



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ OBSAHU KADMIA V ROSTLINNÉM PLETIVU SMRKU ZTEPILÉHO A BUKU LESNÍHO PO APLIKACI NANOČÁSTIC OXIDU KADEMNATÉHO.

DETERMINATION OF CADMIUM CONTENT IN PLANT TISSUE OF NORWAY SPRUCE AND EUROPEAN BEECH AFTER APPLICATION OF CADMIUM OXIDE NANOPARTICLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Svozilová, DiS.

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1066/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Eva Svozilová, DiS.**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Stanovení obsahu kadmia v rostlinném pletivu smrku ztepilého a buku lesního po aplikaci nanočástic oxidu kademnatého.

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše zaměřená na transport těžkých kovů v životním prostředí a vliv těžkých kovů na rostliny (listnaté a jehličnaté stromy).
2. Metody - stanovení kadmia pomocí atomové absorpční spektrometrie v listech a jehličích; odběr a zpracování vzorků, mikrovlnný rozklad vzorků.
3. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Eva Svozilová, DiS.
student(ka)

Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je sledovat obsah kadmia v jehličí smrku ztepilého a listech buku lesního po řízené expozici nanočásticemi oxidu kademnatého, a vyhodnotit potenciální nebezpečí těchto nanočástic pro rostliny. Jehlice a listy byly odebrány po jednotýdenní a dvoutýdenní expozici a před analýzou na obsah kadmia byly upravovány příslušnými procedurami. Vzorke byly mineralizovány v kyselině dusičné pomocí tlakového mikrovlnného mineralizátoru a následně analyzovány metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) s elektrotermickou atomizací na obsah kadmia. Na základě výsledků AAS analýzy, porovnáním obsahu kadmia v jednotýdenním a ve dvoutýdenním experimentu, v umytých a neumytých vzorcích jehlic a listů, byl vyhodnocen transport nanočástic do rostlinného pletiva sledovaných rostlin.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to monitor cadmium content in needles of Norway spruce and European beech leaves after controlled exposure to cadmium oxide nanoparticles and evaluate the potential risks of such nanoparticles to plants. Needles and leaves were harvested after a one-week and two-week exposure and prior to analysis of cadmium content, they were modified using relevant procedures. Samples were mineralized in nitric acid using pressurized microwave mineralizer and subsequently analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS) with electrothermal atomization of cadmium content. Based on the results AAS analysis the transport of nanoparticles into the plant tissue of studied species was evaluated, comparing the content of cadmium in one week and two weeks experiment in the washed and unwashed samples of needles and leaves.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, kadmium, těžké kovy, životní prostředí, atomová absorpční spektrometrie.

KEYWORDS

Nanoparticles, cadmium, heavy metal, environment, atomic absorption spectrometry.

SVOZILOVÁ, E. *Stanovení obsahu kadmia v rostlinném pletivu smrku ztepilého a buku lesního po aplikaci nanočástic oxidu kademnatého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Večeřa, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce panu Ing. Zbyňku Večeřovi, CSc., za odborné vedení, rady, cenné připomínky a trpělivost při zpracování celé práce. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Bohumilu Dočekalovi za pomoc, ochotu a rady při práci v laboratoři. Také děkuji Ústavu výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Laboratoři ekologické fyziologie rostlin za kultivaci rostlin a odběr vzorků. Poděkování patří i mým rodičům, celé rodině a nejbližším za podporu a motivaci k dokončení studia.

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	9
2.1. Transport těžkých kovů v životním prostředí	9
2.2. Vliv těžkých kovů na rostliny	10
2.2.1. Fytoremediace a těžké kovy	11
2.2.2. Fyziologické poškození rostlin těžkými kovy	12
2.3. Vliv nanočástic na rostliny	13
2.4. Působení těžkých kovů na lidský organismus.....	15
2.5. Smrk ztepilý (<i>Picea abies</i>).....	15
2.5.1. Taxonomické zařazení smrku ztepilého	15
2.5.2. Podmínky růstu	18
2.5.3. Choroby a škůdci smrků.....	18
2.5.4. Smrk a jeho využití	19
2.6. Buk lesní (<i>Fagus sylvatica</i>)	19
2.6.1. Taxonomické zařazení buku lesního	19
2.6.2. Podmínky růstu buku lesního	21
2.6.3. Buk a jeho využití	21
3. Stavba jehlic a listů	22
3.1. Stavba listu u buku	22
3.2. Stavba jehlic u smrku	23
4. Využití smrku a buku v potravinářství	24
4.1. Využití smrku	24
4.2. Využití buku	25
5. Atomová absorpční spektrometrie	26
5.1. Základní principy a historie AAS.....	26
5.2. Instrumentace	27
5.2.1. Zdroj záření	28
5.2.2. Atomizátory.....	29
5.2.3. Monochromátor	29
5.2.4. Detektor	29
5.3. Interference.....	30
5.4. Korelace pozadí.....	30
5.5. Elektrotermická atomizace.....	31

5.5.1. Teplotní program.....	31
6. Cíle práce.....	33
7. Experimentální část.....	34
7.1. Chemikálie	34
7.2. Expoziční experiment.....	34
7.3. Generování nanočástic CdO.....	35
7.4. Charakterizace nanočástic Cd elektronovou mikroskopií	36
7.5. Odběr a zpracování vzorků před analýzou	37
7.6. Označení vzorků.....	37
7.7. Rozklad vzorků jehličí	38
7.8. Rozklad vzorků listí	40
7.9. Stanovení obsahu kadmia ve vzorcích	41
7.10. Vyhodnocení dat	42
7.10.1. Výpočet obsahu kadmia v jehličí a listech	43
7.10.2. Statistické zpracování hodnot.....	43
8. Výsledky a diskuze.....	44
8.1. Výsledky stanovení obsahu kadmia v jehličí smrku	44
8.1.1. Jednotýdenní experiment.....	44
8.1.2. Dvoutýdenní experiment	47
8.2. Výsledky stanovení obsahu kadmia v listech buku.....	51
8.2.1. Jednotýdenní experiment.....	51
8.2.2. Dvoutýdenní experiment	54
8.3. Experimenty se smrky a buky	58
9. Závěr.....	59
10. Použitá literatura	60

1. ÚVOD

Lidstvo je provázeno přítomností těžkých kovů již dlouhou dobu. Jsou dochovány záznamy o používání olova přibližně 2 000 let př.n.l.. Škodlivé působení těchto kovů je známo také velmi dlouho, např. některé sloučeniny antimonu, olova a mědi jsou označovány jako jedy v Ebersově papyru, který vznikl cca 1 500 let př.n.l. a patří mezi nejstarší lékařské záznamy. Některé těžké kovy byly objeveny až později, např. kadmium bylo poprvé získáno až roku 1817, jako doprovodný prvek zinkové rudy. Kovy tvoří elektrofilní kationty. Většina kationtů kovů má silnou afinitu k síře, proto reagují s thiolovou –SH skupinou v enzymech, nebo s karboxylovou skupinou –COOH a aminoskupinou –NH₂. Karboxylové a aminoskupiny jsou mimo jiné charakteristické pro genetickou informaci. Jestliže kationty kovů vstoupí do organismu trávicím traktem je vstřebání kovů ulehčeno kyselým prostředím v trávicím ústrojí [1].

V současné době je velký zájem o těžké kovy a jejich chování v životním prostředí kvůli jejich velkému průmyslovému využití, a z toho vyplývající neúměrné zatěžování životního prostředí produkovanými odpady, které obvykle tyto těžké kovy obsahují [1].

Kadmium je měkký kov stříbritého lesku hojně využívaný pro svou odolnost vůči korozi. Oproti zinku, který vždy doprovází v zinkových rudách, nepatří mezi esenciální prvky a působí na životní prostředí velmi toxicky. Kvůli podobnému atomovému poloměru může kadmium nahrazovat zinek v biochemických strukturách a měnit tím jejich funkčnost, například může způsobit inaktivaci určitých enzymů. Kadmium se vyskytuje v půdě přirozeně jako stopový prvek, ale kontaminací může být jeho koncentrace mnohonásobně zvýšena. Existují rostliny, které jsou hyperakumulátory kadmia a mohou ve svých pletivech tento prvek toxicky hromadit (jedná se o sóju, pšenici a některé druhy zeleniny). Mezi hyperakumulátory kadmia patří i tabák, a proto je kadmium přítomno v cigaretovém kouři [1].

Dřívější studie ukázaly, že prostředí může ovlivnit koncentrace iontů v potravinových plodinách. Za určitých růstových podmínek rostliny absorbují esenciální a neesenciální prvky, které nad určitou koncentraci mohou působit toxicky. Tyto látky nacházíme nahromaděné v rostlinných tkáních, a na některé druhy mohou působit letálně. Při požití jsou látky uložené v rostlině, ať už prospěšné, nebo toxické přeneseny z producenta (rostliny) ke spotřebiteli. Např. rostliny bohaté na selen mohou být používány při nedostatku selenu u přežvýkavců a jiných zvířat. Nicméně je to stále předmětem zkoumání, protože hranice mezi nedostatkem a toxicitou je velmi úzká [2].

Toxicita nanočástic může být v důsledku jejich malé velikosti, jejich povrchových vlastností, schopnosti agregace a souvisejících vlastností, nebo mohou napodobovat jiné prvky. Také se zdá, že větší uvolňování iontů je z nanočástic kovů, než ze surového kovu [2].

Primárním místem interakce mezi rostlinou a nanočásticemi je buněčná stěna, která se skládá zejména z celulózy a bílkovin a nabízí řadu aktivních míst pro vazbu nanočástic. Buněčná stěna je polopropustná, a velikost jejich pórů je v rozmezí od 5 do 20 nm, což umožňuje pronikání malých molekul. Spojení nanočástic s lipidovou dvouvrstvou plazmatické membrány je provázeno změnami v produkci reaktivních forem kyslíku a v metabolických procesech [3].

Rostliny se vždycky vyvíjely v přítomnosti přírodních nanomateriálů, ale v současné době se zvyšuje jejich vystavení nanočásticím hlavně s výrobou a používáním umělých nanomateriálů v různých nástrojích a zboží. Umělé nanomateriály se mohou dostat do rostlin přímou aplikací, v případě náhodného úniku, kontaminovanou půdou, sedimenty nebo

atmosférickými spády [2]. Umělé nanomateriály vznikají neúmyslně v energetickém průmyslu, metalurgickém a hutním průmyslu, v chemickém průmyslu, dopravě, nebo úmyslně vznikají při moření osiva, zlepšování úrodnosti půd nebo jsou v ochranných prostředcích rostlin [4]. Některé studie však zjistily, že ne všechny nanočástice, se projevují pro rostliny toxicky. Některá zkoumání dokonce dokázaly i pozitivní nebo žádné účinky na rostlinu. Nicméně je na místě opatrnost při vyvozování závěrů toxicity jednotlivých nanočástic. Fyziologické a vizuální hodnocení toxicity nanočástic na rostliny nemusí být citlivým indikátorem toxicity. Je zapotřebí další studium na protetické, genomické a metabolické úrovni. Kromě toho je třeba ještě objasnit, zda tyto látky, ať už podléhající biotransformaci či nikoliv, mají nepříznivý vliv na zdraví zvířat a lidí [2].

Poznatky o účinku kovových nanočástic jsou omezené. Např. nanočástice křemíku v dávce 1 000 mg/l v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS, povrchově aktivní látka rozptylující nanočástice v roztoku), zcela inhibovaly klíčení semen cukety. Naopak nanočástice křemíku bez přítomnosti SDS vedly k 80% klíčivosti. Prakticky však neexistuje žádná studie o nanotoxicitě s jednoznačným závěrem. Nicméně se, s pomocí omezených informací, rozvíjí nový obor nanoekotoxikologie, který se zabývá účinky umělých nanomateriálů na živé složky ekosystémů [2].

Po celou dobu existence je lidstvo provázeno těžkými kovy. Jak je uvedeno výše, účinky nanočástic těžkých kovů jsou stále ve stádiu zkoumání a doufáme, že tato práce přispěje k objasnění jejich příjmu rostlinami. V našich experimentech byly smrk ztepilý a buk lesní vystaveny expozici nanočástic oxidu kademnatého. Jehličí smrku a listy buku mají také své místo v potravinovém řetězci.

Experimenty s expozicí nanočástic oxidu kademnatého na uvedené rostliny se prováděly, spolu s analýzou obsahu kadmia ve vzorcích, na Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., kultivace rostlin a odběr vzorků (jehličí, listy) se uskutečnil na Ústavu výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i. v Laboratoři ekologické fyziologie rostlin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

K těžkým kovům chemicky řadíme ty kovy, jejichž hustota je větší než $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Mezi těžké kovy patří i řada biogenních mikroprvků jako je kobalt, měď, železo, mangan, molybden a zinek, které se při vyšších koncentracích stávají toxické. Do skupiny těžkých kovů se řadí tyto toxické prvky: kadmium, olovo, chrom, kobalt, rtuť, zlato a stříbro. Určení koncentrací, kdy tyto prvky působí toxicky, není vůbec jednoduché. Záleží na jednotlivých druzích a odrůdách rostlin v konkrétních přírodních nebo hydrologických podmínkách. Největší nebezpečí pro rostliny představuje kadmium, olovo, měď, nikl, rtuť, nikl a zinek. Nepříznivé působení těchto prvků se zvyšuje se vzestupem kyselosti půd, protože kyselé půdy lépe uvolňují ionty těžkých kovů do roztoku [4].

Nanočásticemi označujeme takové objekty, jejichž rozměry jsou alespoň v jednom rozměru menší než 100 nm [5].

2.1. Transport těžkých kovů v životním prostředí

Těžké kovy doprovází lidstvo pravděpodobně od počátku jeho existence. Do prostředí se dostávají různými způsoby. Buď přírodní cestou, nebo antropogenními zdroji, které mohou být přímé (úmyslné aplikace) nebo nepřímé (neúmyslné aplikace). Mezi přírodní zdroje patří zvětrávání hornin, vulkanická činnost, lesní požáry, prach unášený větrem, mořský aerosol, pevný spád nebo podzemní vody. Antropogenní, přímé zdroje jsou moření osiva, ochrana kultur pesticidy a zlepšování úrodnosti půd hnojivem, průmyslovými komposty nebo znečištění půd odpadními surovinami. Do neúmyslných, antropogenních aplikací zasahuje energetický průmysl, metalurgický a hutní průmysl, chemický průmysl, doprava a také městské a průmyslové aglomerace [4].

Specifickými cestami svých biogeochemických cyklů se mohou těžké kovy pohybovat v ekosystémech. Z těchto cyklů mohou v různých momentech vystupovat a kumulovat se v živých organismech nebo půdách. S rozpustností sloučenin ve vodě je spjata mobilita příslušného kovu. Čím je sloučenina rozpustnější, tím je mobilita daného kovu vyšší. Je velmi podstatné, zda jde u rozpuštěných látek o stabilní komplex nebo o nestálou hydratovanou iontovou sloučeninu. Podstatná je i rozpustnost v kyselinách, hlavně v kyselině dusičné a sírové, které se často vyskytují v životním prostředí. Vysoká kyselost vodních srážek nebo prosakující vody může způsobit vymývání sloučenin těžkých kovů z půdy, které pak mohou pronikat do rostlin a stromů a znehodnocovat zdroje pitné vody. Těžký kov je toxický pro daný organismus až po dosažení určité prahové koncentrace. Některé esenciální prvky jako je měď, zinek, železo nebo chrom, které jsou součástí některých enzymů, jsou pro organismus nezbytné a jejich nedostatek se může projevit onemocněním [1].

Kovy se v přírodě vyskytují ve formě solí nebo jako ryzí a v nízkých koncentracích jsou přirozenou součástí zemské kůry. V životním prostředí se pohybují po geochemických a biologických cyklech. Díky biologickým cyklům mohou přecházet do živých částí ekosystémů. Na rozdíl od organických látek kovy nikdy nedegradují, proto se musí počítat s jejich akumulací v životním prostředí. Ministerstvo životního prostředí ve vyhlášce č. 382/2001 Sb., v příloze 2 a 3 stanovuje mezní hodnoty koncentrací těžkých kovů v půdě, v písku a v kalcích. Po překročení těchto koncentrací by mohlo dojít k poškození funkcí půdy a složek životního prostředí [1].

Sloučeniny těžkých kovů se mnohostranně využívají, proto existuje mnoho možností a zdrojů úniku těchto nebezpečných těžkých kovů do životního prostředí. Kadmium slouží

jako doprovodný kov v zinkových a olovených rudách, v zemědělství je součástí fosfátových hnojiv. Nachází se v pigmentech pro barvy a plasty, je v bateriích, vzniká při spalování fosilních paliv a také při kouření cigaret. Dále např. olovo vzniká při úpravě rud, v hutích, v chemickém průmyslu, přidává se do glazur; arsen je aditivum do skla, součástí ochranných prostředků na dřevo; zinek je součástí slitin, pigmentů do barev a keramických glazur atd. Při zpracování rud zahrnující jejich mletí nebo drcení vzniká prach nebo při jejich tavení se tvoří páry a dýmy kovů, které ohrožují dýchací ústrojí. V těchto případech se do životního prostředí dostává hlavně olovo, kadmium, arsen, selen, nikl a rtuť. Další zdroje kontaminace mohou být charakteristické pro určitý kov, např. rtuť se využívá v elektrochemických procesech nebo v lékařství, chrom se uvolňuje z roztoků používaných jako konzervační prostředek na ochranu dřeva nebo jako činidlo na zpracování kůže. Tabákový kouř je častým zdrojem expozice těžkých kovů, hlavně kadmia a niklu [1].

2.2. Vliv těžkých kovů na rostliny

Porovnáním minimální toxické koncentrace daného iontu pro buňky *Escherichia coli* s jeho koncentrací v mořské vodě, byla definována toxicita jednotlivých kovů v následující řadě se sestupným trendem: Zn^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , UO_2^{2-} , CO_2^+ , CrO_4^{2-} , Au^{3+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} . Na substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů rostou metalofilní bakterie. Mezi důležité zástupce těchto bakterií patří *Ralstonia*, která je schopna žít ve velmi kontaminovaných půdách. Svoji detoxikaci uskutečňuje tak, že aktivně přenáší příslušný kov z buňky do vnějšího prostředí. Např. zredukuje Hg^{2+} a uvolní ho v neutrální formě jako Hg. Je však známo, že v závislosti na konkrétních podmínkách je rozdílná biologická toxicita pro rozdílné koncentrace těžkého kovu. Jejich vliv závisí i na faktorech determinovaných daným organismem, proto je velmi obtížné stanovit obecné biologicky přijatelné koncentrace těžkých kovů. Podobný mechanismus detoxikace, jako je u bakterií, můžeme nalézt i u vyšších rostlin. Po překročení velmi nízké hranice obsahu těžkých kovů, je tento kov pro rostlinu toxický [4].

Těžké kovy mohou vstupovat do buněk:

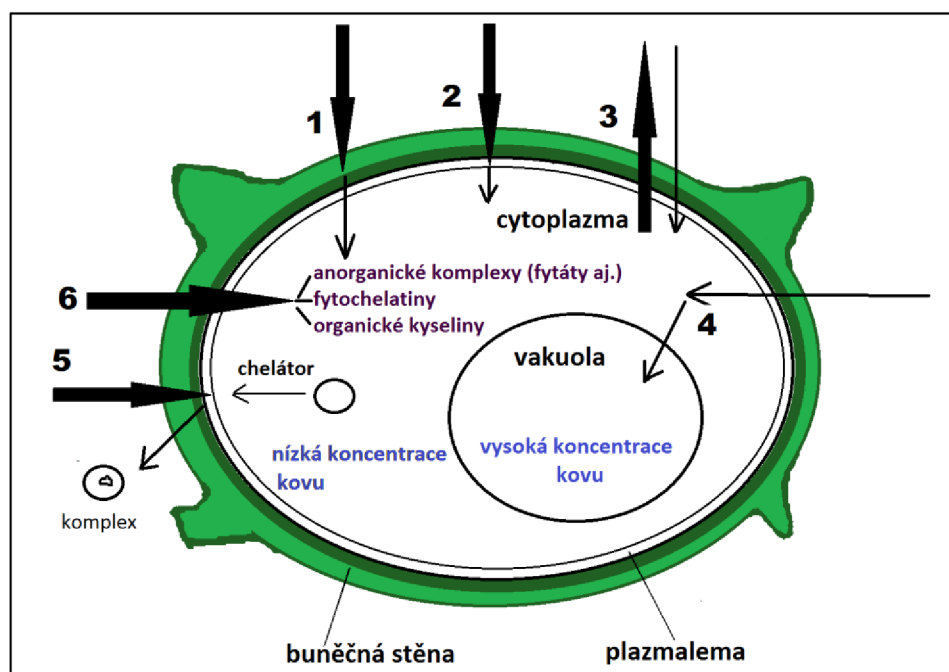
- na základě jejich fyzikálněchemických vlastností, např. kadmium a olovo využívají podobnosti s biogenními kovy jako je vápník, mangan, železo nebo zinek
- kanály pro příjem vápníku
- širokospektrálními přenašeči kovů [4]

Na obrázku 1 jsou schematicky znázorněny hlavní vstupy těžkých kovů do buňky i cesty její detoxikace (1: vazba v buněčné stěně; 2: omezený tok plazmalemou; 3: aktivní výtok z buňky; 4: kompartmentace ve vakuole; 5: chelatizace na rozmezí plazmalemy a buněčné stěny; 6: chelatizace v cytoplazmě). K detoxikaci patří převážně chelatizace těžkých kovů a jejich uložení do metabolicky neaktivního poolu ve vakuolách [4].

Nebezpečné působení těžkých kovů není zatím dostatečně objasněno. Většinou jejich toxicita spočívá v tom, že se vyznačují vysokou afinitou k redukovaným skupinám síry. Dochází tak k inaktivaci enzymů, které mají volné –SH skupiny. Proti tomuto působení těžkých kovů produkují organismy metalothioneiny, specifické nízkomolekulární bílkoviny s vysokým obsahem cysteinu. Těmito bílkovinami jsou těžké kovy účinně detoxikovány [6].

Dále byly u rostlin zjištěny fytochelatiny, specifické peptidy, které jsou tvořeny γ -glutamylcysteinovými zbytky (jedním až šesti) s terminálním glycinem. Ionty těžkých kovů se komplexně váží na SH-skupiny cysteinových zbytků a vytváří stabilní thioláty. Fytochelatiny mají vysokou afinitu převážně ke kadmium, mědi, olovu a zinku. Syntéza fytochelatinů probíhá přenosem γ -glutamylcysteinových zbytků na glutathion,

což je tripeptid. Tento přenos se uskutečňuje za působení enzymu transpeptidázy nazývané fytochelatinsyntáza. Se zvýšením obsahu těžkých kovů v cytoplazmě se zvyšuje i aktivita tohoto enzymu. Z toho plyne, že buňky obsahující zvýšené množství těžkých kovů obsahují i více fytochelatinsyntázy, než buňky nezatížené ionty těžkých kovů [4]. Fytochelatiny se podílí na obraně proti toxickým kovům tím, že uzavírají kovové ionty do vakuol [7].



Obr. 1: Možné mechanismy zajišťující toleranci buňky v prostředí s obsahem těžkých kovů.

Při porovnávání toxických účinků kadmia na brukev sítinovitou a řepku olejku, se zjistilo, že brukev sítinovitá má více fytochelatinů v kořenech, zatímco řepka olejka jich má více v listech. Avšak rozdíly ve stresové odpovědi obou druhů byly minimální. Proto, autoři studie došli k závěru, že musí existovat i další faktory, kromě koncentrace fytochelatinů, které mají schopnost transportovat komplexy Cd-fytochelatinu do vakuoly [8].

2.2.1. Fytoremediace a těžké kovy

Neselektivní ukládání odpadu z různých zdrojů, včetně starých hutí, může vést k významnému zvýšení široké škály kovů (např. arsenu, kadmia, chromu, niklu, mědi, olova a zinku) v půdě. Tento odpad je dále modifikován chemickými a biologickými procesy [9].

Jak tyto kovy ovlivňují potravní řetězec, závisí na zdroji, koncentraci kovu, vlastnostech půdy, příjmu rostlinou a absorpci zvířaty [10].

