



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

TRANSPORT KOVŮ V SYTÉMU PŮDA/ROSTLINA.
POROVNÁNÍ MODY AKTIVNÍHO A PASIVNÍHO
VZORKOVÁNÍ (TECHNIKA DIFÚZNÍHO
GRADIENTU V TENKÝCH FILMECH)

METALS TRANSPORT IN THE SYSTEM SOIL/PLANT. COMPARISON OF THE ACTIVE AND
PASSIVE SAMPLING METHOD (THE DIFFUSIVE GRADIENTS IN THIN FILMS TECHNIQUE)

DOKTORSKÁ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. JANA TRÁVNÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. HANA DOČEKALOVÁ, CSc

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0041/2010** Akademický rok: **2010/2011**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Ing. Jana Trávníčková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)
Studijní obor: Chemie životního prostředí (2805V003)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Hana Dočekalová, CSc.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Transport kovů v systému půda/rostlina. Porovnání metody aktivního a pasivního vzorkování (Technika difúzního gradientu v tenkém filmu)

Zadání dizertační práce:

Cílem této dizertační práce je porovnání příjmu mědi ředkvi setou (*Raphanus sativus* L.) pěstovanou na půdách s různým obsahem mědi, určení distribuce mědi v jednotlivých částech rostliny a porovnání výsledků s efektivní koncentrací mědi zjištěné technikou DGT a koncentrací zjištěnou extrakčními postupy.

Termín odevzdání dizertační práce: 11.5.2011

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Jana Trávníčková
Student(ka)

prof. RNDr. Hana Dočekalová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2008

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předkládaná dizertační práce se zabývá porovnáním příjmu mědi ředkvi setou (*Raphanus sativus* L.) s množstvím mědi stanoveným technikou DGT v půdě přirozené a obohacené solemi mědi a s množstvím mědi stanoveným ve výluzích běžně používaných extrakčních činidel (HNO_3 , NaNO_3 , deionizovaná voda) a půdním roztoku. Rostliny byly pěstovány v půdě přirozené i obohacené. Obsah mědi byl stanoven v celé ředkvi i jednotlivých částech rostliny po rozložení v mineralizátoru APION analytickou metodou ET – AAS. Největší množství mědi ukládala rostlina ve své podzemní části, především v kořenech a slupce kořenové bulvy, což svědčí o vazbě mědi v buněčných stěnách kořenového systému. Rostlinami přijaté množství mědi nepřekračuje ani na obohacených půdách povolené hygienické limity a konzumace ředkvi není zdravotně závadná. Celková množství mědi přijatá rostlinami korelovala s obsahem mědi v půdách stanoveným z výluhů všech použitých extrakčních činidel a půdního roztoku. Výluh 2 M HNO_3 potvrdil, že celkové množství přidané mědi v obohacených půdách zůstalo stabilní po dobu všech vegetačních experimentů. Experimenty s DGT ukázaly, že obohacené půdy jsou schopny úbytek měďnatých iontů vázaných jednotkou DGT doplňovat uvolňováním z pevné fáze do půdního roztoku stálou rychlostí a jejich koncentrace je v blízkosti vzorkovací jednotky DGT konstantní, zatímco uvolňování mědi z půdy neobohacené po 24 hodinách klesá. Měď přidaná do půdy ve formě měďnaté soli se tak i po měsíční době ekvilibrace nachází v půdě i v jiných formách než měď přirozeně se v půdě vyskytující. Obsah mědi v půdách stanovený DGT se lišil od obsahu stanoveného extrakcí dusičnanem sodným. Lze usoudit, že o dva řády nižší koncentrace mědi zjištěná pomocí DGT techniky lépe odpovídá skutečnému biodostupnému podílu mědi v půdě. Vysoké hodnoty korelačních koeficientů ($R^2 > 0,9$) byly nalezeny mezi obsahem mědi v rostlinách ředkve seté a obsahem mědi v půdě stanovené z analýzy půdního roztoku a mezi obsahem mědi v rostlinách ředkve a obsahem mědi v půdě změřené technikou DGT. Hodnoty obsahu mědi v půdě zjištěné pomocí půdního roztoku byly třikrát vyšší než ty, změřené technikou DGT. Půdní roztok tedy obsahuje i specie mědi, které nejsou měřitelné DGT a dle předpokladu i rostlině dostupné. Koncentrace mědi stanovená DGT technikou je v porovnání s výsledky získanými extrakčními postupy a analýzou půdního roztoku blíže ke skutečnému obsahu biodostupných forem kovů přítomných v půdě a prokazatelně koreluje s obsahem mědi v těle rostliny ředkve seté. Je proto možno techniku DGT doporučit jako techniku pro stanovení biodostupných forem mědi v půdách.

