

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Změny v metabolismu dusíku v rostlině jako důsledek jejího růstu na kontaminované půdě**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Tereza Podmanická**

**Obor studia: Rostlinná produkce**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.**

**Konzultantka: Ing. Veronika Zemanová, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny v metabolismu dusíku v rostlině jako důsledek jejího růstu na kontaminované půdě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2019

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Velmi ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. za její odborné vedení, cenné rady při konzultacích, milý přístup a čas, který mi věnovala při vzniku této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Veronice Zemanové, Ph.D. a Ing. Marii Bazalové za vstřícnost a pomoc v praktické části práce.

# Změny v metabolismu dusíku v rostlině jako důsledek jejího růstu na kontaminované půdě

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo hodnocení vlivu rostoucího obsahu arsenu v půdě na dusíkatý metabolismus v rostlině a půdní charakteristiky. Byly formulovány dvě hypotézy: (1) S nárůstem kontaminace půdy As se mění aktivita nitrátreduktázy v rhizosféře rostlin; (2) Důsledkem kontaminace půdy je oxidační stres rostliny, který se projeví snížením využití přijatého dusíku (hromadění nitrátů v rostlině, změny ve složení aminokyselin). Pro splnění cílů práce byly provedeny analýzy rostlin na obsah arsenu, celkového dusíku, nitrátového dusíku a glutaminu. Na základě půdních rozborů okolní půdy a rhizosféry byly stanoveny obsahy vodorozpustného arsenu, organického uhlíku, nitrátového dusíku a aktivita nitrátreduktázy. Byl založen nádobový pokus s modelovými rostlinami rodu *Pteris* – *P. cretica Albo-lineata*, *P. cretica Parkerii* a *P. straminea*, přičemž rostliny *P. cretica* jsou považovány za hyperakumulátory As. Celkem byly hodnoceny 4 varianty – kontrola bez kontaminace (As0), varianty s přídávkem As do půdy 20 (As1), 100 (As2), 250 (As3) mg As/kg půdy. V této práci byl vyhodnocen 3. odběr po 180 (150) dnech vegetace ve dvou opakováních. Výjimkou je varianta As3 u *P. straminea*, poněvadž došlo k úhynu rostliny vlivem vysoké toxické hladiny As.

Tento pokus potvrdil, že s nárůstem As v půdě se zvýšil obsah As v rostlinách, v jehož důsledku došlo k hromadění nitrátů a celkového dusíku v rostlině. Tyto výsledky byly signifikantní u všech rostlin. Toxická hladina As v rostlinách způsobila změny v asimilaci dusíku do aminokyselin, které se projevily zvýšeným obsahem glutaminu, jenž slouží jako stresový marker. U *P. cretica Albo-lineata* na variantě As3 byl nárůst glutaminu oproti kontrole o 354 %. Schopnost hyperakumulovat As byla potvrzena pouze u *P. cretica Albo-lineata* s nejvyšším detekovaným obsahem – 6 444 mg As/kg sušiny (As3). Na kontaminované půdě byla stanovena aktivita nitrátreduktázy, která vykazovala výrazný klesající trend s narůstajícím obsahem As u všech rostlin, přičemž v okolní půdě činnost toho enzymu byla inhibována výrazněji než v rhizosféře. Na základě těchto výsledků byly obě stanovené hypotézy potvrzeny.

Jedinečnost této práce dokládá skutečnost, že ostatní autoři sledovali některé z charakteristik v krátkodobých pokusech nejčastěji v hydroponiích. Tento pokus byl však založen za přirozenějších podmínek a měl dlouhodobý charakter, proto může mít prokazatelnější výsledky. Tyto výstupy mohou být použity pro další výzkum v oblasti fytoremediace.

**Klíčová slova:** dusík; arsen; toxicita; *Pteris*; stres

# The Changes in Nitrogen Metabolism in Plant as a Result of its Growth on Contaminated Soil

## Summary

The aim of this diploma thesis was to evaluate the effect of the increasing arsenic content in soil on the plant's nitrogen metabolism and soil characteristics. The following two hypothesis were formulated: (1) The activity of the nitrate reductase in the plant's rhizosphere changes with the increase of As contaminated soil; (2) The result of soil contamination is oxidation stress on the plant, which is seen by an decrease in the utilization of nitrogen accepted (accumulation of nitrates in the plant, a change in the composition of amino acids). To achieve the aim of this thesis, the plants were analyzed for arsenic content, total nitrogen, nitrate nitrogen and glutamine. Based on the analysis of the bulk soil and rhizosphere, the water-soluble arsenic, organic carbon, nitrate nitrogen and nitrate reductase activity were defined. A pot experiment with *Pteris* ferns – *P. cretica Albo-lineata*, *P. cretica Parkerii* and *P. straminea* was created, where *P. cretica* plants were considered to be As hyperaccumulators. Four treatments were evaluated in total – control without contamination (As0), As spiked to soil 20 (As1), 100 (As2), 250 (As3) mg As/kg sample soil. This thesis evaluated the third sampling after 180 (150) days of vegetation in two repetitions. The As3 at *P. straminea* option is an exception because the plant died as a result of a high toxic level of As.

This experiment confirmed that increasing As content in the soil, increased the As content in the plants, resulting in the accumulation of nitrates and total nitrogen in the plant. These results were significant in all plants. The As toxicity in the plants caused changes in the assimilation of nitrogen into amino acids. These changes were reflected in higher content of glutamine, which serves as a stress marker. The As3 treatment of *P. cretica Albo-lineata* resulted in a 354% increase in glutamine compared to the control. The ability to hyperaccumulate As was only confirmed in *P. cretica Albo-lineata* with the highest detectable content – 6,444 mg As/kg dry mass (As3). The nitrate reductase activity was determined in the contaminated soil, which showed a significantly decreasing trend with the increasing As content of As for all plants, where the activity of this enzyme was significantly inhibited in the bulk soil than in the rhizosphere. Based on these results, both of the defined hypotheses were confirmed.

The uniqueness of this work is demonstrated by the fact that the other authors observed some of the characteristics in short-term experiments, most often in hydroponics. However, this experiment was long-term and ferns were cultivated in soil, therefore, our results are significant and may be used for further research in the area of phytoremediation.

**Keywords:** nitrogen; arsenic; toxicity; *Pteris*; stress

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Vědecké hypotézy a cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Role dusíku v životním prostředí a zemědělství</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1.2 Dusíkatý cyklus a zdroje dusíku pro rostliny</b> .....	<b>4</b>
3.1.2.1 Fixace vzdušného dusíku.....	5
<b>3.2 Dusík v půdě a jeho přeměny</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2.1 Mineralizační procesy</b> .....	<b>7</b>
3.2.1.1 Amonizace .....	7
3.2.1.2 Nitrifikace .....	9
<b>3.2.2 Denitrifikace</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.3 Ztráty dusíku z půdy</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3 Dusík v rostlině</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.1 Příjem dusíku</b> .....	<b>12</b>
3.3.1.1 Příjem nitrátového dusíku.....	14
3.3.1.2 Příjem amonného dusíku .....	18
<b>3.3.2 Význam dusíku pro rostliny</b> .....	<b>20</b>
3.3.2.1 Nedostatek dusíku .....	20
3.3.2.2 Nadbytek dusíku.....	22
<b>3.4 Arsen a jeho toxicita</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.1 Arsen v půdě</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4.2 Příjem arsenu rostlinou</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4.3 Arsen v rostlině a hyperakumulátory</b> .....	<b>25</b>
3.4.3.1 Vliv arsenu na metabolismus dusíku.....	26
<b>4 Materiál a metody</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Nádobový pokus</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Stanovení obsahů prvků v rostlinách a v půdě</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3 Stanovení aktivity nitrátoreduktázy</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4 Zpracování naměřených dat</b> .....	<b>33</b>
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1 Výnos biomasy</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2 Analýza rostlin</b> .....	<b>37</b>

5.2.1 Obsah arsenu .....	37
5.2.2 Celkový obsah dusíku .....	40
5.2.3 Obsah nitrátového dusíku .....	42
5.2.4 Obsah glutaminu.....	44
5.3 Analýza půdy.....	46
5.3.1 Obsah vodorozpustného arsenu .....	46
5.3.2 Obsah organického uhlíku .....	48
5.3.3 Obsah nitrátového dusíku .....	51
5.3.4 Obsah organického rozpustného dusíku.....	53
5.3.5 Stanovení aktivity nitrátreduktázy .....	55
6 Diskuze .....	58
7. Závěr .....	63
Seznam použité literatury .....	64

# 1 Úvod

Arsen (As) je přirozeně vyskytující se metaloid, který je z výživového hlediska pro rostliny nedůležitý. Za určitých podmínek se v rostlinách může hromadit až po toxické hladiny, tím vstoupit do potravinového řetězce a představovat tak zdravotní riziko pro člověka. V dnešní době je tento problém velmi diskutován například v oblasti pěstování rýže v Indii (Sinha et Bhattacharyya, 2015). Dle Singh et al. (2007) v životním prostředí se koncentrace arsenu zvyšuje jak přirozenou cestou (sopečné emise, zvětrávání hornin, uvolnění z horkých pramenů), tak antropogenní činností (těžba, průmyslová výroba, zemědělství – pesticidy, prostředky na ochranu dřeva, atd.).

Na příjmu a metabolismu arsenu v rostlinách se podílí mnoho mechanismů. Nejtoxičtější formy tohoto prvku jsou As(III) a As(V), přičemž v rostlinách z 90 % převažuje forma As(III). Hlavní působení toxicity arsenu v rostlinách spočívá v tom, že má určitou podobnost v chování jako fosfor, jenž pro rostliny představuje jednu z nejdůležitějších živin, a tím tedy dochází k nepříznivé konkurenci mezi těmito prvky. As(III) disponuje výraznou afinitou k sulfanylovým skupinám (-SH), tudíž může tvořit komplexy s různými thiolovými sloučeninami, přičemž tato skutečnost se negativně odráží v přeměnách dusíku patřící mezi základní makroprvky rostlin. Výše popsané změny vedou k oxidativnímu stresu snižující celkovou vitalitu rostlin a v konečném důsledku mohou zapříčinit jejich úhyn (Abbas et al., 2018).

Existují rostliny, které dokáží ve velkém množství akumulovat toxické prvky do své biomasy, přičemž dosud byla detekována hyperakumulace arsenu u některých kapradin např. *Pteris vittata*, *Pteris cretica*, *Pteris longifolia*. Fytoremediace představuje odstranění znečišťujících látek z prostředí pomocí rostlin a může být efektivním způsobem při sanaci kontaminované půdy (Singh et Ma, 2007). Studium rostlin disponujících schopností hyperakumulace má do budoucna velký význam pro řešení této environmentální problematiky. V současné době se hledají rostlinné hyperakumulátory tvořící větší množství biomasy a otázkou dalšího výzkumu zůstává, jak se tyto rostliny s vysokým obsahem toxického prvku budou bezpečným způsobem likvidovat.



## 2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Hypotézy:

- 1) S nárůstem kontaminace půdy As se mění aktivita nitrátreduktázy v rhizosféře rostlin;
- 2) Důsledkem kontaminace půdy je oxidační stres rostliny, který se projeví snížením využití přijatého dusíku (hromadění nitrátů v rostlině, změny ve složení aminokyselin).

Cílem této diplomové práce bylo studium změn, ke kterým dochází v metabolismu N během růstu rostliny na kontaminované půdě. Hlavním záměrem práce bylo podat ucelený literární přehled se zaměřením na metabolismy N a As v rostlinách a v půdě, dále provést analýzu výsledovaných změn ovlivněných As a v diskuzi předložit věcné argumenty příčin těchto změn.

## 3 Literární rešerše

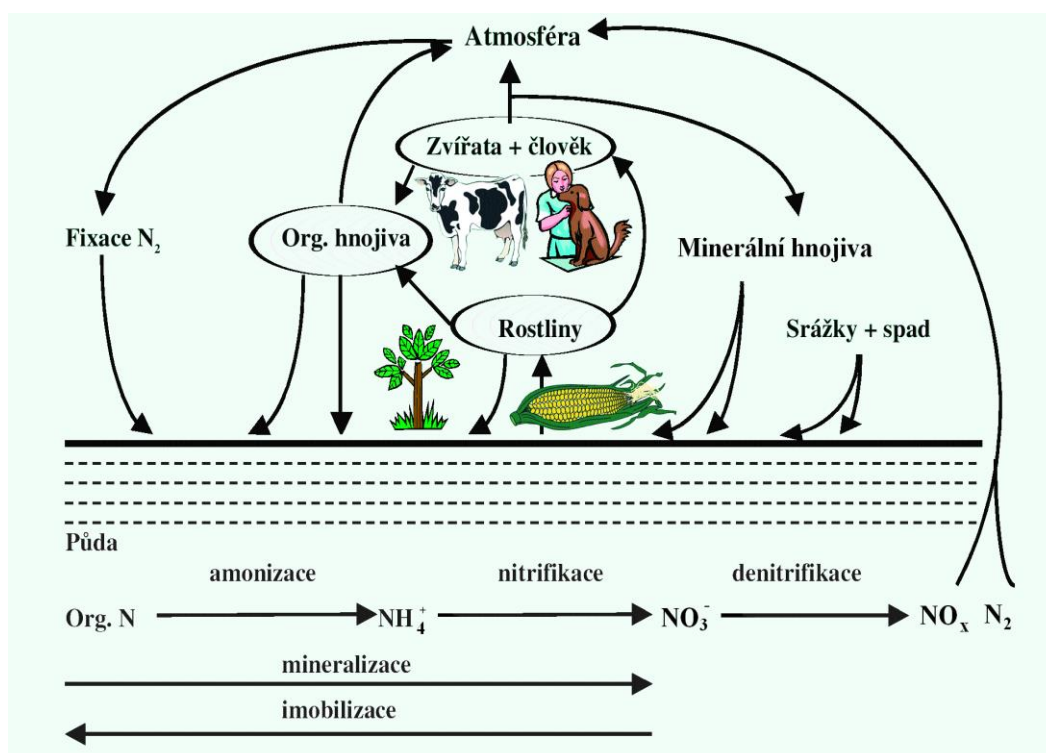
### 3.1 Role dusíku v životním prostředí a zemědělství

Dusík (N) patří mezi základní biogenní prvky, které jsou nezbytné pro přežití všech živých organismů. Tvoří základní stavební kameny mnoha organických sloučenin, jako jsou aminokyseliny, bílkoviny, nukleové kyseliny, chlorofyl, enzymy, fosfatidy, alkaloidy aj. Na Zemi je největší podíl dusíku zastoupen v pevné formě, která je nejstabilnější, přičemž v litosféře se nachází zhruba 98 % celkového N. V elementární podobě dusík tvoří 78 % (77,5 % hmotnostních) zemské atmosféry, přičemž se zde nachází také oxidy ( $\text{NO}_x$ ) nebo amoniak. Nepatrný podíl dusíku zaujímá biosféra a hydrosféra (Balík et al., 2012; Kirkby et Mengel, 2001).

Dusík představuje nejrozšířenější živinu rostlin, kterou lze doplňovat stájevými hnojivy, přičemž v dnešní době podstatná část dusíkaté výživy je zajišťována minerálními hnojivy. Požadavky na zvýšení využití dusíku v zemědělství za účelem zajištění základních stravovacích potřeb jsou v přímé korelaci s neustále rostoucí světovou populací. V celosvětovém měřítku se odhaduje až 40% zvýšení produkce potravin na obyvatele za posledních 50 let. Přidání organických a minerálních dusíkatých hnojiv k pěstovaným plodinám je již dlouhou dobu známo jako jeden z klíčových faktorů přispívající k navýšení výnosů rostlinné produkce, což vede k větší finanční návratnosti. Je zapotřebí dusík využívat efektivně, poněvadž může být rizikovým faktorem přispívajícím ke znečištění vodních zdrojů nebo v plynné formě unikat do ovzduší a podílet se na skleníkovém efektu. V současné době je snahou hledat řešení a vyvíjet nové technologie s cílem minimalizovat nepříznivé dopady dusíku na životní prostředí (Bernhard, 2010; Follett, 2008).

### 3.1.2 Dusíkatý cyklus a zdroje dusíku pro rostliny

Obrázek č. 1 znázorňuje různé formy a cesty dusíku, které cirkulují atmosférou, půdou a živými organismy. Koloběh dusíku je ovlivněn mnoha faktory a procesy, jež jsou chemické, biologické nebo fyzikální povahy (Follett, 2008).



Obr. č. 1 – Schéma koloběhu dusíku; zdroj: Vaněk et al. (2016)

Zjednodušený model dusíkatého cyklu lze popsat následovně. Rostliny ke svému růstu a produkci generativních orgánů nezbytně potřebují dusík, jehož hlavním zdrojem v půdách je organická hmota, která mineralizačními procesy za pomoci půdních mikroorganismů uvolňuje N na rostlinami přijatelné anorganické formy. Dusík je z kořenů rostliny přijímán a následně zabudován do organických sloučenin. Tento přirozený cyklus se uzavírá poté, když se dusík vrací zpět do půdy exkrementy dobytka nebo po ukončení vegetace rostlin. Tyto organické zbytky tvoří primární organickou hmotu (McMcKague, 2005).

Dalšími možnými způsoby, jak dusík vstupuje do cyklu a tvoří tak zdroje pro rostliny, jsou následující:

- Anorganický dusík z atmosféry dostávající se do půdy srážkami, kdy se  $N_2$  oxiduje na  $NO_x$ , případně na  $HNO_3$ .
- Z továren, kde se vyrábí dusíkatá hnojiva.
- Ze živočišné produkce, kde vznikají stájová hnojiva.
- Fixací vzdušného dusíku.
- Z čistírenských kalů, osiva a sadby, avšak tvoří minoritní podíl v dusíkatých zdrojích pro rostliny.

Přirozený koloběh dusíku je zemědělským systémem narušen, poněvadž se biomasa neboli organická hmota pěstovaných rostlin odveze v podobě hlavních, případně vedlejších produktů a dusíkatá bilance se musí tedy doplňovat dusíkatými hnojivy (Bernhard, 2010; Follet, 2008; McMCKague, 2005).

### **3.1.2.1 Fixace vzdušného dusíku**

Velmi významným vstupem N do biosféry a následným zdrojem výživy pro rostliny je biologická fixace dusíku (BNF). Proces BNF uskutečňuje velký počet druhů jak volně žijících, tak symbiotických mikroorganismů pod společným názvem diazotrofové. Tyto organismy produkují enzym nitrogenázu, který katalyzuje redukci elementárního N přes diimid, hydrazin až na amoniak a ten se následně asimiluje do organických sloučenin rostlin. Nitrogenáza sestává ze dvou komponent tzv. Fe-proteinu (azoferredoxin), což je bílkovinná část enzymu, obsahující 4 atomy železa a 4 atomy síry se dvěma vazebnými místy pro MgATP dodávající energii a elektrony druhému komponentu tzv. Mo-Fe-proteinu (molybdoferredoxin), jež je tvořen dvěma atomy molybdenu a až 30 atomy železa a síry. V bakteroidu probíhá redukce dusíku na amoniak, přičemž se v buněčném cytosolu tvoří kyselina asparagová, asparagin a glutamin uplatňující se v dusíkatém metabolismu. Činnost nitrogenázy se odehrává za anaerobních podmínek, proto jsou hlízkové bakterie uzavřeny v hlízkách a potřebně množství kyslíku jim dodává leghemoglobin (Bruijn, 2015; Vaněk et al., 2016; Zehnálek et al., 2006).

Významným zástupcem volně žijících bakterií, tedy nesymbiotických, je *Azotobacter* patřící mezi aerobní heterotrofy. Rod *Clostridium* zastupuje organismy, které jsou aktivní v anaerobním prostředí a oba tyto rody volně žijících organismů fixují pouze malé množství dusíku, přičemž autoři se shodují na rozmezí hodnot 1 - 10 kg N/ha/rok. Nesymbiotická BNF je energeticky méně náročná, než je tomu u symbiotické BNF, uvádí se až 30krát nižší spotřeba energie (Bruijn, 2015; Hillel, 2008).

Symbiotická skupina mikroorganismů získává energii z hostitelských rostlin, na jejichž kořenech se vytvářejí hlízky. Významnými členy této skupiny jsou bakterie rodu *Rhizobium*, které vstupují do symbiózy s rostlinami čeledi *Fabaceae* (jetel, vojtěška, fazol, hrách, podzemnice olejná aj.). Jedná se o velmi náročný energetický proces, na redukci jedné molekuly N<sub>2</sub> je zapotřebí 28 molekul ATP, resp. na 1 kg fixovaného N se spotřebuje 36 MJ energie (Bruijn, 2015; Vaněk et al., 2016).

Dle Vaňka et al. (2016) kvalitní porosty jetele a vojtěšky mohou fixovat 200 - 250 kg N/ha za rok a jednoleté bobovité 40 - 80 kg N/ha.

Mezi další příklady vztahu mezi dusíkatými fixátory a rostlinami lze uvést cyanobakterie na zaplavených rýžových polích nebo organismus *Anabaena* ve spojení s vodní kapradinou *Azola* (Hillel, 2008).

### 3.2 Dusík v půdě a jeho přeměny

Obsah celkového dusíku v ornici nabývá hodnot v průměru 0,1 - 0,2 %, může však kolísat v rozmezí 0,03 - 0,5 %, což po přepočtu odpovídá přibližně 3000 - 9000 kg N/ha. Podstatná část půdního dusíku (cca 99 %) je uložena v organické hmotě, která je tvořena ze živočišných a rostlinných zbytků, různých metabolitů, biomasy mikroorganismů a stabilních organických sloučenin (huminové kyseliny, fulvokyseliny, huminy). Organický dusík v půdě se rozděluje do dvou frakcí – nehydrolyzovatelný N, těžko uvolnitelný ve vazbě například na jádra stabilních huminových kyselin, a hydrolyzovatelný N, který je přítomný ve snadno rozložitelných aminosloučeninách. Stabilita nejvýznamnějších složek primární organické hmoty se významně liší, přičemž kořenové exsudáty jsou rozloženy za několik dní, mikrobiální biomasa a kořenové vlášení se rozkládají několik týdnů a hrubší části rostlin až několik let. Humusové látky představují stabilní organické látky neplnící funkci zásobárny živin, a proto mají poločas rozpadu v řádu několik desetiletí až tisíciletí (Vaněk et al., 2016).

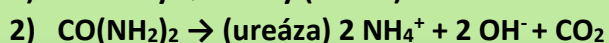
V půdě probíhá řada přeměn dusíku, které jsou schematicky znázorněny na obrázku č. 1, přičemž z hlediska výživy rostlin je významným procesem mineralizace, při které organicky vázaný dusík přechází na minerální frakci. Rostlina přijímá především minerální dusík ( $N_{\min}$ ), a to ve formě amonné ( $NH_4^+$ ) a nitrátové ( $NO_3^-$ ).  $N_{\min}$  tvoří pouze 1 - 2 % z celkového dusíku v půdě (Balík et al., 2012; Vaněk et al., 2016). Fixace  $NH_4^+$  a vyplavování  $NO_3^-$  patří mezi abiotické procesy – fyzikálně chemické, ostatní půdní transformace jsou biotické za účasti půdních mikroorganismů (Kirkby et Mengel, 2001).