Fytoremediace je nově vznikající technologie, která se zabývá použitím vyšších rostlin k vyčištění kontaminovaného prostředí, včetně půdy znečištěné kovy. Vzhledem k tomu, že vyšší rostliny vytváří biomasy bohaté na extrahované toxické kovy, je nutné další ošetření této biomasy. Proto bylo cílem studie [9] zhodnotit potenciál divokých rostlin pro produkci biomasy a odstranění těžkých kovů ze znečištěného místa. Jednalo se o topol, pajasan, akát, ambrózii a diviznu. Bylo zjištěno, že divizna je hyperakumulátorem kadmia a má velký potenciál pro fytoextrakci [9].

Fytoremediace je použití rostlin ke zlepšení kontaminovaných zemín. Vegetativní kryt na půdě znečištěné těžkými kovy může zabránit rozptýlení nečistot větrnou erozí a snížení množství vody, která prosakuje půdou. To by mohlo udržet těžké kovy od podzemní vody

tím, že se stabilizují v půdním profilu. V extrémních případech, jako je důlní těžba, ozelenění kontaminovaných půd může být obtížné vzhledem k fytotoxicitě těžkých kovů a může vyžadovat použití rostlin tolerantních na těžké kovy. Fytotoxicita se liší v závislosti na druhu rostliny a těžkého kovu: pro zinek se pohybuje 500 až 1 500 mg.kg⁻¹, pro olovo cca 300 mg.kg⁻¹, pro měď 25 až 40 mg.kg⁻¹ a pro kadmium 5 až 700 mg.kg⁻¹ [9].

Několik druhů z rodu *Brassica* (brukev) jsou velmi důležitými zemědělskými plodinami v různých částech světa, a je také známo, že jsou to akumulátory těžkých kovů. Obecně jsou považovány za dobré rostliny pro fytoremediační účely. Avšak jedním z problémů, pokud jde o použitelnost rostlin pro tyto účely, jsou obtíže ve stanovení reprezentativních experimentálních postupů. Některé studie se provádějí v hydroponickém roztoku, jiné v půdách s přídatkem těžkých kovů a jiné v přirozeně kontaminovaných půdách. Výsledky získané ve všech těchto rozdílných experimentálních podmínkách jsou velmi rozmanité a je obtížné extrapolovat výsledky z jedné experimentální podmínky na jiné [8].

2.2.2. Fyziologické poškození rostlin těžkými kovy

Škody vyvolané toxickým množstvím těžkých kovů byly přičítány různým příčinám, které obvykle fungují dohromady a mohou zahrnovat přímé poškození jedním kovem nebo nepřímé poškození vyvolané oxidačním stresem [11]. Mezi obvyklé zjištěné účinky patří snížení obsahu chlorofylu, způsobené buď snížením syntézy, nebo zvýšením degradace, porucha rovnováhy vody, snížení aktivity různých enzymů, uzávěr průduchů, zpomalení rychlosti fotosyntézy a snížený příjem esenciálních minerálních látek [12].

Několik studií s těžkými kovy zjistilo pokles obsahu vody v rostlinách, které byly vystaveny těžkým kovům, a proto toxický účinek kovů může být způsoben nepřímo snížením příjmu vody [13]. Například obsah vody v rostlině *Brassica juncea* se drasticky snížil po vystavení rostliny toxickým koncentracím olova, a to i u toho druhu, který je považován za tolerantní. Někteří autoři uvádějí, že ve vodě rozpustné cukry, prolin a další aminokyseliny mohou mít ochrannou funkci, regulaci osmotického potenciálu a také přímo detoxikaci reaktivních forem kyslíku (ROS). Ali et al. [13] potvrdili tuto ochrannou roli u rostlin *B. napus* vystavených kadmium, když listová aplikace kyseliny 5 -aminolevulové vedla ke zlepšení odolnosti rostlin a ke zvýšení hladin těchto látek. Přesto je potřeba poznamenat, že tato studie byla provedena za velmi vysokých koncentrací kadmia (100 a 500 μm) a prolin i rozpustné cukry se u rostlin kontaminovaných kadmium snížily pravděpodobně v důsledku obecného poškození metabolismu rostlin [8].

Obvykle mezi první viditelné příznaky související s toxickým působením kovů patří nejen nedostatečný růst, ale také snížený růst kořenů a změny v morfologii kořenového systému. Normálně jsou kořeny postiženy více než listy, protože jsou v přímém styku s toxickými prvky. Různé kovy mohou mít různé efekty. Měď má výraznější vliv na boční vývoj kořenů než zinek. Snížený růst kořenů a výhonků pod expozicí kadmium, což mohlo být způsobeno omezením příjmu železa a manganu do výhonků, ale toto tvrzení nebylo prokázáno [8].

Ačkoli je Cd vysoce toxické pro rostliny [14], bylo zjištěno počáteční zrychlení růstových parametrů *B. juncea* rostoucí na kadmium kontaminované půdě a v hydroponii. Bylo to přisuzováno hormetickému efektu způsobenému přílišnou kompenzací na poškození homeostázy rostliny. Při expozici v pozdější fázi byl tento efekt opačný a toxické účinky byly patrné. Za zmínku stojí skutečnost, že Armas et al [15] tento jev popisuje pouze v experimentu s půdou a ne v hydroponii, jak je popsáno ve stejné publikaci [8].

Různé rostliny jsou schopny přemístit těžké kovy do různých částí rostlin, což je částečně obranný mechanismus. Nouairi et al. [16] uvádí, že kadmium se hromadí v trichomech listů

B. juncea, a to mohlo z části vysvětlit toleranci těchto druhů na těžké kovy. Nicméně mechanismy, které toto umožňují, nejsou zcela jasné [8].

2.3. Vliv nanočástic na rostliny

Příjem, bioakumulace, biotransformace a rizika nanomateriálů na potravinářské plodiny nejsou stále přesně prozkoumány. Bylo studováno jen velmi málo nanomateriálů a rostlinných druhů, a to hlavně jen u raných stádií růstu rostlin. Většina studií, kromě jedné s multistěnnými uhlíkovými trubicemi, byla prováděna na rostlinném modelu huseníčku rolním a další s nanočásticemi ZnO na jílku vytrvalém a sledoval se účinek nanomateriálů na klíčící semena nebo na 15 -ti denní sazenice. Jen velmi málo odkazů popisuje biotransformaci nanomateriálů v potravinářských plodinách a možnost přenosu nanomateriálů na další generace exponovaných rostlin není známa. Možné hromadění nanočástic v potravinovém řetězci je taktéž neobjasněno [2].

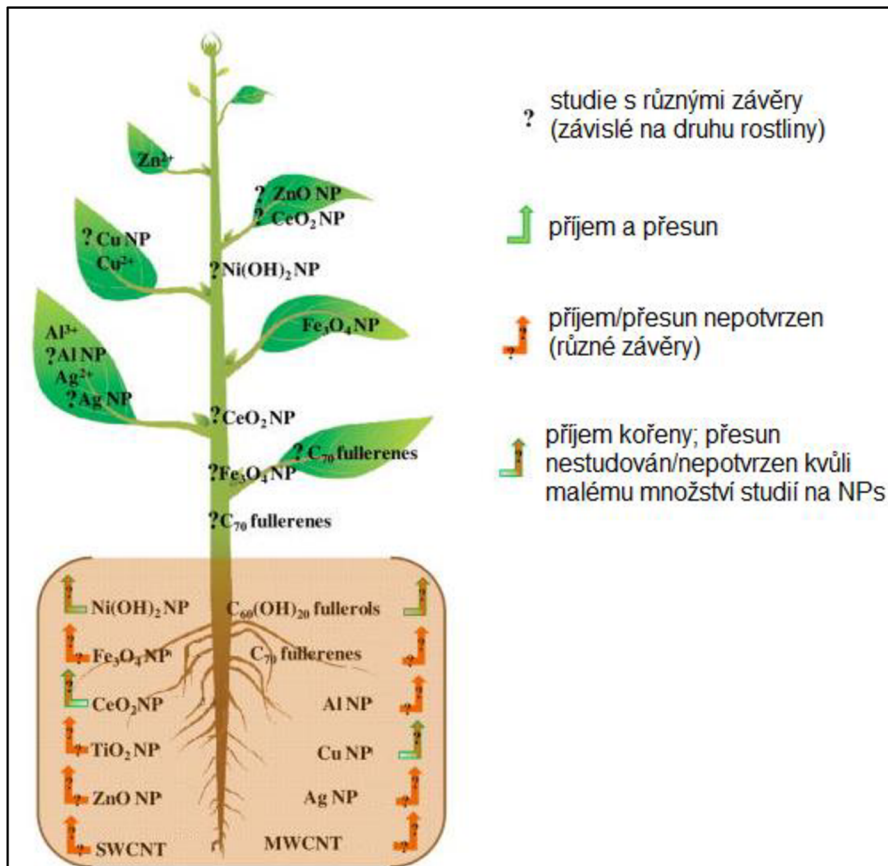
Uměle vytvořené nanomateriály (ENMs) se můžou dostat to rostliny prostřednictvím přímé aplikace, v případě náhodného úniku, kontaminovanou půdou, sedimenty nebo atmosférickými spády. Přesto se o účinku ENMs na potravinářské plodiny a jejich možných účincích v potravinovém řetězci ví jen velmi málo [17].

Současná literatura uvádí, že absorpce, přesun a akumulace nanočástic závisí na druhu rostliny a na velikosti, typu, chemickém složení, funkcionalizaci a stabilitě nanočástic. Mezi nanomateriály na uhlíkové bázi bylo prokázáno snadné hromadění v rostlinách pouze u fullerenu C70 a fullerolů. Naopak u nanomateriálů na kovové bázi bylo zjištěno, že většina z nich se přijímá a hromadí v rostlinách, ačkoli existují některá data, která toto vyvrací [2].

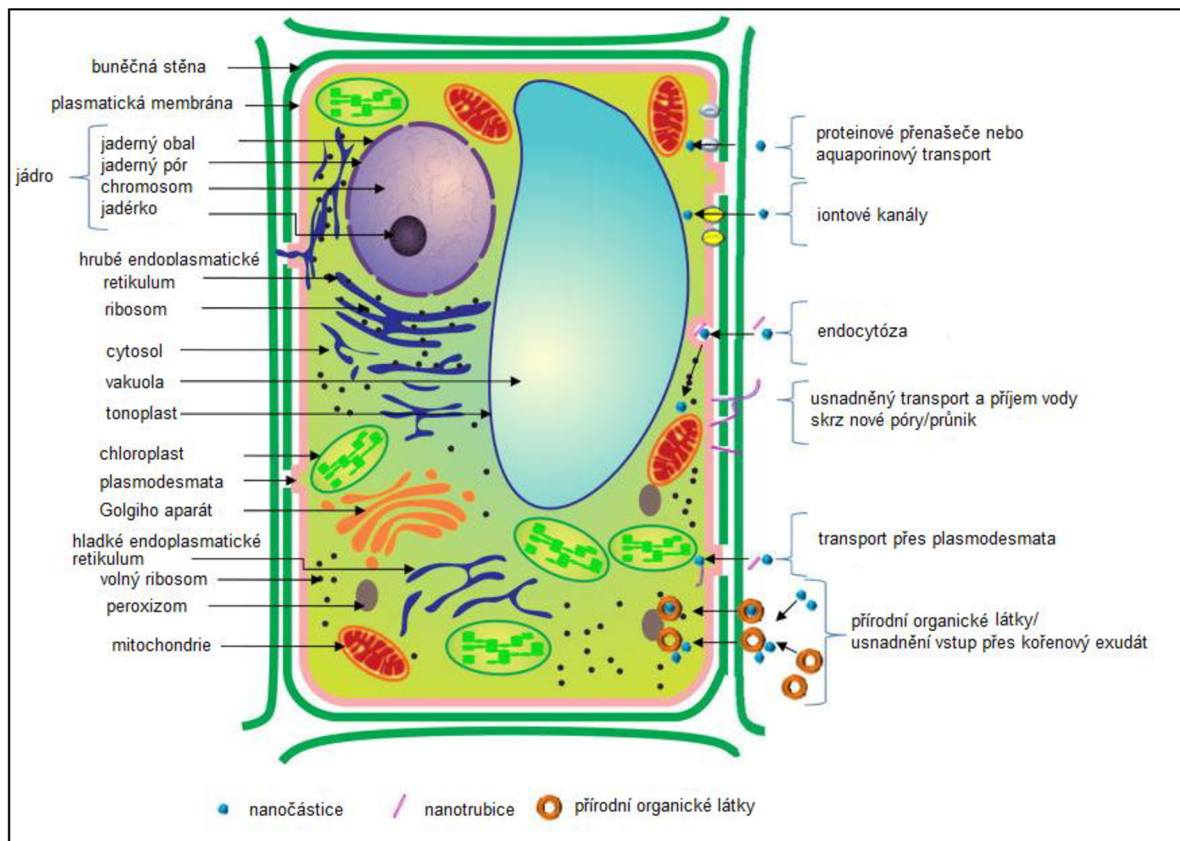
Je prokázáno, že kadmium má tendenci hromadit se v požitelných částech rostlin, takže hlavním zdrojem expozice člověka kadmiu jsou potraviny rostlinného původu. To vedlo k zavedení příslušných limitů koncentrace kadmia v potravinách a to je limit $0,2 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ sušiny pro obiloviny a luštěniny. Známým problémem také je, že některé plodiny rostoucí na půdách s přirozeně se vyskytující koncentrací kadmia mohou stále hromadit tento kov v požitelných částech (např. v semenech) v koncentracích, které překračují tento limit, čímž se vylučuje jejich vhodnost ke spotřebě a exportu [18].

Selektivní vychytávání, biotransformace a přesun různých nanočástic u modelové rostliny je znázorněno na obr. 2. Jak je vidět z tohoto obrázku, známé údaje o příjmu nanočástic rostlinami nejsou stále ještě jednoznačné [2].

Absorpce nanočástic rostlinnými buňkami zřejmě probíhá několika způsoby, viz obrázek 3. Jak je znázorněno na tomto obrázku, nanočástice můžou vstoupit do rostlinné buňky vazbou na proteinové přenašeče, prostřednictvím aquaporinů, iontových kanálů, endocytózou, vytvořením nových pórů (přednostně uhlíkové trubice), nebo vazbou na organické chemikálie v živném médiu. Vzhledem ke zvýšenému poměru povrchu ke hmotnosti, nanočástice ve srovnání se surovými kovy, mají zřejmě větší reaktivitu s okolím. Nanočástice mohou tvořit komplexy s membránovými přenašeči nebo kořenovými exudáty, a následně být transportovány do rostlin. Pro většinu nanočástic na kovové bázi, o kterých je známo, že jsou přijímány rostlinami, byly zjištěny iontové transportéry [19]. Jakmile jsou nanočástice uvnitř buněk mohou být přepravovány apoplasticky nebo symplasticky. Symplastický a apoplastický systém slouží k transportu na kratší vzdálenosti mimo vodivá pletiva. Mohou být přepravovány přes plasmodesmy z jedné buňky do druhé. Přesné mechanismy, proč jen některé rostlinné druhy snadno přijímají některé nanočástice, jsou stále neznámé a zůstávají předmětem výzkumu [2].



Obr. 2: Rostlina vykazující selektivní příjem a přesun nanočástic [2].



Obr. 3: Vstupy nanočástic do rostlinné buňky [2].

2.4. Působení těžkých kovů na lidský organismus

Hlavní způsoby vstřebání iontů těžkých kovů do těla jsou inhalace dýchacím ústrojím a požitím trávicím ústrojím. Po nějaké době pronikají do krve, kterou jsou transportovány na různá cílová místa v organismu. Cílové orgány jsou orgány, které jsou daným kovem ovlivňovány nebo ve kterých je kov ukládán. Staří lidé a malé děti jsou nejvíce vnímaví k toxickému působení těžkých kovů. V dětském organismu rychlý růst buněk a jejich rychlé dělení při působení těžkých kovů může způsobit riziko genotoxických efektů. Poškození organismu závisí na době, po kterou jsou kovy přítomny v organismu. Proto se zjišťuje biologický poločas, doba, za kterou tělo vyloučí polovinu naakumulovaného kovu. Tyto hodnoty se liší pro jednotlivé prvky. Hodiny až dny jsou to pro chrom, kobalt a arsen. U kadmia a olova je to dvacet až třicet let. Absorbování kovů mohou ovlivnit i stravovací návyky a to buď negativně, nebo pozitivně. Např. vitamin C snižuje absorpci kadmia a olova, tím, že zvyšuje absorpci železa, které tak snižuje příjem těchto těžkých kovů. Konzumace mléka naopak absorpci některých kovů zvyšuje [1].

Cílovými orgány pro kadmium jsou ledviny, játra a varlata. Proto způsobuje poškození ledvin, reprodukčních orgánů, destrukci erytrocytů, je jednou z příčin vysokého krevního tlaku a může vyvolat i rakovinu plic. Ionty kadmia jsou také příčinou křehnutí kostí a při dlouhodobém hromadění kadmia v těle, může dojít až k rozpadu kosterního skeletu [1].

2.5. Smrk ztepilý (*Picea abies*)

2.5.1. Taxonomické zařazení smrku ztepilého

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Podříše: Cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: Rostliny nahosemenné (*Gymnospermophytae*)

Nahosemenné rostliny jsou vývojově velmi různorodá součást semenných rostlin, které dosáhly jen stupně nahosemennosti (gymnospermie). Na pohlavním rozmnožování se podílejí tyčinky (mikrosporofyly) a plodolisty (megasporofyly), které tvoří převážně jednopohlavné šištice. Šištice jsou tedy buď samčí, nebo samičí. Vývojově nejsou šištice ještě květy nebo květenství [20].

Na neuzavřených plodolistech (semenných šupinách) samičí šištice jsou většinou po dvou umístěna volně přístupná vajíčka (semeník, blizna i čnělka chybí). Z tyčinek jsou uvolňována pylová zrna, ze kterých při klíčení na vajíčku vznikají dvě neobrvané spermatické buňky. Jen jedna spermatická buňka uskuteční vlastní oplození a z takto oplozené vaječné buňky se postupně vyvíjí semena [20].

Většina taxonů nahosemenných rostlin má stálezelené listy kromě opadavých rodů *Ginkgo*, *Metasequoia*, *Larix*, *Pseudolarix*, *Taxodium*). Nejčastější jsou listy jehlicovité (*Pinophyta*). Některé druhy mají v dospělosti listy šupinové nebo kombinované [20].

Zástupci nahosemenných rostlin se objevují v mladších prvohorách a hlavní rozvoj ustává již koncem druhohor. V dnešní době zahrnují pouze kolem 730 druhů v 70 rodech, 15 čeledí a 5 řádech [20].

Třída: rostliny jehličnaté, jehličnany (*Pinophyta*)

Patří sem jen dřeviny druhotně tloustnoucí, s centrálním válcem stonku z vodivých pletiv (eustélická stavba). Mají vyvinuté dvůrkaté cévy (tracheidy), chybí cévy (tracheje) a dřev je nepatrná. Vedlejší větve jsou tenčí a většinou nepřerůstají hlavní výhon (monopodiální větvení), výjimkou je rod *Taxodium*. Geograficky jsou jehličnany rozděleny na dvě skupiny a to na skupinu severní a jižní polokoule. Tato třída obsahuje asi 50 rodů se 600 druhy, z nichž se přirozeně roste v Asii 65 % rodů, v Severní Americe 33 %, v Evropě 17 %, v Africe také 17 %, v Jižní Americe 12 % a v Austrálii 31 %. Některé druhy se vyskytují ve více světadílech. Přepokládá se, že vývojové centrum jehličnanů může být v oblasti vymezené Čínou, Novým Zélandem a Japonskem, protože většina druhů roste v Číně. První zástupci skupiny se objevili před více než 300 miliony let v mladších prvohorách [20].

Řád: borovicotvaré (*Pinales*)

Čeleď: borovicovité (*Pinaceae*)

Do této čeledi patří vždyzelené, vzácně opadavé jednodomé dřeviny. Jehlicovité listy jsou ve šroubovici buď jednotlivě, nebo ve svazečcích. Nachází se převážně na severní polokouli. Patří sem např. jedlovec, douglaska, smrk, jedle, modřín, borovice, cedr. Jedlovec má jehlice řapíkaté a řapíky přitisknuté k větvičce. Douglaska má třícípé podpůrné šupiny nápadně vyčnívajících šišek. U smrku nasedají jehlice na listové polštářky. U jedlí nasedají jehlice rozšířenou bází přímo na větvičky. Jehlice u modřínu jsou měkké a každoročně opadají. Borovice má jehlice ve svazečcích po dvou až pěti na drobných, nenápadných brachyblastech. Jehlice u cedru jsou ve svazečcích po třiceti až padesáti. Cedrová větvička je podobná modřínové, ale jen ve vegetační době [20].

Rod: smrk (*Picea*)

Tento rod je dobře morfologicky ohraničen oproti ostatním rodům, avšak vysoká proměnlivost uvnitř rodu ztěžuje odlišení jednotlivých druhů. Vývoj rodu sahá do konce druhohor a koncem třetihor se smrky staly převážnou součástí lesů, dokonce jejich dominantou. Následné ochlazování a s tím spojené doby ledové ve starších čtvrtohorách způsobily změny v zastoupení evropské vegetace [20].

Centrum vývoje se nachází pravděpodobně ve východní Asii. Tato teorie podporuje snad nejstarší žijící taxon tohoto rodu, japonský horský smrk (*Picea koyamae*), který je u nás jen vzácně pěstovaný. Pravděpodobně se smrk z Asie musel rozšířit dvěma velkými proudy: východním a západním. Východní proud pronikal do Severní Ameriky přes dnešní Beringovo moře, kdy pevninský most ještě spojoval oba kontinenty. Západní proud směřoval do západní Asie a Evropy přes dnešní Sibiř a Čínu [1].

Do rodu *Picea* (smrk) patří asi 50 druhů. Sedm druhů pochází ze Severní Ameriky, osmnáct z Číny a jen jeden druh je původem ze středu Evropy a tím je smrk ztepilý (*Picea abies*). Obvykle rostou do kuželovitého tvaru, avšak s věkem často ztrácejí spodní větve, a tím bývají méně žádoucí pro okrasné účely. Jsou to přizpůsobivé stromy, které dosahují velkých rozměrů, a proto se běžně vysazují po celé Evropě [21].

Borka (vnější kůra) je poměrně tenká a později šupinovitá a štítkovitá. U starších stromů může být dole na kmeni rozpukaná a dřev s výjimkou jedlí obsahuje pryskyřici [20].

Pro stálezelené, jednotlivé jehlice jsou charakteristické všechny odstíny zelené. Jen stříbrné smrky mají jehličí namodralé. Hustě po spirálách obrůstají ve všech směrech dokola větvičky. Jehlice jsou buď čtyřhranné, typ A (na průřezu kosočtvercové) nebo zploštělé, typ B (na průřezu mečovitě). Čtyřhranné jehlice mají na každé straně jeden nezřetelný podélný proužek průduch. Typ B má na spodní straně jehlice dva bílé proužky průduchů. Typ B má smrk omorika a smrk sitka. Jehlice přisedají na hnědých stopkovitě zúžených polštářcích k větévce a zůstávají na stromě sedm až deset let. Tyto listové polštářky zůstávají na větvičkách i po opadu jehlic a zanikají až při odlupování vnějších vrstev kůry [20], [21].

Smrk je anemonogamní (větrosprašný). Válcovité, dužnaté samčí šištice většinou sedí vzpřímeně v dolní a střední části koruny. Samičí šišky rostou v horní části koruny a zráním se stávají převíslé. Na stromě jsou až do následující vegetační sezony, kdy jako celek ze stromu opadají. Šišky začínají růst na smrku až od desátého roku. Šišky dozrávají v prvním roce, jsou vejcovito-válcovité, dřevnatí a visí směrem dolů. Většinou opadávají v celku po vypadnutí semen. Jedlové šišky se rozpadají při vypadávání semen a jsou vždy vzpřímeny [20], [21].

