; Antoniadis et al., 2017), což vede k jejich relativně nízkému odběru RP z půdy (Tlustoš et al., 2005). Ve fytoextrakčních technologiích existují v podstatě dva hlavní trendy ve výběru rostlin vhodných k jejich realizaci, a to buď používat hyperakumulační rostliny pro jejich schopnost akumulovat vysoké hladiny RP a nebo RRD pěstované systémem výmladkových plantáží s krátkou dobou obmýtl (Maxted et al., 2007b).

2.2.5 Rychle rostoucí dřeviny

Mezi rychle rostoucí dřeviny můžeme zařadit druhy rostlin z rodu topol (*Populus* spp.), vrba (*Salix* spp.), bříza (*Betula* spp.), olše (*Alnus* spp.), jasan (*Fraxinus* spp.) a jeřáb (*Sorbus* spp.; Rosselli et al., 2003; Weih, 2004). V systému výmladkových plantáží s krátkou dobou obmýtl jsou nejčastěji pěstovány druhy z rodů *Populus* spp. a *Salix* spp. patřící do čeledi *Salicaceae*, následně pak druhy z rodu *Betula* spp. a *Alnus* spp. z čeledi *Betulaceae* (Weih, 2004). Dřeviny z čeledi *Salicaceae*, mají některé společné rysy, pro které se staly nejvhodnějšími dřevinami pro výmladkové plantáže. Je to zejména veliký rozsah stanovišť, rychlý počáteční růst, avšak relativně krátká životnost. Dále snadné vegetativní rozmnožování a malý genom, což jsou vlastnosti umožňující rychlé vylepšování jejich vlastností prostřednictvím šlechtění (Weih, 2004). Z těchto důvodů, ale především pro svoji schopnost přijímat, transportovat a ukládat RP do nadzemních částí rostlin jsou vrby a topoly považovány za vhodné rostliny pro fytoextrakční technologie (Pulford a Dickinson, 2006; Vysloužilová et al., 2003b; Van Slyckena et al., 2013;

Kacálkové et al., 2015; Mayerová et al., 2017; Shi et al., 2017;), především na mírně až středně kontaminovaných půdách (Jensen et al., 2009), na rozdíl od olší, jasanů a jeřábů, které RP transportují jen omezeně do nadzemní biomasy (Rosselli et al., 2003). Na silně kontaminovaných půdách lze aplikovat vápno, což má za následek snížení mobility RP a tím i zlepšení kondice RRD. Pěstování RRD tak může být na silně kontaminovaných půdách vhodným opatřením pro kombinaci dvou strategií, fytoextrakce pro mobilní prvky (Cd a Zn) a asistované fytostabilizace pro As a Pb (Vondráčková et al., 2017).

2.2.5.1 Vrby

Rod vrba tvoří velmi početnou skupinu druhů, celosvětově se vyskytuje přes 350 druhů vrb, na našem území je zastoupen 25–27 původními druhy. Vrby se snadno mezi sebou kříží a jsou značně proměnlivé. Vrby jsou rozšířeny v mírném pásmu severní polokoule, téměř v celé Evropě, Asii, Himálaji, Tibetu a na kontinentech Severní a Jižní Ameriky. Tvar listů je u jednotlivých druhů velmi proměnlivý a je důležitým druhovým znakem. Vrby jsou rostliny dvoudomé, květenstvím jsou jehnědy a plodem tobolky (Šimíček 1992). Některé druhy vrb jsou schopné kolonizovat kontaminované půdy RP, např. *S. alba*, *S. viminalis*, *S. cinerea* a *S. caprea*, avšak tolerance k RP byla obecně potvrzená jen u některých klonů, zatímco další snášely jen jeden nebo dva RP (Dickinson et al., 1994).

2.2.5.1.1 Schopnost vrb tolerovat a akumulovat rizikové prvky

Klony vrb, ale i topolů, byly testovány v hydroponických pokusech na rezistenci a kumulaci RP (dos Santos Utmazian et al., 2007). V těchto pokusech byly nejvyšší koncentrace Cd zjištěny v klonu *S. dasyclados* ($315 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a nejvyšší koncentrace Zn v klonu *S. smithiana* ($3180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), avšak tyto klony měly nižší toleranci k těmto RP. Naopak, klony *S. matsudana*, *S. fragilis* a *S. purpurea* měly o něco nižší obsahy Cd a Zn, ale vyšší toleranci k jejich toxicitě.

Výsledky nádobových pokusů Fischerové et al. (2006) a polních pokusů Kacálkové et al. (2015) a Mayerové et al. (2017) ukázaly, že vrby jsou vhodnými akumulátory Cd a Zn, zatímco topoly hromadí podle Fischerové et al. (2006) o něco více Pb a mají v našich podmínkách vyšší výnos (Mayerová et al., 2017) než vrby. Také nádobové pokusy Vysloužilové et al. (2003a) na dvou odlišně kontaminovaných půdách dokazují schopnost vrb hromadit ve svých pletivech Zn a Cd. Ovšem extrémně vysoká kontaminace RP ve fluvizemi z nivy řeky Litavky měla za následek vznik chlorózu, opad listů a omezení

tvorby biomasy u všech sedmi sledovaných klonů vrb. Obecně nejvyššího odběru Cd z půdy bylo dosaženo u vrb na středně znečištěné kambizemi v okolí Příbrami, a to díky vysoké akumulaci Cd (maxima v listech $108 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v prvním roce a $204 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v druhém roce pokusu) spojené s vysokou produkcí biomasy. Nejvyšší celkový odběr Zn byl zaznamenán u vrb na fluvizemi „Litavka“, díky vysokému obsahu Zn v pletivech vrby (maxima v listech $5061 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v prvním roce a $4484 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v druhém roce pokusu) navzdory významné redukci biomasy. K podobným závěrům vedly také pokusy Fischerové et al. (2006) a Tlustoše et al., (2007), i v těchto studiích byly u vrb nejvyšší obsahy Cd a Zn nalezeny v listech, zatímco prvky As a Pb byly hromaděny především v kořenech. Schopnost vrb akumulovat Cd a Zn především v listech potvrzují i další autoři (Van Slycken et al., 2013; Kacálková et al., 2015; Mayerová et al., 2017).

2.2.5.1.2 Výnos biomasy vrb

Vedle schopnosti akumulovat a tolerovat RP je pro fytoextrakční technologie významným parametrem také výnos biomasy použitých rostlin. Mezi nejvýkonnější klony vrb v produkci biomasy patří kříženec *S. smithiana* (Tlustoš et al., 2007; Mrnka et al., 2011), který je spontánním hybridem *S. viminalis* a *S. caprea*. V devítiletém polním pokusu (3 obmýtí) tento klon dosáhl výnosu přes $14 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$ suché biomasy (Weger, 2008) a jeho výnos neklesal i v následující čtvrté sklizni (Weger a Bubník, 2011). Tlustoš et al. (2007) uvádějí pro tento klon výnosy suché biomasy vypočtené z nádobového pokusu na středně kontaminované půdě RP po první sklizni jen $2\text{--}5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$. Podle Havlíčkové et al. (2010) výnos biomasy z první sklizně bývá přibližně asi 30 % oproti výnosu biomasy z následujících sklizní. Dalšími často pěstovanými vrbami ve výmladkových plantážích s krátkou dobou obmýtí jsou tzv. „švédské vrby“, které byly většinou vyšlechtěny z kříženců vrby *S. viminalis*. Tato skupina vrb zahrnuje registrované odrůdy např. klon Tordis, Tora, Orm a mnohé další (Havlíčková et al., 2010). Sevel et al. (2014), zaznamenali výnosy klonu Tordis ve druhém dvouletém obmýtí v rozmezí od $8,7\text{--}11,9 \text{ t sušiny}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$ a Larsen et al. (2016) uvádějí výnos pro tento klon ve druhém tříletém obmýtí $7,2$ až $10,2 \text{ t sušiny}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$ v závislosti na režimu používání hnojiv. Výnos biomasy klonů RRD nezáleží pouze na volbě klonu, ale zároveň i na podmínkách stanoviště (Mrnka et al., 2011; Larsen et al., 2014). Klon Tordis v první sklizni po tříletém růstu na pěti odlišných stanovištích dosáhl ve studii Larsena et al. (2014) výnosu biomasy rozmezí $5,2\text{--}10,2 \text{ t sušiny}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$, podobných výsledků jako klon Tordis dosáhl i klon Tora, ale pouze na dvou nejlepších stanovištích. Naopak, Pulford et al. (2002), u klonu

Tora zaznamenali po prvním roce růstu na silně kontaminované půdě výnos sušiny pouze $0,09 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{rok}^{-1}$.

2.2.5.2 Topoly

Jedná se o opadavé listnaté dřeviny, které jsou dvoudomé a většinou větrosnubné. Listy jsou střídavě postavené, řapíkaté. Květy jsou v jehnědách, jednopohlavné, stopkaté a rozvíjí se před rašením listů, plody jsou tobolky. Zástupci rodu topol jsou na severu rozšířeni až v lesotundře, na jihu se vyskytují po Himálaj, Eufkrat, severní Afriku či Floridu. Tento rod zahrnuje dle užšího vymezení asi 110 druhů. Díky snadné vegetativní reprodukci topolů jsou v kultuře jako kultivary rozšířeny stovky kříženců (Mottl a Úradníček, 2003).

2.2.5.2.1 Schopnost topolů tolerovat a akumulovat rizikové prvky

Topoly stejně jako vrby jsou schopny akumulovat RP a transportovat je z kořenů do nadzemních částí rostlin za současné vysoké produkce biomasy. Tyto schopnosti a fytoextrakční potenciál tří klonů topolů zkoumali Di Lonardo et al. (2011) *in vitro*. Jednalo se o dva autochtonní klony a jeden komerční klon druhu *Populus alba* L. Oba autochtonní klony vykazovaly vyšší obsahy RP (Cd, Cu, Zn), avšak díky vyššímu výnosu biomasy byl největší odběr RP zaznamenán u komerčního klonu.

Schopnost akumulovat a tolerovat RP u topolů byla zkoumána v mnoha nádobových pokusech, např. Komárek et al. (2008) a Nikolić et al. (2017). Fytoextrakční potenciál dvou klonů topolů (*Populus trichocarpa* Torr. A Gray \times *P. koreana* Rehd.; *Populus nigra* \times *P. maximowiczii* Henry.), tří klonů vrb a dvou hyperakumulujících rostlin zkoumali také Fischerová et al. (2006) ve dvouletém nádobovém pokusu. Hyperakumulátory potvrdily svou vysokou schopnost akumulovat RP, ale i přes vysoké obsahy RP v jejich pletivech, nebyl nalezen žádný významný rozdíl mezi nimi a RRD v remediační výkonnosti vyjádřené pomocí remediačního faktoru (RF): *P. trichocarpa* – Cd = $20,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 5 %); Pb = $17,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 0,024 %); Zn = $337 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 1,61 %), *P. nigra* – Cd = $17,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 4,6 %); Pb = $16,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 0,025 %); Zn = $344 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (roční RF 1,77 %), a to díky vyšší produkci biomasy u klonů RRD. Také v polním pokusu Mayerové et al. (2017) s jednou vrbou (*Salix* \times *fragilis* L.), dvěma klony topolu (klon J–104 a klon J–105 oba kříženci *Populus nigra* \times *P. maximowiczii* Henry) a s několika bylinnými energetickými rostlinami, potvrdily RRD svůj fytoextrakční potenciál, avšak lepších fytoextrakčních výsledků dosáhla vrba i když oba topolové klony měly o něco vyšší výnos biomasy. Během tří let klon J–104 odebral

60,2 g·ha⁻¹ Cd, 80,8 g·ha⁻¹ Pb a 2,5 kg·ha⁻¹ Zn a klon J–105 odebral 66,2 g·ha⁻¹ Cd, 81,9 g·ha⁻¹ Pb a 2,8 kg·ha⁻¹ Zn.

Laureysens et al. (2004a; 2004b) ověřili schopnost topolů tolerovat a hromadit RP v polním pokusu založeném v roce 1996. Sedmnáct klonů topolů bylo pěstováno na půdě kontaminované Cd (0,8 mg·kg⁻¹), Zn (160 mg·kg⁻¹) a dalšími prvky v areálu bývalé odpadní skládky nedaleko Antverp. Pro další výzkum bylo vybráno 6 klonů s vysokým fytoextrakčním potenciálem a vysokou produkcí biomasy (Balsam Spire, Hazendans, Fritzi Pauley, Trichobel, Gaver a Woltersen). Po dalších dvou letech pěstování nejlepších výsledků v akumulaci Cd a Zn dosáhl klon Balsam Spire (57 g·ha⁻¹ Cd; 2,0 kg·ha⁻¹ Zn) a klon Woltersen (47 g·ha⁻¹ Cd; 2,4 kg·ha⁻¹ Zn). Tyto dva klony se vyznačovaly četnými menšími výhonky a vysokou mírou hromadění Cd a Zn (Laureysens et al., 2005).

2.2.5.2.2 Výnos biomasy topolů

Mezi nejproduktivnější a nejčastěji pěstované klony výmladkových plantáží v České republice podle Wegera (2009) a Wegera a Bubeníka (2011) patří kříženci *Populus maximowiczii* × *P. nigra*, především klon J–105 a klon J–104 (Weger, 2009; Mrnka et al., 2011). U těchto klonů topolů, označovaných též jako „japonské topoly“ jsou typické výnosy na nekontaminovaných půdách 6–18 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. Fortier et al. (2010) pěstovali v šestiletém obmýtí křížence *Populus maximowiczii* × *P. nigra* na úrodných březích potoků v Kanadě s výnosem 12 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. K podobným výsledkům dospěl i Weger (2009), který u klonu stejného původu dosáhl v šestiletém obmýtí výnosu 11,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, avšak pokud byl tento klon sklizen v tříletém obmýtí, jeho výnos poklesl na 9,2 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ a při každoroční sklizni měl výnos pouhých 5,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. Nielsen et al. (2014) ve své studii odhadli výnos tohoto klonu po 13 letech pěstování pouze na 5,1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. V tříletém polním pokusu Mayerové et al. (2017), ve kterém byl klon J–105 pěstován na kontaminované půdě bez použití hnojiv, byl jeho výnos odhadnut v prvním roce na 8,2 t·ha⁻¹, ve druhém roce na 11,9 t·ha⁻¹ a ve třetím roce na 13,8 t·ha⁻¹. Podle Wegera (2009) pro hybridy *Populus maximowiczii* × *P. nigra* je nejvhodnější délka obmýtí 5–6 let. V pokuse Benetky (2009) s pěti klony *P. nigra* (klony: 107, 113, 202, 210, 301) z místní subpopulace a s jedním hybridním klonem NE–42 se výnosy sušiny v po sobě jdoucích sklizních pohybovaly, podle typu stanoviště a klonu, v rozmezí 0,8–9,4 t·ha⁻¹·rok⁻¹ v první sklizni, 1,3–11,4 t·ha⁻¹·rok⁻¹ v druhé sklizni a 9,4–26,1 t·ha⁻¹·rok⁻¹ ve třetí sklizni. Ve studiích Laureysense et al. (2004a; 2004b) bylo na mírně kontaminované zemině RP testováno 17 klonů ze šesti skupin topolů. Výnosy napříč všemi skupinami se

pohybovaly v rozmezí 2,2–11,4 t·ha⁻¹·rok⁻¹. U skupiny klonů D × T (*P. deltooides* × *P. trichocarpa*) byl výnos sušiny v rozmezí 2,8–3,7 t·ha⁻¹·rok⁻¹, u skupiny klonů D × N (*P. deltooides* × *P. nigra*) se výnos sušiny pohyboval v rozmezí 2,2–5,2 t·ha⁻¹·rok⁻¹, u klonu ze skupiny T × B (*P. trichocarpa* × *P. balsamifera*) byl výnos sušiny 4,8 t·ha⁻¹·rok⁻¹; u klonu ze skupiny N (*P. nigra*) byl výnos sušiny 8,2 t·ha⁻¹·rok⁻¹; u skupiny klonů T (*P. trichocarpa*) se výnos sušiny pohyboval v rozmezí 8–8,5 t·ha⁻¹·rok⁻¹ a ve skupině klonů T × D (*P. trichocarpa* × *P. deltooides*) byl výnos sušiny v rozmezí 3,7–11,4 t·ha⁻¹·rok⁻¹. Nielsen et al. (2014) ve své studii odhadují výnos klonu Wolterson po 13 letech pěstování pouze na 1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. Verlinden et al. (2013) uvádějí výnos tohoto klonu v prvním dvouletém obmýtí 2,78 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, a ve druhém dvouletém obmýtí Verlinden et al. (2015) uvádějí výnos přibližně 11 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹.

2.2.5.3 Zlepšení fytoextrakčního potenciálu rychle rostoucích dřevin

Produkce biomasy u RRD využitých ve fytoextrakčních technologiích se zdá být velmi významným parametrem (Komárek et al, 2008). Fytoextrakční potenciál RRD lze tedy zvýšit pomocí vhodných agrotechnických zásahů, které mají pozitivní vliv na zvýšení výnosu biomasy. Hlavní agrotechnickou operací těsně po výsadbě je omezování zaplevelení, neboť je dobře známo, že konkurence plevelů může snížit výnos RRD v průběhu roku výsadby (založení porostu), ale také může mít vážné dopady na výnos i v následujících letech (Clay a Dixon, 1997; Larsen et al 2014). I když výmladkové plantáže jsou poměrně nenáročné na živiny, je třeba doplnit odebrané živiny hnojením v podobě minerálních nebo organických hnojiv. Vhodnými organickými hnojivy pro výmladkové plantáže mohou být hnůj, kejda, kompost a případně také digestát a stabilizované kaly ČOV (Mrnka et al., 2011; Placek et al., 2017), jejichž použití pro hnojení běžných plodin určených pro produkci potravin není zcela vhodné, neboť mohou obsahovat vysoká množství různých látek a RP (Hanč et al., 2007). Aplikace čistírenských kalů do půdy má příznivý vliv na její úrodnost a fyzikální vlastnosti, zvyšuje pórovitost půdy, stabilitu půdních agregátů (Pagliai a Antisari, 1993; Placek et al., 2017) a dodává do půdy velké množství makroživin (N, P) a organické hmoty, což má pozitivní vliv na produkci biomasy. Podle Chaney et al. (1999) a Placek et al. (2017) aplikace čistírenského kalu do půdy může mít také vliv na snížení příjmu RP z půdy, neboť aplikace organických hnojiv může omezit mobilitu a přijatelnost těchto prvků pro rostliny. Dalšími možnostmi jak ovlivnit mobilitu, akumulaci RP a výnos RRD může být aplikace bakteriálního (Zloch et al., 2017), ektomykorhizního (Phanthavongsa et al., 2017)

nebo endofytického (Berthelot et al., 2017) inokula či různých činidel jako je např. EDTA (Shahid et al., 2014; Antoniadis et al., 2017). Vliv na fytoextrakční potenciál může mít také délka obmýtí, či období, ve kterém je sklizeň provedena. Podle Michels et al. (2018) je sklizeň topolů ve vegetačním období i s listy klíčovou součástí fytoextrakce Cd a Zn. Podle Van Slycken et al. (2013) by se při sklizni vrb i s listem mohl zvýšit potenciál fytoextrakce u Cd až o 40 %.

2.3 Metody remediace půd

Místem, kde se RP zachycují a případně i dále koncentrují, je především půda, která je svými vlastnostmi přímo předurčena poutat kontaminanty. Proto je právě půda nejčastěji zmiňována v souvislosti s remediacemi (Tlustoš et al., 2004). K úspěšnému provedení remedice je třeba stanovit: (i) povahu kontaminantu a rizik biopřístupnosti, (ii) přesný rozsah kontaminace, a to jak plošné, tak i objemové a možné riziko jejího pohybu, (iii) hraniční hodnoty remediační úrovně, neboli jakých výsledných hodnot má být dosaženo a v jakém časovém intervalu a po té na základě zjištěných informací určit způsob remediace (Mulligan et al., 2001; Tlustoš et al., 2004).

Metody remediace lze rozdělit podle několika parametrů. Evanko a Dzombak (1997) dělí metody remediace do několika kategorií na základě používaného přístupu: izolace, imobilizace, redukce toxicity, fyzická separace a extrakce. Metody remediace můžeme dále rozdělit na *ex-situ* techniky, které představují odtěžení, odvoz a následnou dekontaminaci zeminy a *in-situ* techniky, které jsou většinou více šetrné k půdě a jsou prováděny přímo v místě kontaminace. Některé z metod lze použít *in-situ* i *ex-situ*. Oba způsoby využívají chemických, fyzikálních a biologických principů (Boopathy, 2000; Tlustoš et al., 2004).

2.3.1 Fyzikální a chemické metody

Fyzikální separace - jedná se o procesy prováděné *ex-situ*, které separují kontaminovaný materiál od zbylé půdní hmoty využitím určitých fyzikálních charakteristik RP a půd. K dosažení tohoto cílů, je použito několik postupů. Patří mezi ně: síťování, hydrocyklony, fluidní lože nebo magnetická separace. Tato metoda se používá nejčastěji k předčištění půdy, čímž dojde ke snížení objemu kontaminované zeminy (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001; Tlustoš et al., 2004).

Pyrometarulgická extrakce - jedná se převážně o *ex-situ* metodu, která využívá vysokých teplot 200–700 °C k odpařování nečistot. Tyto metody jsou nejvíce používány

pro rtuť, protože snadno téká. Metoda je vhodná především pro vysoce kontaminované půdy (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001).

Praní půdy (chemické vyluhování) – při této *ex-situ* metodě mohou být RP odstraněny z půdy za použití různých činidel přidávaných do půdy. To může být provedeno v reaktorech nebo na haldách zeminy. Jako činidla jsou používány anorganické kyseliny, jako je kyselina sírová a chlorovodíková s hodnotou pH menší než 2, organické kyseliny, včetně kyseliny octové a kyseliny citrónové, chelatační činidla, jako je například kyselina ethylendiamintetraoctová a různé jejich kombinace. Tato metoda je neúčinnější u písčité půdy (Mulligan et al., 2001).

Izolace ložiska kontaminace - jednou z *in-situ* strategií remediace půd je izolace kontaminantů, aby se zabránilo jejich dalšímu šíření. K tomu lze použít vertikálních či horizontálních stěn zhotovených z oceli, cementu, bentonitu a malty, čímž dojde k úplnému uzavření ložiska kontaminace (Mulligan et al., 2001).

Solidifikace/stabilizace (S/S) - další možností jsou solidifikační a stabilizační *in-situ* technologie, které izolují samotné nečistoty a nikoli celá kontaminovaná ložiska. Solidifikace je zapouzdření kontaminující látky v pevné matici, zatímco stabilizace zahrnuje chemické reakce, vedoucí ke snížení mobility nečistot (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001; Tlustoš et al., 2004). Anorganická pojiva, například cement, popílek a organická pojiva, jako je bitumen se používají k vytvoření krystalického, skelného nebo polymerního obalu kolem polutantu. Dominantním mechanismem, kterým jsou RP imobilizovány je vysrážení hydroxidů v rámci pevné matrice a vyluhovatelnost RP z této matrice je závislá na rozpustnosti těchto hydroxidů (Li et al., 2001). Půdy mohou být remediovány tímto způsobem *in-situ*, ale i odtěženy (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001; Tlustoš et al., 2004).

Vitrifikace - je solidifikačně-stabilizační proces vyžadující tepelnou energii (1600–2000 °C), vytvořenou pomocí elektrod vložených do půdy, čímž dojde k roztavení půdy. Vzniká sklovitá tavenina, která v sobě uzavře netěkavé polutanty. Remedovaná zemina touto metodou by měla obsahovat dostatek Si, Al a oxidů alkalických kovů (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001; Tlustoš et al., 2004).

Vymývání půdy - principem této *in-situ* metody je solubilizace (převedení do roztoku) kontaminantu, pomocí proplachování půdy vodou (Mulligan et al., 2001).

Elektrokinetická dekontaminace - je *in-situ* proces, při kterém dochází k vytvoření elektrického proudu o nízké intenzitě mezi katodou a anodou, které jsou instalovány do podpovrchových vrstev kontaminované půdy. Ionty RP se pohybují

mezi elektrodami, anionty směřují ke kladné elektrodě a kationty k záporné elektrodě (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001). Kovy mohou být odstraněny elektrolytickým pokovováním nebo vysrážením na elektrodách (Smith et al., 1995).

Chemické procesy - chemické reakce se používají ke snížení toxicity nebo mobility RP. Pro tento účel se používají tři typy reakcí: oxidace, redukce, a neutralizační reakce. Chemická oxidace a redukce mění oxidační stav RP. Změna oxidačního stavu kovů může vést k detoxikaci, vysrážení nebo rozpuštění RP. Neutralizační reakce se provádí za účelem nastavení kyselého nebo zásaditého pH půdy (Evanko a Dzombak, 1997; Mulligan et al., 2001).

2.3.2 Biologické metody

Odstraňování polutantů z kontaminovaných míst je možné provádět chemickými nebo fyzikálními procesy, či kombinací obou těchto procesů. To je většinou ekonomicky náročné a dochází přitom k větším zásahům do životního prostředí ve srovnání s možností využití přirozenějších biologických způsobů (Melenová a Demnerová, 2004). Biologické metody k dekontaminaci půdy, nebo jiných složek životního prostředí, využívají živé organismy, především mikroorganismy a rostliny. Primárně byly tyto technologie vyvinuty k sanaci organických polutantů, ale stále více se uplatňují při dekontaminaci RP (Evanko a Dzombak, 1997). Mezi biologické metody vhodné k sanaci půd můžeme řadit biologické procesy s využitím mikroorganismů, které probíhají prostřednictvím různých mechanismů, jako je oxidačně–redukční reakce, sorpce a methylace, nebo fytoremediační metody, které jsou realizovány pomocí rostlin.

2.3.2.1 Bioremediace

Mezi hlavní metody bioremediace patří tzv. bioleaching a oxidačně-redukční reakce. Bakterie rodu *Thiobacillus* sp. v aerobních, kyselých podmínkách oxidují kovové sulfidy na kyselinu sírovou, která pak desorbuje kovy z půdy. Další vyluhovací technikou, která má potenciál pro sanaci kontaminované půdy RP je produkce kyseliny citronové houbou *Aspergillus niger* a její následné působení, jako chelatačního činidla pro vyluhování kovů (Mulligan et al., 2001).

Biosorpce je biologická metoda, která spočívá v zabudování RP do biomasy mikroorganismů. Tato metoda se používá hlavně pro odstraňování nízké koncentrace kovů ve vodě (Evanko a Dzombak, 1997).

Biologické oxidačně–redukční procesy mohou snížit např. mobilitu chromu. Mobilní a toxický Cr (VI) je pomocí bakterie *Bacillus subtilis* redukován na Cr (III), který je méně mobilní a téměř netoxický.

Biomethylace obnáší navázání methylové skupiny (-CH₃) pomocí aktivity mikroorganismů na RP, jako je As, Hg, Cd nebo Pb, čímž se zvýší těkavost RP (Mulligan et al., 2001; Fišer et al., 2014).

2.3.2.2 Fytoremediace

Fytoremediace jsou technologie, ve kterých se využívají rostliny k odstranění polutantů z prostředí, nebo je činí méně škodlivými. Fytoremediace zahrnují dva základní procesy, a to imobilizaci RP a nebo jejich odstranění (Wenzel et al., 1999; Bolan et al., 2014). Stabilizační metody, jako je fytostabilizace a fytoimobilizace neodstraňují RP z kontaminované půdy, ale snižují jejich mobilitu a tím i riziko jejich vstupu do potravního řetězce. Naopak, metody určené k odstraňování RP z půdy, mohou někdy mobilitu těchto prvků v půdě dokonce zvyšovat za účelem jejich snadnějšího příjmu rostlinami. Mezi metody vedoucí k odstranění RP z půdy patří fytoextrakce, fytodegradace a fytovolatilizace (Wenzel et al., 1999).

Fytostabilizace využívá rostlin tolerantních k RP pro mechanickou stabilizaci znečištěných půd a prevenci vodní a větrné eroze. Zároveň může dojít ke snížení extrahovatelnosti RP díky vyšší úrovni evapotranspirace v porovnání s půdou bez vegetačního pokryvu (Wenzel et al., 1999; Favas et al., 2014).

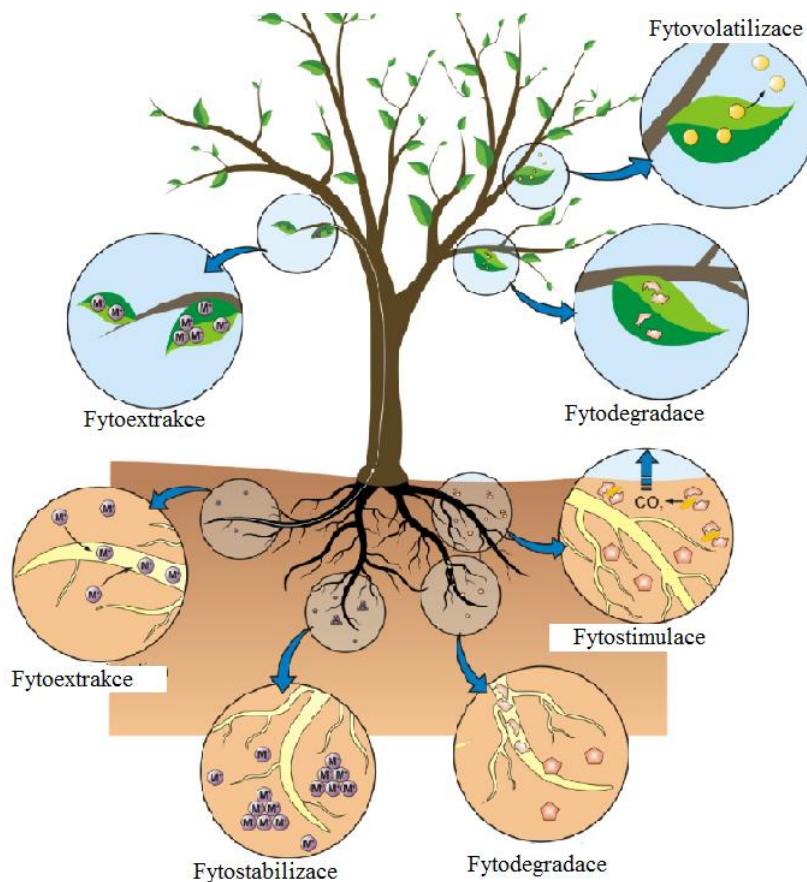
Fytoimobilizace omezuje pohyb a transport rozpustných kontaminantů, a to díky tomu, že rostliny sniží jejich pohyblivost v půdě (Wenzel et al., 1999).

Fytodegradace je proces, kdy po přijetí organických polutantů do rostliny dochází k jejich degradaci uvnitř rostlinných pletiv nebo pomocí mikroorganismů v blízkosti kořenů (Wenzel et al., 1999; Favas et al., 2014).

Fytovolatilizace je proces transformace, degradace a volatilizace těkavých sloučenin kontaminujících půdu pomocí rostlin a mikroorganismů (Wenzel et al., 1999; Favas et al., 2014).

Schematické znázornění těchto výše popsaných fytoremediačních principů je uvedeno v obrázku 2.

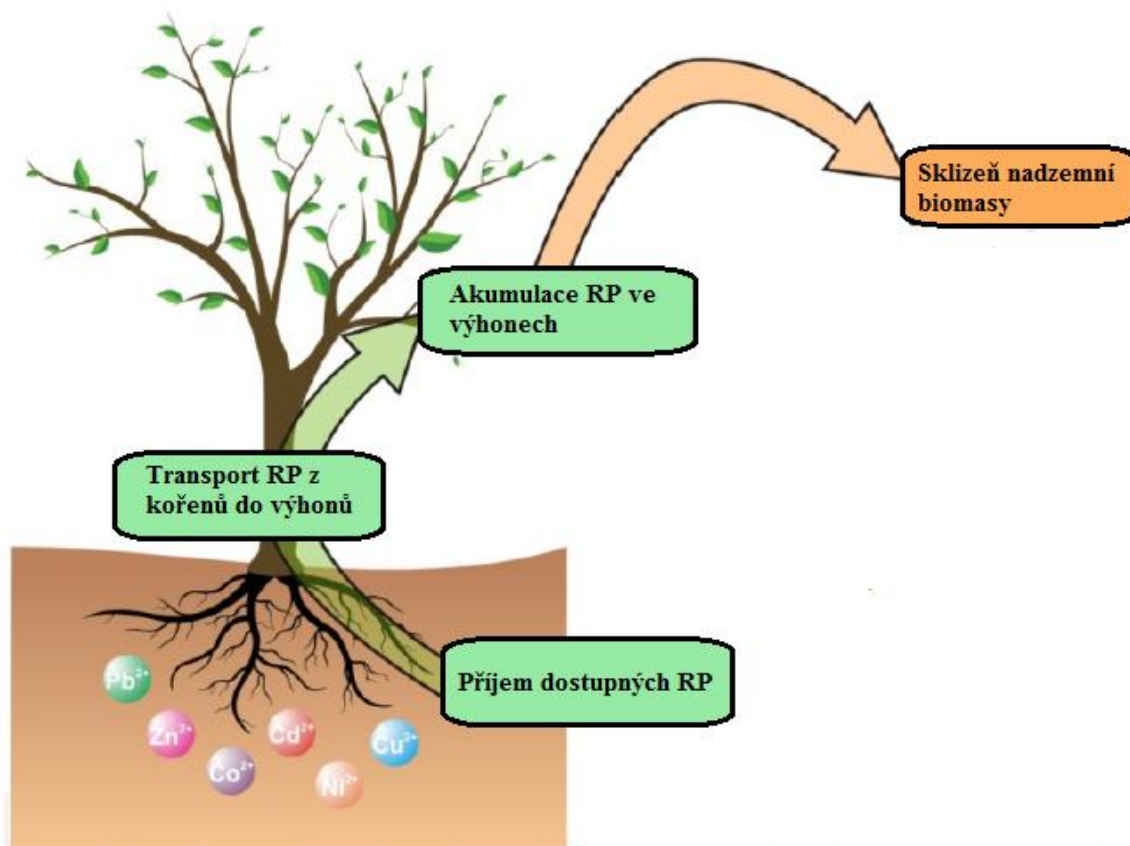
Obr. 2. Znárodnění fytoimediačních strategií (upraveno dle Favas et al., 2014).



2.3.2.2.1 Fytoextrakce

Fytoextrakce je metoda, při které dochází k extrakci RP a anorganických a organických sloučenin z půdy jejich příjmem do rostliny, kde jsou transportovány do nadzemní biomasy rostlin (Wenzel et al., 1999; Blaylock et al., 2000; Favas et al., 2014). Tento proces schematicky znázorňuje obrázek 3. Fytoextrakční technologie jsou nejen relativně levné a ohleduplné k životnímu prostředí, neboť zanechávají půdu strukturálně, chemicky a biologicky nepoškozenou, ale v případě, že jsou realizovány pomocí RRD jsou z dlouhodobého hlediska i ekonomicky návratné, díky využití dřeva pro průmyslové nebo energetické zpracování. Dalšími výhodami fytoextrakčních výmladkových plantáží RRD je jejich pozitivní vliv na biodiverzitu, sekvestraci uhlíku a podružné omezení vodní a větrné eroze, čímž zabraňují úniku RP do okolí. Fytoextrakční metody jsou však časově většinou velmi náročné (Michels et al., 2018) a v praxi se zatím nevyužívají (Favas et al., 2014).

Obr. 3. Schématické znázornění fytoextrakce RP z půdy (upraveno dle Favas et al., 2014).



Výnos biomasy a akumulační schopnosti některých klonů vrb a topolů byly již zmíněny v kapitole 2.2.5. Celkový obsah prvku v nadzemní biomase je však pouze jedním ze sledovaných parametrů u rostlin, použitých ve fytoextrakčních technologiích. Nejvýznamnější parametrem je patrně remediační faktor (RF), který představuje procentuální podíl prvku odstraněného z určitého objemu půdy s ohledem na koncentraci prvku v rostlině a rozsah sklizně (Fišerová et al., 2006; Komárek et al., 2008). V nádobovém experimentu Fischerové et al. (2006) byla u vrb a topolů nižší koncentrace sledovaných RP ve výhonech kompenzována značnou produkcí biomasy ve srovnání s hyperakumulačními druhy rostlin s vyššími koncentracemi RP a nízkým výnosem biomasy. Výsledky pokusů Vysloužilové et al. (2003a), ale i dalších autorů (Jensen et al., 2009), ukazují, že RRD se zdají být vhodnými fytoextrakčními rostlinami, ale pouze na mírně a středně kontaminovaných půdách. Přesto, že odběr Zn na silně kontaminované fluvizemi „Litavka“ byl nejvyšší, RF byl velmi nízký (pod 1 %) vzhledem k extrémně vysokému obsahu Zn v půdě. Avšak na středně kontaminované kambizemi „Příbram“ dosáhl RF pro Cd 20 % a pro Zn 4 % po dvou letech trvání experimentu (Vysloužilová et al., 2003a).

Stále ještě není známo mnoho výsledků z polních pokusů, obzvláště těch dlouhodobých. Schopnosti klonů vrb a topolů tolerovat a akumulovat RP (Cd a Zn) prověřovali v polních pokusech např. Van Slycken et al. (2013), Hu et al. (2014), Kacálková et al. (2015); Mleczek et al. (2017) a Michels et al. (2018). Ve čtyřletém polním pokusu Jensen et al. (2009) bylo dosaženo nejvyšších RF pouze 0,13 % pro Cd a 0,29 % pro Zn. Schmidt (2003) a také Antoniadis et al. (2017) uvádějí, že rostliny pěstované v nádobových pokusech odebírají vyšší množství těžkých kovů, než v přírodních podmínkách. V polním pokusu lze předpokládat, že bude dosaženo pouze 20 % RF v porovnání s RF v řízeném nádobovém pokusu. Také Dickinson a Pulford (2005) popsali rozdíly mezi teoretickými výpočty a skutečnými výsledky z polních experimentů. Existuje několik důvodů, proč tomu tak je: (i) kořeny rostlin se záměrně vyhýbají ohniskům kontaminace, (ii) část odstraněných RP je uložena v listech, které opadají a nejsou sklizeny a (iii) obsahy některých RP bývají v kořenech vysoké a kořeny nejsou při sklizních RRD sklizeny.

Z těchto důvodů je potřebný další výzkum fytoextrakčních technologií s použitím RRD v polních experimentech, kde lze v praxi ověřit účinnost některých zlepšovacích návrhů pro zvýšení remediačního potenciálu, zjištěných v řízených laboratorních a nádobových pokusech, jako jsou např.: (i) aplikace extrakčních činidel ke zvýšení mobility RP v půdě a tím zvýšení jejich dostupnosti RRD; (ii) aplikace mykorhizního inokula nebo hnojiv pro podporu tolerance RRD k RP a zvýšení výnosu biomasy; (iii) zavedení sklizně RRD ve vegetačním období, kdy může být nadzemní biomasa sklizena i s listy; (iv) optimalizace délky obmýtí pro konkrétní klony nebo druhy RRD.

3 Vědecké hypotézy a cíle práce

Tato práce se zabývá výzkumem schopnosti rychle rostoucích dřevin akumulovat rizikové prvky a je zaměřena na klony RRD z rodu *Salix* spp. a z rodu *Populus* spp. pěstovaných výmladkovým způsobem v přirozených polních podmínkách na lokalitě Podlesí v blízkosti města Příbram, na půdě která je středně kontaminovaná rizikovými prvky, zejména Cd, Pb a Zn. Pro hodnocení fytoextrakčního potenciálu čtyř vybraných klonů vrb a topolů a pro hodnocení rizik při nakládání se sklizenou kontaminovanou biomasou těchto klonů byly stanoveny následující hypotézy:

1. Odběr rizikových prvků při sklizni rychle rostoucích dřevin prováděné jednou za čtyři roky bude pravděpodobně odlišný oproti sklizni prováděné po dvou letech. Odběr rizikových prvků a produkce biomasy budou dále ovlivněny termínem sklizně a bude odlišná ve vegetačním období a v období vegetačního klidu.
2. Tvorba biomasy a s ní spojený odběr rizikových prvků budou závislé na aplikaci čistírenského kalu.
3. Při skladování sklizené kontaminované biomasy existuje reálné riziko zpětného uvolnění rizikových prvků z této biomasy do prostředí.

K potvrzení uvedených hypotéz byly stanoveny následující cíle:

1. Sledování změn tvorby biomasy a obsahů rizikových prvků nahromaděných v biomase rychle rostoucích dřevin, pěstovaných v reálných přírodních podmínkách a sklizených jednou za dva nebo jednou za čtyři roky. Obsahy rizikových prvků budou mezi sebou porovnávány a na základě zjištěných rozdílů bude objasněn vliv délky časového intervalu mezi sklizněmi na odběr rizikových prvků rostlinami. Dále budou posouzeny rozdíly mezi obsahy rizikových prvků nahromaděnými v pletivech rychle rostoucích dřevin sklizených ve vegetačním období a v rostlinách sklizených v období vegetačního klidu a dlouhodobý vliv těchto letních sklizní na výnos biomasy rychle rostoucích dřevin.
2. Posouzení účinku aplikace čistírenského kalu na produkci biomasy rychle rostoucích dřevin, mobilitu a příjem rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v jednotlivých rostlinných částech.
3. Posouzení míry uvolnění rizikových prvků do roztoku při vyluhování sklizené kontaminované biomasy v laboratorních podmínkách.

4 Publikované práce

4.1 Zárubová (Kubátová) et al. (2015). Distribuce P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb a Zn do věkových tříd dřeva a kůry vrb a topolů využívaných pro fytoextrakci na kontaminované půdě rizikovými prvky.

Název: Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements.

Autoři: Zárubová (Kubátová), P., Hejcman, M., Vondráčková, S., Mrnka, L., Száková, J., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Environmental Science and Pollution Research. 22 (23). 18801-18813.

Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements

Pavla Zárubová¹ · Michal Hejman² · Stanislava Vondráčková¹ · Libor Mrnka³ · Jiřina Száková¹ · Pavel Tlustoš¹

Received: 30 March 2015 / Accepted: 5 July 2015 / Published online: 24 July 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Fast-growing clones of *Salix* and *Populus* have been studied for remediation of soils contaminated by risk elements (RE) using short-rotation coppice plantations. Our aim was to assess biomass yield and distributions of elements in wood and bark of highly productive willow (S1—[*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*] × *S. viminalis*, S2—*Salix* × *smithiana* clone S-218) and poplar (P1—*Populus maximowiczii* × *Populus nigra*, P2—*P. nigra*) clones with respect to aging. The field experiment was established in April 2008 on moderately Cd-, Pb- and Zn- contaminated soil. Shoots were harvested after four seasons (February 2012) and separated into annual classes of wood and bark. All tested clones grew on contaminated soils, with highest biomass production and lowest mortality exhibited by P1 and S2. Concentrations of elements, with exception of Ca and Pb, decreased with age and were higher in bark than in wood. The *Salix* clones were characterised by higher removal of Cd, Mn and Zn compared to the *Populus* clones. Despite generally higher RE content in young shoots, partly due to lower wood/bark ratios and higher RE concentrations in bark,

the overall removal of RE was higher in older wood classes due to higher biomass yield. Thus, longer rotations seem to be more effective when phytoextraction strategy is considered. Of the four selected clones, S1 exhibited the best removal of Cd and Zn and is a good candidate for phytoextraction.

Keywords Cadmium · Heavy metals · Lead · Phosphorus · Phytoremediation · *Populus* spp · *Salix* spp · Zinc

Introduction

Different willow (*Salix* spp.) and poplar (*Populus* spp.) species, clones and hybrids have been studied frequently for phytoextraction of risk elements (RE), such as Cd, Pb and Zn, from slightly to moderately contaminated soils (Pulford and Watson 2003; Laureysens et al. 2005; Brunner et al. 2008; Jensen et al. 2009). Although these fast-growing trees cannot be considered hyperaccumulators, they produce high biomass, resulting in high removal of RE from the soil (Hammer et al. 2003; Pulford and Dickinson 2006). Due to low reproductive barriers, different willow and poplar species can hybridise easily, creating large genotypic variation. This enables targeted breeding and selection of clones suitable for different soils and environmental conditions, in which they exhibit different growth rates, tolerances to RE toxicity and RE accumulation in their organs (Zalesny and Bauer 2007b). Due to deeper rooting compared to grasses/herbs, willows and poplars are able to extract RE from deeper soil layers and stabilise the soil surface, preventing further spread of RE by wind or water (Lonardo et al. 2011). As willows and poplars produce large biomass, phytoextraction of RE can be associated with the production of green energy. A number of fast-growing willow and poplar clones are available in the Czech Republic; some are registered and commercially used

Responsible editor: Elena Maestri

✉ Michal Hejman
hejman@fzp.czu.cz

¹ Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiological Sciences, University of Life Sciences, Kamýcká 129, CZ-165 21 Prague 6 - Suchbátka, Czech Republic

² Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, CZ-165 21 Prague 6 - Suchbátka, Czech Republic

³ Department of Mycorrhizal Symbioses, Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Zámek 1, 262 43 Průhonice, Czech Republic

in other parts of Europe, while others are native. Two promising willow clones, allochthonous (*[Salix schwerinii × Salix viminalis] × S. viminalis*) hybrid Tordis and autochthonous *Salix × smithiana* clone S-218 (hereafter denoted S1 and S2, respectively), were selected. Of poplar clones, we selected the most widely planted hybrid clone in the Czech Republic, *Populus maximowiczii × Populus nigra* J-105, also known as Max-4, as well as *P. nigra* clone Wolterson (hereafter denoted P1 and P2, respectively).

Clone S1 belongs to the registered varieties of “Swedish willows”, which were mostly hybrids of *S. viminalis* (Havlíčková et al. 2010). Clone S1 achieved the highest biomass yield out of 14 willow clones (hybrids of *S. viminalis*) in a study by Weih and Nordh (2002). Under a suitable nutrient supply regime, the dry matter (DM) biomass yield of clone S1 can reach 12 t ha⁻¹ year⁻¹ (Sevel et al. 2014). We are not aware of any study testing S1 for phytoextraction of Cd and Zn in field conditions.