### 3.2.1 Mineralizační procesy

Při mineralizaci dochází k přeměně z organických na anorganické formy dusíku ( $N_{\min}$ ), přičemž se tedy jedná o degradaci organických látek bohatých na dusík půdními mikroorganismy. Mezi nejvýznamnějšími skupiny enzymů, které se podílejí na mineralizaci, patří deaminázy, O-glykosidázy a acetylhydrolázy. Reverzním procesem se označuje imobilizace, při které mikroorganismy asimilují organický dusík pro syntézu proteinů a dalších organických dusíkatých sloučenin. Oba tyto procesy se v půdě odehrávají současně a jejich rovnováha je ovlivněna poměrem C:N rozloženého organického materiálu. K čisté mineralizaci může docházet, pokud se uhlík a dusík uvolňují ze sloučenin s podobnou rychlostí degradace a poměr C:N je nižší než 20, naopak čistá imobilizace nastává v případě, že poměr C:N přesáhne hodnotu 30 (Masunga et al., 2016; Šarapatka, 2010).

#### 3.2.1.1 Amonizace

První krok v mineralizačních dějích se uskutečňuje za pomoci heterotrofních mikroorganismů hydrolyzující makromolekuly organických dusíkatých látek na jednodušší sloučeniny.



V následném procesu zvaném amonizace, za účasti široké škály aerobních i anaerobních mikroorganismů, se z těchto snadno rozložitelných organických látek (aminy, aminocukry, aminokyseliny, aj.) uvolňuje  $\text{NH}_3$  a po přijetí protonu ve vodném prostředí přechází na  $\text{NH}_4^+$  (Jalota et al., 2018).

Amonizaci lze demonstrovat na reakci hydrolýzy močoviny, která je součástí hnojiv nebo živočišných odpadních metabolitů. Tento proces katalyzuje enzym ureáza, jež produkuje prakticky všechny mikrobiální a rostlinné druhy. Hydrolýzou močoviny se uvolňuje hydroxylový iont, který zapříčiňuje zvýšení pH vedoucí tedy k alkalickým podmínkám. Za vhodných podmínek, kdy je zvýšená koncentrace  $\text{NH}_4^+$ , vyšší pH a sucho, může dojít k volatilizaci amoniaku, přičemž v půdách těžších s dobrou sorpční kapacitou k těkání  $\text{NH}_3$  dochází omezeně (Singh et al., 2008).

Amonizaci ovlivňuje celá řada faktorů, především povětrnostní podmínky. Optimální teplota pro amonizaci je přibližně  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , s klesající teplotou se její intenzita výrazně snižuje, přičemž kolem  $5\text{ }^\circ\text{C}$  se téměř zastavuje. Probíhá za aerobních i anaerobních podmínek. Vlhkost ovlivňuje mineralizační děj méně než teplota, avšak byl zaznamenán pozitivní vliv na intenzivnější průběh při střídání vlhka a sucha. Optimální rozmezí pH, při kterém nebyly zaznamenány výraznější rozdíly v průběhu amonizace, je 5 až 8. Rychlejší uvolňování minerálních forem N byl pozorován v okolí rhizosféry vlivem vyšší koncentrace snadno rozložitelných organických látek z kořenových výměšků. Rovněž obohacení půdy dusíkem má krátkodobý vliv na zvýšení mineralizace, jedná se o tzv. priming effect, při kterém se zmobilizuje půdní edafon. (Šarapatka, 2010; Vaněk et al., 1997).

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že podle povětrnostních podmínek je nutné správně zvolit druh a dávku hnojiv, abychom minimalizovali možné ztráty N z půdy a zvýšili efektivitu příjmu N rostlinami. Tudíž lze konstatovat, že za teplých a vlhkých podmínek dávky hnojiv k pěstovaným plodinám můžeme snížit (rychlejší průběh mineralizace), a naopak za sucha nebo chladna dávky zvýšit za použití především ledkových hnojiv.

Amoniak uvolněný při mineralizaci může být dále ve formě  $\text{NH}_4^+$  přijímán rostlinami, být fixován v mezivrstvách jílových minerálů či zpětně imobilizován mikroorganismy (Kirkby et Mengel, 2001).

### 3.2.1.2 Nitrifikace

Nitrifikace se účastní podstatná část uvolněného amoniaku v předchozím procesu amonizace. Jedná se o dvoustupňový proces oxidace redukovaných forem dusíku až na dusičnany, kterou vykonávají autotrofní nitrifikační mikroorganismy za aerobních podmínek. Při nitrifikaci získávají energii pro syntézu organických látek sloužící jako zdroj dusíku. Tyto mikroorganismy vykazují širokou škálu metabolických pochodů, což významně ovlivňuje jejich výskyt a kinetiku nitrifikace (Prosser, 2005).

Nitrifikace je ovlivňována řadou vnějších podmínek, především teplotou a vlhkostí, přičemž teplotní optimum se pohybuje v rozmezí 25 - 30 °C, pod 5 °C klesá na minimum. Optimální vlhkost půdy pro nitrifikaci odpovídá 70 % MVK (minimální vzdušné kapacity). Je zapotřebí dostatečná aerace v půdě a slabě kyselé až mírně alkalické pH prostředí. Při pH pod 6,5 se intenzita nitrifikace snižuje a pod 5 se zastavuje (Vaněk et al., 1997). Kyveryga et al. (2004) však uvádějí, že rozpětí pH pro intenzivní nitrifikaci je 6,2 - 9,2.

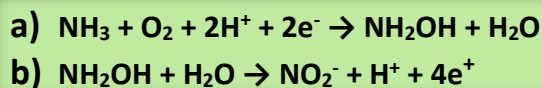
Vliv mají také doprovodné ionty a vlastnosti daného hnojiva, tzn. dusík je pozvolněji nitrifikován z hnojiv obsahující N v amonné formě (síran amonný), zatímco rychlá nitrifikace probíhá u močoviny nebo ledku amonného (Vaněk et al., 1997).

Nitrifikace probíhá ve dvou krocích:

#### 1) Nitritace

Tento děj probíhá za účasti mikroorganismů spadající pod  $\beta$ -proteobacteria a patří sem: *Nitrosospira*, *Nitrosomonas europaea*/*Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas cryotolerans* a *Nitrosomonas sp. Nm143*.

V prvním stupni je amoniak oxidován na hydroxylamin za katalýzy amoniumoxygenázy – na membránu vázaným enzymem. Reakce je endergonická za účasti kyslíku a redukovaných ekvivalentů. Hydroxylamin se poté oxiduje na dusitan hydroxylaminoxidoreduktázou za pomoci kyslíku z vody v exergonické reakci, podle níže přiloženého schématu (Follet, 2008; Prosser, 2005).





## 2) Nitratace

Autotrofní bakterie oxidující dusitany na dusičnany zahrnují čtyři nejdůležitější rody: *Nitrobakter*, *Nitrococcus*, *Nitrosospira* a *Nitrospina*. V půdě byly detekovány pouze rody *Nitrobacter* a *Nitrosospira*, které se od sebe odlišují tím, že rod *Nitrobacter* obsahuje intracytoplazmatické membrány a je příbuzný fotosyntetizujícím organismům, rod *Nitrosospira* nikoliv. Oxidace dusitanů je katalyzována enzymem nitritoxidoreduktázou podle níže uvedené rovnice.



Nitrifikační proces produkuje  $\text{H}^+$  ionty, tudíž snižuje půdní pH,  $\text{HNO}_3$  může být neutralizována bazickými ionty sorpčního komplexu nebo půdního roztoku. Uvolněné  $\text{NO}_3^-$  ionty jsou velmi pohyblivé a slouží jako přímý zdroj dusíkaté výživy pro rostliny. Dále však mohou být vyluhovány nebo podléhat denitrifikaci a jako plynné emise unikát do ovzduší, tudíž přidavkem inhibitorů nitrifikace (NIs) se ztráty dusíku přes tyto dva procesy snižují (Follet, 2008; Prosser, 2005).

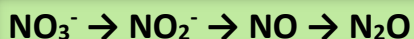
### 3.2.2 Denitrifikace

V našich podmínkách se denitrifikací rozumí stav, při kterém se půdní dusík dostupný pro rostliny stává pro ně nedostupným, poněvadž se navrácí do atmosféry ve formě plynů –  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$  a  $\text{N}_2$ . Tento proces je definován jako mikrobiální redukce dusičnanů nebo dusitanů probíhajícího na základě transportu elektronů fosforylace vedoucí k plynnému N. Při této reakci heterotrofní bakterie využívají dusičnanový iont jako koncový akceptor elektronů během respirace namísto kyslíku. Lze tedy mluvit o respirační denitrifikaci a tento proces probíhá pouze za určitých podmínek. V půdě musí být přítomnost  $\text{NO}_2^-$  nebo  $\text{NO}_3^-$ , které vznikají z  $\text{NH}_3$  v autotrofní nitrifikační dráze, dostupnost snadno rozložitelných sloučenin

s vysokým obsahem uhlíku a samozřejmě nízká nebo žádná koncentrace půdního kyslíku (Groffman et Robertson, 2015; Martens, 2005; Šimek, 2008).



Souhrnná rovnice denitrifikace; zdroj: Vaněk et al. (2016)



Mezistupně denitrifikace

Jednotlivé reakce jsou katalyzovány reduktázami vyskytující se na buněčných membránách G<sup>-</sup> bakterií a jsou inhibovány kyslíkem (Martens, 2005).

Menší význam se přisuzuje denitrifikaci chemické probíhající abiotickou cestou bez účasti mikroorganismů, při níž dochází k redukci amidů při kyselé půdní reakci (Vaněk et al., 2016).

### 3.2.3 Ztráty dusíku z půdy

Ztráty dusíku z půdního a rostlinného systému snižují jak úrodnost půdy a výnosy rostlin, tak nepříznivě dopadají na životní prostředí. Volatilizace neboli emise čpavku do ovzduší přispívají ke kyselým dešťům a představují nepřímý zdroj emisí skleníkových plynů N<sub>2</sub>O. Úniky dusičnanů vyplavující se do řek a jezer mohou způsobit eutrofizaci, která vede k nadměrnému růstu vodních rostlin a sinic, což zapříčiňuje snížení populace ryb a rekreační hodnoty vody. Kontaminace pitné vody dusičnany může vyvolat vážná zdravotní rizika. Denitrifikace představující uvolňování oxidů dusíku do ovzduší přispívá k poškození ozonové vrstvy a rovněž se podílí na změně klimatu (Cameron et al, 2013).

Stupeň ztrát dusíku denitrifikací z aplikovaných hnojiv se může lišit, pohybuje se v rozmezí 0 - 70 %. V USA r. 1998 N<sub>2</sub>O z použitých dusíkatých hnojiv představoval 45 % celkových emisí, oxidu dusného, a tento plyn je v dnešní době velmi diskutovaným skleníkovým plynem, poněvadž má 320krát silnější potenciál v účasti na globálním oteplování než CO<sub>2</sub> (Martens, 2005).

Jednou z možností omezení těchto ztrát je využívání inhibitorů ureázy nebo nitrifikace (NI) při aplikaci hnojiv. Inhibitor ureázy je určen hlavně pro močovinu, případně pro hnojiva s vysokým obsahem močoviny (DAM, SAM, AmisaN). Cílem tohoto inhibitoru je omezit aktivitu

enzymu ureázy, tzn. riziko ztrát  $\text{NH}_3$ . Inhibitory nitrifikace jsou především určeny pro hnojiva s obsahem  $\text{HN}_4^+$  (dusičnan amonný, síran amonný), přičemž u močoviny začíná jejich funkce až po přeměně amidického N na  $\text{HN}_4^+$ . Aktivita půdních nitrifikačních bakterií je snižena a dochází k sorpci  $\text{HN}_4^+$  na půdní částice. Odeznění účinku NI a vznik mobilního  $\text{NO}_3^-$  trvá několik týdnů (Mráz, 2013).

Assing et al. (2007) prováděli experiment na modelové rostlině salátu ve skleníku za stanovených vlhkostních a teplotních podmínek. Ke hnojivu na bázi močoviny byl přidán NI dikyandiamid (DCD) a dále byly monitorovány plynné emise  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{NH}_3$  po dobu pěti týdnů. Na konci experimentu vědci stanovovali koncentraci N nadzemní a podzemní části salátu a provedli rozbor půdního výluhu. Výsledky prokázaly výrazně vyšší ztrátu dusíku ve formě  $\text{NH}_3$  než  $\text{N}_2\text{O}$ . Přidáním DCD byla udržována vyšší půdní koncentrace  $\text{HN}_4^+$  a nižší  $\text{NO}_3^-$ , než tomu bylo na kontrole bez přídatku DCD. Celkově byl DCD účinný při snížení ztrát N emisemi  $\text{N}_2\text{O}$  a vyluhování  $\text{NO}_3^-$ . Vliv na výnos salátu po přídatku NI nebyl zaznamenán.

V posledních letech se rovněž uplatňuje jako NI nitrapyrin, který je obsažen v produktech pod obchodním označením N-serve a Instict. Po přidání nitrapyrinu ke hnoji nebo komerčním hnojivům obsahující  $\text{NH}_3$  je zajištěna kontrola populace bakterií, které jsou odpovědné za iniciaci nitrifikačního procesu. N-serve je na bázi oleje a není mísitelný s hnojem, kdežto Instict obsahuje ve vodě rozpustné mikro-kapsle, které lze ke hnoji přidat. Výzkumníci z Minnesoty rovněž uvádějí, že NI nemají pozitivní vliv na výnosy plodin a lze konstatovat, že pozitivní vliv na výnos je v těsné korelaci s průběhem počasí. Kladné ohlasy na NI ohledně výnosu byly pozorovány v případě vyšších teplot v listopadu nebo pokud byly teplé a deštivé podmínky v dubnu, květnu a červnu. Agronomové uvažující o použití NI by měli produkty považovat jako prevenci před neefektivním využitím hnojiv, nikoliv vždy očekávat pozitivní účinek na výnos za normálních pěstebních podmínek (May, 2014).

## **3.3 Dusík v rostlině**

### **3.3.1 Příjem dusíku**

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, rostliny přijímají dusík především ve formě  $\text{NH}_4^+$  nebo  $\text{NO}_3^-$ , přičemž o příjmu iontů rozhodují vnější podmínky (půdní reakce, teplota,

aerace půdy, přítomnost fenolických alelopatických sloučenin v půdě) a sama rostlina dle výživového stavu. Do určité míry rostlina může přijímat i některé organické sloučeniny např. močovinu nebo aminokyseliny (Maathius, 2009; Pavlíková et al., 2008).

Organický dusík je rostlinami přijímán na stanovištích s nízkým obsahem živin nebo s vysokým obsahem organických látek. V těchto lokalitách kořeny rostlin vylučují vyšší množství polyfenolů urychlující rozklad bílkovin na aminokyseliny. Následně jsou aminokyseliny spolu s fenoly přijímány rostlinami a zabudovány do metabolismu (Zehnálek et al., 2006).

Na příjem obou iontů má výrazný vliv pH půdy. Za experimentálních podmínek bylo zjištěno, že maximální produkce sušiny modelových rostlin rýže nastala při rozmezí pH 5 - 6 u aplikace  $\text{NH}_4^+$  a při pH 4 - 5 u příjmu  $\text{NO}_3^-$ . Při hraničních hodnotách pH 3,5 a 7,5 bylo pozorováno podstatné snížení růstu vegetačních vrcholů a kořenů rostlin u obou variant N forem. Další pozorování ukázalo, že při nejnižší hodnotě pH (3,5) listy a kořeny byly krátké, nezdravě vypadající, zatímco při nejvyšší hodnotě pH (7,5) došlo ke chlorózám listů a ke změně hnědé barvy u kořenů. Vyšší vliv dusíku na příjem ostatních kationtů byl zaznamenán u aplikace nitrátové formy dusíku (Alam, 1984).

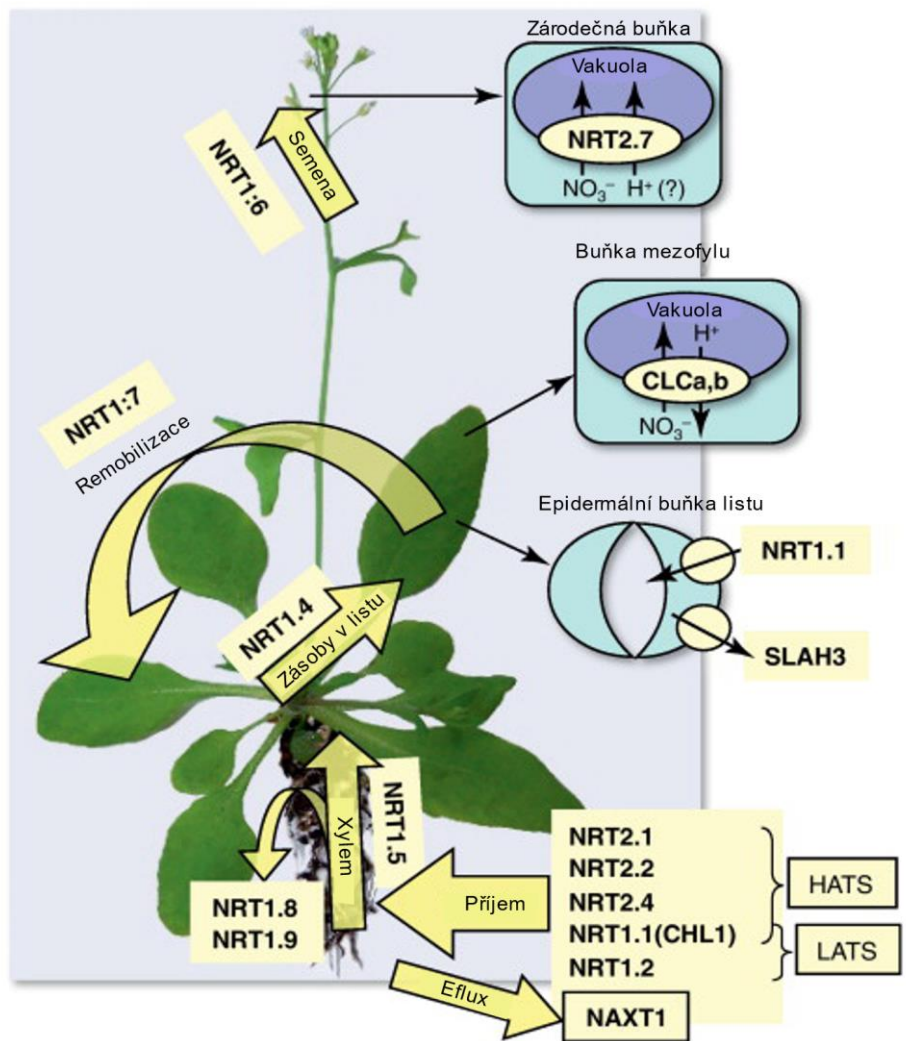
Boczulak et al. (2014) se zabývali pozorováním vlivu teploty na příjem dané N formy. Rostliny vykazují příjmovou plasticitu, ale za určitých teplotních podmínek mohou mít preferenci pro danou N formu, což úzce souvisí se stanovištěm, kde daná rostlina roste. Za chladných podmínek, kde je stupeň mineralizace nízký, se příjem aminokyselin vyrovnává příjmu anorganických forem. Oteplování zvyšuje celkovou dostupnost N v půdě a působí na zvýšený příjem N rostlinami, poněvadž se zvyšuje fluidita membrán a zrychluje metabolismus. Příjem  $\text{NO}_3^-$  vykazuje vyšší citlivost k rostoucím teplotním podmínkám než  $\text{NH}_4^+$ , tudíž za vyšších teplot dochází k vyššímu příjmu nitrátové formy, která je rovněž pohyblivější a lépe se dostává ke kořenům rostlin. Pokud teploty klesnou pod 10 °C, převládá příjem  $\text{NH}_4^+$ .

Evans et al. (1996) zjistili, že rostliny hnojené N ve formě  $\text{NO}_3^-$  měly vyšší listovou plochu, zatímco rostliny s výživou  $\text{NH}_4^+$  vykazovaly zvýšený růst kořenů, což může být odůvodněno tím, že kořeny mají tendenci více růst s cílem dosáhnout na méně pohyblivé formy N. Preference příjmu určité formy N souvisí s energií potřebnou pro příjem, asimilaci a skladování nebo fyziologickým stavem rostliny.

### 3.3.1.1 Příjem nitrátového dusíku

Jedná se o aktivní elektrogenní příjem, zatímco výdej probíhá pasivně. S narůstající koncentrací  $\text{NO}_3^-$  ve vnějším prostředí byly pozorovány dva kineticky odlišné oddíly – vysoce afinitní (HATS) a nízko afinitní transportní systém (LATS). HATS zprostředkovává transport při nižších a LATS při vyšších koncentracích N ( $>1$  mM) v půdním roztoku. Činnost těchto transportních systému závisí na dodávání buněčné energie a pojí se s protonovým elektrochemickým gradientem (Orsel et al., 2002).

V nedávné době byly identifikovány nejméně čtyři genové rodiny transportérů podílejících se na  $\text{NO}_3^-$  transportu, jedná se o: NRT1.1 (NPF), NRT2, CLC, SLAC1/SLAH. Tento transportní systém zahrnuje širokou škálu funkcí: role v architektuře kořenů a získávání živin, skladování dusičnanů a bílkovin ve vakuole, přerozdělování živin na místa potřeby, snímání biotických a abiotických stresů, řízení iontové rovnováhy mezi nitrátem, draslíkem a chloridem, regulace buněčného pH a nakonec řízení cirkadiálního rytmu v C/N rovnováze (Fan et al., 2017). Obrázek č. 2 zobrazuje místa působení jednotlivých transportérů nitrátového N v rostlině.