Šišky se svými semennými šupinami rozdělují tento rod do dvou skupin. Typ morinda je hojnější skupina s většinou neohebnými, tuhými a tmavě hnědými semennými šupinami. Druhá, méně častá skupina je typ casicta. Tato skupina má šupiny tenké až papírové, ohebné se světle hnědými semennými šupinami. Do druhé skupiny patří smrk pichlavý, smrk sitka a smrk Engelmannův [20].

Semena mají lehce oddělitelná křídla a semenáčky obsahují pět až deset děloh [20].

Mezi druhy rodu *Picea* patří např.: smrk omorika, smrk sitka, smrk sivý, smrk černý, smrk východní, smrk ztepilý, smrk sibiřský, smrk pichlavý a smrk Engelmannův. Smrk omorika (*P. omorika*), který je vzácně pěstovaný, má jehlice tupé, větvičky dolů visící a chlupaté. Korunu má nápadně úzkou. Větve jsou krátké a šišky má typu morinda. Smrk sitka (*P. sitchensis*) má jehlice ostře zašpičatělé, větvičky lysé. Koruna je doširoka kuželovitá a šišky jsou typu casicta. Smrk sivý (*P. glauca*) má tlustší, špičaté, nepichlavé a matné jehlice. Výhony má světlé. Smrk černý (*P. mariana*) má jehlice úzké a matné. Výhony jsou tmavé. Smrk východní (*P. orientalis*) má tupé, tmavě zelené, lesklé jehlice. Výhony má světlé. Smrk sibiřský (*P. obovata*) má žláznatě chlupaté větvičky a okrouhlé semenné šupiny. Smrk pichlavý (*P. pungens*) má tuhé, pichlavé jehlice, větvičky lysé a silné. Pupeny má kulovité, bez pryskyřice. Smrk Engelmannův (*P. engelmanni*) má jehlice měkké, nepichlavé a větvičky žláznatě chlupaté. Pupeny jsou kuželovité a s pryskyřicí [20].

Druh: smrk ztepilý (*Picea abies*)

Smrk ztepilý je nejdůležitější hospodářskou dřevinou, dřevařského průmyslu střední a severní Evropy. Je často pěstovaný mimo oblast svého přirozeného rozšíření. Jeho zastoupení v lesích České republiky je přibližně 53 %, přitom by mělo být pouze 11 % [20].

V Severní Americe je nejčastěji vysazovaným zahradnickým smrskem a hlavním smrskem pro obnovu lesů nejen ve východní Kanadě, Spojených státech, ale i v jiných oblastech mírného pásu severní polokoule [21].

Jedná se o velký strom, který průměrně dosahuje výšky 30 až 40 m, průměr kmene může být až 1,5 m a může žít přibližně 300 až 400 let. Na Šumavě byl v roce 1864 pokácen tzv. Želnavský smrk, který byl vysoký 68,9 m ve věku 585 let. V dnešní době rostou nejvyšší

smrky ztepilé pravděpodobně v horských údolích Bosny a Bulharska, kde jsou vysoké až 63 m [20].

Koruna je pyramidální, pravidelně přeslenitá a do vysokého věku špičatá, užší nebo širší. Větvení je často variabilní. U jedinců na horských lokalitách, kteří jsou vystaveni větrům vanoucích většinou z jednoho směru, mohou na závětrné straně kmene vznikat jednostranné vlajkové koruny. Radiálně uspořádané jsou jehlice na svislých výhonech. Na svrchní straně vodorovných prýtů (budoucích větviček) směřují skoro dopředu, ale na spodní straně těch samých prýtů jsou rozčísnuté. Jehlice jsou na stromě šest až devět let, ale při znečištěném prostředí opadávají dříve [20].

Kmen je štíhlý, válcovitý, většinou s vyvinutými kořenovými náběhy. Kůra smrku je zpočátku tenká, světle hnědá, šupinatá, později šedne a odlučuje se v plochých, tenkých šupinách. Spodní část kmene je většinou podélně rozpraskaná. Velká variabilita kůry a borky vzrůstá se stářím stromu. Převažují typy s tenkou borkou a hladkým či penízkovitým povrchem, nebo typy se silnou borkou a podélnými šupinami. Smrk má bledě nažloutlé, lehké, měkké, pevné a pružné dřevo s drobnými pryskyřičnými kanálky. Dřevo je proto snadno opracovatelné [20].

2.5.2. Podmínky růstu

Smrk ztepilý je většinou považován za polo-stinný až stinný druh se střední tolerancí k zástínu [1]. Někteří jej charakterizují jako slunnou dřevinu [21]. Jejich schopnost snášet zastínění závisí na stáří smrku a na stanovištních podmínkách. Obecně platí, že stromy mají vyšší toleranci k zastínění v mládí na dobrých stanovištích a nižší toleranci ve stáří nebo na špatných stanovištích [20].

Většinou upřednostňují chladnější, vlhčí klima a nedaří se jim v příliš suchých a teplých podmínkách. Na půdu nemají zvláštní nároky, hlavně na obsah živin. Mohou růst i na chudších půdách. Optimální hodnota pH půdy je 4 až 5. Větší význam má obsah půdní vody a dobré provzdušnění půdy. Avšak nadbytek vody spojený s nedostatkem kyslíku má negativní vliv na růst. Obzvláště citlivé jsou na záplavy [20]. Dobře odolávají sněhu. Nesnáší městské znečištěné ovzduší, alkalické půdy a slaný vzduch. Kořeny rostou mělce a jsou vláknité. Smrčkům nevyhovuje pěstování v nádobách a nejlepší doba přesazení je na jaře [21].

2.5.3. Choroby a škůdci smrků

Hmyz podobný mšicím, korovnice (druhy *Adelges*), sáním vytváří deformující hálky, které se dají odstranit rukou nebo se mohou odřezat celé napadené větve [21].

Cytoporální rakovinu způsobuje houbový organismus *Cytospora kunzei*. Toto onemocnění se projevuje křehnutím větví, hnědnutím a opadáváním jehlic. Projevuje se bílou pryskyřicí na kůře stromu, která se vytváří od spodní části stromu. Deštěm, hmyzem a zahradním náradím se rozšiřují její houbové výtrusy. Chemické prostředky na tuto houbu nejsou účinné, ale dá se chorobě předcházet pěstováním smrků za vhodných podmínek a zabráněním mechanickému poranění kůry a kořenů [21].

Dále jehličí narušuje i jiná houba *Rhizosphaera kalkhoffii*, která způsobuje hnědnutí a opadávání jehličí, které se začíná projevovat od spodních větví [21].

Smrk má nepatrnou regenerační schopnost, proto je choulostivý na škody způsobené zvěří (okus, vytloukání). Přestože rostlina přežije, rány jsou vstupní branou pro houbové infekce. Zastříhávání a tvarování na živý plot snáší dobře [20].

Nejčastěji jsou škody způsobené zvěří, mniškou, kůrovci, pilatkami, houbovými chorobami, námrazou, větrem, mokřím sněhem, imisemi a suchem [20].

2.5.4. Smrk a jeho využití

Smrk ztepilý je naše nejdůležitější užitková dřevina a je základním zdrojem pro stavební průmysl. Dřevo je snadno opracovatelné, pevné a lehké. Má malý obsah pryskyřice a dlouhá vlákna, čímž je ideální také pro výrobu papíru a celulózy. Je vyhledávané pro výrobu píšťal do varhan, viol, pian, kytar a jiných strunných nástrojů díky své vysoké rezonantnosti [20], [21].

Původní obyvatelé Ameriky používali kořeny jako vlákna pro výrobu kanoí, míčů a sněžnic. Smrk slouží také jako zdroj potravy pro severská zvířata. Pupeny smrkových letorostů ozobávají kuroviti, hlavně jeřábek a tetřívěk. Jeleni a losy okusují mladé větévky a jehličí. Vysoká zvěř loupe i kůru mladých smrků. Malá křídlatá semena smrku jsou cennou potravou pro řadu druhů ptáků (křivka, strakapoud, datel černý), ale i veverek [21].

2.6. Buk lesní (*Fagus sylvatica*)

2.6.1. Taxonomické zařazení buku lesního

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Podříše: Cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: Rostliny krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiospermae*)

Toto oddělení je velmi proměnlivé a sdružuje velký počet druhů, skoro 300 tisíc a osidluje všechna místa na souši. Krytosemenné rostliny obsahují pravá pletiva, i vodivá. Většina má i cévy, které umožňují efektivněji transportovat vodu rostlinou. Důležitý je vznik květu, souboru orgánů: květní obaly, tyčinky, plodolisty), který má velký význam pro pohlavní rozmnožování. Plodolisty jsou různě srostlé v pestík, jehož hlavní částí je semeník, který dokonale chrání vajíčka a následně semena. Vajíčka tudíž nejsou volně přístupná pylovým zrnům, tak jak je tomu u nahosemenných rostlin. Během dozrávání semen se pestík podílí na tvorbě plodu [22], [23].

Krytosemenné rostliny mají rozličný vzhled od bylin až po stromy, obvykle zelené, výjimečně druhotně nezelené. Jsou i cizopasně nebo saprofyti (živíci se organickými látkami). Většinou rostou na zemi, občas jsou sladkovodní nebo ojedinele mořské. Mají rozmanitý tvar listů, které mohou i druhotně chybět, např. u kaktusů. Původ krytosemenných rostlin není dosud přesně objasněn, protože se nepodařilo nalézt zkameněliny jejich předků [22].

Třída: Dvouděložné rostliny (*Magnoliopsida, Dicotyledonae*)

Dvouděložné rostliny jsou pravděpodobně vývojově starší a také původnější než rostliny jednoděložné. Patří sem většina vyšších rostlin, asi 210 tis druhů [22].

Mají většinou zárodek se dvěma dělohami. Cévní svazky jsou ve stonku uspořádány, mezi lýkovou a dřevní částí s kambiem, do kruhu. S tímto uspořádáním je možné druhotné tloušťnutí, viditelné hlavně u dřevin. Hlavní kořen obvykle vytrvává. Dva, první listy na dceřině větví rostou po straně větve. U listů je žilnatina převážně zpeřená nebo dlanitá. Květy bývají pětičetné, čtyřčetné, s obaly rozlišenými [22].

Řád: bukotvaré (*Fagales*)

Čeleď: bukovité (*Fagaceae*)

Do čeledi bukovité patří 10 druhů z mírného pásu severní polokoule. Jsou to opadavé stromy, které jsou většinou dost mohutné s hladkou borkou. Listy mají zubaté nebo skoro celokrajné se zvlněným okrajem. Květy jsou nenápadné, jednopohlavné. Samčí květy jsou umístěné ve dlouze stopkatých svazečcích s osmi až šestnácti tyčinkami. Samičí květy jsou po dvou obklopené čtyřdílnou číškou a mají tři čnělky. Vejčité plody jsou trojúhelné nažky (bukvice). Bukvice jsou umístěné jednotlivě nebo po dvou až třech v dřevnaté, zevně ostnitě číšce [24].

Množí se semeny nebo se časně z jara roubují. Tato čeleď snáší všechny druhy půd až na suché, písčité nebo těžké nepropustné a bažinaté půdy. Tyto stromy jsou efektní a robustní, nepostradatelné pro krajinné úpravy. Vysazují se jako solitéry nebo do samostatných či smíšených skupin. Existují hybridy s výrazným zbarvením listů nebo různě utvářenou korunou [24].

Zástupcem této čeledi je buk Englerův (*Fagus engleriana*), který je často už od báze vícekmenný. Je až dvacet metrů vysoký a pochází ze střední Číny. Rub listů je nápadně namodralý. Buk velkolistý (*Fagus grandifolia*) je dvacet až třicet pět metrů vysoký strom pocházející z východní části USA a jihovýchodní Kanady. Borka je světle šedá, hladká. Listy jsou vejčité podlouhlé [24].

Rod: buk (*Fagus*)

Tento rod zahrnuje stromy rostoucí pouze na severní polokouli. Samičí květy sedí v číšce a samčí květy visí ve svazečcích. Číška postupně dřevnatí a otevírá se čtyřmi chlopněmi a obsahuje dvě trojhranné nažky (bukvice) [25].

Patří sem kromě buku lesního i buk východní (*Fagus orientalis*) a buk Englerův (*Fagus engleriana*). Předci buku lesního rostli v Evropě už ve třetihorách a dnes roste od Malé Asie k Bulharsku a na Kavkazu je typický lesní strom. V parcích vyrůstá v mohutný strom se zlatožlutým, podzimním zbarvením. Má méně zavětvenou korunu než buk lesní. Balkánský buk je přírodním hybridem buku lesního a buku východního [25].

Buk Englerův je v Evropě málo vysazovaný strom, který roste endemicky v horách jižní Číny. Od evropských buků se odlišuje listy, které jsou zespodu modrozelené, užší a bez brvitého okraje. Tento buk je pojmenován po významném německém botanikovi, který zemřel v roce 1930 a zabýval se zeměpisem rostlin. Jedná se o Adolfa Englera, autora několikásvazkového díla, popisující rostlinné čeledi světa, který byl také ředitelem berlínské botanické zahrady [25].

Druh: buk lesní (*Fagus sylvatica*)

Buk lesní je strom vysoký dvacet pět až čtyřicet pět metrů. Koruna je bohatě větvená, borka je šedá, hladká a tenká. Kmen může mít v průměru až 1,5 m. U volně rostoucích jedinců je koruna kulovitá, jinak je metlovitá. Hlavní kořen je srdcovitý, zkrácený a hojně větvený v boční, silné kořeny. Díky tomu je v půdě dobře zakotven. Buk se dožívá 200 až 400 let. Pupeny má dlouhé, úzké a pichlavé. Listy jsou lehce zubaté, eliptické 5 až 11 x 3,5 až 6,5 cm velké. Na okraji jsou zvlněné, lesklé tmavě zelené a na spodní části světle zelené. Buk je jednodomá dřevina se samčími dlouze stopkatými ve svazečcích květy, v paždí listů. Samčí

květy jsou po dvou v načervenalé číšce, která je zevně nejprve porostlá chlupatými, později dřevnatíci výrůstky. Číška je se vzpřímenými výrůstky 20 až 25 mm dlouhá. Stopky čížek jsou chlupaté a přibližně stejně dlouhé jako číšky [24], [27].

Trojboké nažky, bukvice, jsou plody buku. Bukvice jsou uzavřené po dvou v dřevnaté číšce a otevírají se čtyřmi chlopněmi. Buk začíná plodit na volném prostranství mezi dvacátým až čtyřicátým rokem. Bukvice mají oříškovou chuť, jsou jedlé a roznášené drobnými hlodavci a ptáky. Buk je dřevina s periodickou plodností. V intervalu 6 až 10 let se vyskytují plné úrody. Na výsadbách nových stromků vznikají velké škody, neboť je zvěř ničí okusem [27].

Pochází z Evropy a na východ zasahuje až na Krym s výjimkou dalekého severu. Na jihu se vyskytuje pouze v pohorích. Buk lesní by bez zásahu člověka pokrýval celou střední Evropu. Má spoustu atraktivních hybridů, kteří se liší jak zbarvením a utvářenými listy, tak tvarem a velikostí. Hybrid 'Asplenifolia' má listy dlouze řapíkaté, stříhaně zubaté až 100 x 40 mm velké. K řapíku se sbíhají bez zubů. Hybrid 'Fastigiata' má úzce sloupovitý vzrůst s větvemi většinou až k zemi. Listy hybridu 'Zlatia' jsou nejdříve silně lesklé a žluté, které se později mění na zelenožluté až tmavozelené. Jsou to pomalu rostoucí stromy [24]. Nejběžnější je převislý buk, hybrid 'Pendula'. Červenolistý buk obsahuje v listech anthokyanová červená barviva, která překrývají listovou zeleň, hybrid 'Purpurea' [25].

Na našem území buk lesní patří mezi významné dřeviny. Před začátkem výrazných antropogenních vlivů tvořilo jeho zastoupení v lesích 40,2 %. Nyní je to pouze 8,0 %, ale do budoucna by se jeho podíl měl zvýšit na 18,0 %. K záchraně této dřeviny přispívá i vyhlášení chráněných území různých kategorií a genových základů. Hlavní změnu by však mělo představovat vyhlášení Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin na období 2014 – 2018. Tento program vyhláší v souladu se zákonem č. 149/2003 Sb. Ministerstvo zemědělství ČR [28].

2.6.2. Podmínky růstu buku lesního

Na vláhu v půdě má buk lesní střední nároky. Potřebuje značné množství srážek a hlavně v letním období vyžaduje dostatečnou relativní vlhkost vzduchu. Nejlépe roste na humózních půdách bohatých na vápník, avšak roste na většině druhů hornin. Má rád mírné oceánské klima, proto je citlivý na pozdní mrazy. V nadmořských výškách 400 až 800 m vytváří většinou nesmíšené porosty, ale na horní hranice se už mísí se smrkem a jedlí, a na spodní hranici s dubem [27]

2.6.3. Buk a jeho využití

Je významný pro lesnictví a z jeho načervenalého, pevného dřeva se vyrábí parkety, nábytek, dýhy, kuchyňské nářadí, nebo slouží jako palivo. Z bukovic je možné lisovat stolní olej. Avšak plody obsahují saponiny a kyselinu šťavelovou, proto jsou pro člověka slabě jedovaté. Pro spoustu savců a ptáků slouží jako důležitá zimní potrava [25].

Buk je meliorační a zpevňující dřevina, která lépe odolává škodlivým vlivům jako je např. vítr, sníh, než jiné dřeviny. Pokud roste v lese, zvyšuje tak odolnost celého lesa proti těmto škodlivým vlivům i proti erozi půdy a sesuvům [27].

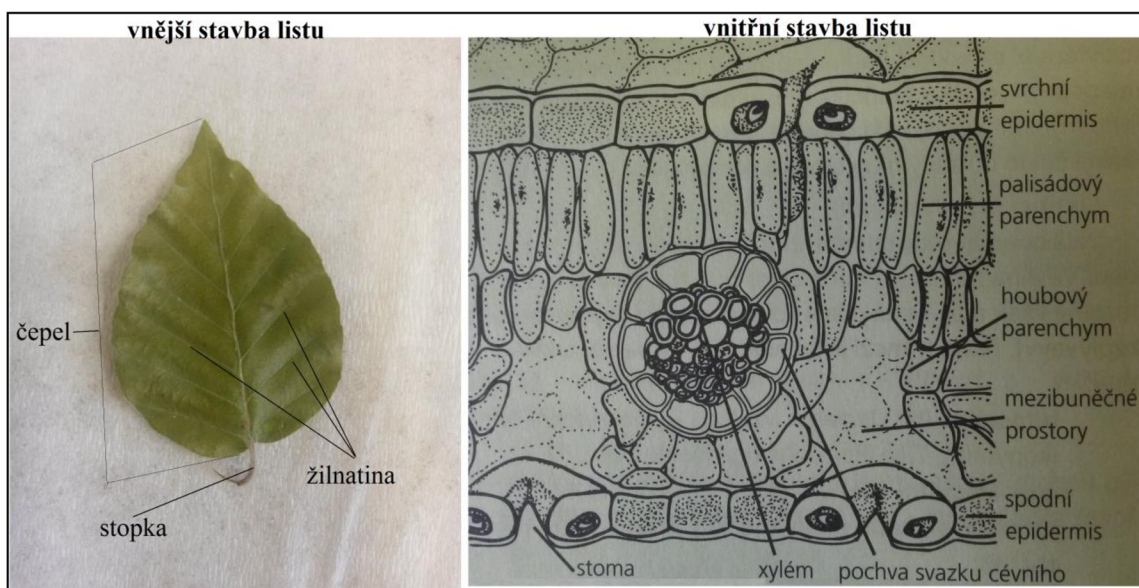
3. STAVBA JEHLIC A LISTŮ

Listy jsou postranní orgány, které rostou pouze na stonku. Z hlediska vývoje se rozlišují různé typy listů a některé z nich si prošly samostatným vývojem. Za nejpůvodnější se považují jehlicovité listy (mikrofyly), které vznikly pravděpodobně z vychlípenin pokožky, tzv. enací – enační teorie. Velké ploché asimilační listy, nazývané makrofyly (megafyly) souvisí s procesy, které jsou vysvětlovány telomovou teorií. Většina listů jsou makrofyly, které tvoří pestrou škálu forem. Nejdůležitější funkcí listu je fotosyntéza (asimilace CO_2), výdej vody (transpirace) a také výměna vzduchu mezi rostlinou a prostředím. List může plnit i funkci sekundární – zásobní, ochrannou atd. [29].

3.1. Stavba listu u buku

Buk lesní má bifaciální list, jehož svrchní strana se liší od spodní strany. Vnitřní stavba listu odpovídá jeho fyziologickým funkcím a tím je fotosyntéza a transpirace. Na povrchu listu je pokožka (epidermis) a uvnitř jsou vodivá pletiva a pletivo základní, nazývané mezofyl, které je rozlišeno na palisádový a houbový parenchym. Mezofyl je parenchymatické pletivo mezi pokožkou svrchní a spodní strany listu. Vnější a vnitřní stavba listu je znázorněna na obr. 4 [29].

Epidermis tvoří jedna vrstva buněk, která je kryta kutikulou, která je na svrchní straně silnější. V epidermis svrchní strany bývá méně průduchů. Palisádový parenchym mezofylu je umístěn pod svrchní pokožkou a je tvořen válcovitými buňkami, které jsou protažené v kolmém směru na povrch listu, a obsahuje velké množství chloroplastů. Palisádový parenchym může být tvořený jen jednou nebo více vrstvami buněk. Počet vrstev buněk závisí hlavně na světelných podmínkách. Houbový parenchym je umístěn mezi palisádovým parenchymem a spodní pokožkou, a je obsahuje buňky nepravidelného tvaru s většími mezibuněčnými prostory. Jeho buňky obsahují menší množství chloroplastů, ale je významný pro fotosyntézu. V mezofylu se nachází i kolaterální cévní svazky, které mají pravidelnou orientaci. Dřevní část směřuje ke svrchní straně a lýková část vede ke spodní straně. Produkty fotosyntézy z mezofylu jsou odváděny sběrnými buňkami do lýkové části cévních svazků [29].

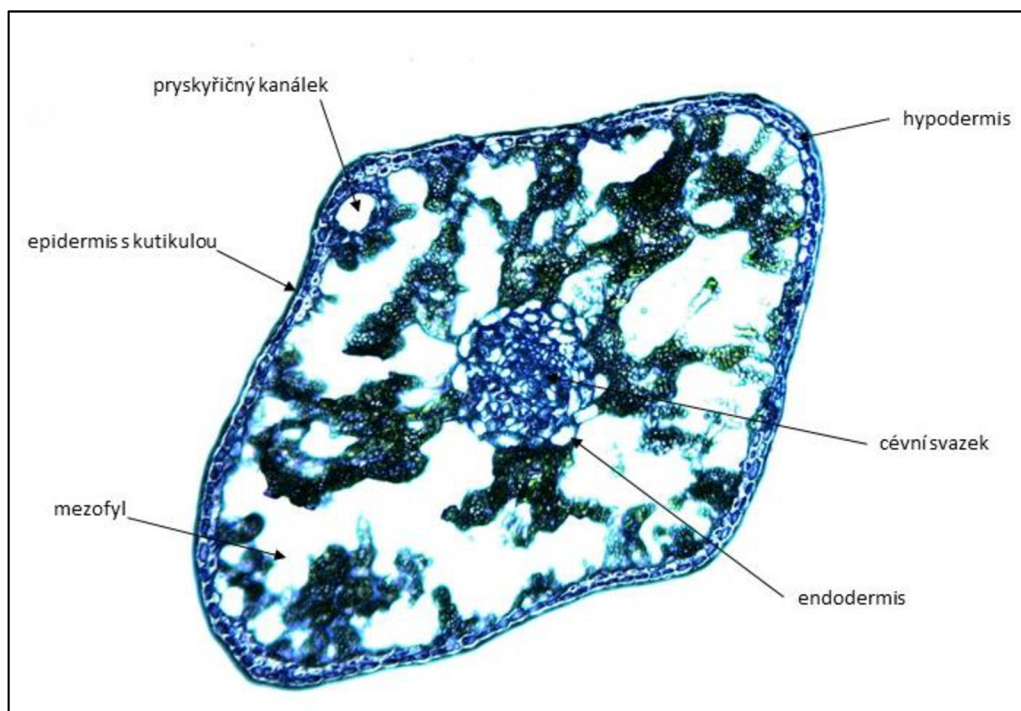


Obr. 4: Vnější a vnitřní stavba listu [29].