Clone S2 is a spontaneous hybrid of *S. viminalis* and *Salix caprea* (Tlustoš et al. 2007) and belongs to the best-performing clones in the Czech Republic. Its biomass production can reach more than 14 t ha⁻¹ year⁻¹ (Weger 2008). In a pot experiment performed by Vysloužilová et al. (2003a, 2003b), clone S2 was characterised by high accumulations of Cd and Zn in leaves and was considered potentially suitable for practical use in field conditions for remediation of Cd- and Zn-contaminated soils. Similarly, high leaf Cd and Zn accumulations of several *S. × smithiana* clones also were observed by other authors using hydroponic screening for metal resistance (Dos Santos Utmazian et al. 2007) and pot experiments with plantings of willows on contaminated soils (Dos Santos Utmazian and Wenzel 2007; Wieshammer et al. 2007). In a pot experiment conducted by Tlustoš et al. (2007), clone S2 accumulated only negligible amounts of As and Pb in the aboveground biomass and was thus considered not suitable for remediation of soils contaminated by As and Pb. In the same experiment, contents of Zn and Cd in the individual organs of the studied willow clones decreased in the order of leaves > bark > shoots > wood.

Phytoextraction potential of *P. maximowiczii × P. nigra* hybrids (to which clone P1 belongs) has been studied to a limited extent. Zalesny and Bauer (2007a) tested hybrids of *P. maximowiczii × P. nigra* next to other clones of willows and poplars for differences in contents of RE in leaves, stems and roots. The *P. maximowiczii × P. nigra* clones exhibited lower overall phytoremediation potential compared to genotypes of *Populus deltoides × P. nigra*. Hybrid *P. maximowiczii × P. nigra* tested by Fischerová et al. (2006) was able to accumulate Cd, Zn and, especially, Pb. According to Komárek et al. (2008), this hybrid is not suitable for remediation of highly contaminated soils.

Clone P2 was tested for biomass production together with 17 other poplar clones (Laureysens et al. 2004a). The lowest

RE concentrations were found in wood, and the highest RE concentrations were generally recorded in leaves. Concentrations of most metals in leaves increased with age (Laureysens et al. 2004b). Laureysens et al. (2005) observed no significant effects of plant height on metal content, but, in wood, metal concentrations generally increased towards the top of the shoot in August and decreased towards the top of the shoot in November.

Most information regarding phytoextraction ability of the aforementioned clones comes from hydroponic and pot experiments, stressing the need to test the clones under true field condition on soils contaminated by RE. To fill this gap, we established a long-term field experiment with S1, S2, P1 and P2 clones on soil anthropogenically contaminated by As, Cd, Pb and Zn. We collected biomass samples during the vegetation rest period. Late winter harvest is widely used because of lower water content of harvested biomass, less risk of soil compaction and higher availability of human resources and mechanisation. In addition, winter harvest threatens the survival of plants less compared to summer harvest, as reserves stored in roots can be used more effectively for regeneration (Mitchell et al. 1999; Dawson 2007).

The aim of the research presented in this paper was to test the following:

1. The effects of clone on biomass yield and bark/wood ratios 4 years after establishment of the experiment
2. The distribution of elements in wood and bark of investigated clones
3. The effects of shoot age on concentrations of elements in wood and bark
4. Comparison of bioremediation potential of four investigated clones for particular RE

Materials and methods

Study site and field experiment

In April 2008, we established the field experiment on multi-RE (mostly Cd, Pb and Zn)-contaminated soil near the village of Podlesi (49° 42′ 24″ N, 13° 58′ 32″ E), near the town of Příbram, 58 km south of Prague. Altitude of the study site is 500 m above sea level, with a mean annual precipitation of 700 mm and mean annual temperature of 6.5 °C. The soil type is a weakly acidic modal Cambisol with a CEC of 166 mmol kg⁻¹, C_{org} of 4.1 %, C/N ratio of 9, humus horizon thickness of 26 cm and soil bulk density of 1.35 t m⁻³. The mean pH_{H2O} is 5.66, and pH_{KCl} is 5.27. Pseudo-total concentrations of elements extracted by aqua regia are as follows: 7.3 mg Cd kg⁻¹, 218 mg Zn kg⁻¹ and 1368 mg Pb kg⁻¹ (Our own measurements). Czech legislation limits for

pseudo-total concentrations of elements in agricultural soils are 1.0, 140 and 200 mg kg⁻¹ of Cd, Pb and Zn, respectively (Anonymous 1994). Plant-available (Mehlich III; Mehlich 1984) concentrations of P, K, Ca and Mg in the humus horizon were 14, 84, 4441 and 324 mg kg⁻¹, respectively. Plant-available concentrations of Cd, Pb and Zn in the humus horizon were 4.92, 705 and 37 mg kg⁻¹, respectively.

The experiment was established using four clones described in the introduction (S1, S2, P1 and P2) planted in four completely randomised blocks. The size of each individual experimental plot with the same clone planted in one row was 7.5 m × 1.3 m. Intra-row distance was 0.25 m, and the inter-row distance was 1.3 m. Cuttings were 20 cm in length, and 15 cm was buried into the soil during planting.

Harvesting of plant material

Shoots of cuttings were harvested in February 2012 after four vegetative seasons. The stems were cut 20 cm above the soil surface. Harvested shoots were sorted based on shoot age into four annual classes and weighed. Then, we subsequently separated ten shoots in each age class into wood and bark and dried at 60 °C to determine DM content and weight. Total DM mass of each bark and wood age class was then calculated according to obtained bark/ wood ratio and DM content.

Laboratory analyses

Dry biomass samples were ground using a stainless steel mill Retsch friction mill (Retsch, Haan, Germany; particle size 0–1 mm). The total concentrations of elements in the bark and wood were determined using inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy (ICP-OES, VARIAN Vista Pro, Australia) for P, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn and by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS, VARIAN SpectrAA-280, Australia) for K, Ca and Mg, where dry ashing procedures (Mader et al. 1998) were applied for sample decomposition.

Remediation factor

Phytoextraction potential of the examined clones was expressed as a remediation factor (RF, %), which indicates the proportion of elements removed by harvested biomass from the total contents of elements at the site. The RF was calculated as follows (1):

$$Rf (\%) = \frac{C_{plant} MD_{plant}}{C_{soil} W_{soil}} 100 \quad (1)$$

where C_{plant} is the concentration of a metal in plant dry biomass (g t⁻¹), MD_{plant} the dry weight plant biomass yield (t), C_{soil} the total concentration of a metal in soil (g t⁻¹) and W_{soil}

the amount of soil in humus horizon per hectare (t), modified according to Komárek et al. (2008).

Data analyses

All statistical analyses were performed using the Statistica 10.0 (www.statsoft.com) and CANOCO 4.5 (ter Braak and Smilauer 2002) programs. All data were checked for homogeneity of variance and normality (Levene and Shapiro-Wilk tests). Collected data did not meet assumptions for the use of ANOVA and were thus evaluated by non-parametric Kruskal-Wallis test. The relationship between yield and age classes, the relationship between concentration of elements and age classes, and the relationship between mortality and biomass production were evaluated using linear regression. The linear regression and Kruskal-Wallis test were performed using the Statistica 10.0 program. Principal component analysis (PCA), using the CANOCO 4.5 program, was applied to all collected data together (concentrations of elements in the wood and bark as well as biomass yield). We used standardised “species data” because data of different character and units were analysed together. The PCA was used to make visible correlations between all analysed data and similarities of different clones. The results were visualised in the form of a bi-plot ordination diagram using the CanoDraw program.

Results

Biomass yield, bark/wood ratio and mortality

The effect of clones on the yield of wood and bark was not significant for any age class (Table 1), where proportion of wood of total biomass increased with age from 0.66 in 1-year-old shoots to 0.80 in 4-year-old shoots (Table 2). Similar results were reported for total wood and bark yields over four age classes together (Table 3). Biomass production of shoots (wood and bark together) decreased in the order of P1 > S2 > P2 > S1, but differences between clones at the levels of individual plants and per hectare were not significant due to high data variability (Tables 3 and 4).

Yield of wood, bark, and wood and bark together significantly increased with age only in clone S1 (linear regression for S1, $R=0.73$, $p=0.001$ for wood; $R=0.57$, $p=0.021$ for bark; for wood and bark together $R=0.51$, $p=0.003$). A significant difference in wood and bark yield between age classes was found only in clone S1 (Table 1). There was the least variability in wood and bark yield in clone S1 compared to other clones.

Mortality of clones increased in the order of P1 (19 %) < S2 (23 %) < P2 (24 %) < S1 (42 %) and was negatively related to biomass production (linear regression $R=-0.51$, $p=0.044$, $y=11.4-0.02 * x$, with y being mortality rate and x being biomass yield).

Table 1 Mean (\pm SE) standing biomass and concentrations of elements (P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in wood and bark of 1-, 2-, 3- and 4-year-old shoots of *Salix* (*S. viminalis* \times *S. viminalis*; *S. viminalis*; *S. viminalis*) and *Populus* (*P. nigra*, *P. nigra*, *P. nigra*) clones

Variable	Clones	Age shoots							
		1-year-old shoots		2-year-old shoots		3-year-old shoots		4-year-old shoots	
		Wood	Bark	Wood	Bark	Wood	Bark	Wood	Bark
Dry biomass (g plant ⁻¹)	S1	4.65±1.42	1.90±0.58	3.02±0.75	1.13±0.35	13.16±2.90	2.71±0.38	21.64±5.67	4.83±1.55
	S2	18.98±9.10	7.55±3.01	16.47±8.15	5.28±1.53	75.24±35.32	13.71±6.22	39.10±16.38	6.37±2.15
P (g kg ⁻¹)	P1	41.32±17.09	16.43±5.78	28.69±12.92	8.58±3.80	81.55±46.17	19.08±5.22	99.78±57.89	40.82±31.71
	P2	13.95±9.91	6.07±3.71	17.45±12.48	4.73±2.76	24.62±14.17	8.90±4.73	29.14±18.72	7.12±4.49
K (g kg ⁻¹)	S1	2.21±0.50	3.33±0.46	2.33±0.25	2.99±0.18	1.73±0.17	2.78±0.17	1.42±0.24	2.20±0.13
	S2	1.89±0.21	2.46±0.13	1.97±0.10	2.77±0.25	1.37±0.17	2.21±0.15	1.11±0.05	1.85±0.14
Ca (g kg ⁻¹)	P1	2.24±0.16	2.68±0.23	2.35±0.20	2.36±0.41	1.74±0.15	2.13±0.16	1.34±0.07	1.85±0.52
	P2	2.49±0.43	2.30±0.23	1.92±0.08	1.55±0.06	1.32±0.05	1.67±0.21	1.30±0.04	1.21±0.20
Mg (g kg ⁻¹)	S1	1.97±0.17	3.94±0.28	1.81±0.21	4.31±0.39	1.54±0.15	3.17±0.29	1.29±0.11	2.92±0.12
	S2	2.38±0.09	4.69±0.20	1.91±0.04	4.33±0.29	1.53±0.18	4.08±0.24	1.23±0.11	3.36±0.10
Cd (mg kg ⁻¹)	P1	2.75±0.22	6.87±0.41	2.55±0.31	6.14±0.46	2.42±0.19	5.15±0.27	2.11±0.18	4.70±0.25
	P2	3.46±0.26	9.67±0.20	2.24±0.16	8.63±0.41	1.73±0.05	7.92±1.12	1.54±0.10	7.85±0.97
Cu (mg kg ⁻¹)	S1	1.83±0.30	4.55±0.45	1.51±0.20	7.16±0.68	1.65±0.13	5.27±0.62	1.61±0.34	6.69±0.74
	S2	3.29±0.34	12.06±0.72	2.49±0.23	12.90±1.32	2.65±0.47	14.78±0.41	2.04±0.42	15.48±0.35
Mn (mg kg ⁻¹)	P1	2.82±0.36	8.43±0.84	3.22±0.65	8.99±1.41	2.77±1.12	8.71±2.31	1.13±0.01	12.74±1.07
	P2	4.30±0.69	10.77±1.75	3.13±0.48	11.04±1.44	2.62±0.54	9.39±1.28	2.74±0.13	12.57±2.17
Zn (mg kg ⁻¹)	S1	0.40±0.05	0.67±0.10	0.35±0.04	1.03±0.15	0.36±0.03	0.72±0.11	0.32±0.04	0.65±0.06
	S2	0.39±0.01	1.30±0.10	0.32±0.03	1.18±0.04	0.32±0.07	1.30±0.09	0.23±0.03	1.15±0.06
Fe (mg kg ⁻¹)	P1	0.42±0.03	1.28±0.13	0.40±0.11	1.02±0.10	0.37±0.04	0.97±0.20	0.28±0.07	1.02±0.17
	P2	0.79±0.10	2.39±0.16	0.51±0.08	2.18±0.16	0.43±0.06	1.45±0.17	0.35±0.02	1.68±0.23
Pb (mg kg ⁻¹)	S1	66.59±13.98	159.76±25.51	73.12±11.57	156.95±13.97	56.27±6.02	171.75±18.23	50.31±9.23	148.57±14.81
	S2	55.04±5.72	114.72±7.37	51.49±3.99	130.86±17.54	39.97±4.24	114.48±13.38	34.89±1.48	94.30±9.51
Cu (mg kg ⁻¹)	P1	23.27±4.92	54.54±6.91	26.81±3.53	51.90±6.42	19.06±5.21	41.15±11.03	12.31±0.0	36.12±4.81
	P2	33.10±3.61	42.15±1.36	25.88±1.23	40.83±2.59	22.62±4.19	51.76±4.64	22.20±1.45	40.39±4.10
Fe (mg kg ⁻¹)	S1	12.07±1.11	15.74±2.38	10.82±1.09	12.46±1.66	6.96±0.26	18.46±6.09	5.76±0.81	13.73±3.43
	S2	17.71±1.04	11.92±1.04	18.46±1.10	14.86±2.12	8.85±1.41	9.55±1.83	6.66±0.55	10.66±1.40
Mn (mg kg ⁻¹)	P1	9.53±1.00	17.00±1.83	8.40±0.84	14.72±3.62	6.35±0.17	10.31±1.34	5.23±0.10	8.78±1.90
	P2	12.91±1.00	12.95±1.72	7.86±0.81	7.76±1.16	6.26±1.11	10.47±2.87	6.31±0.14	7.76±0.99
Zn (mg kg ⁻¹)	S1	23.15±3.46	53.45±5.87	48.10±27.50	53.76±6.19	19.37±3.65	42.96±4.56	24.92±11.65	33.34±3.57
	S2	33.21±3.23	74.76±10.12	29.09±1.33	72.06±9.34	18.00±2.94	47.28±7.59	18.46±2.75	43.80±3.48
Pb (mg kg ⁻¹)	P1	23.75±5.55	55.12±4.03	23.30±4.19	57.22±7.21	14.76±1.21	46.01±12.43	12.51±0.51	36.09±7.89
	P2	28.53±6.36	31.21±2.21	13.84±0.68	33.01±10.39	10.59±1.71	30.28±4.06	18.66±7.63	22.79±1.55
Mn (mg kg ⁻¹)	S1	72.21±12.82	172.98±37.33	108.81±30.92	188.81±46.38	82.84±19.98	173.97±28.12	65.43±12.52	139.81±23.02
	S2	56.51±4.67	99.84±13.6	60.95±7.66	110.81±18.22	38.26±6.08	85.03±14.43	28.85±5.75	74.04±10.69
Cu (mg kg ⁻¹)	P1	23.83±2.84	43.17±3.89	24.35±1.68	39.32±5.16	14.2±2.83	31.20±3.30	9.75±1.49	32.68±2.51
	P2	66.05±19.75	81.59±16.39	38.30±8.65	57.07±9.82	38.24±13.93	73.13±18.54	29.89±4.44	51.85±7.37

Table 1 (continued)

Variable	Clones	Age shoots							
		1-year-old shoots		2-year-old shoots		3-year-old shoots		4-year-old shoots	
		Wood	Bark	Wood	Bark	Wood	Bark	Wood	Bark
Pb (mg kg ⁻¹)	S1	15.33±2.95 Aa	75.19±14.73 A1bab	26.45±9.41 Aaab	102.33±14.30 A1bb	23.88±9.08 Aaab	97.74±23.07 Aaab	26.86±9.65 Aaab	57.33±6.66 Aaab
	S2	17.50±2.38 Aa	81.46±2.60 A1ba	17.99±3.20 Aa	103.16±6.42 A1ba	18.33±3.52 Aa	110.34±9.77 Aa	19.37±3.19 Aa	73.96±10.10 Aa
	P1	20.28±7.54 Aa	120.47±19.09 Ba	29.99±5.91 Aa	129.39±18.38 Ba	29.08±9.92 Aa	74.28±24.98 Aa	26.26±8.08 Aa	33.38±8.17 Aa
	P2	16.41±4.42 Aaab	33.96±1.14 Aaab	15.74±0.91 Aaab	44.78±5.22 Ab	13.39±0.62 Aa	37.10±4.58 Aaab	17.46±0.23 Aaab	28.94±2.75 Aaab
	S1	652.88±183.84 Aaab	1297.19±181.87 Bb	723.29±61.82 Bbab	1388.68±140.58 Bb	465.46±19.57 Bbab	1338.58±118.93 Bb	338.19±47.2 Bba	1104.36±194.37 Bbab
	S2	525.70±45.34 Aaabc	789.71±28.31 A1Bbc	497.02±44.80 A1Babc	893.80±57.67 A1Bc	307.96±41.94 A1Bab	754.31±39.73 A1Babc	235.69±13.57 A1Ba	630.31±22.68 A1Babc
Zn (mg kg ⁻¹)	P1	230.74±27.32 Aaab	341.28±18.16 A1Bb	237.54±23.45 A1Bab	338.49±36.08 A1Bab	152.82±22.88 A1Ba	271.28±35.29 A1Bab	102.71±3.50 Aa	264.64±32.29 A1Bab
	P2	228.57±90.82 Aa	241.19±23.65 Aa	177.32±8.56 Aa	220.30±20.79 Aa	114.91±10.78 Aa	239.18±35.12 Aa	130.44±3.20 A1Ba	188.95±28.38 Aa

Differences between clones and wood and bark were evaluated by Kruskal–Wallis test. Clones with the same capital letter for each wood and bark age category were not significantly different. In the each clone, age classes of wood and bark with the same small letter were not significantly different

Table 2 Mean (±SE) wood: (wood + bark) ratio

Clones	Age shoots	Ratio wood/(wood + bark)
S1	1 year old	0.71±0.02 a
	2 years old	0.73±0.02 ab
	3 years old	0.82±0.02 b
	4 years old	0.82±0.02 ab
	Mean (±SE)	0.77±0.03
S2	1 year old	0.66±0.05 a
	2 years old	0.72±0.04 a
	3 years old	0.82±0.02 a
	4 years old	0.84±0.02 a
	Mean (±SE)	0.76±0.04
P1	1 year old	0.67±0.04 a
	2 years old	0.73±0.04 a
	3 years old	0.76±0.08 a
	4 years old	0.75±0.07 a
	Mean (±SE)	0.73±0.02
P2	1 year old	0.6±0.07 a
	2 years old	0.67±0.07 a
	3 years old	0.73±0.02 a
	4 years old	0.8±0.02 a
	Mean (±SE)	0.70±0.04

Differences in ratios between differently aged twigs within each clone were evaluated by Kruskal–Wallis test. Age classes with the same letter for each clone were not significantly different

Concentrations of elements

Concentrations of all analysed elements were generally higher in bark than in wood (Table 1). There were only several small exceptions to this pattern. For example, P concentrations were slightly higher in wood than in bark in the P2 clone in 1-, 2- and 4-year-old shoots. Concentrations of Cu were higher in wood than in bark in the S2 clone in 1- and 2-year-old shoots and in the P2 clone in 2-year-old shoots.

When data from all clones were analysed together, concentrations of most analysed elements (P, K, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn and Zn) in wood and bark decreased with age, but a significant decrease was recorded only in the case of P ($R=-0.63$, $p<0.001$ in wood; $R=-0.47$, $p<0.001$ for bark), K ($R=-0.65$, $p<0.001$ in wood; $R=-0.29$, $p=0.026$ in bark) (Fig. 1a–d), Mg ($R=-0.45$, $p=0.001$ in wood; $R=-0.26$, $p=0.049$ in bark), Cu ($R=-0.66$, $p<0.001$ in wood; Fe ($R=-0.43$, $p=0.001$ in bark; and Zn ($R=-0.36$, $p=0.005$) in wood. Concentration of Ca decreased with age in wood, but the opposite trend was recorded in bark (Fig. 1e, f). Concentration of Pb was stable or exhibited a small increase with age in wood, but a decreasing trend was recorded in bark (Fig. 1g, h).

Table 3 Mean (\pm SE) dry matter weight and amount of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood, bark, and in wood and bark together in individual plant

Clones		S1	S2	P1	P2
DMW (g plant ⁻¹)	Wood	42.47 \pm 6.46 Ba	140.00 \pm 59.93 Aa	181.07 \pm 76.86 Aa	77.85 \pm 51.65 Aa
	Bark	10.58 \pm 1.29 Aa	31.32 \pm 10.93 Aa	59.73 \pm 27.40 Aa	25.02 \pm 14.78 Aa
	Plant	53.05 \pm 7.70 a	171.32 \pm 70.42 a	240.80 \pm 100.94 a	102.87 \pm 66.42 a
Removal P (mg plant ⁻¹)	Wood	64.21 \pm 7.03 Ba	194.26 \pm 85.50 Aa	322.73 \pm 131.49 Aa	123.91 \pm 79.99 Aa
	Bark	28.59 \pm 5.35 Aa	69.39 \pm 24.26 Aa	135.23 \pm 64.17 Aa	47.25 \pm 30.26 Aa
	Plant	92.80 \pm 12.27 a	263.65 \pm 109.26 a	457.96 \pm 181.03 a	171.16 \pm 110.23 a
Removal K (mg plant ⁻¹)	Wood	62.04 \pm 9.14 Aa	213.92 \pm 95.05 Aa	459.60 \pm 206.74 Aa	164.12 \pm 110.51 Aa
	Bark	34.52 \pm 4.17 Aa	131.17 \pm 49.81 Aa	342.72 \pm 146.20 Aa	196.81 \pm 113.11 Aa
	Plant	96.56 \pm 13.10 a	345.09 \pm 143.99 a	802.32 \pm 338.89 a	360.93 \pm 223.55 a
Removal Ca (mg plant ⁻¹)	Wood	70.86 \pm 12.06 Aa	328.88 \pm 140.01 Aa	399.52 \pm 161.25 Aa	211.76 \pm 130.98 Aa
	Bark	65.41 \pm 11.24 Aa	430.23 \pm 147.58 Aa	648.63 \pm 359.79 Aa	224.62 \pm 102.59 Aa
	Plant	136.27 \pm 21.48 a	759.11 \pm 285.64 a	1048.15 \pm 445.98 a	436.38 \pm 232.36 a
Removal Mg (mg plant ⁻¹)	Wood	14.88 \pm 2.39 Ba	36.34 \pm 15.10 Aa	63.96 \pm 26.34 Aa	34.93 \pm 21.85 Aa
	Bark	7.40 \pm 1.12 Aa	38.60 \pm 14.21 Aa	72.77 \pm 35.73 Aa	40.79 \pm 21.10 Aa
	Plant	22.28 \pm 3.40 a	74.94 \pm 29.07 a	136.73 \pm 59.04 a	75.72 \pm 42.91 a
Removal Cd (mg plant ⁻¹)	Wood	2.14 \pm 0.24 Aa	5.51 \pm 2.19 Aa	3.09 \pm 1.08 Aa	1.77 \pm 1.13 Aa
	Bark	1.64 \pm 0.24 Aa	3.31 \pm 1.12 Aa	2.65 \pm 1.17 Aa	1.19 \pm 0.73 Aa
	Plant	3.78 \pm 0.47 a	8.82 \pm 3.31 a	5.74 \pm 2.13 a	2.96 \pm 1.86 a
Removal Cu (mg plant ⁻¹)	Wood	0.28 \pm 0.04 Aa	1.42 \pm 0.63 Aa	1.26 \pm 0.54 Aa	0.58 \pm 0.39 Aa
	Bark	0.16 \pm 0.04 Aa	0.32 \pm 0.10 Aa	0.72 \pm 0.30 Aa	0.23 \pm 0.13 Aa
	Plant	0.44 \pm 0.07 a	1.74 \pm 0.72 a	1.98 \pm 0.82 a	0.81 \pm 0.52 a
Removal Fe (mg plant ⁻¹)	Wood	1.13 \pm 0.49 Aa	2.79 \pm 1.11 Aa	2.78 \pm 1.06 Aa	1.31 \pm 0.94 Aa
	Bark	0.44 \pm 0.08 Aa	1.75 \pm 0.76 Aa	2.93 \pm 1.30 Aa	0.80 \pm 0.54 Aa
	Plant	1.57 \pm 0.49 a	4.54 \pm 1.86 a	5.71 \pm 2.30 a	2.11 \pm 1.49 a
Removal Mn (mg plant ⁻¹)	Wood	3.20 \pm 0.85 Aa	6.34 \pm 2.79 Aa	2.91 \pm 1.16 Aa	2.26 \pm 1.27 Aa
	Bark	1.81 \pm 0.48 Aa	3.02 \pm 1.30 Aa	2.19 \pm 1.03 Aa	1.53 \pm 0.94 Aa
	Plant	5.01 \pm 1.34 a	9.36 \pm 4.06 a	5.10 \pm 1.90 a	3.79 \pm 2.21 a
Removal Pb (mg plant ⁻¹)	Wood	0.88 \pm 0.13 Aa	2.19 \pm 0.85 Aa	3.97 \pm 1.59 Aa	1.09 \pm 0.68 Aa
	Bark	0.81 \pm 0.19 Aa	2.83 \pm 0.96 Aa	4.97 \pm 1.99 Aa	0.92 \pm 0.57 Aa
	Plant	1.69 \pm 0.18 a	5.02 \pm 1.79 a	8.94 \pm 3.27 a	2.01 \pm 1.25 a
Removal Zn (mg plant ⁻¹)	Wood	17.31 \pm 2.85 Aa	43.94 \pm 17.83 Aa	28.95 \pm 11.18 Aa	11.14 \pm 7.13 Aa
	Bark	13.12 \pm 2.46 Aa	23.59 \pm 8.29 Aa	17.57 \pm 7.82 Aa	6.59 \pm 4.42 Aa
	Plant	30.43 \pm 5.28 a	67.53 \pm 26.06 a	46.52 \pm 17.52 a	17.73 \pm 11.55 a

Differences between clones and wood and bark were evaluated by Kruskal-Wallis test. Clones with the same small letter were not significantly different, and wood and bark within the same clone and with the same capital letter were not significantly different. Clone abbreviations are given in Table 1

Removal of elements from the soil

With the exception of Ca and Mg, the amount of elements removed by wood was generally higher than that removed by bark (Table 3). With the exception of Cd, Mn and Zn, the amount of removed elements increased in the order of S1 < P2 < S2 < P1 and followed the order of biomass production. *Salix* clones were characterised by higher removal of Cd, Mn and Zn compared to *Populus* clones.

With the exception of Zn, Cd and Mn, the amount of elements removed by harvested wood and bark per hectare was highest for P1 and corresponded the most with biomass yield.

The highest amount of removed Cd, Mn and Zn was recorded for clone S2 (Table 4).

Approximately 60–70 % of Cd, Pb and Zn were removed in 3- and 4-year-old shoots, which represented 61–80 % of whole shoot biomass (Table 5).

Results of principal component analysis

The first axis of the PCA of element concentrations and DM biomass yield explained 55 % of the data variability, while the first two axes together explained 75 % (Fig. 2). The length and direction of the vectors indicate the strength of the vector

Table 4 Mean (\pm SE) dry matter yield of wood and bark and amount of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn removed in harvested wood and bark (30,769 plants ha⁻¹ minus mortality)

Clones		S1	S2	P1	P2
DMW (t ha ⁻¹)	Wood	0.82 \pm 0.24 Aa	3.89 \pm 1.90 Aa	4.44 \pm 1.92 Aa	2.22 \pm 1.64 Aa
	Bark	0.20 \pm 0.06 Aa	0.86 \pm 0.36 Aa	1.42 \pm 0.60 Aa	0.70 \pm 0.47 Aa
	Plant	1.02 \pm 0.31 a	4.75 \pm 2.25 a	5.86 \pm 2.44 a	2.92 \pm 2.11 a
Removal P (kg ha ⁻¹)	Wood	1.16 \pm 0.30 Aa	5.41 \pm 2.71 Aa	7.97 \pm 3.38 Aa	3.51 \pm 2.54 Aa
	Bark	0.54 \pm 0.16 Aa	1.90 \pm 0.81 Aa	3.18 \pm 1.36 Aa	1.33 \pm 0.96 Aa
	Plant	1.70 \pm 0.46 a	7.31 \pm 3.50 a	11.15 \pm 4.38 a	4.84 \pm 3.50 a
Removal K (kg ha ⁻¹)	Wood	1.20 \pm 0.36 Aa	5.94 \pm 3.00 Aa	11.34 \pm 5.32 Aa	4.69 \pm 3.50 Aa
	Bark	0.66 \pm 0.21 Aa	3.62 \pm 1.63 Aa	8.23 \pm 3.27 Aa	5.48 \pm 3.64 Aa
	Plant	1.86 \pm 0.57 a	9.56 \pm 4.60 a	19.57 \pm 8.27 a	10.17 \pm 7.14 a
Removal Ca (kg ha ⁻¹)	Wood	1.37 \pm 0.40 Aa	9.15 \pm 4.43 Aa	10.02 \pm 4.38 Aa	5.99 \pm 4.17 Aa
	Bark	1.31 \pm 0.47 Aa	11.76 \pm 4.90 Aa	15.17 \pm 7.72 Aa	6.06 \pm 3.32 Aa
	Plant	2.68 \pm 0.85 a	20.91 \pm 9.27 a	25.19 \pm 10.20 a	12.05 \pm 7.47 a
Removal Mg (kg ha ⁻¹)	Wood	0.29 \pm 0.09 Aa	1.00 \pm 0.48 Aa	1.57 \pm 0.67 Aa	0.99 \pm 0.69 Aa
	Bark	0.15 \pm 0.05 Aa	1.06 \pm 0.47 Aa	1.72 \pm 0.78 Aa	1.12 \pm 0.68 Aa
	Plant	0.44 \pm 0.14 a	2.06 \pm 0.94 a	3.29 \pm 1.36 a	2.11 \pm 1.37 a
Removal Cd (g ha ⁻¹)	Wood	37.34 \pm 8.79 Aa	152.36 \pm 70.01 Aa	76.03 \pm 27.71 Aa	50.11 \pm 35.88 Aa
	Bark	29.82 \pm 7.76 Aa	89.62 \pm 37.66 Aa	62.98 \pm 25.35 Aa	33.22 \pm 23.27 Aa
	Plant	67.16 \pm 16.54 a	241.98 \pm 107.71 a	139.01 \pm 49.91 a	83.33 \pm 59.12 a
Removal Cu (g ha ⁻¹)	Wood	5.17 \pm 1.40 Aa	39.56 \pm 19.82 Aa	30.99 \pm 13.63 Aa	16.62 \pm 12.29 Aa
	Bark	2.83 \pm 0.86 Aa	8.76 \pm 3.51 Aa	17.17 \pm 6.66 Aa	6.39 \pm 4.27 Aa
	Plant	8.00 \pm 2.21 a	48.32 \pm 23.16 a	48.16 \pm 19.57 a	23.01 \pm 16.56 a
Removal Fe (g ha ⁻¹)	Wood	25.55 \pm 15.48 Aa	76.76 \pm 35.52 Aa	68.09 \pm 26.46 Aa	37.96 \pm 29.64 Aa
	Bark	8.34 \pm 2.39 Aa	48.05 \pm 24.56 Aa	69.85 \pm 29.03 Aa	22.97 \pm 17.19 Aa
	Plant	33.89 \pm 16.78 a	124.81 \pm 59.88 a	137.94 \pm 53.84 a	60.93 \pm 46.83 a
Removal Mn (g ha ⁻¹)	Wood	66.16 \pm 25.47 Aa	179.35 \pm 87.41 Aa	72.99 \pm 31.15 Aa	63.00 \pm 40.93 Aa
	Bark	37.45 \pm 14.55 Aa	83.42 \pm 41.44 Aa	51.86 \pm 21.85 Aa	43.27 \pm 30.16 Aa
	Plant	103.61 \pm 40.06 a	262.77 \pm 128.02 a	124.85 \pm 46.00 a	106.92 \pm 71.07 a
Removal Pb (g ha ⁻¹)	Wood	13.99 \pm 2.27 Aa	59.92 \pm 27.64 Aa	98.65 \pm 42.49 Aa	30.87 \pm 21.62 Aa
	Bark	15.17 \pm 4.53 Aa	77.23 \pm 31.88 Aa	119.05 \pm 43.96 Aa	25.92 \pm 18.34 Aa
	Plant	29.16 \pm 6.69 a	137.15 \pm 58.88 a	217.70 \pm 79.76 a	56.79 \pm 39.95 a
Removal Zn (g ha ⁻¹)	Wood	318.79 \pm 88.69 Aa	1218.52 \pm 571.29 Aa	718.22 \pm 290.74 Aa	316.34 \pm 226.62 Aa
	Bark	249.45 \pm 73.72 Aa	645.60 \pm 275.46 Aa	416.25 \pm 168.00 Aa	187.87 \pm 140.10 Aa
	Plant	568.24 \pm 162.20 a	1864.12 \pm 844.93 a	1134.47 \pm 422.89 a	504.21 \pm 366.59 a

Differences between clones and wood and bark were evaluated by Kruskal-Wallis test. Clones with the same small letter were not significantly different, and wood and bark within the same clone and with the same capital letter were not significantly different. Clone abbreviations are given in Table 1

effect and correlation between vectors. A long vector for a particular variable indicates that it greatly affected the results of the analysis, while the opposite is the case for a short vector. For example, DM yield of biomass was clearly negatively related to concentrations of all analysed elements, as their vectors were directed into opposite parts of the diagram. The concentration of Zn in plant biomass was positively correlated with concentrations of Cd and Mn, as indicated by the angles smaller than 90° between the vectors for Zn and Cd or Mn.

Markers for wood (squares) are more abundant on the right side of the diagram and are clearly separated from markers for

bark (circles), which are located on the left side of the diagram. This indicates higher yield of wood compared to bark and lower concentrations of all elements in wood compared to bark. The category of 3–4-year-old wood (empty squares) was characterised by the lowest concentrations of elements in highest contrast to 1–2-year-old bark (filled circles) with the highest concentrations. The second axis divides markers according to genus (*Populus* clones into the upper part of the diagram and *Salix* clones into the bottom part). *Salix* clones, especially S1, were characterised by higher concentrations of Zn, Cd, Mn, P and Cu compared to *Populus* clones.

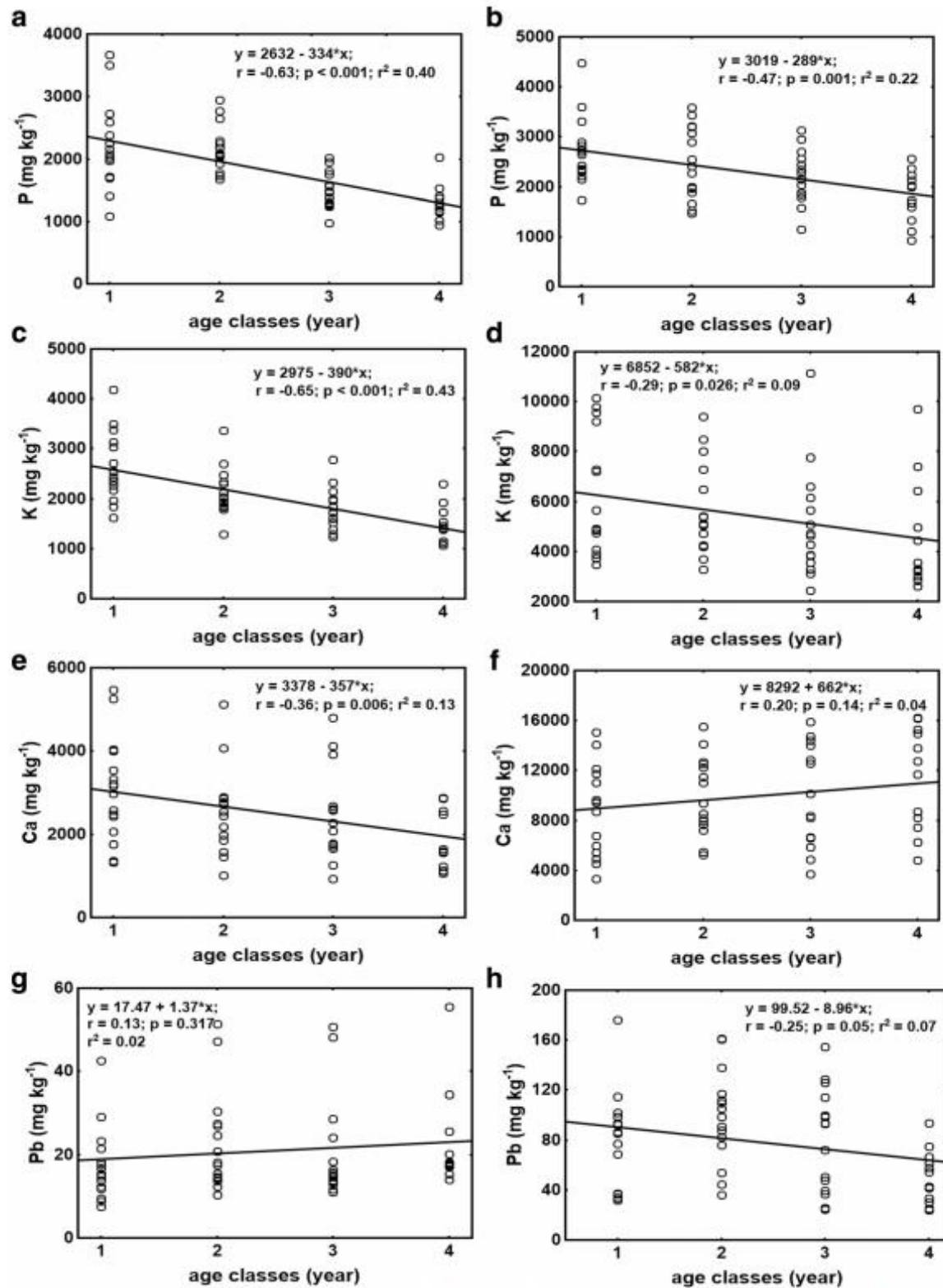


Fig. 1 Relationship between concentration of elements (P, K, Ca and Pb) and age classes. a, c, e, g wood and b, d, f, h bark over all clones (S1, S2, P1 and P2) together

Table 5 Share (in %) of 1-, 2-, 3- and 4-year-old shoots (±SE) on total shoot yield and amount of removed P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn

Variable	Age shoots	Clones			
		S1	S2	P1	P2
Dry biomass (%)	1-year-old shoots	12.2±2.8 ABa	12.7±1.6 Aa	23.0±3.4 Aa	17.8±1.3 Aa
	2-year-old shoots	8.0±1.8 ABa	17.8±5.8 Aa	12.5±7.3 Aa	20.5±2.3 ABa
	3-year-old shoots	31.5±6.6 ABa	32.6±9.3 Aa	30.8±17.4 Aa	35.9±3.3 Ba
	4-year-old shoots	48.2±10.5 Ba	36.9±8.0 Aa	33.7±21.3 Aa	25.9±1.5 ABa
P (%)	1-year-old shoots	16.2±2.9 ABa	16.9±1.4 Aa	27.7±5.4 Aa	27.9±1.9 Aa
	2-year-old shoots	10.7±1.6 Aa	24.6±6.8 Aa	13.9±7.6 Aa	22.5±2.9 Aa
	3-year-old shoots	32.4±4.9 ABa	30.0±8.2 Aa	29.7±17.3 Aa	29.7±1.8 Aa
	4-year-old shoots	40.6±7.8 Ba	28.5±6.4 Aa	28.8±19.5 Aa	19.9±1.5 Aa
K (%)	1-year-old shoots	16.5±3.4 ABa	20.0±2.3 Aa	28.1±3.2 Aa	26.9±1.5 Aa
	2-year-old shoots	10.8±2.4 Aa	21.9±6.4 Aa	13.2±8.6 Aa	21.8±1.2 Aa
	3-year-old shoots	30.2±5.5 ABa	30.7±6.5 Aa	29.1±15.3 Aa	31.4±3.3 Aa
	4-year-old shoots	42.5±10.3 Ba	27.4±5.1 Aa	29.6±20.7 Aa	19.9±1.5 Aa
Ca (%)	1-year-old shoots	13.2±4.4 Aa	18.0±3.8 Aa	22.0±0.9 Aa	20.3±0.3 Aa
	2-year-old shoots	10.0±2.8 Aa	18.8±6.2 Aa	15.0±9.9 Aa	20.9±1.7 Aa
	3-year-old shoots	28.5±6.7 Aa	31.3±5.7 Aa	29.1±13.2 Aa	34.2±2.8 Aa
	4-year-old shoots	48.3±12.1 Aa	32.0±4.7 Aa	33.9±24.1 Aa	24.5±2.7 Aa
Mg (%)	1-year-old shoots	14.3±3.7 ABa	19.3±2.9 Aa	28.4±0.9 Aa	26.9±0.9 ABa
	2-year-old shoots	10.4±2.7 Aa	20.0±6.2 Aa	12.7±9.0 Aa	22.8±1.2 ABa
	3-year-old shoots	30.9±6.3 ABa	32.6±5.9 Aa	28.1±13.1 Aa	30.8±2.0 Ba
	4-year-old shoots	44.3±11.4 Ba	28.2±4.3 Aa	30.8±23.0 Aa	19.5±2.2 Aa
Cd (%)	1-year-old shoots	14.9±3.0 ABa	16.3±1.7 Aa	30.0±2.2 Aa	21.6±1.2 Aa
	2-year-old shoots	9.9±1.5 Aa	23.9±6.8 Aa	15.6±7.5 Aa	21.0±2.3 Aa
	3-year-old shoots	31.9±5.7 ABa	30.7±8.2 Aa	25.2±14.8 Aa	34.3±2.8 Aa
	4-year-old shoots	43.2±8.6 Ba	29.2±6.6 Aa	29.2±20.1 Aa	23.0±1.8 Aa
Cu (%)	1-year-old shoots	18.6±3.4 Aa	19.0±2.4 Aa	31.8±4.1 Aa	30.1±1.8 Aa
	2-year-old shoots	10.2±1.1 Aa	28.4±6.0 Aa	13.3±7.2 Aa	21.1±2.3 Aa
	3-year-old shoots	31.6±4.0 Ba	26.6±7.0 Aa	27.4±16.0 Aa	26.5±1.3 Aa
	4-year-old shoots	39.6±7.6 Ba	26.0±6.7 Aa	27.5±19.1 Aa	22.3±2.5 Aa
Fe (%)	1-year-old shoots	17.2±4.9 Aa	21.1±3.1 Aa	28.0±4.2 Aa	26.7±4.3 Aa
	2-year-old shoots	11.5±1.8 Aa	24.9±7.1 Aa	15.2±8.2 Aa	19.9±2.6 Aa
	3-year-old shoots	28.5±7.0 Aa	25.1±6.9 Aa	27.3±17.0 Aa	27.2±4.0 Aa
	4-year-old shoots	42.8±13.0 Aa	29.0±9.1 Aa	29.6±21.0 Aa	26.3±7.3 Aa
Mn (%)	1-year-old shoots	14.3±3.7 ABa	18.4±2.5 Aa	30.3±5.8 Aa	25.0±2.0 Aa
	2-year-old shoots	10.5±1.6 Aa	26.2±7.4 Aa	14.5±7.3 Aa	22.0±2.3 Aa
	3-year-old shoots	32.8±5.5 ABa	28.5±6.4 Aa	27.6±17.3 Aa	30.1±1.7 Aa
	4-year-old shoots	42.4±9.3 Ba	26.9±5.2 Aa	27.7±18.9 Aa	22.8±2.7 Aa
Pb (%)	1-year-old shoots	12.2±3.5 Aa	14.7±1.2 Aa	30.7±12.4 Aa	18.7±1.0 Aa
	2-year-old shoots	10.8±2.0 Aa	21.6±7.1 Aa	16.8±8.3 Aa	23.3±2.1 ABa
	3-year-old shoots	33.2±6.3 Aa	33.8±8.4 Aa	26.3±18.9 Aa	32.5±2.3 Ba
	4-year-old shoots	43.8±9.6 Aa	29.8±5.0 Aa	26.2±14.9 Aa	25.5±1.9 ABa
Zn (%)	1-year-old shoots	16.4±3.1 ABa	18.9±2.6 Aa	28.5±4.0 Aa	25.7±1.7 Aa
	2-year-old shoots	12.0±1.7 Aa	25.7±7.4 Aa	15.4±8.3 Aa	22.2±2.7 Aa
	3-year-old shoots	32.6±5.0 ABa	29.2±7.9 Aa	27.6±15.6 Aa	30.8±2.0 Aa
	4-year-old shoots	39.0±7.5 Ba	26.2±5.4 Aa	28.5±19.9 Aa	21.3±1.7 Aa

Differences between clones and age classes of shoots were evaluated by Kruskal-Wallis test. Clones with the same small letter were not significantly different and age classes within the same clone and with the same capital letter were not significantly different. Clone abbreviations are given in Table 1

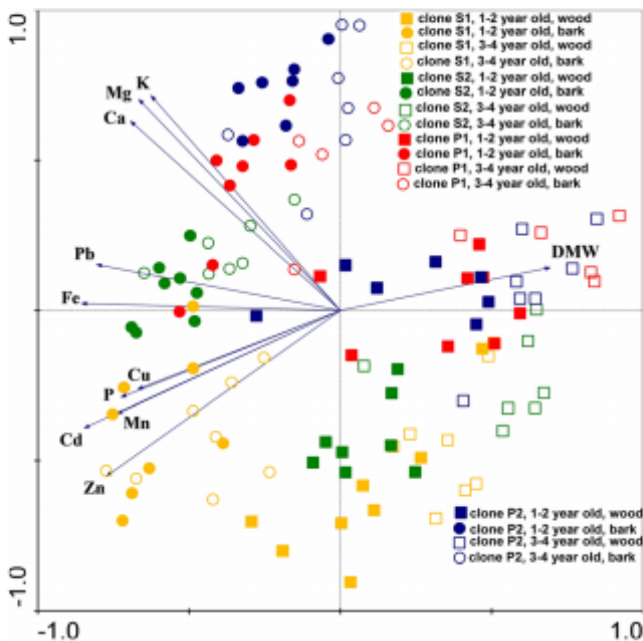


Fig. 2 Ordination diagram showing results of PCA of dry matter yield of wood and bark per plant (DMW) and concentrations of elements in wood and bark (based on data provided in Table 1). *S1* (*Salix schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*, *S2* *S. smithiana*, *P1* *Populus maximowiczii* × *P. nigra*, *P2* *P. nigra*

The first axis of the PCA analysis of removed elements and DM biomass yield per plant explained 85 % and the first two axes together 92 % of the data variability (Fig. 3). DM weight of biomass was clearly positively correlated with amount of

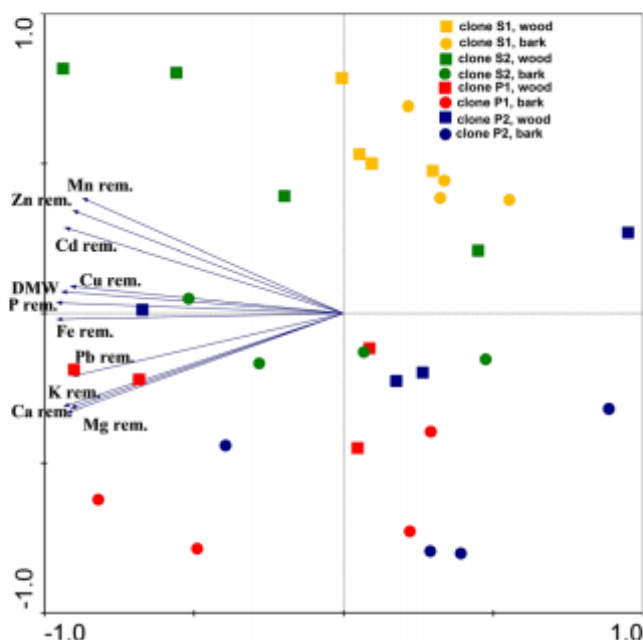


Fig. 3 Ordination diagram showing results of PCA of dry matter yield of wood together with bark per plant (DMW) and amount of elements removed by wood and bark (based on data provided in Table 3). *S1* (*Salix schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*, *S2* *S. smithiana*, *P1* *Populus maximowiczii* × *P. nigra*, *P2* *P. nigra*

removed elements, as all vectors were directed into the same part of the diagram. The second axis divided clones into *Salix* in the upper part of the diagram and *Populus* in the bottom part.