CLC (chlorid chanel)	NAXT 1 (nitrate excretion transporter 1)
HATS (high afinity transport system)	LATS (low afinity transport systém)
NAXT 1 (nitrate excretion transporter 1)	NRT (nitrate transporter)
SLAH 3 (slow anion chanel, associated homologue 3)	

Obr. č. 2 – Transport nitrátů v rostlině; zdroj: <http://www.imb.sinica.edu.tw/~mbyftsay/>

Transportér NRT1.1 funguje jako HATS, ale může být fosforylován ATP a poté se přepne na LATS v reakci rostliny na zvýšenou koncentraci  $\text{NO}_3^-$  v prostředí. NAXT1 náleží do rodiny NPF (nitrate peptide transport family) a jedná se o protein zodpovědný za exkreci  $\text{NO}_3^-$  ven z buňky. Transportní systém s vysokou afinitou se opírá o činnost skupiny genů NRT2. Proteiny náležící k chloridovému kanálu (CLC) se chovají jako výměník  $2\text{NO}_3^-/1\text{H}^+$  v tonoplastech a

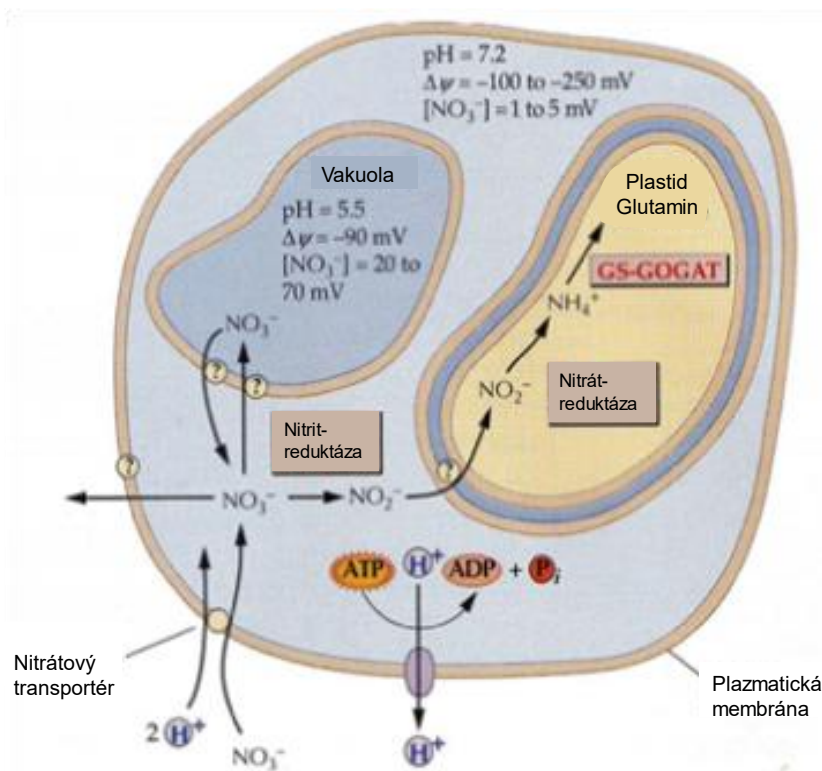
umožňují akumulaci dusičnanu ve vakuole. Genová rodina SLAC (**s**low **a**nion **c**hanel) kóduje iontové kanály v ochranných buňkách a podílí se na uzavírání průduchů (Fan et al., 2017).

Regulace příjmu  $\text{NO}_3^-$  probíhá třemi možnými způsoby: indukci syntézy přenašečů po kontaktu  $\text{NO}_3^-$  s rhizodermis, zpětnovazebnou inhibicí přenašečů produktů asimilace nebo samostatnou regulací rychlosti efluxu (Taiz et Zeiger, 2010).

Proces příjmu  $\text{NO}_3^-$  kořeny rostlin, jejich následná redukce a asimilace představuje hlavní způsob přeměny anorganického dusíku na organický za účasti enzymu nitrátreduktázy (Zehnálek et al., 2006).

Dle Taiz et Zeiger (2010) nitrátreduktáza (NR) představuje limitující faktor při redukci  $\text{NO}_3^-$ , přičemž se jedná o složitý enzymový komplex vyžadující produkty fotosyntézy. Volná NR v cytoplasmě tvoří různé isoformy – NADH, NAD(P)H, NADPH. NR vázána na plazmatickou membránu je vysoce hydrofobní, konstitutivní resp. nezávislá na indukci a vykazuje nižší afinitu k  $\text{NO}_3^-$ . Indukce tvorby NR probíhá za pomoci NIA (**n**itrate **r**eductase **a**ctivity) genů, kde jsou hlavními induktory nitrátové ionty. Aktivita NR je dále řízená fytohormony (cytokininy), zářením v listech přes fytohormony a zvýšenou koncentrací sacharózy nebo glutamátu. Funkci NR ovlivňují rovněž různé cykly (denní, roční, ontogeneze).

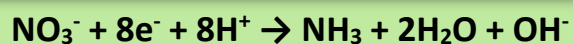
Dusičnan po vstupu do rostliny může být redukován ihned v kořenech nebo až v listech, kam se  $\text{NO}_3^-$  spolu s vodou dopraví xylémem. Preference místa redukce v rostlině (kořeny nebo listy) závisí na těchto faktorech: dostupnost nitrátů, stáří rostliny, teplota, množství uhlíku nebo druhová specifita. V cytosolu může být  $\text{NO}_3^-$  redukován na  $\text{NH}_4^+$ , dočasně umístěn ve vakuole, symplastem transportován do xylému nebo přejít pasivním transportem z kořenů zpět do substrátu (Orsel et al., 2002; Taiz et Zeiger, 2010; Zehnálek et al., 2006).



GS/GOGAT (glutamin syntetáza /glutamin – oxoglutarát

Obr. č. 3 – Procesy asimilace nitrátového N v rostlinné buňce; zdroj: Taiz et Zeiger (2010)

Redukce  $\text{NO}_3^-$  probíhá přes několik dílčích reakcí. Z  $\text{NO}_3^-$  vzniká  $\text{NO}_2^-$ , který je pro buňky škodlivý a musí být tedy nitrátreduktázou redukován přes hyponitrit ( $\text{HNO}$ ) a hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) až na  $\text{NH}_3$  (Zehnálek et al., 2006). Níže je uvedena souhrnná rovnice redukce  $\text{NO}_3^-$ .



Významnou roli při těchto reakcích má přítomnost některých prvků – Mo, Fe, Cu, Mn a Mg. Lze usuzovat, že reakce má alkalický charakter, neboť vzniká aniont  $\text{OH}^-$ . Vzniklý  $\text{NH}_3$  se následně váže na organické kyseliny (oxokyseliny) za vzniku aminokyseliny (Vaněk et al., 2016). Fyziologickými důsledky využíváním  $\text{NO}_3^-$  jsou: menší potřeba C skeletů v kořenech, možnost skladování N a stimulace vegetativního růstu (Taiz et Zeiger, 2010).



### 3.3.1.2 Příjem amonného dusíku

Příjem  $\text{NH}_4^+$  je rovněž aktivní, ale ve formě  $\text{NH}_3$  může difundovat volně přes dvojvrstvé fosfolipidové membrány za vyšších koncentrací v půdním roztoku a alkalických podmínkách.

Uvádí se, že  $\text{NH}_4^+$  působí inhibičně na příjem nitrátové formy a omezuje příjem dalších iontů především kationtů –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Z energetického hlediska je amonný dusík pro rostliny výhodnější, poněvadž může být hned zabudován do aminokyselin bez předchozí redukce, jako je tomu u  $\text{NO}_3^-$  (Kirkby et Mengel, 2001; Vaněk et al., 2016).

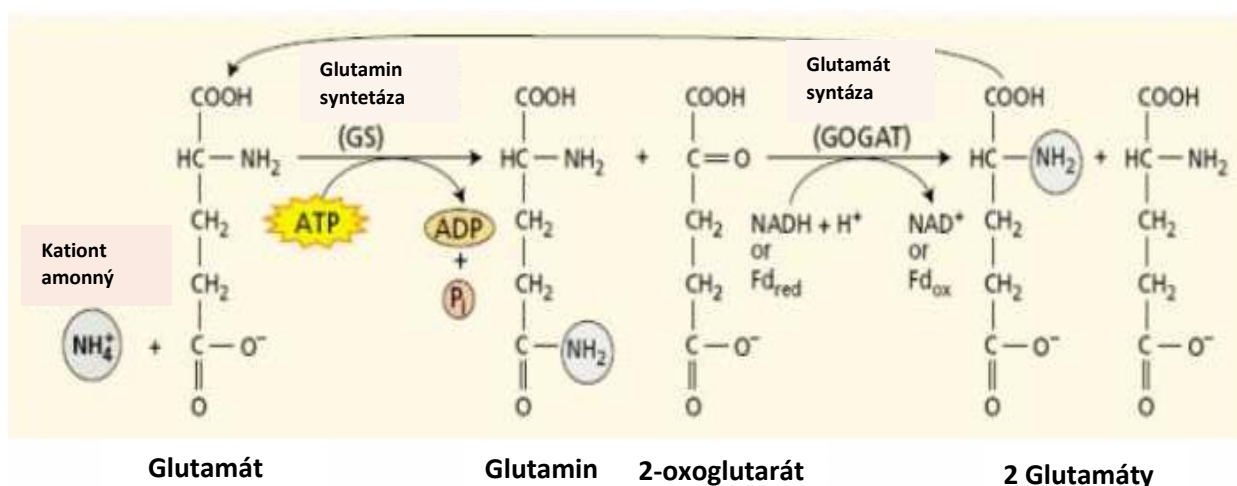
$\text{NH}_4^+$  ionty podléhají rychlé asimilaci, poněvadž mají při zpracování v buňce vysokou prioritu z důvodu toxického účinku. Může se stát, že při výživě  $\text{NH}_4^+$  dojde k vyčerpání sacharidů a nezpracovaný  $\text{NH}_3$  zvýší pH a omezí tak další pochody v buňce – fotosyntézu, dýchání, hormonální regulaci atd. Toxicita nastává již při nízkých koncentracích  $\text{NH}_3$  v rostlině. Pavlíková et al. (2008) uvádějí, že symptomy toxicity  $\text{NH}_4^+$  se objevují již při koncentraci  $\text{NH}_4^+$  0,1 - 0,5 mmol/l, přičemž dochází ke chlorózám, inhibici růstu, omezenému vzcházení a klíčení, zvýšenému poměru nadzemní biomasa : kořeny, sníženému poměru kořenové vlášení : hlavní kořen, zvýšenému větvení kořenů a vodnímu stresu. Tyto změny vyvolává iontová nerovnováha z důvodů hromadění aniontů, což je hlavní příčinou toxicity a nese označení „amoniakální syndrom“.

Bylo zjištěno, že transportu  $\text{NH}_4^+$  v rostlině se účastní genová rodina AMT (**am**monia transporters), která zaujímá určitou prostorovou organizaci proteinů označených AMT1, přičemž transportní proteiny s nejvyšší afinitou (AMT 1.1, AMT 1.3, AMT 1.5) jsou umístěny ve vnějších kořenových buňkách nebo kořenových vláscích, aby mohly převzít  $\text{NH}_4^+$  z půdního roztoku. Protein s nižší afinitou AMT 1.2 se nachází v endodermis v zóně kořenového vlášení a plní transportní funkci při příjmu  $\text{NH}_4^+$ , jenž je uvolňován z kortexu nebo přichází apoplastickou cestou z kořene (Maathius, 2009; Fan et al., 2017).

Asimilaci dusíku do aminokyselin, při níž se  $\text{NH}_3$  váže na oxokyseliny, můžeme demonstrovat na nejběžnější reakci, při níž je výchozím substrátem kyselina oxoglutarová a probíhá dvěma způsoby. Pokud nastane vyšší koncentrace  $\text{NH}_3$ , funkci přebírá enzym glutamátdehydrogenáza katalyzující reakci 2-oxoglutarátu podle níže uvedené reakce.



Druhá cesta probíhá účinnějším enzymovým systémem glutaminsyntetáza (GS)/glutamátsyntéza (GOGAT) podle níže přiloženého schématu.



Obr. č. 4 - Asimilace  $\text{NH}_4^+$  v rostlinné buňce; zdroj: Pavlíková et al. (2008)

GS a GOGAT představuje několik izoenzymů umístěných v buněčných organelách a jejich exprese v jednotlivých rostlinných orgánech nebo buňkách závisí na vegetačním stádiu rostliny. GS se v rostlinných buňkách nachází ve dvou formách s odlišnou aktivitou, jednak se účastní metabolismu dusíku a uhlíku s lokací v chloroplastech a jednak se podílí na zabudování  $\text{NH}_3$  do kyseliny 2-oxoglutarové v peroxizomech nebo mitochondriích. Významná úloha při syntéze aminokyselin je přisuzována glutamátu představující zásobu  $\alpha$ -aminodusíku. Na přeměnách aminokyselin a syntéze sekundárních metabolitů se významně účastní skupina aminotransferáz. Uhlíkaté skelety potřebné pro stavbu aminokyselin se odvozují z meziproductů fotosyntézy, glykolýzy a citrátového cyklu (Zehnálek et al., 2006, Pavlíková et al., 2008).

Dalšími významnými substráty pro vznik esenciálních aminokyselin v rostlinách jsou kyselina oxaloctová, ze které se tvoří kyselina asparagová nebo 3-fosfoglukonát dávající vznik

serinu. Kyselina glutamová a asparagová jsou základními a prvotními kyselinami v rostlinách (Vaněk et al., 2016).

Amonný iont oproti  $\text{NO}_3^-$  způsobuje okyselování půdy v důsledku uvolňování  $\text{H}^+$  iontu a indukuje rychlejší respiraci tzv. vyšší spotřebu sacharidů (Taiz et Zeiger, 2010).

Optimum pro výživu rostlin dusíkem představuje vyvážený příjem  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$ , což nám zaručí stabilní pH rhizosféry i buněk, a tím se zvýší rychlost růstu vegetativních a generativních orgánů (Kirkby et Mengel, 2001).

### **3.3.2 Význam dusíku pro rostliny**

Rostliny potřebují dusík pro růst, vývoj a obranu proti biotickým a abiotickým stresům. Koncentrace N v sušině tvoří 1,5 % z celkového obsahu všech prvků. Dusík je obsažen v řadě významných organických sloučenin, které plní celou řadu funkcí – stavební, metabolickou, transportní i zásobní. Aminokyseliny a dusíkaté báze nukleových kyseliny tvoří základní jednotky primárních metabolitů. Aminokyseliny se spojují peptidickou vazbou a vznikají tak stavební, zásobní a funkční proteiny, dále specifické proteiny, jako např. glykoproteiny, fosfoproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny aj. Rovněž vznikají oligopeptidy, kde je zástupcem glutathion podílející se na detoxikaci těžkých kovů, a polypeptidy. Dusík je rovněž obsažen v dalších sloučeninách, jako jsou aminy, alkaloidy, chlorofyl, vitamíny, aminocukry, cytochromy aj. Rostlinné bílkoviny obsahující 15 - 18,9 % N se nacházejí zvláště v mladých orgánech, dělivých pletivech, enzymech a dalších látkách, jež se podílejí na produkci biomasy (Kirkby et Mengel, 2001; Pavlíková et al., 2008; Vaněk et al., 2016).

#### **3.3.2.1 Nedostatek dusíku**

Pokud nastane deficit dusíku, omezí se tvorba stavebních a funkčních bílkovin, což se projeví v omezeném růstu všech rostlinných částí (listů, stébel, lodyh, letorostů apod.). Rovněž ubývá chlorofyl způsobující žloutnutí. Nejprve jsou postiženy starší pletiva, poněvadž se dusíkaté sloučeniny rozpadají a přesouvají do mladších orgánů, aby se udržel vývoj plodů a semen. První viditelné příznaky se objeví ve špičkách a na okrajích starších listů. Při silném

nedostatku dusíku může být celá rostlina chlorotická, listy odspodu odumírají a můžou opadnout. Omezená tvorba chlorofylu a menší plochy listů vedou ke snížení fotosyntézy, což vede ke snížené tvorbě biomasy. Pokud je omezen růst nadzemní části, tak se zbrzdí i růst kořenů, a tím se sníží jejich energetické zásobování a příjem živin. Kořeny mají tendenci růst do délky, málo se větvit a nabývají tak kúlový tvar. Porosty s nedostatečnou N výživou rychleji dozrávají, vegetační doba se zkracuje a dochází k malému nalévání semen. Poruchy plynoucí z nedostatečného příjmu N se tedy projeví v narušení metabolismu, omezeném růstu, nižším výnosu a horší kvalitě produkce (Kirkby et Mengel, 2001; Vaněk et al., 2016)

Příznaky z nedostatku N se projevují rozdílně u jednotlivých druhů rostlin a záleží na vegetační fázi, ve které se rostlina nachází. Může se stát, že rostlina nemusí mít viditelné příznaky, ale nedostatečný zásobování N zjistíme až po sklizni. Při nízké kvalitě zrna u obilnin dochází ke zhoršeným technologickým parametrům a musí být použito pro krmné nebo jiné účely. U některých plodin je naopak žádoucí, aby přísun N byl dostatečný na počátku vegetace pro tvorbu biomasy, ale ke konci vegetace nižší příjem N napomáhá k fyziologickému dozrávání (cukrovka, hlízy, ovoce, zelenina) nebo k lepším nutričním vlastnostem, kdy nedochází k hromadění nitrátů (Vaněk et al., 2016).



Obr. č. 5 - Deficit N u pšenice; zdroj: web2.mendelu.cz



Obr. č. 6 - Deficit N u kukuřice; zdroj: web2.mendelu.cz

### 3.3.2.2 Nadbytek dusíku

Nadměrný příjem dusíku je méně obvyklý a většinou se projevuje latentní formou, přičemž symptomy jsou opět rozdílné u jednotlivých druhů rostlin a jejich růstových fází. Negativně působí především v počátečních fázích vývoje u drobnosemenné zeleniny, řepy a jetelovin, kdy je potřeba se vyvarovat vyšším dávkám amonné formy N. Vyšší koncentrace N v povrchovém horizontu ornice v podzimních a jarních měsících způsobuje zvýšené větvení kořenů a omezení růstu hlavního kořene, což vyústí ve snížený příjem živin a vody. Mezi viditelné příznaky nadměrné N výživy patří sytě zelené zbarvení, robustní růst rostlin a nekrotické okraje listů způsobené hromaděním dusíku. Může být také pozorováno bohaté větvení a zkroucení listů (např. u cukrovky) a celkové zahušťování porostů, které vytváří vhodné podmínky pro houbové choroby. Vlivem vyššího povrchu rostlin se rovněž snižuje odolnost a pevnost pletiv, proto nastává riziko poléhání za nepříznivého počasí. Nadbytek N prodlužuje vegetační dobu a plodiny později dozrávají (Vaněk et al., 2016; Addiscott, 2005).

Za účelem vyvarování se potíží plynoucí z nedostatku či nadbytku N je zapotřebí znát určitá pravidla ohledně N výživy rostlin a sestavit tak vhodný plán aplikace hnojiv, který se opírá o podklady týkající se povětrnosti a stavu porostů a je třeba provést rozbor rostlin a rozbor půd. Lze využít jak tuhá, tak kapalná N hnojiva, případně mimokořenovou výživu ve formě postřiku. V průběhu vegetace je zapotřebí používat ledková hnojiva, zatímco v základním nebo předseťovém hnojení se preferují hnojiva s amonnou formou dusíku s pozvolnějším působením (Hlušek et Richter, 1996; Vaněk et al., 2016).

## 3.4 Arsen a jeho toxicita

Arsen (As) je toxický polokov, který je široce rozšířen v životním prostředí a organismech. Vyskytuje se v zemské kůře ve vyvřelých horninách o koncentraci 1,5 mg/kg a v usazeninách až 13 mg/kg. Arsen se přirozeně nachází v sulfidických minerálech: arsenopyrit ( $\text{FeAsS}$ ), löllingit ( $\text{FeAs}$ ), realgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) a auripigment ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ). Za přirozený obsah v podzemních vodách se považuje koncentrace asi 5  $\mu\text{g/l}$  (Soudek et al., 2006). Koncentrace As v zemědělských

půdách se běžně pohybuje v rozmezí 1 - 20 mg/kg a teprve nad 20 mg/kg lze půdu považovat za kontaminovanou As (Adriano, 2001). Mezi přirozené cesty uvolňování As patří zvětrávání, biologická nebo vulkanická aktivita, přičemž rizikové prvky pocházející z lidské činnosti patří mezi nejčastější a nejdéle působící kontaminanty životního prostředí. Antropogenní zdroje arsenu mohou být ze spalování pevného odpadu, fosilních paliv, těžby, těžkého průmyslu, sklářského průmyslu, elektrárenských popílků a důlních vod. V neposlední řadě je obsažen v mnoha herbicidech, insekticidech a fungicidech. Je velmi obtížné eliminovat nežádoucí účinky skupiny prvků toxických pro životní prostředí, poněvadž v půdě přetrvávají tisíce let (Tlustoš et al., 2007).

Povolené limity obsahů rizikových prvků pro půdy jsou uvedeny v našich legislativních předpisech: Vyhláška o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Tato vyhláška platí od 1. 6. 2016 a definuje úroveň znečištění našich půd. Pokud jsou tyto limity převyšeny, tak negativně ovlivňují biologické a fyzikálně-chemické procesy v půdách, mohou se dostávat do potravinového řetězce a mít škodlivé účinky na zdraví člověka.

### **3.4.1 Arsen v půdě**

Mobilita a biologická dostupnost arsenu v půdě jsou dány souborem chemických, fyzikálních a biologických vlastností půdy. Důležitou roli hraje pH, redoxní potenciál, půdní druh, obsah organické hmoty a interakce s ostatními prvky. Pohyblivost arsenu v prostředí je omezena silnou sorpcí na jílové minerály, hydro-oxidy (hlavně Fe a Mn) a organickou hmotou. Arsen lze považovat jako prvek s nižší mobilitou a transferem do rostlin (Tlustoš et al., 2007).

Jednotlivé organické a anorganické formy arsenu se liší v půdě mobilitou i toxicitou. V anaerobním prostředí za redukčních podmínek je převládající formou As(III), jež se vyznačuje větší rozpustností, mobilitou a také vyšší toxicitou než As(V), který je naopak častější formou v aerobním prostředí (Finnegan et Chen, 2012).

U arsenu byl zjištěn vyšší příjem rostlinou z půdy současně se vzrůstající hodnotou pH, tudíž jeho mobilita může být podpořena vápněním, na rozdíl od většiny ostatních rizikových prvků, jejichž zásobárnu představují lehké a kyselé půdy. Reakce půdního roztoku ovlivňuje

maximální sorpci arsenu v jednotlivých oxidačních stupních. Maximální adsorpce As(III) a As(V) nastávají při hodnotách pH 8 a 4. Je zajímavé, že minimální adsorpce As(III) a As(V) jsou obě při pH 12 a jejich adsorpce se opět zvýší při vyšších hodnotách pH, jako jsou 13,0 a 13,5 (Wei et al., 2016).

Vliv redoxního potenciálu je významný především u těch rizikových prvků, které se v půdě mohou vyskytovat ve více než jednom oxidačním stupni (Fe, Mn, As, Cu, Hg, a Pb). Prokázalo se, že při vyšších hladinách redoxního potenciálu půdy (500 mV) byla rozpustnost As nízká a v roztoku převažoval ve formě As(V) z 65 - 98 %. Alkalické pH a redukční podmínky uvolnily do roztoku velké množství arsenu, poněvadž As(V) koprecipituje s oxyhydroxidy železa a při změně redoxního potenciálu je uvolňován. Při snížení redoxního potenciálu na -200 mV se rozpustný obsah arsenu zvýšil 13krát oproti 500 mV (Masscheleyn et al., 1991; Tlustoš et al., 2007).