3.2. Stavba jehlic u smrku

Listy jehličnanů se liší od listu buku morfologicky a anatomicky. Jsou úzké a mají silně kutinizovanou epidermis, mezofyl je tvořený z ramenovitých palisád a typického transfúzního pletiva. Palisádový parenchym je tvořen buňkami s chloroplasty, které umožňují fotosyntézu. Uprostřed jehlice je kolaterální svazeček, který má dřevní část tvořenou tracheidami [30].

Pod pokožkou (epidermis) se nachází hypodermis, pod kterou je vrstva mezofylu. Hypodermis může být tvořena jednou nebo více vrstvami buněk, které se liší svou strukturou od buněk pokožky. Většinou plní hypodermis mechanickou funkci. Mezofyl je tvořen parenchymatickými buňkami s asimilační funkcí, díky vysokému množství chloroplastů. V mezofylu leží pryskyřičné kanálky, které vznikají rozpuštěním střední lamely a rozestoupením okolních buněk. Vnější vrstva pryskyřičného kanálku je tvořena sklerenchymatickými buňkami a vnitřní vrstva se skládá z parenchymatických buněk, které vylučují pryskyřici. Střední část jehlice je oddělena od mezofylu vrstvou endodermis, jež zpravidla uzavírá dvojici kolaterálních cévních svazků obklopených sklerenchymem [29]. Stavba jehlice, na příčném řezu, je popsána na obrázku 5.



Obr. 5: Příčný řez jehlice smrku ztepilého, zvětšení 100x.

Jehlice jsou čtyřhranné, typ A, který má kosočtvercový průřez. Tyto jehlice mají na každé straně jeden nezřetelný podélný proužek průduch. Jehličnany se svou stavbou jehlic přizpůsobily životu s minimálním přísunem vody (zimní období). Mezi hlavní znaky této adaptace patří silná vrstva kutikuly na pokožce, zanořené průduchy a malá asimilační plocha v podobě jehlicovitého tvaru [20], [29].

4. VYUŽITÍ SMRKU A BUKU V POTRAVINÁŘSTVÍ

4.1. Využití smrku

U smrku ztepilého se využívají světle zelené jarní výhony, které se sbírají v dubnu a květnu. Používají se jako koření do různých jídel, protože mají výraznou citronovou chuť. Výhonky se můžou použít na smrkový čaj nebo se mohou svařit s cukrem a zredukovat na hustý sirup. Dá se jimi aromatizovat likéry a lihoviny. Starší výhony jsou nepoživatelné [31], [32].

Ze smrku se dají jíst i syrová semena, která se mohou opražit. Získají se tak, že se nasbírají zavřené šišky, které se nechají v teple otevřít a semena se vyjmou [31].

Na trhu je k dostání Smrkové želé, viz obrázek 6. Dodavatelem je Chuť Moravy s.r.o. a obsahuje cukr, výtažek ze smrkových větviček, víno, želírovací látky, regulátor kyselosti, a barviva.



Obr. 6: Smrkové želé.

Z výhonků smrku ztepilého se dají péct i smrkové linecké koláčky, obrázek 7. Recept se může péct po celý rok. Když je jehličí starší a tuhé, stačí ho nasekat mlýnkem na kávu. Tento recept stejně jako další smrkové recepty pochází z Aljašky [33].



Obr. 7: Smrkové linecké koláčky [33].

4.2. Využití buku

Jarní, příjemně nakyslé listy se hodí do salátů a k aromatizování likérů a limonád. Z bukvice se může lisovat olej. Syrové bukvice jsou ve větším množství nepoživatelné. Po opražení jsou stravitelné a chutnají jako mandle. Bukvice dozrávají od září a mohou se jimi posypat saláty nebo přidat do müsli [32].

5. ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod anorganické prvkové analýzy. Využívá se již skoro 60 let a patří k běžným laboratorním metodám. Její široké uplatnění a dostupnost umožňuje stanovení kolem sedmdesáti prvků v koncentracích od desetin $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až po $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [46]. V posledních patnácti letech zažívá AAS bouřlivý rozvoj a široké uplatnění po celém světě. Používá se ke stanovování vzorků v životním prostředí, v geologii, v potravinách i nápojích a také v biologických vzorcích [35]. Principem je absorpce záření volnými atomy v plynném stavu, které se tvoří v atomizátorech. Volné atomy v plynném stavu pohlcují fotony určité energie a záření o určité vlnové délce. Energetická hodnota fotonů je typická pro určitý atom a množství absorbovaných fotonů je mírou kvanta stanovovaných atomů [36].

5.1. Základní principy a historie AAS

Historie byla spojena s pozorováním tmavých čar slunečního spektra, které v roce 1815 studoval Fraunhofer a po němž dostaly svůj název. Později 1859 až 1861 Kirchhoff a Bunsen na základě pokusů v plameni se zvratem čar ve spektru kovů alkalických zemin zjistili, že ve slunečním spektru Fraunhoferova tmavá čára D je stejná s čarou sodíku. Až v roce 1939 provedl první pokus Woodspn při analýze rtuti v ovzduší. Za objevitele AAS jako analytické metody je považován Alan Walsh, britsko-australský fyzik, který vystavoval v roce 1954 atomový absorpční spektrometr na výstavě v Melbourne. Použil jako zdroj záření výbojku s dutou katodou. První komerční přístroj začala vyrábět firma Techtron v roce 1962 [37]. Atomy mají schopnost pohlcovat nebo vyzařovat (emitovat) elektromagnetické záření, čímž dochází k přechodu elektronů mezi jednotlivými energetickými hladinami. Fotony při každém přechodu přenášejí energii, která je rovna emisi (úbytku) nebo absorpci (přírůstku) energie atomu. Pomocí *Planckova vztahu* je popsána tato energie [37]:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu$$

kde: E_2, E_1 – energie atomu ve vyšším nebo nižším energetickém stavu

h - Planckova konstanta ($6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$)

ν - frekvence absorbovaného nebo emitovaného záření

Hodnoty energie pro přechody mezi dvěma různými energetickými stavy jsou pro každý prvek charakteristické. Poměry počtu atomů v excitovaném a základním stavu vyjadřuje *Boltzmannova rovnice*:

$$\frac{N_j}{N_o} = \left(\frac{g_j}{g_o} \right) \cdot e^{\frac{-\epsilon}{(k\cdot T)}}$$

kde: N_j, N_o - atomy v základním nebo excitovaném stavu

g_j, g_o - statické váhy excitovaného nebo základního stavu

e - energie excitace

T - teplota v [K]

K - Boltzmannova konstanta ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)

Každý prvek má tedy vlastní vhodnou excitační teplotu. Při normální teplotě jsou atomy v základním stavu. Se vzrůstající teplotou se poměr atomů v excitovaném a základním stavu zvyšuje. Pod 2700°C je však počet atomů v excitovaném stavu zanedbatelný. Absorpcí záření dojde k utlumení paprsku, což popisuje *Bouguerův-Lambert-Beerův zákon*:

$$A = \log \frac{\Phi}{\Phi_0} = \kappa_\lambda \cdot b \cdot N_0$$

kde: A-absorbance je definována jako logaritmus poměru původního a prošlého zářivého toku. Je přímo úměrná tloušťce absorbující vrstvy *b* a počtu atomů v základním stavu *N₀*.

Φ, Φ_0 - tok vstupujícího nebo prošlého záření

κ_λ - konstanta úměrnosti je charakteristická při dané vlnové délce pro absorbující prvek a nazývá se absorpční koeficient, který má rozměr plochy [m²].

Vedle absorbance je významnou veličinou transmitance neboli propustnost (T), jež je definována jako poměr toku záření prošlého absorpčním prostředím ku zářivému toku do prostředí vstupujícího:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

Transmitance slouží k nastavení maximální vlnové délky ve spektrálním intervalu vymezeném monochromátorem. Mezi absorbancí a transmitancí platí převodní vztah:

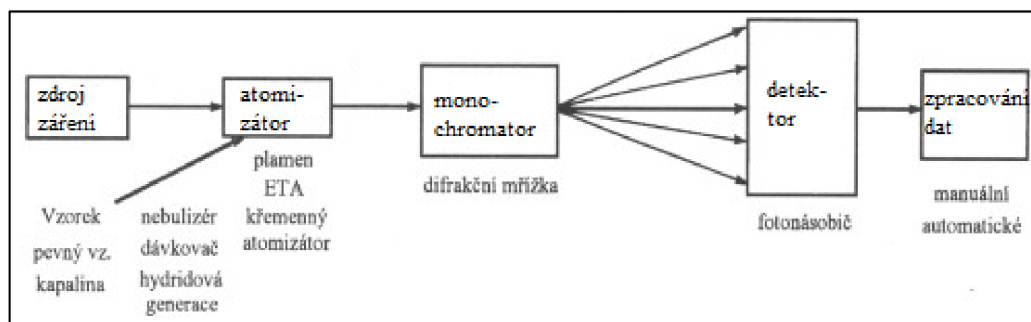
$$A = - \log T$$

Metoda AAS je stejně jako mnoho analytických metod metodou srovnávací a měřenou veličinou je absorbance. Míra koncentrace jako hodnota absorbance sledovaného prvku nezávisí na velikosti zářivého zdroje, ale hustota zářivé energie ovlivňuje velikost nejmenší měřitelné absorbance a tím i mez detekce [37].

5.2. Instrumentace

Běžný atomový absorpční spektrometr se skládá z následujících základních částí, viz obr. 8:

- zdroj záření
- atomizátor: produkuje volné atomy a je absorpčním prostředím
- monochromátor
- detektor
- zpracování signálu a dat

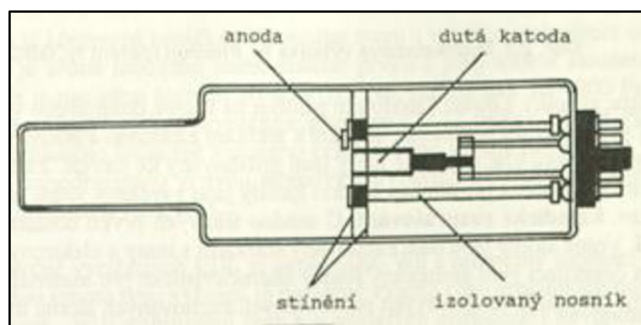


Obr. 8: Schéma atomového absorpčního spektrometru [38].

Zdroj primárního záření u atomového absorpčního spektrometru emituje elektromagnetické záření. Toto záření prochází absorpčním prostředím, kde dojde k jeho absorpci volnými atomy prvku. Zeslabené záření vstupuje vstupní štěrbinou do monochromátoru, jehož úkolem je izolovat vybranou část rezonančního spektra. Izolovaná část záření prochází přes vstupní štěrbinu do detektoru, kterým bývá většinou fotonásobič. Na tomto místě dochází k transformaci záření, které prošlo vzorkem, na měřitelný signál. Výstupní signál je upravován, zesilován a zapisován. Atomové absorpční spektrometry pracují buď na principu jednopaprskového, nebo dvoupaprskového fotometrického systému. U jednopaprskového přístroje se měří nejdříve celkové záření a až potom záření absorbované. V praxi se nejdříve změní tok záření procházející referenčním roztokem, který má stejné složení jako vzorek (bez stanovované složky, tzv. slepý pokus). Takto naměřená hodnota se používá, jako horní mez propustnosti pro konkrétní systém. Při stejné vlnové délce se změní i spodní mez, ale při úplném zclonění detektoru. Mezní hodnoty propustnosti fotometru je třeba kontrolovat, případně nastavit při každé změně vlnové délky. Potom, co se takto spektrometr seřídí, se vymění referenční roztok za roztok vzorku a měří se propustnost stanovované látky. U dvoupaprskového systému se ve stejnou dobu porovnávají dva paprsky se shodnou vlnovou délkou, vzniklé rozkladem zdrojového záření. Paprsek emitován primárním zdrojem záření je rozdělen na dvě části. První část prochází atomizátorem, kde dochází k absorpci volnými atomy vzorku a druhá část paprsku je vedena mimo absorpční prostředí. Dříve než vstoupí záření do monochromátoru, jsou paprsky opět spojeny do jednoho. Vzniklý paprsek vstupuje do detektoru, kde se zaznamenává signál odpovídající poměru propustnosti rozděleného a celistvého paprsku záření. Dělení paprsku probíhá pomocí rotujících zrcadel umístěných mezi zdrojem primárního záření a absorpčním prostředím. U dvoupaprskového systému jsou lepší a stabilnější podmínky pro měření. Snižuje se poměr signálu a šumu a dochází ke kompenzaci možných posunů na úrovni primárního zdroje záření. Měření na jednopaprskovém přístroji je zatíženo větší chybou [36], [39].

5.2.1. Zdroj záření

Vyhovující zdroj primárního záření pro spektrometrické stanovení musí mít dostatečnou intenzitu pro snadnou detekci a měření. Katoda použitá ve výbojce obsahuje ten prvek, který se stanovuje. Záření může být emitováno s časem nebo v podobě přechodného signálu. Jako zdroj záření jsou využívány výbojky s dutou katodou, bezelektrodové výbojky nebo vysokotlakové xenonové obloukové výbojky a polovodičové laserové diody. Spektrometrické zdroje záření se rozdělují na zdroje spojitého záření a zdroje čárového záření. Uvedené zdroje se liší ve spektru, které je širší pro zdroj spojitého záření. Výbojka s dutou katodou, obr. 9, je nejčastějším zdrojem záření pro AAS. Výbojka s dutou katodou je zdrojem vyzářujícím čárové spektrum záření. Výbojka je zhotovená z optického skla a má tvar dutého válce, který je naplněn monoatomárním plynem (argon, neon atd.). Katoda výbojky je vždy vyrobena z prvku, který právě analyzujeme, viz výše a anoda je vyrobena z inertního kovu (wolfram, titan). Po vložení elektrického napětí vzniká ve výbojce nízkotlaký doutnavý výboj a vzniklým elektrickým polem dochází k ionizaci vzácného plynu. Potom kationty vzácného plynu způsobují excitaci atomů na katodě. Vracením atomů na základní hladinu, dojde k žádanému vyzáření monochromatického záření [40].



Obr. 9: Výbojka s dutou katodou [37].

5.2.2. Atomizátory

Volné atomy vzorku mohou absorbovat primární záření pouze v plynném stavu. Pro převedení těchto atomů do plynného stavu je zapotřebí absorpční prostředí, které nám poskytuje atomizátor. K atomizaci může docházet plamenem nebo elektrotermicky. Při atomizaci plamenem prochází záření přímo plamenem, který má teplotu 2 000 až 3 000°C. Do plamene je vstříkovan zmlžený vzorek ve formě malých kapének aerosolu, pomocí směsi vzduch-acetylen nebo acetylen-N₂O [40].

5.2.3. Monochromátor

Monochromátor v atomové absorpční spektrometrii slouží k izolaci požadované vlnové délky. Součástí monochromátoru je optické disperzní zařízení, hranol nebo mřížka, a odrazná zrcadla. Vstupní štěrbinou vstupuje do monochromátoru záření prošlé vzorkem. Vzniklý svazek paprsků je disperzním prostředím rozložen lomem nebo ohybem světla na různé vlnové délky. Z monochromátoru vystupuje výstupní štěrbinou jediný izolovaný paprsek, jehož vlnová délka se dá měnit, natáčením disperzní části, v rozsahu 180 až 860 nm. Běžná šířka štěrbin je 0,2 až 1mm. Pro rozlišení i blízkých vlnových délek je citlivost dána nejen disperzním prostředím, ale i jejich vzdáleností od výstupní štěrbině a šířkou štěrbin [40].

5.2.4. Detektor

Výsledky spektrometrického měření jsou pomocí detektoru převáděny na měřitelnou formu. Jedná se o transformaci elektromagnetického záření na elektrický signál. Jako detektory se v atomové absorpční spektrometrii používají fotonásobiče. Detektory jsou složeny z fotocitlivé katody a elektrod, které se nazývají dynody a anody. Rezistory rozkládají napětí mezi elektrody. V systému má nejzápornější potenciál fotokatoda a další elektrody mají potenciál o 50 až 90V pozitivnější. Z fotokatody jsou dopadem fotonů uvolňovány elektrony, které jsou přitahovány dynodou a získají tak kinetickou energii. Nárazem na dynodu se uvolní množství sekundárních elektronů. Dopad zrychleného fotoelektronu na dynodu, způsobí vyzáření dalších fotoelektronů, které jsou opět urychleny a dopadají na další dynodu. Na dynody se vkládá stále větší napětí. Proces se opakuje, do té doby, než na anodu dopadne množství elektronů, které je možné přímo změřit, mezi poslední dynodou a anodou. Kompletní vyhodnocovací jednotka obsahuje detektor, zesilovač a elektronické zařízení, které tvoří např. analogový signál na měrné stupnici nebo digitální signál na číselné stupnici [39], [40].

5.3. Interference

I přesto, že je AAS velmi citlivá, je potřeba prověřit vliv interferencí. Při atomizaci vzorku probíhají děje, z jejichž podstaty vyplývá spektrum interferencí. Elektrotermickou atomizací sice dosáhneme nižší meze detekce než atomizací plamenovou, ale vliv interferencí je zde o mnoho větší. V analyzovaném vzorku se mohou vyskytovat další doprovodné složky, které mohou ovlivnit hodnotu absorbance, změnit tak signál a tím i celé stanovení. Čím má analyzovaný vzorek komplikovanější složení, tím je stanovení ovlivněno větším množstvím rušivých vlivů. Lze použít modifikátory vzorku, ale platí zde důležitá podmínka, že nesmí obsahovat stanovovaný prvek. Mohlo by dojít k pozitivní chybě stanovení. V roce 1981 byl Walterem Slavinem navržen koncept pro používání modifikátorů a optimalizaci programů. Koncept obsahuje následující podmínky: používaná grafitová kyveta je potažená vrstvou pyrolytického uhlíku nebo je použita grafitová kyveta s integrovanou platformou, dodržuje se maximální rychlosti ohřevu při atomizaci, zastavení vnitřního plynu ve fázi atomizace, používá se chemických modifikátorů, vyhodnocuje se plocha píku a efektivní korelace pozadí. Interference jsou dvojího typu: spektrální a nespektrální [36], [41].

Při absorpci primárního záření volnými atomy analyzovaného prvku a absorpcí pozadí dochází k interferenci spektrální. Tyto interference jsou závislé na vlnové délce, vznikají např. rozptylem světla na nevypařených částicích aerosolu nebo atomovou absorpcí prvku s podobnou spektrální linií. Absorpce pozadí se připočítává k absorpci analytu a tak vzniká pozitivní chyba měření. U vzorků s komplikovaným složením a tam kde měříme velmi nízké hodnoty absorbance má tato chyba velký význam. Správné výsledky získáme odečtením absorpce pozadí od celkové absorpce, což se provádí korelací pozadí [42].

Nespektrálními interferencemi vznikají kladné i záporné chyby měření signálu. Patří sem vlivy, které ovlivňují formu a počet volných atomů stanovovaného analytu. Chyby vzniklé nespektrálními interferencí mají vliv na transport a rychlost nasávání vzorku, na vypařování kondenzované fáze vznikem sloučenin s odlišnou těkavostí a na disociační a ionizační konstantu látky v plynné fázi [42].

5.4. Korelace pozadí

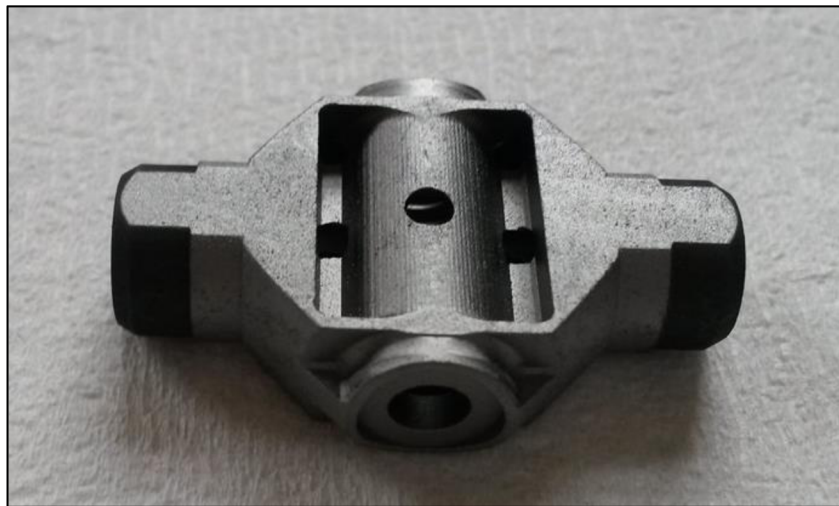
Nespecifické absorpce jsou považovány za absorpci pozadí a způsobují falešně pozitivní chybu měření. K eliminaci těchto chyb slouží různé techniky korelace pozadí, jako jsou např. Zeemanova korekce, korekce pomocí blízké linie nebo Smith-Hieftjerna metoda. Zeemanova korekce využívá štěpení spektrálních čar v silném magnetickém poli. Spektrální čára se tvoří přechodem mezi dvěma energetickými hladinami. V případě normálního Zeemanova jevu, u prvků kde nehraje roli spin-orbitální interakce, dochází k rozštěpení spektrální čáry na triplet. Při anormálním Zeemanově jevu dochází k rozštěpení spektrálních čar za vzniku multipletů [40].

Nejběžnější metodou korelace pozadí v AAS je korekce pomocí lampy se spojitým spektrem. Jako kontinuální zdroj záření se využívá deuteriová lampa. Dochází ke střídání čárového zdroje s kontinuálním zdrojem, který je taktéž umístěn v optické cestě spektrometru. Elektrickou modulací a posunem fází je zajištěno jejich střídání. Záření primárního zdroje je absorbováno vzorkem i pozadím, ale záření kontinuálního zdroje absorbuje pouze pozadí. Absorbanci analytu získáme z rozdílu těchto naměřených absorbancí [40].

5.5. Elektrotermická atomizace

Elektrotermická atomizace je citlivější postup, který umožňuje stanovit i vzorky o velmi nízké koncentraci. Při elektrotermické atomizaci prochází paprsek záření ze zdroje elektricky vyhřívanou kyvetou, která je orientovaná mezi dvěma elektrodami. Atomy vzorku jsou do plynného stavu převedeny pomocí žáruvzdorného materiálu vyhřívaného elektrickým proudem, který prochází tělem atomizátoru. Tato elektricky vyhřívaná kyveta je nejčastěji vyrobena z grafitu, viz obrázek 10. Atomizátor z grafitu je ve tvaru trubičky s dávkovacím otvorem uprostřed, který je vložen do grafitových kónusů. Proud prochází atomizátorem nejčastěji v důsledku vloženého napětí, nebo existují i tzv. odporově vyhřívané atomizátory.

Je nutné při vysokých teplotách atomizátor chránit před oxidací vzdušným kyslíkem. Vzduch v kyvetě není vhodný ani pro analyty, které mají vysokou afinitu ke kyslíku, čímž se ztrácí citlivost stanovení. Proto musí atomizátor pracovat v inertní atmosféře, nejlépe v argonu vysoké čistoty. Z ekonomických důvodů se často argon nahrazuje dusíkem, který však při vysokých teplotách ztrácí inertní vlastnosti a může reagovat s některými analyty [36], [39], [43], [44].



Obr. 10: Grafitová kyveta.

Nejčastěji jsou atomizátory vyráběny z polykrystalického elektrografitu, který má vhodné mechanické, elektrické i tepelné vlastnosti. Má vysoký bod sublimace a tak umožňuje ohřev až na 3 000°C. Prudké změny teploty nezpůsobí jeho deformace. K atomizačním procesům většiny analytů přispívají redukční vlastnosti grafitu. Avšak s některými prvky může při vysokých teplotách grafit reagovat za vzniku termicky stabilních karbidů, které atomizaci komplikují, vytváří chvostující signály a kyveta vykazuje paměťové efekty, což vede k předčasné destrukci kyvety. Kvůli ohřevům na vysoké teploty se musí celé zařízení chladit vodou [44].