On the left side of the diagram, there are markers for clones with low yield of biomass and, therefore, also with less removal of elements, as was the case of the S11 clone. The ordination diagram clearly indicates a large positive effect of biomass yield on removal of elements.

Remediation factors

Remediation factors for *Salix* clones S1 and S2 were 0.24 and 0.85 % for Cd, 0.001 and 0.003 % for Pb and 0.08 and 0.15 % for Zn, respectively. Remediation factors for *Populus* clones P1 and P2 were 0.49 and 0.29 % for Cd, 0.005 and 0.001 % for Pb and 0.15 and 0.07 % for Zn, respectively.

Discussion

Biomass yield and mortality

Although all tested clones were able to grow on moderately contaminated soil, the most productive with the lowest mortalities were P1 and S2 clones in the first 4 years of the experiment. The P1 and S2 clones were listed among the most productive clones in the Czech Republic by Weger (2009) and Weger and Bubeník (2011), with P1 the most used clone for short-rotation coppices in the Czech Republic. For these clones, average yields ranging from 6–18 t DM ha⁻¹ are typical at optimal, unpolluted stands with different rotation lengths. The estimated yields of clones in our experiment ranged from 0.8 (S1) to 7.4 t DM ha⁻¹ (P1) in the first harvest performed 4 years after establishment of the experiment. Such yields are low compared to data published by other authors. For example, Fortier et al. (2010) observed yield amounts of 12 t DM ha⁻¹ year⁻¹ of the hybrid *P. maximowiczii* × *P. nigra* clone NM6 (the same parentage as P1 used in this study) on a highly fertile riparian buffer strip (6-year rotation). For clone S2, Tlustoš et al. (2007) quoted yields of 2–5 t DM ha⁻¹ year⁻¹ (first rotation). Laureysens et al. (2004b) published that clone P2 achieved almost 9 t DM ha⁻¹ year⁻¹ on a former waste disposal site moderately polluted by RE. Sevel et al. (2014), using clone S1, recorded yield amounts ranging from 8.7 to 11.9 t ha⁻¹ year⁻¹, depending on the fertiliser application regime. It is important to note that biomass yield of the first harvest was approximately 30 % of biomass yield from the following harvests (Havličková et al. 2010). For example, Pulford et al. (2002), using clone Tora (similar to S1), recorded only 0.09 t ha⁻¹ yield after the first year of growth on heavily contaminated soil. Soil at our site was also poor in plant-available P, which may contribute to low yield

and explain the favourable response of most clones to sewage sludge application (personal communication). Long-term measurements throughout several rotations are necessary to properly assess yield potential of a given clone (Weger and Bubeník 2011). Obviously, yields are highly dependent not only on the clone but also on the level of soil contamination, nutrient and water availabilities, climate conditions and weed infestation.

The relatively high mortality of plants was probably the result of the high density of planting, which caused considerable self-thinning. Typical planting densities used by other authors range from 6000 to 12,000 for poplar clones and 6000–15,000 for willow clones (Havličková et al. 2010). We used a high density of planting because of the low competition of small plants during early years of the experiment, increased competitive ability of small plants against weeds under a higher density of planting and continuous collection of biomass samples for experimental purposes.

Biomass yield increased with shoot age in our experiment, which is in agreement with results by Maxted et al. (2007), who recorded much higher annual biomass increments in 3-year-old shoots compared to 1-year-old shoots of tested willow clones. Because the maximum mean annual increment for poplars never occurs before the fifth year, rotations exceeding this period are recommended (Kauter et al. 2003). However, in practice, 2–6-year-long rotations are most common, due to economic reasons (i.e. harvest costs, etc.). In willows, the optimal rotations are somewhat lower. The proportion of bark of the total biomass was lower in tested willows compared to poplars. The mean proportion of bark of total biomass (~30%) and decrease in the proportion of bark with age agree with results of other authors (Laureysens et al. 2005; Maxted et al. 2007).

Concentrations of elements

Concentrations of all analysed elements were generally higher in bark compared to wood, which is in agreement with other authors (Laureysens et al. 2005; Maxted et al. 2007). There were only several minor exceptions. Concentrations of P and Cu in the wood were slightly higher than in the bark of clones P2 and S2. Similar results were reported by Pulford et al. (2002), who found a group of willows with lower concentrations of Ni and Cu in the bark compared to the wood in clones with good survival rates and biomass production.

The concentrations of most elements (P, K, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn and Zn) in the wood and bark decreased with age of shoots. A decrease in concentrations of elements in shoots with age is commonly explained by the fact that a decrease in the proportion of element-rich bark is associated with an increase in the proportion of element-poor wood with age (Sander and Ericsson 1998). Since we separated wood and bark and analysed them separately, we revealed that a decrease

in concentrations of elements with age is associated not only with the change of bark/wood proportion but also with a decrease in concentrations of elements in both wood and bark. Higher concentrations of elements in the younger compared to older shoots can be explained by the dilution effect; the dilution of elements in the younger shoots is lower than in older ones, since younger shoots have much lower amounts of biomass. The exceptions in our study were Ca in bark and Pb in wood, which slightly increased with age. Increase of Ca concentration with age is a common feature also reported by other authors (Laureysens et al. 2005) and can be explained by low mobility of Ca in plants. Since plants cannot redistribute Ca efficiently over long distances, Ca absorbed by roots and transported through the xylem is largely utilised or sequestered locally. Most of the Ca absorbed by plants is found in the cell walls, where Ca^{2+} plays a role in strengthening the wall by cross-linking the carboxyl groups of the pectic polymers (Gilroy et al. 1993). Also, Pb has low mobility and was found to accumulate mainly in roots with good affinity to galacturonic acid, the main component of two pectin domains, homogalacturonan and rhamnogalacturonan (Polec-Pawlak et al. 2007).

Each clone accumulated elements in different patterns. Generally, the clones of willows, particularly clone S1, had higher concentrations of Zn, Cd, Mn, P and Cu than poplar clones, and conversely, poplar clone P1 accumulated more Pb. This is consistent with results of Fischerová et al. (2006), and genotype seems to have profound effects on accumulation abilities for different elements.

Removal of elements

Based on our results, efficiency of phytoextraction for many elements is driven to a large extent by biomass yield, followed by the concentrations of elements, in the biomass. Similar results also were presented by Komárek et al. (2008) and Laureysens et al. (2004a). Despite higher concentrations of elements in bark compared to wood, bark quantity is substantially lower compared to wood, and thus, the bark is not as significant for removal of elements from the soil (with the exception of Ca and Mg). The removal of elements from the soil by clones increased in the order of $S1 < P2 < S2 < P1$, and this is the order of biomass production. The exceptions only included Cd, Mn and Zn, which were removed more by willows than by poplars ($S2 > P1$, $S1 > P2$), due to very high concentrations of these elements in willow clones. It must be noted that biomass production of clones can change during following years, and the order of clones according to biomass production during the first 4 years of planting may be different in following years. Higher proportions of elements were removed by 3- and 4-year-old shoots than by younger shoots, particularly in willows. The most effective remediation strategy therefore seems to be longer cutting frequency, at least

3 years or probably more, due to the higher accumulation of biomass in several-year-old shoots.

The higher concentrations of RE in young, fast-growing tree stands also may create a health risk via contamination of game meat. If not fenced, twigs or bark of willows (and, to a lesser extent, of poplars) are common components of winter diets of large herbivores (Hejman et al. 2014). In our experimental field, we recorded intensive browsing of plants by roe deer during the first season, before fencing the area.

Remediation factors

Observed RF in our study was very low compared to the RF in pot experiments with the same willow and poplar clones (Vysloužilová et al. 2003a; Komárek et al. 2008) but was similar to RF (0.13 % for Cd and 0.29 % for Zn) found in a field study on moderately polluted soil by Jensen et al. (2009). Schmidt (2003) reported that plants grown in pots absorb a higher amount of heavy metals than in natural conditions. In field experiments, we can assume only 20 % RF compared to controlled pot experiments. Also, Dickinson and Pulford (2005) described the difference between theoretical calculations and real results from field experiments. There are several reasons for different results: (i) the roots of plants intentionally avoid the centre of contamination, (ii) part of removed RE is stored in the leaves that fall off and are not harvested, and (iii) concentrations of Cd and other elements are almost always significantly higher in the roots than in above-ground tissues, and the roots are not harvested until plantation termination.

There are several techniques designed for processing of contaminated biomass. Mrnka et al. (2011) recommended the application of contaminated biomass with Pb as an additional fuel in the furnaces in smelters. Šyc et al. (2012) also stated incineration of biomass as one of the best ways to process contaminated biomass, because most of RE remain bound in ashes. Contaminated biomass can be processed by pyrolysis, which results in formation of biochar. Biochar can be applied into the soil as a stable soil additive with ability to bind contaminants in the soil (Břendová et al. 2015).

Conclusions

All clones were able to easily grow on moderately contaminated soil. The most productive ones with the lowest mortality were P1 and S2 clones in the first 4 years of the experiment. Biomass yield and wood/bark ratio increased with the age of the shoots. Conversely, concentrations of most elements decreased with the age of the shoots and were generally higher in the bark than in the wood.

Biomass yield seems to be more important for phytoextraction than concentration of RE in plant biomass.

The removal of most elements (including Pb) from the soil by clones increased in the order of $S1 < P2 < S2 < P1$, which is in agreement with biomass production. From the point of view of phytoextraction, longer rotations seem to be more effective. Cd, Mn and Zn were removed in higher extent by willows than by poplars ($S2 > P1$, $S1 > P2$), and therefore, S2 clone seems to be the best candidate for phytoextraction on moderately contaminated soil with these RE.

Acknowledgments This study was supported by Czech University of Life Sciences, Prague, from CIGA project No. 20142005.

References

- Anonymous (1994) Public notice No. 13/1994 for the management of soil protection. Czech Ministry of the Environment, Prague [In Czech]
- Břendová K, Tlustoš P, Száková J (2015) Can biochar from contaminated biomass be applied into soil for remediation purposes? Water Air Soil Poll. doi:10.1007/s11270-015-2456-9
- Brunner I, Luster J, Günthard-Goerg MS, Frey B (2008) Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. Environ Pollut 152:559–568
- Dawson M (2007) Short-rotation coppice willow: best practice guidelines. Omagh College
- Dickinson NM, Pulford ID (2005) Cd phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evident trail. Environ Int 31:609–613
- Dos Santos Utmazian MN, Wenzel WW (2007) Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. J Plant Nutr Soil Sci 170:265–272
- Dos Santos Utmazian MN, Wieshammer G, Vega R, Wenzel WW (2007) Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. Environ Pollut 148:155–165
- Fischerová Z, Tlustoš P, Száková J, Šichorová K (2006) A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. Environ Pollut 144:93–100
- Fortier J, Gagnon D, Truax B, Lambert F (2010) Biomass and volume yield after 6 years in multiclonal hybrid poplar riparian buffer strips. Biomass Bioenerg 34:1028–1040
- Gilroy S, Bethke PC, Jones RL (1993) Calcium homeostasis in plants. J Cell Sci 106:453–462
- Hammer D, Kayser A, Keller C (2003) Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. Soil Use Manage 19:187–192
- Havlíčková K, Suchý J, Weger J, Šedivá J, Tábořská M, Bureš M, Hána J, Nikl M, Jirásková L, Petruchovej J, Knápek J, Vašíček J, Gallo P, Stražil Z (2010) Analysis of biomass production potential in the Czech Republic. VÚKOZ v.v.i., Průhonice.[in Czech]ISBN 978-80-85116-72-4
- Hejman M, Hejmanová P, Stejskalová M, Pavlů V (2014) Nutritive value of winter-collected annual twigs of main European woody species, mistletoe, and ivy and its possible consequences for winter foddering of livestock in prehistory. The Holocene 24:659–667
- Jensen JK, Holm PE, Nejrup J, Larsen MB, Borggaard OK (2009) The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. Environ Pollut 157:931–937
- Kauter D, Lewandowski I, Claupein W (2003) Quantity and quality of harvestable biomass from *Populus* short rotation coppice for solid fuel use: a review of the physiological basis and management influences. Biomass Bioenerg 24:411–427

- Komárek M, Tlustoš P, Száková J, Chrástný V (2008) The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environ Pollut* 151:27–38
- Laureysens I, Bogaert J, Blust R, Ceulemans R (2004a) Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecol Manag* 187:295–309
- Laureysens I, Blust R, De Temmemanc L, Lemmens C, Ceulemans R (2004b) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood, and bark concentrations. *Environ Pollut* 131:485–494
- Laureysens I, De Temmeman L, Hastir T, Van Gysel M, Ceulemans R (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut* 133:541–551
- Lonardo DS, Capuana M, Ametoli M, Gabbriellini R, Gonnelli C (2011) Exploring the metal phytoextraction potential of three *Populus alba* L. clones using an *in-vitro* screening. *Environ Sci Pollut Res* 18:82–90
- Mader P, Száková J, Miholová D (1998) Classical dry ashing of biological and agricultural materials: part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analysis* 26:121–129
- Maxted AP, Black CR, West HM, Crout NMJ, Megrath SP, Young SD (2007) Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil* 290:157–172
- Mehlich A (1984) Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Commun Soil Sci Plant Anal* 15:1409–1416
- Mitchell CP, Stevens EA, Watters MP (1999) Short-rotation forestry: operations, productivity, and costs. *Forest Ecol Manag* 121:123–136
- Mmka L, Doubková P, Habart J, Sudová R, Tlustoš P, Vohník M, Vosátka M (2011) Willow and poplar short rotation coppice plantations in soils contaminated by risk elements: review and handbook for growers in the Czech Republic. Institute of Botany of the ASCR, Průhonice. ISBN 978-80-86188-36-2
- Poleć-Pawlak K, Ruzik R, Lipiec E, Czurzyńska M, Gawrońska H (2007) Investigation of Pb(II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *J Anal Atom Spectrom* 22:968–972
- Pulford ID, Dickinson NM (2006) Phytoextraction technologies using trees. In: Prasad MNV (ed) Trace elements in the environment: biochemistry, biotechnology, and bioremediation. CRC Press, Boca Raton, pp 375–395
- Pulford ID, Watson C (2003) Phytoextraction of heavy metal-contaminated land by trees: a review. *Environ Int* 29:529–540
- Pulford ID, Riddell-Black D, Stewart C (2002) Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoextraction. *Int J Phytoremediat* 4:59–72
- Sander ML, Ericsson T (1998) Vertical distributions of plant nutrients and heavy metals in *Salix viminalis* stems and their implications for sampling. *Biomass Bioenerg* 14:57–66
- Schmidt U (2003) Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J Environ Qual* 32:1939–1954
- Sevel L, Nord-Larsen T, Ingerslev M, Jørgensen U, Raulund-Rasmussen K (2014) Fertilisation of SRC Willow: I. Biomass production response. *Bioenergy Res* 7:319–328
- Šyc M, Pohořelý M, Kameníková P, Habart J, Svoboda K, Punčochář M (2012) Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crops. *Biomass Bioenerg* 37:106–113
- ter Braak C J F, Smilauer P (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca
- Tlustoš P, Száková J, Vysloužilová M, Pavlíková P, Weger J, Javorská H (2007) Variation in the uptake arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of willows (*Salix* spp.) grown in contaminated soils. *Cen Eur J Biol* 2:254–428
- Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J (2003a) Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant Soil Environ* 49:542–547, **WOS: 000187555200003**
- Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J, Pavlíková D (2003b) As, Cd, Pb, and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements. *Plant Soil Environ* 49:191–196, **WOS: 000183940200001**
- Weger J (2008) Yield of selected poplar and willow clones after 9 years of coppicing. *Acta Pruhoniciana* 89:5–10, [in Czech]. ISBN 978-80-85116-63-2
- Weger J (2009) The evaluation of the influence of a rotation length of short rotation coppice on production and growth characteristics of poplar clone Max-4 (*Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* Henry). *Acta Pruhoniciana* 92:5–11, [in Czech]. ISBN 978-80-85116-70-0
- Weger J, Bubeník J (2011) The evaluation of yield and growth of native willows after 14 years of short rotation coppice. *Acta Pruhoniciana* 97:39–46, [in Czech]. ISBN 978-80-85116-79-3
- Weih M, Nordh NE (2002) Characterising willows for biomass and phytoextraction: growth, nitrogen, and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass Bioenerg* 23:397–413
- Wieshammer G, Unterbrunner R, García TB, Zivkovic MF, Puschenreiter M, Wenzel WW (2007) Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* spp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* 298:255–264
- Zalesny RS Jr, Bauer EO (2007a) Evaluation of *Populus* and *Salix* continuously irrigated with landfill leachate: I. Genotype-specific elemental phytoextraction. *Int J Phytoremediat* 9:281–306
- Zalesny RS Jr, Bauer EO (2007b) Evaluation of *Populus* and *Salix* continuously irrigated with landfill leachate: II. Soils and early tree development. *Int J Phytoremediat* 9:307–323

4.2 Kubátová et al. (2016). Účinky aplikace čistírenského kalu na produkci biomasy a obsah Cd, Pb a Zn ve výhonech klonů *Salix* a *Populus*: Zlepšení účinnosti fytoremediace na kontaminovaných půdách.

Název: Effects of sewage sludge application on biomass production and concentrations of Cd, Pb and Zn in shoots of *Salix* and *Populus* clones: Improvement of phytoremediation efficiency in contaminated soils.

Autoři: Kubátová, P., Hejzman, M., Száková, J., Vondráčková, S., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Bioenergy Research. 9 (3). 809-819.

Effects of Sewage Sludge Application on Biomass Production and Concentrations of Cd, Pb and Zn in Shoots of *Salix* and *Populus* Clones: Improvement of Phytoremediation Efficiency in Contaminated Soils

Pavla Kubátová¹ · Michal Hejman² · Jiřina Száková¹ · Stanislava Vondráčková¹ · Pavel Tlustoš¹

Published online: 12 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Fast-growing clones of *Salix* and *Populus* species have been studied for phytoremediation of soils contaminated by risk elements (REs) using short-rotation coppice plantations. Biomass yield, accumulation and removal of RE (Cd, Pb and Zn) by highly productive willow (S1—(*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*) × *S. viminalis*, S2—*Salix* × *smithiana*) and poplar (P1—*Populus maximowiczii* × *Populus nigra*, P2—*P. nigra*) clones were investigated with and without sewage sludge (SS) application. The precise field experiment was established in April 2008 on moderately Cd-, Pb- and Zn-contaminated soil. Initially, shoots were harvested after four seasons in February 2012 and then after two more seasons in February 2014. The application of SS limited plant growth during the first years of the experiment in the majority of treatments, mainly due to weed competition and higher concentrations of available soil nutrients causing lower yields than those of control (C) treatments. Well-developed roots were able to take advantage of SS applications, and shoot yield was mainly higher in SS treatments in the second harvest, reaching up to 15 t dry matter (DM) ha⁻¹. Willows

performed better than poplars. Application of SS reduced RE shoot concentrations compared to the C treatment. The removal of RE was significantly higher in the second harvest for all clones and elements (except the P2 clone), and the biomass yield was the major driving force for the amount of RE removed by shoots. Well-developed plantations of fast-growing trees showed better suitability for the phytoextraction of moderately contaminated soils for Cd and partly for Zn but not for Pb, which was less available to plants. From the four tested clones, S2 showed the best removal of Cd (up to 0.94 %) and Zn (up to 0.34 %) of the total soil element content, respectively, and this clone is a good candidate for phytoextraction. SS can be a suitable source of nutrients for *Salix* clones without any threat to the food chain in terms of biomass contamination, but its application to the soil can result in an increased incidence of some weeds during the first years of plantation.

Keywords Cadmium · Lead · *Populus* spp. · *Salix* spp. · Sewage sludge · Zinc

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12155-016-9727-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pavel Tlustoš
tustos@af.czu.cz

¹ Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, CZ-165 21 Prague 6 - Suchbátka, Czech Republic

² Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, CZ-165 21 Prague 6 - Suchbátka, Czech Republic

Introduction

Sustainable use of environmentally friendly remediation methods of contaminated sites is among the major environmental issues [1]. Therefore, the interest in use of suitable methods to decontaminate soils is still increasing [2]. Phytoextraction, removing RE from the soil by their accumulation in plant tissues, is a very challenging technique [3]. Many plant species have been tested for their ability to accumulate elements in their aboveground biomass. According to Pulford and Dickinson [4] and also from our previous experience [5–7], the plants suitable for phytoextraction of metals

are fast-growing trees; mainly species of willows and poplars perform well in medium and moderately contaminated soils [8]. Their advantages include their ability to accumulate and translocate metals to the aerial parts, fast growth and extended root systems [9]. Willows and poplars have the added advantage of producing biomass that can be used for energy production [4].

Phytoextraction potential of *Salix* and *Populus* clones has been tested, for example, using hydroponic screening [10]. Also, the results of pot experiments with Cambisol moderately contaminated with RE (5.46 mg Cd kg⁻¹, 956 mg Pb kg⁻¹, 279 mg Zn kg⁻¹) revealed that *Salix* clones are able to accumulate Cd and Zn well (*Salix dasyclados*, 41 mg Cd kg⁻¹, 591 mg Zn kg⁻¹), whereas *Populus* clones prefer to accumulate more Pb (*Populus trichocarpa*, 17.3 mg Pb kg⁻¹) than do *Salix* clones. Remediation factors (RFs) of these clones were comparable to hyperaccumulators [7]. Evaluation of phytoextraction effectiveness is usually based on the results of pot and laboratory experiments, but due to long plant stands at a specific site and unlimited root growth, it is vital to test plants in field conditions within a longer period of time on a global scale. Maxted et al. [11] performed field experiments with *Salix* clones. The best *Salix* clones removed within 4 years 15–20 % of the available Cd content in soil. Laureysens et al. [12] carried out field experiments with *Populus* clones on slightly contaminated soil. The best remediation efficiency was shown with clones with high numbers of shoots and with high ability of Cd and Zn accumulation. Vysloužilová et al. [5] confirmed in pot experiments the phytoextraction potential of clones in moderately contaminated soil (RF for Cd=20 % and for Zn=4 %), but on heavily contaminated soil, the RF for Zn was less than 1 %. In this context, the methods of RE immobilisation in the soil are tested to decrease RE concentration in the soil solution and, subsequently, to decrease the phytotoxic effect of the extreme soil RE contents. The correct choice of the suitable RE immobilisation agent is a crucial point of the successful remediation of such a soil.

Disposal of SS poses a serious threat to our environment. It is assumed that the amount of SS produced in Europe will increase in the near future, mainly due to increasing demands for quality of clean sewage water [13]. At present, there is growing pressure to minimise or forbid landfilling of SS; therefore, there are mainly two ways of its disposal: application on agricultural land and incineration. In economic terms, the application of SS onto the soil is considered to be an advantageous method due to the significant portion of nutrient recycling. However, this solution involves severe risks with respect to the occurrence of organic and inorganic contaminants, mainly some pathogens and RE present in the sludge. Both organic and inorganic contaminants could be accumulated in the soil, taken up by plants and thereby transferred to humans via the food chain [14]. On the other hand, the

application of SS has a positive effect on soil fertility and its physical characteristics, such as increasing porosity of the soil and stability of soil aggregates [15], and the sludge is a good source of N, P and other nutrients. Application of organic fertilisers can decrease mobility and availability of these elements to plants, especially for Cu [16, 17] less for Pb and Cd [18, 19]; conversely, Zn mobility can be increased [18, 19]. Thus, SS can be a significant source of organic matter for potential RE immobilisation. However, the application of SS can result in the addition of the toxic organic and inorganic compounds into soil together with the fertilisation effect [20]. Chaney et al. [21] proved that organic fertilisation and other agronomic activities (e.g., liming) can limit RE uptake by plants. Behaviour of RE in the sludge-treated soil and their plant uptake are difficult to generalise because they are strongly dependent on the nature of the metal, sludge, soil properties and crop planted [22].

At our experimental location, the amounts of most RE in contaminated soils are much higher (with the exception of Zn) than the obvious contents of the RE in SS. Therefore, the application of local SS should not increase the soil contamination but rather should dilute the soil RE content and enrich it with nutrients. Investigation of SS application has not been studied under the mentioned conditions so far, but SS amendment can help plants develop higher biomass amounts and close a loop of on-site safe recycling and utilisation of SS. The application of SS for biomass production can also reduce total cost of remediation and SS utilisation.

In our field study, the biomass production and phytoremediation potential of four clones of fast-growing trees were investigated as follows:

- (i) Clone (*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*) × *S. viminalis*, called Tordis SW 960299, belongs among the registered varieties of ‘Swedish willows’, which were mostly hybrids of *S. viminalis* [23]. Clone Tordis achieved high biomass yields [24, 25] and responded positively to the application of different fertilisers containing N [25]. Clone Tordis was tested for phytoextraction of As, Cd, Pb and Zn in field conditions at project KBBE-266124 [26] and in the study of Zárubová et al. [27] (only for Cd, Pb and Zn), in which this clone achieved high concentrations of Cd (148–171 mg kg⁻¹ in bark, 50–73 mg kg⁻¹ in wood) and especially Zn (1104–1388 mg kg⁻¹ in bark, 338–723 mg kg⁻¹ in wood) but very low biomass yield (0.26 t DM ha⁻¹ year⁻¹).
- (ii) Clone *Salix* × *smithiana*, S-218 is a spontaneous hybrid of *S. viminalis* and *Salix caprea* [28] and is among the best-performing clones in the Czech Republic. This clone reached biomass yields of more than 14 t ha⁻¹ year⁻¹ [29]. Simultaneously, the S-218 clone demonstrated a high ability to accumulate Cd (76.8 mg kg⁻¹ in leaves, 41.9 mg kg⁻¹ in twigs) and Zn

(2105 mg kg⁻¹ in leaves, 592 mg kg⁻¹ in twigs) in pot experiments in soil with an addition of 100 mg Cd kg⁻¹, 2000 mg Pb kg⁻¹ and 2000 mg Zn kg⁻¹ [6]. Also, in the pot experiment [28], clones of *S. smithiana* (S-218 and S-150) demonstrated higher phytoremediation potential compared to the remaining ones, where S-218 and S-150 clones were characterised by the highest biomass yield (up to 15 t DM ha⁻¹ year⁻¹).

- (iii) Clone *Populus nigra* × *Populus maximowiczii*, J105 is among the most productive clones in the Czech Republic, according to Weger [30] and Weger and Bubeník [31]. Hybrid *P. nigra* × *P. maximowiczii*, tested by [7], was able to accumulate Cd (17.3 mg kg⁻¹), Zn (344 mg kg⁻¹) and especially Pb (16.7 mg kg⁻¹). For this clone, the Pb RF was 0.025 % higher than for hyperaccumulating plants. However, according to Komárek et al. [32], this hybrid is not suitable for remediation of moderately and highly contaminated soils (4.86 mg Cd kg⁻¹, 1360 mg Pb kg⁻¹, 266 mg Zn kg⁻¹), because the RF for Pb was only 0.02 %.
- (iv) Clone *P. nigra*, Wolterson was tested in a field experiment on a former waste disposal site slightly polluted by RE (0.4–0.8 mg Cd kg⁻¹, 39–52 mg Pb kg⁻¹, 103–161 mg Zn kg⁻¹ [33]) for biomass production and for accumulation of RE in studies by [12]. In this study, clone Wolterson was among clones with the best remediation potential (removed 47 g Cd ha⁻¹ and 2400 g Zn ha⁻¹ during 2 years in a second rotation) and with best biomass yield (9 t DM ha⁻¹ year⁻¹).

The main objectives of the study were (i) to evaluate the potential immobilisation effects of SS application on plant growth and/or RE uptake and (ii) to compare the RE (Cd, Pb and Zn) phytoremediation efficiency of individual willow and poplar clones.

Materials and Methods

Study Site and Field Experiment

The field experiment was established in April 2008 on multi-RE (mostly Cd, Pb and Zn)-contaminated agricultural soil in Podleší (49° 42' 24" N, 13° 58' 32" E), near the town of Píbram, 58 km south of Prague. The altitude of the study site is 500 m above sea level, with a mean annual precipitation of 700 mm and mean annual temperature of 6.5 °C. On this experimental area were 64 rows (experimental units) [34], each row contained one clone and one treatment. Each row was 7.5 × 1.3 m, and the intra-row distance among plants was 0.25 m. Experimental units were arranged in a split-plot randomisation. Treatments [control (C) and sewage sludge (SS)] were whole plots

arranged in a completely randomised design with eight replicates. Each whole plot contained four sub-plots, corresponding to two *Salix* and two *Populus* clones [34].

Two promising *Salix* clones, allochthonous ((*S. schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*) hybrid Tordis and autochthonous *S.* × *smithiana* clone S-218 (hereafter denoted S1 and S2, respectively), were selected. Among *Populus* clones, we selected the most widely planted hybrid clone in the Czech Republic, *P. maximowiczii* × *P. nigra* J-105, also known as Max-4, as well as *P. nigra* clone Wolterson (hereafter denoted P1 and P2, respectively). These clones were grown in contaminated soil (especially Cd, Pb and Zn) in the C treatments and in treatments with the application of SS.

The soil type is a weakly acidic modal Cambisol, with a cation exchange capacity of 166 mmol_{l+} kg⁻¹, C_{org} of 4.1 %, C/N ratio of 9, humus horizon thickness of 26 cm and soil bulk density of 1.35 t m⁻³. The mean soil pH_{H2O} is 5.66 and pH_{KCl} 5.27. Pseudo-total (*Aqua regia*-soluble) concentrations of elements in the soil are as follows: 7.3 mg Cd kg⁻¹, 218 mg Zn kg⁻¹ and 1368 mg Pb kg⁻¹ [27]. Czech legislation limits for pseudo-total concentrations of elements in agricultural soils are 1.0, 140 and 200 mg kg⁻¹ of Cd, Pb and Zn, respectively [35]. Plant-available Mehlich III [36] concentrations of P, K, Ca and Mg in the top horizon were 14, 84, 4441 and 324 mg kg⁻¹, respectively. Plant-available concentrations of Cd, Pb and Zn in the top horizon were 4.92, 705 and 37 mg kg⁻¹, respectively, determined in Mehlich III [36], as well.

Application of Sewage Sludge

Fresh SS was applied to all 32 experimental units of the SS treatment for the first time in April 2008 before planting of willow and poplar clones at rate 7.5 kg m⁻², and a second application was done in May 2012 at rate 3.5 kg m⁻². SS was ploughed into the soil immediately after application. The main characteristics of the both sludges are summarised in Table 1.

Harvesting of Plant Material

Shoots of cuttings were harvested in February 2012 after four vegetative seasons and again in February 2014 after the next two seasons. The shoots were cut 20 cm above the soil surface. Harvested shoots were dried at 60 °C and weighed.

Laboratory Analyses

Dry biomass samples were ground using a stainless steel Retsch friction mill (Retsch, Haan, Germany; particle size 0–1 mm). The total concentrations of elements in the biomass of shoots were determined using inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy (ICP-OES; VARIAN VistaPro, Australia), where dry ashing procedures [37] were applied for sample decomposition.

Table 1 Dry matter content (DM), concentration (in DM) and amount of elements applied by sewage sludge in 2008 and 2012

Sewage sludge		DM (%)	N	P	K	Ca	Mg	Cd	Pb	Zn
2008	Content (mg kg ⁻¹)	12	40,800	7950	2602	17,484	4053	2.9	102	913
	Rate (kg ha ⁻¹)		367	71	23	157	36	0.03	0.92	8
2012	Content (mg kg ⁻¹)	18	51,200	10,531	8621	8348	2126	2.10	46	571
	Rate (kg ha ⁻¹)		323	66	54	53	13	0.01	0.29	4

Remediation Factor

Phytoextraction potential of the examined clones was expressed as an RF per cent, which indicates the proportion of elements removed by harvested biomass from the total contents of elements at the site. The RF was calculated as follows (1):

$$RF(\%) = \frac{C_{\text{plant}} DM_{\text{plant}}}{C_{\text{soil}} W_{\text{soil}}} 100 \quad (1)$$

where C_{plant} is the concentration of a metal in the plant dry biomass (g t⁻¹), DM_{plant} the dry matter plant biomass yield (t), C_{soil} the total concentration of the metal in soil (g t⁻¹) and W_{soil} the amount of soil in the top horizon (t ha⁻¹), modified according to Komárek et al. [32].

Data Analyses

All statistical analyses were performed using the Statistica 10.0 (www.statsoft.com) and CANOCO 5 [38] programs. All data were checked for homogeneity of variance and normality (Levene and Shapiro–Wilk tests). Collected data did not meet assumptions for the use of analysis of variance (ANOVA) and were thus evaluated by the non-parametric Kruskal–Wallis test. Principal component analysis (PCA), in the Canoco 5 program, was applied to all collected data together (concentrations of elements in plants as well as biomass yield). We used the standardisation of species data because data of a different character were analysed together. The results were visualised in the form of a bi-plot ordination diagram in the CanoDraw program 5. The PCA is a multivariate method, useful for data presentation, because of overview formation over the correlations among all the analysed data and because of showing general trends visible in one ordination diagram.

Results

Biomass Yield and Mortality

With the exception of the S1 clone, biomass yield was higher in the C than in all SS treatments in the first harvest in 2012 (Tables 2 and 3). In the C treatment, the mean yield decreased

in the order of P1 > S2 > P2 » S1 clones, whereas in the SS treatment, the yield decreased in the order of S2 > P1 > S1 > P2 clones calculated per plant. The order was changed to S2 > S1 > P1 > P2 if the mortality was included into the calculation, and results were expressed on a per hectare basis (Table 4).

With the exception of the P2 clone in the C treatment, biomass yield in 2014 was substantially higher than in 2012, in which higher biomass yield was recorded in the SS compared to the C treatment (with the exception of the P1 clone). In 2014, the biomass yield in the C treatment decreased in the order of P1 > S2 > S1 » P2 clones and in the SS treatment S2 > S1 > P1 » P2. No changes in the clone order were observed after recalculation of the yield per hectare (Table 4). Biomass yield adversely corresponded with the plant mortality. In the C treatment, mortality increased in the order of P1 (15 %) < S2 (23 %) < P2 (25 %) < S1 (48 %) clones and in the SS treatment increased in the order of S2 (40 %) < S1 (41 %) < P1 (50 %) < P2 (51 %) clones in the second harvest.

Concentrations of Elements

In 2012, the concentration of RE in shoots was higher in C treatments than in SS treatments (with the exception of the P2 clone with higher Zn concentration in the SS compared to the C treatment). In the first harvest, the highest Cd and Zn concentrations were recorded in the S1 clone in the C treatment, and the highest Pb concentration was recorded in the P1 clone in the C treatment, where the higher RE contents were mainly associated with the lowest biomass yield (Table 2). A similar pattern was observed in 2014. In 2014, however, in the SS treatment, the concentration of Pb was lower than in 2012 (with the exception of the P1 clone). In 2014, concentrations of Pb in clones S1 and S2 were higher in the SS than in the C treatment (Table 2). Thus, the results showed a higher effect of clone rather than SS application on the concentrations of investigated RE.

Removal of Elements from the Soil

In 2012, the removal of Cd and Zn per plant in the C treatment was the highest for clone S2 and in the SS treatment for clone S1, and the remaining clones decreased in the order of S2 > P1 > P2. Removal of Pb per plant by clones harvested in the C treatment decreased in the order of P1 > S2 > P2 > S1, and this

Table 2 Mean (\pm SE) standing biomass and concentrations of elements (Cd, Pb and Zn) in shoots (wood + bark) of *Salix* (S1—*S. schwerinii* \times *S. viminalis*) \times *S. viminalis*, S2—*S. smithiana*) and *Populus* (P1—*P. maximowiczii* \times *P. nigra*, P2—*P. nigra*) clones grown in control (C) and in sewage sludge (SS) treatments

Variable	Time	Treatment	Clones			
			S1	S2	P1	P2
Dry biomass (g plant ⁻¹)	2012	C	38.8 \pm 6.9 ^{Aa}	132 \pm 16 ^{Bab}	197 \pm 43.4 ^{Bab}	102 \pm 29.1 ^{ABab}
		SS	97.4 \pm 22 ^{Aab}	119 \pm 22.9 ^{Aa}	108 \pm 13.6 ^{Aa}	56.4 \pm 12.4 ^{Aa}
	2014	C	403 \pm 183 ^{ABbc}	498 \pm 137 ^{Bab}	541 \pm 104 ^{Bb}	71.2 \pm 16.6 ^{Aab}
		SS	516 \pm 135 ^{ABc}	715 \pm 203 ^{Bb}	496 \pm 118 ^{ABb}	148 \pm 15.8 ^{Ab}
Cd (mg kg ⁻¹)	2012	C	55 \pm 6.83 ^{Bc}	44.4 \pm 7.9 ^{ABb}	23.6 \pm 2.91 ^{Ac}	25.3 \pm 3.36 ^{Ab}
		SS	48.2 \pm 5.17 ^{CBc}	32.9 \pm 2.7 ^{BCab}	18.2 \pm 1.89 ^{ABc}	25.1 \pm 1.82 ^{ABb}
	2014	C	26.7 \pm 1.99 ^{CaB}	22.4 \pm 1.51 ^{BCa}	11 \pm 0.68 ^{Ab}	14.4 \pm 1.63 ^{ABa}
		SS	24.1 \pm 2.2 ^{Ba}	19.8 \pm 2.56 ^{Ba}	8.63 \pm 1.46 ^{Aa}	13.7 \pm 1.8 ^{ABa}
Pb (mg kg ⁻¹)	2012	C	28.8 \pm 4.02 ^{Ab}	24.5 \pm 3.57 ^{Aa}	30.1 \pm 2.89 ^{Aa}	19.5 \pm 3.20 ^{Aa}
		SS	23.1 \pm 2.79 ^{Aab}	20.6 \pm 2.07 ^{Aa}	22.7 \pm 2.23 ^{Aa}	19.4 \pm 1.82 ^{Aa}
	2014	C	14.8 \pm 0.97 ^{Aa}	14.4 \pm 1.25 ^{Aa}	27.3 \pm 2.74 ^{Ba}	16.9 \pm 1.74 ^{Aa}
		SS	16.4 \pm 1.27 ^{ABab}	18.7 \pm 2.42 ^{ABa}	24.2 \pm 2.04 ^{Ba}	15.1 \pm 1.04 ^{Aa}
Zn (mg kg ⁻¹)	2012	C	506 \pm 66.2 ^{BCb}	343 \pm 38.9 ^{Bb}	207 \pm 23.5 ^{ABb}	158 \pm 21.5 ^{Aa}
		SS	457 \pm 42.5 ^{Bb}	306 \pm 24.4 ^{ABb}	176 \pm 14 ^{Ab}	174 \pm 15.7 ^{Aa}
	2014	C	251 \pm 24 ^{Bab}	187 \pm 16 ^{ABa}	115 \pm 7.81 ^{Aa}	120 \pm 14.3 ^{Aa}
		SS	224 \pm 16.4 ^{Ba}	181 \pm 22.7 ^{ABa}	109 \pm 6.79 ^{Aa}	136 \pm 25.7 ^{Aa}

Differences between clones and treatments were evaluated by Kruskal–Wallis tests. Clones with the same capital letter for each treatment in each harvest year were not significantly different. In each clone during both harvest years together, treatments with the same lowercase letter were not significantly different

order was in accordance with biomass yield. Removal of Pb per plant in the SS treatment was similar to that in the C treatment, and clone S1 removed a higher amount of Pb than clone P2 (Table 3).

In 2014, all the investigated clones removed significantly more RE than in 2012. The only exception was in the case of clone P2 in the C treatment, with a lower amount of removed

RE than in 2012. Among the elements, the highest removal was reported for Zn. In 2014, *Salix* clones, in comparison to *Populus* clones, removed higher amounts of Zn and Cd per plant in both treatments. The most apparent differences were observed especially for clone S1 in the C and clone S2 in the SS treatments. In the C treatment, Pb was removed predominantly by clone P1 and in the SS treatment by clone S2 (Table 3).