### 3.4.2 Příjem arsenu rostlinou

Na základě hydroponických experimentů u mokřadních rostlin *Spartina alterniflora* a *Holcus lanatus*, při kterých byl zkoumán příjem As rostlinou, bylo zjištěno, že chemická forma je důležitější než celkové množství As v roztoku. Byla určena preference v příjmu As v pořadí  $DMA^V < MMA^V < As^V < As^{III}$ . Jednotlivé formy arsenu jsou rostlinami transportovány odlišnými transportními proteiny a musí překročit různé úrovně selektivity (Soudek et al., 2006).

Fosfátový iont má výsadní postavení v interakci anion-As vzhledem k podobnosti s arsenem. Předpokládá se, že As(V) je přijímán přes fosfátové (Pi) transportéry a může následně interagovat s metabolismem fosforu. Za redukčních podmínek je As(III) přijímán přes komplex NIPs (nodulin intrinsic proteins), přičemž u rýže *oryza sativa* bylo zjištěno, že As(III) sdílí vysoce účinnou křemíkovou (Si) cestu při vstupu do kořenových buněk (Zhao et al., 2009).

Při nedostatku fosforu kořeny rostlin uvolňují karboxylové kyseliny, které se podílejí na mobilizaci anorganického fosforu v rhizosféře, a tím i ovlivňují přístupnost As pro rostliny. U rostlin rostoucích v půdním substrátu přítomnost fosforu způsobuje soupeření As-P o sorpční místa vedoucí k větší přístupnosti As a tím i větší koncentraci As v rostlinách. Avšak u hyperakumulátorů je velmi nepravděpodobné, že by přidání fosforu mohlo mít vliv na projevy

fytotoxicity. Křídelnice *Pteris vittata* je schopna akumulovat až 22 630 mg As/kg sušiny z půdy kontaminované 1500 mg As/kg. Přidání fosforu může jednak podpořit růst rostliny, neboť fosfor je významný makroprvek, a jednak mobilizovat vyměnitelný As, což může vést ke zvýšení jeho příjmu rostlinou (Soudek et al., 2006).

### 3.4.3 Arsen v rostlině a hyperakumulátory

V závislosti na druhu rostlin existují dvě tolerance k arsenu, buď dochází k nepřijetí arsenu (excluder) nebo k jeho akumulaci (akumulátor). Strategie nepřijetí arsenu znamená, že rostlina zabrání arsen přijmout nebo omezí jeho transport do nadzemní části a soustředí rizikový prvek hlavně do kořenů, např. u orobince *Typha latifolia* rostoucího na půdě kontaminované arsenem. Strategie akumulace arsenu byla pozorována u několika suchozemských rostlin např. *Agrostis tenuis* rostoucíh v místech těžby nerostů. Aby rostlina mohla být označena za hyperakumulátor, musí být biokoncentrační faktor větší než 1, což znamená, že koncentrace rizikového prvku v rostlině je větší než v půdě. Hyperakumulátory se vyznačují schopností rychlého převodu prvků z kořenů do nadzemních částí a jejich extrémně vysokým hromaděním v pletivech. Prvními objevenými hyperakumulátory As jsou kapradiny *Pteris vittata* a *Pteris calomelanos* produkující velké množství biomasy, tudíž jsou vhodné pro účely fytoextrakce. Po přidání As u *P. vittata* se dokonce množství biomasy zvýšilo. Hyperakumulace As je nejspíše vlastnost, která nezávisí na vnějších podmínkách, než že by se jednalo o přizpůsobení se podmínkám, poněvadž i populace rostlin z nekontaminovaných míst jsou schopny hyperakumulovat arsen (Soudek et al., 2006).

Rozbory u *P. vittata* prokázaly větší množství arsenu ve starších listech než v mladších orgánech z toho důvodu, že xylém transportující arsen vede přes starší listy po celou dobu vegetace. Dále bylo zjištěno, že rostliny akumulují arsen převážně v anorganické formě, poněvadž suchozemské rostliny nemají systém, který by umožňoval metylaci arsenu tak, jak je tomu např. u mořských řas. Listy obsahují nejvíce trojmocný arsen z důvodu přednostního příjmu As(V) a následné redukce na As(III) za účasti enzymu arsenátoreduktázy. Redukce arsenu je součástí detoxikačního procesu, přestože As(III) je toxičtější formou. Předpokládá se přítomnost některých z komplexů arsen-biomolekula, které by se při extrakci rozložily,



poněvadž tvorba komplexů je nutná pro udržení vysoké koncentrace kontaminantu. Byla potvrzena detoxikace arsenu fytochelatinu u některých rostlin pěstovaných na arsenem kontaminovaném substrátu (Finnegan et Chen, 2012; Soudek et al., 2006).

Obsah arsenu v kulturních rostlinách je obecně nízký i v případě, že rostliny rostou na kontaminované půdě. Neprokázalo se, že by arsen byl pro rostliny esenciálním prvkem, přestože indukuje růst rostlin při nízkých koncentracích. Za normální hladinu obsahu As v rostlinách je považováno 0,01 - 1 ppm a obsahy 3 - 10 ppm mohou být již fytotoxické. As(V) je analogický k fosfátu, proto mu může konkurovat v cytoplasmě tím, že dojde k jeho nahrazení v ATP, což vede k narušení energetického toku v buňkách. As(III) se vyznačuje zase vysokou toxicitou z toho důvodu, že reaguje se sulfanylovou (-SH) skupinou enzymů. Mezi viditelné příznaky toxicity arsenem patří: žloutnutí a vadnutí listů, odbarvení a redukce kořenů, plazmolýza buněk a inhibice růstu. Rostliny, které jsou k arsenu nerezistentní, trpí po vystavení arsenem stresem, což může vést až k úhynu rostliny. Prokázalo se, že působením arsenu je indukována tvorba ROS (reactive oxygen species), která pravděpodobně probíhá při redukcí na As(III) vedoucí k syntéze enzymatických antioxidantů (peroxiddismutáza, kataláza a glutathion-S-transferáza) a neenzymatických antioxidantů (glutathion, askorbát). Glutathion rovněž slouží jako prekurzor fytochelatinu, při jejich tvorbě může dojít k vyčerpání zásob glutathionu, a tudíž ke snížení množství antioxidantů pro eliminaci ROS (Zhao et al., 2009, Soudek et al., 2008).

### **3.4.3.1 Vliv arsenu na metabolismus dusíku**

Singh et al. (2009) se zabývali in vitro účinky arsenu na aktivity enzymů (nitrátreduktázy a nitritreduktázy) podílejících se na metabolismu dusičnanů v kořenech, oddencích a listech 4měsíce starých *Pteris vittata* (As hyperakumulátor) a *Pteris ensiformis*, která naopak není hyperakumulátorem arsenu. Experiment probíhal po dobu 7 dnů v hydroponických nádobách za použití arsenátu sodného (0, 150 a 300 mM). Projevil se nepříznivý vliv na váhu sušiny kořenů a listů, jež byl výraznější u *P. ensiformis* než *P. vittata*. Stupeň inhibice aktivity nitrátreduktázy (NR) vzrostla z 10 na 40 % u *P. vittata* a z 25 na 85 % u *P. ensiformis*, kdy byla koncentrace arsenu zvýšena ze 150 na 300 mM v kultivačním médiu. Podobně i aktivita nitritreduktázy (NiR) u *P. ensiformis* byla snížena a tento efekt byl stejně jako u NR výraznější v kořenech než v nadzemních částech. U *P. vittata* snížená aktivita NiR byla signifikantní

pouze v kořenech při nejvyšší koncentraci arsenu. Inhibice aktivity NR spočívá v tom, že se As naváže na thiolovou skupinu (-SH) enzymu a znemožní tím vazbu na NADH. Bylo také prokázáno, že NR je velmi citlivá na  $N_2O_2$ , jež je arsenem indukován.

Pavlík et al. (2010) sledovali působení arsenu na metabolismu aminokyselin u modelové rostliny špenátu *Spinacea oleracea*, poněvadž metabolismus aminokyselin má ústřední roli při odpovědi rostlin na abiotický stres. Experiment byl proveden při koncentracích As (25, 50 a 75 ppm), jež působí fytotoxicky. Se stoupající koncentrací došlo k silné inhibici nadzemní biomasy a obsah As v rostlině stoupal. Změny hladin glutamátu, asparaginu, aspartátu a prolinu v rostlině vykazovaly silnou lineární závislost na koncentraci arsenu. Ve srovnání s kontrolou koncentrace volného prolinu a aspartátu byly zvýšeny na 381 % a 162 %, u koncentrace alaninu nebyla prokázána lineární závislost. Prolin chrání membrány a proteiny před nežádoucími účinky anorganických iontů o vysokých koncentracích, podílí se i jako hydroxyl na vylučování volných radikálů. Aktivita glutamátkinázy (GK) je regulována zpětnou vazbou na obsah prolinu, proto je aktivita GK při zvýšeném obsahu prolinu snížena. Zvýšenou inhibicí biosyntézy prolinu dochází k přednostnímu využití glutamátu pro syntézu fytochelatinů důležitých pro detoxikaci rizikových prvků, a zároveň k vyčerpání obsahu glutathionu, přičemž následně nastane oxidativní stres. Aspartát se syntetizuje transaminací oxalacetátu a je důležitým prekurzorem esenciálních aminokyselin. Aktivita aspartátaminotransferázy účastní se přeměn a katabolismu aspartátu byla při stresu snížena. Amidací z glutaminu vzniká asparagin za účasti enzymu asparaginsyntetázy závislé na ATP, přičemž tato reakce může být inhibována arsenem kvůli oddělení toku fosforu v transportním systému, což vede k poklesu asparaginu a zvýšenému obsahu aspartátu. Ke kumulaci aspartátu dochází také z toho důvodu, poněvadž je potřebný pro syntézu jiných aminokyselin – threoninu, lysinu a methioninu, jejichž obsah byl snížen. Hjorth et al. (2006) uvádějí, že v reakci na stres dochází k hromadění alaninu z důvodů snížené aktivity alaninaminotransferázy a omezené syntézy proteinů, jako odpověď na změny pH v buňkách nebo hypoxii.

Pajuelo et al. (2008) sledovali vliv arsenu na biologickou fixaci dusíku u vojtěšky (*Medicago sativa*). Zjistili, že na kořenovém systému vojtěšky po vystavení As(III) bylo nižší množství kořenových vlásků a vytvořilo se o polovinu méně rhizobiálních hlízek, což bylo z důvodu 90% snížení rhizobiálních bakteriálních kolonií. Snížená aktivita nitrogenázy byla

z důvodu nižší intenzity fixace  $N_2$  v kořenových hlízkách a také kvůli afinitě arsenu k železu, kde komplex Fe-Mo tvoří kofaktor nitrogenázy.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Nádobový pokus

Pro sledování vlivu As na metabolismus rostlin byl založen vegetační nádobový pokus v pokusném skleníku Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin.

Jako pokusné rostliny byli vybráni zástupci rodu *Pteris*, kapradiny s rozdílnou schopností akumulace As (obr. č. 7):

- a) hyperakumulující variety druhu *Pteris cretica* L. – Albo-lineata a Parkerii,
- b) nehyperakumulující druh *Pteris straminea* Mett. ex Baker.

Pro pěstování rostlin byla použita nekontaminovaná černozem modální odebraná z lokality Praha - Suchdol (50 °8 '8 " N; 14 °22 '43 " E), jejíž základní charakteristika je uvedena v tabulce č. 1. Nádoby byly naplněny 5 kg zhomogenizované zeminy, která byla hnojena N (ve formě  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), P a K (ve formě  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) dle schématu uvedeného v tabulce č. 2. Arsen byl přidáván do půdy ve formě  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  v dávkách uvedených v tabulce č. 2. Do každé nádoby byla zasazena jedna rostlina a každá varianta byla ve dvou opakováních. Kapradiny rodu *Pteris* byly pěstovány ve skleníku po dobu 5 - 6 měsíců při těchto parametrech: teplota den/noc 24 °C/ 18 °C, půdní vlhkost 60 % maximální vodní kapacity, světelný režim den/noc 16 h/ 8 h, intenzita osvětlení 375 W/m<sup>2</sup>. Odběr rostlin byl po 30, 90 a 180 dnech od zasazení do pokusných nádob. V případě *P. cretica* var. Parkerii a *P. straminea* byl poslední odběr rostlin po 150 dnech od zasazení.

Biomasa rostlin byla při odběrech rozdělena na listy a kořeny a byl zjištěn výnos čerstvé biomasy. Část biomasy listů a kořenů, určena pro analýzu volných aminokyselin, fytohormonů a izolaci DNA, byla ihned zamražena v tekutém dusíku a skladována při - 80 °C. Zbytek biomasy listů a kořenů určený pro stanovení obsahu prvků byl sušen 5 dní při 40 °C.



Obr. č. 7 - Kapradiny rodu *Pteris* v den zasazení

Tab. č. 1: Základní vlastnosti pokusné zeminy

typ/subtyp	pH <sub>KCl</sub>	C <sub>org</sub> (%)	KVK (mmol <sub>+</sub> /kg)	As (mg/kg)	As vodorozpustný (mg/kg)
černozem/ modální	7,2 ± 0,3	1,83 ± 0,01	258 ± 0,1	16 ± 1,7	0,1 ± 0,01

KVK – kationtová výměnná kapacita; C<sub>org</sub> – organický uhlík

Tab. č. 2: Schéma nádobového pokusu

Varianta	As (mg/kg)	Hnojení NPK		
		N (g/nádoba)	P (g/nádoba)	K (g/nádoba)
Kontrola	0			
As1	20	0,5	0,16	0,4
As2	100			
As3	250			

## 4.2 Stanovení obsahů prvků v rostlinách a v půdě

### Stanovení arsenu v rostlinách (0,5 ± 0,05 g)

Bylo provedeno po mikrovlnném rozkladu (Ethos 1, MLS GmbH) ve směsi HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1, v/v) metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Varian VistaPro).

### Stanovení volných aminokyselin v rostlinách

Pro stanovení obsahu volných aminokyselin byly vzorky zhomogenizovány v kapalném dusíku. Volné aminokyseliny byly extrahovány z čerstvé biomasy (~0,5 g) 10 ml roztoku metanolu a redestilované vody (7:3 v/v). Po uplynutí 24 hodin byly vzorky centrifugovány při 9 000 g po dobu 20 min. Derivatizace volných aminokyselin v supernatantu byla provedena sadou EZ: faast firmy Phenomenex.

Obsah volných aminokyselin byl měřen metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) na přístroji Hewlett-Packard 6890N/5975 MSD (Agilent Technologies, USA) s kolonou Zebron ZB-PAA-MS 10 m x 0,25 mm, která je dodávána se sadou. Pro nástřik bylo použito 1,5 - 2 µl vzorku s poměrem 1 : 10 a v režimu split. Jako nosný plyn bylo použito helium (He, čistoty 5,0) s konstantním průtokem 1,1 ml/min. Teplotní program pece: počáteční teplota 110 °C, rampa 30 °C min<sup>-1</sup> do teploty 320 °C. Teplota inletu byla 280 °C. Podmínky detektoru MS : MS zdroj 240 °C, kvadrupól 180 °C, aux 310 °C, energie elektronů 70 eV, skenování m/z v rozmezí 45 - 450 a frekvence 3.5 scans<sup>-1</sup>.

### Stanovení celkového N a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Rostlinný materiál a zemina byly rozloženy v mineralizačním bloku topného systému Kjeldatherm koncentrovanou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:20 w/v) s následným stanovením celkového N Kjeldahlovou metodou na destilačním přístroji Vapodest 50s.

Nitrátový N byl ze sušiny kořenů a nadzemní biomasy extrahován destilovanou vodou (1:10, w/v).

## **Stanovení vodorozpustné formy As, minerální a rozpustné organické formy dusíku a organického uhlíku**

Půdní vzorky byly extrahovány demineralizovanou vodou (1 : 5 w/v). Vodorozpustný As byl stanoven na ICP-OES. Minerální a rozpustné organické formy N a organický C byly analyzovány segmentovou průtokovou analýzou na přístroji SKALAR<sup>plus</sup>SYSTEM.

### **4.3 Stanovení aktivity nitrátreduktázy**

Aktivita nitrátreduktázy byla stanovena dle metodiky Abdelmagid a Tabatabai (1987). Vzorky byly inkubovány po dobu 24 hodin se substrátovým roztokem KNO<sub>3</sub> a přidavkem 2,4-dinitrofenolu (DNP), který slouží k blokaci energie potřebné pro nástup druhé fáze denitrifikace – redukce dusitanů. Výsledný obsah dusitanů byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm.

Do polykarbonátových centrifugačních zkumavek bylo naváženo 5,00 g čerstvě odebrané proseté půdy. Ke vzorkům byly automatickou pipetou postupně přidány 4 ml roztoku 2,4-dinitrofenolu o  $c = 0,9$  mmol/l, 1 ml roztoku KNO<sub>3</sub> o  $c = 25$  mmol/l a 5 ml demineralizované vody. Zkumavky byly uzavřeny šroubovacím uzávěrem a obsah byl ručně promíchán. Kontrolní vzorky byly vloženy do mrazicího boxu, kde byly ponechány při teplotě - 20 °C, ostatní vzorky byly inkubovány v termostatu při 25 °C, obojí po dobu 24 hodin. Po inkubaci a roztátí kontrolních vzorků při laboratorní teplotě bylo ke vzorkům ve zkumavkách pipetováno 10 ml roztoku KCl o  $c = 4$  mol/l, suspenze byla ručně promíchána a ihned filtrována přes skládaný filtr.

Pro spektrofotometrické stanovení se do 20 ml zkumavek převedlo 5 ml filtrátu, k němuž byly přidány 3 ml NH<sub>4</sub>Cl pufru o pH 8,5 a  $c = 0,19$  mmol/l a 2 ml barevného činidla (roztoku sulfanilamidu a N-(1-naftyl)ethylenamin hydrochloridu s přidavkem kyseliny trihydrogenfosforečné). Zkumavky byly uzavřeny parafilmem, obsah ručně promíchán a

ponechán reagovat 15 minut při laboratorní teplotě. Obsah dusitanů byl stanoven proti blanku s destilovanou vodou na přístroji PerkinElmer Lambda 25.

Vzorec pro výpočet aktivity nitrátreduktázy:

$$ANR = \frac{(S - C) \times 20 \times 100}{m \times 5 \times DM}$$

kde:

*ANR* aktivita nitrátreduktázy v  $\mu\text{g N/g}$  sušiny/24 hod;

*S* průměrný obsah dusitanů ve vzorku v  $\mu\text{g N}$ ;

*C* obsah dusitanů v kontrolním vzorku v  $\mu\text{g N}$ ;

*20* objem extraktu v ml;

*m* navážka půdního vzorku v g;

*5* alikvotní podíl filtrátu v ml;

*DM* sušina půdních vzorků v %.

**Zdroj: Abdelmagid et Tabatabai (1987)**

#### **4.4 Zpracování naměřených dat**

Data pro vyhodnocení byla připravena v MS excel a dále zpracována spolu s grafy ve statistickém programu IBM SPSS statistics. K určení korelace byl použit Pearsonův korelační koeficient, stanovení síly korelace pak bylo provedeno dle Evansovy příručky (1996).



## 5 Výsledky

V roce 2018 byl založen nádobový pokus s rostlinami rodu *Pteris* v pokusném skleníku v Praze – Suchdol. V této práci byla vyhodnocena data pouze ze 3. odběru, což znamená po 150 dnech u *P. cretica Parkerii* a *P. straminea* a po 180 dnech u *P. cretica Albolineata*. Pro následnou analýzu jsme měli k dispozici dvě opakování na každé variantě u *P. cretica Parkerii* a *P. cretica Albo-lineata*. V případě *P. straminea* nebyl proveden rozbor rostlin a rhizosféry na variantě 250 mg As/kg půdy z důvodu úhynu rostlin.

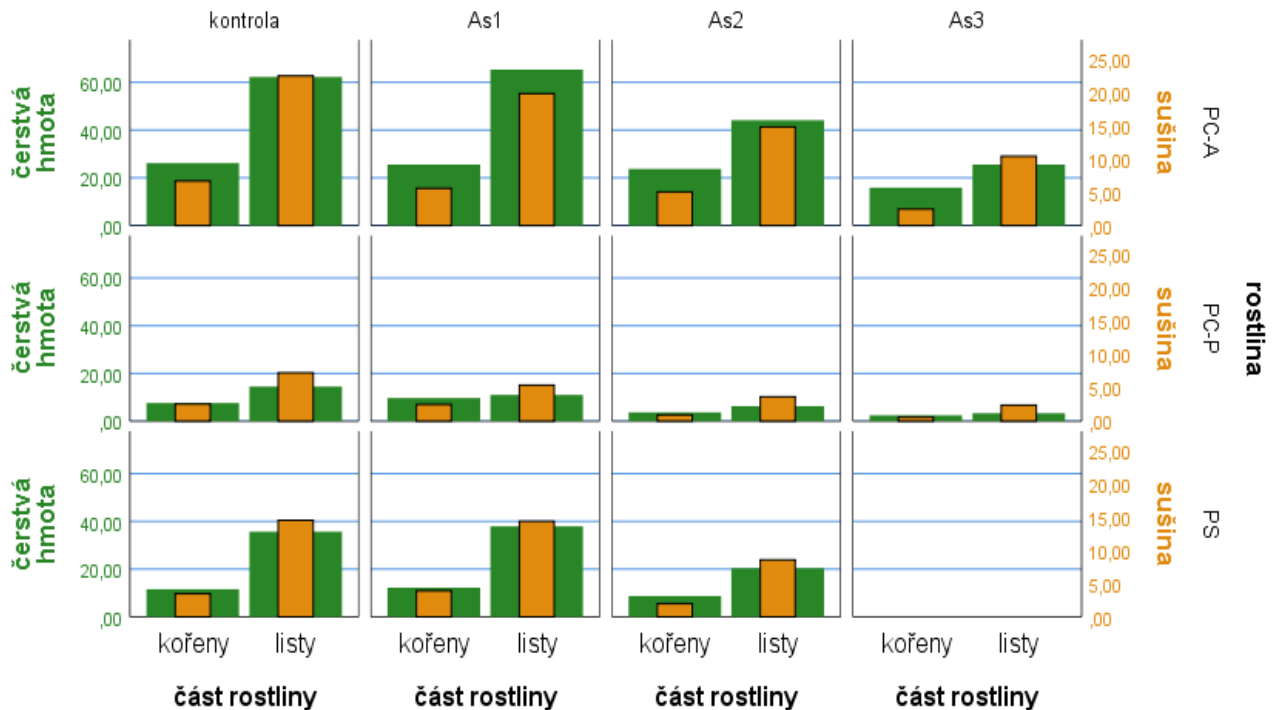
V této práci byla vyhodnocena data z analýzy rostlin na obsahy prvků a aminokyselin (nadzemní část, kořeny), dále rozbor půdy za účelem stanovení obsahů prvků a měření nitrátoreduktázy (okolní půda, rhizosféra) a v neposlední řadě byly zhodnoceny výnosy biomasy na kontaminované půdě.