5.5.1. Teplotní program

Při elektrotermické atomizaci je trubice vyhřívána v pěti na sebe navazujících krocích, které tvoří teplotní program. První tři fáze jsou základní: sušení, tepelný rozklad neboli pyrolýza a atomizace. Do fází po atomizaci patří čištění a chlazení. Pro měření je nutné teplotní program optimalizovat. V každém kroku je potřeba nastavit teplotu a její rychlost nárůstu, doba, po kterou je teplota stabilní a také průtok inertního plynu. Začátek teplotního programu začíná po nadávkování vzorku na platformu grafitové kyvety. Dávkování vzorku provádí

automatický dávkovač, který se musí před měřením vždy seřídít nebo zkontrolovat. Kapilára dávkovače se při dávkování nesmí dotýkat platformy, ale zároveň nesmí být ani vysoko nad ní, aby se vzorek nerozstříkoval nebo neodkapával uvnitř trubice. Se vzorkem se současně dávkuje i modifikátor, který neobsahuje stanovovaný prvek. Modifikátor je používán pro různé účely. Může ovlivňovat zjišťovaný analyt a stabilizovat ho při vyšších teplotách, nebo může tvořit s analytem těkavější sloučeninu. Je možné také modifikátor užít k reakci s interferující látkou, která je těkavější a odstraní se během termické fáze [44].

První fáze teplotního programu je sušení. Teplota se stanovuje o 5 až 10°C vyšší než je bod varu rozpouštědla. Teplota by měla pozvolně narůstat, aby nedocházelo k rozstříkání vzorku. Na sušení navazuje druhá fáze, tepelný rozklad neboli pyrolýza. V této fázi se odstraní nebo změní matrice vzorku tak, aby se stanovovaný analyt neztratil. Teplota je volena o 50 až 100°C nižší než je zlom rozkladné křivky. Rozkladná křivka se zjistí při optimalizaci metody opakovanou analýzou vzorku. Slouží k tomu závislost na rostoucí teplotě termické úpravy. Tepelný rozklad se může rozdělit do více kroků v závislosti na složitosti matrice. Na pyrolýzu navazuje samotná atomizace, která se skládá z jednoho kroku, jehož úkolem je zabezpečit selektivní atomizaci daného analytu. Parametry atomizace se nastavují podobně jako u předchozí fáze. Samotná atomizace trvá jen několik sekund, během kterých se vzorek okamžitě vyhřeje na atomizační teplotu. Současně probíhá měření analytu, při kterém je zastaven průtok plynu. Předposlední fází je fáze čištění (vypalování), ve které při maximálním průtoku inertního plynu dochází za vysoké teploty, k odstranění zbývajících termicky stabilních matic. Tato vysoká teplota se volí vyšší než atomizační, ale nesmí být příliš vysoká, aby zbytečně nezkracovala životnost grafitové trubice. Poslední fáze chlazení se provádí u kyvet s platformou. Dojde k časové prodlevě, která je nutná ke zchlazení platformy před dalším dávkováním vzorku. Vysoká teplota platformy by způsobila vyprskání vzorku. Chlazení probíhá za plného průtoku inertního plynu [44].

6. CÍLE PRÁCE

Experiment s expozicí nanočástic CdO na jehličí smrku ztepilého:

- Vyhodnotit jednotýdenní a dvoutýdenní expozici, ve speciálních klecích s kontrolovanou atmosférou nanočástic CdO na obsah kadmia v jehličí.
- Rozklad jehličí mineralizací v kyselině dusičné.
- Stanovení obsahu kadmia ve vzorcích jehličí.

Experiment s expozicí nanočástic CdO na listy buku lesního:

- Zhodnotit jednotýdenní a dvoutýdenní expozici, ve speciálních klecích s kontrolovanou atmosférou nanočástic oxidu kademnatého na obsah kadmia v listech.
- Mineralizace listů pomocí kyseliny dusičné.
- Stanovení obsahu kadmia v listech.

Po stanovení obsahu kadmia ve vzorcích jehličí a listů se statisticky porovnají naměřená data pomocí ANOVA analýzy. Posoudí se vliv nanočástic kadmia na jehlice smrku a listy buku podle tří faktorů:

1. Zda měla expozice vliv na obsah kadmia.
2. Posoudit, jestli umytí vzorků ovlivnilo obsah kadmia
3. Zhodnotit rozdíl změny obsahu kadmia u vzorků pod vlivem stresové podmínky v podobě zvýšené teploty a současné snížené vlhkosti.

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. Chemikálie

V průběhu experimentů byla používána koncentrovaná kyselina dusičná, čistoty p.a. (Lachner), která byla přečištěna podvarovou, subboiled destilací. Při stanovení kadmia v roztocích vzorků pomocí atomové absorpční spektrometrie byl používán jako směsný modifikátor dusičnan hořečnatý $Mg(NO_3)_2$ (suprapur, Merk) a hydrogenfosforečnan amonný $NH_4H_2PO_4$ (suprapur, Merk). K ředění roztoků vzorků byla použita vysoce čistá voda.

7.2. Expoziční experiment

Experimenty probíhaly na Ústavu analytické chemie Akademie Věd ČR v rámci projektu GAČR, P503/12/G147, Centrum studií toxických vlastností nanočástic. Ve dvou samostatných experimentech byl použit jednak smrk ztepilý, a jednak buk lesní, které byly v inhalačních komorách vystaveny vzduchu se zvýšenou koncentrací nanočástic oxidu kademnatého. Po jednotýdenní a dvoutýdenní expozici, byly odebrány jehlice smrku a listy buku, ve kterých byl následně stanoven obsah kadmia.

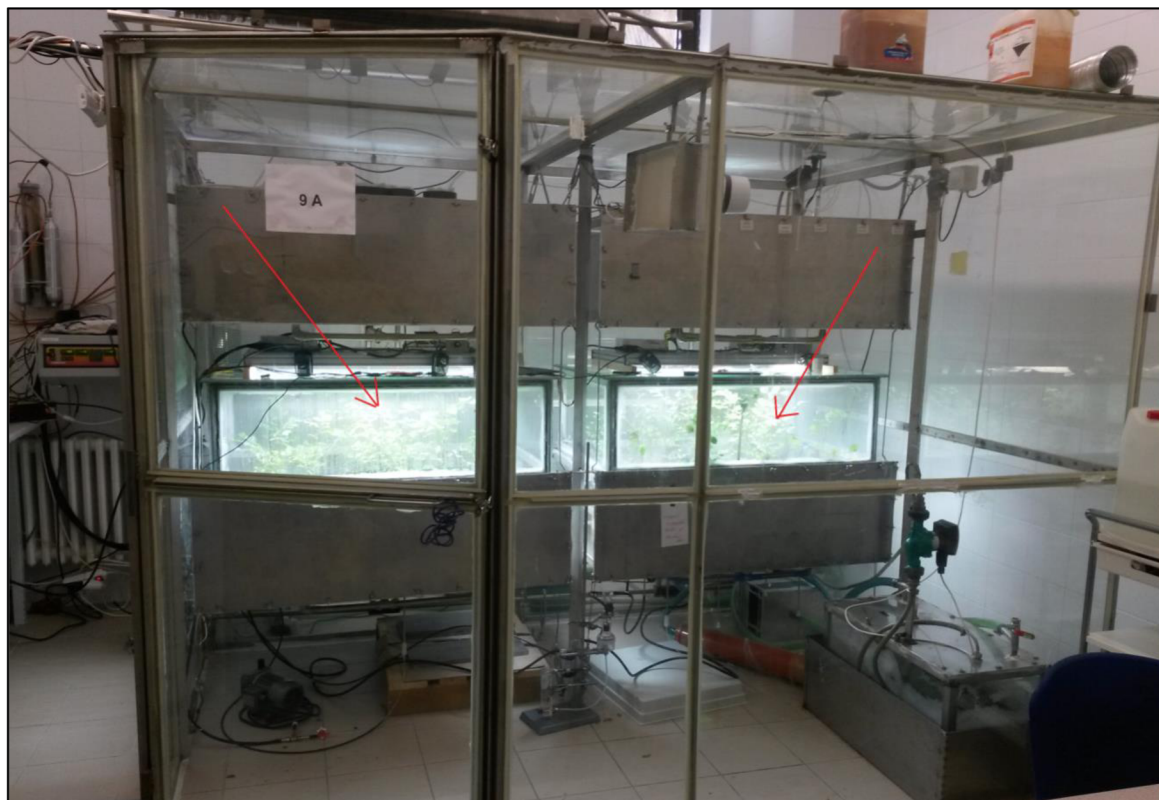
Smrky a buky byly zakoupeny jako tříleté sazenice ve stromové školce. Celkem bylo zpracováno 156 stromků. 88 smrku a 68 buku. Před vlastní expozicí nanočásticemi, byly všechny dřeviny kultivovány ve fytotronu (obrázek 11). V experimentu se smrky i buky byla část stromků kultivována při teplotě 20 °C a část při teplotě 35°C. Pro kultivaci dřevin byly použity běžné růstové komory FS-SI-4600 firmy PSI, ČR. V růstových komorách byl nastaven režim intenzity světla $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12 hodin světlo / 12 hodin tma). Při teplotě 20°C a relativní vlhkosti vzduchu 75 % byla nastavena kontrolní, nestresová varianta, při teplotě 35°C a relativní vlhkosti vzduchu 50 % stresová varianta. Během expozičního experimentu byly dřeviny umístěny do dvou boxů s kontrolovanou atmosférou. V jednom boxu byly rostliny vystaveny nanočásticím oxidu kademnatého (CdONPs) a ve druhém boxu proudil stejný vzduch jako u exponovaných rostlin, ale bez nanočástic kadmia. Tento box sloužil jako kontrolní, porovnávací. Expoziční komora, obrázek 12, je vyrobena ze skla a nerezové oceli a obsahuje 4 nerezové expoziční boxy. Experimenty probíhaly jen ve spodních dvou boxech.



Obr. 11: Buky kultivované ve fytotronu.

Jednotýdenní experiment na smrcích s CdONPs se smrky probíhal ve dnech 22.–29.2. 2016 s celkem 28 stromky, z toho 14 kontrolními a 14 exponovanými. Dvoutýdenní experiment se smrky probíhal ve dnech 4.–22.2. 2016. Smrky byly 14 dnů kultivované ve fytotronech při dvou různých teplotách: 20°C a 35°C a poté byly 14 dnů vystaveny CdONPs. V tomto pokusu bylo dohromady 60 smrků, z toho 40 kontrolních a 20 exponovaných. V pokusu se smrky nebyla koncentrace nanočástic v expozičním boxu ve všech jeho částech stejná, průměrně činila cca $1,98 \cdot 10^5$ P/cm³.

Jednotýdenní experiment s buky probíhal ve dnech 12.–18.7.2016. Buky byly nejdříve vystaveny 7 dnů CdONPs a poté byly pěstovány 7 dnů ve fytotronech při teplotě 20°C a 35°C. Celkem v tomto experimentu bylo použito 34 buků, z toho 10 kontrolních a 24 exponovaných. Ve dvoutýdenním experimentu, uskutečněném ve dnech 18.7.–1.8. 2016, bylo rovněž použito 34 buků, 10 kontrolních a 24 exponovaných. Buky byly nejprve 14 dnů kultivované ve fytotronech při dvou různých teplotách: 20°C a 35°C a poté byly 14 dnů vystavené CdONPs. V experimentu s buky nebyla koncentrace nanočástic v expozičním boxu ve všech jeho částech stejná, průměrně činila cca $2,52 \cdot 10^5$ P/cm³.



Obr. 12: Inhalační komora, kde probíhaly experimenty (boxy označeny červenou šipkou).

7.3. Generování nanočástic CdO

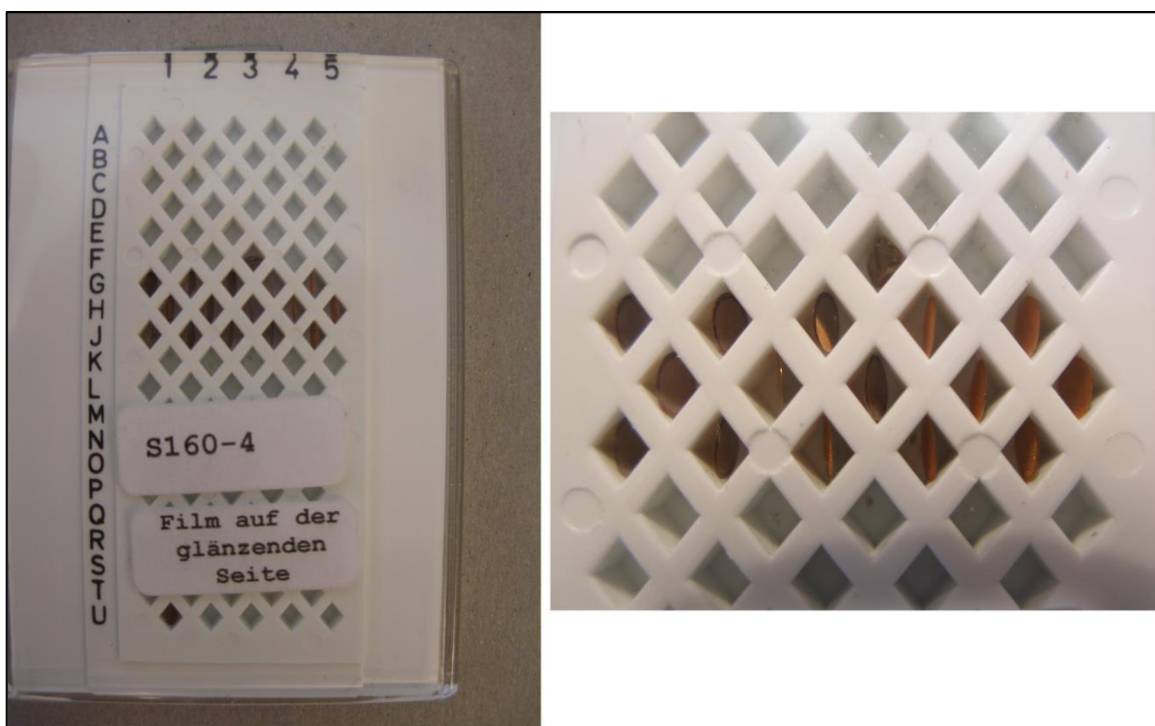
Nanočástice byly generovány v průtokovém reaktoru na základě odpařovacího-oxidačně-kondenzačního postupu. Postup byl založen na odpařování kovových pelet p.a. kadmia v keramickém žíhacím kelímku, zavěšeném v keramické trubici ve vertikálně orientované peci, Carbolite TZF 15/50/610. Odpařování kadmia probíhalo při teplotě 340 °C. Vzniklé kovové výpary byly unášeny ven z pece pomocí proudu inertního dusíku, a byly zředěny proudem vzduchu, který zoxidoval kadmium na oxid kademnatý. Obě objemové rychlosti dusíku byly nastaveny na 3 l/min pomocí hmotových regulátorů průtoku (MFS).

Připravené nanočástice oxidu kadmátého byly smíchány s proudem vzduchu o průtoku 20 l/min a poté po celou dobu experimentu používány k inhalaci v dávkovacích koncentračních komorách. V koncentrační dávce byl geometrický průměr nanočástic oxidu kadmátého $14,4 \pm 1,76$ nm. S ohledem na jejich velikost, bylo rozložení nanočástic měřeno pomocí přístroje Scanning Mobility Particle Sizer™ spectrometer, model 3936L72 (TSI).

7.4. Charakterizace nanočástic Cd elektronovou mikroskopií

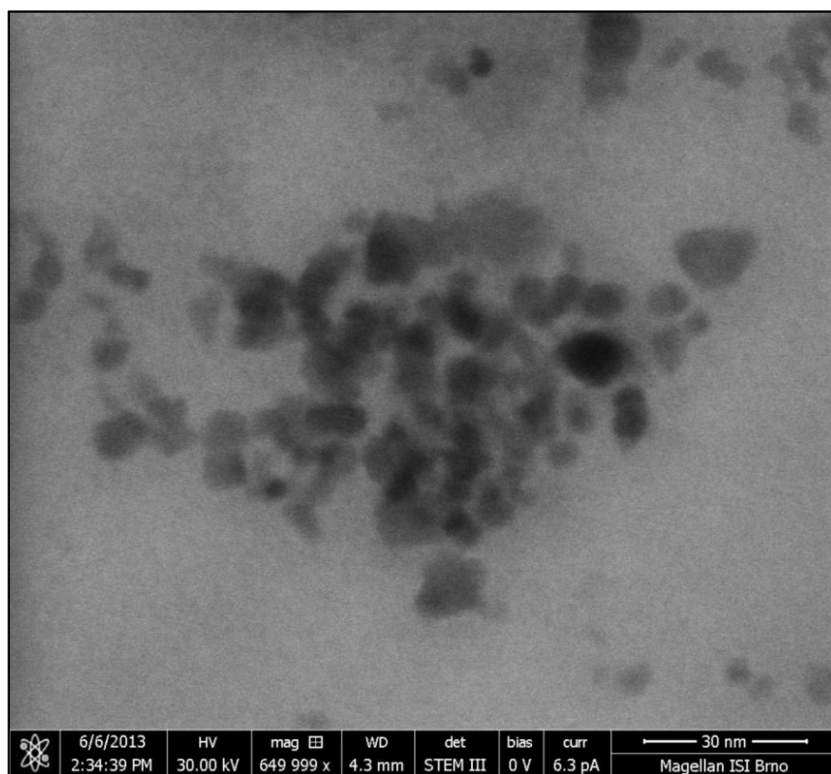
Částice připravované odpařováním taveniny kovového kadmia byly zachyceny na uhlíkové fólii s měděnou mřížkou (TEM grids) S 160-4 (Agar Scientific, 3 mm, 400 mesh grids), viz obr. 13. Nanočástice byly odebírány elektrostatickou precipitací pomocí TSI Nanometer aerosol sampler (NAS) model 3089 na TEM mřížky S160-4.

Měření bylo prováděno na Ústavu přístrojové techniky AVČR, v.v.i., v Brně (Laboratoř elektronové mikroskopie, Ing.Filip Mika, PhD), na přístroji Magellan 400 firmy FEI Company, umožňujícím měřit zpětně odražené elektrony v modu XHR SEM (extreme high resolution scanning electron microscopy) nebo prošlé elektrony v modu STEM (scanning transmission electron microscopy), popř. rentgenovské záření energiově disperzním analyzátozem (EDS – energy dispersive spectroscopy), či difraktované elektrony detektorem EBSD (electron backscatter diffraction). Podmínky měření jsou uvedeny v obrázku 14.



Obr. 13: Uhlíkové fólie s Cu mřížkou (TEM grids) S160-4. Vpravo detail.

Na měděné síťce byly nalézány jak agregáty Cd částic, tak i jednotlivé primární částice. Obrázek 14 ukazuje přítomnost velkých shluků, ale i malých částeček.



Obr. 14: Nanočástice kadmia.

7.5. Odběr a zpracování vzorků před analýzou

Odběr vzorků se prováděl v prostorách Ústavu výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i v Laboratoři ekologické fyziologie rostlin.

Pro stanovení obsahu kadmia byly odebrány vzorky jehličí smrku a listy buků, a byla zjištěna jejich hmotnost odpovídající čerstvému vzorku (FW – fresh weight), a to po 7 nebo 14 dnech trvání experimentu s nanočásticemi kadmia (CdONPs). V obou případech byly vzorky rozděleny na dvě části, jedna byla určená pro omytí jejich povrchu (umyté) a druhá byla neupravována (neumyté). Jehličí smrku se umylo pomocí 2 x 4 ml dichlormethanu. Jehlice se zalily 4 ml dichlormethanu, následovalo 5 min třepání a vzorky se nechaly 15 min stát. Poté se dichlormethan odlil a celý postup se zopakoval. Listy buků byly promyté v destilované vodě, která se po každém vzorku vyměnila. Následně byly vzorky sušeny v sušárně firmy Memmert, Německo, po dobu 48 h při teplotě na 70°C. Usušené vzorky byly následně dodány zpět na Ústav analytické chemie AV ČR, kde probíhalo stanovení obsahu kadmia pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací.

7.6. Označení vzorků

Pokusné smrky:

Jednotýdenní experiment: K- kontroly, CdO- vystavené CdONPs, N- neumyté, U- umyté.

Dvoutýdenní experiment: číslo 1,2- kontroly; číslo 3,4- vystavené CdONPs; N- neumyté, U- umyté, C- teplota 20°C, T- teplota 35°C.

Pokusné buky:

Jednotýdenní experiment: K- kontroly, CdO- vystavené CdONPs; NEU- neumyté, U- umyté, L- teplota 20°C, H- teplota 35°C.

Dvoutýdenní experiment: K- kontroly; CdO vystavené CdONPs; NEU- neumyté, U- umyté, L- teplota 20°C, H- teplota 35°C.

7.7. Rozklad vzorků jehličí

Vzorky byly mineralizovány v předčištěných originálních křemenných zkumavkách tlakového mikrovlnného mineralizátoru UltraWAVE, Milestone S.r.l., Itálie, viz obrázek 15. Vzorek jehličí, jehož navážka činila v průměru cca 0,23 g, byl rozkládán ve 3 ml koncentrované kyseliny dusičné čistoty subboiled (připravené tzv. podvarovou destilací) podle programu ve čtyřech krocích.

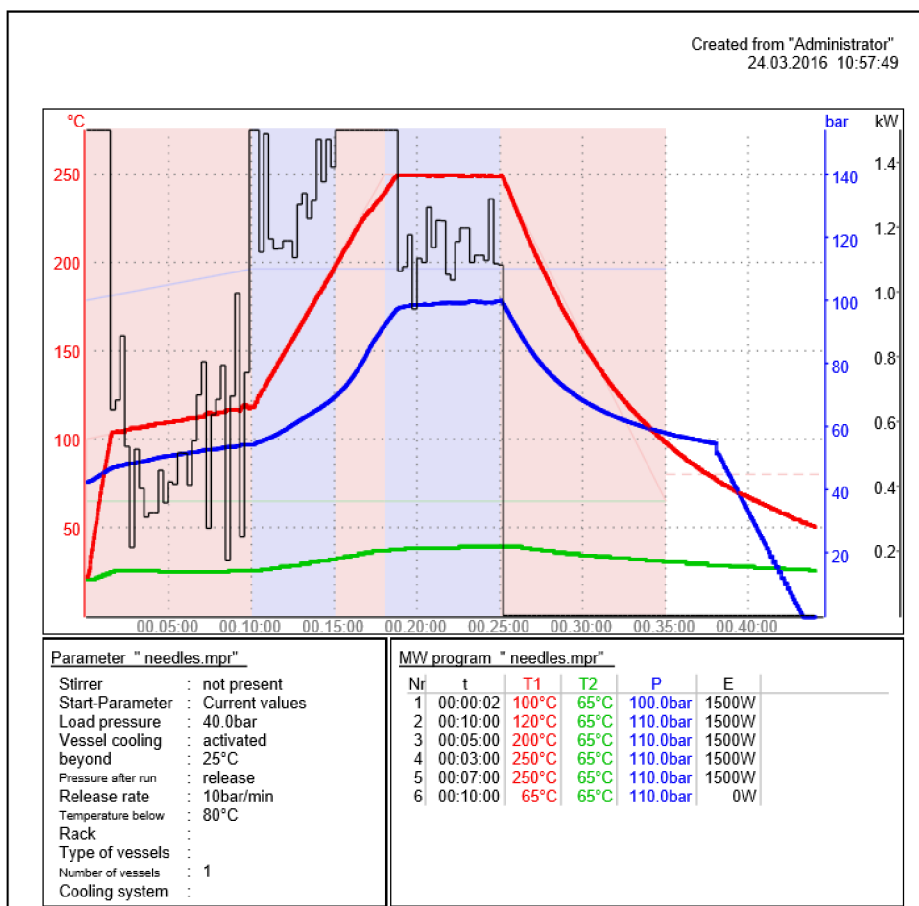
Rozkladný program měl 1. krok - 10 min s nárůstem teploty od 100°C do 120°C, 2. krok – 5 min s nárůstem teploty od 120°C do 200°C, 3. krok - 3 min s nárůstem teploty od 200°C do 250°C, 4. krok - 5 min při teplotě 250°C, a to s počátečním pracovním tlakem 40 bar, viz obrázek 16.