Table 3 Mean (\pm SE) amount of Cd, Pb and Zn in shoots of individual plants grown in control (C) and in sewage sludge (SS) treatments

Removal	Time	Treatment	Clones			
			S1	S2	P1	P2
Cd (mg plant ⁻¹)	2012	C	2.06 \pm 0.45 ^{Aa}	5.76 \pm 0.98 ^{Ba}	4.26 \pm 1.17 ^{ABab}	2.43 \pm 0.79 ^{Aa}
		SS	4.24 \pm 1.01 ^{Bab}	3.5 \pm 0.54 ^{Ba}	1.66 \pm 0.1 ^{ABa}	1.27 \pm 0.22 ^{Aa}
	2014	C	12.2 \pm 6.2 ^{Bb}	11.4 \pm 3.09 ^{Ba}	6.13 \pm 1.33 ^{Bb}	1 \pm 0.23 ^{Aa}
		SS	11.4 \pm 3.13 ^{Bb}	12.8 \pm 3.51 ^{Ba}	3.51 \pm 0.69 ^{ABab}	2.08 \pm 0.41 ^{Aa}
Pb (mg plant ⁻¹)	2012	C	1 \pm 0.18 ^{Aa}	3.12 \pm 0.38 ^{Bab}	5.44 \pm 1.18 ^{Bab}	1.9 \pm 0.57 ^{ABa}
		SS	2.11 \pm 0.47 ^{Aab}	2.15 \pm 0.36 ^{Aa}	2.21 \pm 0.3 ^{Aa}	1.01 \pm 0.20 ^{Aa}
	2014	C	6.30 \pm 2.98 ^{ABb}	6.88 \pm 1.8 ^{ABab}	16.1 \pm 4.39 ^{Bb}	1.27 \pm 0.42 ^{Aa}
		SS	7.77 \pm 1.79 ^{ABb}	11.3 \pm 2.71 ^{Bb}	11.0 \pm 2.35 ^{Bb}	2.24 \pm 0.27 ^{Aa}
Zn (mg plant ⁻¹)	2012	C	18.1 \pm 3.5 ^{Aa}	45.4 \pm 6.21 ^{Ba}	38.4 \pm 9.48 ^{ABab}	16.9 \pm 6.11 ^{Aa}
		SS	36.4 \pm 7.53 ^{Bab}	35 \pm 6.67 ^{Ba}	17.2 \pm 1.6 ^{ABa}	9.75 \pm 2.49 ^{Aa}
	2014	C	125 \pm 69.4 ^{Bb}	90.3 \pm 24.1 ^{Ba}	65.4 \pm 15.9 ^{Bb}	8.51 \pm 2.08 ^{Aa}
		SS	112 \pm 32.1 ^{Bb}	119 \pm 35.8 ^{Ba}	52.6 \pm 13.6 ^{ABb}	21.2 \pm 5.61 ^{Aa}

Differences between clones and treatments were evaluated by Kruskal–Wallis tests. Clones with the same capital letter for each treatment in each harvest year were not significantly different. In each clone during both harvest years together, treatments with the same lowercase letter were not significantly different. Abbreviations of clones and treatments are given in Table 1

Table 4 Mean (\pm SE) dry matter yield and amount of Cd, Pb and Zn removed by harvested shoot biomass of plants grown in control (C) and in sewage sludge (SS) treatments (30,769 plants ha^{-1} minus mortality)

Variable	Time	Treatment	Clones			
			S1	S2	P1	P2
Dry biomass (t ha^{-1})	2012	C	0.67 \pm 0.18 ^{Aa}	3.26 \pm 0.57 ^{Ba}	5.14 \pm 1.08 ^{Bab}	2.58 \pm 0.91 ^{ABa}
		SS	1.93 \pm 0.62 ^{Aab}	2.61 \pm 0.74 ^{Aa}	1.68 \pm 0.53 ^{Aa}	1.06 \pm 0.45 ^{Aa}
	2014	C	6.28 \pm 2.86 ^{ABb}	11.7 \pm 3.10 ^{Ba}	14.1 \pm 2.82 ^{Bb}	1.70 \pm 0.46 ^{Aa}
		SS	9.99 \pm 3.19 ^{Ab}	15.1 \pm 4.94 ^{Aa}	8.64 \pm 3.70 ^{Aab}	2.43 \pm 0.67 ^{Aa}
Cd (g ha^{-1})	2012	C	32.6 \pm 9.58 ^{Aa}	133 \pm 20.5 ^{Ba}	108 \pm 24.8 ^{ABb}	62.8 \pm 24.7 ^{ABa}
		SS	76.2 \pm 18.4 ^{Aab}	74.2 \pm 17.6 ^{Aa}	25 \pm 6.2 ^{Aa}	23.4 \pm 8.9 ^{Aa}
	2014	C	186 \pm 96.7 ^{ABab}	268 \pm 70.6 ^{Ba}	158 \pm 34 ^{ABb}	23.6 \pm 6.16 ^{Aa}
		SS	215 \pm 65.2 ^{Bb}	265 \pm 88.9 ^{Ba}	58.5 \pm 22.7 ^{ABab}	31.5 \pm 9.21 ^{Aa}
Pb (g ha^{-1})	2012	C	15.5 \pm 3.94 ^{Aa}	72.8 \pm 8.36 ^{Bab}	141 \pm 28 ^{Bab}	48.7 \pm 17.3 ^{ABa}
		SS	37.8 \pm 8.64 ^{Aab}	45.5 \pm 11.4 ^{Aa}	32.4 \pm 9.08 ^{Aa}	19.1 \pm 7.55 ^{Aa}
	2014	C	95.2 \pm 46.6 ^{ABab}	163 \pm 41 ^{ABab}	429 \pm 128 ^{Bb}	30.7 \pm 11.7 ^{Aa}
		SS	146 \pm 44.7 ^{ABb}	235 \pm 69.3 ^{Bb}	186 \pm 74.7 ^{ABab}	35.2 \pm 9.79 ^{Aa}
Zn (g ha^{-1})	2012	C	288 \pm 76.7 ^{Aa}	1090 \pm 185 ^{Ba}	984 \pm 208 ^{Bab}	441 \pm 191 ^{ABa}
		SS	675 \pm 164 ^{Aab}	769 \pm 210 ^{Aa}	262 \pm 69.9 ^{Aa}	197 \pm 88.1 ^{Aa}
	2014	C	1930 \pm 1080 ^{ABab}	2160 \pm 585 ^{Ba}	1720 \pm 453 ^{Bb}	204 \pm 58.4 ^{Aa}
		SS	2140 \pm 697 ^{ABb}	2540 \pm 938 ^{Ba}	943 \pm 420 ^{ABab}	341 \pm 119 ^{Aa}

Differences between clones and treatments were evaluated by Kruskal–Wallis tests. Clones with the same capital letter for each treatment in each harvest year were not significantly different. In each clone during both harvest years together, treatments with the same lowercase letter were not significantly different. Abbreviations of clones and treatments are given in Table 1

In 2012, removal of RE per hectare in the C treatment displayed a similar pattern as removal of RE per plant. In 2012, in the SS treatment, removal of Cd per hectare displayed a similar pattern as removal of Cd per plant, but the order of clones according to removed Zn and Pb per hectare was different: S2 > S1 > P1 > P2 (Table 4).

In 2014, the S2 clone in the C treatment removed higher amounts of Cd and Zn per hectare than did the S1 clone. Removal of Pb per hectare in the C treatment and removal of Cd, Pb and Zn per hectare in the SS treatment reflected the removal of these elements per plant (Table 4).

Results of Principal Component Analysis

The first axis of the PCA of RE concentrations and DM biomass yield explained 59 % of the data variability, and the first two axes together explained 80 % (Fig. 1). The length and direction of the vectors indicate the strength of the vector effect and correlation between vectors respectively. A long vector for a particular variable indicates that it highly affected the results of the analysis, while the opposite is the case for a short vector. For example, DM yield of biomass was clearly negatively related to concentrations of all RE, as their vectors were directed into opposite parts of the diagram. The concentration of Zn in plant biomass was positively correlated with the concentration of Cd, as indicated by the angle smaller than 90° between vectors for Zn and Cd.

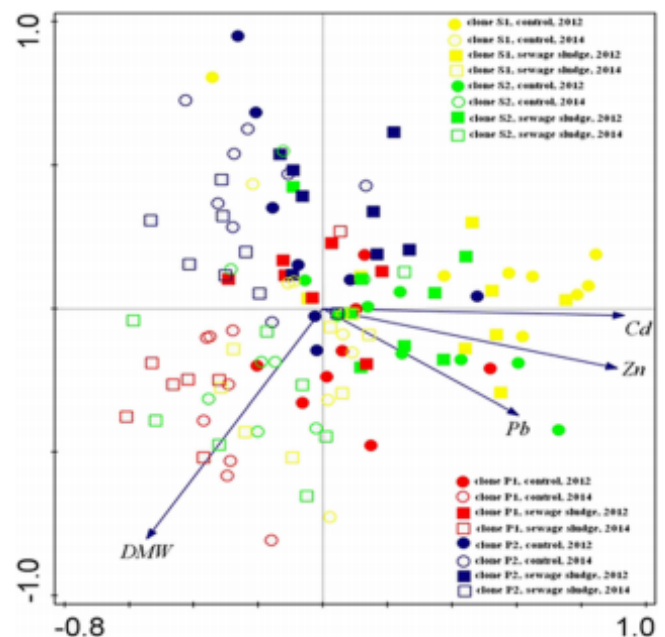


Fig. 1 Ordination diagram showing results of principal component analysis of dry matter yield of shoots per plant (DMW) and concentrations of Cd, Pb and Zn in shoots of plants grown in control and sewage sludge treatments in harvest years 2012 and 2014 (based on data provided in Table 2). Clone abbreviations: S1—(*Salix schwerinii* \times *S. viminalis*) \times *S. viminalis*, S2—*S. smithiana*, P1—*Populus maximowiczii* \times *P. nigra*, P2—*P. nigra*

Markers for the SS treatment in 2014 (empty squares) and markers for the C treatment in 2014 (empty circles) were located on the right side of the diagram, while markers for the SS treatment in 2012 (filled squares) and markers for the C treatment in 2012 (filled circles) were located on the left side of the diagram. This indicates higher biomass yields and lower concentrations of RE in 2014 compared to 2012.

Salix clones, especially S1, were characterised by higher concentrations of Cd and Zn compared to *Populus* clones.

Remediation Factors

The ability of plants to remove relative portions of metals showed significant differences between individual harvests for Cd and Zn (Table 5). In both cases, RF increased several times in the second harvest compared to the first one. Willows showed better removal of Cd and Zn, reaching up to 0.94 % for Cd and 0.34 % for Zn in the S2 clone. RF of poplars was lower. The RF for Pb was negligible for all tested clones, reaching less than 0.01 %.

Discussion

Biomass Yield and Mortality

The estimated yields of clones in our experiment in the C treatment ranged from 0.7 (S1) to 5.1 (P1) t DM ha⁻¹ in the first harvest (2012), provided 4 years after the establishment of the experiment. P1 and S2 clones were the most productive ones with the lowest mortality. These clones also were listed among the most productive clones in the Czech Republic by Weger [30] and Weger and Bubeník [31]. The estimated yields of clones treated with SS provided 4 years after the establishment of the experiment were lower, ranging from 1.6 (P2) to 2.6 (S2) t DM ha⁻¹ in the first harvest (2012). The yield suppression was probably caused by higher incidence of weeds in the experimental units with the application of SS. There especially was *Rumex obtusifolius*, which is a highly problematic and widely spread weed [39]. It is well established that the occurrence of weeds can reduce the yield of fast-growing trees during the establishment year, but weeds can also have severe effects on yield in subsequent years [40, 41]. The application of SS increased yield of biomass only for the S1 clone, where the yield in the C treatment was the lowest among clones. Also, Sevel et al. [25] cited that the S1 clone positively responded to application of N fertilisers, including SS.

According to Havlíčková et al. [23], the biomass yield of the first harvest represented approximately only 30 % of the biomass yield from the following harvests. This corresponds well with our results, because the yields of the biomass harvested in 2014 were generally substantially higher than those in the first harvest in 2012. In the second harvest (2014), yield

Table 5 Remediation factor (RF, %) indicates the proportion of elements (Cd, Pb and Zn) removed by harvested biomass (S1, S2, P1 and P2 clones grown in control (C) and in sewage sludge (SS) treatments) from the total contents of elements in the arable layer (upper 25 cm of the soil)

RF	Time	Treatment	Clones			
			S1	S2	P1	P2
Cd %	2012	C	0.11 ^{Aa}	0.46 ^{Ba}	0.38 ^{ABb}	0.22 ^{ABa}
		SS	0.27 ^{Aab}	0.26 ^{Aa}	0.09 ^{Aa}	0.08 ^{Aa}
	2014	C	0.65 ^{ABab}	0.94 ^{Ba}	0.55 ^{ABb}	0.08 ^{Aa}
		SS	0.75 ^{Bb}	0.93 ^{Ba}	0.20 ^{ABab}	0.11 ^{Aa}
Pb %	2012	C	0.0004 ^{Aa}	0.002 ^{Bab}	0.003 ^{Bab}	0.001 ^{ABa}
		SS	0.0009 ^{Aab}	0.001 ^{Aa}	0.0008 ^{Aa}	0.0005 ^{Aa}
	2014	C	0.002 ^{ABab}	0.004 ^{ABab}	0.01 ^{Bb}	0.0007 ^{Aa}
		SS	0.004 ^{ABb}	0.006 ^{Bb}	0.004 ^{ABab}	0.0008 ^{Aa}
Zn %	2012	C	0.04 ^{Aa}	0.14 ^{Ba}	0.13 ^{Bab}	0.06 ^{ABa}
		SS	0.09 ^{Aab}	0.1 ^{Aa}	0.03 ^{Aa}	0.03 ^{Aa}
	2014	C	0.26 ^{ABab}	0.29 ^{Ba}	0.23 ^{Bb}	0.03 ^{Aa}
		SS	0.28 ^{ABb}	0.34 ^{Ba}	0.13 ^{ABab}	0.05 ^{Aa}

Differences between clones and treatments were evaluated by Kruskal–Wallis tests. Clones with the same capital letter for each treatment in each harvest year were not significantly different. In each clone during both harvest years together, treatments with the same lowercase letter were not significantly different. Abbreviations of clones and treatments are given in Table 1

in the C treatment ranged from 1.7 (P2) to 14.13 (P1) t DM ha⁻¹, and yield in the SS treatment ranged from 2.43 (P2) to 15.14 (S2) t DM ha⁻¹. High increases in yield of biomass were recorded especially for *Salix* clones (S1 and S2) in the SS treatment. Only the P2 clone in the C treatment had lower biomass yield in 2014 than in 2012. Opposite findings were presented by Laureysens et al. [33], where clone P2 achieved in the first rotation 8 t DM ha⁻¹ year⁻¹ and in the second rotation 9 t DM ha⁻¹ year⁻¹ on a former waste disposal site moderately polluted by RE. Similarly, Al Afas et al. [42] characterised the P2 clone by high biomass production throughout the three rotations. These discrepancies can be explained by different conditions of the individual experiments, especially by lower levels of soil pollution (only 0.8 mg Cd kg⁻¹, 52 mg Pb kg⁻¹ and 161 mg Zn kg⁻¹) compared to levels in this study. Nevertheless, for *Populus* clones, the rotations longer than 2 years seem to be more effective. Fortier et al. [43] observed the yields of the hybrid *P. maximowiczii* × *P. nigra* clone NM6 (the same parentage as P1 used in our study) reaching up to 12 t DM ha⁻¹ year⁻¹ in a 6-year rotation in unpolluted soil. Also, Weger [30] found a similar yield (11.7 t DM ha⁻¹ year⁻¹) of the P1 clone harvested after 6 years in one rotation. However, in two rotations provided every 3 years, a biomass yield of only 9.2 t DM ha⁻¹ year⁻¹ was found, and when the P1 clone was harvested every year in six rotations, a biomass yield of only 5.7 t

DM ha⁻¹ year⁻¹ was found. Weger [29] observed that the yields of *Salix* (including S2) and *Populus* clones in a third harvest were generally higher than in the second one, but the yields especially of some *Populus* clones (*Populus cf. deltoides* × *P. trichocarpa* P-NE44B-466; *P. trichocarpa* × *Populus koreana* P-trikor-468; *P. cf. deltoides* × *P. koreana* P-delkor-473) were conversely lower. For example, Tlustoš et al. [28] quoted yields of 2–5 t DM ha⁻¹ year⁻¹ for clone S2 (first rotation) in moderately contaminated soil, and Weger [29] stated that in the ninth year of growth (third rotation), yield of S2 clones was more than 14 t DM ha⁻¹ year⁻¹ in unpolluted soil. Sevel et al. [25] recorded yield amounts of the clone S1 ranging from 9 to 10 t DM ha⁻¹ year⁻¹ in the first rotation and from 8.7 to 11.9 t DM ha⁻¹ year⁻¹ in the second rotation, respectively, depending on the fertiliser application regime. Conversely, Pulford et al. [44], using clone Tora (similar to S1), recorded only 0.09 t ha⁻¹ yield after the first year of growth in heavily contaminated soil. Soil at our site was also poor in plant-available P, which may contribute to low yield and explain the favourable response of willow clones to SS application. Obviously, yields are highly dependent not only on the clone but also on the level of soil contamination, nutrient and water availabilities, climate conditions, weed infestation and sequence and period of rotation. All of these factors were manifested in this study.

The relatively high mortality of plants (in the C treatment from 15 % for P1 to 48 % for S1 and in the SS treatment from 41 % for S1 to 51 % for P2) resulted probably from the high density of planting (30,769 plants ha⁻¹), which caused considerable self-thinning. Typical planting densities range between 6000 and 12,000 for *Populus* clones and between 10,000 and 20,000 for *Salix* clones [23, 45]. Although Armstrong et al. [46] and Bullard et al. [47] observed that the increase in clone density results in the increase in biomass yield from the plot, this relationship is not valid at the extremely high plant density. For example, the economic optimum of planting density of *Salix* clones is 15,000 cuttings [23, 47]. *P. nigra* clones are very strong heliophiles [48] and have a high ability of tillering [42]. We have tested a high density of plants because of their mutual low competition, higher positive effect on phytoextraction, better survival of young plants under weed pressure and regular sampling of biomass within the first years of the experiment.

Risk Element Contents in Plants

Generally, the clones of *Salix*, particularly clone S1, showed higher concentrations of Zn and Cd than *Populus* clones, and, conversely, clone P1 accumulated more Pb than did other clones. This is consistent with results from pot experiments of Fischerová et al. [7] and how accumulation ability for different elements by different clones can be an inherent property.

Increased contents of present RE in SS do not result in increased contents of RE in plants. Shoots showed higher contents of RE in the C treatment than in the SS treatment in both harvests. Application of organic fertilisers can limit mobility and availability of RE to plants [21]. Garrido et al. [16] reported that the SS constitutes a good source of organic matter that contributes new sites for the sorption of metals, but Shaheen and Tsadilas [19] showed that the application of SS did not significantly change Cd and Pb sorption compared to the C. The sorption ability seemed to be mainly affected by soil pH, which was revealed by the significant correlations of Cd and Pb sorption with soil pH. The lower metal biomass content could be also explained as a relative dilution of soil metal content in the SS treatments due to application of amendments with higher pH and lower Cd and Pb contents than are present in soil. Conversely, SS contains higher amounts of Zn compared to soil, but higher Zn concentrations in clones grown in the SS treatment compared to clones of the C treatment were not found, with the only exception of the P2 low-productive clone. Zn behaviour confirmed that immobilisation properties of applied SS played a more important role than did the dilution effect of amendment. Tlustoš et al. [18] applied a significantly higher rate of SS and found increased soil mobility of Zn, especially on acid Cambisol, whereas low mobility of Pb was not increased.

The biomass Cd, Pb and Zn concentrations were mostly lower in clones harvested in 2014 compared to clones harvested in 2012. According to Tinker et al. [49], a high growth rate of the plant may cause internal 'dilution' of trace elements. Also, Hejman et al. [50] recorded that the concentrations of some micro and trace elements in plant biomass were negatively correlated with biomass production, probably due to the dilution effect.

Removal of Elements from the Soil

Our results clearly showed that efficiency of phytoextraction for RE is driven to a large extent by biomass yield, followed by the concentrations of elements in the biomass. Similar results were also presented by Laureysens et al. [51], Lonardo et al. [9] and Zárubová et al. [27]. The removal of Pb from the soil in both treatments and in both harvests exhibited similar trends and increased with higher biomass yield (except in the SS treatment in 2012 per plant and SS treatment in 2014 per hectare). Jensen et al. [8] reported annual removal of Pb (0.4 g ha⁻¹) by *S. viminalis* in field experiments in soil slightly contaminated with RE (2.5 mg Cd kg⁻¹, 400 mg Zn kg⁻¹ and 170 mg Pb kg⁻¹) after the first year, whereas the removal of Pb in our experiment ranged from 3.8 g ha⁻¹ year⁻¹ (15.46 g ha⁻¹) for the S1 clone in the C treatment in 2012 to 241 g ha⁻¹ year⁻¹ (428.69 g ha⁻¹) for the P1 clone in the C treatment in 2014, especially due to high yield of biomass of 6-year-old clones and high content of Pb in the soil.

Cd and Zn were removed more by *Salix* than by *Populus* clones, due to higher concentrations of these elements in shoots of *Salix* clones. It seems also that application of SS has a positive effect on high biomass production [25] and thus a high removal of RE for *Salix* clones. Generally, the highest mean Cd removal was done by S2 clones in all treatments, mainly due to higher biomass yield, with the exception of S1 in SS treatments in 2012, where the removal was slightly higher due to higher Cd accumulation. The highest Cd removal was done by S2 clones in C treatments in 2014 (267 g ha⁻¹; 134 g ha⁻¹ year⁻¹), and the lowest Cd removal was done by P2 clones in the SS treatment in 2012 (23.4 g ha⁻¹; 5.85 g ha⁻¹ year⁻¹). Laureysens et al. [12] recorded for the same 7-year-old P2 clone removal of 47 g Cd ha⁻¹ during 2 years. Differences can be explained again by significantly higher biomass production. However, in our experiment, P2 clones had a much higher content of Cd but simultaneously lower yield of biomass than P2 clones in experiments of Laureysens et al. [12]. In a study by Jensen et al. [8], 1-year-old *S. viminalis* achieved removal of 9.5 g Cd ha⁻¹ year⁻¹. In our experiment, all clones had higher biomass yield and also a higher content of Cd than those in the experiment of Jensen et al. [8].

Removal of Zn was also better performed by *Salix* clones than *Populus* ones in both harvests. The SS application slightly improved Zn removal (grams per hectare) due to higher yield compared to C treatments, with the exception of the S2 treatment in the first harvest due to yield depression. Conversely, application of SS to *Populus* clones had a rather negative effect on biomass production and thus on shoot RE removal from the soil. The highest Zn removal was done by S2 clones in SS treatments in 2014 (2536 g ha⁻¹; 1268 g ha⁻¹ year⁻¹), and the lowest Zn removal was done by P2 clones in SS treatments in 2012 (197 g ha⁻¹; 49 g ha⁻¹ year⁻¹). Laureysens et al. [12] recorded for same 7-year-old P2 clone removal of 2400 g Zn ha⁻¹ during 2 year. Differences between our results and results of Laureysens et al. [12] can be explained again by high biomass production similar to the case of Cd removal. The reason why P2 clones in the study by Laureysens et al. [12] removed much larger amounts of Cd and Zn than in our study could be different conditions in their field experiment, especially low levels of soil pollution, resulting in high biomass yield and thus high removal of Zn. In a study of Jensen et al. [8], removal of 345 g Zn ha⁻¹ year⁻¹ by 1-year-old *S. viminalis* was achieved. Conversely, in our experiment, all clones had higher biomass yields and also higher contents of Zn than those in the experiment of Jensen et al. [8]; therefore, in our experiment, all clones had higher removal of Zn compared to clones of their experiment.

Remediation Factors

RF calculated on the basis of total soil contents significantly differed between harvests, individual elements and plant

species; only slight differences were found between clones. The calculated Cd, Pb and Zn RF in our study were significantly lower compared to the RF determined in pot experiments with *Salix* and *Populus* clones [5, 7, 32]. Vysloužilová et al. [5] found out in their pot experiment a very high RF for *Salix* clones in moderately contaminated soil after 2 years (RF for Cd=22.3 % for clone *S. × smithiana* S-150; RF for Zn=4.3 % for clone *Salix × rubens* S-394). Also, Fischerová et al. [7] reported very high annual RF for Cd and Zn in their pot experiment with three *Salix* clones (RF for Cd=3.4–8.1 %; RF for Zn=1.2–2.2 %; RF for Pb=0.005–0.012 %) and with two *Populus* clones (RF for Cd=4.6–5 %; RF for Zn=1.6–1.8 %; RF for Pb=0.024–0.025 %). Komarek et al. [32] calculated these RF (Cd=2.22 %, Zn=0.48 % and Pb=0.02 %) for 2-year-old *P. nigra × P. maximowiczii* hybrids, which were grown in moderately RE-contaminated soil.

Nevertheless, our RF are comparable with RF from field experiments of other authors. Jensen et al. [8] found RF of 0.13 % for Cd, 0.029 % for Zn and 0.001 % for Pb, respectively, in a field study on moderately polluted soil. According to Schmidt [52], in field experiments, we can assume only 20 % RF compared to controlled pot experiments. There are several reasons for different results coming from pot and field experiments: (i) The roots of plants in pots penetrate properly only a limited volume of soil, but in the field, they can easily avoid a contaminated top soil layer; (ii) a portion of removed RE is stored in the leaves that fall down and are not harvested in the field; and (iii) concentrations of elements are almost significantly higher in the roots than in aboveground tissues, and the roots are not harvested until the plantation was terminated [53].

RF calculations in our experiment confirmed that natural phytoextraction of Pb from this contaminated soil is not a suitable remediation method. According to Komarek et al. [32], the Pb RF values are very low (≤0.001 %), due to the high total concentration of Pb in the soil, its stable binding to the oxide and organic fractions of the soil. Better results were obtained for Zn (up to 0.34 %) and especially for Cd (up to 0.94 %) by S2 clones in the second harvest. Even though these percentages are small, the removal by plants will most likely reduce the amount that can be leached, representing the most readily available fraction in the soil [8].

Conclusions

The results from the 6-year experiment showed that high biomass production was found in the second harvest (last 2 years) of the experiment either in C or SS treatments when sufficient roots were developed. The application of SS limited plant growth in the first years of the experiment but significantly increased biomass yield in willows in treatments, reaching up

to 15 t DM ha⁻¹ for S2 clones in the second harvest. The biomass yield was the major driving force for the RE amount removed by shoots. The removal was significantly higher by the second harvest for all clones and elements, with the exception of the P2 clone, in the C treatment. The *Salix* clones were characterised by higher removal of Cd and Zn compared to *Populus* clones. The S2 clone showed the best removal of Cd (up to 0.94 %) and Zn (up to 0.34 %); removal of Pb was negligible. SS can be a suitable amendment for willow plantations. Very promising phytoextraction efficiency presented in pot experiments was not confirmed in the field due to lower density of roots per volume of soil.

Acknowledgments This study was supported by National Agency of Agriculture Sciences (NAZV QJ 1210211) and Czech University of Life Sciences, Prague, from CIGA project no. 20142005.

References

- Santos FS, Magalhaes MOL, Mazur N, Amaral Sabrinho NMB (2007) Chemical amendment and phytostabilization of an industrial residue contaminated with Zn and Cd. *Sci Agric* 64:506–512
- Melo ÉEC, Nascimento CWA, Accioly AMA, Santos ACQ (2008) Phytoextraction and fractionality of heavy metals in soil after multiple application of natural chelants. *Sci Agric* 65:61–68
- Wenzel WW, Lombi E, Adriano D (1999) Biogeochemical processes in the rhizosphere: role in phytoremediation of metal-polluted soils. In: Prasad N, Hagemeyer J (eds) Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer Verlag, Heidelberg, p 401
- Pulford ID, Dickinson NM (2006) Phytoremediation technologies using trees. In: Prasad MNV, Sajwan KS, Naidu R (eds) Trace elements in the environment: biochemistry, biotechnology and bioremediation. CRC Press, Boca Raton, pp 375–395
- Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J (2003) Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal-contaminated soils. *Plant Soil Environ* 49:542–547
- Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J, Pavlíková D (2003) As, Cd, Pb and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements. *Plant Soil Environ* 49:191–196
- Fischerová Z, Tlustoš P, Száková J, Šicharová K (2006) A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ Pollut* 144:93–100
- Jensen JK, Holm PE, Nejrup J, Larsen MB, Borggaard OK (2009) The potential of willow for remediation of heavy metal-polluted calcareous urban soils. *Environ Pollut* 157:931–937
- Lonardo DS, Capuana M, Ametoli M, Gabbrilli R, Gonnelli C (2011) Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an *in-vitro* screening. *Environ Sci Pollut Res* 18:82–90
- Dos Santos Utmazian MN, Wieshammer G, Vega R, Wenzel WW (2007) Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in 20 clones of willows and poplars. *Environ Pollut* 148:155–165
- Maxted AP, Black CR, West HM, Crout NMJ, McGrath SP, Young SD (2007) Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil* 290:157–172
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, Van Gysel M, Ceulemans R (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut* 133:541–551
- Latumus F, von Arnold K, Grøn C (2007) Organic contaminants from sewage sludge applied to agricultural soils. *Environ Sci Pollut Res* 14:53–60
- Hartman M, Pohořelý M, Trnka O (2006) Chemical and fuel characteristics of anaerobically stabilized sewage sludge and its ash. *Chem List* 100:813–820 [in Czech]
- Pagliai M, Antisari LV (1993) Influence of waste organic matter on soil micro- and macrostructure. *Bioresour Technol* 43:205–213
- Garrido T, Mendoza J, Arriagada F (2012) Changes in the sorption, desorption, distribution and availability of copper, induced by application of sewage sludge on Chilean soils contaminated by mine tailings. *J Environ Sci* 24:912–918
- Shaheen SM, Tsadilas CD, Rinklebe J (2013) A review of the distribution coefficients of trace elements in soils: influence of sorption system, element characteristics and soil colloidal properties. *Adv Colloid Interface Sci* 201–202:43–56
- Tlustoš P, Balík J, Dvořák P, Száková J, Pavlíková D (2001) Zinc and lead uptake by three crops planted on different soils treated by sewage sludge. *Rostl Vyr* 47:129–134
- Shaheen SM, Tsadilas CD (2010) Influence of fly ash and sewage sludge application on cadmium and lead sorption by an acidic Alfisol. *Pedosphere* 20:436–445
- Hanč A, Tlustoš P, Száková J, Balík J (2007) The changes of cadmium and zinc mobility in sewage sludges after their treatment. *Chem List* 101:807–810 [in Czech]
- Chaney RL, Li Y-M, Angle JS, Baker AJM, Reeves RD, Brown SL, Homer FA, Malik M, Chin M (1999) Improving metal-hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Terry N, Bañuelos GS (eds) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press, Boca Raton, p 408
- McBride MB (2003) Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Environ Res* 8:5–19
- Havlíčková K, Suchý J, Weger J, Šedivá J, Táborská M, Bureš M, Hána J, Nikl M, Jirásková L, Petruchová J, Knápek J, Vašíček J, Gallo P, Stražil Z (2010) Analysis of biomass production potential in the Czech Republic. VÚKOZ v. v. i., Průhonice. [in Czech]
- Weih M, Nordh NE (2002) Characterising willows for biomass and phytoremediation: growth, nitrogen and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass Bioenergy* 23:397–413
- Sevel L, Nord-Larsen T, Ingerslev M, Jørgensen U, Raulund-Rasmussen K (2014) Fertilisation of SRC willow: I. Biomass production response. *Bioenergy Res* 7:319–328
- Kidd P, Mench M, Álvarez-López V, Bert V, Dimitriou I, Friesl-Hanl W, Herzig R, Jansen JO, Kolbas A, Müller I, Neu S, Renella G, Ruttens A, Vangronsveld J, Puschenreiter M (2015) Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *Int J Phytoremediation* 17:1005–1037
- Zárubová P, Hejman M, Vondráčková S, Mrnka L, Száková J, Tlustoš P (2015) Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements. *Environ Sci Pollut Res* 22:18801–18813
- Tlustoš P, Száková J, Vysloužilová M, Pavlíková P, Weger J, Javorská H (2007) Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead and zinc by different species of willows (*Salix* spp.) grown in contaminated soils. *Cent Eur J Biol* 2:254–258
- Weger J (2008) Yield of selected poplar and willow clones after 9 years of coppicing. *Acta Pruhoniana* 89:5–10 [in Czech]
- Weger J (2009) The evaluation of the influence of a rotation length of short-rotation coppice on production and growth characteristics

- of poplar clone Max-4 (*Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* Henry). *Acta Pruhoniciana* 92:5–11 [in Czech]
31. Weger J, Bubeník J (2011) The evaluation of yield and growth of native willows after 14 years of short-rotation coppice. *Acta Pruhoniciana* 97:39–46 [in Czech]
 32. Komárek M, Tlustoš P, Száková J, Chrástný V (2008) The use of poplar during a 2-year-induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environ Pollut* 151:27–38
 33. Laureysens I, Bogaert J, Blust R, Ceulemans R (2004) Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *For Ecol Manag* 187:295–309
 34. Casler MD, Vemmeris W, Dixon RA (2015) Replication concepts for bioenergy research experiments. *Bioenergy Res* 8:1–16
 35. Anonymous (1994) Public notice No. 13/1994 for the management of soil protection. Czech Ministry of the Environment, Prague [in Czech]
 36. Mehlich A (1984) Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Commun Soil Sci Plant Anal* 15:1409–1416
 37. Mader P, Száková J, Miholová D (1998) Classical dry ashing of biological and agricultural materials: part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analysis* 26:121–129
 38. ter Braak CJF, Smilauer P (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca
 39. Hejcman M, Vondráčková S, Müllerová V, Červená K, Száková J, Tlustoš P (2012) Effect of quick lime and superphosphate additives on emergence and survival of *Rumex obtusifolius* seedlings in acid and alkaline soils contaminated by As, Cd, Pb and Zn. *Plant Soil Environ* 58(12):561–567
 40. Clay DV, Dixon FL (1997) Effect of ground-cover vegetation on the growth of poplar and willow short-rotation coppice. *Asp Appl Biol* 49:53–60
 41. Larsen SU, Jørgensen U, Lærke PU (2014) Willow yield is highly dependent on clone and site. *Bioenergy Res* 7:1280–1292
 42. Al Afías N, Marron N, Van Dongen S, Laureysens I, Ceulemans R (2008) Dynamics of biomass production in a poplar coppice culture over three rotations (11 years). *For Ecol Manag* 255:1883–1891
 43. Fortier J, Gagnon D, Truax B, Lambert F (2010) Biomass and volume yield after 6 years in multiclone hybrid poplar riparian buffer strips. *Biomass Bioenergy* 34:1028–1040
 44. Pulford ID, Riddell-Black D, Stewart C (2002) Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *Int J Phytoremediation* 4:59–72
 45. Van de Walle I, Van Camp N, Van de Castele L, Verheyen K, Lemeur R (2007) Short-rotation forestry of birch, maple, poplar and willow in Flanders (Belgium): I. Biomass production after 4 years of tree growth. *Biomass Bioenergy* 31:267–275
 46. Armstrong A, Johns C, Tubby I (1999) Effects of spacing and cutting cycle on the yield of poplar grown as an energy crop. *Biomass Bioenergy* 17:305–314
 47. Bullard MJ, Mustill SJ, McMillan SD, Nixon PMI, Carver P, Britt CP (2002) Yield improvements through modification of planting density and harvest frequency in short-rotation coppice *Salix* spp: –I. Yield response in two morphologically diverse varieties. *Biomass Bioenergy* 22:15–25
 48. Benetka V, Pilařová P, Kozlíková K (2009) Yield potential analysis of black poplar in the course of three coppice rotations at two different plant spacings. *Acta Pruhoniciana* 92:13–17 [in Czech]
 49. Tinker PB, MacPherson A, West TS (1981) Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. *Philos Trans R Soc B* 294:41–55
 50. Hejcman M, Száková J, Schellberg J, Tlustoš P (2010) The Rengen grassland experiment: relationship between soil and biomass chemical properties, amount of elements applied and their uptake. *Plant Soil* 333:163–179
 51. Laureysens I, Blust R, De Temmerman L, Lemmens C, Ceulemans R (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ Pollut* 131:485–494
 52. Schmidt U (2003) Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation and leaching of heavy metals. *J Environ Qual* 32:1939–1954
 53. Dickinson NM, Pulford ID (2005) Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ Int* 31:609–613

4.3 Kubátová et al. (2018). Účinky letní a zimní sklizně na účinnost prvkové fytoextrakce klonů *Salix* a *Populus* vysázených na kontaminované půdě.

Název: Effects of summer and winter harvesting on element phytoextraction efficiency of *Salix* and *Populus* clones planted on contaminated soil.

Autoři: Kubátová, P., Száková, J., Břendová, K., Kroulíková-Vondráčková, S., Mercl, F., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: International Journal of Phytoremediation. 20 (5). 499-506.



Effects of summer and winter harvesting on element phytoextraction efficiency of *Salix* and *Populus* clones planted on contaminated soil

Pavla Kubátová, Jiřina Száková, Kateřina Břendová, Stanislava Kroulíková-Vondráčková, Filip Mercl & Pavel Tlustoš

To cite this article: Pavla Kubátová, Jiřina Száková, Kateřina Břendová, Stanislava Kroulíková-Vondráčková, Filip Mercl & Pavel Tlustoš (2018) Effects of summer and winter harvesting on element phytoextraction efficiency of *Salix* and *Populus* clones planted on contaminated soil, *International Journal of Phytoremediation*, 20:5, 499-506, DOI: [10.1080/15226514.2017.1393393](https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1393393)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1393393>



Published online: 02 Apr 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 5



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Effects of summer and winter harvesting on element phytoextraction efficiency of *Salix* and *Populus* clones planted on contaminated soil

Pavla Kubátová, Jiřina Száková, Kateřina Břendová, Stanislava Kroulíková-Vondráčková, Filip Mercl, and Pavel Tlustoš

Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

The clones of fast-growing trees (FGTs) were investigated for phytoextraction of soil contaminated with risk elements (REs), especially Cd, Pb, and Zn. As a main experimental factor, the potential effect of biomass harvesting time was assessed. The field experiment with two *Salix* clones (S1 – (*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*) × *S. viminalis*, S2 – *S. viminalis* × *S. smithiana*) and two *Populus* clones (P1 – *Populus maximowiczii* × *Populus nigra*, P2 – *P. nigra*) was established in April 2009. Shoots of all clones were first harvested in February 2012. After two further growing seasons, the first half of the trees was harvested in September 2013 before leaf fall (summer harvest) and the second half in February 2014 (winter harvest). Remediation factors (RFs) for all clones and all REs (except Pb for clone S1) were higher in the summer harvest. The highest annual RFs for Cd and for Zn (1.34 and 0.67%, respectively) were found for clone S2 and were significantly higher than other clones. Although no increased mortality of trees harvested in the summer was detected in the following season, the effect of summer harvesting on the phytoextraction potential of FGTs clones should be investigated in long-term studies.

KEYWORDS

Cadmium; lead; zinc; nutrients; willow; poplar



Introduction

Soil contamination with heavy metals is a major environmental issue. For this reason, the development of cost-effective decontamination technologies, such as phytoextraction, is frequently discussed (De Melo *et al.* 2008) in comparison with physical and chemical methods such as solidification/stabilization techniques, separation, oxidization reactions etc. (Mulligan *et al.* 2001). Such technologies have to meet several criteria, such as sustainable arable land management, to leave the soil structurally, chemically, and biologically undamaged; they also need to be inexpensive and provide some financial return (Maxted *et al.* 2007). The important and most limiting factor to achieve the target is the duration of phytoextraction. Phytoextraction methods implemented by clones of fast-growing trees (FGTs) from the genera *Salix* spp. and *Populus* spp. meet these conditions. In addition, FGTs provide aesthetic improvements of contaminated areas (Dickinson *et al.* 2005), reduce wind and water erosion (Hammer *et al.* 2003), positively affect the biodiversity (Laureysens *et al.* 2005), and sequester CO₂; the produced biomass can be a source of renewable energy (Hammer *et al.* 2003, Laureysens *et al.* 2005).

The efficiency of phytoextraction techniques depends, besides the location and soil type, on several characteristics of the plant, such as the ability to accumulate and translocate metals to the aerial parts, a fast growth, and a dense and extended root system (Di Lonardo *et al.* 2011). Therefore, FGTs are suitable plants for the phytoextraction of risk elements (REs),

according to (Bedell *et al.* 2009), especially on medium and slightly contaminated soils (Jensen *et al.* 2009). Phytoextraction methods are generally applied over a period of many years and their use in the field is still limited. Thus, various effects, such as whether to include leaves into harvest or not, need to be elucidated to optimise the phytoremediation potential of FGTs (Maxted *et al.* 2007, Dickinson and Pulford, 2005, Hu *et al.* 2014).

Detailed information concerning the potential effect of the FGTs harvest time on the phytoextraction effectivity is still lacking. The leaves of young trees account for the large portion of the total biomass (Bedell *et al.* 2009, Bereton *et al.* 2013), but the leaves of mature trees account for less than 25% of the total aboveground biomass (Maxted *et al.* 2007, Laureysens *et al.* 2005). The leaves accumulate a considerably higher concentration of elements than trunks and branches (Maxted *et al.* 2007, Bedell *et al.* 2009, Hu *et al.* 2014, Fischerová *et al.* 2006, Van Slycken *et al.* 2013). The removal of RE by the leaves could substantially enhance the phytoextraction potential: according to (Van Slycken *et al.* 2013), about 40% for Cd, according to (Maxted *et al.* 2007) about 22–56% for Cd, and about 35–77% for Zn and, according to (Dickinson and Pulford, 2005), about 20–40% for Cd. On the other hand, harvesting of FTG clones before the end of the growing season can adversely affect tree wintering and their biomass yield in the following years.

CONTACT Pavel Tlustoš  tlustos@af.czu.cz  Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchbát, Czech Republic.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/bjip.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

The investigated FGT clones can be characterised as follows:

- i) Clone *Salix schwerinii* × *Salix viminalis* × *S. viminalis*, called Tordis or SW 960299, presented quite high yields. In the first harvest after three years of growth on five different sites, this clone achieved biomass yields between 5.2 and 10.2 t ha⁻¹ year⁻¹ (Larsen *et al.* 2014), and (Sevel *et al.* 2014) recorded in the second harvest yields of clone Tordis, between 8.7 and 11.9 t ha⁻¹ year⁻¹, and (Larsen *et al.* 2016) reported similar results in their study. The ability of clone Tordis to accumulate REs (Cd, Pb and Zn) was tested in field experiments in a study of (Zárubová *et al.* 2015).
- ii) Clone *Salix* × *smithiana*, S-218, is a spontaneous hybrid of *Salix viminalis* and *Salix caprea* and is among the clones with high biomass yields, exceeding 14 t ha⁻¹ year⁻¹ (Weger, 2008). The ability of this clone to accumulate RE has been tested in many pot experiments (Vysloužilová *et al.* 2003, Tlustoš *et al.* 2007) and under field conditions (Kacálková *et al.* 2015, Kubátová *et al.* 2016).
- iii) Clone *Populus nigra* × *Populus maximowiczii*, J105 or MAX 4 (NM4), is one of the most commonly grown clones with the highest productivity, used in short rotation coppice plantations in the Czech Republic (Weger, 2009). The yield of this clone ranges between 6 and 18 t ha⁻¹ year⁻¹ (Weger, 2009, Mrnka *et al.* 2011), but (Nielsen *et al.* 2014) estimated its biomass yield after 13 years of only 5.1 t ha⁻¹ year⁻¹.
- iv) In a study by (Laureysens *et al.* 2004), clone *Populus nigra*, called Wolterson, obtained yields of 8.2 t ha⁻¹ year⁻¹. The yield of clone Wolterson was tested in other studies, *eg.* (Nielsen *et al.* 2014, Verlinden *et al.* 2013, Verlinden *et al.* 2015). The phytoextraction potential of clone Wolterson was investigated in several trials (Laureysens *et al.* 2005, Laureysens *et al.* 2004).

The objective of our phytoextraction study was to evaluate the advantages and disadvantages of summer (branches and leaves) and winter (branches) harvests of four FGT clones planted in the field conditions on a medium contaminated site and to identify the optimum FTG clone for this purpose. Regarding the long-term sustainability of the phytoextraction, the survival of the trees in the following season was assessed, as well.

Material and methods

Study site and field experiment design

The field experiment was established in April 2009 on multi-RE (mostly Cd, Pb and Zn)-contaminated agricultural soil (49°42'24"N, 13°58'32"E), near the town of Přebíram, 58 km south of Prague. The area is characterized as agricultural soil covered by permanent grassland before the experiment with the long history of mining and smelting of lead ore and was contaminated mainly by the atmospheric emissions from the nearby smelter (Mrnka *et al.* 2011). The altitude of the study site is 500 m above sea level, with a mean annual precipitation of 700 mm and a mean annual temperature of 6.5°C. On this experimental area, there were 16 rows established, each one

contained one clone and each row was equally split into two experimental units. The first units of rows were harvested in September 2013 and the second units of rows in February 2014 as the second harvest after the first one in February 2012, when the whole site was cut uniformly. Each row was 5 × 1.3 m (one experimental unit 2.5 × 1.3), with an intra-row distance among plants of 0.25 m. The rows were arranged in a split-plot randomisation. Whole plots were arranged in a completely randomised design with four replications. Each plot contained four sub-plots, corresponding to two *Salix* and two *Populus* clones. In each half of each row, two plants were sampled (two observed units) = eight samples for each clone and for each harvest.

Two promising *Salix* clones, allochthonous ((*Salix schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*) hybrid Tordis, and autochthonous *S.* × *smithiana* clone S-218 (hereafter denoted S1 and S2, respectively), were selected. Among *Populus* clones, we selected the most widely planted hybrid clone in the Czech Republic, *Populus maximowiczii* × *P. nigra* J-105, also known as Max-4, as well as the *P. nigra* clone Wolterson (hereafter denoted P1 and P2, respectively). These clones were grown in contaminated soil (especially Cd, Pb, and Zn) without any treatment.

The soil type was a weakly acidic modal Cambisol, with a cation exchange capacity of 166 mmol_{H+} kg⁻¹, C_{org} of 4.1%, C/N ratio of 9. Mean soil pH_{H2O} was 5.66 and pH_{KCl} 5.27. Pseudo-total (*Aqua regia*-soluble) mean (± SE) concentrations of elements in the soil were as follows: 7.3 ± 0.22 mg Cd kg⁻¹, 218 ± 5.9 mg Zn kg⁻¹ and 1368 ± 33 mg Pb kg⁻¹ (*n* = 50). Plant-available concentrations of Cd, Pb and Zn in the top soil horizon were 4.92, 705, and 37 mg kg⁻¹, respectively, and the concentrations of P, K, Ca, and Mg nutrients in the top horizon were 14, 84, 4441, and 324 mg kg⁻¹, respectively. For determination of the plant-available element proportions, the Mehlich III extraction procedure was used (Mehlich, 1984).

Plant biomass harvesting

Shoots of cuttings with leaves were harvested in September 2013 (summer harvest) and shoots of cuttings without leaves in February 2014 (winter harvest) after two growing seasons. Eight plants were sampled from each clone in the summer as well as in the winter harvest. The shoots were cut 20 cm above the soil surface. Harvested shoots were weighed as whole plants, leaves were removed at summer harvests, weighed again for fresh matter, dried at 60°C, and weighed as dry matter. To investigate the influence of summer harvest on biomass yield, FGT clones were again harvested after two years in September 2015 (branches and leaves) and in February 2016 (branches). Mortality of clones after each harvest was monitored. The dry matter yield per hectare was estimated as follows: The dry matter weight of plant was multiplied by number of plants per hectare corresponding with real density of plants at the individual replication.

Analytical methods

Dry biomass samples were ground using a stainless steel Retsch friction mill (Retsch, Haan, Germany; particle size 0–1 mm). The total concentrations of elements (P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe,

Mn, Pb, and Zn) in the biomass of leaves and branches were determined using inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy (ICP-OES; Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA), where dry ashing procedures (Mader *et al.* 1998) were applied for sample decomposition. Aliquots of the certified reference material (CRM) RM NCS DC 73349, Bush branches, and leaves (Analytika, Prague, Czech Republic), were determined under the same conditions for quality assurance of the analytical method. The certified values of the CRM were following: $0.38 \pm 0.08 \text{ mg kg}^{-1}$ for Cd; $47 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$ for Pb, and $55 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$ for Zn. Determined values of this CRM were 0.45, 44.6, and 53.7 mg kg^{-1} for Cd, Pb, and Zn, respectively. The concentration of N in the plant samples was determined by the Kjeldahl method, using a Vapodest 50s (Gerhardt, Königswinter, Germany) after wet-digestion with concentrated H_2SO_4 (98%) and a Se catalyst.