Všechny výsledky jsou graficky znázorněny v níže přiložených grafech č. 1-19, přičemž se se vždy jedná o sledování dané charakteristiky na těchto variantách: kontrola, 20 mg As/kg půdy (As1), 100 mg As/kg půdy (As2) a 250 mg As/kg půdy (As3). Pro rostliny byly v grafech použity zkratky PC-A (*P. cretica Albo-lineata*), PC-P (*P. cretica Parkerii*) a PS (*P. straminea*). Pro statistické vyhodnocení mezi sledovanými veličinami byla aplikována korelace, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 3 - 13.

## 5.1 Výnos biomasy

Při vyhodnocování pokusu byl první sledovanou veličinou výnos čerstvé hmoty, ze které se poté určilo množství sušiny. Byl stanovován výnos jak nadzemních částí, tak kořenů u všech rostlin.

Graf č. 1 – Výnos čerstvé hmoty a sušiny (g) u jednotlivých variant při nárůstu As v půdě



Na grafu č. 1 lze vidět, že směrem k rostoucímu množství As v půdě klesají výnosy jak kořenů, tak nadzemní biomasy, vyjma varianty As1, při které dochází k menšímu navýšení ve výnosech nadzemní biomasy u *P. cretica Albo-lineata* a *P. straminea* a kořenů u *P. cretica Parkerii*. Rovněž je z grafu patrné, že výnosy kořenů a nadzemní biomasy mají podobné trendy, tzn. úbytky ve výnosech jsou srovnatelné. Nejvyšších výnosů bylo dosaženo vždy u *P. cretica Albo-lineata*, zatímco nejnižších u *P. cretica Parkerii*.

**Tab. č. 3 – Korelace výnosu rostlin a množství As v půdě**

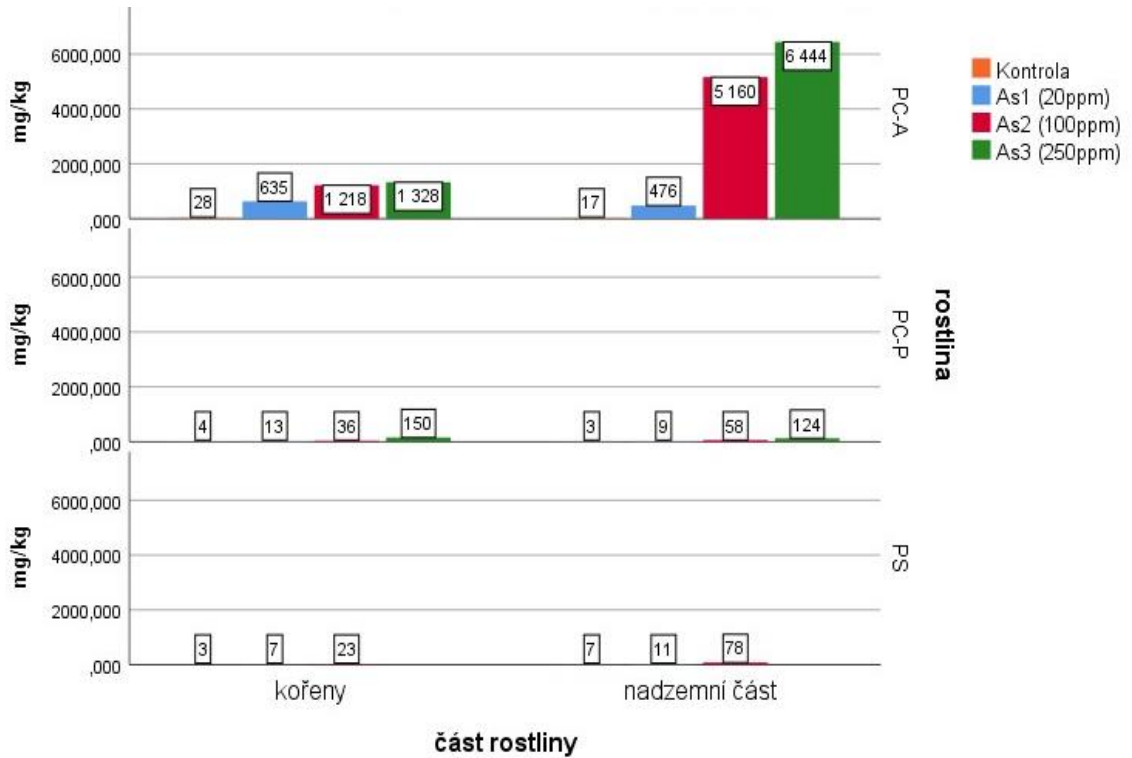
mass	část_rostliny	rostlina	množství As (ppm) v půdě
sušina	kořeny	PC-A	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,979
			N of Valid Cases 4
		PC-P	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,908
			N of Valid Cases 4
		PS	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,916
			N of Valid Cases 3
	listy	PC-A	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,968
			N of Valid Cases 4
		PC-P	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,913
			N of Valid Cases 4
		PS	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,986
			N of Valid Cases 3
čerstvá hmota	kořeny	PC-A	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,986
			N of Valid Cases 4
		PC-P	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,860
			N of Valid Cases 4
		PS	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,934
			N of Valid Cases 3
	listy	PC-A	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,980
			N of Valid Cases 4
		PC-P	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,929
			N of Valid Cases 4
		PS	množství (g/rostlina) Pearson's R - ,954
			N of Valid Cases 3

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl ve výnosech rostlin při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 3 vyplývá, že mezi testovanými veličinami je velmi silná nepřímá závislost ve všech případech, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu nabývajících hodnot v rozmezí -0,860 až -0,986.

## 5.2 Analýza rostlin

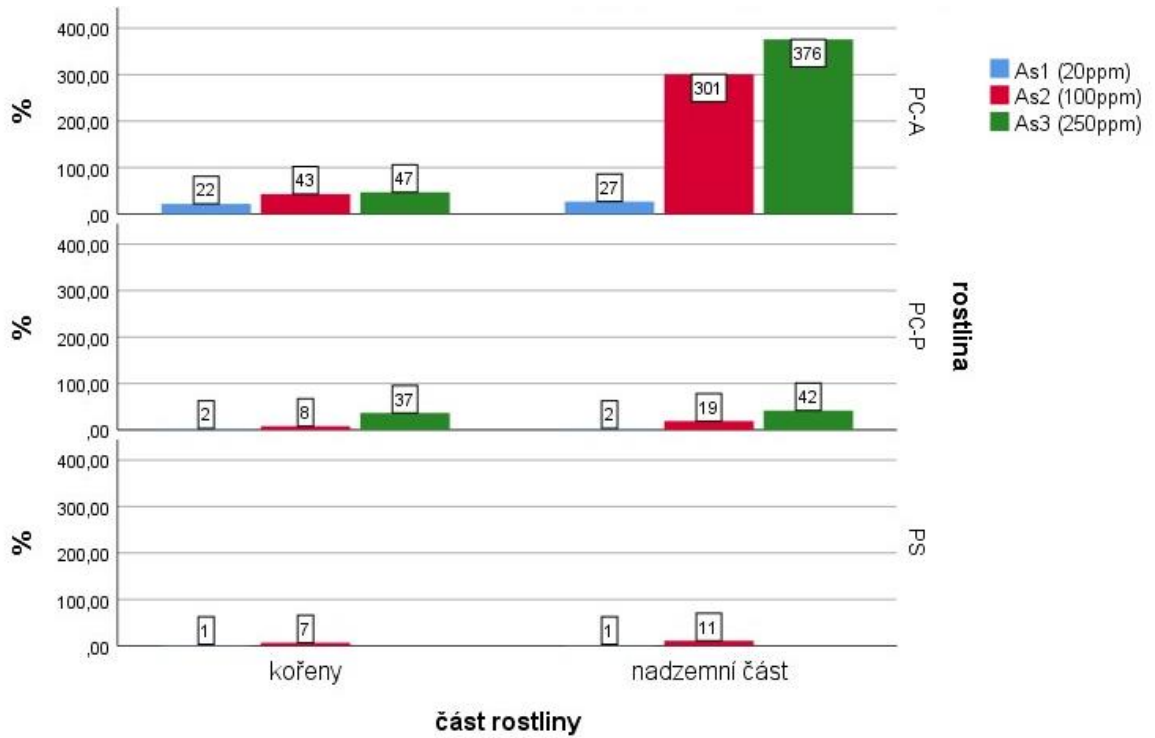
### 5.2.1 Obsah arsenu

Graf č. 2 - Průměrný obsah As (mg/kg) v rostlinách



Graf č. 2 podává přehled množství As jak v kořenech, tak v nadzemních částech rostlin při rostoucí koncentraci As v půdě. Z obrázku jednoznačně vyplývá, že schopnost akumulovat největší množství As se projevila u rostliny *P. cretica Albo-lineata* v nadzemní biomase a jednoznačně bylo potvrzeno, že se jedná o hyperakumulátor As.

**Graf č. 3 – Procentuální porovnání nárůstu As v rostlinách oproti kontrole**



Graf č. 3 zobrazuje procentuální nárůst As v rostlinách oproti kontrole, přičemž signifikantní rozdíl nastal u rostliny *P. cretica Albo-lineata*, která As rovněž akumulovala i v kořenech, ale obsahy byly mnohonásobně nižší než v nadzemní biomase. *P. cretica Parkerii* a *P. straminea* vykazovaly na všech variantách srovnatelné hodnoty.

Tab. č. 4 – Korelace As v rostlině a množství As v půdě

rostlina	část rostliny			množství As (ppm) v půdě
PC-A	kořeny	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,831
		Validní případy		4
	nadzemní část	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,918
		Validní případy		4
PC-P	kořeny	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,982
		Validní případy		4
	nadzemní část	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,997
		Validní případy		4
PS	kořeny	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	1,000
		Validní případy		3
	nadzemní část	množství As (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,992
		Validní případy		3

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu As v rostlině při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 4 je zřejmé, že mezi danými veličinami je velmi silná přímá závislost, již dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,831 - 1.

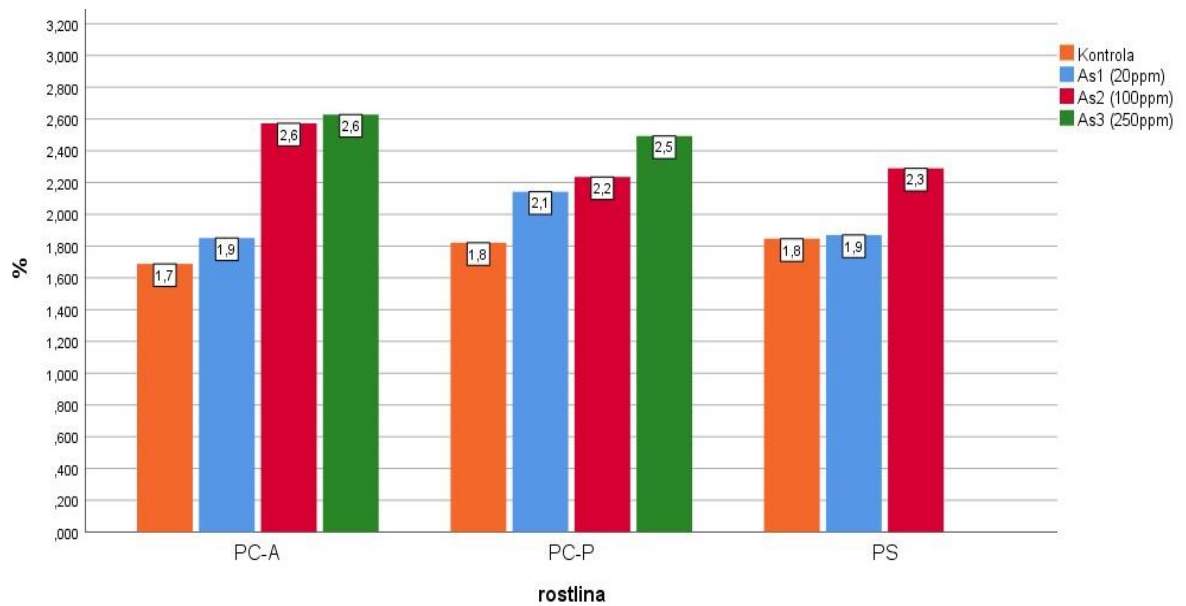
Tab. č. 5 – Stanovení biokoncentračního faktoru

množství As v půdě (mg/kg)	Biokoncentrační faktor					
	PC-A		PC-P		PS	
	kořeny	nadzemní část	kořeny	nadzemní část	kořeny	nadzemní část
20	31,7	23,8	0,7	0,5	0,3	0,6
100	12,2	51,6	0,4	0,6	0,2	0,8
250	5,3	25,8	0,6	0,5	-	-

Pokud je stanoven biokoncentrační faktor větší než 1, tedy koncentrace toxického prvku v rostlině je větší než koncentrace daného prvku v půdě, lze rostlinu označit jako hyperakumulátor. Z tabulky č. 5, ve které jsou uvedeny hodnoty vypočtené poměrem As v rostlině/As v půdě, vyplývá, že pouze *P. cretica Albo-lineata* se chová jako hyperakumulátor arsenu.

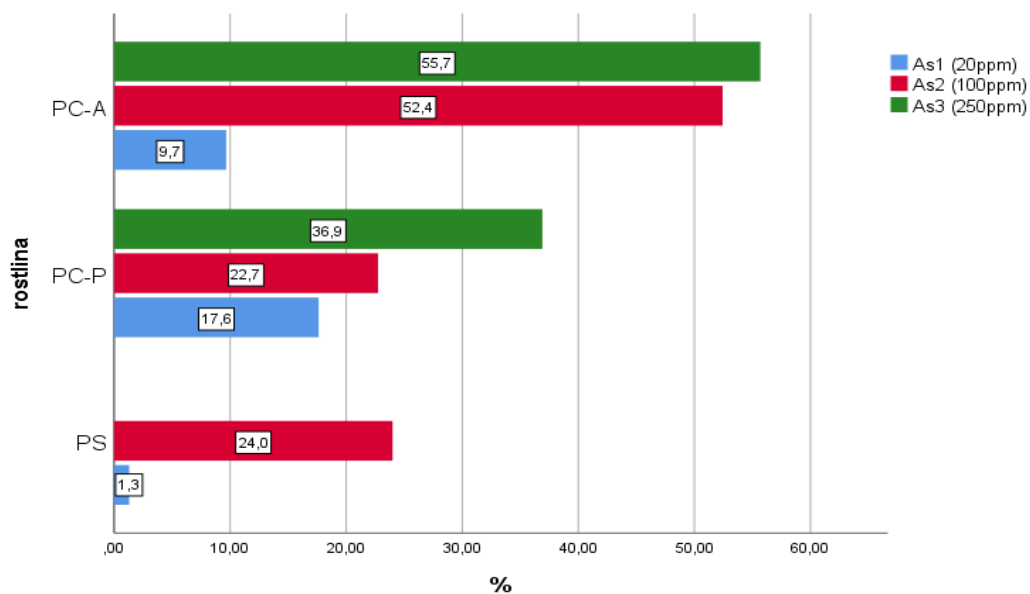
## 5.2.2 Celkový obsah dusíku

Graf č. 4 – Průměrný obsah celkového N (%) v rostlinách



Z grafu č. 4 jednoznačně vyplývá u všech modelových rostlin trend, při kterém dochází ke zvyšování celkového N (%) v rostlině s nárůstem As v půdě, přičemž nejvyšší procentuální obsah celkového N byl stanoven u *P. cretica Albo-lineata* na variantě As3.

Graf č. 5 – Procentuální porovnání nárůstu obsahu celkového N v rostlinách oproti kontrole



Graf č. 5 podává přehled procentuálního navýšení celkového N v rostlině oproti kontrole. Je zřejmé, že u *P. cretica Albo-lineata* došlo k výraznému navýšení obsahu celkového N v půdě na variantě As1 přibližně o polovinu více než u dvou ostatních rostlin.

**Tab. č. 6 – Korelace obsahu celkového N v rostlině a množství As v půdě**

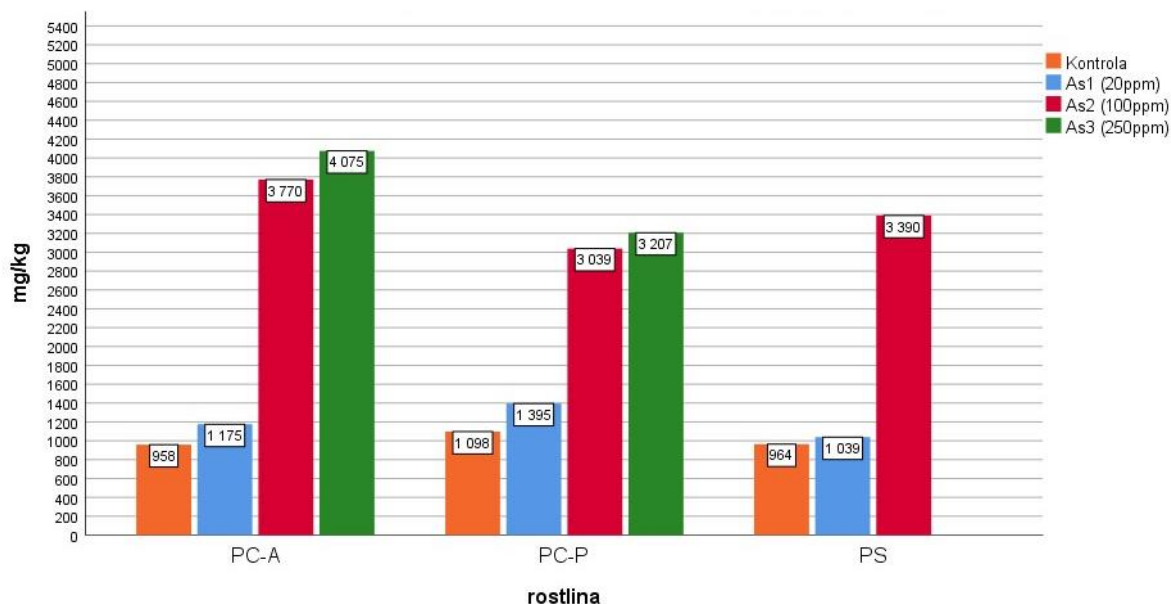
rostlina		množství As (ppm) v půdě
PC-A	Průměrný obsah celkového N (%) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient
	Validní případy	
PC-P	Průměrný obsah celkového N (%) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient
	Validní případy	
PS	Průměrný obsah celkového N (%) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient
	Validní případy	

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu celkového N v rostlině při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 6 je zřejmé, že mezi danými veličinami je velmi silná přímá závislost, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,865 - 0,990.



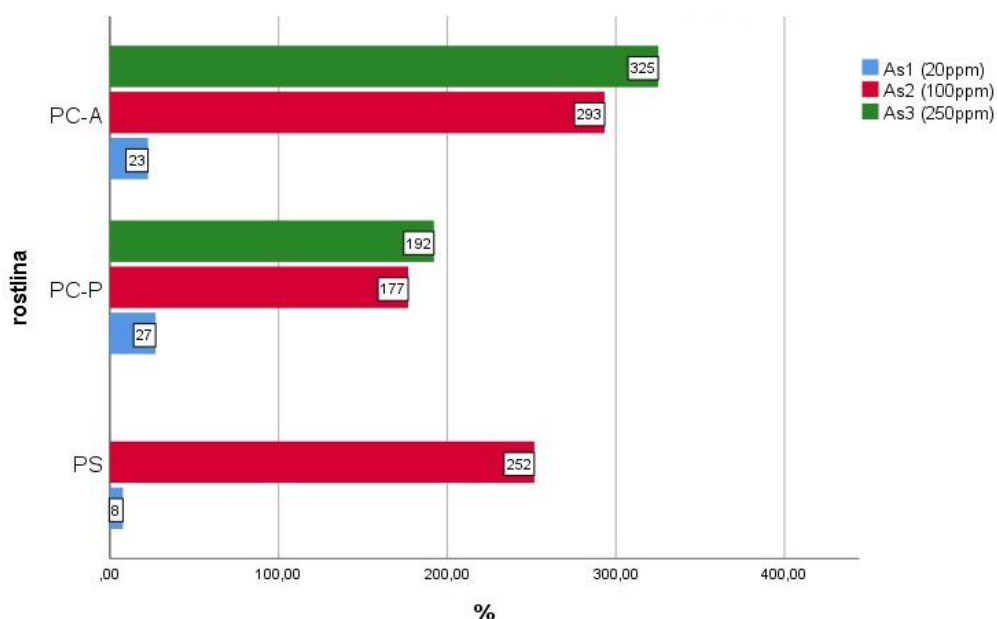
## 5.2.3 Obsah nitrátového dusíku

Graf č. 6 – Průměrný obsah N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/kg) v rostlinách



Z grafu č. 6 je zřejmé, že docházelo k hromadění NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v rostlinách s nárůstem As v půdě na všech variantách. Opět byl stanoven nejvyšší obsah N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u *P. cretica Albo-lineata* na variantě As3.

Graf č. 7 – Procentuální porovnání nárůstu obsahu N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> oproti kontrole



Graf č. 7 ukazuje nárůst obsahu  $N-NO_3^-$  na variantách kontaminovaných As ve srovnání s kontrolou. Je zřejmé, že obsah  $N-NO_3^-$  skokově vzrostl od varianty As2 u všech rostlin, nejvíce u *P. cretica Albo-lineata* a nejméně u *P. cretica Parkerii*.