Ve všech případech byl vzorek dokonale rozložen. Postup rozkladu jehličí znázorňuje obrázek 16 a obrázek 17. Roztok vzorku byl kvantitativně převeden do plastové HDPE -scintilační nádoby a pak doplněn vysokočistou vodou na finální objem cca 5 ml a uchováván k analýze. Paralelně byl uskutečněn dostatečný počet slepých pokusů, celkem 17, a to po čištění zkumavek mezi některými rozklady jehličí, a to kvůli ověření, zda se případně vzorky vzájemně nekontaminují (paměťové efekty, křížová kontaminace). Slepé vzorky, tj. pouze s kyselinou dusičnou v porovnání s rozloženým jehličím, jsou ukázány na obrázku 18.

Všechny vzorky byly rozkládány v pořadí, které odpovídalo odhadovanému rostoucímu obsahu Cd, tj. kontrolní vzorky z jednotýdenního pokusu pak dvoutýdenního až po vzorky s vysokým obsahem Cd, exponované jehličí z dvoutýdenního pokusu.



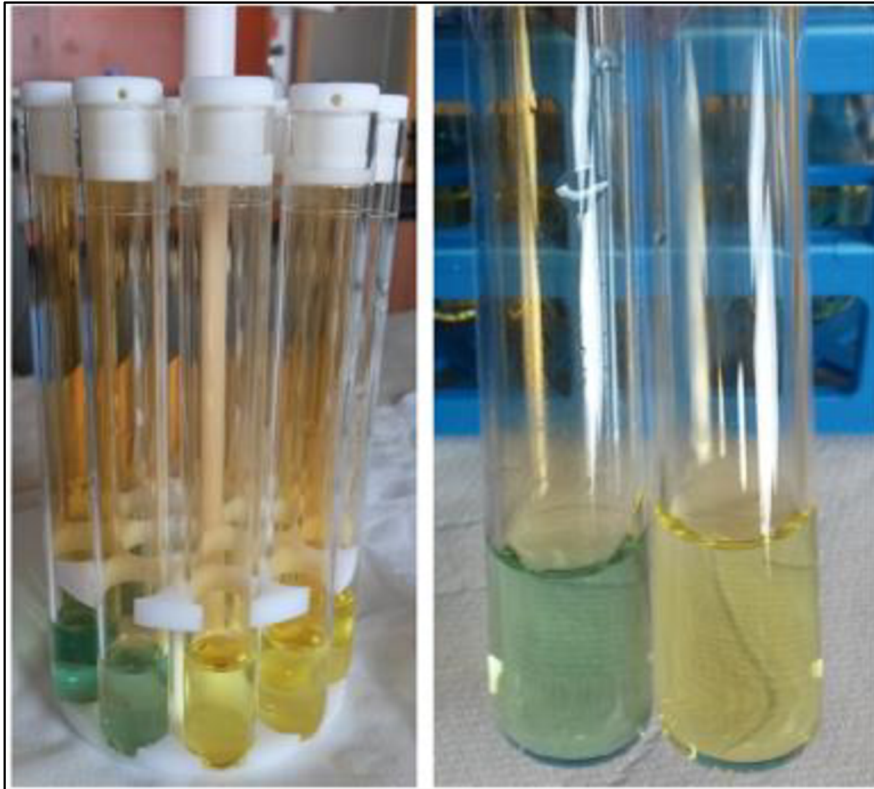
Obr. 15: Tlakový mikrovlnný mineralizátor a zkumavky s mineralizovaným jehličím.



Obr. 16: Záznam průběhu rozkladu jehličí.



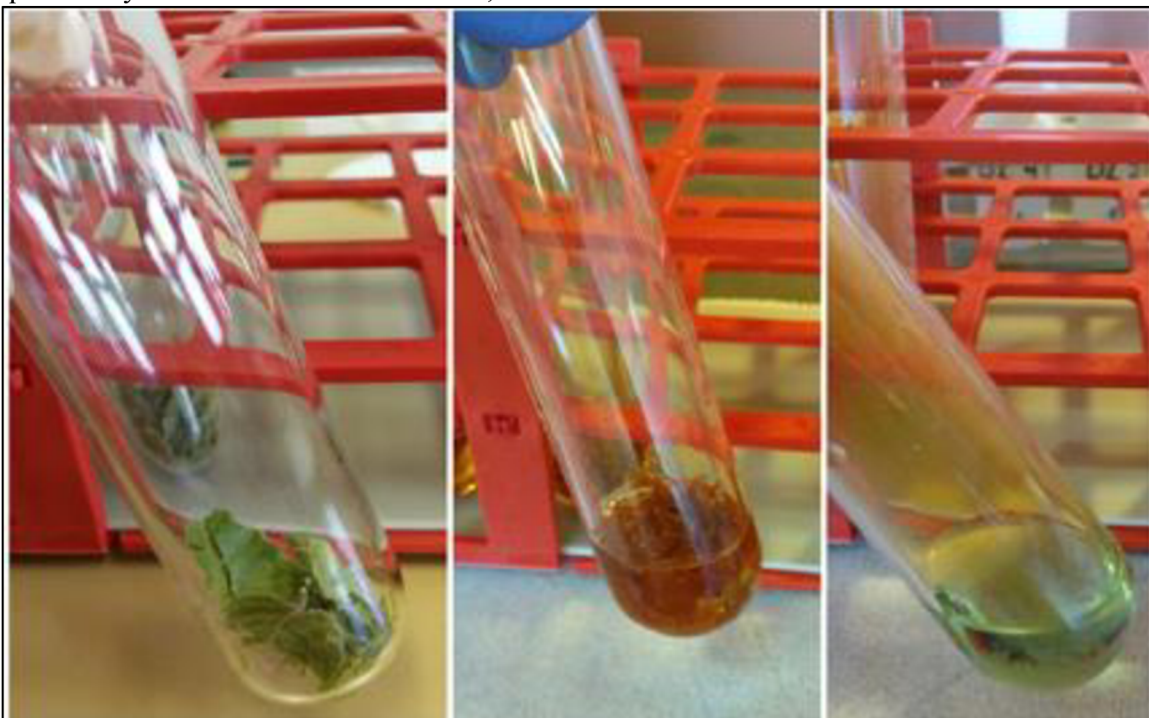
Obr. 17: Křemenné zkumavky s jehličím, v kyselině dusičné a roztokem po proběhlém rozkladu (zleva).



Obr. 18: Porovnání zbarvení roztoků slepých vzorků (žluté) a jehličí (zelené).

7.8. Rozklad vzorků listí

Vzorky listů byly rovněž mineralizovány v předčištěných originálních křemenných zkumavkách tlakového mikrovlnného mineralizátoru UltraWAVE, Milestone S.r.l., Itálie. Vzorek listů, jehož navážka činila v průměru cca 0,14 g, byl rozkládán v 5 ml koncentrované kyseliny dusičné čistoty subboiled podle stejného programu jako vzorky jehličí. Ve všech případech byl vzorek dokonale rozložen, viz obrázek 19.



Obr. 19: Křemenné zkumavky s listím, s kyselinou dusičnou a po proběhlém rozkladu (zleva).

Roztok vzorku byl kvantitativně převeden do plastové HDPE scintilační nádoby a pak doplněn vysokočistou vodou na finální objem cca 10 ml a uchováván k analýze. Současně byl uskutečněn dostatečný počet slepých pokusů (celkem 12), a to po čištění zkumavek mezi některými rozklady listů, a to kvůli ověření, zda se případně vzorky vzájemně nekontaminují (paměťové efekty, křížová kontaminace).

Všechny vzorky byly rozkládány v pořadí, které odpovídalo odhadovanému rostoucímu obsahu Cd, tj. kontrolní vzorky z jednotýdenního pokusu pak dvoutýdenního až po vzorky s vysokým obsahem kadmia, exponované listy z dvoutýdenního pokusu.

7.9. Stanovení obsahu kadmia ve vzorcích

Roztoky vzorků byly analyzovány metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET AAS) na přístroji AAnalyst 600 Perkin-Elmer (obrázek 20) za podmínek doporučených výrobcem s použitím směsného modifikátoru hydrogenfosforečnanu amonného a dusičnanu hořečnatého. Kalibrace byla provedena metodou přidavku standardu pomocí pěti roztoků standardu s rostoucí koncentrací kadmia, které byly připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 1 g.l^{-1} (Astasol, Analytika Praha).



Obr. 20: Přístroj AAnalyst 600 Perkin-Elmer s příslušenstvím.

Z plastových nádobek (PS), které obsahovaly 1 ml vzorku, bylo pomocí automatického dávkovače přístroje dávkováno ve všech měřeních $20 \mu\text{l}$ vzorku a $10 \mu\text{l}$ směsného modifikátoru, který slouží ke stabilizaci analytu v atomizátoru během termické přípravy. Všechny vzorky byly měřeny třikrát s integrovanou absorbcí v lineárním rozsahu kalibrace. Pokud byla naměřená hodnota integrované absorpce vzorku vyšší než hodnota absorpce

nejkoncentrovanějšího kalibračního roztoku, pak byl tento vzorek vhodně zředěn 0,01 M kyselinou dusičnou. Naředěný vzorek byl znovu třikrát změřen. Koncentrace kadmia v jednotlivých vzorcích byla vypočtena pomocí metody kalibrace přídavkem standardu pro dané měřené skupiny vzorků. Z integrované hodnoty absorbance signálu, plošného obsahu signálu, byla vyhodnocována všechna měření.

Teplotní program pro elektrotermickou atomizaci na přístroji AAnalyst 600 Perkin-Elmer se skládal z pěti kroků, viz tabulka 1. V prvním a druhém kroku se vzorek sušil. Po prvním kroku se během 15-ti sekund teplota zvýšila na 130 °C. V třetím kroku nastala pyrolýza, která trvala 20 sekund a zbavila vzorek rušivých příměsí. Samotná atomizace proběhla po dobu 3 sekund ve čtvrtém kroku při 1600 °C. Pátý, poslední krok byl čistící, v němž se odstranily zbytky po atomizaci, a tím se vyčistila grafitová trubice atomizátoru pro následující stanovení. Kromě atomizačního kroku byl ve všech krocích nastaven maximální průtok argonu na 250 ml/min, kromě atomizačního, v němž byl průtok vnitřního plynu, argonu, zastaven. Měření probíhalo při vlnové délce 228,8 nm a spektrální šířka štěrbinu monochromátoru byla nastavena na 0,7 nm.

Tabulka č. 1: Teplotní program elektrotermické atomizace.

krok	čas [s]	teplota [°C]
1	30	110
2	30	130
3	20	500
4	3	1600
5	3	2450

7.10. Vyhodnocení dat

Během pokusů bylo změřeno 17 vzorků slepých pokusů pro jehličí a 12 vzorků slepých pokusů pro listí. Z úrovně a fluktuace slepých pokusů byl stanoven detekční limit 0,3 ng/g Cd v jehličí a 0,5 ng/g Cd v listí, a to pro rozklad jednoho vzorku v reakční zkumavce mineralizátoru UltraWAVE, tj. při respektování běžné průměrné hmotnosti dodaných suchých vzorků 0,23 g pro jehličí a 0,14 g pro listí. Nalezené detekční limity byly na úrovni instrumentálního detekčního limitu stanovení. Detekční limit (LOD) se vypočítal jako trojnásobek směrodatné odchylky fluktuace hodnot slepých pokusů. Směrodatná odchylka se vypočítala z hodnot obsahu kadmia ve vzorcích slepých pokusů pro jehličí i listí po testování hodnot na odlehlost výsledků.

7.10.1. Výpočet obsahu kadmia v jehličí a listech

Ke každému vzorku byly získány tři paralelní hodnoty absorpací, pro které byl proveden test odlehlosti. Z průměrné hodnoty absorpance, pomocí přidavku standardu byla vypočítána koncentrace stanovovaného kadmia. Součinem této koncentrace s celkovým objemem roztoku vzorku bylo vypočteno množství kadmia v nádobce se vzorkem. Od tohoto obsahu kadmia ve vzorku se odečetl průměrný obsah kadmia ve slepém vzorku. Tím se získal obsah kadmia ve vzorku oproštěný o úroveň slepého pokusu. Tato hodnota byla nakonec vztažena na příslušnou navážku vzorku, a tím byla zjištěna koncentrace kadmia v daném vzorku v $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$.

7.10.2. Statistické zpracování hodnot

Dle postupu uvedeného v kapitole 7.10.1. byla vypočítána koncentrace kadmia v jednotlivých vzorcích jehličí a listí. Ke všem výsledkům byla vypočítána směrodatná odchylka, do níž byla zahrnuta jak směrodatná odchylka daného měřeného vzorku, tak i směrodatná odchylka příslušného slepého pokusu, která se odečítala, viz kapitola 7.10.1. Celkovou nejistotu analytického měření, včetně slepého pokusu, reprezentovala tato směrodatná odchylka.

Z jednotlivých experimentů, jednotýdenní a dvoutýdenní, pro smrk i buk, byla část vzorků umyta a část zůstala v nativním stavu. Tak nám pro každý experiment vznikly další soubory, jednotýdenní umyté a jednotýdenní neumyté, dvoutýdenní umyté a dvoutýdenní neumyté. Některé se dělily ještě na růst při teplotě 20°C (nestresová varianta) a 35°C (stresová varianta). Tyto jednotlivé skupiny byly testovány pomocí Grubbsova testu na vyloučení hrubých chyb, označované také jako odlehlé, které jsou způsobeny výjimečnou příčinou např. selháním aparatury nebo nesprávným záznamem výsledků [45]. Tyto odlehlé výsledky byly z měření vyloučeny a byla vypočítána průměrná koncentrace kadmia pro dané skupiny vzorků. Tyto skupiny byly také výchozí pro testování výsledků pomocí ANOVA analýzy.

ANOVA neboli analýza rozptylu slouží k analýze zdrojů variability v lineárních statistických modelech. Podstatou je rozklad celkového rozptylu dat na složky objasněné a složku neobjasněnou, o které se předpokládá, že je náhodná. Na vyhodnocení dat se použila jednofaktorová analýza, která zkoumá vliv jednoho faktoru na výsledek experimentu [46].

Pomocí analýzy ANOVA byla testována odlišnost výsledků vlivem různých faktorů. Testoval se rozdíl mezi kontrolními a exponovanými rostlinami jak v jednotýdenním experimentu, tak ve dvoutýdenním experimentu. Dále se testoval rozdíl v obsahu kadmia mezi jednotýdenním a dvoutýdenním vystavením rostlin nanočásticím kadmia, zda měla doba expozice vliv na obsah kadmia ve vzorcích. Testoval se také rozdíl mezi umytými a neumytými vzorky v jednotýdenních a ve dvoutýdenních experimentech. Nakonec se testoval i vliv teploty na obsah kadmia. Zda stresové podmínky při teplotě 35°C měli vliv na obsah zachyceného kadmia, oproti normálním podmínkám při 20°C . Ve většině, ale ne u všech, testovaných faktorů se prokázal statisticky významný rozdíl v odlišnosti výsledků. U statisticky významných odlišností výsledků zjištěných ANOVA analýzou byla výsledná hodnota daného faktoru (F) vyšší než kritická hodnota (F_{krit}). Všechny výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti alfa 0,05.

8. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky ze dvou experimentů byly získány během února 2016 pro smrk a v průběhu července až srpna 2016 pro buk po expozici nanočásticím oxidu kademnatého.

Cílem této práce bylo zjistit, zda jehličí smrků a listy buků přijímají nanočástice CdO, jaký je rozdíl obsahu kadmia mezi kontrolními a exponovanými jedinci. Jestli umytí vzorků ovlivní obsah kadmia. Zda má na příjem kadmia vliv stresová podmínka v podobě zvýšené teploty a nižší vlhkosti při růstu.

Celkem bylo změřeno 185 vzorků, z toho bylo 156 vzorků dřevin a 29 slepých vzorků. Každý vzorek se změřil třikrát a vypočítal se aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

Při hodnocení ANOVA analýzy se zjišťovaly tři faktory vlivu na obsah kadmia ve vzorcích. Prvním faktorem byl rozdíl obsahu mezi kontrolními a exponovanými vzorky, druhý faktor byl vliv umytí vzorků na obsah kadmia a poslední třetí faktor, sledoval, zda zvýšená teplota a snížená vlhkost při kultivaci rostlin ovlivnila obsah kadmia v jednotlivých vzorcích.

Protože v jednotlivých experimentech, což byl jednotýdenní a dvoutýdenní se smrky, a jednotýdenní a dvoutýdenní s buky, se pracovalo vždy s novými rostlinami, nemůžeme kvůli biologické variabilitě porovnávat vliv doby expozice na obsah kadmia.

8.1. Výsledky stanovení obsahu kadmia v jehličí smrku

V experimentu se smrky se analyzovalo 105 vzorků, z toho bylo 17 slepých vzorků, aby se vyloučila kontaminace vzorků a potvrdila správnost měření (graf č. 1). Z výsledků pro vzorky slepých pokusů byl stanoven detekční limit (LOD) 0,069 ng Cd, což je na úrovni instrumentálního detekčního limitu. Detekční limit pro stanovení koncentrace Cd v jehličí činil po přepočtu na průměrnou hmotnost vzorku 0,3 ng/g Cd v jehličí. Pomocí Grubbsova testu byly vyloučeny odlehlé výsledky zjištěného obsahu kadmia, v tabulce č. 2 a 4 jsou označeny šedou barvou, se kterými se dále nepočítalo.

8.1.1. Jednotýdenní experiment

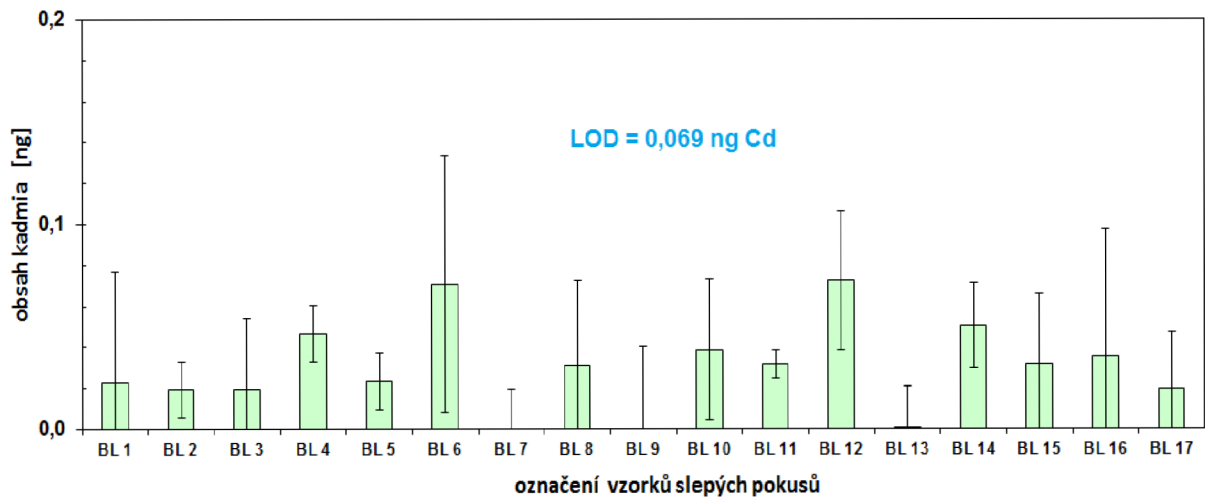
Jednotýdenní experiment, viz tabulka 2, se smrky ukázal, že průměrný obsah kadmia v kontrolních, neumytých vzorcích byl $41 \pm 0,7$ ng/g a v kontrolních, umytých vzorcích $21 \pm 0,3$ ng. V exponovaném jehličí byl obsah kadmia u neumytých jehlic $42 \pm 0,4$ ng/g a u umytých jehlic $35 \pm 1,0$ ng/g. U kontrolních vzorků umytých bylo přibližně o 49 % méně kadmia než u neumytých vzorků. Exponované umyté jehlice měly v průměru o 17 % méně kadmia než neumyté jehlice.

V tomto experimentu byla z výpočtů vyloučena jedna hodnota pro vzorek kontrolní, umytý KL6. U.

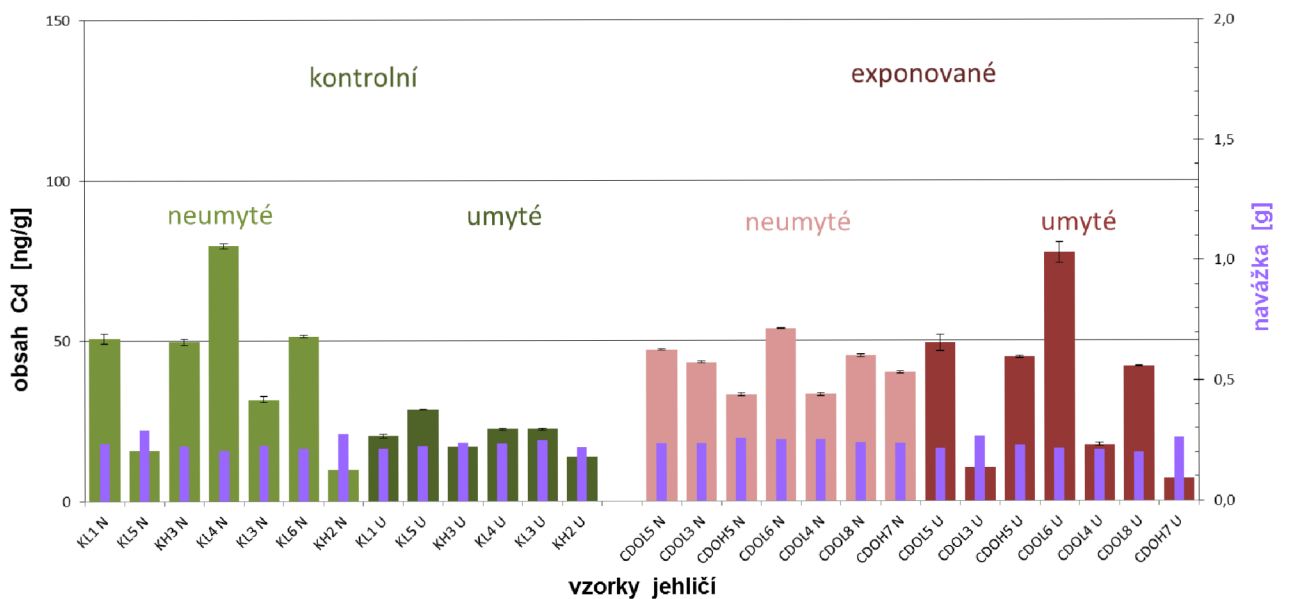
Přehledněji jsou výsledky zobrazeny v grafu č. 2, ve kterém jsou fialovými sloupečky znázorněny i velikosti navážky jednotlivých vzorků. Umytím, se snížil obsah kadmia jak u kontrolních, tak i exponovaných vzorků, proto je patrné, že se kadmium přichycuje na povrchu jehlic a do jehlice přímo neproniká. Což naznačuje, že většina obsahu kadmia v jehlicích pochází pravděpodobně z půdy.

Pomocí analýzy rozptylu se zjistilo, viz tabulka č. 3, že rozdíl mezi kontrolními a exponovanými vzorky jehlic není statisticky významný. Nepotvrdila ani statisticky významný rozdíl mezi neumytými a umytými exponovanými vzorky. Avšak statisticky významný rozdíl se potvrdil mezi umytými a neumytými jehlicemi kontrolních

vzorků. Protože se jedná o kontrolní jehlice, je možné, že za zvýšený obsah kadmia může zvýšený obsah kadmia v půdě, kde smrčky rostly ještě před experimentem. Při jednotýdenním experimentu se nepůsobilo na rostliny zvýšenou teplotou 35°C a nižší vlhkostí vzduchu, proto nemůžeme posuzovat vliv tohoto stresového faktoru.



Graf č. 1: Vývoj úrovně slepého pokusu pro rozklad vzorků z jednotýdenního a dvoutýdenního experimentu se smrčky.



Graf č. 2: Jednotýdenní expozice jehličí nanočásticím CdO.

Tabulka č. 2: Výsledky stanovení obsahu kadmia v jehličí pro jednotýdenní experiment.