Remediation factor (RF)

The phytoextraction potential of the examined clones was expressed as relative RF (%) t, which indicates the proportion of elements removed via harvested biomass from the total contents of elements at the site. The RF was calculated as follows (De Melo *et al.* 2008):

$$\text{RF (\%)} = \frac{C_{\text{plant}} \text{ DM}_{\text{plant}}}{C_{\text{soil}} W_{\text{soil}}} 100, \quad (1)$$

where C_{plant} is the concentration of an RE in the plant dry biomass (g t^{-1}), DM_{plant} is the dry matter plant biomass yield (t), C_{soil} is the total concentration of the RE in soil (g t^{-1}), and W_{soil} is the amount of soil in the top horizon thickness of 26 cm and soil bulk density of 1.35 t m^{-3} (t ha^{-1}), modified according to (Komárek *et al.* 2008).

Data analysis

All statistical analyses were performed using the software packages Statistica 10.0 (www.statsoft.com) and CANOCO 5 (ter Braak and Smilauer, 2002). All data were checked for homogeneity of variance and normality (Levene and Shapiro-Wilk tests). Collected data did not meet assumptions for the use of analysis of variance (ANOVA) and were thus evaluated by the nonparametric Kruskal-Wallis test. Principal components analysis (PCA), using the CANOCO 5 program, was applied to all collected data (concentrations of elements in plants as well as biomass yield). We used standardised "species data" because the data of different character and units were analysed together. The PCA was used to make visible correlations between all analysed data and similarities of different clones. The results were visualised in the form of a bi-plot ordination diagram using the CanoDraw program 5.

Results and discussion

Biomass yield and mortality of FGTs

The determination of the ability to accumulate and tolerate RE and to produce sufficient amounts of aboveground biomass are

important parameters for the phytoextraction technology (Zárubová *et al.* 2015, Komárek *et al.* 2008). For this reason, it seems that the summer harvest was more advantageous than the winter one, because the FGTs are harvested with the leaves. Branches of clones harvested in summer reached higher yields of dry matter than branches harvested in winter, with the exception of the S1 clone (Table 1). These differences were not significant in the field experiment, because of many factors influencing the biomass yield like spatially different soil nutrient status, soil moisture, competing weeds etc. (Mrnka *et al.* 2011). Also, the differences between whole plants harvested in summer (branches and leaves together) and between whole plants harvested in winter (only branches) for individual clones were not significant. Leaf dry matter yield tended to have lower levels than branches for all clones, but this difference was only significant for clone S1 (Table 1). Leaves accounted for 15 to 26% (S1 – 15%, S2 – 21%, P1 – 25%, P2 – 26%) of the harvested aboveground biomass. The influence of summer harvesting on the phytoextraction potential was examined mostly in short-term pot experiments, where FGTs had a high biomass yield of leaves in relation to the whole biomass (Bedell *et al.* 2009). In pot experiments with *Salix alba*, that leaves account for 77% of the aboveground biomass after a growth period of 70 days,

Table 1. Mean (\pm SE) dry matter and concentrations of elements (N, P, K, Mg, Cd, Pb, and Zn) in the branches and in leaves of *Salix* (S1 – *S. schwerinii* \times *S. viminalis*) \times *S. viminalis*, S2 – *S. smithiana*) and *Populus* (P1 – *P. maximowiczii* \times *P. nigra*, P2 – *P. nigra*) clones harvested in September 2013 and in February 2014. Differences between the clones and harvested organs were evaluated by Kruskal-Wallis tests. Clones with the same capital letter for each organ in each term of harvest were not significantly different. In each clone, the organs with the same lowercase letter were not significantly different. The number of replicates ($n = 8$).

Variable	Clones Organ	Harvest in September 2013		Harvest in February 2014
		Branches	Leaves	Branches
Dry biomass (g plant^{-1})	S1	$421 \pm 89.9^{\text{ABb}}$	$73.9 \pm 14.8^{\text{ABa}}$	$578 \pm 131^{\text{ABb}}$
	S2	$1050 \pm 462^{\text{Ba}}$	$282 \pm 109^{\text{Ba}}$	$844 \pm 227^{\text{Ba}}$
	P1	$621 \pm 114^{\text{Ba}}$	$207 \pm 34.8^{\text{Ba}}$	$500 \pm 160^{\text{ABa}}$
	P2	$106 \pm 25.6^{\text{Aa}}$	$37.1 \pm 7.14^{\text{Aa}}$	$109 \pm 22.8^{\text{Aa}}$
N (g kg^{-1})	S1	$3.49 \pm 0.27^{\text{Aa}}$	$25.4 \pm 0.70^{\text{ABb}}$	$5.83 \pm 0.25^{\text{Aab}}$
	S2	$4.68 \pm 0.04^{\text{Aa}}$	$25.7 \pm 0.76^{\text{Bb}}$	$6.46 \pm 0.71^{\text{Aa}}$
	P1	$4.09 \pm 0.33^{\text{Aa}}$	$18.4 \pm 1.12^{\text{Ab}}$	$6.63 \pm 0.36^{\text{Aab}}$
	P2	$4.75 \pm 0.36^{\text{Aa}}$	$20.7 \pm 1.12^{\text{ABb}}$	$6.69 \pm 0.18^{\text{Aab}}$
P (g kg^{-1})	S1	$1.08 \pm 0.05^{\text{Ba}}$	$4.13 \pm 0.10^{\text{Ab}}$	$0.95 \pm 0.03^{\text{ABa}}$
	S2	$0.94 \pm 0.03^{\text{ABa}}$	$4.04 \pm 0.15^{\text{Ab}}$	$0.86 \pm 0.06^{\text{Aa}}$
	P1	$0.85 \pm 0.05^{\text{Aa}}$	$5.27 \pm 0.35^{\text{Bb}}$	$1.22 \pm 0.09^{\text{Ca}}$
	P2	$1.00 \pm 0.05^{\text{ABa}}$	$4.84 \pm 0.26^{\text{ABb}}$	$1.15 \pm 0.04^{\text{Ba}}$
K (g kg^{-1})	S1	$2.62 \pm 0.20^{\text{Aa}}$	$9.07 \pm 0.35^{\text{Ab}}$	$2.17 \pm 0.09^{\text{Aa}}$
	S2	$2.52 \pm 0.26^{\text{Aa}}$	$11.4 \pm 1.04^{\text{ABb}}$	$1.94 \pm 0.15^{\text{Aa}}$
	P1	$3.07 \pm 0.12^{\text{ABa}}$	$10.3 \pm 0.37^{\text{ABb}}$	$2.96 \pm 0.15^{\text{ABa}}$
	P2	$4.24 \pm 0.24^{\text{Ba}}$	$13.2 \pm 0.99^{\text{Bb}}$	$4.06 \pm 0.35^{\text{Ba}}$
Mg (g kg^{-1})	S1	$0.69 \pm 0.05^{\text{Aa}}$	$4.70 \pm 0.16^{\text{Bb}}$	$0.58 \pm 0.04^{\text{Aa}}$
	S2	$0.66 \pm 0.06^{\text{Aa}}$	$3.31 \pm 0.19^{\text{Ab}}$	$0.51 \pm 0.04^{\text{Aa}}$
	P1	$0.61 \pm 0.03^{\text{Aa}}$	$4.46 \pm 0.13^{\text{ABb}}$	$0.65 \pm 0.04^{\text{ABa}}$
	P2	$0.97 \pm 0.04^{\text{Ba}}$	$5.02 \pm 0.19^{\text{Bb}}$	$0.92 \pm 0.06^{\text{Ba}}$
Cd (mg kg^{-1})	S1	$30.0 \pm 1.92^{\text{Ba}}$	$61.8 \pm 4.36^{\text{Bb}}$	$23.0 \pm 1.50^{\text{Ca}}$
	S2	$26.4 \pm 1.62^{\text{Ba}}$	$58.1 \pm 2.40^{\text{Bb}}$	$18.3 \pm 2.18^{\text{BCa}}$
	P1	$13.6 \pm 0.65^{\text{Aa}}$	$28.0 \pm 1.89^{\text{Ab}}$	$10.9 \pm 1.01^{\text{Aa}}$
	P2	$13.8 \pm 1.18^{\text{Aa}}$	$23.0 \pm 1.44^{\text{Ab}}$	$13.1 \pm 0.68^{\text{ABa}}$
Pb (mg kg^{-1})	S1	$17.4 \pm 1.72^{\text{Aa}}$	$42.0 \pm 4.62^{\text{Ab}}$	$20.5 \pm 2.64^{\text{ABa}}$
	S2	$16.2 \pm 1.06^{\text{Aa}}$	$36.3 \pm 3.07^{\text{Ab}}$	$15.1 \pm 1.00^{\text{Aa}}$
	P1	$30.6 \pm 2.05^{\text{Ba}}$	$29.4 \pm 2.14^{\text{Aa}}$	$28.5 \pm 1.69^{\text{Ba}}$
	P2	$13.4 \pm 2.43^{\text{Aa}}$	$30.3 \pm 4.08^{\text{Ab}}$	$20.0 \pm 1.49^{\text{ABa}}$
Zn (mg kg^{-1})	S1	$294 \pm 25.2^{\text{BCa}}$	$1710 \pm 115^{\text{Cb}}$	$236 \pm 17.9^{\text{Ba}}$
	S2	$227 \pm 17.9^{\text{Ba}}$	$1180 \pm 56.7^{\text{BCb}}$	$175 \pm 22.8^{\text{ABa}}$
	P1	$125 \pm 1.86^{\text{ABa}}$	$882 \pm 31.7^{\text{ABb}}$	$121 \pm 8.67^{\text{Aa}}$
	P2	$114 \pm 9.57^{\text{Aa}}$	$587 \pm 33.4^{\text{Ab}}$	$111 \pm 8.34^{\text{Aa}}$

while they only account for 60% after 209 days. In the experiment with clone ((*Salix schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*), after two months of growth, leaves accounted for 60% and after six months, for 34% of the aboveground biomass (Bereton *et al.* 2013). In long-term field trials, the leaves represent a relatively small proportion of the total harvested biomass. In the field experiment with *Salix* clones more than four years old, the leaves accounted for 17–23% of the harvested aboveground biomass (Maxted *et al.* 2007); this corresponds well with our results. And (Laureysens *et al.* 2005) reported that the leaves of seven-year-old *Populus* clones accounted for 12.7–16% of the harvested aboveground biomass, which is slightly more than in our study.

In our experiment, the leaves from the summer harvest had moisture contents from 56 to 65% (P1 = 65% > S1 = S2 = 58% > P2 = 56%), while the branches had moisture contents of 45 to 47% (S2 = 47% > S1 = P1 = 46% > P2 = 45%), similar to the winter harvest. Biomass harvested in the growing season had a higher moisture content than biomass harvested in the dormancy, about 50–55% (Mrnka *et al.* 2011). Moisture content is an important parameter for energy use efficiency. Calorific biomass value increases with decreasing moisture contents. Biomass with a moisture content of 20% had a calorific value of about 16 MJ kg⁻¹, but biomass with a content of 60% had only a value of about 6 MJ kg⁻¹ (Mrnka *et al.* 2011).

Dry biomass production of whole plants (branches and leaves combined) harvested in summer decreased in the order S2 > P1 > S1 > P2, while dry biomass production of plants (only branches) harvested in winter decreased in the order S2 > S1 > P1 > P2 (Table 1). The same trend was also found for dry biomass production per hectare, encompassing different numbers of trees per replication (Table 2). Clone S2 had the highest yields in both summer and winter harvests. In the summer harvest, it achieved a yield of 24.1 t ha⁻¹ (12 t ha⁻¹ year⁻¹), while in the winter harvest, the yield was 17 t ha⁻¹ (8.5 t ha⁻¹ year⁻¹; Table 2). According to (Weger, 2008), clone S2 belongs to the most suited *Salix* clones in terms of biomass production, with a yield over 14 t ha⁻¹ year⁻¹ and with a yield over 17 t ha⁻¹ year⁻¹ in later harvests. Reason for relatively high biomass yield in our study was high density of planting (30796 plant ha⁻¹) and biomass yield in summer harvest also includes leaves. We used such high density of planting because we predicted relatively high mortality of FGTs clones during first years after planting. Plants density after first three years was decreased for each clone differently and real densities in 2012 for clone S1, P1, S2, and P2 were 24600, 24200, 18800, and 17700 plant ha⁻¹ respectively. Common planting density is about 15000 FGTs trees (Mrnka *et al.* 2011). In the summer harvest, clone P1 had a yield of 17.7 t ha⁻¹ (8.85 t ha⁻¹ year⁻¹), while in the winter harvest, the yield was 12 t ha⁻¹ (6 t ha⁻¹ year⁻¹). Clone S1 had a yield 11.7 t ha⁻¹ (5.85 t ha⁻¹ year⁻¹) in the summer harvest and yield of 15.9 t ha⁻¹ (7.9 t ha⁻¹ year⁻¹; Table 2) in the winter harvest. Clones S1 and P1 achieved results comparable to the findings of other studies. Biomass yield of P1 clone ranged between 6 and 18 t ha⁻¹ year⁻¹ (Weger, 2009, Mrnka *et al.* 2011). For clone S1 (Sevel *et al.* 2014) recorded a biomass yield of 8.7 to 11.9 t ha⁻¹ year⁻¹. Clone P2 had the lowest yields in both summer and winter harvests. In the summer harvest, clone P2 had a yield of 2.7 t ha⁻¹

(1.35 t ha⁻¹ year⁻¹) and in the winter harvest, the yield was 1.9 t ha⁻¹ (0.95 t ha⁻¹ year⁻¹; Table 2). For clone P2, (Laureysens *et al.* 2004) reported a biomass yield of 8.2 t ha⁻¹ year⁻¹, which is roughly eight times higher than in our study. For the same clone, (Verlinden *et al.* 2013) reported a biomass yield of 1.27 t ha⁻¹ year⁻¹ after the first growing season and of 15 t ha⁻¹ = 3.75 t ha⁻¹ year⁻¹ after the fourth growing season (Verlinden *et al.* 2015). In a study by (Nielsen *et al.* 2014), the biomass yield of this clone after 13 years of cultivation was estimated to be only 1 t ha⁻¹ year⁻¹.

The mortality of clones harvested in summer was not increased for both willow and poplar clones compared to the winter harvest in the following growing season. Conversely, a slightly larger increase of mortality was for S1, S2, and P2 clones in the winter harvest than in the summer harvest.

Risk element and nutrient contents in FGTs

Clones harvested in summer accumulated higher contents of all elements in leaves than in branches, with the exception of Pb for clone P1. The concentrations of the REs Zn, Cd, and Pb were generally six, two, and two times higher, respectively, in leaves than in branches (Table 1). This trend of higher RE concentrations (especially for Cd and Zn) in leaves than in branches is in agreement with previous results obtained for other and also for identical clones of FGTs in pot experiments (Bedell *et al.* 2009, Fischerová *et al.* 2006) and field trials (Maxted *et al.* 2007, Laureysens *et al.* 2005, Hu *et al.* 2014, Van Slycken *et al.* 2013). A different pattern was observed for clone P1, which accumulated more Pb than the other clones, probably due to low yield (Table 1); the Pb content in the branches of clone P1 was comparable to that in the leaves. According to (Seregin and Kozhevnikova, 2008), Pb was mainly accumulated in the lower parts of the plants, especially the roots, where it is bound on cell walls due to its high affinity to galacturonic acid. Our previous study (Zárubová *et al.* 2015) showed low concentrations of Pb in the youngest branches, which are located on the top of the tree, confirming also the limited translocation of Pb from roots to shoots.

Leaves also contained significantly more nutrients. The concentrations of the macroelements Mg, P, N, and K were generally 6 times, 4.5 times, 4 times, and 3.5 times higher in leaves than in branches, respectively. The high biomass N content presents a disadvantage to biomass combustion. While most of the REs remain in the ash (Šyc *et al.* 2012), the high N content in the combusted biomass could increase the production of NO_x (Fournel *et al.* 2015).

Branches harvested in summer had similar concentrations of all elements compared to branches harvested in winter. Concentrations of Cd and Zn were slightly higher in the branches harvested in the summer than in the branches harvested in the winter; Pb did not show a uniform trend. The nutrients K, Mg, and P (for *Salix* clones) had higher concentrations in the branches harvested in summer; conversely, N and P (for *Populus* clones) had higher concentrations in branches harvested in winter (Table 1). The cambium of the branches and trunks of poplars contained higher K concentrations in summer than in winter, as K is highly important for the transport during the vegetation period (Wind *et al.* 2004, Fromm, 2010). Conversely,

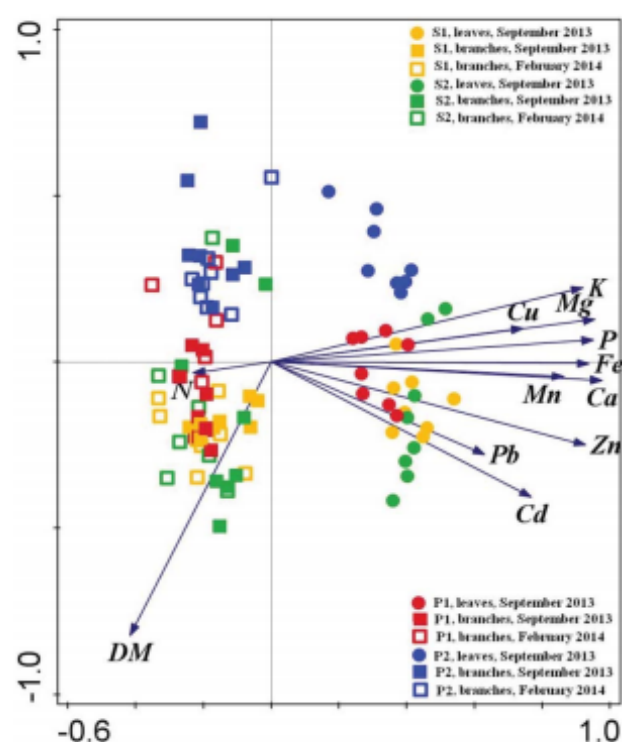


Figure 1. Ordination diagram showing the results of the PCA of dry matter yield of leaves and of branches per plant (DM) and concentrations of elements in the leaves and in the branches in summer and winter harvests (based on data provided in Table 1). Clone abbreviations: S1- (*Salix schwerinii* × *S. viminalis*)? *S. viminalis*, S2 – *S. smithiana*, P1 – *Populus maximowiczii* × *P. nigra*, P2 – *P. nigra*.

majority of the investigated elements caused by higher biomass yield. The concentration of Cd in branches and leaves was positively correlated with concentrations of Pb and Zn, as indicated by the sharp angles among the vectors for Cd, Pb, and Zn. Also, nutrients showed significant inter-correlations. Markers for leaves (circles) are more abundant on the right side of the diagram and are clearly separated from the markers for branches (squares). Leaves accumulated more elements, while branches produced more biomass. Markers for clones S1, S2, and P1 were located at the bottom part of the diagram, presenting relatively similar properties of all three clones, whereas markers for clone P2 were located at the upper part of the diagram, indicating different properties.

Remediation factor (RF)

Values for the RF expressed per year for FGTs clones harvested in summer were as follows: Cd, S1 = 0.66, S2 = 1.34, P1 = 0.55 and P2 = 0.08%; Zn, S1 = 0.37, S2 = 0.67, P1 = 0.37, and P2 = 0.04%. Values of RF for Pb in the summer harvest were extremely low, ranging from 0.001% (P2) to 0.007% (P1). Most of the RFs were higher in the summer harvest than in the winter (except Pb for clone S1). Values of RF for Cd and Zn for clone S1 in the winter harvest were only slightly lower than in the summer harvest. Values for RF for the other clones (S2, P1, and P2) in the winter harvest were about two-fold lower for Cd and Pb and even about three-fold lower for Zn than in the summer harvest. Expectably, the calculated RFs in our study were lower in comparison with the RF values in pot experiments

with *Salix* and *Populus* clones on similarly contaminated soils ((Fischerová *et al.* 2006, Komárek *et al.* 2008) (Puschenreiter *et al.* 2013)). However, a comparison with previously published field experiments showed either higher RFs (0.13% for Cd and 0.29% for Zn per year) found in a field study on slightly contaminated soil (Jensen *et al.* 2009) or values similar to those of the field experiments of our previous investigations (Zárubová *et al.* 2015, Kubátová *et al.* 2016) where the phytoextraction by younger trees was presented.

Conclusions

- 1) Summer harvest with leaves seems to be a more promising approach compared to winter one because of the higher phytoextraction efficiency. The RF values for all clones and for all REs (Cd, Pb, and Zn) were substantially higher in the summer harvest than in the winter harvest, with the exception of Pb for the clone S1. The willow clone S2, showed the best performance, annually extracted 1.34% of Cd and 0.67% of Zn from the total soil content, while phytoextraction of Pb was relatively low for all clones. The values of RFs for Cd and Zn for S2 clone are significantly higher than other clones. To assume similar REs removal in following harvests periods the amount of Cd and Zn would be removed during 70 and 67 years for Cd and Zn respectively to reach Czech legislation limits (0.5 mg kg⁻¹ for Cd and 120 mg kg⁻¹ for Zn) determined by aqua regia (Anonymous 2016). Phytoextraction was not effective for Pb. The costs of this method are associated with the establishment of FGTs plantation, cultivation, and harvesting, but can be partly compensated by biomass production as renewable energy source.
- 2) Biomass harvested at the end of the growing season had a higher moisture content and higher concentrations of N and other nutrients than biomass harvested in the dormancy period. Moisture reduced the energy value of the biomass, and the high N content in the leaves could increase the emission of NO_x during biomass combustion. In addition, the storage of the contaminated biomass with leaves is questionable.
- 3) Summer harvest removed not only a greater amount of REs, but also greater amounts of nutrients that should be, to some extent, supplied by fertilizers. In our field trial, summer harvest did not have a negative impact on clone survival, as the mortality tested in the following season was negligible for winter and summer harvests.

Funding

This study was supported by the Czech University of Life Sciences, Prague under Grant CIGA project No. 20172023 and under Grant CIGA project No. 20172016.

References

- Anonymous 2016. Public notice No. 153/2016 for the management of soil protection. Czech Ministry of the Environment, Prague [In Czech].
Bedell JP, Capilla X, Giry C, Schwartz C, Morel JL, Perrodin Y. 2009. Distribution, movement and availability of Cd and Zn in a dredged

- sediment cultivated with *Salix alba*. *Environ Exp Bot.* 67:403–414. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.08.001.
- Bereton NJB, Pitre FE, Shield I, Hanley SJ, Ray MJ, Murphy RJ, Karp A. 2013. Insights into nitrogen allocation and recycling from nitrogen elemental analysis and ¹⁵N isotope labelling in 14 genotypes of willow. *Tree Physiol.* 34:1252–1262. doi:10.1093/treephys/tp081. PMID:24186940.
- Cooke JEK, Weih M. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytol.* 167:19–30. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01451. PMID:15948826.
- De Melo ÉEC, Do Nascimento CWA, Accioly AMA, Dos Santos ACQ. 2008. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Sci Agr.* 65:61–68. doi:10.1590/s0103-9016200800100009.
- Dickinson NM, French C, Putwain P. 2005. Brownfield remediation using shortrotation coppice. Proceedings 8th International conference on the biogeochemistry of trace elements (ICOBTE) Adelaide. Australia:256–257.
- Di Leonardo S, Capuana M, Arnetoli M, Gabrielli R, Gonnelli C. 2011. Exploring the metal phyto remediation potential of three *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environ Sci Pollut R.* 18:82–90. doi:10.1007/s11356-010-0354-7.
- Dickinson NM, Pulford ID. 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ Int.* 31:609–613. doi:10.1016/j.envint.2004.10.013. PMID:15788201.
- Fromm J. 2010. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiol.* 30:1140–1147. doi:10.1093/treephys/tpq024. PMID:20439254.
- Fournel S, Palacios JH, Morissette R, Villeneuve J, Godbout S, Heitz M, Savoie P. 2015. Influence of biomass properties on technical and environmental performance of a multi-fuel boiler during on-farm combustion of energy crops. *Appl Energ.* 141:247–259. doi:10.1016/j.apenergy.2014.12.022.
- Fischerová Z, Tlustoš P, Száková J, Šichorová K. 2006. A comparison of phyto remediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ Pollut.* 144:93–100. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.005. PMID:16516363.
- Hu Y, Nan Z, Ch J, Wang N, Luo H. 2014. Phytoextraction potential of poplar (*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bunge) from calcareous agricultural soils contaminated by cadmium. *Int J Phytoremediat.* 16:482–495. doi:10.1080/15226514.2013.798616.
- Hammer D, Kayser A, Keller C. 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use Manage.* 19:187–192. doi:10.1079/SUM2002183.
- Jensen JK, Holm PE, Nejrup J, Larsen MB, Borggaard OK. 2009. The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environ Pollut.* 157:931–937. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.024. PMID:19062141.
- Kacálková L, Tlustoš P, Száková J. 2015. Phytoextraction of risk elements by willow and poplar trees. *Int J Phytoremediat.* 17:414–421. doi:10.1080/15226514.2014.910171.
- Komárek M, Tlustoš P, Száková J, Chrástný V. 2008. The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environ Pollut.* 151:27–38. doi:10.1016/j.envpol.2007.03.010. PMID:17467862.
- Kubátová P, Hejzman M, Száková J, Vondráčková S, Tlustoš P. 2016. Effects of sewage sludge application on biomass production and concentrations of Cd, Pb and Zn in shoots of *Salix* and *Populus* clones: Improvement of phyto remediation efficiency in contaminated soils. *Bioenerg Res.* 9:809–819. doi:10.1007/s12155-016-9727-1.
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, Van Gysel M, Ceulemans R. 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut.* 133:541–551. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.013. PMID:15519729.
- Larsen SU, Jørgensen U, Lærke PU. 2014. Willow yield is highly dependent on clone and site. *Bioenerg Res.* 7:1280–1292. doi:10.1007/s12155-014-9463-3.
- Laureysens I, Bogaert J, Blust R, Ceulemans R. 2004. Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecol Manag.* 187:295–309. doi:10.1016/j.foreco.2003.07.005.
- Larsen SU, Jørgensen U, Kjeldsen JB, Lærke PE. 2016. Effect of fertilisation on biomass yield, ash and element uptake in SRC willow. *Biomass Bioenerg.* 86:120–128. doi:10.1016/j.biombioe.2016.01.014.
- Laureysens I, Blust R, De Temmerman L, Lemmens C, Ceulemans R. 2004. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood, bark concentrations. *Environ Pollut.* 131:485–494. doi:10.1016/j.envpol.2004.02.009. PMID:15261412.
- Mehlich A. 1984. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Commun Soil Sci Plan.* 15:1409–1416.
- Mader P, Száková J, Miholová D. 1998. Classical dry ashing of biological and agricultural materials: Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analysis.* 26:121–129. doi:10.1051/analysis:1998121.
- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng Geol.* 60:193–207. doi:10.1016/S0013-7952(00)00101-0.
- Maxted AP, Black CR, West HM, Crout NMJ, McGrath SP, Young SD. 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil.* 290:157–172. doi:10.1007/s11104-006-9149-5.
- Mrnka L, Doubková P, Habart J, Sudová R, Tlustoš P, Vohník M, Vosátka M. 2011. Willow and poplar short rotation coppice plantations in soils contaminated by risk elements: review and handbook for growers in the Czech Republic. Institute of Botany of the ASCR, Průhonice. ISBN 978-80-86188-36-2.
- Nielsen UB, Madsen P, Hansen JK, Nord-Larsen T, Nielsen AT. 2014. Production potential of 36 poplar clones grown at medium length rotation in Denmark. *Biomass Bioenerg.* 64:99–109. doi:10.1016/j.biombioe.2014.03.030.
- Puschenreiter M, Wittstock F, Friesl-Hanl W, Wenzel WW. 2013. Predictability of the Zn and Cd phytoextraction efficiency of a *Salix smithiana* clone by DGT and conventional bioavailability assays. *Plant Soil.* 369:531–541. doi:10.1007/s11104-013-1597-0.
- Sevel L, Nord-Larsen T, Ingerslev M, Jørgensen U, Raulund-Rasmussen K. 2014. Fertilisation of SRC willow: I. Biomass production response. *Bioenerg Res.* 7:319–328. doi:10.1007/s12155-013-9371-y.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD. 2008. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, strontium. *Russ J Plant Physiol.* 55:1–22. doi:10.1134/S1021443708010019.
- Šyc M, Pohořelý M, Kameníková P, Habart J, Svoboda K, Punčochář M. 2012. Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crops. *Biomass Bioenerg.* 37:106–113. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.025.
- Tlustoš P, Száková J, Vysloužilová M, Pavlíková P, Weger J, Javorská H. 2007. Variation in the uptake arsenic, cadmium, lead, zinc by different species of willows (*Salix* spp.) grown in contaminated soils. *Cent Eur J Biol.* 2:254–428. doi:10.2478/s11535-007-0012-3.
- Ter Braak CJE, Šmilauer P. 2002. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power Ithaca.
- Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J. 2003. Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant Soil Environ.* 49:542–547.
- Van Slycken S, Witters N, Meiresonne L, Meers E, Ruttens A, Van Peteghem P, Weyens N, Tack FMG, Vangronsveld J. 2013. Field evaluation of willow under short rotation coppice for phytomanagement of metal-polluted agricultural soils. *Int J Phytoremediat.* 15:677–689. doi:10.1080/15226514.2012.723070.
- Verlinden MS, Broeckx LS, Van den Bulcke J, Van Acker J, Ceulemans R. 2013. Comparative study of biomass determinants of 12 poplar (*Populus*) genotypes in a high-density short-rotation culture. *Forest Ecol Manag.* 307:101–111. doi:10.1016/j.foreco.2013.06.062.
- Verlinden MS, Broeckx LS, Ceulemans R. 2015. First vs. second rotation of a poplar short rotation coppice: Above-ground biomass productivity

- and shoot dynamics. *Biomass Bioenerg.* 73:174–185. doi:10.1016/j.biombioe.2014.12.012.
- Weger J. 2008. Yield of selected poplar and willow clones after 9 years of coppicing. *Acta Pruhoniciana.* 89:5–10. [in Czech]
- Weger J. 2009. The evaluation of the influence of a rotation length of short-rotation coppice on production and growth characteristics of poplar clone Max-4 (*Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* Henry). *Acta Pruhoniciana.* 92:5–11. [in Czech]
- Wind C, Arend M, Fromm J. 2004. Potassium-dependent cambial growth in poplar. *Plant Biol.* 6:30–37. doi:10.1055/s-2004-815738. PMID:15095132.
- Zárubová P, Hejzman M, Vondráčková S, Mrnka L, Száková J, Tlustoň P. 2015. Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements. *Environ Sci Pollut R.* 22:18801–18813. doi:10.1007/s11356-015-5043-0.

4.4 Kubátová et al. (2018). Vliv délky obmýtí stromů na odstranění těžkých kovů z kontaminované půdy v polním experimentu.

Název: Effect of tree harvest interval on the removal of heavy metals from contaminated soil in a field experiment

Autoři: Kubátová, P., Száková, J., Břendová, K., Kroulíková-Vondráčková, S., Drešlová, M., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Plant, Soil and Environment. 64 (3). 132-137.

<https://doi.org/10.17221/755/2017-PSE>

Effect of tree harvest intervals on the removal of heavy metals from a contaminated soil in a field experiment

PAVLA KUBÁTOVÁ, JIŘINA SZÁKOVÁ, KATEŘINA BŘENDOVÁ, STANISLAVA KROULÍKOVÁ-VONDRÁČKOVÁ, MARKÉTA DREŠLOVÁ, PAVEL TLUSTOŠ*

Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague 6 – Suchbát, Czech Republic

*Corresponding author: tlustos@af.czu.cz

ABSTRACT

Kubátová P., Száková J., Břendová K., Kroulíková-Vondráčková S., Drešlová M., Tlustoš P. (2018): Effect of tree harvest intervals on the removal of heavy metals from a contaminated soil in a field experiment. *Plant Soil Environ.*, 64: 132–137.

Four clones of short rotation coppice (SRCs) were investigated for phytoextraction of soil contaminated by risk elements (REs), especially Cd, Pb and Zn. As a main experimental factor, the influence of rotation length on the removal of REs was assessed. The field experiment with two *Salix* clones (S1 – (*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*) × *S. viminalis*; S2 – *S.* × *smithiana*) and two *Populus* clones (P1 – *Populus maximowiczii* × *Populus nigra*; P2 – *P. nigra*) was established in April 2008 on moderately contaminated soil. For the first time, all clones were harvested in February 2012 (2012_{4y}) after 4 years. Subsequently each plot was equally split into halves. The first half of the SRC clones was harvested in February 2014 after 2 years (2014_{2y}) and again it was harvested in February 2016 after further 2 years (2016_{2y}). The second half was harvested in February 2016 after 4 years (2016_{4y}). The results showed that the biomass production for the second 4-year harvest period was significantly higher for all clones but the metal concentration was lower in the mentioned period. 4-year rotation seems to be more advantageous for the phytoextraction than two 2-year rotations. The highest metal removal presented by remediation factors (RFs) per 4 years for Cd (6.39%) and for Zn (2.55%) were found for S2 in the harvest 2016_{4y} treatment. Removal of Pb was the highest by P1 clone with very low RF per 4 years (0.04%). Longer rotation is also economically superior.

Keywords: willow; poplar; cadmium; lead; zinc; contamination

Phytoextraction is an environmentally friendly method, where the risk elements (REs) are removed from soil by their accumulation in plant tissues (Favas et al. 2014). Suitable plants for phytoextraction must accumulate REs in their tissues and produce large amount of biomass. The biomass production can be supported by correct selection of short rotation (SRCs) clones and habitats (Mrnka et al. 2011) or improving soil conditions by control of weeds (Larsen et al. 2014) or fertilization (Sevel et al. 2014) but also the length of rotation (Schweier et al. 2017).

In an experiment with ten *Salix* clones, most reached a maximum mean annual increment (8 to 14 t/ha/year) after a rotation period of 4–5 years, while extremely short rotations (1–2 years) were unsuitable (Willebrand et al. 1993). Conversely, Bullard et al. (2002) reported that two *Salix* clones (*S.* × *dasyclados* and *S. viminalis*) had higher annual yields after 2 years than after 3 years. Sevel et al. (2014) reported that the *Salix* clone Tordis (S1) after 2 years achieved yields of 8.7–11.9 t/ha/year; in the study of Larsen et al. (2014) after 3 years, the yields of 5.2–10.2 t/ha/year were

Supported by the Czech University of Life Sciences Prague, Project No. CIGA 20172023.

<https://doi.org/10.17221/755/2017-PSE>

achieved, as dependent on the fertilization rate. In a trial with three harvests of three-year rotations, the *Salix* clones showed better biomass yield (S2 clone – 14 t/ha/year) than the *Populus* clones; for them, the 3-year rotations were too short (Weger 2008). In the study of Weger (2009), clone P1 harvested after 6 years in one rotation yielded 11.7 t/ha/year, 9.2 t/ha/year after 3 years in two rotations and only 5.7 t/ha/year when the harvest was done annually. Schweier et al. (2017) reported the yield of P1 clone was on average 10.4% higher in a 7-year rotation than in a 3-year rotation. Nielsen et al. (2014) estimated the biomass production after 5 and 13 years for 36 *Populus* clones (include P1 and P2 clones). Generally, average biomass yield for all clones together was higher after 13 years (3.6 t/ha/year; specifically P1 = 5.1 t/ha/year; P2 = 1 t/ha/year) than after 5 years (2.3 t/ha/year; data for P1 and P2 were not shown). According to Liu et al. (2016), clones cultivated under a 3-year rotation achieved higher mean annual yields, but lower tissue concentrations of elements, including REs, than clones cultivated under 1 and 2-year rotations.

MATERIAL AND METHODS

Study site and field experiment. The field experiment was established in April 2008 on multi-RE (mostly Cd, Pb and Zn)-contaminated agricultural soil (49°42'24"N, 13°58'32"E), near the town of Přebíram, 58 km south of Prague, Czech Republic. Two previously tested *Salix* clones S1 and S2 and the two *Populus* clones P1 and P2 were grown in contaminated weakly acidic Haplic Cambisol. For planting, homogeneous 20-cm long cuttings of clones were used. Pseudo-total (*aqua regia*-soluble) mean (\pm standard error) concentrations of REs in the soil (0–20 cm) were as follows: 7.3 ± 0.22 mg Cd/kg, 218 ± 5.9 mg Zn/kg and 1370 ± 33 mg Pb/kg ($n = 50$). An exact description of this place, soil and clones was published in the study of Zárubová et al. (2015). The experimental area comprised 32 rows (experimental units), 8 plots each with 4 rows and each row containing one clone. Each row covered the area of 7.5×1.3 m, and the intra-row original planting distance among plants was 0.25 m. Whole plots were arranged in a completely randomised design with eight replications. Each whole plot contained four sub-plots = rows (experimental units). The first harvest was carried

out in February 2012 (2012_{4y}), when the whole site was cut uniformly. Then each row was equally split into two experimental units. The first units of rows were harvested twice after two years, first in February 2014 (2014_{2y}), as published in the study of Kubátová et al. (2016) and second in February 2016 (2016_{2y}). The second part of rows was harvested once after four years in February 2016 (2016_{4y}). The shoots of SRCs clones were cut 20 cm above the soil surface. Each experimental unit (half of row) was harvested and weighed for fresh matter, then subsamples (one whole plant from each unit) were collected, weighed, cutted, dried at 60°C, to determine dry matter and ground using a stainless steel Retsch friction mill (Retsch, Haan, Germany; particle size 0–1 mm). Mortality of clones after each harvest was monitored, so all living plants in each row were counted. The dry matter yield per hectare was estimated as follows: the dry matter weight of unit was multiplied by the number of units per hectare. Dry ashing procedure (Mader et al. 1998) was applied for sample decomposition. The ash was solubilized in HNO₃ (65%) and adjusted by deionised water into 20 mL flasks. The total concentrations of REs in the harvested biomass (stems and twigs without leaves) were determined using the inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy (ICP-OES; Agilent 720, Agilent Technologies Inc., Torrance, USA). Certified reference material RM NCS DC 73349 – bush branches and leaves (Analytika, Prague, Czech Republic), was analysed under the same conditions for quality assurance of the analytical method.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed using the software packages Statistica 12.0 (www.statsoft.com). All data were checked for homogeneity of variance and normality (Levene and Shapiro-Wilk tests). The collected data did not meet the assumptions for the use of analysis of variance (ANOVA) and were thus evaluated by the non-parametric Kruskal-Wallis test.

Remediation factor (RF). The phytoextraction potential of the examined clones was expressed as relative RF (%), which indicates the proportion of elements removed via the harvested biomass from the pseudototal soil contents of the elements at the site. The RF was calculated as follows (1):

$$RF (\%) = \frac{C_{\text{plant}} DM_{\text{plant}}}{C_{\text{soil}} W_{\text{soil}}} \times 100 \quad (1)$$

Where: C_{plant} – concentration of REs in the plant dry biomass (g/t); DM_{plant} – dry matter plant biomass yield (t);

<https://doi.org/10.17221/755/2017-PSE>

C_{soil} – pseudototal concentration of the REs in soil (g/t);
 W_{soil} – amount of soil (t/ha) in the top horizon (0–20 cm)
 at soil bulk density of 1.35 t/m³, modified according to
 Komárek et al. (2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass yield of SRCs. Generally, the annual biomass production per plant increased non-significantly in the order 2012_{4y} < 2014_{2y} < 2016_{2y} < 2016_{4y}, with the exception of S1 clone. The S1 clone had higher annual biomass production in harvest 2016_{2y} (884.5 g/plant = 442 g/plant/year) than in harvest 2016_{4y} (1361 g/plant = 340 g/plant/year). However, if the biomass production only after 4 years is compared, the lowest biomass production was in the first harvest in 2012_{4y} fol-

lowed by the combined harvests 2014_{2y} + 2016_{2y} and the harvest 2016_{4y} (Table 1). The same trends were also found for dry biomass production per hectare comprising different numbers of trees per plot (Figure 1a). Differences between the yield of harvest 2016_{4y} and yield of harvests 2014_{2y} + 2016_{2y} were small for clone S1, but the yield of harvest 2016_{4y} was 1.5, 2 and 4 times higher than the yield sum of harvests 2014_{2y} + 2016_{2y} for the clones S2, P1 and P2, respectively (Figure 1a). The results confirm that longer harvest periods are advantageous especially for the *Populus* clones. Weih (2004) reported suitable rotation periods of 4–6 years for *Populus* clones while for *Salix* clones suitable rotation periods can be also 3 years. The biomass yield also increased with the increasing number of rotations. According to Havlíčková et al. (2010), the biomass yield of the first harvest

Table 1. The mean (\pm standard error) dry matter and concentrations of elements (Cd, Pb and Zn) in the biomass of *Salix* (S1 – (*S. schwerinii* \times *S. viminalis*) \times *S. viminalis*; S2 – *S. smithiana*) and *Populus* (P1 – *P. maximowiczii* \times *P. nigra*; P2 – *P. nigra*) clones

Variable	Period (year)	Time	Clone			
			S1	S2	P1	P2
Dry biomass (g/plant)	4	2012	38.77 \pm 6.90 ^{Aa}	132.43 \pm 16.03 ^{Ba}	196.90 \pm 43.39 ^{Ba}	101.97 \pm 29.11 ^{ABa}
	2	2014	403.15 \pm 182.59 ^{ABab}	498.15 \pm 137.11 ^{Bab}	540.93 \pm 104.10 ^{Bab}	71.23 \pm 16.55 ^{Aa}
	2	2016	884.51 \pm 106.70 ^{ABb}	1604.55 \pm 318.62 ^{Bbc}	1126.34 \pm 159.64 ^{Bbc}	173.33 \pm 48.81 ^{Aab}
	2 + 2	total	1287.66 \pm 211.75 ^{ABb}	2102.70 \pm 296.84 ^{Bbc}	1667.27 \pm 234.50 ^{Bbc}	244.56 \pm 60.49 ^{Aab}
	4	2016	1361.23 \pm 167.29 ^{Ab}	3843.20 \pm 368.89 ^{Bc}	4171.81 \pm 539.24 ^{Bc}	792.77 \pm 226.02 ^{Ab}
Cd (mg/kg)	4	2012	54.96 \pm 6.83 ^{Bb}	44.40 \pm 7.90 ^{ABb}	23.60 \pm 2.91 ^{Ab}	25.33 \pm 3.36 ^{Ab}
	2	2014	26.73 \pm 1.99 ^{Cab}	22.35 \pm 1.51 ^{BCa}	10.96 \pm 0.68 ^{Aa}	14.39 \pm 1.63 ^{ABa}
	2	2016	25.84 \pm 1.83 ^{Ba}	29.04 \pm 2.07 ^{Bab}	15.81 \pm 1.37 ^{Aab}	13.27 \pm 0.43 ^{Aa}
	4	2016	27.47 \pm 1.28 ^{Cab}	22.19 \pm 1.71 ^{Ba}	10.65 \pm 0.77 ^{Aa}	14.55 \pm 1.00 ^{ABa}
Pb (mg/kg)	4	2012	28.83 \pm 4.02 ^{Ab}	24.53 \pm 3.57 ^{Ab}	30.09 \pm 2.89 ^{Ac}	19.48 \pm 3.20 ^{Aa}
	2	2014	14.81 \pm 0.97 ^{Aab}	14.36 \pm 1.25 ^{Aab}	27.34 \pm 2.74 ^{Bbc}	16.89 \pm 1.74 ^{Aa}
	2	2016	13.00 \pm 1.33 ^{Aa}	14.10 \pm 1.72 ^{Aa}	15.51 \pm 1.44 ^{Aa}	15.68 \pm 1.19 ^{Aa}
	4	2016	16.39 \pm 1.50 ^{Aab}	16.39 \pm 1.34 ^{Aab}	17.94 \pm 1.07 ^{Aab}	16.47 \pm 3.64 ^{Aa}
Zn (mg/kg)	4	2012	506.26 \pm 66.17 ^{Cb}	342.62 \pm 38.87 ^{BCb}	206.83 \pm 23.49 ^{ABb}	158.29 \pm 21.53 ^{Ab}
	2	2014	251.34 \pm 23.95 ^{Ba}	186.70 \pm 15.97 ^{ABa}	114.66 \pm 7.81 ^{Aa}	120.21 \pm 14.28 ^{Aab}
	2	2016	248.79 \pm 14.59 ^{BCa}	279.14 \pm 24.76 ^{Cab}	168.93 \pm 13.94 ^{ABb}	93.08 \pm 5.71 ^{Aa}
	4	2016	285.64 \pm 16.54 ^{Bab}	267.52 \pm 36.19 ^{Bab}	148.66 \pm 8.94 ^{ABab}	126.95 \pm 5.44 ^{Aab}

Differences between the clones and harvest periods were evaluated by the Kruskal-Wallis test at $P \leq 0.05$. Clones with the same capital letter for each harvest period were not significantly different. In each harvest period, clones with the same lowercase letter were not significantly different

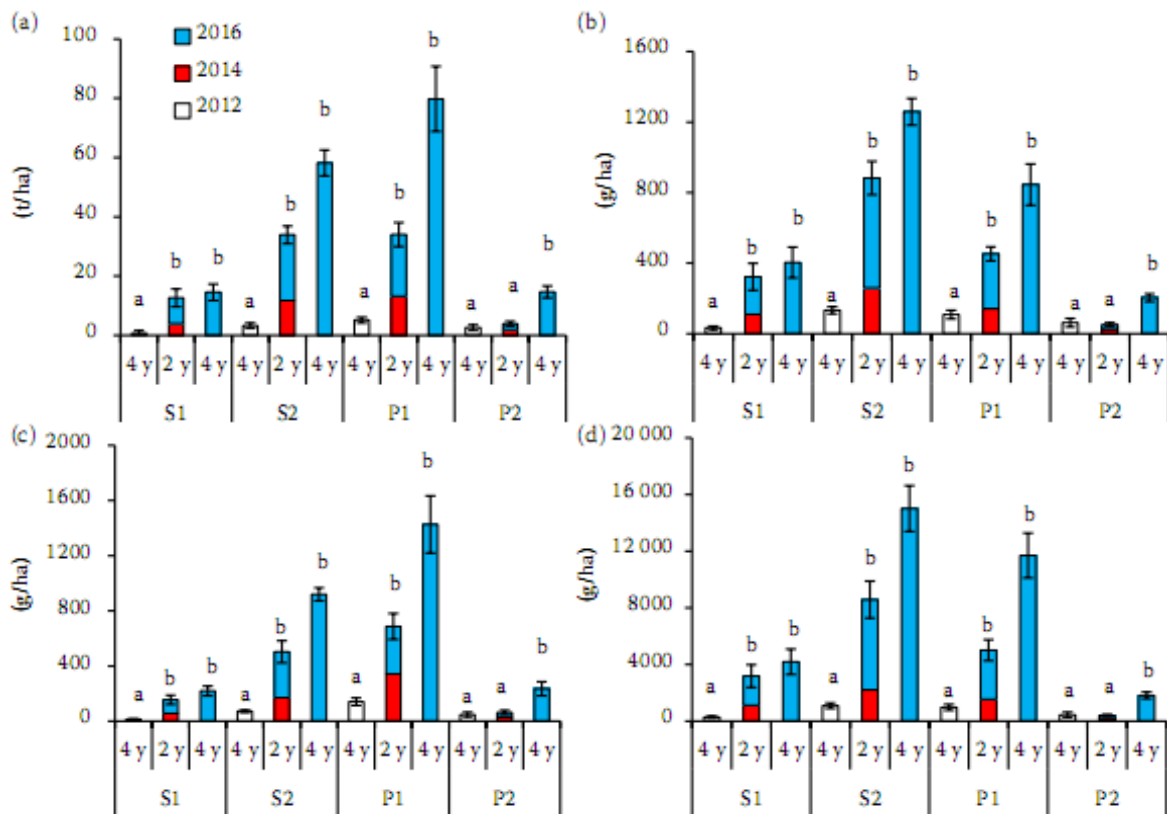


Figure 1. The mean (\pm standard error) dry matter yield (a) and the mean amount of Cd (b), Pb (c) and Zn (d) removed by the harvested biomass of *Salix* (S1 – *S. schwerinii* \times *S. viminalis*) \times *S. viminalis*; S2 – *S. smithiana*) and *Populus* (P1 – *P. maximowiczii* \times *P. nigra*; P2 – *P. nigra*) clones (30 769 plants/ha minus mortality). In each clone, periods of harvest with the same lowercase letter were not significantly different. Differences between the harvest periods were evaluated by the Kruskal-Wallis test at $P \leq 0.05$; 2 y – 2 years period; 4 y – 4 years period

represented only ~30% of the yield from the following harvests. Weger (2008) reported that biomass yield of SRC clones in the third rotation was about 20% higher than in the second one.