**Tab. č. 7 – Korelace obsahu  $N-NO_3^-$  v rostlině a množství As v půdě**

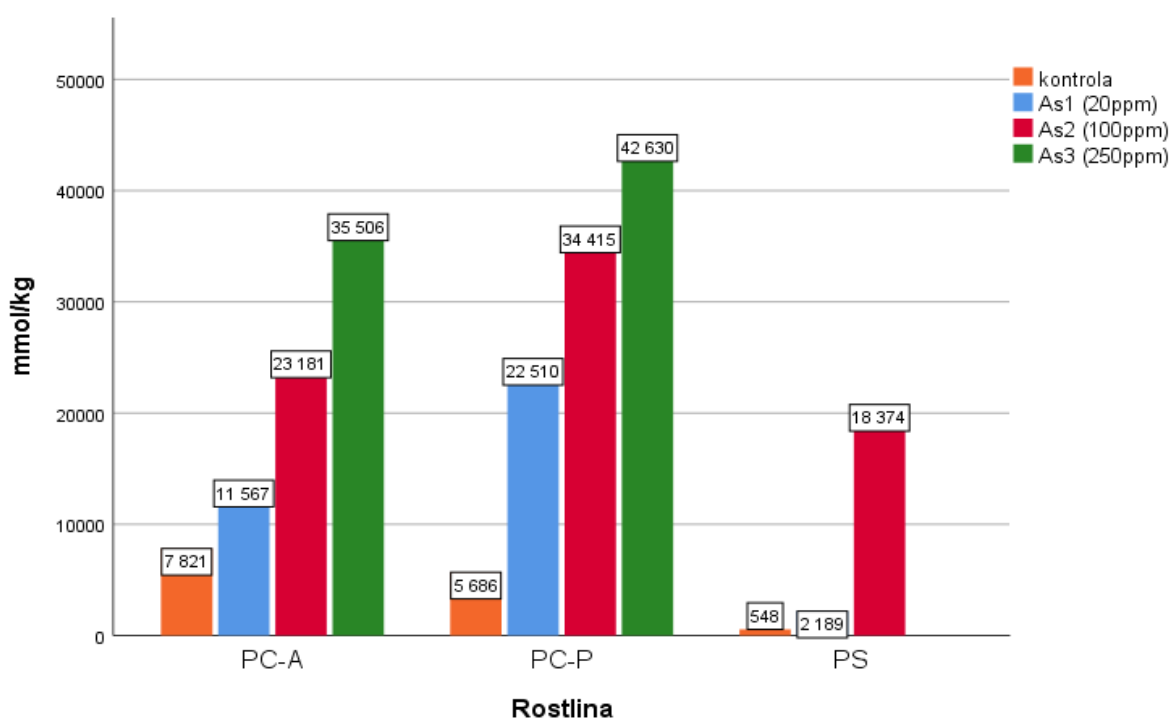
rostlina			množství As (ppm) v půdě
PC-A	Průměrný obsah nitrátového N (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,880
	Validní případy		8
PC-P	Průměrný obsah nitrátového N (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,874
	Validní případy		8
PS	Průměrný obsah nitrátového N (ppm) v rostlině	Pearsonův korelační koeficient	,987
	Validní případy		6

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu nitrátového N v rostlině při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č.7 je zřejmé, že mezi danými veličinami je velmi silná přímá závislost, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,874 - 0,987.

## 5.2.4 Obsah glutaminu

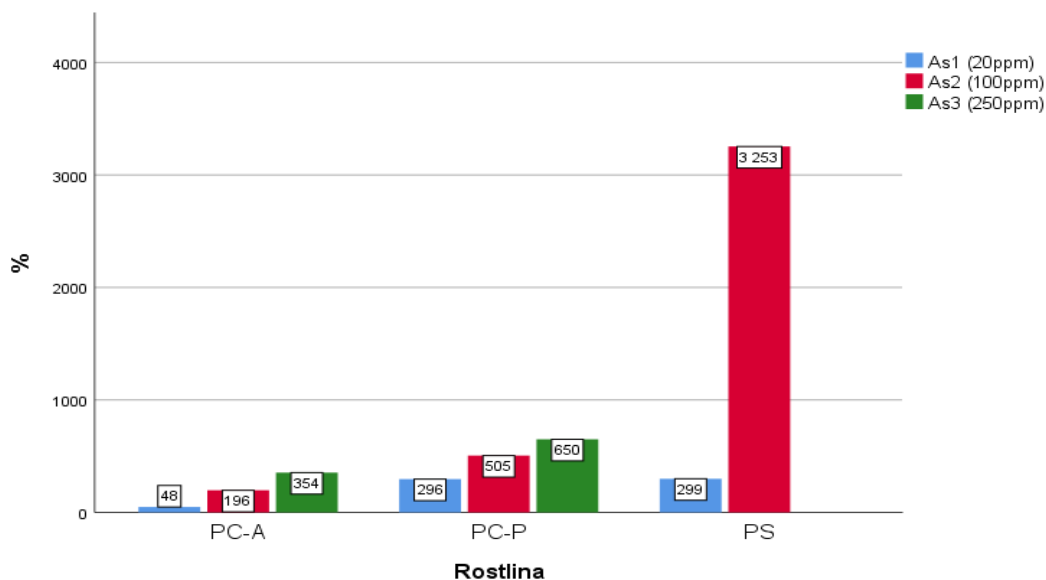
V rámci tohoto pokusu byly rovněž sledovány změny v metabolismech aminokyselin v rostlinách, přičemž pro účely této práce byl vyhodnocen pouze glutamin – amid kyseliny glutamové.

Graf č. 8 – Průměrný obsah glutaminu (mmol/kg) v rostlinách



Bylo zjištěno, že s nárůstem množství As v rostlinné biomase se zvyšoval obsah glutaminu v rostlinách, jak je zřejmé z grafu č. 8. Nejvyšší obsahy glutaminu byly naměřeny u *P. cretica Parkerii* už od varianty As1.

**Graf č. 9 – Procentuální vyjádření nárůstu obsahu glutaminu v rostlinách oproti kontrole**



Z grafu č. 9 je zřejmé, že nejmenší rozdíly v nárůstu obsahu glutaminu oproti kontrole byly stanoveny u hyperakumulující rostliny *P. cretica Albo-lineata* a naopak k nejvyššímu procentuálnímu navýšení došlo u *P. straminea* na variantě As2.

**Tab. č. 8 – Korelace obsahu glutaminu v rostlině a množství As v půdě**

Rostlina			množství As (ppm) v půdě
PC-A	množství glutaminu v rostlině (mmol/kg)	Pearson's R	,987
	N of Valid Cases		4
PC-P	množství glutaminu v rostlině (mmol/kg)	Pearson's R	,881
	N of Valid Cases		4
PS	množství glutaminu v rostlině (mmol/kg)	Pearson's R	,994
	N of Valid Cases		3

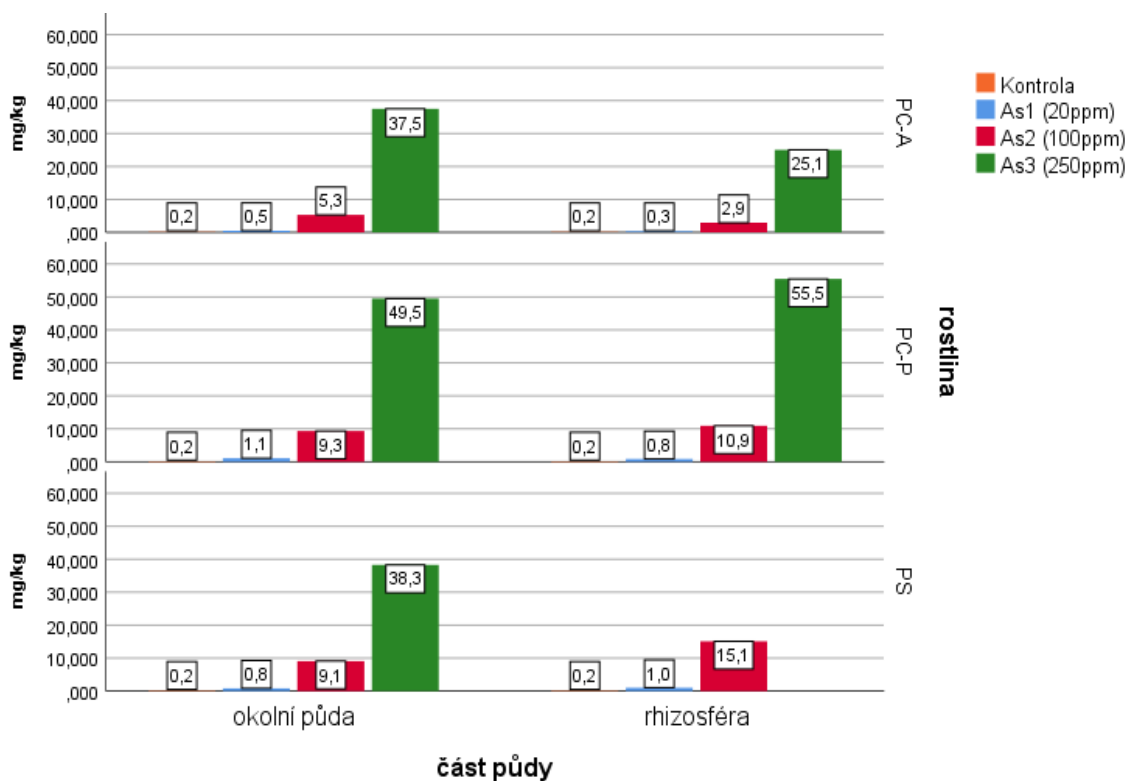
Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu glutaminu v rostlině při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci

daných veličin. Z tabulky č. 8 je zřejmé, že mezi danými veličinami je velmi silná přímá závislost, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,881 - 0,994.

## 5.3 Analýza půdy

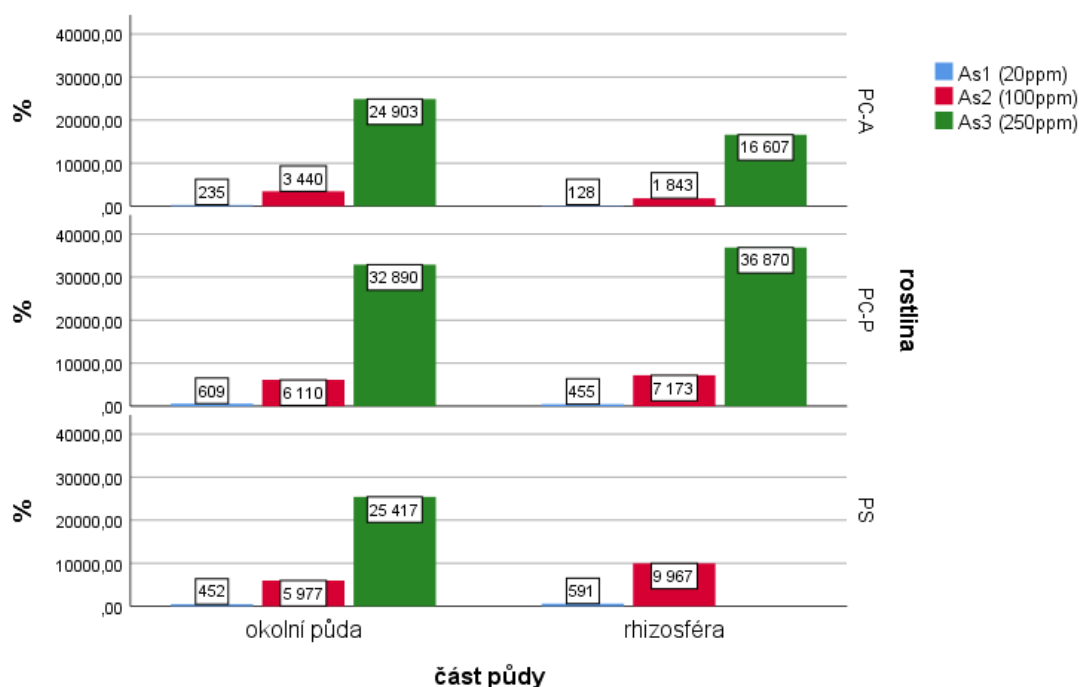
### 5.3.1 Obsah vodorozpuštěného arsenu

Graf č. 10 – Průměrný obsah vodorozpuštěného As (mg/kg) v půdě



Z grafu č. 10 je patrné, že k nejvyššímu uvolnění As do půdního roztoku dochází až na poslední variantě As3, přičemž k nejvýraznějšímu navýšení obsahu vodorozpuštěného As dochází u *P. cretica Parkerii*. Hodnoty u ostatních dvou rostlin jsou na variantě As3 v okolní půdě srovnatelné.

**Graf č. 11 – Procentuální vyjádření změny obsahu As v půdě**



Graf č. 11 zobrazuje procentuální vyjádření změny nárůstu vodorozpustného arsenu oproti kontrole a je zřejmé, že u *P. cretica Parkerii* se více než dvojnásobně navýšil obsah vodorozpustného As v rhizosféře než u *P. cretica Albo-lineata*. Dále z grafu č. 11 lze vypočítat, že k nejmenším změnám oproti kontrole došlo u rostliny *P. Albo-lineata*.

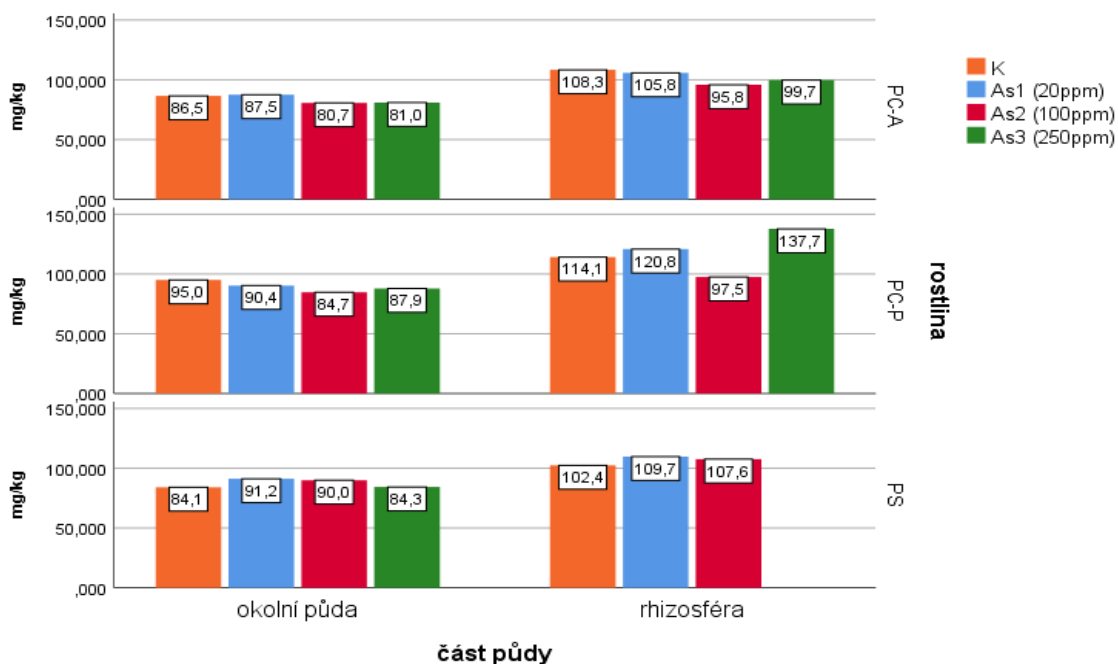
**Tab. č. 9 – Korelace obsahu vodorozpustného As a množství As v půdě**

rostlina	část půdy	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	množství As (ppm) v půdě
PC-A	okolní půda	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,966
		N of Valid Cases		
PC-A	rhizosféra	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,959
		N of Valid Cases		
PC-P	okolní půda	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,977
		N of Valid Cases		
PC-P	rhizosféra	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,979
		N of Valid Cases		
PS	okolní půda	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,986
		N of Valid Cases		
PS	rhizosféra	množství vodorozpustného As (ppm) v půdě	Pearson's R	,991
		N of Valid Cases		

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu vodorozpustného As v půdním roztoku při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 9 vyplývá, že mezi testovanými veličinami je velmi silná přímá závislost ve všech případech, již dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu nabývajících hodnot v rozmezí 0,959 – 0,991.

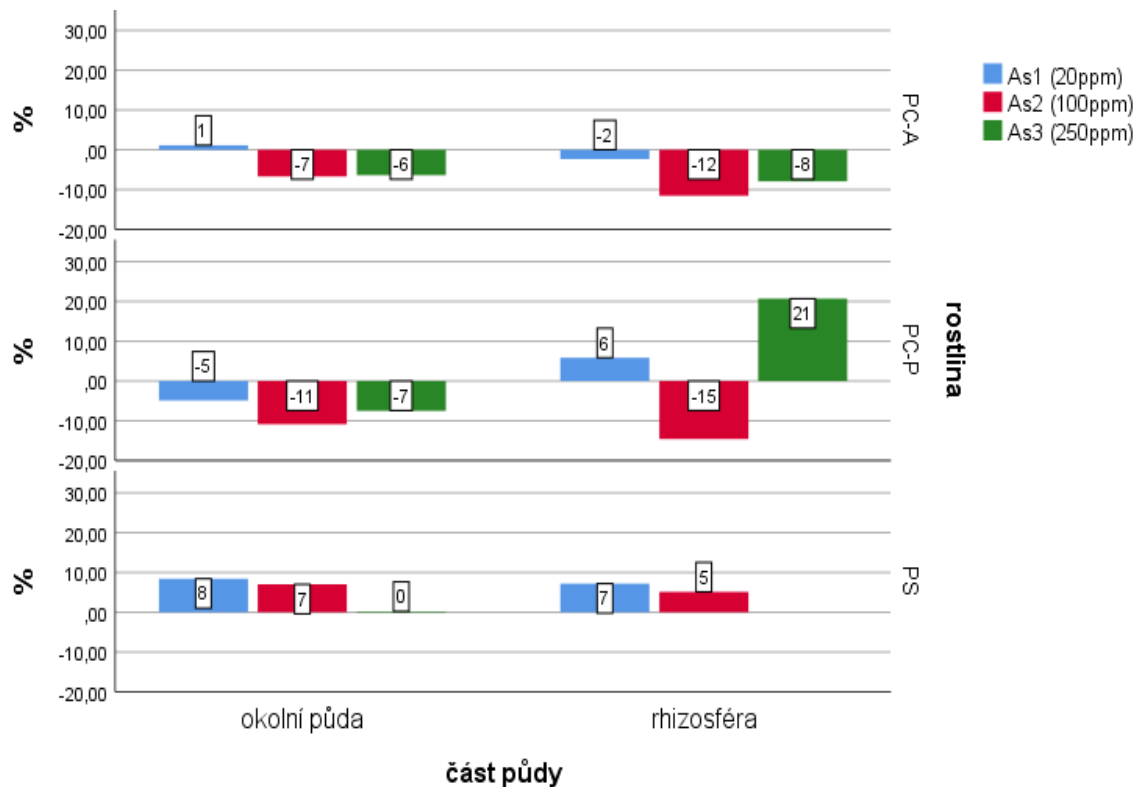
### 5.3.2 Obsah organického uhlíku

Graf č. 12 – Průměrný obsah organického C (mg/kg) v půdě



Z výsledků vyobrazených na grafu č. 12 je zřejmé, že u *P. cretica Albo-lineata* se obsah organického C snižoval v okolní půdě i rhizosféře, stejně tak u *P. cretica Parkerii* v okolní půdě s rostoucím množstvím As v půdě. U *P. cretica Parkerii* byl stanoven nejvyšší průměrný obsah organického C na variantě As3 v rhizosféře. U *P. straminea* signifikantní výsledky nebyly potvrzeny.

Graf č. 13 – Procentuální vyjádření změny obsahu organického C v půdě oproti kontrole



Graf č. 13 zobrazuje procentuální vyjádření změny obsahu organického C v půdě a potvrzuje, že nejvyšší rozdíl oproti kontrole nastal na variantě As3 v rhizosféře u *P. cretica Parkerii*. U rostlin *P. cretica Albo-lineata* a *P. straminea* výraznější rozdíly oproti kontrole nebyly zaznamenány.



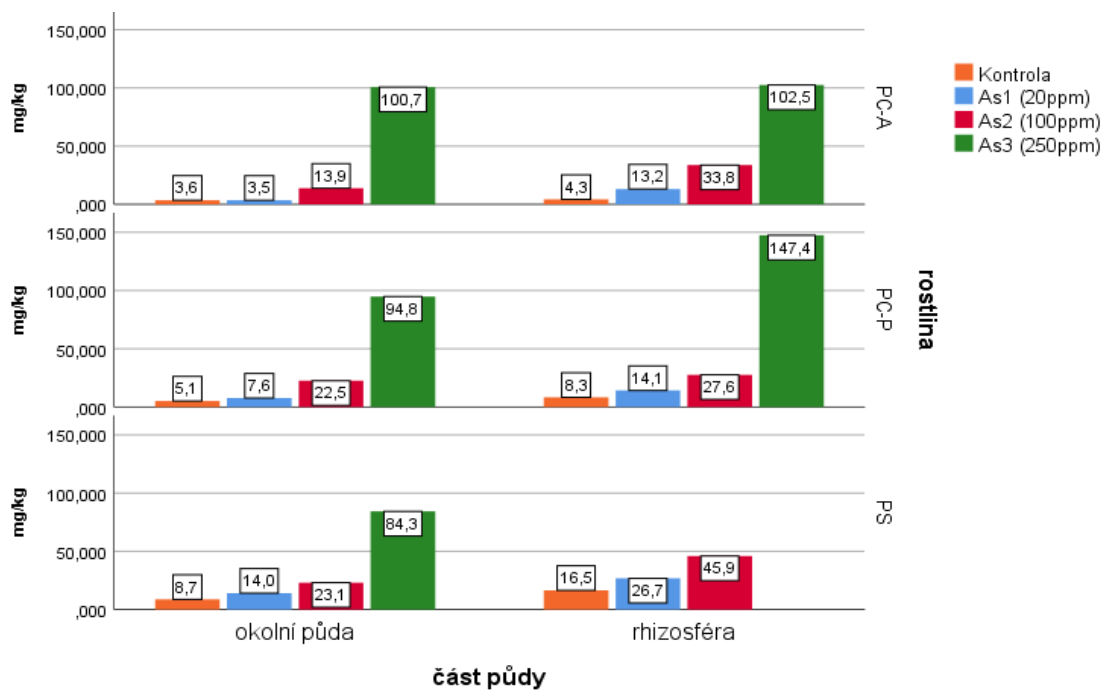
**Tab. č. 10 – Korelace obsahu organického C a množství As v půdě**

rostlina	část půdy			množství As (ppm) v půdě
PC-A	okolní půda	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	-,809
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	-,653
		N of Valid Cases		4
PC-P	okolní půda	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	-,580
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	,548
		N of Valid Cases		4
PS	okolní půda	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	-,346
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického C (ppm) v půdě	Pearson's R	,418
		N of Valid Cases		3

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v půdním obsahu organického C při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 10 je zřejmé, že v případě *P. Albo-lineata* (okolní půda) je mezi danými veličinami nepřímá velmi silná závislost, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu nabývající hodnoty -0,809 a nepřímá silná závislost (rhizosféra), kde Pearsonův korelační koeficient nabývá hodnoty -0,653. Slabou až střední korelaci mezi danými veličinami lze popsat u *P. cretica Parkerii* a *P. straminea* v okolní půdě i rhizosféře.