1 týdenní expozice - smrk ztepilý							
expozice		označení	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	
1 týden	neumyté	kontrolní	KL1 N	51	1,5	41	0,7
			KL5 N	16	0,1		
			KH3 N	50	1,0		
			KL4 N	79	0,8		
			KL3 N	32	1,0		
			KL6 N	51	0,4		
			KH2 N	10	0,0		
	umyté	kontrolní	KL1 U	20	0,5	21	0,3
			KL5 U	29	0,2		
			KH3 U	17	0,3		
			KL4 U	22	0,2		
			KL3 U	22	0,3		
			KL6 U	47	0,3		
			KH2 U	14	0,0		
neumyté	exponované	CDOL5 N	47	0,3	42	0,4	
		CDOL3 N	43	0,4			
		CDOH5 N	33	0,5			
		CDOL6 N	54	0,1			
		CDOL4 N	33	0,6			
		CDOL8 N	45	0,5			
		CDOH7 N	40	0,3			
umyté	exponované	CDOL5 U	49	2,5	35	1,0	
		CDOL3 U	10	0,2			
		CDOH5 U	45	0,4			
		CDOL6 U	77	3,2			
		CDOL4 U	17	0,6			
		CDOL8 U	42	0,1			
		CDOH7 U	7	0,2			

Tabulka č. 3: ANOVA analýza pro jednotýdenní experiment se smrky.

faktor	EXPERIMENT SMRK 1 TÝDEN	<i>F</i>	<i>F krit</i>	porovnání <i>F</i> a <i>F krit</i>	Statisticky významný rozdíl
1	neumyté 1t kontrolní x exponované	0,013	4,747	$F < F_{krit}$	Ne
1	umyté 1t kontrolní x exponované	1,907	4,844	$F < F_{krit}$	Ne
2	kontrolní 1t neumyté x umyté	35,289	4,844	$F > F_{krit}$	Ano
2	exponované 1t neumyté x umyté	0,199	4,747	$F < F_{krit}$	Ne

8.1.2. Dvoutýdenní experiment

Výsledky dvoutýdenního experimentu se smrky jsou zobrazeny v tabulce 4. Průměrný obsah kadmia u kontrolních, neumytých vzorků byl $172 \pm 0,9$ ng/g a u umytých kontrolních byl $49 \pm 0,5$ ng/g. Exponované, neumyté jehlice měly $556 \pm 6,9$ ng/g kadmia a exponované, umyté měly jen $325 \pm 7,9$ ng/g kadmia. Při umytí se u kontrolních vzorků snížil obsah kadmia cca o 72 % a v případě exponovaných vzorků se po umytí snížil obsah kadmia o 42 %.

Z výpočtů byly pro odlehlost hodnot vyloučeny tyto hodnoty: kontrolní C2F.N, C2E.N, C1H.U, C2E.U, T1A.U a exponované C4E.N, C3C.U, T3D.U.

V grafu č. 3 jsou výsledky zobrazeny přehledněji, z nichž lze vidět, že umytím se opět snížil obsah kadmia v jehličí. Navážky jednotlivých vzorků jsou znázorněny modrými sloupečky.

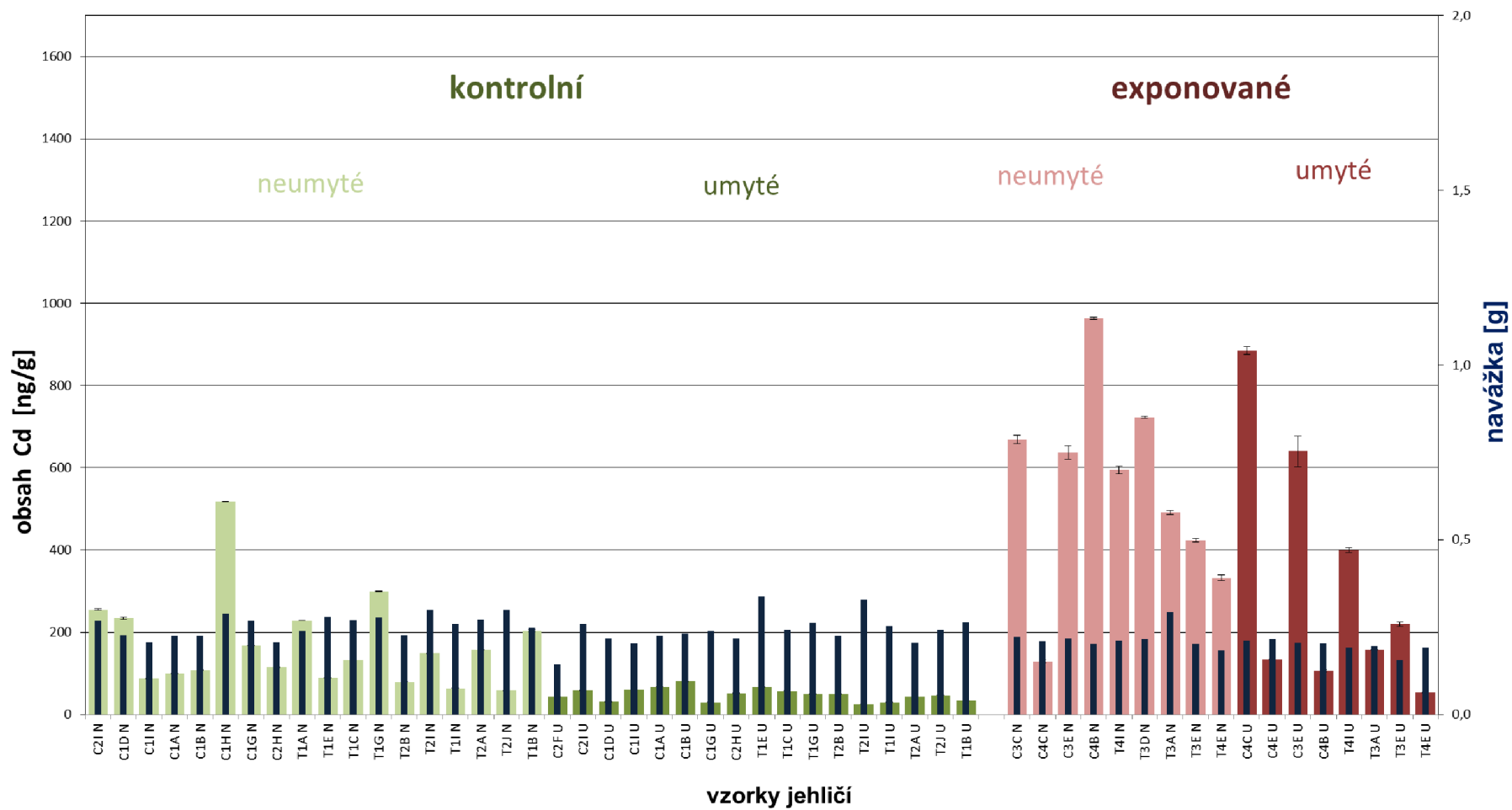
ANOVA analýza ukázala, tabulka č. 5, že je statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia mezi kontrolními a exponovanými vzorky. V případě umytí se statisticky významný vliv na obsah kadmia projevil jen u kontrolních jehlic. Avšak při hodnocení stresového faktoru 35°C se zjistil statisticky významný rozdíl mezi umytými a neumytými exponovanými jehlicemi. Posouzením vlivu teploty, umytí a neumytí se jen statisticky potvrdil vliv expozice nanočástic na vzorky. Naopak v případě testování samotného vlivu stresového faktoru se neprokázal statisticky významný rozdíl mezi rozdílnou teplotou pěstování stromků při 20°C a 35°C. Z analýzy rozptylu tedy vyplývá, že umytí jehlic snížilo obsah kadmia o statisticky významný podíl jen u exponovaných jehlic pěstovaných při 35°C, ale samotná vyšší stresová teplota neměla statisticky významný vliv na obsah kadmia v jehličí.

Tabulka č. 6 přehledně zobrazuje obsah kadmia pro jednotýdenní a dvoutýdenní experiment s jehličím smrků.

Tabulka č. 4: Výsledky stanovení obsahu kadmia v jehličí pro dvoutýdenní experiment.

2 týdenní expozice - smrk ztepilý									
expozice		označení	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	
2 týdny	neumyté	kontrolní 20°C	C2F N	1601	41,1	197	1,1	172	0,9
			C2I N	255	1,7				
			C1D N	234	2,4				
			C1I N	87	0,9				
			C1A N	99	0,4				
			C1B N	108	1,0				
			C1H N	517	0,6				
			C2E N	1231	49,6				
			C1G N	167	1,0				
		C2H N	114	0,9					
		kontrolní 35°C	T1A N	228	0,4	146	0,6		
			T1E N	89	0,7				
			T1C N	132	0,4				
			T1G N	299	0,5				
			T2B N	79	0,0				
			T2I N	148	0,6				
			T1I N	64	0,2				
			T2A N	157	0,8				
	T2J N		58	0,2					
	T1B N	204	2,2						
	umyté	kontrolní 20°C	C2F U	42	0,2	53	0,5	49	0,5
			C2I U	59	0,6				
			C1D U	31	0,7				
			C1I U	60	0,5				
			C1A U	68	0,2				
			C1B U	80	0,5				
			C1H U	143	0,6				
			C2E U	421	0,7				
			C1G U	30	0,2				
		C2H U	51	1,0					
		kontrolní 35°C	T1A U	130	3,0	45	0,5		
			T1E U	66	0,8				
			T1C U	57	0,4				
			T1G U	50	0,3				
			T2B U	50	0,9				
			T2I U	25	0,2				
T1I U			30	0,7					
T2A U			43	0,6					
T2J U	47		0,3						
T1B U	34	0,5							
neumyté	exponované 20°C	C3C N	668	10,0	599	8,0	556	6,9	
		C4C N	128	3,3					
		C4E N	2581	12,5					
		C3E N	637	16,0					
		C4B N	963	2,8					
		C4A N	963	2,8					
	exponované 35°C	T4I N	595	9,3	513	5,7			
		T3D N	723	2,0					
		T3A N	491	5,7					
		T3E N	424	4,2					
		T4E N	332	7,2					
		T4A N	332	7,2					
umyté	exponované 20°C	C3C U	1424	11,5	442	12,6	325	7,9	
		C4C U	885	9,9					
		C4E U	134	0,8					
		C3E U	640	37,3					
		C4B U	107	2,4					
		C4A U	107	2,4					
	exponované 35°C	T4I U	400	5,5	208	3,2			
		T3D U	2023	31,8					
		T3A U	157	0,9					
		T3E U	220	4,9					
		T4E U	53	1,4					
		T4A U	53	1,4					

Graf č. 3: Dvouúřední expozice jehličí nanočásticím CdO.



Tabulka č. 5: ANOVA analýza pro dvoutýdenní experiment se smrky.

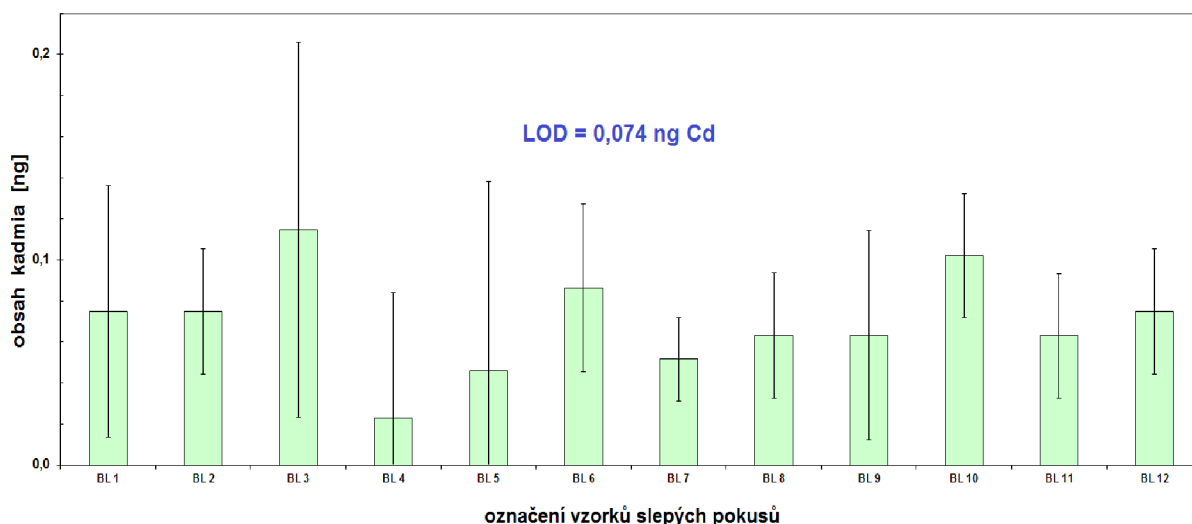
faktor	EXPERIMENT SMRK 2 TÝDNY	<i>F</i>	<i>F krit</i>	porovnání <i>F</i> a <i>F krit</i>	Statisticky významný rozdíl
1	neumyté 2t kontrolní x exponované	41,466	4,260	$F > F \text{ krit}$	Ano
1	umyté 2t kontrolní x exponované	15,415	4,279	$F > F \text{ krit}$	Ano
2	kontrolní 2t neumyté x umyté	30,971	4,149	$F > F \text{ krit}$	Ano
2	exponované 2t neumyté x umyté	3,016	4,543	$F < F \text{ krit}$	Ne
2	kontrolní 20°C 2t neumyté x umyté	4,150	4,494	$F < F \text{ krit}$	Ne
2	exponované 20°C 2t neumyté x umyté	0,373	5,987	$F < F \text{ krit}$	Ne
2	kontrolní 35°C 2t neumyté x umyté	14,388	4,451	$F > F \text{ krit}$	Ano
2	exponované 35°C 2t neumyté x umyté	9,334	5,591	$F > F \text{ krit}$	Ano
3	neumyté 20°C 2t kontrolní x exponované	0,290	4,747	$F < F \text{ krit}$	Ne
3	umyté 20°C 2t kontrolní x exponované	9,068	4,965	$F > F \text{ krit}$	Ano
3	neumyté 35°C 2t kontrolní x exponované	39,502	4,667	$F > F \text{ krit}$	Ano
3	umyté 35°C 2t kontrolní x exponované	12,475	4,844	$F > F \text{ krit}$	Ano
3	neumyté exponované 2t 20°C x 35°C	0,257	5,591	$F < F \text{ krit}$	Ne
3	umyté exponované 2t 20°C x 35°C	1,297	5,987	$F < F \text{ krit}$	Ne

Tabulka č. 6: Obsah kadmia v jehličí u jednotýdenního a dvoutýdenního experimentu.

Experimenty se smrky								
expoziční	kontrolní				exponované			
	neumyté		umyté		neumyté		umyté	
	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]
1 týden	41	0,7	21	0,3	42	0,4	35	1,0
2 týdny	172	0,9	49	0,5	556	6,9	325	7,9

8.2. Výsledky stanovení obsahu kadmia v listech buku

Během experimentu s buky bylo analyzováno 80 vzorků, z toho bylo 12 slepých vzorků. Ze vzorků slepých pokusů byl stanoven detekční limit pro slepé vzorky na 0,074 ng Cd, což je na úrovni instrumentálního detekčního limitu, graf č. 4. Detekční limit, pro stanovení koncentrace Cd listech, činil po přepočtu na průměrnou hmotnost vzorku 0,5 ng/g Cd. Pomocí Grubbsova testu byly vyloučeny odlehlé výsledky, v tabulce č. 7 jsou označeny šedou barvou, se kterými se dále nepočítalo.



Graf č. 4: Vývoj úrovně slepého pokusu pro rozklad vzorků z jednotýdenního a dvoutýdenního experimentu s buky.

8.2.1. Jednotýdenní experiment

Výsledky jednotýdenního experimentu s buky shrnuje tabulka č. 7. Pro kontrolní, neumyté vzorky byl průměrný obsah kadmia $291 \pm 2,2$ ng/g listů a kontrolní, umyté vzorky měly $47 \pm 0,4$ ng/g. Exponované, neumyté listy měly $570 \pm 5,5$ ng/g a průměrný obsah kadmia u exponovaných, umytých byl $355 \pm 1,9$ ng/g. Umyté, kontrolní vzorky měly přibližně o 84 % méně kadmia než vzorky neumyté. Umyté, exponované vzorky mají cca o 38 % méně kadmia.

Z výpočtů byla vyloučena odlehlá hodnota pro vzorek kontrolní, umytý LK4.NEU.

Grafické shrnutí výsledků, graf č. 5, ukazuje, že hodnoty exponovaných vzorků jsou přibližně o 70 % vyšší než vzorky kontrolní. U exponovaných vzorků je vidět i rozdíl mezi umytým a neumytým listím. V grafu je také znázorněna modrými sloupčky velikost navážky jednotlivých vzorků.

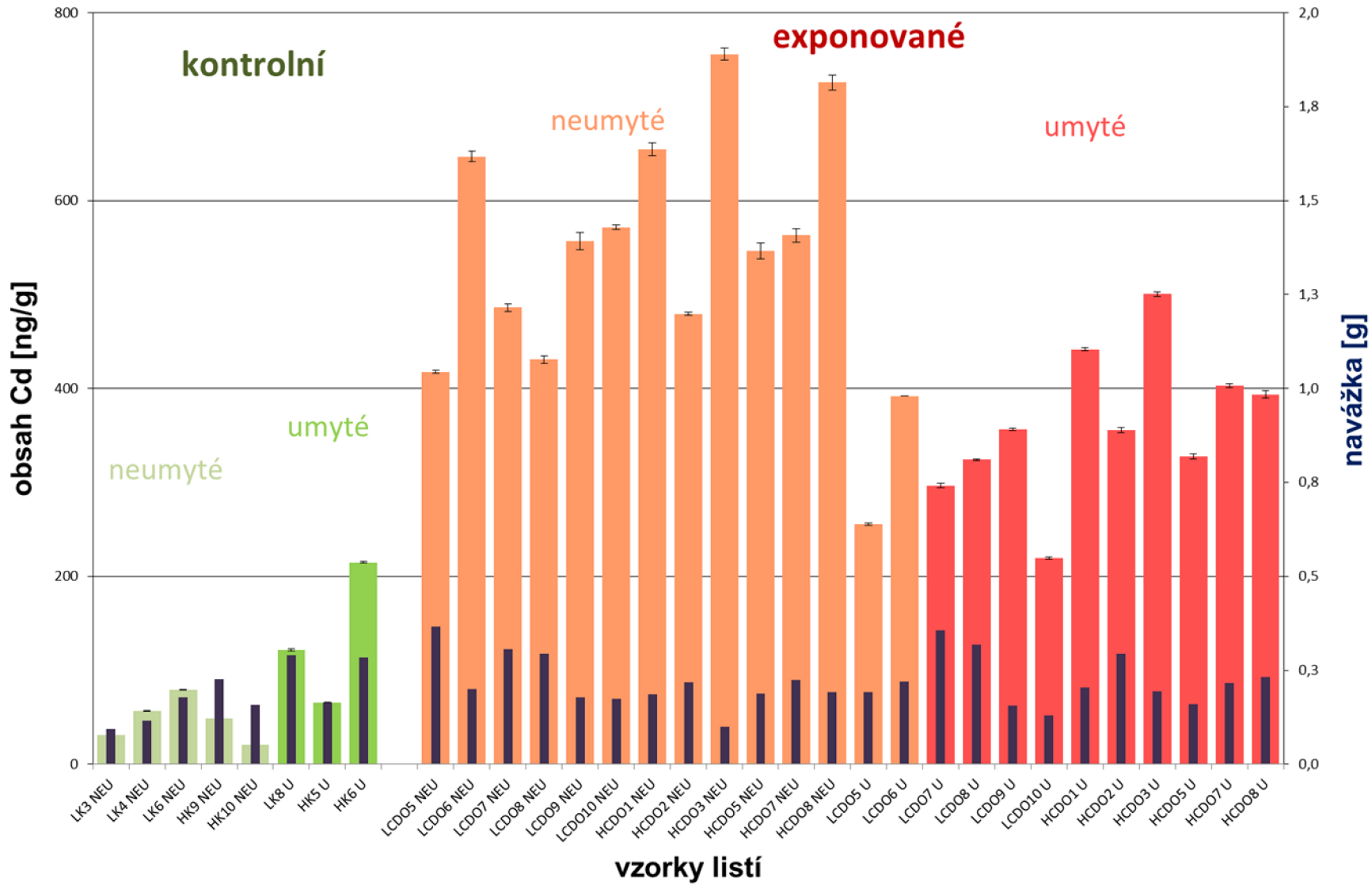
V tabulce č. 8, analýza ANOVA potvrdila statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia mezi kontrolními a exponovanými buky, viz tabulka č. 7. Potvrdila také statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia pro umyté a neumyté vzorky, kontrolní i exponované. Avšak při přesnější analýze v závislosti i na teplotě bylo prokázáno, že u kontrolních vzorků není statisticky významný rozdíl mezi neumytými a umytými listy. Také se u umytých listů

pěstovaných při 20 °C neprokázal významný rozdíl mezi kontrolními a exponovanými vzorky. Při posuzování vlivu samostatné teploty na obsah kadmia v exponovaných vzorcích se prokázalo, že rozdílná teplota měla statisticky významný vliv.

Tabulka č. 7: Výsledky stanovení obsahu kadmia v listí pro jednotýdenní experiment.

1 týdenní expozice - buk lesní								
	označení	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	
neumyté	kontrolní 20 °C	LK3 NEU	762	5,5	442	3,5	291	2,2
		LK4 NEU	1 266	4,1				
		LK6 NEU	122	1,5				
	kontrolní 35 °C	HK9 NEU	65	1,0	140	0,9		
		HK10 NEU	215	0,9				
umyté	kontrolní 20 °C	LK6 U	31	0,8	56	0,4	47	0,4
		LK7 U	57	0,3				
		LK8 U	79	0,2				
	kontrolní 35 °C	HK5 U	49	0,1	35	0,3		
		HK6 U	21	0,4				
neumyté	exponované 20 °C	LCDO5 NEU	418	1,6	518	4,4	570	5,5
		LCDO6 NEU	647	5,5				
		LCDO7 NEU	486	3,9				
		LCDO8 NEU	431	4,0				
		LCDO9 NEU	557	9,5				
		LCDO10 NEU	572	2,1				
	exponované 35 °C	HCDO1 NEU	655	7,2	621	6,5		
		HCDO2 NEU	479	1,7				
		HCDO3 NEU	756	6,2				
		HCDO5 NEU	547	8,5				
		HCDO8 NEU	725	8,2				
umyté	exponované 20 °C	LCDO5 U	255	0,9	307	1,1	355	1,9
		LCDO6 U	392	0,0				
		LCDO7 U	297	2,2				
		LCDO8 U	324	1,1				
		LCDO9 U	356	1,1				
		LCDO10 U	220	1,3				
	exponované 35 °C	HCDO1 U	442	1,9	404	2,6		
		HCDO2 U	356	2,7				
		HCDO3 U	500	2,3				
		HCDO5 U	327	2,9				
		HCDO8 U	394	4,0				

Graf č. 5: Jednotýdenní expozice listů buku nanočásticím CdO.