Clone P1 had the highest yields in all harvests, only with the exception of harvest 2016_{2y}. Yields obtained with the P1 clone ranged from 1.29 t/ha/year (5.1 t/ha) in harvest 2012_{4y} to 19.95 t/ha/year (79.8 t/ha) in harvest 2016_{4y}. Similarly, clone S2 achieved a yield as high as 14.55 t/ha/year (58.2 t/ha) in harvest 2016_{4y} (Figure 1a). Mrnka et al. (2011) reported yields ranging between 6–18 t/ha/year for P1 clone. Weger (2008) found yields of 14.63 t/ha/year for clone P1 and of 14 t/ha/year for clone S2 in the third harvest in a 3-year rotation. Above average biomass yields of both P1 and S2 clones in our study can be explained by a very high density of planting (30 769 plants/ha) at the beginning of the experiment (real densities in 2016 for clones S1, P1,

S2 and P2 were 15 100, 19 400, 23 700 and 21 800 plant/ha, respectively) as well as by suitability for climate conditions. Typical SRC planting densities for production of energy biomass range from 6000 to 12 000 plants for *Populus* clones and 10 000–20 000 for *Salix* clones (Havlíčková et al. 2010). Clone S1 had a yield from 0.17 t/ha/year (0.67 t/ha) in harvest 2012_{4y} to 4.3 t/ha/year (8.6 t/ha) in harvest 2016_{2y}. Clone P2 had a yield from 0.65 t/ha/year (2.58 t/ha) in harvest 2012_{4y} to 3.65 t/ha/year (14.6 t/ha) in harvest 2016_{4y} (Figure 1a). These S1 and P2 clones achieved lower or comparable results to the findings of other studies. Larsen et al. (2014) reported yields of 5.2–10.2 t/ha/year for clone S1 in the first rotation after 3 years; Sevel et al. (2014) in a 2-year rotation reported yields of 8.7 to 11.9 t/ha/year. In the study by Verlinder et al. (2013) biomass yield of the P2 clone was 1.27 t/ha/year after one year, and in the study by Verlinder et al.

<https://doi.org/10.17221/755/2017-PSE>

(2015) it was 3.75 t/ha/year after 4 years. Nielsen et al. (2014) reported yields of only 1 t/ha/year for clone P2 after 13 years.

Risk element concentrations in wood (twigs and stem together) of SRCs. For all clones the highest concentrations of all REs were found in the first harvest 2012_{4y}. In this harvest biomass yield was the lowest (Table 1). According to Tinker et al. (1981) a high growth rate of the plant may cause internal 'dilution' of REs. Also concentrations of REs are generally higher in the bark than in the wood and wood/bark ratio increases with the age of the shoots (Zárubová et al. 2015). Concentrations of REs in other harvests did not show any uniform trend. Generally, in all harvests *Salix* clones S1 and S2 accumulated considerably higher concentrations of Cd and Zn than *Populus* clones. *Populus* clone P1 accumulated higher (in harvest 2014 significantly, $P \leq 0.05$) concentrations of Pb than other clones (Table 1). These findings are in line with our previous research (Fischerová et al. 2006, Zárubová et al. 2015).

Removal of elements from the soil. Removal of elements per hectare and per year from the soil by shoots of all clones closely corresponded to the biomass yield per hectare. Generally, annual removal of Cd, Pb and Zn for S2, P1 and P2 clones increased non-significantly in the order 2012_{4y} < 2014_{2y} < 2016_{2y} < 2016_{4y}, with the exception of Cd and Zn for P2 clone, because the Cd and Zn removal in harvest 2012_{4y} was higher than the removal in harvests 2014_{2y} and 2016_{2y} due to low biomass production. Also, annual removal of Cd by clone S1 had a similar trend, as the lowest biomass production per hectare was found in the first harvest and increased non-significantly in the order 2012_{4y} < 2014_{2y} < 2016_{4y} < 2016_{2y}. However, annual Pb and Zn removal was slightly higher in 2016_{4y} than in 2016_{2y} (Figure 1). The comparison of harvests after only 4 years as to the removal of metals showed a very close relationship for all clones and for all REs, with the lowest amount of REs being removed in harvest 2012_{4y}, followed by the combined harvests 2014_{2y} + 2016_{2y} and harvest 2016_{4y}, with the exception of P2 clone. Removal of Cd and Zn for P2 clone was higher in the first harvest 2012_{4y} than in the combined harvests 2014_{2y} + 2016_{2y}. This finding confirms that the biomass production is very important for the phytoextraction potential proposed by Komárek et al. (2008). The P1 clone had the highest biomass

yield in all harvests, with the exception of harvest 2016_{2y}, but this clone removed only the highest amount of Pb in all harvests (Figure 1c). The S2 clone removed the highest amount of Cd and Zn in all harvests (Figure 1b, d), which is in line with the results of Zárubová et al. (2015).

Remediation factor (RF). The RFs (considering top 20 cm of the soil) after 4 years increased in the order 2012_{4y} < 2014_{2y} + 2016_{2y} < 2016_{4y} for all clones and for all REs, with the exception of RFs of Cd and Zn for clone P2 that were higher in the first harvest 2012_{4y} than in the combined harvests 2014_{2y} + 2016_{2y}. The highest RFs for Cd and for Zn in all harvest periods were found for clone S2 (RFs for Cd: 0.67% in 2012_{4y}, 4.53% in 2014_{2y} + 2016_{2y} and 6.39% in 2016_{4y}; RFs for Zn: 0.19% in 2012_{4y}, 1.46% in 2014_{2y} + 2016_{2y} and 2.55% in 2016_{4y}). The RF for Cd was 9.5 times higher in harvest 2016_{4y} than the RF in harvest 2012_{4y}; the RF for Zn was 13 times higher in harvest 2016_{4y} as compared to the RF in the harvest 2012_{4y}. The RFs for Pb were extremely low in all harvests and for all clones, ranging from 0.0004% (S1 in 2012_{4y}) to 0.04% (P1 in 2016_{4y}). The highest RFs for Cd and Zn in our study were slightly higher than in other field experiments (Jensen et al. 2009, Zárubová et al. 2015).

Rotation lasting 4 years seems to be the most promising approach as compared to two 2-year harvest rotations because of the higher biomass production, associated with higher removal of REs as well as higher RFs.

REFERENCES

- Bullard M.J., Mustill S.J., McMillan S.D., Nixon P.M.L., Carver P., Britt C.P. (2002): Yield improvements through modification of planting density and harvest frequency in short-rotation coppice *Salix* spp. – 1. Yield response in two morphologically diverse varieties. *Biomass and Bioenergy*, 22: 15–25.
- Favas P.J., Pratas J., Varun M., D'Souza R., Paul M.S. (2014): Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: Potential of native flora. In: Hernández-Soriano M.C. (ed.): *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. Rijeka, InTech, 485–517.
- Fischerová Z., Tlustoš P., Száková J., Šichorová K. (2006): A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*, 144: 93–100.
- Havlíčková K., Suchý J., Weger J., Šedivá J., Táborská M., Bureš M., Hána J., Nikl M., Jirásková L., Petrušová J., Knápek J.,

<https://doi.org/10.17221/755/2017-PSE>

- Vašíček J., Gallo P., Stražil Z. (2010): Analysis of Biomass Production Potential in the Czech Republic. Průhonice, The Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening. (In Czech)
- Jensen J.K., Holm P.E., Nejrup J., Larsen M.B., Borggaard O.K. (2009): The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environmental Pollution*, 157: 931–937.
- Komárek M., Tlustoš P., Száková J., Chrástný V. (2008): The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environmental Pollution*, 151: 27–38.
- Kubátová P., Hejzman M., Száková J., Vondráčková S., Tlustoš P. (2016): Effects of sewage sludge application on biomass production and concentrations of Cd, Pb and Zn in shoots of *Salix* and *Populus* clones: Improvement of phytoremediation efficiency in contaminated soils. *BioEnergy Research*, 9: 809–819.
- Larsen S.U., Jørgensen U., Lærke P.U. (2014): Willow yield is highly dependent on clone and site. *BioEnergy Research*, 7: 1280–1292.
- Liu N., Jørgensen U., Lærke P.E. (2016): Concentrations of chemical elements in willow biomass depend on clone, site and management in the field. *BioEnergy Research*, 9: 1216–1230.
- Máder P., Száková J., Míhlová D. (1998): Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analyst*, 26: 121–129.
- Mrnka L., Doubková P., Habart J., Sudová R., Tlustoš P., Vohník M., Vosátka M. (2011): Willow and Poplar Short Rotation Coppice Plantations in Soils Contaminated by Risk Elements: Review and Handbook for Growers in the Czech Republic. Průhonice, Institute of Botany of the Academy of Science of the Czech Republic.
- Nielsen U.B., Madsen P., Hansen J.K., Nord-Larsen T., Nielsen A.T. (2014): Production potential of 36 poplar clones grown at medium length rotation in Denmark. *Biomass and Bioenergy*, 64: 99–109.
- Schweler J., Molina-Herrera S., Chirardo A., Grote R., Díaz-Pinés E., Kreuzwieser J., Haas E., Butterbach-Bahl K., Rennenberg H., Schnitzler J.-P., Becker G. (2017): Environmental impacts of bioenergy wood production from poplar short-rotation coppice grown at a marginal agricultural site in Germany. *Global Change Biology Bioenergy*, 9: 1207–1221.
- Sevel L., Nord-Larsen T., Ingerslev M., Jørgensen U., Raulund-Rasmussen K. (2014): Fertilisation of SRC willow, I. Biomass production response. *BioEnergy Research*, 7: 319–328.
- Tinker P.B., MacPherson A., West T.S. (1981): Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, 294: 41–55.
- Verlinden M.S., Broeckx L.S., Van den Bulcke J., Van Acker J., Ceulemans R. (2013): Comparative study of biomass determinants of 12 poplar (*Populus*) genotypes in a high-density short-rotation culture. *Forest Ecology and Management*, 307: 101–111.
- Verlinden M.S., Broeckx L.S., Ceulemans R. (2015): First vs. second rotation of a poplar short rotation coppice: Above-ground biomass productivity and shoot dynamics. *Biomass and Bioenergy*, 73: 174–185.
- Weger J. (2008): Yield of selected poplar and willow clones after 9 years of coppicing. *Acta Pruhonicensia*, 89: 5–10. (In Czech)
- Weger J. (2009): The evaluation of the influence of a rotation length of short-rotation coppice on production and growth characteristics of poplar clone Max-4 (*Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* Henry). *Acta Pruhonicensia*, 92: 5–11. (In Czech)
- Welsh M. (2004): Intensive short rotation forestry in boreal climates: Present and future perspectives. *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 1369–1378.
- Willebrand E., Ledin S., Verwijst T. (1993): Willow coppice systems in short rotation forestry: Effects of plant spacing, rotation length and clonal composition on biomass production. *Biomass and Bioenergy*, 4: 323–331.
- Zárubová P., Hejzman M., Vondráčková S., Mrnka L., Száková J., Tlustoš P. (2015): Distribution of B, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 18801–18813.

Received on November 27, 2017

Accepted on March 7, 2018

Published online on March 15, 2018

4.5 Břendová et al. (2018). Vyluhování stopových prvků z kontaminované biomasy vrb a topolů – Laboratorní studie potencionálních rizik.

Název: Trace element leaching from contaminated willow and poplar biomass – A laboratory study of potential risks

Autoři: Břendová, K., Kubátová, P., Száková, J., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Biomass and Bioenergy. 112. 11–18.



Research paper

Trace element leaching from contaminated willow and poplar biomass – A laboratory study of potential risks

Kateřina Břendová, Pavla Kubátová, Jiřina Száková, Pavel Tlustoš*^a^a Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Phytoextraction
Contaminated biomass
Storage
Cadmium
Zinc
Lead
Leaching

ABSTRACT

Despite the advantages of phytoextraction, serious risks can be caused by the produced contaminated biomass. Currently, there is a lack of research on the potential risk of storing and handling this biomass. The aim of our study was to verify the losses of potential risk elements (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) via leaching of short rotation coppice biomass in laboratory batch tests. Harvested woody and leafy biomass was chipped and/or kept compact. The fresh and/or dried biomass was then leached by two types of leachate to simulate rainfalls—neutral water and/or acidified water. Chipped wood was characterised by the highest element release in comparison to whole branches. The leaves were considered more risky from the point of view of element losses. A similar trend of leaching was observed for all elements, except iron. More iron was leached from fresh wood biomass, whilst in the case of the leaves, iron was leached more from dry biomass. Lead was released by 1.4–7.2% from the biomass. Cadmium was leached by 2% from woody biomass, but up to 39% from leaves. The potential losses of these elements during storage and pre-processing should be taken into account in the development of methodologies for the storage and handling of contaminated biomass before its' processing.

1. Introduction

In situ remediation technologies such as phytoextraction, where plants remove contaminants from the environment or make pollutants less harmful, are measures for environmentally friendly restoration of contaminated soil [1]. For induced plant growth on a contaminated site, the choice of plant species is primarily based on plant properties such as their ability to accumulate risk elements into their tissues and the ability for high biomass production. Thus, fast-growing trees are suitable and can be further used for energy purposes. This sustainable process of plant cultivation for soil remediation connected with further biomass utilisation is only possible when the contaminant recovery into the environment is eliminated [2]. The potential of willow for risk element phytoextraction technologies was observed, for instance, on heavily and moderately polluted calcareous soils [3], moderately contaminated Cambisol [4], and sandy atmospherically contaminated soil [5]. Ruttens et al. [6] investigated the possibilities of growing willows and poplars under short rotation coppice (SRC) on acid, poor and sandy metal-contaminated soil to combine phytoextraction and production of biomass for energy purposes.

Despite all the advantages of phytoextraction, there is a potential for element losses between harvest and processing of the contaminated

biomass (including pre-treatment and storage) to the environment. In the scientific literature, there is a lack of essential information on how to handle and store this kind of biomass suitably before its use for energy purposes, to avoid the risk of element release back into environment. A two-phase harvest of biomass is usually provided on small plantations. Biomass is firstly cut and then left to dry to moisture of 20–30% at the edge of the plantation. After drying, the biomass is chipped. Biomass is sufficiently dried (30% moist) and has a higher energy value [7,8]. For one-phase harvest, special technology is used, e.g. a modified corn cutter providing a stern cut and immediate chipping. The drawback of this procedure is a possible problem with the storage of moist chips (up to 50%), but this material is more suitable for manipulation and transportation [7,8]. Moreover, Kofman and Spinelli [9] confirm that the storage of willow biomass from short rotation coppice is very difficult. They observed losing of large amount of storing fine chips dry matter and their heavy colonisation of micro-organisms.

Leaching tests are common tools for assessing constituent release upon contact with water and usually two types are performed: static and dynamic extraction tests. In static extraction protocols (batch tests), leaching takes place with a single volume of leachant. In dynamic extraction protocols, the leaching fluid is renewed throughout the test

* Corresponding author.

E-mail address: tlustos@af.czu.cz (P. Tlustoš).<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.02.012>Received 7 December 2016; Received in revised form 5 February 2018; Accepted 15 February 2018
0961-9534/© 2018 Published by Elsevier Ltd.

[10]. In our study, we chose the batch extraction according to ČSN EN 12457-1 (838005): Waste characterisation - Leaching - Verification of leachability of granular waste and sludge, because of absence of other suitable test according to the Czech legislative.

The leaching of various elements from element-loaded biomass is discussed in the context of potential phytomining of the elements [11]. The methods available for the recovery of the contaminated biomass processing were reviewed by Kikucha and Tanaka [12]. For biomass that has no 'ore value', the disposal in landfills or hazardous waste landfills is recommended with volume reduction by processes such as composting and anaerobic digestion [13].

There is insufficient knowledge on the storing of biomass from phytoremediation technology. Thus, two main questions considering the handling and storage of contaminated biomass were posed: i) is it more suitable to make chips of larger branches after harvesting? ii) is it more suitable to store fresh or dried biomass from the point of view of element release? The aim of our study was to provide a laboratory test to verify the potential loss of elements (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) via leaching during the storage of short rotation coppice biomass. The main target was to simulate the conditions of biomass storage and observe their influence on elemental leaching. Harvested woody and leaf biomass was chipped and/or kept compact. Different conditions of simulated storing were set, these were: i) biomass was kept fresh and/or dried, and ii) two types of leachate were chosen to simulate rainfalls—neutral water and/or acidified water.

2. Materials and methods

2.1. Plant biomass

Plant biomass originating from a phytoextraction plantation was chosen for the experiment. One clone of willow and one clone of poplar, were tested, these were: *Salix x smithiana* (S) and *Populus nigra x Populus maximowiczii* (P). The field phytoextraction experiment was established on multi-heavy metal (predominantly Cd, Pb, and Zn) contaminated soil near the village of Podlesí (49°42'24"N, 13°58'32"E) close to the town of Příbram, 58 km south of Prague, Czech Republic. This area has been described as one of the most polluted sites in the Czech Republic [14]. The soil type is a modal Cambisol, weakly acidic (pH_{H2O} is 5.66 and pH_{KCl} is 5.27) with a CEC of 166 mmol kg⁻¹. Pseudototal content (extracted by *aqua regia*) of cadmium in an arable layer is 83 mg kg⁻¹, lead 1214 mg kg⁻¹ and zinc 218 mg kg⁻¹.

2.2. Leaching experiment and analytical methods

The leaves and branches of willows (S) and poplars (P; both fast growing trees) were leached as a fresh biomass immediately after harvest and as a dry biomass. Note that after drying at 65 °C, the tested biomass was not affected by any biological transformation during storage. Both fresh and dry biomass of branches was leached as: i) 20 cm long branches, and ii) as 2 cm chips. The branches were sealed with wax at their cut ends to simulate storage of whole branches and to observe the risk elements release just through the bark. The chips were not treated, therefore, and the storage of fresh and dry wood chips was

simulated. The branches were leached in 1 L PE laboratory bottles (round, wide-mouth bottles, Kartell, Germany), the chips in 250 mL PE laboratory bottles (round, wide-mouth bottles, Kartell, Germany). Fresh and dried leaves were leached both whole and cut into small pieces. The extraction agents were: i) deionised water (pH = 7) and, ii) 0.5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ (pH = 3) simulating extremely acid rainfall. Water was boiled before the experiment, to avoid CO₂ in the agent and to keep deionised water at pH 7. The ratio was 1:2: 1 kg of dry matter equivalent was treated with 2 L of leaching. The mixtures were agitated on a reciprocating shaker for 24 h (160 rpm) and filtered (filtered paper for qualitative analyse, Macherey-Nagel, MN 615 70 g m⁻²). The temperature was kept at 25 °C during the whole process. The leaching test performed in our study did not include the control of pH. Each tested treatment was conducted in 3 replicates.

For the determination of the total element content in the wood of plants, the dry biomass samples were ground using a stainless steel mill. A dry ashing procedure [15] was applied for sample decomposition. An Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-OES, Agilent 720, Agilent Technologies Inc. USA) equipped with a two-channel peristaltic pump, a Struman-Masters spray chamber, and a V-groove pneumatic nebuliser made of inert material was applied for the determination of Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn in the plant leachates and digest. The experiment used a power of 1.2 kW, plasma flow of 15.0 L/min, auxiliary flow of 0.75 L/min and nebuliser flow of 0.9 L/min. Certified reference material, NCS DC 73348 Bush Branches and Leaves, was applied for quality assurance of the analytical data. This material was certified to contain the following: Zn: 20.6 ± 2.2 mg kg⁻¹; Cd: 0.14 ± 0.06 mg kg⁻¹ and Pb: 7.1 ± 1.1 mg kg⁻¹ was determined: Zn: 19.4 ± 2.1 mg kg⁻¹; Cd: 0.15 ± 0.08 mg kg⁻¹ and Pb: 6.9 ± 1.4 mg kg⁻¹.

2.3. Data analysis

All of the statistical analyses were performed using the Statistica 10.0 (www.statsoft.com) and CANOCO 4.5 programmes. All data were checked for homogeneity of variance and normality (Levene and Shapiro-Wilk tests). Collected data were evaluated by ANOVA. Principal Component Analysis (PCA) was applied to all collected data (concentrations of elements in the wood and bark as well as biomass yield) using the CANOCO 4.5 programme. We used standardised 'species data' because data of a different character and units were analysed together. The PCA was used to make visible correlations between all analysed data and similarities of different clones. The results were visualised in the form of a bi-plot ordination diagram using the CanoDraw programme.

3. Results

3.1. Elements concentration in plants

Total element contents in dry above-ground biomass of willows and poplars in the individual parts of plants are given in Table 1. Higher concentrations of observed elements were determined in the leaves in comparison to branches in all cases, except the content of lead in

Table 1
Total element contents in tested leaves and branches of willows (S) and poplars (P).

Plant part	Type of tree	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
		mg.kg ⁻¹					
Leaves	S	56.9 ± 0.7	5.7 ± 0.1	87.8 ± 2.3	343 ± 10.7	51.0 ± 1.4	725 ± 7.6
	P	28.1 ± 0.2	4.4 ± 0.1	114 ± 8.1	92.7 ± 3.1	46.2 ± 1.0	577 ± 7.0
Branches	S	21.5 ± 10.1	4.3 ± 0.9	15.5 ± 3.1	13.3 ± 1.2	25.2 ± 6.6	197 ± 5.1
	P	15.3 ± 0.65	3.0 ± 0.1	24.1 ± 2.2	11.1 ± 5.1	60.4 ± 9.0	132 ± 4.2

Data are means ± standard error; calculated from three replicates.

Table 2
Element concentrations in leachates of biomass as affected by different pH of the leaching agent—chips and branches.

Variable	Plant	Extracting Agent	Branches		Chips	
			Fresh	Dry	Fresh	Dry
Al (mg l ⁻¹)	S	pH 7	1.19 ± 0.16 ^{Ba}	0.14 ± 0.02 ^{Aa}	2.36 ± 0.20 ^{Ca}	0.20 ± 0.03 ^{Aa}
		pH 3	1.06 ± 0.04 ^{Aa}	0.13 ± 0.03 ^{Aa}	2.26 ± 0.41 ^{Ba}	0.21 ± 0.06 ^{Aa}
	P	pH 7	1.14 ± 0.06 ^{Ba}	0.25 ± 0.07 ^{Aa}	2.79 ± 0.35 ^{Ca}	0.20 ± 0.03 ^{Aa}
		pH 3	1.00 ± 0.25 ^{Ba}	0.33 ± 0.09 ^{Aa}	1.73 ± 0.33 ^{Ba}	0.28 ± 0.07 ^{Aa}
Cd (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.02 ± 0.01 ^{Aa}	< 0.01 ± < 0.01 ^{Aa}	0.05 ± 0.01 ^{Aa}	0.29 ± 0.07 ^{Bb}
		pH 3	0.03 ± < 0.01 ^{Aa}	0.02 ± 0.01 ^{Aa}	0.03 ± 0.01 ^{Aa}	0.27 ± 0.04 ^{Bab}
	P	pH 7	0.02 ± < 0.01 ^{Ba}	< 0.01 ± < 0.01 ^{Aa}	0.07 ± < 0.01 ^{Ca}	0.10 ± < 0.01 ^{Ca}
		pH 3	0.03 ± < 0.01 ^{Aba}	0.01 ± < 0.01 ^{Aa}	0.06 ± 0.01 ^{Ba}	0.11 ± 0.01 ^{Ca}
Cu (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.05 ± 0.01 ^{Aa}	0.04 ± < 0.01 ^{Aa}	0.04 ± 0.01 ^{Aab}	0.12 ± 0.02 ^{Bab}
		pH 3	0.05 ± 0.01 ^{Aa}	0.07 ± 0.02 ^{Aa}	0.03 ± 0.01 ^{Aa}	0.18 ± 0.04 ^{Bb}
	P	pH 7	0.05 ± < 0.01 ^{Aba}	0.04 ± 0.01 ^{Aa}	0.08 ± < 0.01 ^{Bc}	0.06 ± 0.01 ^{Aba}
		pH 3	0.04 ± 0.01 ^{Aba}	0.03 ± 0.01 ^{Aa}	0.06 ± 0.01 ^{BCbc}	0.08 ± < 0.01 ^{Ca}
Fe (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.81 ± 0.09 ^{Ba}	0.08 ± 0.01 ^{Aa}	1.81 ± 0.17 ^{Ca}	0.17 ± 0.01 ^{Aa}
		pH 3	0.72 ± 0.02 ^{Aa}	0.05 ± 0.02 ^{Aa}	1.70 ± 0.35 ^{Ba}	0.18 ± 0.05 ^{Aa}
	P	pH 7	0.78 ± 0.04 ^{Aa}	0.11 ± 0.04 ^{Aa}	2.29 ± 0.31 ^{Ba}	0.12 ± 0.01 ^{Aa}
		pH 3	0.62 ± 0.18 ^{Aa}	0.11 ± 0.05 ^{Aa}	1.40 ± 0.23 ^{Ba}	0.13 ± 0.04 ^{Aa}
Mn (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.23 ± 0.08 ^{Aa}	0.12 ± 0.05 ^{Aa}	0.39 ± 0.10 ^{Aa}	3.65 ± 0.50 ^{Bb}
		pH 3	0.38 ± 0.01 ^{Aa}	0.32 ± 0.09 ^{Aa}	0.26 ± 0.05 ^{Aa}	3.26 ± 0.40 ^{Bb}
	P	pH 7	0.22 ± 0.06 ^{Aa}	0.11 ± 0.04 ^{Aa}	0.29 ± 0.02 ^{Aa}	1.06 ± 0.08 ^{Ba}
		pH 3	0.25 ± 0.02 ^{Aba}	0.18 ± 0.03 ^{Aa}	0.36 ± 0.02 ^{Ba}	1.15 ± 0.04 ^{Ca}
Pb (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.34 ± 0.02 ^{Aba}	0.08 ± 0.01 ^{Aa}	0.63 ± 0.11 ^{Ba}	0.46 ± 0.09 ^{Ba}
		pH 3	0.27 ± 0.01 ^{Aba}	0.15 ± 0.05 ^{Aa}	0.54 ± 0.14 ^{Ba}	0.39 ± 0.05 ^{Aba}
	P	pH 7	0.53 ± 0.07 ^{Aa}	0.14 ± 0.04 ^{Aa}	1.60 ± 0.28 ^{Bb}	0.30 ± 0.02 ^{Aa}
		pH 3	0.45 ± 0.17 ^{Aa}	0.15 ± 0.02 ^{Aa}	0.81 ± 0.25 ^{Aab}	0.29 ± 0.01 ^{Aa}
Zn (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.71 ± 0.30 ^{Aa}	0.79 ± 0.14 ^{Aab}	0.93 ± 0.28 ^{Aa}	13.28 ± 1.56 ^{Bb}
		pH 3	0.97 ± 0.03 ^{Aa}	1.91 ± 0.63 ^{Ab}	0.49 ± 0.15 ^{Aa}	12.26 ± 0.84 ^{Bb}
	P	pH 7	0.43 ± 0.11 ^{Aa}	0.36 ± 0.11 ^{Aa}	0.77 ± 0.07 ^{Aa}	2.05 ± 0.15 ^{Ba}
		pH 3	0.42 ± 0.08 ^{Aa}	0.39 ± 0.04 ^{Aa}	0.85 ± 0.11 ^{Ba}	2.20 ± 0.10 ^{Ca}

Mean ± (SE), n = 3; One-way ANOVA, Tukey HSD, Upper case = differences = branches fresh x branches dry, chips fresh x chips dry; lower case = differences between = S-demi x S-acid, P-demi x P-acid.

poplars. The most conspicuous differences of element contents in leaves and branches were determined for manganese and iron. On the other hand, the lowest difference was found for copper, followed by cadmium and zinc. Generally the willows accumulated higher amounts of elements than the poplars (Cd: by 35.1 mg kg⁻¹; Cu: by 2.6 mg kg⁻¹, Mn: by 253 mg kg⁻¹, and Zn: by 230 mg kg⁻¹); only iron (by 34.8 mg kg⁻¹) and lead (by 30.4 mg kg⁻¹) were accumulated in larger amounts by the poplars.

3.2. Leached elements

The influence of contaminated biomass particle size on the leachability of elements appears as one of the most important factors causing the concentration of risk elements in leachate. Table 2 displays elemental concentrations in leachate of the branches and chips. The data are compared by size of the leached biomass (branches and chips), freshness of the biomass and type of leachate. The relative leached amount of elements was determined from the total concentration in biomass samples (Table 1) to compare more clearly the leachable proportions of the individual elements in Figs. 1 and 2. Generally, more aluminium was leached from fresh chips. High Al concentration in water leachate was observed within the fresh poplar chips and it is comparable to the leached amount of Al from fresh willow chips. There was no influence found for the type of plant or type of leachate on the amount of leached Al.

Unlike Al leaching, the highest concentration of leached Cd was determined in leachate of dry chips. In contrast, dry willow chips statistically released the highest concentration of Cd; ten-fold higher than the fresh branches and six-fold higher than from fresh chips. Moreover, the influence of biomass was observed; thus the highest amount of Cd was determined in leachate of willows chips. No influence of an extracting agent was found for willows and poplars, probably because we

did not use leachates of extremely high or low pH values. The highest amount of Cd leached from poplars was determined in dry chips (1–2%). Cadmium leached from branches to a lesser extent in comparison to leaves (Table 3).

Similarly, the highest amount of Cu was leached from dry chips. Observing this element, the influence of leachate was found to be important when dry chips were leached; the highest amount of Cu was leached by acid from dry chips. Concerning dry chips, the lowest amount of Cu was leached from poplars by water. A different pattern was observed for Fe. The highest amount of this element was leached from fresh biomass. The highest percentage was leached from willows, although the total Fe content in poplar branches was higher by 36%. The influence of the type of fast growing tree or type of leachate was not observed.

Lead was significantly less leached from dry willow branches. The percentage of released lead was higher (5.3–1.4%) from fresh than from dry branches and chips. The highest concentration of lead was observed in leachate from poplars compared to willows. Mn was leached from dry chips; statistically more manganese was leached from willows. Zinc was leached in greater extent from dry chips of both poplar and willow. The influence of the type of biomass and leachate on higher Zn release was recorded for dry willow biomass.

Similar to the elements released from branches and chips, the release of the same elements was observed from whole leaves and/or leaf fragments. These data, along with the values for fresh and dry biomass, are given in Table 3. The influence of biomass freshness on the aluminium release was observed for poplar, where the highest Al concentration was determined in acidic leachate from fragments of fresh leaves. However, the results were not significant. We observed Al leaching from fresh willow leaves (both whole and crushed) that was 34–35% higher than from dry leaves biomass. The effect of the type of biomass and type of leachate was observed in the case of fresh leaves

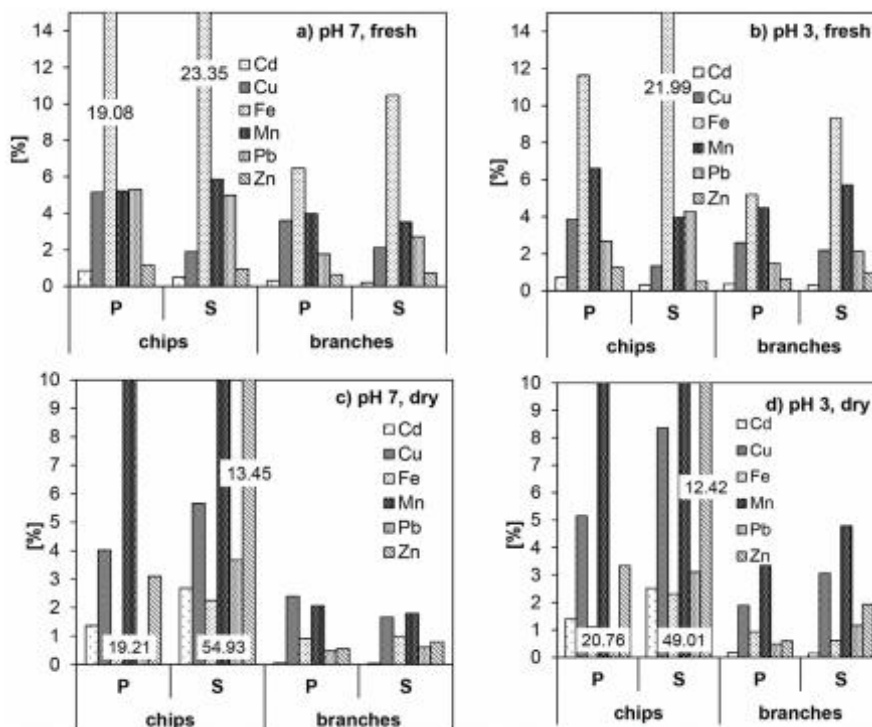


Fig. 1. The percentage of leached elements from poplar (P) and willow (S) branches and chips.

and dry leaf fragments. Significantly lower Al concentrations were determined in neutral and acidic leachate from fresh leaves and dry leaves fragments, respectively.

In the case of cadmium release, the main factor was the biomass moisture. Poplar leaves were characterised by approximately half the total Cd content; Cd was leached significantly more from them, except

in the case of dry crushed leaves of willows where any influence of the leachate type was not found. Copper release from leaves had a very similar trend as cadmium, and the moisture of leaves was the strongest influencing factor. The highest amounts of Cu were determined in leachate of dry willow leaves and in their fragments.

Iron behaviour was specific; there was neither the influence of the

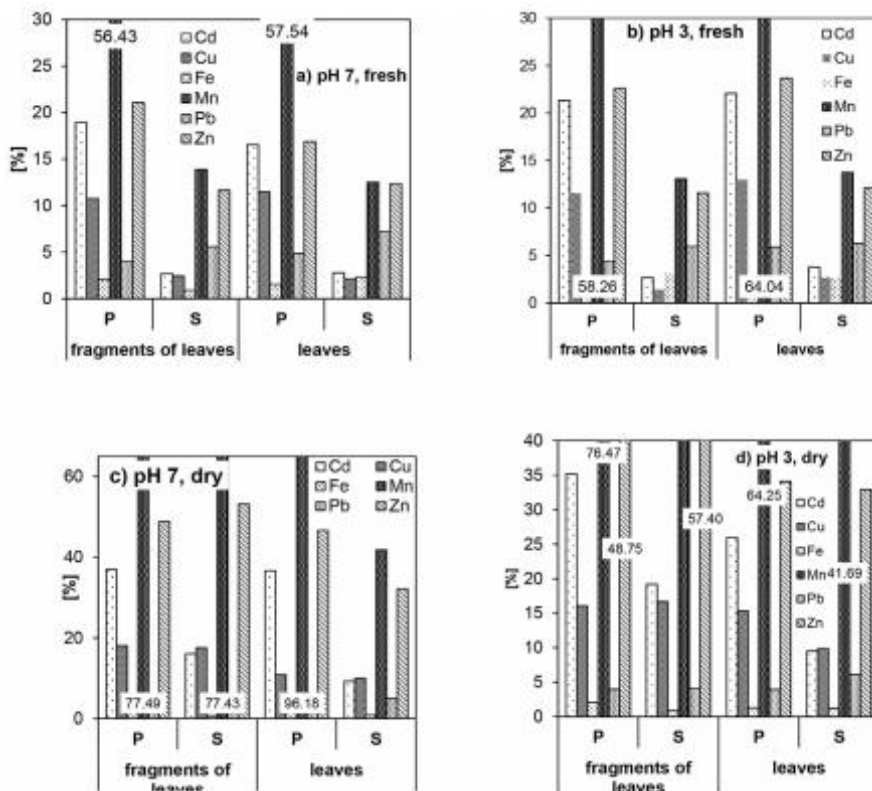


Fig. 2. The percentage of leached elements from poplar and willow leaves and fragments of leaves.

Table 3
Element concentrations in leachates of biomass as affected by different pH of the leaching agent—leaves and leaf fragments.

Variable	Plant	Extracting agent	Leaves		Leaf fragments	
			Fresh	Dry	Fresh	Dry
Al (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.65 ± 0.15 ^{Aab}	0.40 ± 0.04 ^{Aa}	0.51 ± 0.24 ^{Aa}	0.43 ± 0.02 ^{Ab}
		pH 3	0.98 ± 0.04 ^{Ab}	0.64 ± 0.04 ^{Aa}	0.95 ± 0.36 ^{Aa}	0.60 ± 0.03 ^{Ab}
		P	0.35 ± 0.11 ^{Aa}	0.66 ± 0.14 ^{Aa}	0.72 ± 0.25 ^{Aa}	0.49 ± 0.06 ^{Ab}
	P	pH 7	0.61 ± 0.01 ^{Ab}	0.34 ± 0.04 ^{Aa}	1.03 ± 0.06 ^{Ca}	0.40 ± 0.03 ^{Aa}
		pH 3	0.79 ± 0.27 ^{Aa}	2.63 ± 0.28 ^{Ba}	0.77 ± 0.26 ^{Aa}	4.57 ± 0.32 ^{Ca}
		P	1.07 ± 0.03 ^{Aa}	2.71 ± 0.09 ^{Ba}	0.77 ± 0.29 ^{Aa}	5.46 ± 0.19 ^{Ca}
Cd (mg l ⁻¹)	S	pH 7	2.33 ± 0.85 ^{Aa}	5.16 ± 0.57 ^{Aab}	2.67 ± 0.62 ^{Aab}	5.20 ± 0.40 ^{Ba}
		pH 3	3.11 ± 0.75 ^{Aa}	3.65 ± 0.36 ^{Ab}	3.01 ± 0.23 ^{Ab}	4.95 ± 0.63 ^{Aa}
		P	0.25 ± 0.03 ^{Ab}	0.24 ± 0.02 ^{Ab}	0.23 ± 0.02 ^{Ab}	0.40 ± 0.04 ^{Ba}
	P	pH 7	0.29 ± 0.04 ^{Ab}	0.34 ± 0.03 ^{Ab}	0.26 ± 0.01 ^{Ab}	0.35 ± 0.06 ^{Aa}
		pH 3	1.02 ± 0.21 ^{Ba}	0.40 ± 0.04 ^{Aa}	0.39 ± 0.15 ^{Aa}	0.33 ± < 0.01 ^{Aa}
		P	1.17 ± 0.01 ^{Aa}	0.55 ± 0.04 ^{Aa}	1.36 ± 0.65 ^{Aa}	0.38 ± 0.05 ^{Aa}
Cu (mg l ⁻¹)	S	pH 7	0.88 ± 0.19 ^{Aa}	1.60 ± 0.28 ^{Ab}	1.17 ± 0.23 ^{Aa}	1.22 ± 0.11 ^{Ab}
		pH 3	1.04 ± 0.17 ^{Aa}	0.75 ± 0.04 ^{Ab}	1.30 ± 0.03 ^{Aa}	1.17 ± 0.15 ^{Ab}
		P	21.46 ± 3.74 ^{Aa}	71.67 ± 7.39 ^{Bb}	23.79 ± 2.97 ^{Aa}	132.73 ± 2.42 ^{Cb}
	P	pH 7	23.61 ± 1.19 ^{Aa}	71.46 ± 0.96 ^{Bb}	22.42 ± 4.30 ^{Aa}	139.79 ± 4.55 ^{Cb}
		pH 3	26.68 ± 6.64 ^{Aa}	44.60 ± 3.33 ^{Aa}	26.17 ± 2.90 ^{Aa}	35.93 ± 5.70 ^{Aa}
		P	29.93 ± 4.62 ^{Aa}	29.79 ± 2.55 ^{Aa}	27.01 ± 1.44 ^{Aa}	35.46 ± 3.51 ^{Aa}
Fe (mg l ⁻¹)	S	pH 7	1.85 ± 0.27 ^{Ba}	1.30 ± 0.06 ^{Aab}	1.43 ± 0.20 ^{Aa}	0.85 ± 0.02 ^{Aa}
		pH 3	1.61 ± 0.10 ^{Ba}	1.56 ± 0.06 ^{Bb}	1.52 ± 0.12 ^{Ba}	1.05 ± 0.06 ^{Aa}
		P	1.12 ± 0.20 ^{Aa}	1.29 ± 0.16 ^{Ab}	0.92 ± 0.10 ^{Aa}	1.03 ± 0.05 ^{Aa}
	P	pH 7	1.37 ± 0.05 ^{Ba}	0.91 ± 0.01 ^{Aa}	1.01 ± 0.03 ^{Aa}	0.92 ± 0.07 ^{Aa}
		pH 3	44.68 ± 5.18 ^{Aa}	116.32 ± 9.13 ^{Ba}	42.24 ± 5.67 ^{Aa}	192.92 ± 9.42 ^{Cb}
		P	43.83 ± 2.95 ^{Aa}	119.24 ± 4.74 ^{Ba}	42.00 ± 7.61 ^{Aa}	207.97 ± 4.16 ^{Cb}
Mn (mg l ⁻¹)	S	pH 7	48.74 ± 13.39 ^{Aa}	134.59 ± 14.51 ^{Ba}	60.83 ± 13.04 ^{Aa}	140.92 ± 3.73 ^{Ba}
		pH 3	68.33 ± 8.38 ^{Aa}	98.37 ± 5.87 ^{Aa}	65.26 ± 0.76 ^{Aa}	140.70 ± 12.97 ^{Ba}
		P				

Mean ± (SE); n = 3; One-way ANOVA, Tukey HSD, Upper case - differences - leaves fresh x leaves dry, fragments of leaves fresh x fragments of leaves dry; lower case - differences between - S-demi x S-acid, P-demi x P-acid.

state of biomass nor particle size. Fe concentration in leachates was highest within dry poplar biomass. Iron was not leached from leaf biomass to the same extent as from the branches. On the contrary, Fe release from leaves was the lowest compared to other observed elements, although the total concentration was five to six times higher than in branches of both willows and poplars.

Dry leaf fragments and willow biomass were characterised by the highest values of Mn release. Opposite to manganese, lead was released from the dry leaves fragment of willows in the lowest amount. The influence of the type of plant and leachate was observed for fresh leaf biomass, and the values for Pb release were the lowest, ranging from 3.3 to 7.2%. These values are therefore higher than those reported for the branches. Generally, zinc was released significantly more from dry leaves than from fresh ones, whilst dry leaves and fragments of willows released the highest amounts of zinc. The influence of plant type and leachate was observed only for dry leaf fragments; willows were characterised with higher amounts of released zinc.

3.3. PCA analysis

Figs. 3 and 4 document the inter-relationship of the elements during the leaching procedure. In the case of branches and chips (Fig. 1) the first axis of the PCA of element concentrations and DM biomass yield explained 57% of the data variability, while the first two axes together explained 93%. The length and direction of the vectors indicate the strength of the vector effect and the correlation between vectors. A long vector for a particular variable indicates greatly affected analytical results. Thus, leached amounts of Al, Fe and Pb were clearly negatively related to concentrations of other leached elements; their vectors were directed to opposite sides of the diagram. The released amounts of Cu, Cd, Mn and Zn were positively correlated between each other, as indicated by the angles smaller than 90° between their vectors. The markers for fresh biomass (coloured green) are concentrated on the left

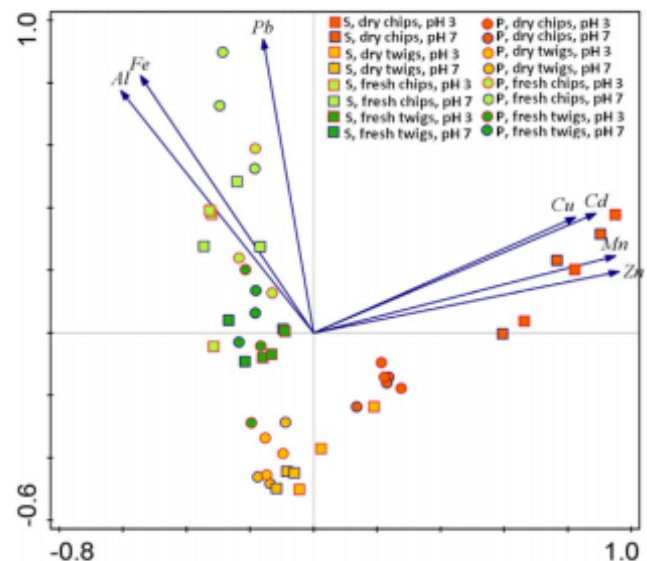


Fig. 3. Ordination diagram showing results of PCA of elements content of leached biomass of branches and chips in leachate of different pH.

upper side of the diagram and are clearly separated from markers for dry biomass (coloured red and orange), which are located on the bottom right side of the diagram. This indicates a higher release of Al, Fe and Pb from fresh biomass, especially from chips (green circles), whereas Cu, Cd, Mn and Zn were released mainly from dry chips (red squares). The lowest amounts of elements were leached from dry branches (orange squares and circles).