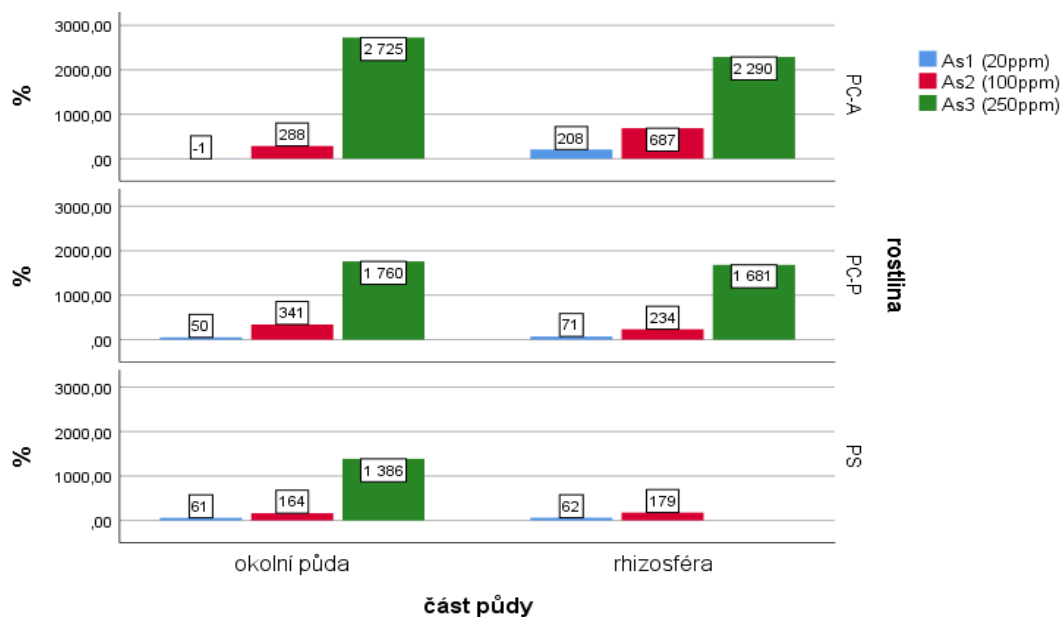
### 5.3.3 Obsah nitrátového dusíku

Graf č. 14 – Průměrný obsah N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v půdě



Grafu č. 14 potvrzuje výrazný trend nárůstu nitrátového N s růstem obsahu As v půdě, a to ve všech případech. Rovněž je patrné, že k výraznému navýšení N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v půdě došlo vždy na poslední variantě As3.

**Graf č. 15 – Procentuální vyjádření změny obsahu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v půdě oproti kontrole**



Graf č. 15 zobrazuje procentuální navýšení obsahu N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v půdě oproti kontrole a potvrzuje tím významnou závislost.

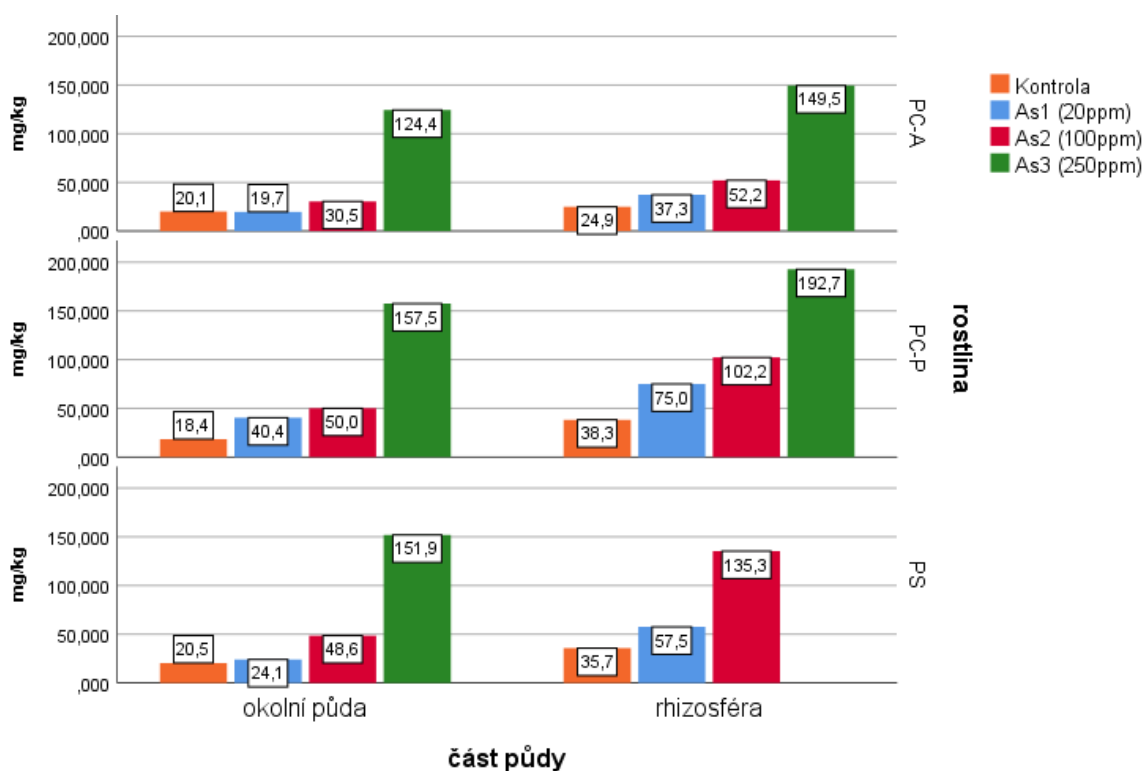
**Tab. č. 11 – Korelace obsahu N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a množství As v půdě**

rostlina	část půdy	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	množství As (ppm) v půdě
PC-A	okolní půda	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,958
		N of Valid Cases		4
PC-A	rhizosféra	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,993
		N of Valid Cases		4
PC-P	okolní půda	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,978
		N of Valid Cases		4
PC-P	rhizosféra	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,964
		N of Valid Cases		4
PS	okolní půda	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,958
		N of Valid Cases		4
PS	rhizosféra	průměrný obsah nitrátového N (ppm) v půdě	Pearson's R	,987
		N of Valid Cases		3

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v půdním obsahu  $N-NO_3^-$  při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 11 vyplývá, že mezi testovanými veličinami je velmi silná přímá závislost ve všech případech, již dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,958 - 0,993.

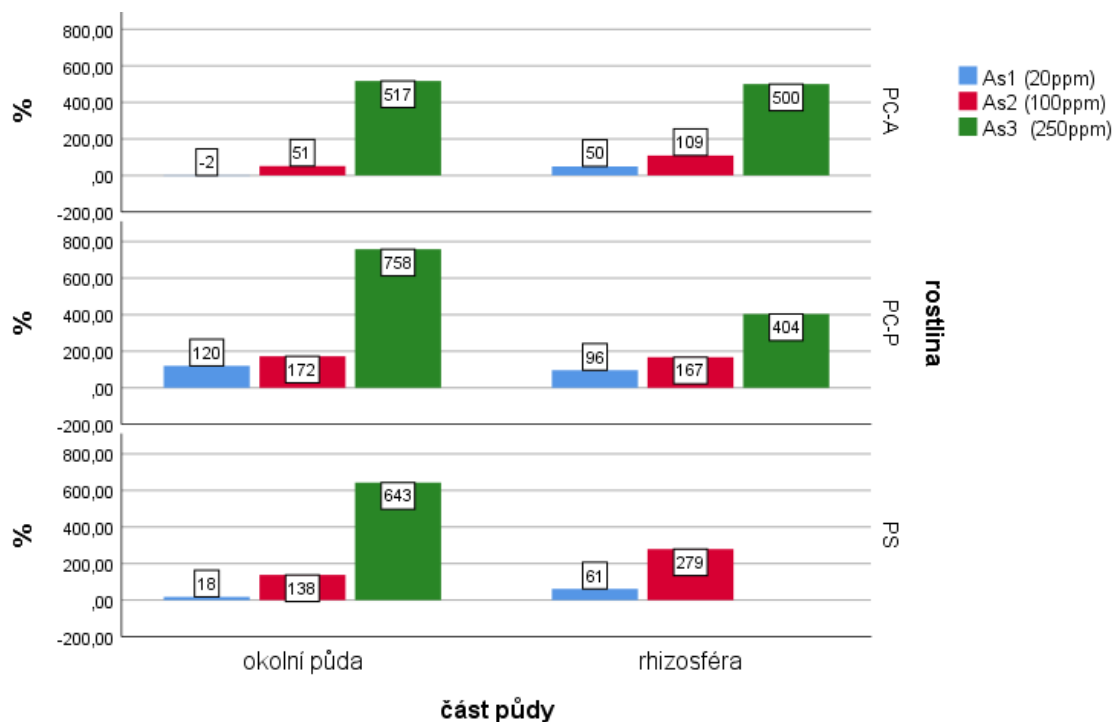
### 5.3.4 Obsah organického rozpustného dusíku

Graf č. 16 – Průměrný obsah organického rozpustného N (mg/kg) v půdě



Z grafu č. 16 je rovněž zřejmý signifikantní trend, kdy dochází ke zvyšování množství organického rozpustného N s rostoucí dávkou As v půdě. Oproti  $N-NO_3^-$  k nárůstu obsahu organického N dochází pozvolněji.

**Graf č. 17 – Procentuální vyjádření změny obsahu organického rozpustného N v půdě oproti kontrole**



Graf č. 17 znázorňuje výraznou změnu v nárůstu organického N v půdě ve srovnání s kontrolou, přičemž ke skokovému navýšení rovněž dochází na variantách s nejvyšším množstvím As v půdě.

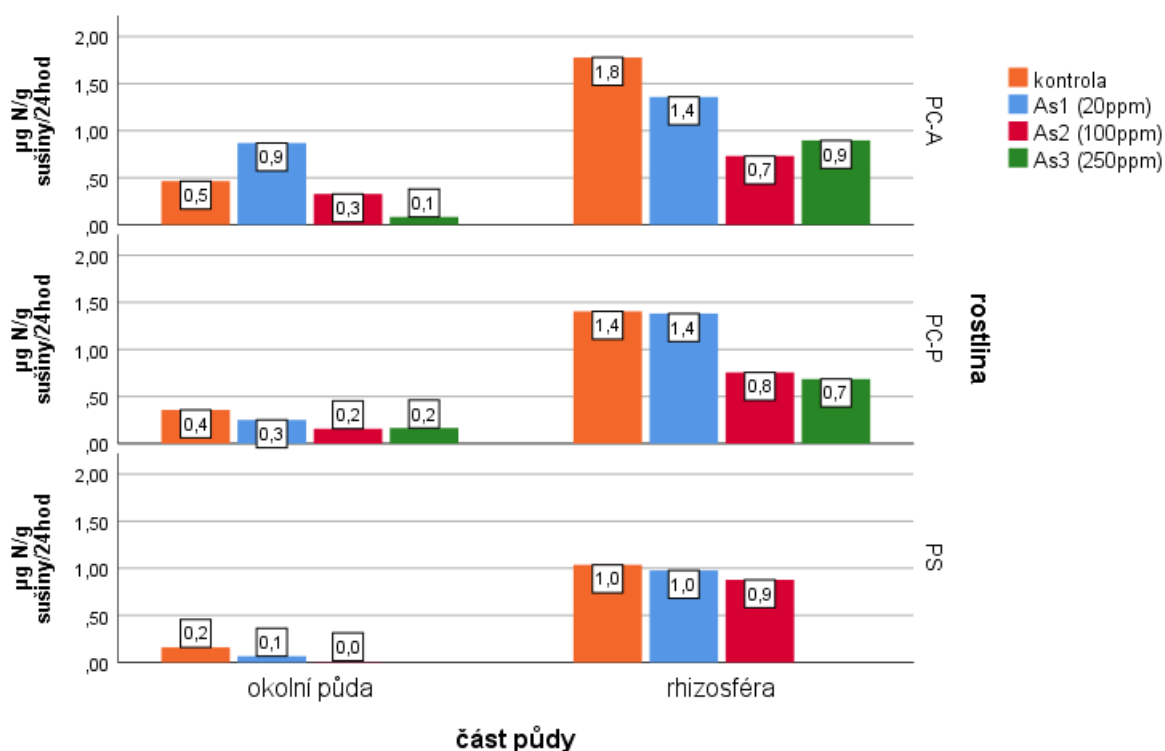
**Tab. č. 12 – Korelace obsahu organického rozpustného N a množství As v půdě**

rostlina	část půdy	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	množství As (ppm) v půdě
PC-A	půda	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	,957
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	,979
		N of Valid Cases		4
PC-P	půda	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	,973
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	,987
		N of Valid Cases		4
PS	půda	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	,982
		N of Valid Cases		4
	rhizosféra	průměrný obsah organického rozpustného N(ppm) v půdě	Pearson's R	1,000
		N of Valid Cases		3

Testovali jsme hypotézu  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl v půdním obsahu organického rozpustného N při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 12 vyplývá, že mezi testovanými veličinami je velmi silná přímá závislost ve všech případech, již dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu, která nabývá hodnot v rozmezí 0,958 - 1.

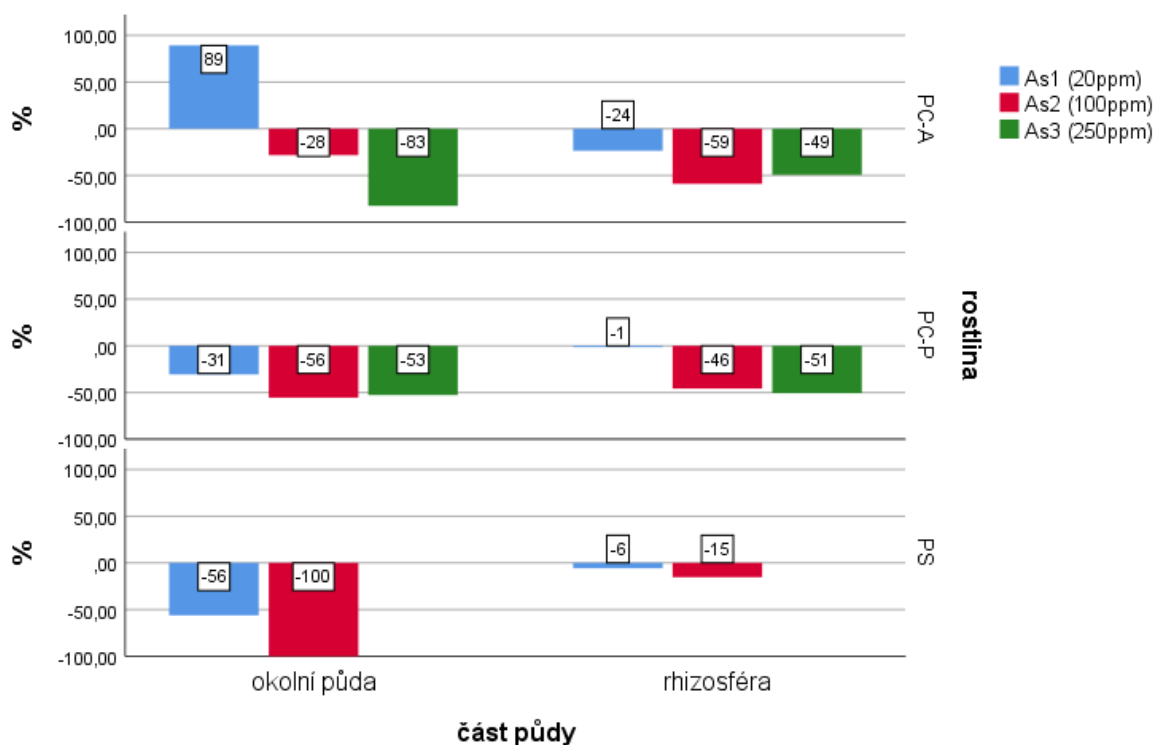
### 5.3.5 Stanovení aktivity nitrátreduktázy

Graf č. 18 – Stanovení aktivity nitrátreduktázy v půdě



Byla sledována aktivita nitrátreduktázy v závislosti na zvyšujícím se obsahu As v půdě. Z grafu č. 18 je patrné, že aktivita enzymu se snižuje s nárůstem množství As v půdě, přičemž u *P. straminea* činnost nitrátreduktázy v okolní půdě postupně téměř ustala. Aktivita nitrátreduktázy byla signifikantně vyšší v rhizosféře než v okolní půdě u všech rostlin.

**Graf č. 19 – Procentuální porovnání změny aktivity nitrátreduktázy oproti kontrole**



Z grafu č. 19 vyplývá, že u *P. straminea* činnost nitrátreduktázy byla zachována pouze v rhizosféře, kde rozdíly oproti kontrole nejsou tak výrazné, zatímco u ostatních rostlin aktivita enzymu klesla přibližně o 50 % od varianty As2. Lze konstatovat, že k většímu poklesu aktivity nitrátreduktázy nastalo v okolní půdě než v rhizosféře.

**Tab. č. 13 – Korelace aktivity nitrátreduktázy a množství obsahu As v půdě**

část půdy	rostlina			množství As (ppm) v půdě
okolní půda	PC-A	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,806
		N of Valid Cases		4
	PC-P	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,758
		N of Valid Cases		4
	PS	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,899
		N of Valid Cases		3
rhizosféra	PC-A	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,722
		N of Valid Cases		4
	PC-P	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,878
		N of Valid Cases		4
	PS	aktivita nitrátreduktázy	Pearson's R	-,983
		N of Valid Cases		3

Byla testována hypotéza  $H_0$ : Lze předpokládat, že neexistuje statisticky významný rozdíl ve změně aktivity nitrátreduktázy při rostoucím množství As v půdě. Na hladině významnosti 0,01 můžeme zamítnout  $H_0$  ve prospěch alternativní hypotézy  $H_1$ , která konstatuje korelaci daných veličin. Z tabulky č. 13 vyplývá, že mezi testovanými veličinami je silná až velmi silná nepřímá závislost, jíž dokazuje hodnota Pearsonova korelačního koeficientu nabývajících hodnot v rozmezí -0,722 až -0,983.



## 6 Diskuze

Arsen se přirozeně vyskytuje ve všech půdách jak v organických, tak v anorganických formách, jež převažují, tudíž se za normálních podmínek na nekontaminované půdě v rostlinách běžně nachází ve stopovém množství. Arsen patří mezi toxické prvky a při jeho zvýšeném obsahu v rostlinách vyvolává řadu morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních změn. V experimentu s modelovými rostlinami rodu *Pteris* jsme sledovali vybrané charakteristiky v závislosti na rostoucí dávce As v půdním substrátu.

V tomto pokusu bylo viditelnou odpovědí rostlin na kontaminovanou půdu As omezení růstu, což vedlo k nižšímu výnosu biomasy. Stejně změny byly popsány u řady dalších autorů (Nagajyoti et al. 2010; Pavlík et al., 2010; Singh et al., 2009). Kořeny jsou obvykle prvním místem kontaktu s As, kde metaloid inhibuje prodlužovací růst a proliferaci, redukuje se počet kořenových vlásků, a tudíž se snižuje absorpční plocha pro příjem živin. Mezi další změny z fyziologického hlediska patří omezená stomatální vodivost a degradace chlorofylu. Po morfologické stránce k úbytku hmotnosti rostlin vedou tyto děje: redukce počtu listů, listová nekróza, chloróza, senescence listů a defoliace. Na biochemické úrovni dochází k nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS) vedoucí k poškození sacharidů, proteinů a poškození DNA (Abbas et al., 2018).

Zajímavým paradoxem související s toxicitou As je zvýšený růst rostlin při nízkých koncentracích As v půdě, přičemž Liu et al. (2012) tento efekt detekovali u pšenice při dávkách As do půdy < 60 mg/kg. Tentýž jev jsme zpozorovali na variantě As1, kdy u *P. albo-lineata* a *P. straminea* došlo k navýšení výnosu nadzemní biomasy oproti kontrole přibližně o 5 %. Interpretace výsledků vychází z přímé interakce As s rostlinným metabolismem nebo z interakce As s živinami rostlin. Přestože tyto mechanismy nejsou zcela známy, Pandey et al. (2015) spekulují, že ke stimulaci růstu dochází vlivem zvýšeného příjmu fosforu.

Údaje v literatuře ukazují, že koncentrace As v rostlinných pletivech pozitivně korelovala s obsahem v půdě (Zolnowski et al., 2010). Dle mnohých autorů se rostliny mohou lišit v citlivosti na kontaminaci As, jež je spojena s jeho různými formami a mechanismy transportu. Koncentrace As v rostlinách je dynamická a může být variabilní pro různé druhy, kultivary a fáze růstu rostlin, stejně tak významně závisí na dávce a chemické formě metaloidu (Hartley-

Whitaker et Meharg, 2002). V tomto pokusu (graf č. 3) došlo k nárůstu obsahu As ve všech rostlinách v závislosti na zvyšující se dávce As v půdě, přičemž nejvíce signifikantní výsledek jsme zaznamenali u *P. cretica Albo-lineata*, kde byl nárůst oproti kontrole na variantě As3 až o 376 %. U všech rostlin mezi danými veličinami byla stanovena velmi silná přímá závislost.

Luongo et Ma (2005) popsali hyperakumulaci As u *P. cretica* (bez bližší specifikace odrůdy). Naše výsledky potvrdily výraznou hyperakumulační schopnost As u *P. cretica Albo-lineata*. Rovněž Zhao et al. (2002) detekovali hyperakumulaci u *P. cretica Albo-lineata*, která byla překvapivě mnohonásobně (13 – 50krát) vyšší oproti ostatním hyperakumulačním kapradinám např. *Asplenium nidus* nebo *Polypodium aureum*. Singh et Ma (2007) uvádějí, že k hyperakumulaci As dochází i u *P. cretica Parkerii*, tento výsledek však nemůžeme potvrdit. Meharg (2003) identifikoval dva druhy kapradin – *P. straminea* a *P. tremula*, které As nehyperakumulují, přičemž tuto skutečnost jsme rovněž zaznamenali u *P. straminea*.

Potvrdili jsme hypotézu, podle níž dochází k hromadění celkového dusíku i  $\text{N-NO}_3^-$  v pletivech rostlin v důsledku toxicity As. Hlavní příčinou je inhibice aktivity enzymu nitrátoreduktázy, jež hraje roli v procesu asimilace nitrátů. Důsledkem toho dochází ke snížené asimilaci N a zabudování do aminokyselin, jež jsou součástí bílkovin plnící funkci stavební, zásobní, funkční a transportní. Omezená činnost nitrátoreduktázy byla rovněž zaznamenána v experimentech u řady autorů. Jha et Dubey (2004) ve své studii o vlivu kontaminované půdy As na klíčení rýže uvedli, že As brání aktivitám enzymů podílejících se na asimilaci  $\text{NO}_3^-$ , přičemž se jedná o nitrátoreduktázu, nitritoreduktázu a glutamátosyntetázu. Singh et al. (2009) popsali sníženou aktivitu nitrátoreduktázy a nitritoreduktázy v kořenech, oddencích a listech *P. ensiformis* a *P. vittata*. Vysvětlení spočívá v tom, že sulfanylová (SH) skupina tvoří aktivní místo nitrátoreduktázy a je potřebná pro vazbu k NADH, přičemž As vykazuje afinitu k této funkční skupině, a tudíž omezuje katalytickou aktivitu tohoto enzymu (Sharma et Dubey, 2005).