Tabulka č. 8: ANOVA jednotýdenního experimentu s buky.

faktor	EXPERIMENT BUK 1 TÝDEN	<i>F</i>	<i>F krit</i>	porovnání <i>F</i> a <i>F krit</i>	Statisticky významný rozdíl
1	neumyté 1t kontrolní x exponované	108,974	4,543	$F > F_{krit}$	Ano
1	umyté 1t kontrolní x exponované	19,500	4,667	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 1t neumyté x umyté	6,242	5,987	$F > F_{krit}$	Ano
2	exponované 1t neumyté x umyté	30,630	4,301	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 20°C 1t neumyté x umyté	2,608	10,128	$F < F_{krit}$	Ne
2	exponované 20°C 1t neumyté x umyté	28,603	4,494	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 35°C 1t neumyté x umyté	1,894	18,513	$F < F_{krit}$	Ne
2	exponované 35°C 1t neumyté x umyté	18,101	4,964	$F > F_{krit}$	Ano
3	neumyté 20°C 1t kontrolní x exponované	83,016	4,667	$F > F_{krit}$	Ano
3	umyté 20°C 1t kontrolní x exponované	0,725	5,978	$F < F_{krit}$	Ne
3	neumyté 35°C 1t kontrolní x exponované	51,832	5,987	$F > F_{krit}$	Ano
3	umyté 35°C 1t kontrolní x exponované	20,633	5,987	$F > F_{krit}$	Ano
3	neumyté exponované 1t 20°C x 35°C	4,861	4,494	$F > F_{krit}$	Ano
3	umyté exponované 1t 20°C x 35°C	7,055	4,965	$F > F_{krit}$	Ano

8.2.2. Dvoutýdenní experiment

Výsledky dvoutýdenního experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 9. Kontrolní, neumyté vzorky měly v průměru obsah kadmia $95 \pm 0,8$ ng/g a umyté $35 \pm 0,6$ ng/g. Neumyté, exponované listy měly $666 \pm 10,3$ ng/g a průměrný obsah kadmia v exponovaných, umytých listech byl $536 \pm 5,4$ ng/g. Kontrolní, umyté listy měly přibližně o 63 % méně kadmia než neumyté vzorky. Exponované, umyté vzorky měly cca o 20 % méně kadmia než vzorky neumyté.

Do výpočtů nebyly zahrnovány následující vzorky kontrolní HK2 U a exponovaný CDOL7 NEU.

Pro lepší názornost jsou hodnoty z tabulky č. 9 znázorněny v grafu č. 6. Je patrné, že exponované vzorky neumyté mají nejvyšší obsah kadmia, pak vzorky exponované umyté a kontrolní vzorky mají oproti exponovaným vzorkům nepatrný obsah kadmia.

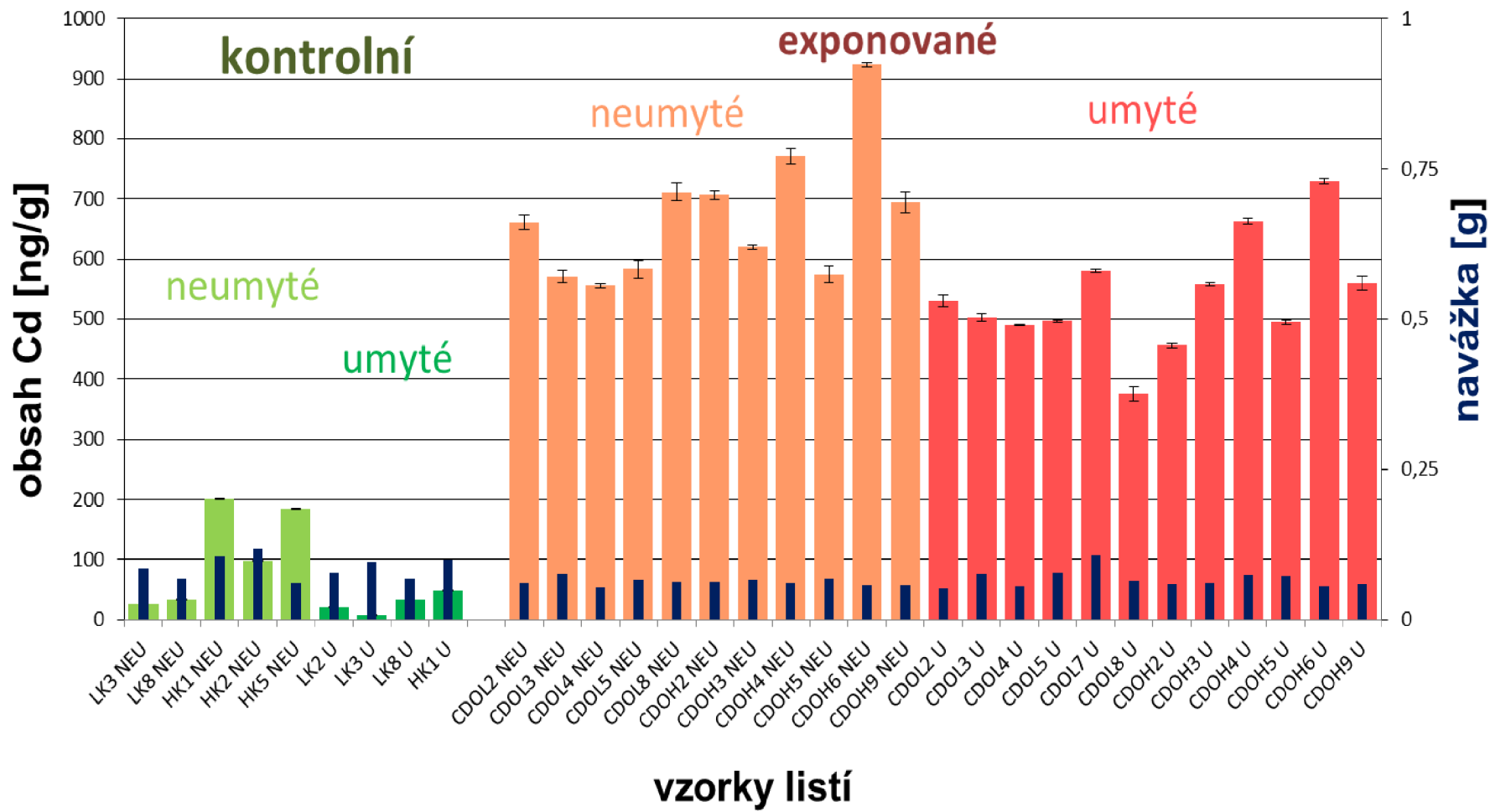
Analýza rozptylu, tabulka č. 10, také potvrdila statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia mezi kontrolními a exponovanými vzorky. Dále také potvrdila pouze statisticky významný rozdíl mezi neumytými a umytými exponovanými vzorky. Při podrobnější analýze byl tento rozdíl potvrzen pouze pro teplotu 20°C u exponovaných listů. Nebyl také prokázán

statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia při pěstování buků při stresové variantě, tedy při 35°C. Teplota neměla žádný vliv na obsah kadmia při dvoutýdenním experimentu s buky. Tabulka č. 11 přehledně zobrazuje zjištěný obsah kadmia v listech při jednotýdenní a dvoutýdenní expozici nanočástic CdO.

Tabulka č. 9: Výsledky stanovení obsahu kadmia v listí pro dvoutýdenní experiment.

2 týdenní expozice - buk lesní								
	označení		obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]	průměr obsah Cd [ng/g]	průměr SD Cd [ng/g]
neumyté	kontrolní 20°C	LK3 NEU	25	0,5	29	0,8	95	0,9
		LK8 NEU	33	1,0				
	kontrolní 35°C	HK1 NEU	201	0,7	161	0,9		
		HK2 NEU	98	0,8				
		HK5 NEU	184	1,2				
umyté	kontrolní 20°C	LK2 U	21	1,2	21	0,8	35	0,6
		LK3 U	7	0,5				
		LK8 U	34	0,6				
	kontrolní 35°C	HK1 U	48	0,4	48	0,4		
		HK2 U	186	1,1				
neumyté	exponované 20°C	CDOL2 NEU	660	11,9	616	10,8	666	10,3
		CDOL3 NEU	571	9,6				
		CDOL4 NEU	556	3,7				
		CDOL5 NEU	583	14,0				
		CDOL7 NEU	1019	6,1				
		CDOL8 NEU	711	14,6				
	exponované 35°C	CDOH2 NEU	706	7,3	715	9,8		
		CDOH3 NEU	620	4,0				
		CDOH4 NEU	771	12,8				
		CDOH5 NEU	575	13,5				
		CDOH6 NEU	923	3,5				
		CDOH9 NEU	693	17,4				
umyté	exponované 20°C	CDOL2 U	530	10,6	495	5,8	536	5,5
		CDOL3 U	502	6,5				
		CDOL4 U	490	1,1				
		CDOL5 U	496	1,6				
		CDOL7 U	580	2,3				
		CDOL8 U	376	12,5				
	exponované 35°C	CDOH2 U	456	3,1	577	5,1		
		CDOH3 U	558	3,1				
		CDOH4 U	663	4,2				
		CDOH5 U	495	4,2				
		CDOH6 U	729	4,5				
		CDOH9 U	560	11,5				

Graf č. 6: Dvoutýdenní expozice listů buku nanočásticím CdO.



Tabulka č. 10: ANOVA dvoutýdenního experimentu s buky.

faktor	EXPERIMENT BUK 2 TÝDNY	<i>F</i>	<i>F krit</i>	porovnání <i>F</i> a <i>F krit</i>	Statisticky významný rozdíl
1	neumyté 2t kontrolní x exponované	71,476	4,543	$F > F_{krit}$	Ano
1	umyté 2t kontrolní x exponované	113,422	4,600	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 2t neumyté x umyté	3,640	5,591	$F < F_{krit}$	Ne
2	exponované 2t neumyté x umyté	10,713	4,301	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 20°C 2t neumyté x umyté	0,633	10,128	$F < F_{krit}$	Ne
2	exponované 20°C 2t neumyté x umyté	8,788	5,117	$F > F_{krit}$	Ano
2	kontrolní 35°C 2t neumyté x umyté	3,141	18,513	$F < F_{krit}$	Ne
2	exponované 35°C 2t neumyté x umyté	4,438	4,965	$F < F_{krit}$	Ne
3	neumyté 20°C 2t kontrolní x exponované	138,371	6,608	$F > F_{krit}$	Ano
3	umyté 20°C 2t kontrolní x exponované	136,822	5,591	$F > F_{krit}$	Ano
3	neumyté 35°C 2t kontrolní x exponované	52,308	5,591	$F > F_{krit}$	Ano
3	umyté 35°C 2t kontrolní x exponované	22,746	6,608	$F > F_{krit}$	Ano
3	neumyté exponované 2t 20°C x 35°C	2,540	5,117	$F < F_{krit}$	Ne
3	umyté exponované 2t 20°C x 35°C	2,607	4,964	$F < F_{krit}$	Ne

Tabulka č. 11: Obsah kadmia v listech jednotýdenního a dvoutýdenního experimentu.

Experimenty s buky								
expoziční	kontrolní				exponované			
	neumyté		umyté		neumyté		umyté	
	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]
1 týden	291	2,2	47	0,4	570	5,5	355	1,9
2 týdny	95	0,9	35	0,6	666	10,3	536	5,5

8.3. Experimenty se smrky a buky

Při přehledném zobrazení výsledků všech experimentů, v tabulce č 12, lze vyzorovat, že listí buku obsahovalo více kadmia než jehličí smrku. Může to být způsobeno rozdílnou stavbou jehličí a listí nebo tím, že exponované buky měly vyšší koncentraci nanočástic ve vzduchu během experimentu.

Tabulka č. 12: Obsah kadmia v jehličí a listech jednotýdenních a dvoutýdenních experimentů.

Experimenty se smrky i buky									
expozice	dřevina	kontrolní				exponované			
		neumyté		umyté		neumyté		umyté	
		obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]	obsah Cd [ng/g]	SD Cd [ng/g]
1 týden	smrk	41	0,7	21	0,3	42	0,4	35	1,0
	buk	291	2,2	47	0,4	570	5,5	355	1,9
2 týdny	smrk	172	0,9	49	0,5	556	6,9	325	7,9
	buk	95	0,9	35	0,6	666	10,3	536	5,5

9. ZÁVĚR

V této diplomové práci byl sledován vliv expozice vzduchu s nanočásticemi oxidu kademnatého na obsah kadmia v jehličí smrku ztepilého a listech buku lesního. Experimenty se uskutečnily na Ústavu analytické chemie a Ústavu výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.. Pokusné rostliny byly před experimenty kultivovány ve fytotronu, a poté byly přemístěny do expozičních komor, kde část rostlin byla vystavena nanočásticím oxidu kademnatého. Druhá část rostlin byla kontrolní skupinou. V této části experimentu se pracovalo s jehličím z 88 smrků a listím z 68 buků (156 rostlin). V experimentu se smrky byla průměrná koncentrace kadmia $1,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a v experimentu s buky $2,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Část vzorků byla umyta a následně byly všechny vzorky usušeny a dodány na analýzu obsahu kadmia pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Před analýzou byly vzorky mineralizovány v kyselině dusičné. Zjištěné hodnoty obsahu kadmia v jednotlivých vzorcích byly statisticky vyhodnoceny pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Sledoval se vliv expozice, vliv umytí na vzorky a zvýšená teplota se současně sníženou vlhkostí při kultivaci rostlin.

V jednotýdenním experimentu se smrky byl zjištěn průměrný obsah kadmia v kontrolních, neumytých vzorcích $41 \pm 0,7 \text{ ng/g}$ a v kontrolních, umytých vzorcích $21 \pm 0,3 \text{ ng/g}$. V exponovaném jehličí byl obsah kadmia u neumytých jehlic $42 \pm 0,4 \text{ ng/g}$ a u umytých jehlic $35 \pm 1,0 \text{ ng/g}$. U kontrolních vzorků umytých bylo přibližně o 49 % méně kadmia než u neumytých vzorků. Exponované umyté jehlice měly v průměru o 17 % méně kadmia než neumyté jehlice. Průměrný obsah kadmia ve dvoutýdenním experimentu se smrky u kontrolních, neumytých vzorků byl $172 \pm 0,9 \text{ ng/g}$ a u umytých kontrolních $49 \pm 0,5 \text{ ng/g}$. Exponované, neumyté jehlice měly $556 \pm 6,9 \text{ ng/g}$ kadmia a exponované, umyté měly $325 \pm 7,9 \text{ ng/g}$ kadmia. Při umytí se u kontrolních vzorků snížil obsah kadmia cca o 72 % a v případě exponovaných vzorků se po umytí snížil obsah kadmia o 42 %.

Experiment s buky ukázal statisticky významný rozdíl mezi exponovanými a kontrolními listy. Po týdenní expozici byl pro kontrolní, neumyté vzorky průměrný obsah kadmia $291 \pm 2,2 \text{ ng/g}$ listí a kontrolní, umyté vzorky $47 \pm 0,4 \text{ ng/g}$. Exponované, neumyté listy měly $570 \pm 5,5 \text{ ng/g}$ a průměrný obsah kadmia u exponovaných, umytých byl $355 \pm 1,9 \text{ ng/g}$. Umyté, kontrolní vzorky měly přibližně o 84 % méně kadmia než vzorky neumyté. Umyté, exponované vzorky mají cca o 38 % méně kadmia. Ve dvoutýdenním experimentu s buky měly kontrolní, neumyté vzorky v průměru obsah kadmia $95 \pm 0,8 \text{ ng/g}$ a umyté $35 \pm 0,6 \text{ ng/g}$. Neumyté, exponované listy měly $666 \pm 10,3 \text{ ng/g}$ a průměrný obsah kadmia v exponovaných, umytých listech byl $536 \pm 5,4 \text{ ng/g}$. Kontrolní, umyté listy měly přibližně o 63 % méně kadmia než neumyté vzorky. Exponované, umyté vzorky měly cca o 20 % méně kadmia než vzorky neumyté.

Pouze jednotýdenní experiment s buky prokázal statisticky významný rozdíl v obsahu kadmia v závislosti na stresovém faktoru, kterým byla zvýšená teplota $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a snížená vlhkost při růstu. U ostatních experimentů teplota nehrála statisticky významnou roli.

Experimenty se smrky a buky ukázaly, že kadmium se do rostlin může dostávat nejen z půdy, ale i z ovzduší, transportem přes jehlice a listí, v případě, když se v ovzduší nachází ve formě nanočástic oxidu kademnatého.

10. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KAFKA, Zdeněk a Jana PUNČOCHÁŘOVÁ. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chemické listy*. 2002, **96**(7), 611-617. ISSN 0009-2770.
- [2] RICO, Cyren M., Sanghamitra MAJUMDAR a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(8), 3485-3498. DOI: 10.1021/jf104517j. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104517j>
- [3] VEČEŘOVÁ, Kristýna, Zbyněk VEČEŘA a Otmar URBAN. Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles. *Environmental Pollution*. 2016, **218**, 207-218. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.05.013. ISSN 02697491. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026974911630392X>
- [4] NÁTR, Lubomír. *Fotosyntetická produkce a výživa lidstva*. Praha: ISV, 2002. Přírodní vědy (ISV). ISBN 80-858-6692-7.
- [5] BUZEA, Cristina, Ivan PACHECO a Kevin ROBBIE. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, vol. 2, issue 4, MR17-. DOI: 10.1116/1.2815690.
- [6] Hassinen, V.H.; Tervahauta, A.I.; Schat, H.; Karenlampi, S.O. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol*. **2011**, 13, 225–232.
- [7] COBBETT, Christopher a Peter GOLDSBROUGH. PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 2002, **53**(1), 159-182. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154. ISSN 1543-5008. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- [8] MOURATO, Miguel, Inês MOREIRA a Luisa MARTINS. Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus Brassica. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16**(8), 17975-17998. DOI: 10.3390/ijms160817975. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/8/17975/>
- [9] ČUDIĆ, Vladica, Dragoslava STOJILJKOVIĆ a Aleksandar JOVOVIĆ. Phytoremediation potential of wild plants growing on soil contaminated with heavy metals. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2016-01-1, **67**(3), DOI: 10.1515/aiht-2016-67-2829. ISSN 0004-1254. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/aiht.2016.67.issue-3/aiht-2016-67-2829/aiht-2016-67-2829.xml>
- [10] BOLAN, Nanthi, Anitha KUNHIKRISHNAN a Kirk SCHECKEL. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*. 2014, **266**, 141-166. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.12.018. ISSN 03043894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389413009485>
- [11] VIEHWEGER, Katrin. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*. 2014, **55**(1), 35-. DOI: 10.1186/1999-3110-55-35. ISSN 1999-3110. Dostupné také z: <http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/35>

- [12] NAGAJYOTI, P. C., K. D. LEE a T. V. M. SREEKANTH. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2010, **8**(3), 199-216. DOI: 10.1007/s10311-010-0297-8. ISSN 1610-3653. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-010-0297-8>
- [13] ALI, Basharat, Rifaqat A. GILL a Su YANG. Regulation of Cadmium-Induced Proteomic and Metabolic Changes by 5-Aminolevulinic Acid in Leaves of *Brassica napus* L. *PLOS ONE*. 2015-4-24, **10**(4), e0123328-. DOI: 10.1371/journal.pone.0123328. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123328>
- [14] CUYPERS, Ann, Michelle PLUSQUIN, Tony REMANS, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals*. 2010, **23**(5), 927-940. DOI: 10.1007/s10534-010-9329-x. ISSN 0966-0844. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-010-9329-x>
- [15] ARMAS, T.; Pinto, A.P.; de Varennes, A.; Mourato, M.P. Comparison of cadmium-induced oxidative stress in *Brassica juncea* in soil and hydroponic cultures. *Plant. Soil* **2015**, 388, 294–305.
- [16] NOUAIRI, Issam, Wided Ben AMMAR a Mokhtar ZARROUK. Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science*. 2006, **170**(3), 511-519. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.10.003. ISSN 01689452. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945205003882>
- [17] DARLINGTON, Thomas K., Arianne M a Steven J. OLDENBURG. NANOPARTICLE CHARACTERISTICS AFFECTING ENVIRONMENTAL FATE AND TRANSPORT THROUGH SOIL. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, **28**(6), 1191-. DOI: 10.1897/08-341.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/08-341.1>
- [18] SANKARAN, Renuka P. a Stephen D. EBBS. Transport of Cd and Zn to seeds of Indian mustard (*Brassica juncea*) during specific stages of plant growth and development. *Physiologia Plantarum*. 2007. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00994.x. ISSN 0031-9317. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2007.00994.x>
- [19] HALL, J. L. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2003, **54**(393), 2601-2613. DOI: 10.1093/jxb/erg303. ISSN 1460-2431. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erg303>
- [20] MUSIL, Ivan a Jan HAMERNÍK. *Jehličnaté dřeviny: přehled nahosemenných i výtrusných dřevin: lesnická dendrologie 1*. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1567-9.
- [21] BITNER, Richard L. *Jehličnany: kapesní atlas*. Praha: Knižní klub, 2012. ISBN 978-80-242-3139-6.
- [22] KUBÁT, Karel. *Botanika*. 2. vyd. Praha: Scientia, pedagogické nakladatelství, 2003. ISBN 80-718-3266-9.
- [23] KOBLÍŽEK, Jaroslav. *Systematická botanika lesnická*. Vyd. 2. nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-715-7756-1.
- [24] HORÁČEK, Petr. *Listnaté stromy v zahradě*. Brno: CP Books, 2005. Abeceda české zahrady (CP Books). ISBN 80-251-0250-5.

- [25] SPOHN, Margot a Roland SPOHN. *Stromy Evropy: 680 stromů, 2600 ilustrací*. Praha: Beta-Dobrovský, 2013. ISBN 978-80-7291-227-8.
- [26] HODGE, Geoff. *Praktická botanika pro milovníky rostlin: více než 3000 botanických termínů: objevujte a pozorujte*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5249-5.
- [27] BEZDĚČKOVÁ, Lena a Jana ŘEZNÍČKOVÁ. *Sběr, skladování a předosevní příprava semen buku lesního (Fagussylvatica): certifikovaná metodika*. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2013. Lesnický průvodce. ISBN 978-80-7417-075-1.
- [28] FULÍN, Martin, Jiří ČÁP a Helena CVRČKOVÁ. *Genetická charakterizace významných regionálních populací buku lesního v České republice: specializovaná mapa s odborným obsahem*. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2016. Lesnický průvodce. ISBN 978-80-7417-115-4.
- [29] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vyd. Praha: Powerprint, 2012. ISBN 978-80-87415-53-5.
- [30] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. 2., nezměn. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 80-715-7870-3.
- [31] HOFMANN, Helga. *Jedlé bylinky a plody: [naučte se znát a používat nejdůležitější druhy]*. Praha: Svojtka, 2013. Průvodce přírodou (Svojtka. ISBN 978-80-256-1059-6.
- [32] BEISER, Rudi. *Jedlé rostliny v přírodě*. Praha: Knižní klub, 2014. ISBN 978-80-242-4210-1.
- [33] *Poradenská a konzultační činnost v oblasti životního prostředí: Smrkové linecké koláčky* [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.paukertova.cz/view.php?cislocianku=2014050014>
- [34] ČERNOHORSKÝ, Tomáš a Pavel JANDERA. *Atomová spektroskopie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997, 218 s. ISBN 80-719-4114-X.
- [35] XIAO, Yuan-fang, Xiao-hua WANG a Wei HANG. Recent Development of Atomic Spectrometry in China. *SPECTROSCOPY AND SPECTRAL ANALYSIS*. 35. 2015, (9): 2377-2387. ISSN 1000-0593.
- [36] KOMÁREK, Josef. *Atomová absorpční spektrometrie*. 1. vyd. Brno, 2000, 85 s. ISBN 80-210-2500-X.
- [37] ČERNOHORSKÝ, Tomáš. *Atomová absorpční spektrometrie I: základní kurz*. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2003, 118 s. ISBN 80-708-0513-7
- [38] http://mineralogie.sci.muni.cz/kap_5_1_metody_chem/obrazek51_1.jpg [cit. 30.11.2015]
- [39] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [40] ČŮTA, František. *Instrumentální analýza: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty vysokých škol technických skupin oborů 27-Technická chemie silikátů, 28-Technická chemie, 31-Textil a oděvnictví*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, 295 s
- [41] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie I*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, 1995, 107 s. ISBN 80-214-0658-5.
- [42] ČERNOHORSKÝ, Tomáš. *Atomová absorpční spektrometrie II: kurz pro pokročilé*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2006, 145 s. ISBN 80-903732-0-8.
- [43] Spěváčková V., Knotková J.,. *Prvková analýza klinických materiálů- aplikace ETA AAS* 1998, Chemické listy, stránky 287-293.

- [44] ČERNOHORSKÝ, Tomáš, Václav ČERVENÝ, Bohumil DOČEKAL a Jiřina SYSALOVÁ. *Atomová absorpční spektrometrie: kurz AAS I.* V Praze: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci a Vysoká škola chemicko-technologická, 2015. ISBN 978-80-905704-6-7.
- [45] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat.* Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2196-8.
- [46] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Interaktivní statistická analýza dat.* Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2173-9.