For leaves and fragments of leaves (Fig. 2), the first axis of the PCA of element concentrations and DM biomass yield explained 54% of the

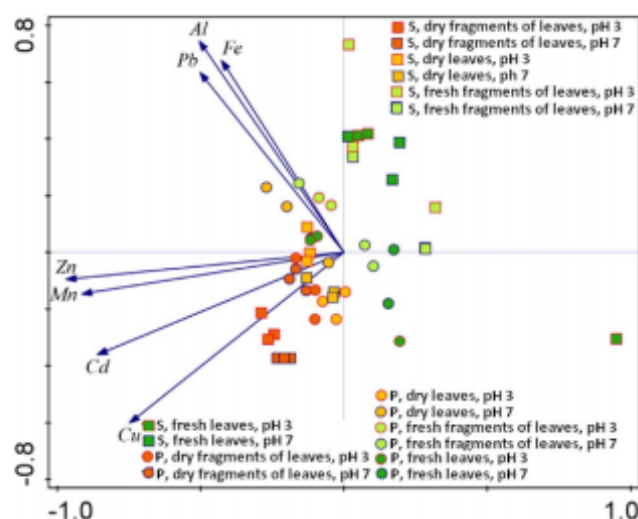


Fig. 4. Ordination diagram showing results of PCA of elements content of leached biomass of leaves and fragments of leaves in leachate of different pH.

data variability, while the first two axes together explained 81%. The strength and angle of vectors again indicated a negative correlation between the released amounts of Pb, Al and Fe in comparison to the rest of the observed elements, which were correlated between each other. The length of vectors is similar, thus the effect on the results is the same for individual elements. The fresh and dry biomasses are again separated (coloured green for fresh; red and orange for dry). The fresh willow leaf fragments were characterised by the lowest release of elements.

4. Discussion

4.1. Element concentration in plants

Higher elemental accumulation was determined in the leaves, as detailed in previously published data (e.g. Mertens et al. [16], Fuksova et al. [17] and Meers et al. [5]). Willows are known as a suitable risk element phytoextractor due to their high element accumulation, high element transport to their shoots and high biomass production [18]. Tested willow plants contained higher amounts of observed elements than the poplars in our experiment. In whole plants of *Salix spp.* that were planted on moderately contaminated soil originating from the same location, values of 41 mg kg^{-1} of Cd were reported by Fuksova et al. [17]. Contents twice these were observed in our study, substantially exceeding average concentrations (typically in the range of $0.005\text{--}0.4 \text{ mg kg}^{-1}$ [19]). The zinc deficiency threshold is approximately 20 mg kg^{-1} and the toxic level ranges from 300 to 400 mg kg^{-1} in plants [19]. Ordinarily lead mass fractions in plant dry matter varies in the range of $0.2\text{--}3.8 \text{ mg kg}^{-1}$ [19]. Fuksová et al. [17] determined 10.9 and 591 mg kg^{-1} of lead and zinc respectively in *Salix* plants planted on moderately contaminated soil. Thus, high concentrations of these elements were also accumulated in both plants in our experiment. The following concentrations of other elements were typically observed: Cu: $3\text{--}8 \text{ mg kg}^{-1}$, Fe: $3\text{--}46 \text{ mg kg}^{-1}$ and Mn: 30 mg kg^{-1} [19]. In comparison, Voutsas et al. [20] recorded values of $49\text{--}196 \text{ mg kg}^{-1}$ for Fe and $3\text{--}62 \text{ mg kg}^{-1}$ for Mn. These values were considered by Voutsas et al. [20] as normal in comparison with those from previous papers. Thus, the willows and poplars tested in this study contained average amounts of these three elements.

4.2. Leached elements

Mulligan et al. [21] identified cadmium, lead, copper and zinc as the most hazardous elements on the US Environmental Protection Agency's

(EPA) list of priority pollutants. Phytoextraction is one of the methods by which these elements can be removed from contaminated soils. However, the risk posed by manipulation and processing of the harvested contaminated biomass is still unknown. Šyc et al. [22] noted the danger of heavy metal recovery back into the environment by the processing of contaminated wood biomass. When the concentrations are compared to the limits given by a Czech legislative standard (94/2016Sb.), we can conclude that leachates from branches from phytoremediation technologies are below the limits for dangerous waste for Cd, Pb and Zn (limits: Cd 0.5 mg L^{-1} , Pb: 5 mg L^{-1} and Zn: 20 mg L^{-1}). However, leaves are considered as dangerous waste for Cd and Zn according to this standard. Pulford and Watson [23] reviewed the willow biomass production for $15 \text{ t ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$. Based on the contents of heavy metals in branches (Table 1), we calculated that 8 g of Cd, 11 g of Pb and 369 g of Zn could be hypothetically be washed out from dried willow branches per hectare. Zarubova et al. [24] reported removal of cadmium (67 g ha^{-1}), lead (29 g ha^{-1}) and zinc (568 g ha^{-1}) after four years of plantation on the same site as tested plants of our experiment were harvested. Comparing our hypothetical values and determined real values of mentioned study, the potential risk of heavy metal release back into the environment is high.

Among the available literature it has been noted that metal concentrations in leachate of waste or biomass are strongly dependant on pH of extractant [25,26]. Šyc et al. [22] simulated the environmental conditions by different pH values represented by mineral and organic acids and by hydroxides with pH control during leaching test. At low pH values (pH = 2) 50% of Cd was released, whilst at acidic pH values (pH = 5) up to 30% of Zn was released from the tissues of fast growing trees. Compared with our results, the released element contents did not reach such amounts. Moreover, the influence of leachant beginning pH had no influence on element leaching.

Pecorini et al. [10] tested ambient conditions of leaching from different hazardous materials (fly ash, bottom ash, sludge etc.). This study found that in most cases, the presence of an acid environment (pH = 4.5) accelerated the leaching process, resulting in a higher cumulative quantity of pollutants (e.g. Cr, Ni and Zn). Stals et al. [26] investigated willow branches, leaves and pyrolysis char derived from the biomass in leaching tests to observe heavy metals release. They found that metal concentrations in leachate are strongly dependent on solution pH. Tests using purified water indicated a sample pH between 6 and 7 after 24 h of shaking, indicating no severe pH change. However, the nitric acid solutions (performed using a low concentration of acid) changed pH from 4.0–4.5 to 4.5–6.5 after extraction. However, there are also studies describing no influence of leachant pH on released elements. For instance, Zhao et al. [27] simulated acid rain for leaching of heavy metals from road-deposited sediments and found this process pH-independent above pH 3.

However, the effect of temperature and mechanical constraints seemed to have no effect on the process of leaching according to study of Pecorini et al. [10]. These factors should be considered and tested in long-term tests of contaminated biomass storage. Another important factor that could influence biomass storage is microorganism activity [9]. Leaching tests usually do not observe this aspect. However, this factor should be considered if the assumption of longer storage of fresh biomass on the heaps is planned. Furthermore, this could be tested in future studies of contaminated biomass storage.

Compacting contaminated biomass by drying was noted as advantageous by Gosh and Singh [28]. According to our results, this advantage can be devalued, because of the potential risk of element release.

Previously, the leaching of elements from leaves was only discussed in terms of plant nutrition. For example, the effect of rainfall on nutrient leaching from leaves was described in Marschner [29]. The author also described the effect of low pH of acid rain on higher leaching of cations from the surface of leaves [30]. When the leaching of fresh leaves was studied in term of nutrient losses, it was found that leaching

of cations hardly ever exceeded 1% from the total content in leaves [31]. Tukey [32] observed lower leaching of Fe and Zn in comparison to K, Mg from the leaf surface of growing plants. Zn was leached in highest amounts in comparison to Al, Cd, Cu, Fe, Mo and Pb, in our experiment.

The importance of element bounds in the biomass was described by Krueger et al. [33] where water extractable Pb proportions in *Brassica rapa* biomass were investigated. They applied different chelates for enhancement Pb mobility and plant availability in soil. However, they found high leachability of Pb (up to 92%) from the dried biomass, complexed as Pb-EDTA, whereas only 6.7% of Pb was extracted from the dried biomass from soils amended with EDDS. In our experiment, the Pb binding onto the cell wall and complexing into $Pb_3(PO_4)_2$, Pb-malic, and Pb-GSH [34] most probably occurred, but the leaching efficiency was negligible compared to the EDTA-chelated Pb.

Šyc et al. [22] observed the highest percentage leachability of Zn compared to Cu and Cd, but it is not clear whether the biomass was fresh or dry and the size was also not clearly described. In our study, this trend was confirmed only for dry chips regardless of leachate pH. They also observed the leaching of studied elements that did not exceed 10% of the total content, which is similar to our results of branches leaching test.

The potential removal of risk elements from the contaminated biomass of *Pandanus amaryllifolius* was investigated by Abdullah and Loo [35]. They found the desorption of Pb (up to 70%) and Cu (even up to 90%) was effective by using the low pH extracting agents such as HCl at pH 2 and 3.0 mM EDTA at pH 4.58. High extractability of the risk elements was reported for hyperaccumulating plants. For instance, Barbaroux et al. [36] demonstrated that the leaching of crushed seeds of Ni hyperaccumulator *Alyssum murale* in a 0.5 M H_2SO_4 solution resulted in the release of 97% of the total Ni. Núñez-López et al. [37] compared leaching of Pb from Pb-accumulating aquatic plant *Salvinia minima* biomass where water, several aqueous ammonium salts, and EDTA solution extractants were used with the concentration 0.3 mol kg⁻¹. The extraction effectiveness of the leachants followed the order: EDTA > ammonium oxalate > water-ammonium nitrate > ammonium acetate. This achieved Pb extraction efficiencies of 99%, 70%, 7.2%, 6.9% and 1.3%, respectively. Similarly, Yang et al. [38] tested leaching of heavy metals from Zn hyperaccumulator *Sedum alfredii* with an ammonia-ammonium chloride solution (molar ratio NH_4Cl to NH_3 of 0.6, leaching time of 2 h and solid/liquid of 5:1) as the leaching agent. They reported excellent leaching efficiency for Zn (up to 98%). In this context, our results significantly showed lower leachability (for Pb 5.3–1.4% from branches; for Zn up to 2% from branches) because of the applied mild extraction agents. The reason for this was the main aim of our study: to simulate real, common conditions of biomass storage. Although willows and poplars showed excellent accumulation ability especially for Cd and Zn, they cannot be considered as hyperaccumulators. Thus, lower extractability of elements compared to the hyperaccumulating plants was to be expected. Moreover, the higher extractability of elements from leaves compared to branches documented the importance of the leaf harvest and removal from the experimental field at the end of the vegetation season. Considering the approximate yield of leaves (for willows 4 t ha⁻¹ y⁻¹, for poplars 3 t ha⁻¹ y⁻¹) the element recovery to field for cadmium is 16 g ha⁻¹ y⁻¹ and 11 g ha⁻¹ y⁻¹ for poplars and willows respectively. For lead, values of 6.9 g ha⁻¹ y⁻¹ and 132 g ha⁻¹ y⁻¹ are reported for poplars and willows, whilst for zinc values of 346 g ha⁻¹ y⁻¹ and 348 g ha⁻¹ y⁻¹ are reported (again, for poplars and willows respectively). Similarly, Mertens et al. [16] considered the autumn litter as the disadvantage of phytoextraction technology in terms of Cd and Zn 'release' into the ecosystem.

To summarise previous data, we conclude that the observed element release was highly influenced by both the freshness of the biomass and size of the biomass, and that elemental leaching had similar trends for wood and leaves in all cases except iron. Iron was leached more from

fresh wood biomass, but considering leaves, iron was leached more from dry biomass.

Whereas handling rules of contaminated biomass have not been set yet in available literature, our study is opening an approach for the research of contaminated biomass storage. We determined short-term release of Cd, Cu, Fe, Mn and Zn from different parts of willows and poplars with different moisture content, according to the methodology for waste materials. Freshness, chipping and/or cutting of biomass were determined as crucial factors in terms of risk elements release and overall biomass safe storage. The mischievous contents of elements in leaves have been already described in our previous literature. Our results confirmed the unsolved problem of the risks connected with the storage of harvested leaves and branches. The study poses questions for development of the methodology of contaminated biomass storage, for instance the influence of different temperature of environment or activity of microorganisms.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.02.012>.

References

- [1] D.E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin, Phytoremediation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 49 (1) (1998) 643–668.
- [2] P. Tlustoň, J. Száková, G. Müllbachová, R. Neugschvandtner, J. Habart, *The Phytoremediation Technology of the Induced Phytoextraction, Certified Methodology*, Czech University of Life Sciences, Prague, 2012 (in Czech).
- [3] J.K. Jensen, P.E. Holm, J. Nejrup, M.B. Larsen, O.K. Borggaard, The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 931–937.
- [4] P. Tlustoň, J. Száková, M. Vysloužilová, D. Pavlíková, J. Weger, H. Javorská, Variation in the uptake of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc by different species of willows *Salix* spp. grown in contaminated soils, *Cent. Eur. J. Biol.* 2 (2) (2007) 254–275.
- [5] E. Meers, B. Vandecasteele, A. Ruttens, J. Vangronsveld, F.M.G. Tack, Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals, *Environ. Exp. Bot.* 60 (2007) 57–68.
- [6] A. Ruttens, J. Boulet, N. Weyens, K. Smeets, K. Adriaenssens, E. Meers, S. Van Slycke, F. Tack, L. Meiresonne, T. Thevys, N. Witters, R. Carleer, J. Dupae, J. Vangronsveld, Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils, *Int. J. Phytoremediation* 3 (1) (2011) 194–207.
- [7] K. Havlíčková, J. Suchý, J. Weger, J. Šedivá, M. Táborská, M. Bureš, J. Hána, M. Níkl, L. Jirásková, J. Petruchová, J. Knápek, J. Vašíček, P. Gallo, Z. Stražil, *Analysis of Biomass Production Potential in the Czech Republic*, VÚKOZ v.v.i., Průhonice, first ed., (2010) (in Czech).
- [8] L. Mrnka, P. Doubková, J. Habart, R. Sudová, P. Tlustoň, M. Vohník, M. Vosátka, *Willow and Poplar Short Rotation Coppice Plantations in Soils Contaminated by Risk Elements: Review and Handbook for Growers in the Czech Republic*, Institute of Botany of the ASCR, Průhonice, 2010.
- [9] P.D. Kofman, R. Spinelli, *Storage and Handling of Willow from Short Rotation Coppice*, (1997).
- [10] I. Pecorini, F. Baldi, D. Bacchi, E.A. Carnevale, A. Corti, Leaching behaviour of hazardous waste under the impact of different ambient conditions, *Waste Manag.* 63 (2017) 96–106.
- [11] V. Sheoran, A.S. Sheoran, P. Poonia, Phytomining: a review, *Miner. Eng.* 22 (2009) 1007–1019.
- [12] T. Kikuchi, S. Tanaka, Biological removal and recovery of toxic heavy metals in water environment, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec* 42 (2012) 1007–1057.
- [13] R.L. Chaney, J.S. Angle, C.L. Broadhurst, C.A. Peters, R.V. Tappero, D.L. Sparks, Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies, *J. Environ. Qual.* 36 (2007) 1429–1443.
- [14] K. Šichorová, P. Tlustoň, J. Száková, K. Kořínek, J. Balík, Horizontal and vertical variability of heavy metals in the soil of a polluted area, *Plant Soil Environ.* 50 (12) (2004) 525–534.
- [15] P. Mader, J. Száková, D. Mihalová, Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II, Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue, *Analisis* 26 (3) (1998) 121–129.
- [16] J. Mertens, P. Vervaeke, A. De Schrijver, S. Luysaert, Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation, *Sci. Total Environ.* 326 (1) (2004) 209–215.
- [17] Z. Fuksová, J. Száková, P. Tlustoň, Effects of co-cropping on bioaccumulation of trace elements in *Thlaspi caerulescens* and *Salix dasycladus*, *Plant Soil Environ.* 55 (11) (2009) 461–467.
- [18] M. Greger, T. Landberg, Use of willow in phytoextraction, *Int. J. Phytoremediat* 1 (2) (1999) 115–123.

- [19] A. Kabata-Pendias, A.B. Mukherjee, Trace Elements from Soil to Human, first ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007.
- [20] D. Voutsas, A. Grimanis, C. Samara, Trace elements in vegetables grown in an industrial area in relation to soil and air particulate matter, *Environ. Pollut.* 94 (3) (1996) 325–335.
- [21] C.N. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs, Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation, *Engineering Geol.* 60 (1) (2001) 193–207.
- [22] M. Šyc, M. Pohofelý, P. Kameníková, J. Habart, K. Svoboda, M. Punžochář, Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crop, *Biomass Bioenergy* 37 (2012) 106–113.
- [23] I.D. Pulford, C. Watson, Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review, *Environ. Int.* 29 (4) (2003) 529–540.
- [24] P. Zárubová, M. Hejman, S. Vondráčková, L. Mmka, J. Száková, P. Tlustoň, Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (23) (2015) 18801–18813.
- [25] M. Di Gianfilippo, G. Costa, I. Verginelli, R. Gvasci, F. Lombardi, Analysis and interpretation of the leaching behaviour of waste thermal treatment bottom ash by batch and column tests, *Waste Manage.* 56 (2016) 216–228.
- [26] M. Stals, E. Thijssen, J. Vangronsveld, R. Carleer, S. Schreurs, J. Yperman, Flash pyrolysis of heavy metal contaminated biomass from phytoremediation: influence of temperature, entrained flow and wood/leaves blended pyrolysis on the behaviour of heavy metals, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 87 (1) (2010) 1–7.
- [27] B. Zhao, A. Liu, G. Wu, D. Li, Y. Guan, Characterization of heavy metal desorption from road-deposited sediment under acid rain scenarios, *J. Environ. Sci.* 51 (2017) 284–293.
- [28] M. Ghosh, S.P. Singh, A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts, *Asian J. Energy Environ.* 6 (4) (2005) 18.
- [29] H. Marschner, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, third ed., Academic Press, 2011.
- [30] K. Mengel, H.J. Lutz, M.T. Breininger, Leaching of nutrients out of young *Picea abies* by acid fog, *Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde* (Germany, FR).
- [31] K. Mengel, H.J. Lutz, M.T. Breininger, Leaching of nutrients out of young *Picea abies* by acid fog, *Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde* (Germany, FR).
- [32] H.B. Tukey Jr., The leaching of substances from plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 21 (1) (1970) 305–324.
- [33] E. Krueger, J. Darland, S. Goldyn, R. Swanson, R. Lehmann, S. Shepardson, D. Karpovich, Water leaching of chelated Pb complexes from post-phytoremediation biomass, *Water Air Soil Pollut.* 224 (2014) 1615.
- [34] S.K. Tian, L.L. Lu, X.E. Yang, H.G. Huang, P. Brown, J. Labavitch, Z.L. He, The impact of EDTA on lead distribution and speciation in the accumulator *Sedum alfredii* by synchrotron X-ray investigation, *Environ. Pollut.* 159 (3) (2011) 782–788.
- [35] M.Z. Abdullah, K.P. Loo, Separation of divalent metal ions using *Pandanus amaryllifolius* Roxb (Pandanus) leaves: desorption study, in: V. Popov, A. Kungolos, C.A. Brebbia, H. Itoh (Eds.), *Waste Management and the Environment III. Book Series: WIT Transactions on Ecology and the Environment*, vol. 92, 2016, pp. 313–321.
- [36] R. Barbaroux, N. Meunier, G. Mercier, V. Taillard, J.L. Morel, M.O. Simonnot, J.F. Blais, Chemical leaching of nickel from the seeds of the metal hyperaccumulator plant *Alyssum murale*, *Hydrometallurgy* 100 (2009) 10–14.
- [37] R.A. Núñez-López, Y. Measa, S. Citlalli Gama, R. Ortega Borges, E.J. Olguín, Leaching of lead by ammonium salts and EDTA from *Sabina minima* biomass produced during aquatic phytoremediation, *J. Hazard Mater.* 154 (2008) 623–632.
- [38] J. Yang, C. Peng, C. Tang, M. Tang, K. Zhou, Zinc removal from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance biomass, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 19 (2009) 1353–1359.

5 Sumární diskuze

V první části sumární diskuse (podkapitola 5.1) jsou shrnuty poznatky z vědeckých článků (detaily viz podkapitoly 4.1, 4.2, 4.3 a 4.4), které jsou zaměřeny na fytoextrakční potenciál rychle rostoucích dřevin (RRD), jejich schopnost akumulovat rizikové prvky (RP) a zároveň produkovat poměrně velké množství biomasy. Dva klony z rodu *Salix* spp. značené jako S1 a S2 (S1 = klon TORDIS (*S. schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*); S2 = klon S–218 (*S. × smithiana*)) a dva klony z rodu *Populus* spp. značené jako P1 a P2 (P1 = klon J–105 (*P. nigra* × *P. maximowiczii*); P2 = klon WOLTERSON (*P. nigra*)) byly pěstovány na pokusné plantáži v Podlesí, nedaleko města Příbram, na středně kontaminované půdě RP, především Cd, Pb a Zn. Pokusná plocha byla osázena v dubnu 2008. Část vysazených klonů byla ponechána bez zásahu a část byla hnojena čistírenským kalem. V roce 2009 pokračovala další výsadba klonů. Na počátku roku 2012 byly odebrány vzorky klonů RRD z obou výsadeb a následně byly tyto výsadby sklizeny. V kontrolní variantě výsadeb 2008 byly, za účelem chování distribuce prvků, odebrané vzorky nadzemních částí klonů rozděleny rozřezáním podle svého stáří na čtyři skupiny výhonů. Stejně staré výhony totožných klonů byly nejprve dále rozděleny na kůru a dřevo, poté vysušeny při 60 °C, zváženy a pak dále analyzovány na obsah prvků (podkapitola 4.1). Vedle výzkumu distribuce prvků v klonech RRD, byl také posuzován vliv hnojení čistírenským kalem na fytoextrakční potenciál těchto klonů (podkapitola 4.2). Následně po sklizni v roce 2012 byly všechny experimentální bloky (8 bloků) kontrolní varianty výsadeb 2008 rozděleny na polovinu, kdy jedna polovina klonů z každého bloku byla sklizena po dvou letech (poprvé v únoru 2014 a podruhé v únoru 2016) a druhá polovina byla sklizena až po čtyřletém období v únoru 2016. Sklizená biomasa z obou sklizní i z obou polovin bloků byla kvantitativně hodnocena a analyzována na obsah RP za účelem zjištění vlivu délky časového intervalu mezi sklizněmi na akumulaci RP v klonech a na dlouhodobou produkci biomasy (podkapitola 4.4). Stejně tak byly rozděleny na polovinu všechny 4 pokusné bloky kontrolní varianty výsadeb z roku 2009, kde na jedné polovině byly klony sklizeny ve vegetačním období i s listem (v září 2013) a na druhé polovině bloku byly sklizeny v období vegetačního klidu bez listů (v únoru 2014) za účelem posouzení vlivu termínu sklizně na jejich fytoextrakční potenciál (podkapitola 4.3). Všechny rostlinné vzorky byly rozloženy suchou cestou. Obsahy v nich přítomných RP byly stanoveny optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP–OES) a obsahy živin byly stanoveny plamenovou atomovou absorpční spektrometrií (FAAS).

Druhá část diskuse (podkapitola 5.2) je věnována problematice možného uvolňování RP ze sklizené biomasy RRD zpět do prostředí. Tato problematika je řešena v posledním přiloženém vědeckém článku (detaily viz podkapitola 4.5). Sklizená biomasa klonů RRD byla vyluhována v laboratorních podmínkách za účelem posouzení, v jaké míře se budou potencionálně rizikové prvky (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) uvolňovat z této biomasy. Biomasa větví a listů u klonu S2 (klon S-218 (*S. × smithiana*)) a klonu P1 (klon J-105 (*P. nigra × P. maximowiczii*)), čerstvá nebo vysušená byla ponechána kompaktní nebo štěpkovaná, vyluhována dvěma typy výluhů, které simulovaly neutrální (deionizovaná voda; pH = 7) nebo kyselá ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, pH = 3) dešťové srážky. Sledované prvky v biomase i ve výluzích byly stanoveny optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

5.1 Fytoextrakční potenciál rychle rostoucích dřevin

Množství odstraněných RP z půdy při použití fytoextrakční metody je součinem dvou parametrů: výnosu sklizené nadzemní biomasy rostlin, použitých k fytoextrakci a obsahu RP v pletivech těchto rostlin (Antoniadis et al., 2017).

5.1.1 Výnos biomasy a mortalita klonů RRD

Výnos biomasy klonů RRD záleží na mnoha aspektech. Nejen na konkrétním klonu RRD (Mrnka et al., 2011; Larsen et al., 2014; Mleczek et al., 2017), ale také na výběru stanoviště (Larsen et al., 2014) a jeho půdních a klimatických podmínkách (Mrnka et al., 2011; Larsen et al., 2014). Další vliv na výnos biomasy RRD mají mikroklimatické a ekologické podmínky, především intenzita zaplevelení v prvních letech po výsadbě (Larsen et al., 2014), výskyt houbových chorob a hmyzích škůdců (Mrnka et al., 2011) a samozřejmě míra kontaminace půdy (Vysloužilová et al., 2003a). Nemalou měrou mohou výnos biomasy a tím i fytoextrakční potenciál RRD ovlivnit různé agronomické zásahy, jako je aplikace hnojiv (Sevel et al., 2014; Larsen et al., 2016) či délka obmýtí (Weih et al., 2004; Weger et al., 2013; Nielsen et al., 2014).

Ve všech našich zde uvedených vědeckých publikacích byly hodnoceny čtyři stejné klony (S1, S2, P1 a P2) na stejném stanovišti, přesto se při různých ošetřeních nepatrně měnilo pořadí klonů podle závislosti na výši výnosu biomasy. V první sklizni výsadeb 2008 provedené v únoru 2012 po čtyřech letech růstu bylo dosaženo jen velmi malých výnosů, které se v závislosti na klonu pohybovaly v rozmezí od 0,25 do 1,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ (viz tabulka 4 podkapitola 4.1 a 4.2; obrázek 1a podkapitola 4.4). Nejvyššího výnosu dosáhl klon P1. Výnosy dalších klonů klesaly v pořadí S2 > P2 > S1. Ve variantě hnojené

čistírenským kalem, obecně klony RRD dosáhly ještě nižších výnosů (v rozsahu 0,26–0,65 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹) než v kontrolní variantě s výjimkou klonu S1 a jejich výnos klesal v pořadí S2 > S1 > P1 > P2 (viz tabulka 4 v podkapitole 4.2). Snížení výnosů, a to především u topolových klonů P1 a P2, bylo pravděpodobně způsobeno vyšším výskytem plevelů na variantě ošetřené čistírenským kalem. Podle Benetky (2009) jsou kříženci *P. nigra* velmi silné heliofyty. V důsledku nadměrného rozšíření plevelů na blocích hnojených kalem mohlo dojít k jejich intenzivnímu zastínění a následnému poklesu výnosu a zvýšené mortalitě. Naopak klon S1, ve studii Sevel et al. (2014) pozitivně reagoval na dávky hnojiv obsahujících N, včetně čistírenských kalů, podobně jako v naší studii. Podle Havlíčkové et al. (2010) výnos biomasy z první sklizně bývá přibližně asi 30 % oproti výnosům biomasy z následujících sklizní. To odpovídá i našim výsledkům, neboť roční výnosy v následující sklizni provedené v únoru 2014 v kontrolní variantě i ve variantě hnojené čistírenským kalem byly u všech klonů vyšší než v první sklizni (viz tabulka 4 v podkapitole 4.2). Ve druhé sklizni se u většiny klonů, obzvláště u vrb, projevil pozitivní vliv aplikace čistírenského kalu na výnos biomasy, avšak to neplatilo pro klon P1. Výnos biomasy v kontrolní variantě se pohyboval v závislosti na klonu v rozmezí od 0,85 do 7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ a klesal v pořadí P1 > S2 > S1 > P2. V hnojené variantě byl obecně rozsah výnosu podobný jako v kontrolní variantě (1,2–7,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹), ale klesal v zcela jiném pořadí S2 > S1 > P1 > P2. Ve třetí sklizni provedené v únoru 2016 po dalších dvou letech roční výnos klonů opět stoupl (viz obrázek 1a v podkapitole 4.4). Weger (2008) ve svých pokusech zjistil, že výnos biomasy klonů RRD byl ve třetím obmýtí o 20 % vyšší než v druhém obmýtí. Podle Mrnky et al. (2011) klony RRD dosahují maximálního výnosu zpravidla při 3.–4. sklizni, tj. ve stáří 9–16 let (v závislosti na délce obmýtí).

Výnos biomasy v našich pokusech nebyl ovlivněn pouze hnojením, či pořadím obmýtí, ale také délkou obmýtí. V dalším z našich pokusů byl porovnáván výnos biomasy ze dvou sklizní provedených po dvou letech a jedné sklizně provedené po čtyřech letech (detaily viz podkapitola 4.4). Souhrnný výnos biomasy ze dvou dvouletých sklizní z let 2014 a 2016 byl nižší než výnos z jedné sklizně provedené v únoru 2016 po 4 letech. Pokud porovnáme roční výnos v jednotlivých sklizních odděleně pro každou sklizeň zvlášť, pak u všech klonů, s výjimkou klonu S1, roční výnos klesal v pořadí 2016 (po 4 letech) > 2016 (po 2 letech) > 2014 (po 2 letech) > 2012 (po 4 letech). Klon S1 měl vyšší roční výnos biomasy ve sklizni 2016 po dvou letech růstu, než ve sklizni 2016 provedené po čtyřech letech růstu. Pokud porovnáme výnos mezi jednotlivými klony podle délky obmýtí,

zjistíme, že klon vrby S1 překoná výnosem klon topolu P2 ve dvouletých obmýtích, zatímco ve čtyřletých obmýtích je tomu opačně. Výnos biomasy ve čtyřletých obmýtích ve sklizni 2012 a 2016 klesal v pořadí P1 > S2 > P2 > S1, zatímco ve dvouletých obmýtích ve sklizni 2014 a 2016 klesal v pořadí P1 > S2 > S1 > P2 (viz obrázek 1a podkapitola 4.4). Výsledky polních pokusů s klony vrb a topolů, které provedli Weih et al. (2004) a Weger (2008) také naznačují, že velmi krátké obmýetí snášejí lépe klony vrb než klony topolů. I další autoři, kteří se ve svých studiích zabývali výnosem klonů topolů, došli k závěrům, že topoly upřednostňují delší obmýetí oproti kratším obmýtím. Ve studiích Weger (2009) a Weger et al. (2013) dosáhl klon P1 výnosu 11,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ v jednom obmýetí dlouhém 6 let, zatímco ve dvou obmýtích dlouhých 3 roky měl tento klon výnos jen 9,2 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ a pokud byl sklizen každoročně po dobu 6 let, měl výnos už jen 5,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. V našem pokusu v prvním čtyřletém obmýetí dosáhl klon P1 pouze 1,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, avšak v druhém čtyřletém obmýetí měl výnos 20 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, zatímco pokud byl sklizen po dvou letech, tak v druhém a třetím obmýetí dosáhl průměrného výnosu jen 8,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ (viz obrázek 1a podkapitola 4.4). Schweier et al. (2017) uvádí, že výtěžek klonu P1 po 21 letech byl v průměru o 10,4 % vyšší v sedmiletém obmýetí než ve tříletém obmýetí. Zároveň hodnotí, že sedmileté obmýetí je ekonomicky výhodnější a je i menší zátěží pro životní prostředí. Nielsen et al. (2014) odhadoval ve své studii produkci biomasy 36 klonů z rodu *Populus* (včetně klonů P1 a P2) po 5 a 13 letech a zjistil, že obecně byl výtěžek biomasy pro všechny klony celkově vyšší po 13 letech (P1 - 5,1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹; P2 - 1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹) než po 5 letech (údaje nebyly uvedeny). Také v našem experimentu klon P2 dosahoval nízkých výnosů a to především v krátkých dvouletých obmýtích. V první sklizni po čtyřech letech pěstování dosáhl výnosu 0,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. V druhé sklizni po dalších čtyřech letech se výnos zvýšil (3,7 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹), ale pokud byl klon P2 sklizen v krátkých intervalech po dvou letech, dosahoval průměrný výnos v druhé a třetí sklizni jen 1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ (viz obrázek 1a podkapitola 4.4). Bullard et al. (2002) uvádí, že dva klony vrb (*S. × dasyclados* a *S. viminalis*) použité v jeho studii, měly vyšší výnos ve dvouletém obmýetí než ve tříletém, avšak těchto výsledků bylo dosaženo v prvním obmýetí při extrémně vysoké hustotě výsadby. Naopak Willebrand et al. (1993) považuje obmýetí 1–2 roky za nevhodné i pro klony vrb. To potvrzují i naše výsledky, kdy oba klony vrb S1 a S2 dosáhly vyšších výnosů v jednom čtyřletém obmýetí než ve dvou dvouletých, avšak rozdíly nebyly tak velké jako u topolů. Klon S1 dosáhl v prvním čtyřletém obmýetí výnosu 0,25 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, ve druhém čtyřletém obmýetí 3,6 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ a ve druhém a třetím dvouletém obmýetí

3,2 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹. Klon S2 dosáhl v prvním čtyřletém obmýtí výnosu 1,2 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹, ve druhém čtyřletém obmýtí 14,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ a ve druhém a třetím dvouletém obmýtí 8,5 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹ (viz obrázek 1a podkapitola 4.4).

Další možností, jak zvýšit výnos biomasy klonů RRD a tím odběr RP je jejich sklizeň ve vegetačním období i s listy. V našem polním pokusu byly klony RRD ve druhém obmýtí sklizeny z jedné poloviny pokusných parcel po dvou vegetačních obdobích v září 2013 i s listy a z druhé poloviny parcel v únoru 2014 bez listí. Výnos suché biomasy listů byl nižší než výnos biomasy větví. Listy představovaly 15–26 % (S1 – 15 %, S2 – 21 %, P1 – 25 %, P2 – 26 %) sklizené nadzemní biomasy (detaily viz podkapitola 4.3). Ve většině studií byly zkoumány RRD a jejich sklizeň i s listy v krátkodobých nádobových pokusech, kde byl zjištěn poměrně vysoký výnos biomasy listů z celkové nadzemní biomasy. Ve studii Bedell et al. (2009) biomasa listů klonu vrby *Salix alba* po 70 dnech růstu zaujímala 77 % nadzemní biomasy, zatímco po 209 dnech již jen 60 %. V experimentu s klonem S1 se po dvou měsících růstu listy podílely na tvorbě nadzemní biomasy z 60 % a po šesti měsících jen z 34 % (Brereton et al., 2013). V dlouhodobých polních pokusech listy představují poměrně malý podíl z celkové sklizené biomasy, podobně jako v naší studii. V polním pokusu s vrbovými klony, staršími více než čtyři roky, listy představovaly jen 17–23 % sklizené nadzemní biomasy (Maxted et al., 2007a). Laurensys et al. (2005) uvádějí, že listy sedmiletých klonů topolů představovaly 12,7–16 % sklizené nadzemní biomasy. Poměr biomasy listů k celkové nadzemní biomase s věkem a s celkovým zvyšujícím se nárůstem biomasy klesá podobně jako poměr biomasy kůry k celkové biomase větví (viz podkapitola 4.1).

Velký nárůst mortality klonů RRD v našich polních pokusech byl zaznamenán v prvním obmýtí. U výsadeb z roku 2008 při první sklizni v únoru 2012 v kontrolní variantě stoupala mortalita klonů RRD v následujícím pořadí P1(15 %) < S2 (23 %) < P2 (24 %) < S1 (42 %), zatímco v hnojené variantě byla mortalita obecně vyšší a rostla v pořadí S2 (40 %) < S1 (41 %) < P1 (50 %) < P2 (51 %). Ve variantě hnojené kalem měly klony topolů nejen nižší výnos než v kontrolní variantě, ale i vyšší mortalitu. V následujících letech mortalita stoupala jen zanedbatelně (detaily podkapitola 4.2). V kontrolní variantě výsadeb 2009 mortalita rostla v odlišném pořadí S1 (20 %) < P1 (21 %) < S2 (39 %) < P2 (43 %). Poměrně vysoká úmrtnost u obou výsadeb byla pravděpodobně výsledkem zaplevelení (Larsen et al., 2014) a také vysoké hustoty výsadby (30 769 rostlin·ha⁻¹), čímž došlo k samozředění. Nynější reálná hustota výsadeb se pohybuje zhruba v rozmezí od 15 000 do 20 000 rostlin·ha⁻¹ v závislosti na klonu, variantě ošetření a roku výsadby. Typická

hustota výsadby na hektar se u klonů RRD pro energetické účely pohybuje mezi 6 000 a 12 000 pro klony topolů a mezi 10 000 až 20 000 pro klony vrb (Van de Walle et al., 2007; Havlíčková et al., 2010). Podle rozdílů v mortalitě mezi oběma výsadbami, lze usuzovat, že velký význam na ujmoutí a růst řízků mají především klimatické a ekologické podmínky v prvním roce po výsadbě (Mrnka et al., 2011; Larsen et al., 2014).

5.1.2 Obsah rizikových prvků v nadzemní biomase

Obsah RP v biomase klonů RRD také může být, stejně jako výnos biomasy, ovlivněn mnoha vnějšími i vnitřními faktory. Prvky se mohou různou měrou akumulovat v jednotlivých klonech RRD, ale také v jednotlivých částech téhož klonu v závislosti na druhu a stáří sledovaného pletiva (Laurensys et al., 2005; Maxted et al., 2007a; Mayerová et al., 2017). Ve všech realizovaných experimentech klony vrb (S1 a S2) obsahovaly ve svých pletivech vyšší obsahy Cd a Zn než klony topolů. Naopak klon P1 akumuloval více Pb než ostatní klony. To je v souladu s nádobovými pokusy Fischerové et al. (2006) nebo Mayerové et al. (2017) a naznačuje to významnou variabilitu mezi klony (Stolarski et al., 2017).

Aplikace čistírenských kalů na akumulaci RP neměla příliš velký vliv. Obecně RP byly více akumulovány v kontrolní variantě než ve variantě hnojené čistírenským kalem, ale ne statisticky významně a bylo zde i několik výjimek (detaily viz tabulka 2 v podkapitole 4.2). Provedené polní pokusy Placek et al. (2016) ukázaly, že přidání čistírenského kalu do půdy zvýšilo sorpci RP v půdě, zejména v organické hmotě a snížilo tím akumulaci Cd, Pb a Zn v rostlinách. Také Garrido et al. (2012) uvedli, že čistírenský kal představuje zdroj organické hmoty a tím přispívá k novým sorpčním místům pro RP.

Pokud porovnáme obsahy RP mezi jednotlivými sklizněmi (2012, 2014 a 2016) jednoznačně nejvyšší obsahy Cd, Pb a Zn byly naměřeny v první sklizni (viz tabulka 2 v podkapitole 4.2 a tabulka 1 v podkapitole 4.4). Důvodem může být zředovací efekt, neboť v první sklizni měly všechny klony nejnižší výnos biomasy a zároveň nejdelší dobu (4 roky) pro akumulaci prvků. Podle studie Tinker et al. (1981) vysoká míra růstu rostlin může způsobit vnitřní "zředění" stopových prvků. Také Hejcman et al. (2010) uvádějí, že obsahy některých prvků v rostlinné biomase měly negativní korelaci s produkcí biomasy, pravděpodobně kvůli zředovacímu efektu. V následujících sklizních byly obsahy RP ve výhonech klonů RRD významně nižší oproti první sklizni, ale došlo k výraznému zvýšení výnosu biomasy a zkrácení doby akumulace na dva roky. Obsahy RP naměřené v biomase ze sklizní 2014 (po 2 letech), 2016 (po 2 letech) a 2016 (po 4 letech) jsou nižší oproti obsahům zjištěným v biomase ze sklizně 2012 pravděpodobně v důsledku

kombinace dvou faktorů: intenzita produkce biomasy a délka expozice. Podle studie Tózsér et al. (2017) se míra akumulace Cd a Zn u klonů vrb výrazně zvýšila s prodlužující se dobou expozice, která by měla trvat nejméně tři roky.

U klonů, sklizených v zimě jsme našli u výhonů významné rozdíly mezi obsahy RP akumulovaných ve dřevě a v kůře. Obsahy všech analyzovaných prvků byly v kůře obecně vyšší než ve dřevě (viz tabulka 1 podkapitola 4.1), což je v souladu s předchozím výzkumem (Laureysens et al., 2005, Maxted a kol., 2007). Dále jsme zjistili, že obsahy většiny prvků (P, K, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn a Zn) ve dřevě i v kůře klesaly s narůstajícím věkem výhonů (viz tabulka 1 podkapitola 4.1). Vyšší obsah prvků u mladších (menších) výhonků v porovnání se staršími (většími) výhony lze také vysvětlit zředovacím efektem; ředění prvků v mladších výhoncích je nižší než u starších výhonů, protože mladší výhonky mají mnohem nižší množství biomasy. K podobným výsledkům došli Stolarski et al. (2017), kteří uvádějí, že obsah všech sledovaných prvků se výrazně snížil s prodloužením obmýtí. Obsahy RP u tříletých výhonů oproti jednoletým výhonům poklesly o 11 až 20 %. Také podle Liu et al. (2016) dosáhly klony pěstované v tříletém obmýtí vyšších průměrných ročních výnosů, ale nižších obsahů prvků v pletivech, včetně RP, než klony pěstované v jedno– až dvouletém obmýtí. V případě Pb nebyl tento trend jednoznačný. Ve dřevě byl zaznamenán malý nárůst obsahu Pb se zvyšujícím věkem, ale u kůry tomu bylo opačně (viz tabulka 1 podkapitola 4.1). To může souviset s nízkou mobilitou Pb v rostlině, kde se hromadí především v kořenech a ve spodních, tedy většinou starších, částech rostlin (Poleć–Pawlak et al. 2007).

Většina klonů sklizených v létě akumulovala vyšší obsah všech prvků včetně RP v listech než ve větvích, s výjimkou Pb u klonu P1. Tento trend vyšších obsahů RP (zejména Cd a Zn) v listech než ve větvích odpovídá předchozím výsledkům z nádobových (Fischerová et al., 2006; Bedell et al., 2009) i polních pokusů (Laureysens et al., 2005; Maxted et al., 2007; Van Slycken et al., 2013; Hu et al., 2014). Naopak u klonu P1 byl obsah Pb ve větvích srovnatelný a dokonce i nepatrně vyšší než v listech. Listy obsahovaly také podstatně více živin. Obsahy Mg, P, N a K byly obecně 6krát, 4,5krát, 4krát a 3,5krát vyšší v listech než ve větvích (viz tabulka 1, podkapitola 4.3). Pokud je nadzemní biomasa RRD sklizena i s listy, odstraní se z půdy více RP, ale také mnohonásobně více živin. Zároveň vysoký obsah N v biomase představuje nevýhodu pro její spalování. Zatímco většina RP zůstává podle studie Šyc et al. (2012) v popelu, vysoký obsah N ve spalované biomase by mohl zvýšit produkci NO_x (Fournel et al., 2015).

Zároveň se zvyšuje riziko zpětného uvolnění RP z listů zpět do prostředí při manipulaci a skladování kontaminované biomasy, což bude podrobněji řešeno v podkapitole 5.2.