Další analýzou byl potvrzen zvyšující se obsah aminokyseliny glutaminu ve všech rostlinách s rostoucí dávkou As v půdě, přičemž byla zjištěna velmi silná přímá závislost. Pro interpretaci tohoto výstupu je potřeba vysvětlit vzájemný vztah mezi aminokyselinami – glutaminem, glutamátem a prolinem.

Glutamin představuje jednu z transportních aminokyselin v rostlinách a spolu s glutamátem hrají hlavní roli v přenosu dusíku na další aminokyseliny. Glutamát představující

hlavní prekurzor prolinu se regeneruje působením glutamátsyntázy z glutaminu a 2-oxoglutarátu. Brugierre et al. (1999) prokázali důležitost glutaminu pro metabolismus prolinu inhibicí exprese genu GS1 (**G**lutamine **S**ynthetase **1**), která vedla ke snížení hladin těchto dvou aminokyselin. Dle Abbas et al. (2018) je prolin dobře známý osmoprotektant, který se z velké části hromadí v rostlinách za různých stresových podmínek. Působí jako stabilizátor buněčné stěny a udržuje minimální požadovanou úroveň hydratace uvnitř buněk a buněčných membrán. Bylo zjištěno, že rostliny tolerantní vůči As nadměrně akumulují prolin, který jim umožňuje vyrovnat se se stresem osmotickou úpravou a udržuje růst rostlin pod napětím. Existuje celá řada mechanismů, kterými prolin může snížit toxicitu As: změnou struktury buněčné stěny a tím snížit absorpci toxinu, přímým zhasením ROS, zvýšením aktivit různých antioxidantů, což nepřímo snižuje poškození ROS, a také změnou exprese genů souvisejících se stresem.

S obranou proti toxicitě As je rovněž spojena tvorba tripeptidu glutathionu (GSH) skládajícího se z glutamátu, cysteinu a glycinu ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). Oligomer GSH tvoří základ fytochelatinů, které umožňují vázat As přes molekuly síry. V rostlinách s vyšším obsahem As dochází k přednostnímu využití glutamátu za účelem vzniku fytochelatinů (Schmöger et al., 2000).

Vyšší obsah glutaminu souvisí tedy s výše popsanými obrannými mechanismy a může sloužit jako ukazatel stresu rostliny.

Předpokládalo se, že dojde k navýšení obsahu vodorozpustného As v půdě v důsledku stupňovaného množství As do půdního substrátu. Tento efekt byl potvrzen, přičemž u všech rostlin došlo k výraznému navýšení As oproti kontrole až na variantě As3. Lze tedy konstatovat, že na obsahu As v půdním roztoku má výrazný vliv vysoká dávka přidávaného As do půdy, v tomto případě 250 mg As/kg půdy. Nejnižší obsahy As na všech variantách byly vždy stanoveny u *P. cretica Albo-lineata* (graf č. 10), což se může vysvětlovat tím, že rostlina značné množství As akumulovala do své biomasy na rozdíl od *P. cretica Parkerii* a *P. straminea*, které As nehyperakumulují.

Ghosh et al. (2004) potvrdili, že záleží na množství biologicky dostupného a ve vodě rozpustného As mající výrazný inhibiční účinek na mikrobiální populaci než na celkovém obsahu As v půdě.

Interpretace výsledků z rozborů půdy úzce souvisí s výše zmíněnou mikrobiální aktivitou, která ovlivňuje obsahy prvků a aktivitu nitrátoreduktázy v půdě. Dle Xiong et al. (2010) půdní mikroorganismy hrají klíčivou roli v geochemickém cyklu As prostřednictvím mikrobiálních transformačních procesů zahrnujících oxidaci, redukci a metylaci. Rhizobakterie se mohou významně podílet na příjmu As a akumulačních procesech u rostlin *Pteris*. Změny v mikrobiální diverzitě souvisí s množstvím As v půdě, přičemž dle autorů v kontrolní půdě byla detekována vysoká úroveň mikrobiální heterogenity, která klesala s rostoucím množstvím As v půdě.

Je významné sledovat změny jak v rhizosféře, tak v okolní půdě, poněvadž v rhizosféře se pravděpodobně snižuje toxicita As následkem zvýšené mikrobiální činnosti, což může být vysvětlením rozdílných výsledků mezi těmito dvěma částmi půdy.

V tomto pokusu jsme sledovali změnu obsahu organického uhlíku v půdě v závislosti na zvyšující se dávce As do půdního substrátu. U *P. cretica Albo-lineata* mezi těmito dvěma veličinami byla zaznamenána velmi silná nepřímá závislost ( $r = -0,809$ ) v okolní půdě a silná nepřímá závislost ( $r = -0,653$ ) v rhizosféře, kde se množství organického C postupně snižovalo. To může být následkem poklesu mikrobiální biomasy a menší inkorporací C do mikrobiálních buněk. Množství mikrobiální biomasy je ukazatelem změn celkového organického C v půdě, přičemž nižší obsah C na kontaminované půdě As oproti kontrole vyzorovali i Ghosh et al. (2004). U rostlin *P. cretica Parkerii* a *P. straminea* nelze v této charakteristice jednoznačně popsat trendy z důvodů nízké závislosti sledovaných veličin. Signifikantní výsledek jsme zaznamenali u *P. cretica Parkerii* na variantě As3 v rhizosféře, kde došlo k nejvýraznějšímu nárůstu oproti kontrole (21 %), což může být odůvodněno zvýšenou potřebou dodávky degradovatelných uhlíkatých zbytků sloužící jako zdroj energie potřebné ke zvýšení metabolické mikrobiální aktivity na zmírnění toxicity As u nehyperakumulujících rostlin (Walter et Walter, 2002).

Analýza půdních vzorků ukázala, že došlo k hromadění rozpustného organického N v půdě u všech rostlin s rostoucím množstvím As v půdě. K vyššímu nárůstu těchto sledovaných veličin oproti kontrole docházelo v okolní půdě než v rhizosféře, opět pravděpodobně v důsledku vyšší rhizobiální aktivity mikroorganismů. Dalším vysvětlením může být nižší využití  $\text{NH}_2$  skupin zapříčiněním snížením populace mikroorganismů.

Hromadění  $\text{N-NO}_3^-$  v půdě nastalo u všech rostlin, což je důsledkem poklesu snížené aktivity nitrátreduktázy, která katalyzuje redukci  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NO}_2^-$  za anaerobních podmínek.

Očekávali jsme, že v pokusu dojde k signifikantnímu snížení aktivity nitrátreduktázy (NR) v půdě se zvyšující se dávkou As, což bylo u všech rostlin potvrzeno prokázáním silné až velmi silné nepřímé závislosti. K zajímavému efektu došlo u *P. straminea*, kdy byla zcela pozastavena činnost enzymu v okolní půdě na variantě As2. V rhizosféře u téže rostliny byl vyzorován nejmenší rozdíl oproti kontrole ve srovnání s *P. cretica Albo-lineata* a *P. cretica Parkerii*, což se opět může vysvětlovat interakcí mezi stresovanou rostlinou a rhizobakteriemi. Fu et Tabatabai (1989) provedli studii týkající se účinků stopových prvků na aktivitu nitrátreduktázy v půdě. Zjistili, že As (V) a další sledované stopové prvky (Ag, Cd, Hg, Se, W) o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/g}$  inhibují aktivitu enzymu NR více jak ze 75 %. Nejvyšší efektivita inhibice NR těmito prvky nastala ve vzorcích s kyselým a neutrálním pH půdy. Ve vzorku se zásaditou půdou zaznamenali inhibiční schopnost NR pouze u As (III) a Se.

## 7. Závěr

- Cíl práce byl splněn, rozborů rostlin a půdy získaných z pokusu, kde byl použit půdní substrát s rostoucími dávkami As, byly vyhodnoceny. Převážně jsme dospěli ke statisticky významným výsledkům u daných charakteristik, o jejichž problematice ve vztahu k As toxicitě z dlouhodobého pohledu existuje minimum publikací. Tyto výsledky mohou tedy sloužit pro další výzkum v oblasti fytoremediace.
- V důsledku As kontaminace došlo ke snížení biomasy, kořenů i nadzemních částí, u všech rostlin.
- Pouze u *P. Albo-lineata* se projevila výrazná hyperakumulační schopnost, která této rostlině dává výhodu přežití v silných stresových podmínkách, přičemž důkazem byl úhyn rostliny *P. straminea* na variantě As3.
- Byla potvrzena hypotéza, kdy jsme předpokládali, že dojde k inhibici enzymu nitrátoreduktázy v důsledku zvyšujícího se množství As v rostlině, což vedlo k hromadění N-NO<sub>3</sub> v rostlinných pletivech a zvyšování obsahu celkového N. Mezi dávkami As a obsahy N-forem byla stanovena velmi silná přímá závislost u všech sledovaných rostlin.
- Obsah glutaminu se v rostlinách zvyšoval z důvodu pozměněných metabolických cest, jež vedly ke snaze se vyrovnat se stresem vyvolaným As. Nejvíce signifikantní výsledek jsme zaznamenali u nehyperakumulující rostliny *P. straminea* na variantě As2.
- V půdních rozbořech byly markantní rozdíly v rhizosféře a v okolní půdě, což bylo zapříčiněno obecně zvýšenou aktivitou mikroorganismů v okolí kořenů rostlin, jež čerpají energii z exudátů rostlin.
- Obsah vodorozpustného As v půdě se výrazně zvýšil až na variantě As3, tudíž velké množství biologicky aktivního As se uvolní až při vyšších dávkách As do půdy. Nadlimitní množství As v půdě významně ovlivnilo sledované půdní charakteristiky v důsledku snížené aktivity půdních mikroorganismů.
- Potvrdila se hypotéza, že s rostoucím As v půdě bude klesat aktivita nitrátoreduktázy v jejímž důsledku se zvýší obsah N-NO<sub>3</sub> v půdě. Byla stanovena silná nepřímá závislost mezi těmito veličinami u všech rostlin.

## Seznam použité literatury

- Abbas, G., Amjad, M., Bibi, I., Hussain, M., Khan, M. I., Murtaza, B., Natasha, Niazi, N. H., Shahid, M. 2018. Arsenic Uptake, Toxicity, Detoxification, and Speciation in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15 (1). 59.
- Addiscott, T. M. 2005. *Nitrate, Agriculture and the Environment*. Cabi publishing. Wallingford. p. 252. ISBN: 0851999131.
- Adriano, D. C. 2001. *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals*. Springer. New York. p. 867. ISBN: 9780387986784.
- Alam, S. M. 1984. Effect of nutrient solution pH and N-sources (NH<sub>4</sub>/NO<sub>3</sub>) on the growth and elemental content of rice plants. *Agronomie, EDP Sciences*. 4 (4). 361–365.
- Assing, J., Bolan, N. S., Saggiar, S., Singh, J. 2008. Assessment of nitrogen losses from urea and an organic manure with and without nitrification inhibitor, dicyandiamide, applied to lettuce under glasshouse conditions. *Australian Journal of Soil Research*. 46 (7). 535-541.
- Balík, J., Černý, J., Kulhánek, M. 2012. *Bilance dusíku v zemědělství*. Sborník z konference: Racionální použití hnojiv. Praha. 40 s. ISBN: 9788021323292.
- Bernhard, A. 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Players and Human Impact. *Nature Education Knowledge*. 3 (10). 25.
- Boczulak, S. A., Hawkins B. J., Roy, R. 2014. Temperature effects on nitrogen uptake by seedling roots of three contrasting conifers. *Tree Physiology*. 34 (5). 513-523.
- Brugiere, N., Dubois, F., Hirel, B., Lelandais, M., Limami, A. M., Roux, Y., Sangwan, R. S. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*. 11 (10). 1995-2012.
- Bruijn, F. J. 2015. Biological Nitrogen Fixation. *Advances in Microbiology*. 6. 407-411.
- Cameron, K. C., Di, H. J., Moir, J. L. 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals Of Applied Biology*. 162 (2). 145–173.
- Evans, R., Bloom, A., Ehleringer, J., Sukrapanna, S. 1996. Nitrogen composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5) grown under ammonium or nitrate nutrition. *Plant, Cell & Environment*. 19. 1317-1323.
- Fan, X., Miller, J. A., Naz, M., Xu, G., Xuan, W. 2017. Plant nitrate transporters: from gene function to application. *Journal of Experimental Botany*. 68 (10). 2463-2475.
- Finnegan, P. M., Chen, W. Arsenic Toxicity: The effect on Plant metabolism. *Frontiers in Physiology*. [online]. 6. 6. 2012 [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368394/>>.
- Follett, R. F. 2008. Transformation and Transport Processes of Nitrogen in Agricultural Systems. In: Follett, R. F., Hatfield, J. L. (eds.). *Nitrogen in the Environment Sources, Problems and Management*. Academic Press Elsevier. USA. p. 19–51. ISBN: 9780123743473.

- Fu, M. H., Tabatabai, M. A. 1989. Nitrate reductase activity in soils: Effects of trace elements. *Soil Biology and Biochemistry*. 21 (7). 943-946.
- Ghosh, A. K., Bhattacharyya, P., Pal, R. 2004. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International*. 30 (4). 491-499.
- Groffman, P. M., Robertson, G. P. 2015. Nitrogen transformations. In: Paul, E.A. (ed.). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic Press. USA. p. 421-446. ISBN: 9780124159556.
- Hartley-Whitaker, J., Meharg, A. A. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologists*. 154. 29-43.
- Hillel, D. 2008. Biological Nitrogen Fixation and Cycling. *Soil in the Environment*. 12. 163-174.
- Hjorth, M., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Ravn, H. W. 2006. Amino acids in loose silky-bent (*Apera spica-venti* L.) responding to prosulfocarb exposure and the correlation with physiological effects. *Pesticide Biochemistry & Physiology*. 86. 138-145.
- Hlušek, J., Richter, R. 1996. Průmyslová hnojiva, jejich vlastnosti a použití. Institut výchovy a vzdělávání Mze ČR. Praha. 50 s. ISBN: 8071051217.
- Jalota, S. K., Kaur, S., Sharma, S., Vashisht, B. B. 2018. Understanding Climate Change Impacts on Crop Productivity and Water Balance. Academic Press. USA. p. 1-53. ISBN: 9780128095201.
- Jha, A. B., Dubey, R. S. 2004. Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. *Plant Growth Regulators*. 43. 259-268.
- Kirkby, E., Mengel, K., 2001. Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 849. ISBN: 1402000081.
- Kyveryga, P. M., Blackmer, A. M., Ellsworth, J. W., Ramon, I. 2004. Soil pH Effects on Nitrification of Fall-Applied Anhydrous Ammonia. *Soil Science Society of America Journal Abstract*. 68 (2). 545-551.
- Liu, Q. J., Hu, C. X., Su J. J., Sun, X. C, Tan Q. L., Zheng, C. M. 2012. Effects of high concentrations of soil arsenic on the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and rape (*Brassica napus*). *Plant, Soil & Environment*. 58 (1). 22-27.
- Luongo, T., Ma, L. Q. 2005. Characteristics of arsenic accumulation by Pteris and non-Pteris ferns. *Plant and Soil*. 277. 117-126.
- Maathuis, F. 2009. Physiological Functions of Mineral Nutrients. *Current Opinion in Plant Biology*. 12. 250-258.
- Martens, D. A. 2005. Denitrification. In: Hillel, D. (ed.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. USA. Academic Press. p. 378-382. ISBN: 9780123485304.
- Masscheleyn, P. H., Delaune, D. R., Patrick, W. H. 1991. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environmental, Science & Technology*. 25 (8). 1414-1419.
- Masunga, R. H., Buchan, D., Mlay, P., Neve, S. D., Odeh, I., Singh, A., Uzokwe, V. N. 2016. Nitrogen mineralization dynamics of different valuable organic amendments commonly used in agriculture. *Applied Soil Ecology*. 101. 185-193.



- May, J. Nitrification Inhibitors May Reduce Manure Nitrogen Loss In Unfavorable Weather [online]. Michigan State University Extension. 24. 3. 2014[cit. 2018-9-8]. Dostupné z <<https://www.no-tillfarmer.com/articles/2467-nitrification-inhibitors-may-reduce-manure-nitrogen-loss-in-unfavorable-weather>>.
- McMcKague, K. Environmental Impacts of Nitrogen Use in Agriculture [online]. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 11/2005 [cit. 21.8. 2018]. Dostupné z <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/engineer/facts/05-073.htm>>.
- Meharg, A. A. 2003. Variation in arsenic accumulation – hyperaccumulation in ferns and their allies. *New Phytologist*. 157 (1). 25-31.
- Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. In: *Sbírka zákonů České republiky*. s. 2692-2699. Dostupné také z <<https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=153&r=2016>>.
- Mráz, J. 2013. Močovina a vliv inhibitorů na její uplatnění. *Zemědělec – příloha periodika Agrární obzor*. 39. 8-9.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8 (3). 199-216.
- Orsel, M., Filleur, S., Fraiser, V., Vedele, F. D. 2002. Nitrate Transport in Plants: Which gene and which control?. *Journal of Experimental Botany*. 370 (53). 825-833.
- Pajuelo, E., Dary, M., Palomares, A. J., Rodríguez-Llorente, I. D. 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium – Medicago sativa* symbiotic interaction. *Environmental Pollution*. 154. 203–211.
- Pandey, S., Rai, R., Rai, L. C. 2015. Biochemical and Molecular Basis of Arsenic Toxicity and Tolerance in Microbes and Plants. In: *Flora, S. J. S. (ed.). Handbook of Arsenic Toxicology*. Elsevier. The Netherlands. p. 627-674. ISBN: 9780124186880.
- Pavlíková, D., Balík, J., Pavlík, M. 2008. Vliv amonného dusíku na metabolismus rostlin. *Agrochémia*. 48 (12). 3–8.
- Pavlík, M., Kaliszová, R., Neuberg, M., Pavlíková, D., Staszková, L., Száková J, Tlustos P. 2010. The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73. 1309-1313.
- Prosser, J.I. 2005. Nitrogen in soil. In: Hillel, D. (ed.). *Encyclopedia of soils in the Environment*. Academic Press Elsevier. UK. p. 31-39. ISBN: 978-0-12-348530-4.
- Singh, N., Ma, L. Q. 2007. Assesing Plants for Phytoremediation of Arsenic – Contaminated Soils. In: Willey, N. (ed.). *Phytoremediation: Methods and Reviews*. Springer Science & Business Media. USA. 319-347. ISBN: 9781597450980.
- Singh, N., Kumar, D., Sahu, A. P. 2007. Arsenic in the Environment: Effects on Human Health and Possible Prevention. *Journal of Environmental Biology*. 28. 359-365.
- Singh, J., Bolan., N.S., Sagggar, S., Zaman, M. 2008. The Role of Inhibitors in the Bioavailability and Mitigation of Nitrogen Losses in Grassland Ecosystems. In: Hartemink, A. E., McBratney, A. B., Naidu,

- R. (eds.). Chemical Bioavailability in Terrestrial Environments. Elsevier. Oxford. p. 329-362. ISBN: 9780444521699.
- Singh, N., Ma, L. Q., Raj, A., Vu, J. C. 2009. Effect of arsenic on nitrate metabolism in arsenic hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ferns. *Environmental Pollution*. 157 (8-9). 2300-2305.
- Sinha, B., Bhattacharyya, K. 2015. Arsenic toxicity in rice with special reference to speciation in Indian grain and its implication on human health. *Journal of the Food and Agriculture*. 95 (7). 1435-1444.
- Sharma, P., Dubey, R. S. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17. 35-52.
- Schmöger, M. E. V., Grill, E., Oven, M. 2000. Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. *Plant Physiology*. 122 (3). 793-801.
- Soudek, P., Malá, J., Podlipná, R., Valentová, Š., Vaněk, T., Víchová, L. 2006. Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické listy*. 100. 323-329.
- Šarapatka, B. 2010. Agroekologie: východiska pro udržitelné zemědělské hospodaření. Olomouc: Bioinstitut. Olomouc. ISBN: 9788087371107.
- Šimek, M. 2008. Skleníkové plyny v půdě. *Vesmír*. 11. 758-760. Dostupné také z: <<http://casopis.vesmir.cz/clanek/3-sklenikove-plyny-v-pude>>.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Los Angeles. p. 782. ISBN: 0878935657.
- Tlustoš, P., Balík, J., Pavlíková, D., Száková, J., Šichorová, K. 2007. Rizika kovů v půdě v agrosystémech v ČR. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha-Ruzyně. 27 s.
- Vaněk, V., Balík, J., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P. Dusík v půdě a jeho přeměny [online]. *Agris*. 27. listopadu 1997 [cit. 27. 8. 2018]. Dostupné z <<http://www.agris.cz/clanek/118806/dusik-v-pude-a-jeho-premeny>>.
- Vaněk, V., Balík, J., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P. 2016. Výživa a hnojení polních plodin. Profi Press s.r.o. Praha. 224 s. ISBN: 9788086726793.
- Walter, J. F., Walter W. W. 2002. Arsenic transformations in the soil/rhizosphere/plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*. 99. 259-278.
- Wei, Z., Arriagada, D., Hu, G., Liang, K., Pan, Z., Wu, Y., Zou, Y., Zuo, J. 2015. The effect of pH on the adsorption of arsenic(III) and arsenic(V) at the TiO<sub>2</sub> anatase [1 0 1] surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 462 (15). 252-259.
- Xiong, J., He, Z., Nostrand, J. D. V, Tu, S., Wang, G., Wu, L., Zhou, J. 2010. Microbial Communities and Functional Genes Associated with Soil Arsenic Contamination and the Rhizosphere of the Arsenic-Hyperaccumulating Plant (*Pteris vittata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (21). 7277-7284.
- Zehnálek, J., Adam, V., Kizek, R. 2006. Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin. *Chemické listy*. 100. 508-514.
- Zhao, F. J., Dunham, S. J., McGrath, S. P. 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist*. 156 (1). 27-31.
- Zhao, F. J., Ma, J. F., McGrath S. P., Meharg, A. A. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*. 181 (4). 777-794.

Zolnowski, A. C., Ciećko, Z., Najmowicz, T. 2010. Arsenic Content in and Uptake by Plants from Arsenic-Contaminated Soil. In: Kulakow, P. A., Pidlisnyuk, V. V. (eds.). Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural, and Wastewater Contamination. 135-145. ISBN: 9789048135929.