5.1.3 Odběr rizikových prvků z půdy a fytoremediační faktor

Odběr RP z půdy je dán součinem obsahu RP v pletivech rostlin a výnosu biomasy těchto rostlin (Antoniadis et al., 2017). Oba klony vrb (S1 a S2) akumulovaly vysoká množství Cd a Zn. Zároveň klon S2 dosahoval velmi vysokých výnosů, i když většinou nepatrně nižších než klon P1. Klon S2 dosáhl nejvyšších odběrů Cd a Zn ze všech sledovaných klonů ve všech realizovaných experimentech. Celkem klon S2 po 8 letech růstu ve dvou čtyřletých obmýtích (sklizeň 2012 + 2016), odebral z půdy $1,4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd, $1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Pb a $16 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn. Klon S1, který sice akumuloval velmi vysoká množství Cd a Zn, ale měl nízký výnos biomasy, odebral $0,44 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd, $0,24 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Pb a $4,3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn (viz obrázek 1b, 1c, 1d v podkapitole 4.4). Také ve dvouletém pokusu Kacálkové et al. (2015) se dvěma klony vrb a se dvěma klony topolů dosáhl klon S2 nejvyšších odběrů Cd a Zn ($33,6 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ Cd; $3956 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ Zn). Nejvyšší odběr Pb byl zaznamenán u klonu P1, který měl obecně nejvyšší výnos a zároveň akumuloval nejvíce Pb. Po osmi letech růstu (sklizeň 2012 + 2016) klon P1 naakumuloval $0,95 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd, $1,6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Pb a $12,5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn (viz obrázek 1b, 1c, 1d v podkapitole 4.4). Ve tříletém polním pokusu Mayerové et al. (2017) se sedmnácti rostlinnými druhy, odebral klon P1 také nejvyšší množství Pb ($0,08 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) a druhé nejvyšší množství Cd ($0,07 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) a Zn ($2,8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Klon P2 odebral během 8 sledovaných let (sklizeň 2012 + 2016) $0,27 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd, $0,28 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Pb a $2,3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn (viz obrázek 1b, 1c, 1d v podkapitole 4.4). V polním pokusu Laureysens et al. (2005) na mírně kontaminované půdě (celkový obsah: $0,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd a $161,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Zn) šestiletý klon P2 odebral během dvou let $0,047 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd a $2,4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn. Při porovnání odběrů RP mezi jednotlivými sklizněmi (2012 po 4 letech, 2014 a 2016 po 2 letech a 2016 po 4 letech) byly nejnižší odběry zjištěny u čtyřletých rostlin sklizených v první sklizni v roce 2012. Odběry se v této sklizni pohybovaly v závislosti na klonu v rozmezí $0,03\text{--}0,13 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ pro Cd; $0,02\text{--}0,14 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ pro Pb a $0,29\text{--}1,09 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ pro Zn (viz tabulka 4. v podkapitole 4.2). Ve sklizni 2012 byly v rostlinných pletivech naměřeny nejvyšší koncentrace RP, avšak zároveň v této sklizni měly sledované klony RRD nejnižší výnos. V dalších sklizních byly obsahy RP nižší než v první sklizni, ale výnos biomasy byl vyšší a obecně stoupal v pořadí 2014 (po 2 letech) > 2016 (po 2 letech) > 2016 (po 4 letech). Obecně ve stejném pořadí jako výnos biomasy stoupal i odběr RP. Zároveň odběry zjištěné ve sklizni 2016 provedené po čtyřech letech byly vyšší než součet odběrů

zjištěných ve dvouletých sklizních provedených v roce 2014 a 2016 (viz obrázek 1a, 1b a 1c v podkapitole 4.4). U čtyřletých klonů sklizených v první sklizni byly nalezeny významně vyšší obsahy RP v kůře než ve dřevě, ale vyšší odběry RP byly vypočteny pro dřevo (tabulka 4 v podkapitole 4.1), neboť kůra zaujímal mnohem méně biomasy než dřevo. K podobným závěrům došli také Laureysens et al. (2005) a Maxted et al. (2007a). Zároveň byly naměřeny vyšší obsahy RP v jednoletých a dvouletých výhonech oproti tříletým a čtyřletým výhonům, avšak 60–70 % RP bylo odebráno tříletými a čtyřletými výhony, které představovaly 61–80 % celkové biomasy (tabulka 5 v podkapitole 4.1). Podobně tomu bylo i u pětiletých klonů výsadby 2009, které byly sklizeny po dvou letech ve druhém obmýtí na konci vegetačního období i s listy. Významně vyšší obsahy RP byly naměřeny v listech oproti větvím, ale vyšší odběr RP (s výjimkou Zn) byl zjištěn u větví (viz tabulka 2 v podkapitole 4.3), které měly vyšší výnos biomasy než listy. Klony RRD neakumulují tak vysoké obsahy RP jako hyperakumulátory, ale produkují velké množství biomasy (Fischerová et al., 2006). Z výše uvedeného vyplývá, že v případě RRD je odběr RP ovlivněn především výnosem biomasy (Komárek et al., 2008; Lonardo et al., 2011; Mayerová et al., 2017).

Fytoextrakční potenciál zkoumaných klonů lze vyjádřit pomocí remediačního faktoru (RF), což je podíl prvku odstraněného biomasou z celkového množství prvku na dané lokalitě (detaily v podkapitolách 4.1, 4.2, 4.3 a 4.4). Ve všech sklizních byly nejvyšší RF pro Cd a Zn nalezeny u klonu S2 a pro Pb u klonu P1 (viz podkapitoly 4.1, 4.2, 4.3 a 4.4). V první sklizni čtyřletých klonů, provedené v únoru 2012, byly nejvyšší dosažené hodnoty následující: RF Cd = 0,85 % (0,21 % za rok), Pb = 0,005 % (0,001 % za rok) a Zn = 0,15 % (0,04 % za rok; viz podkapitola 4.1). Hodnoty RF vypočtené v první sklizni byly nejnižší v porovnání s následujícími sklizněmi a byly zcela nesrovnatelné s RF dosaženými v nádobových pokusech (Vysloužilová et al., 2003a; Komárek a kol., 2008), ale byly srovnatelné s RF (0,13 % pro Cd a 0,29 % pro Zn) z polních pokusů (Jensen et al., 2009). Schmidt (2003) a Antoniadis et al. (2017) uvádějí, že rostliny pěstované v nádobových pokusech akumulují vyšší množství RP než rostliny pěstované v polních podmínkách, neboť kořeny rostlin se snaží vyhnout ohniskům kontaminace a část RP je uložena v listech a kořenech, které se většinou nesklízají (Dickinson a Pulford, 2005). Podobně, jako se v dalších sklizních zvyšoval odběr RP, zvyšovaly se i RF. Poměrně vysoké RF byly nalezeny ve druhé sklizni, provedené v září 2014, která se realizovala po dalších dvou vegetačních sezónách u pětiletých klonů výsadby 2009 (tzv. letní sklizeň), kdy byla nadzemní biomasa sklizena i s listem: Cd = 1,34 % (0,67 % za rok), Pb = 0,007

% (0,0035 % za rok) a Zn = 0,67 % (0,34 % za rok; viz podkapitole 4.3). Nejvyšší RF byly však zjištěny u osmiletých klonů výsadeb 2008 sklizených v únoru 2016 ve druhém čtyřletém obmýtí: Cd = 6,39 % (1,6 % za rok), Pb = 0,04 % (0,01 % za rok) a Zn = 2,55 % (0,64 % za rok; viz podkapitola 4.4). Ani v této sklizni nedosáhly klony RRD v našem experimentu, tak vysokých hodnot RF, jako byly publikované ve studii Vysloužilová et al. (2003a) po dvou letech pěstování: celkové RF pro Cd = 22,3 %; celkové RF pro Zn = 4,3 %, ale již se přibližují k výsledkům z jiných nádobových pokusů, alespoň v případě Pb a Zn. Fischerová et al. (2006) uvedli vysoký roční RF pro Cd (3,4–8,1 % u vrb; 4,6–5 % u topolů), ale hodnoty RF pro Zn (1,2–2,2 % u vrb; 1,6–1,8 % u topolů) a pro Pb (0,005–0,012 % u vrb; 0,024–0,025 % u topolů) jsou srovnatelné s našimi výsledky. Podobné jsou i RF (Cd = 2,22 %, Zn = 0,48 % a Pb = 0,02 %) z nádobového pokusu na mírně kontaminované půdě ve studii Komárek et al. (2008). Hodnoty RF vypočtené v našich pokusech pro Cd a Zn ukazují, že klony RRD, především vrby, jsou vhodné fytoextrakční rostliny na středně kontaminované půdě pro tyto prvky (Vysloužilová et al., 2003a; Mayerová et al., 2017), avšak hodnoty RF pro Pb zjištěné v našem experimentu, podobně jako v jiných studiích (Fischerová et al., 2006; Komárek et al., 2008; Mayerová et al., 2017), jsou velmi nízké a naznačují, že fytoextrakce není vhodnou metodou pro remediaci Pb na této lokalitě. Příčinou nízkých hodnot RF pro Pb na sledované lokalitě je pravděpodobně vysoký celkový obsah tohoto prvku v půdě a jeho stabilní vazba na oxidy a organické frakce půdy (Komárek et al., 2008).

5.2 Riziko zpětného uvolnění rizikových prvků z kontaminované biomasy do prostředí

Fytoextrakční metody remediace půd jsou považovány za velmi příznivé pro životní prostředí na rozdíl od fyzikálních a chemických metod. Avšak jsou zde jistá rizika zpětného uvolnění RP do prostředí z vyprodukované kontaminované biomasy. Biomasa větví a listů u klonu S2 a klonu P1, čerstvá nebo vysušená, ponechána kompaktní nebo štěpkovaná byla extrahována dvěma typy činidel, které simulovaly neutrální (deionizovaná voda; pH = 7) nebo kyselé ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, pH = 3) dešťové srážky. Zdá se, že hlavní vliv na uvolnění RP z biomasy větví klonů RRD do výluhu, měla především velikost částic biomasy. Obecně všechny prvky byly více vyluhovány z naštěpkované biomasy, než z biomasy ponechané vcelku a v řezu izolované. Dále se ukázal vliv čerstvosti biomasy Al, Fe a Pb byly více vyluhovány z čerstvé biomasy, zatímco Cd, Cu, Mn a Zn byly více vyluhovány ze suché biomasy (viz tabulka 2 v podkapitole 4.5). Podle Goshe

a Singh (2005) je výhodné skladovat kontaminovanou biomasu kompaktní a vysušenou, avšak podle našich výsledků, je i zde potenciální riziko uvolnění RP (Cd, Cu, Mg a Zn). Naopak, pokud by byla skladovaná čerstvá kompaktní biomasa, mohla by být ovlivněna aktivitou mikroorganismů (Kofman a Spinelli, 1997). V naší studii nebyl prokázán vliv hodnoty pH extrakčního činidla, na rozdíl od některých studií, z nichž je patrné, že koncentrace RP ve výluhu z odpadu nebo z biomasy jsou silně závislé na pH extrakčního činidla (Di Gianfilippo et al., 2016; Pecorini et al., 2017). Nicméně existují studie, které uvádějí, že hodnota pH extrakčního činidla nemá žádný vliv na uvolnění prvků do roztoku. Například Zhao et al. (2017) ve svých pokusech, kde simulovali kyselý déšť (pH = 3) pro vyluhování RP ze silničních sedimentů, zjistili, že tento proces je nezávislý na hodnotě pH. Pokud námi zjištěné koncentrace RP uvolněné do roztoku porovnáme s limity danými českou legislativní normou (94/2016Sb.), Můžeme konstatovat, že koncentrace RP ve výluhu z větví použitých pro fytoextrakční technologii jsou pod limity koncentrací RP vyluhovaných z nebezpečného odpadu pro Cd, Pb a Zn (mezní hodnoty: Cd $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Pb $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a Zn $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Listy jsou však z tohoto hlediska považovány za nebezpečný odpad, neboť extrahované koncentrace Cd a Zn ve výluhu přesáhly stanovené limity (Tabulka 2 a 3 v podkapitole 4.5). Zatímco málo pohyblivé Pb bylo uvolněno z biomasy do roztoku v rozmezí 1,4–7,2 %, Cd bylo extrahováno do roztoku v množství 2 % z dřevní biomasy a až 39 % z listů.

6 Závěr

Všechny zkoumané klony RRD byly schopny růst na stanovišti se středně kontaminovanou půdou RP. Podle různých ošetření (aplikace čistírenských kalů, rok výsadby, délka a pořadí obmýtí) se nepatrně měnilo pořadí klonů ve vztahu k výši výnosu biomasy. Přesto lze za nejproduktivnější klony považovat klon topolu P1 a klon vrby S2. V první sklizni 2012 byl výnos biomasy čtyřletých klonů velmi nízký (P1 – 1,5; S2 – 1,2; P2 – 0,7 a S1 – 0,25 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹), ale v následujících sklizních se obecně zvyšoval se zvyšujícím se pořadím obmýtí a významný vliv na produkci biomasy měla také délka obmýtí. Nejvyššího výnosu biomasy bylo dosaženo u osmiletých klonů ve druhém čtyřletém obmýtí (P1 – 20; S2 – 14,5; P2 – 3,7 a S1 – 3,6 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹), ve kterém byla produkce biomasy znatelně vyšší než ve dvou dvouletých obmýtích dohromady (P1 – 8,5; S2 – 8,5; S1 – 3,2 a P2 – 1 t sušiny·ha⁻¹·rok⁻¹). Značné rozdíly v produkci biomasy mezi dvouletým a čtyřletým obmýtím byly zaznamenány především u topolů. Při druhé sklizni pětiletých klonů, která byla provedena ve vegetačním období, kdy byly klony RRD sklizeny i s listy, se výnos biomasy navýšil o biomasu listů, která zaujímal 15 až 26 % z celkové nadzemní biomasy v závislosti na klonu. Poměr větve/list se zvyšoval s věkem rostliny a tím s celkovým výnosem nadzemní biomasy, podobně jako poměr dřevo/kůra, který byl sledován v první sklizni v období vegetačního klidu. Aplikace čistírenského kalu do půdy, omezila v prvních letech růst většiny klonů RRD, s výjimkou klonu S1. Ve druhé sklizni však došlo k významnému zvýšení výnosu biomasy, především u klonů vrb, pěstovaných na variantě hnojené čistírenským kalem.

U klonů vrb byly nalezeny vyšší obsahy Cd (55 mg·kg⁻¹) a Zn (506 mg·kg⁻¹) ve větvích než u topolů. Naopak klon topolu P1 akumuloval více Pb (až 30 mg·kg⁻¹) než ostatní zkoumané klony. Obsahy RP byly v biomase větví nejvyšší v první sklizni provedené v únoru 2012. V následujících sklizních byly obsahy RP oproti první sklizni nižší, zatímco výnos biomasy byl vyšší. V první sklizni provedené v únoru 2012, byly také zjištěny významné rozdíly mezi obsahem RP v kůře (S1 - 171 mg·kg⁻¹ Cd; P1 až 129 mg·kg⁻¹ Pb a S2 až 1389 mg·kg⁻¹ Zn) a ve dřevě. Obsahy všech analyzovaných prvků včetně Cd, Pb a Zn byly vyšší v kůře než ve dřevě a v obou těchto pletivech klesaly obsahy většiny prvků s nárůstem stáří výhonů. Většina klonů sklizených v létě akumulovala vyšší obsah všech prvků včetně RP v listech (S1 až 62 mg·kg⁻¹ Cd, 36 mg·kg⁻¹ Pb a 1710 mg·kg⁻¹ Zn) než ve větvích, s výjimkou Pb u klonu P1.

Odběr RP klony vrb a topolů byl ovlivněn především produkcí biomasy. Nejnižší odběry RP byly zjištěny u čtyřletých klonů v první sklizni 2012 a nejvyšší odběry RP byly

vypočteny u osmiletých klonů v druhé sklizni 2016 po dalších čtyřech letech. V delším čtyřletém obmýtí byl výnos biomasy a tím i odběry RP u všech klonů vyšší než ve dvou dvouletých obmýtích. Krátká dvouletá obmýtí se zdají být zcela nevhodná především pro klony topolů. Ve všech realizovaných pokusech odebral nejvíce Pb klon topolu P1 a nejvíce Cd a Zn klon vrby S2. Tyto klony byly zároveň nejvýkonnější v produkci biomasy. Během sledovaného osmiletého období ve dvou čtyřletých obmýtích klon P1 odstranil $1,6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Pb a klon S2 $1,4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cd a $16 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn.

Nejvyšší roční RF byly také zjištěny ve sklizni 2016 (druhé čtyřleté obmýtí) u osmiletých klonů S2 (Cd = 1,6 %, Zn = 0,64 %) a P1 (Pb = 0,01 %). Uvedené roční RF jsou téměř srovnatelné s hodnotami z některých nádobových pokusů. Nejvyšší kumulativní RF za celé sledované období osmi let jsou následující: Cd = 7,24 % (klon S2), Pb 0,04 % (klon P1) a Zn 2,70 % (klon S2). Z těchto hodnot lze usuzovat, že fytoextrakce je slibnou metodou na této lokalitě pro Cd a Zn, ale nezdá se být na této lokalitě účinná pro remediaci Pb.

V laboratorních vyluhovacích testech, se jako hlavní faktor, ovlivňující zpětné uvolnění RP do prostředí z kontaminované biomasy větví ukázala velikost částic biomasy. Všechny RP byly více extrahovány z naštěpované biomasy, než z biomasy ponechané vcelku. Z čerstvé biomasy větví byl více vyluhován Al ($2,79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Fe ($2,29 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a Pb ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) zatímco ze suché biomasy Cd ($0,11 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Cu ($0,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Mn ($3,65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a Zn ($13,28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Koncentrace vyluhované z listů byly v mnoha případech mnohonásobně vyšší než u větví Al ($0,98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Cd ($5,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Cu ($0,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Fe ($1,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Mn ($139,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Pb ($1,85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a Zn ($207 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Koncentrace Cd a Zn extrahované z listů přesáhly limity stanovené pro nebezpečný odpad. Z tohoto hlediska může být kontaminovaná biomasa sklizená i s listy velmi riziková.

Výsledky práce naznačují, že tento výzkum je velmi důležitý především z dlouhodobého hlediska. Výsledky osmiletého sledování ukázaly, že testované klony RRD ukazují stále vyšší a vyšší potenciál odběru RP z kontaminované půdy. Je otázkou, zda v následujících letech výnos biomasy a s ním spojený odběr RP ještě stoupne nebo dojde k brzkému vyčerpání klonů RRD, obzvláště při použití velmi krátkých obmýtích či sklizní ve vegetačním období. Další výzkum by měl ověřit, zda dlouhodobé pěstování RRD na tomto stanovišti vede ke změnám obsahu přístupného podílu RP v půdě a zaměřit se na zlepšení způsobů skladování a využití sklizené kontaminované biomasy.

7 Seznam použité literatury

- Abollino, O., Malandrino, M., Giacomino, A., Mentasti, E. 2011. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: a review part I. Extraction procedures, uni- and bivariate techniques and multivariate variable reduction techniques for pattern recognition. *Analytica Chimica Acta*. 688 (2). 104-121.
- Adriano, D. C. 2001. Trace elements in terrestrial environments. 2nd ed.. Springer-Verlag. New York. p. 866. ISBN-10 0387986782.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S. M., Ok Y. S., Sebastian, A., Baum, C., Prasadd, M. N. V., Wenzel, W. W., Rinklebe, J. 2017. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*. 171. 621-645.
- Baker, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy-metals. *Journal of Plant Nutrition*. 3 (1-4). 643-654.
- Baker, A. J. M., Brooks, R. R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1 (2). 81-126.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., Smith, J. A. C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Bañuelos, G. (eds.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers. pp. 85-107. ISBN 978-1-56670-450-2.
- Bedell, J. P., Capilla, X., Giry, C., Schwartz, C., Morel J. L., Perrodin, Y. 2009. Distribution, movement and availability of Cd and Zn in a dredged sediment cultivated with *Salix alba*. *Environmental and Experimental Botany*. 67 (2). 403-414.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17 (1). 21-34.
- Beneš, S. 1994. Obsahy a bilance prvků ve sférách životního prostředí. Část 2, Vstupy prvků do půd zvětráváním hornin, atmosférickými spady, aplikací hnojiv a ostatních surovin ve srovnání s výstupy erozní činností, podzemními vodami a sklizní zemědělských plodin. Ministerstvo zemědělství. Praha. 159 s. ISBN: 8070840900.
- Benetka, V., Pilařová, P., Kozlíková, K. 2009. Yield potential analysis of black poplar in the course of three coppice rotations at two different plant spacings. *Acta Pruhoniana*. 92. 13–17.

- Berthelot, C., Blaudez, D., Leyval, C. 2017. Differential growth promotion of poplar and birch inoculated with three dark septate endophytes in two trace element-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 19 (12). 1118-1125.
- Bjerre, G. K., Schierup, H. H. 1985. Uptake of six heavy metals by oat as influenced by soil type and additions of cadmium, lead, zinc and copper. *Plant and Soil*. 88 (1). 57-69.
- Blake, L., Goulding, K. W. T. 2002. Effect of atmospheric deposition, soil pH and acidification on heavy metal contents in soils and vegetation of semi-natural ecosystems at Rothamsted Experimental Station, UK. *Plant and Soil*. 240 (2). 235-251.
- Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B. D., Raskin, I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental and Science Technology*. 31 (3). 860–865.
- Bolan, N., Naidu, R., Choppala, G., Park, J., Mora, M. L., Budianta, D., Panneerselvam, P. 2010. Solute interactions in soils in relation to the bioavailability and environmental remediation of heavy metals and metalloids. *Pedologist*. 53 (3). 1-18
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B., Scheckel, K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – to mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*. 266. 141-166.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 74 (1). 63-67
- Boriová, K., Urík, M., Matúš, P. 2015. Biosorpcia, bioakumulácia a biovolatilizácia potenciálne toxických prvkov mikroorganizmami. *Chemické Listy*. 109 (2). 109–112.
- Brereton, N. J. B., Pitre, F. E., Shield, I., Hanley, S. J., Ray, M. J., Murphy, R. J., Karp, A. 2013. Insights into nitrogen allocation and recycling from nitrogen elemental analysis and ¹⁵N isotope labelling in 14 genotypes of willow. *Tree Physiology*. 34. 1252-1262.
- Bullard, M. J., Mustill, S. J., McMillan, S. D., Nixon, P. M. I., Carver, P., Britt, C. P. 2002. Yield improvements through modification of planting density and harvest frequency in short-rotation coppice *Salix* spp. – 1. Yield response in two morphologically diverse varieties. *Biomass and Bioenergy*. 22 (1). 15-25.
- Carrillo Zenteno, M. D., de Freitas, R. C. A., Fernandes, R. B. A., Fontes, M. P. F., Jordão, C. P. 2013. Sorption of cadmium in some soil amendments for in situ recovery of contaminated soils. *Water Air and Soil Pollution*. 224 (2). 1418–1426.

- Cibulka, J. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. Academia Praha. s. 432. ISBN 80-200-0401-7.
- Clay, D.V., Dixon, F. L. 1997. Effect of ground-cover vegetation on the growth of poplar and willow short-rotation coppice. *Aspects of Applied Biology*. 49. 53-60.
- Cobbett, C. S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*. 123 (3). 825-832.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 53. 159-182.
- Colpaert, V. J. 2008. Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi. In: Avery, S. V., Stratford, M., van West, P. (eds.). *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*. 27. British Mycological Society Symposia Series. Academic Press, UK. pp. 157-173. ISBN: 978-0-12-374184-4.
- Dalenberg, J. W., van Driel, W. 1990. Contribution of atmospheric deposition to heavy metal concentrations in field crops. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 38 (3). 369-379.
- de Melo, É. E. C., do Nascimento, C. W. A., Accioly, A. M. A., dos Santos A. C. Q. 2008. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*. 65 (1). 61-68.
- Di Gianfilippo, M., Costa, G., Verginelli, I., Gavasci, R., Lombardi, F. 2016. Analysis and interpretation of the leaching behaviour of waste thermal treatment bottom ash by batch and column tests. *Waste Management*. 56. 216-228.
- Di Lonardo, S., Capuana, M., Arnetoli, M., Gabbrielli, R., Gonnelli, C. 2011. Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environmental Science and Pollution Research*. 18 (1). 82-90.
- Dickinson, N. M., Punshon, T., Hodkinson, R. B., Lepp, N. W., 1994. Metal tolerance and accumulation in willows. In: Aronsson, P., Perttu, K. (eds.). *Willow vegetation filters for municipal wastewater and sludges. A biological purification system. Proceedings of a study tour, conference and workshop in Sweden. Section of short rotation forestry*. Uppsala. pp. 121-127. ISBN: 91-576-1916-2.
- Dickinson, N. M., French, C., Putwain, P. 2005. Brownfield remediation using shortrotation coppice. *Proceedings 8th International conference on the biogeochemistry of trace elements (ICOBTE)*. Adelaide, Australia. pp. 256-257.
- Dickinson, N. M., Pulford, I. D. 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International*. 31. 609-613.

- do Nascimento, C. W. A., Xing, B. 2006. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.). 63 (3). 299-311.
- dos Santos, F. S., Magalhães, M. O. L., Mazur, N., do Amaral Sabrinho, N. M. B. 2007. Chemical amendment and phytostabilization of an industrial residue contaminated with Zn and Cd. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.). 64 (5). 506-512.
- dos Santos Utmazian, M. N., Schweiger, P., Sommer, P., Gorfer, M., Strauss, J., Wenzel, W. W. 2007. Influence of *Cadophora finlandica* and other microbial treatments on cadmium and zinc uptake in willows grown on polluted soil. *Plant, Soil and Environment*. 53 (4). 158-166.
- Echeverría, J. C., Morera, M. T., Mazkiarán, C., Garrido, J. J. 1998. Competitive sorption of heavy metal by soils. Isotherms and fractional factorial experiments. *Environmental Pollution*. 101 (2). 275-284.
- Evanko, C. R., Dzombak, D. A. 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. Technology Evaluation Report, TE-97-01. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. Pittsburgh, PA. p. 61.
- Favas, P. J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M. S. 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In: Hernández-Soriano, M. C. (ed.). Environmental risk assessment of soil contamination. p. 485-517. ISBN 978-953-51-1235-8
- Fischerová, Z., Tlustoš, P., Száková, J., Šichorová, K. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*. 144 (1). 93-100.
- Fišer, J., Nováková, M., Macek, T. 2014. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. *Chemické Listy*. 108 (6). 566-571.
- Fitz, W. J., Wenzel, W. W. 2002. Arsenic transformations in the soil – rhizosphere – plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*. 99 (3). 259-278.
- Fontes, M. P. F., dos Santos, G. C. 2010. Lability and sorption of heavy metals as related to chemici, physical, and mineralogical characteristics of highly weathered soils. *Journal of Soils and Sediments*. 10 (4). 774-786.
- Fortier, J., Gagnon, D., Truax, B., Lambert, F. 2010. Biomass and volume yield after 6 years in multiclinal hybrid poplar riparian buffer strips. *Biomass and Bioenergy*. 34 (7). 1028-1040.

- Fournel, S., Palacios, J. H., Morissette, R., Villeneuve, J., Godbout, S., Heitz, M., Savoie, P. 2015. Influence of biomass properties on technical and environmental performance of a multi-fuel boiler during on-farm combustion of energy crops. *Applied Energy*. 141. 247-259.
- Fuksová, Z., Száková, J., Tlustoš, P., Pavlíková, D., Balík, J. 2007. The possibilities of selected plant species to extract toxic elements from contaminated soil (part 1). *Agrochimia* XI. 47. 22-26.
- Garrido, T., Mendoza, J., Arriagada, F. 2012. Changes in the sorption, desorption, distribution and availability of copper, induced by application of sewage sludge on Chilean soils contaminated by mine tailings. *Journal of Environmental Sciences*. 24 (5). 912-918.
- Ghosh, M., Singh, S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal on Energy and Environment*. 6 (4). 214-231.
- Giacomino, A., Abollino, O., Malandrino, M., Mentasti, E. 2011. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: a review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. *Analytica Chimica Acta*. 688 (2). 122-139.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53 (366). 1-11.
- Hall, J. L., Williams, L. E. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*. 54 (393). 2601-2613.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C. 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management*. 19 (3). 187-192.
- Hanč, A., Tlustoš, P., Száková, J., Balík, J. 2007. Změna pohyblivosti kadmia a zinku v čistírenských kalech po jejich úpravě. *Chemické listy*. 101. 807-810.
- Harmens, H., Koevoets, P. L. M., Verkleij, J. A. C., Ernst, W. H. O. 1994. The role of low molecular weight organic acids in mechanism of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist*. 126. (4). 615-621.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*. 321 (1-2). 235-257.
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X-Y., Ahammed, G. J., Qi Z-Y. 2017. Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in Plant Science*. 8 (1492). doi: 10.3389/fpls.2017.01492

- Hasan, S. A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A. 2009. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology*. 30 (2). 165-174.
- Havlíčková, K., Suchý, J., Weger, J., Šedivá, J., Táborská, M., Bureš, M., Hána, J., Nikl, M., Jirásková, L., Petruchová, J., Knápek, J., Vašíček, J., Gallo, P., Stražil, Z. 2010. *Analýza potenciálu biomasy v České republice*. VÚKOZ v.v.i., Průhonice. 498 s.. ISBN 978-80-85116-72-4.
- Hejcman, M., Szaková, J., Schellberg, J., Tlustoš, P. 2010. The Rengen grassland experiment: relationship between soil and biomass chemical properties, amount of elements applied and their uptake. *Plant and Soil*. 333 (1-2). 163-179.
- Hong, C. O., Lee, D. K., Chung, D. Y., Kim, P. J. 2007. Liming effects on cadmium stabilization in upland soil affected by gold mining activity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 52 (4). 496-502.
- Hu, Y., Nan, Z., Jin, C., Wang, N., Luo, H. 2014. Phytoextraction potential of poplar (*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bunge) from calcareous agricultural soils contaminated by cadmium. *International Journal of Phytoremediation*. 16 (5). 482-495.
- Chaney, R. L., Li, Y. M., Brown, S. L., Homer, F. A., Malik, M., Angle, J. S., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Chin, M. 1999. Improving metal-hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. In: Terry, N., Bañuelos, G. S. (eds.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press, Boca Raton. p. 408. ISBN: 1-56670-450-2.
- Chen, Y., Yuan, L., Xu, C. 2017. Accumulation behavior of toxic elements in the soil and plant from Xinzhuangzi reclaimed mining areas, China. *Environmental Earth Sciences*. 76 (5). 226.
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D. Sinha, A. K. 2018. Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Frontiers in Plant Science*. 9. (12) doi: 10.3389/fpls.2018.00012
- Jemal, F., Zarrouk, M., Ghorbal, M. H. 2000. Effect of cadmium on lipid composition of pepper. *Biochemical Society Transactions*. 28 (6). 907-910.
- Jensen, J. K., Holm, P. E., Nejrup, J., Larsen, M. B., Borggaard, O. K. 2009. The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environmental Pollution*. 157 (3). 931-937.
- Jentschke, G., Godbold, D. L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum*. 109 (2). 107–116.

- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace elements in Soil and Plants. 3rd ed.. CRC Press. New York. p. 432. ISBN 0-8493-1575-1.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B. 2007. Trace elements from soil to human. 1st ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. ISBN-10 3-540-32713-4.
- Kacálková, L., Tlustoš, P., Száková, J. 2015. Phytoextraction of risk elements by willow and poplar trees. *International Journal of Phytoremediation*. 17 (5). 414-421.
- Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B., Havel, L. 2004. Využití katalytických reakcí na rtuťové elektrodě pro elektrochemické stanovení metalothioneinů. *Chemické Listy*. 98. 166-173.
- Klang-Westin, E., Eriksson, J. 2003. Potential of *Salix* as a phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant and Soil*. 249 (1). 127-137.
- Kofman, P. D., Spinelli, R. 1997. Storage and handling of willow from short rotation coppice. Research report. Elsamprojekt. Fredericia-Denmark.
- Komárek, M., Tlustoš, P., Száková, J., Chrastný, V. 2008. The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environmental Pollution*. 151 (1). 27–38.
- Larsen, S. U., Jørgensen, U., Lærke, P. E. 2014. Willow yield is highly dependent on clone and site. *BioEnergy Research*. 7 (4). 1280–1292.
- Larsen, S. U., Jørgensen, U., Kjeldsen, J. B., Lærke, P. E. 2016. Effect of fertilisation on biomass yield, ash and element uptake in SRC willow. *Biomass and Bioenergy*. 86. 120-128.
- Lasat, M. M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*. 31 (1). 109-120.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., Ceulemans, R. 2004a. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood, and bark concentrations. *Environmental Pollution*. 131 (3). 485-494.
- Laureysens, I., Bogaert, J., Blust, R., Ceulemans, R. 2004b. Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecology and Management*. 187 (2-3). 295–309.
- Laureysens, I., De Temmerman, L., Hastir, T., Van Gysel, M., Ceulemans, R. 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice

- culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133 (3). 541-551.
- Li, X. D., Poon, C. S., Sun, H., Lo, I. M. C., Kirk, D. W. 2001. Heavy metal speciation and leaching behaviors in cement based solidified/stabilized waste materials. *Journal of Hazardous Materials*. 82. 215-230.
- Liu, N., Jørgensen, U., Lærke, P. E. 2016. Concentrations of chemical elements in willow biomass depend on clone, site and management in the field. *BioEnergy Research* 9 (4). 1216-1230.
- Macek, T., Macková, M., Pavlíková, D., Száková, J., Truksa, M., Singh-Cundy, A., Kotrba, P., Yancey, N., Scouten, W. H. 2002. Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnologica*. 22 (1-2). 101-106.
- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., Marmioli, N. 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between trans and environment. *Environmental and Experimental Botany*. 68 (1). 1-13.
- Maxted, A. P., Black, C. R., West, H. M., Crout, N. M. J., McGrath, S. P., Young, S. D. 2007a. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant and Soil*. 290 (1-2). 157-172.
- Maxted, A. P., Black, C. R., West, H. M., Crout, N. M. J., McGrath, S. P., Young, S. D. 2007b. Phytoextraction of cadmium and zinc from arable soils amended with sewage sludge using *Thlaspi caerulescens*: Development of a predictive model. *Environmental Pollution*. 150 (3). 363-372.
- Mayerová, M., Petrová, Š., Madaras, M., Lipavský, J., Šimon, T., Vaněk, T. 2017. Non-enhanced phytoextraction of cadmium, zinc, and lead by high-yielding crops. *Environmental Science and Pollution Research*. 24 (17). 14706-14716.
- McGrath, S. P., Lombi, E., Gray, C. W., Caille, N., Dunham, S. J., Zhao, F. J. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*. 141 (1). 115-125.
- Meharg, A. A. 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant and Soil*. 274 (1-2). 163-174.
- Melenová, I., Demnerová, K. 2004. Nové možnosti odstraňování polutantů ze životního prostředí a využití multifunkčního permeabilního bariérového systému – multibariéry. *Chemické Listy*. 98. 908-915.
- Michels, E., Annicaerta, B., De Moor, S., Van Nevel, L., De Fraeye, M., Meiresonne, L., Vangronsveld, J., Tack F. M. G., Ok, Y. S., Meers, E. 2018. Limitations for

- phytoextraction management on metal-polluted soils with poplar short rotation coppice-evidence from a 6-year field trial. *International Journal of Phytoremediation*. 20 (1) 8-15.
- Mleczek, M., Rutkowski, P., Goliński, P., Kaczmarek, Z., Szentner, K., Waliszewska, B., Stolarski, M., Szczukowski, S. 2017. Biological diversity of *Salix* taxa in Cu, Pb and Zn phytoextraction from soil. *International Journal of Phytoremediation*. 19 (2). 121-132.
- Mottl, J., Úradníček, L. 2003. Poplars and their leaves (X-ray patterns of poplar leaves). *Acta Průhoniana*. 74. 1-29.
- Mrnka, L., Doubková, P., Habart, J., Sudová, R., Tlustoš, P., Vohník, M., Vosátka, M. 2011. Pěstování vrb a topolů formou výmladkových plantáží na půdách kontaminovaných rizikovými prvky: teoretické podklady a praktický návod pro pěstitele v ČR. Botanický ústav AV ČR. Průhonice. 98 s. ISBN: 978-80-86188-35-5.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., Gibbs, B. F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*. 60 (1-4). 193-207.
- Němeček, J., Vácha, R., Podlešáková, E. 2010. Hodnocení kontaminace půd v ČR. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půd, v. v. i.. Praha. 148 s. ISBN: 978-80-86561-02-4.
- Nielsen, U. B., Madsen, P., Hansen, J. K., Nord-Larsen, T., Nielsen, A. T. 2014. Production potential of 36 poplar clones grown at medium length rotation in Denmark. *Biomass and Bioenergy*. 64. 99-109.
- Nikolić, N., Zorić, L., Cvetković, I., Pajević, S., Borišev, M., Orlović, S., Pilipović, A. 2017. Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus × euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. *iForest – Biogeosciences and Forestry*. 10. 635-644.
- Pagliai, M., Antisari, L. V. 1993. Influence of waste organic matter on soil micro-and macrostructure. *Bioresource Technology*. 43 (3). 205-213.
- Pavlíková, D., Pavlík, M., Stazsková, L., Tlustoš, P., Száková, J., Balík, J. 2007. The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase. *Plant, Soil and Environment*. 53 (5). 201-206.

- Pecorini, I., Baldi, F., Bacchi, D., Carnevale, E. A., Corti, A. 2017. Leaching behaviour of hazardous waste under the impact of different ambient conditions. *Waste Management*. 63. 96–106
- Pedas, P., Schjoerring, J. K., Husted, S. 2009. Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47 (5). 377-383.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin A., Lacercat-Didier L., Roye, S., Blaudez D., Valérie B. 2017. Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environmental and Experimental Botany*. 143. 72-81.
- Placek, A., Grobelak, A., Kacprzak, M. 2016. Improving the phytoremediation of heavy metals contaminated soil by use of sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation*. 18 (6). 605-618.
- Połeć-Pawlak, K., Ruzik, R., Lipiec, E., Ciużyńska, M., Gawrońska, H. 2007. Investigation of Pb(II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 22 (8). 968-972.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. 1998. *Fyziologie rostlin*. AV ČR Praha. 488 s. ISBN: 80-200-0586-2.
- Pulford, I. D., Riddell-Black, D., Stewart, C. 2002. Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. 4 (1). 59-72.
- Pulford, I. D., Dickinson, N. M. 2006. Phytoremediation technologies using trees. In: Prasad, M. N. V., Sajwan, K. S., Naidu, R. (eds.). *Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology and bioremediation*. CRC Press. Boca Raton. p. 375-395. ISBN: 9781420032048.
- Rosselli, W., Keller, C., Boschi, K. 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*. 256 (2). 265-272.
- Sanders, J. R., McGrath, S. P., Adams, T. McM. 1986. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37 (10). 961-968.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41 (2). 105-130.
- Seregin, I. V., Ivanov, V. B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48 (4). 523-544.

- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. 2008. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55 (1). 1-22.
- Sevel, L., Nord-Larsen, T., Ingerslev, M., Jørgensen, U., Raulund-Rasmussen, K. 2014. Fertilization of SRC Willow, I: Biomass production response. *BioEnergy Research*. 7 (1). 319-328.
- Shaheen, S. M., Antoniadis, M., Kwon, E. E., Biswas, J. K., Wang, W., Ok, Y. S., Rinklebe J. 2017. Biosolids application affects the competitive sorption and lability of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc in fluvial and calcareous soils. *Environmental Geochemistry and Health*. 39 (6). 1365-1379.
- Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M. Nadeem, M., Nasim, W., Dumat, C. 2014. EDTA-Enhanced phytoremediation of heavy metals: A review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 23 (4). 389-416.
- Sharma, S. S., Dietz, K. J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*. 57 (4). 711-726.
- Shi, X., Wang, S., Sun, H., Chen, Y., Wang, D., Pan, H., Zou, Y., Liu, J., Zheng, L., Zhao, X., Jiang, Z. 2017. Comparative of *Quercus* spp. and *Salix* spp. for phytoremediation of Pb/Zn mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*. 24 (4). 3400-3411.
- Schmidt, U. 2003. Enhancing phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *Journal of Environmental Quality*. 32 (6). 1939-1954.
- Schweier, J., Molina-Herrera, S., Chirardo, A., Grote, R., Díaz-Pinés, E., Kreuzwieser, J., Haas, E., Butterbach-Bahl, K., Rennenberg, H., Schnitzler, J.-P., Becker, G. 2017. Environmental impacts of bioenergy wood production from poplar short-rotation coppice grown at a marginal agricultural site in Germany. *Global Change Biology Bioenergy*. 9(7). 1207-1221.
- Smith, L. A., Means, J. L., Chen, A., Alleman, B., Chapma, C. C., Tixier Jr. J. S., Brauning, S. E., Gavaskar, A. R., Royer M. D. 1995. Remedial Options for Metals-Contaminated Sites. CRC Press. Boca Raton. p. 240. ISBN: 9781566701808
- Smith, S. E., Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed.. Academic Press. San Diego and London. p. 605. ISBN: 978-0-12-652840-4.

- Steffens J. C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41. 553-575.
- Stolarski, M. J., Niksa, D., Krzyzaniak, M. 2017. Elemental composition of willow short rotation crops biomass depending on variety and harvest cycle. *Biomass and Bioenergy*. 105. 342-350.
- SzÁková, J., Tlustoš, P., Balík, J., Pavlíková, D., Vaněk, V. 1999. The sequential analytical procedure as a tool for evaluation of As, Cd and Zn mobility in soil. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 363. 594-595.
- Šimíček, V. 1992. Vrby při úpravách toků a ekologické obnově krajiny. Agrospoj. Praha. 142 s.
- Šyc, M., Pohořelý, M., Kameníková, P., Habart, J., Svoboda, K., Punčochář, M. 2012. Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crop, *Biomass and Bioenergy*. 37. 106–113.
- Tinker, P.B., MacPherson, A., West, T.S. 1981. Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*. 294 (1071). 41-55.
- Tlustoš, P., SzÁková, J., Pavlíková, D., Balík, J., Hanč., A. 2002. The accumulation of arsenic and cadmium by different species of vegetables. *Proceedings of the ISHS workshop towards an ecologically sound fertilisation in field vegetable production*. Book series: *Acta Horticulturae*. 571. 217-224.
- Tlustoš P., SzÁková J., Fischerová Z., Šichorová K. 2004. Remediacce půd. Sborník 10. konference "Racionální použití hnojiv". Česká zemědělská univerzita v Praze. 69-78.
- Tlustoš, P., Hrubý, J., Balík, J., Pavlíková, D., SzÁková, J., Nedělník, J., Badalíková, B., Hartman, I., Prášek, J. 2005. Metodika fytoextrakce kadmia a zinku z půdy s využitím vysokoprodukčních klonů vrb. Realizační výstup grantu EUREKA OE 108 (E 12567) Fytoremediace organických a anorganických polutantů s použitím vybraných dřevin a zemědělských plodin. Výzkumný ústav pícninářský. Troubsko. 8 s.
- Tlustoš, P., SzÁková, J., Hrubý, J., Hartman, I., Najmanová, J., Nedělník, J., Pavlíková, D., Batysta, M. 2006. Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant, Soil and Environment*. 52 (9). 413-423.
- Tlustoš, P., SzÁková, J., Vysloužilová, M., Pavlíková, D., Weger, J., Javorská, H. 2007. Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of

- willows (*Salix* spp.) grown in contaminated soils. *Central European Journal of Biology*. 2 (2). 254-275.
- Tózsér, D., Magura, T., Simon, E. 2017. Heavy metal uptake by plant parts of willow species: A meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials*. 336. 101-109
- Vácha, R., Sáňka, M., Sáňka, O., Skála, J., Čechmánková, J. 2013. Fluvisol and sediment trace element contamination level as related to their geogenic and anthropogenic source. *Plant, Soil and Environment*. 59 (3). 136-142.
- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., Weyens, N., Tack, F. M. G., Vangronsveld, J. 2013. Field evaluation of willow under short rotation coppice for phytomanagement of metal-polluted agricultural soils. *International Journal of Phytoremediation*. 5 (7). 677-689.
- Vande Walle, I., Van Camp, N., Van de Castele, L., Verheyen, K., Lemeur, R. 2007. Short-rotation forestry of birch, maple, poplar and willow in Flanders (Belgium): I. Biomass production after 4 years of tree growth. *Biomass and Bioenergy*. 31 (5). 267-275.
- Vaněk, V., Balík, J., Černý, J., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P., Valtera, J. 2012. *Výživa zahradních rostlin*. Academia Praha. 570 s.. ISBN: 978-80-200-2147-2.
- Verlinden, M. S., Broeckx, L. S., Van den Bulcke, J., Van Acker, J., Ceulemans, R. 2013. Comparative study of biomass determinants of 12 poplar (*Populus*) genotypes in a high-density short-rotation culture. *Forest Ecology and Management*. 307. 101-111.
- Verlinden, M. S., Broeckx, L. S., Ceulemans, R. 2015. First vs. second rotation of a poplar short station coppice: Above-ground biomass productivity and shoot dynamics. *Biomass and Bioenergy*. 73. 174-185.
- Vondráčková, S., Tlustoš, P., Száková, J. 2017. Can liming change root anatomy, biomass allocation and trace element distribution among plant parts of *Salix × smithiana* in trace element-polluted soils? *Environmental Science and Pollution Research*. 24 (23). 19201-19210.
- Vysloužilová, M., Tlustoš, P., Száková, J. 2003a. Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant, Soil and Environment*. 49 (12). 542-547
- Vysloužilová, M., Tlustoš, P., Száková, J., Pavlíková, D. 2003b. As, Cd, Pb and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements. *Plant, Soil and Environment*. 49 (5). 191-196.
- Weger, J. 2008. Yield of selected poplar and willow clones after 9 years of coppicing. *Acta*

- Pruhoniciana. 89. 5–10.
- Weger, J. 2009. The evaluation of the influence of a rotation length of short rotation coppice on production and growth characteristics of poplar clone Max-4 (*Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* Henry). *Acta Pruhoniciana*. 92. 5–11.
- Weger, J. Bubeník, J. 2011. The evaluation of yield and growth of native willows after 14 years of short rotation coppice. *Acta Pruhoniciana*. 97. 39–46.
- Weger, J., Vávrová, K., Kašpárková, L., Bubník, J., Komárek A. 2013. The influence of rotation length on the biomass production and diversity of ground beetles (*Carabidae*) in poplar short rotation coppice. *Biomass and Bioenergy*. 54. 284-292.
- Weih, M. 2004. Intensive short rotation forestry in boreal climates: present and future perspectives. *Canadian Journal of Forest Research*. 34 (7). 1369-1378.
- Wenzel, W. W., Lombi, E., Adriano, D. 1999. Biogeochemical processes in the rhizosphere: role in phytoremediation of metal-polluted soils. In: Prasad, M. N. V., Hagemeyer, J. (eds.). *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. p. 401. ISBN: 978-3-662-07747-4.
- Willebrand, E., Ledin, S., Verwijst, T. 1993. Willow coppice systems in short rotation forestry: Effects of plant spacing, rotation length and clonal composition on biomass production. *Biomass and Bioenergy*. 4 (5). 323-331.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., Hall, J. L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1465 (1-2). 104-126.
- Williams, P. A., Rayson, G. D. 2003. Simultaneous multi-element detection of metal ions bound to a *Datura innoxia* material. *Journal of Hazardous Materials*. 99 (3). 277-285.
- Yang, Y. Y., Jung, J. Y., Song, W. Y., Suh, H. S., Lee, Y. 2000. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology*. 124 (3). 1019-1026.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L. Q. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*. 368 (2-3). 456-464.
- Zhao, B., Liu, A., Wu, G., Li, D., Guan, Y. 2017. Characterization of heavy metal desorption from road-deposited sediment under acid rain scenarios, *Journal of Environmental Sciences*. 51. 284-293.

- Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A. H., Tarun, A. S., Weber, S. U., Jouanin, L., Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*. 121 (4). 1169-1177.
- Złoch, M., Kowalkowski, T., Tyburski, J., Hrynkiewicz, K. 2017. Modeling of phytoextraction efficiency of microbially stimulated *Salix dasyclados* L. in the soils with different speciation of heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*. 19 (12). 1150-1164.