ABSTRACT

The doctoral thesis deals with comparison between copper uptake by radish (*Raphanus sativus* L.) and concentration of copper measured by a DGT-device and concentration of copper obtained by extraction with generally used extraction agents (HNO₃, NaNO₃ and water). Plants were cultivated in pot experiments on a tested non-treated and gradually spiked soil. The amount of copper was determined in various part of radish (whole plant, above- and below-ground part) after mineralization in the APION mineralizer by ET – AAS. The highest concentration was in belowground part, especially in root tissues and sheel of root bulb. It confirms copper is associated with cell walls. The amount of copper taken by radish up does not pass beyond sanitary standards not even in spiked soils and consummation of radish is not unhealthy. Good correlations were found between copper concentration in radish and the amount of copper extracted with HNO₃, NaNO₃ and water and the amount found in soil solution. Results of extraction with HNO₃ confirmed the amount of copper was stable in spiked soils during the pot experiments. The DGT experiments have shown that the rate of resupply from the solid phase to soil solution is constant during the deployment time. Whereas the release of copper decreases after 24 hours in natural soil. Copper added to soil in form of cupric ions is present in the different form after one month-equilibration than copper present in unspiked soils. The results obtained by DGT measurements were approximately up to two orders of magnitude lower than copper concentration obtained by leaching with sodium nitrate. The extraction with sodium nitrate does not provide true reflection of metal availability to plant root system and soil microorganism. High values of correlation coefficients ($R^2 > 0,9$) were found between concentration of copper in radish plant and the concentration of copper in soil solution measured by DGT technique. Concentration of copper in soil solution was three times higher than concentration measured by DGT technique. Soil solution contains species of copper that are not measured by DGT technique and available to plants. Concentration of metals obtained by DGT measurements is more closely to real concentration of bioavailable forms of metal in soil. Therefore it is possible to recommend the DGT technique as a technique for determination of bioavailable forms of copper in soils.

KLÍČOVÁ SLOVA

ředkev setá (*Raphanus sativus* L.), biodostupnost, měď, technika DGT, extrakční postupy

KEY WORDS

Radish (*Raphanus sativus* L.), bioavailability, copper, the DGT technique, extraction procedures

TRÁVNÍČKOVÁ, J. *Transport kovů v systému půda/rostlina. Porovnání metody aktivního a pasivního vzorkování (Technika difúzního gradientu v tenkém filmu)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 85 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Hana Dočekalová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Velice děkuji prof. RNDr. Haně Dočekalové, CSc. za vedení dizertační práce, všestrannou pomoc, odborné rady při zpracování výsledků a povzbuzování při dokončování dizertační práce. Velmi děkuji i doc. RNDr. Bohumilu Dočekalovi, CSc. za poskytnutí odborných rad při konzultaci a řešení výsledků a zázemí při řešení experimentální části. Také děkuji Ing. Petru Škarpovi, Ph.D. za spolupráci, konzultaci a odborné rady při nádobových pokusech s ředkvi setou. Závěrem bych chtěla poděkovat celé své rodině, zejména mamince a Ondrovi, kteří mě po celou dobu studia psychicky podporovali, věřili mi a dodávali odvahu.

OBSAH

1. Úvod.....	10
2. Cíl disertační práce	11
3. Teoretická část.....	12
3.1 Půdní systém	12
3.1.1 Půdní vlastnosti ovlivňující mobilitu a biodostupnost kovů.....	12
3.1.1.1 pH půdy.....	12
3.1.1.2 Oxidační a redukční procesy.....	13
3.1.1.3 Sorpční vlastnosti půdy.....	13
3.1.2 Původ kovů v půdním systému	14
3.1.2.1 Pedogeneze	15
3.1.3 Antropogenní zdroje těžkých kovů přítomných v půdách	15
3.1.4 Měď v půdě.....	16
3.1.4.1 Obecné vlastnosti mědi	16
3.1.4.2 Formy mědi v půdě	16
3.2 Transport těžkých kovů z půdy do rostliny.....	17
3.2.1 Příjem a akumulace těžkých kovů v rostlinném těle.	17
3.2.1.1 Faktory ovlivňující příjem kovů rostlinami	17
3.2.1.2 Příjem těžkých kovů kořenovým systémem rostlin a jejich akumulace v rostlině	18
3.2.2 Měď v rostlinách	20
3.2.2.1 Deficit mědi v rostlinách.....	21
3.2.2.2 Toxicita mědi v rostlinách.....	22
3.2.2.3 Příjem mědi, její distribuce a akumulace v rostlinách	22
3.3 Metody extrakce půd	24
3.3.1 Jednorázové extrakce.....	25
3.3.2 Sekvenční extrakční postupy.....	25
3.3.3 Extrakční činidla	26
3.4 Technika difúzního gradientu v tenkých filmech	28
3.4.1 Vzorkovací jednotka DGT.....	28
3.4.2 Princip techniky difúzního gradientu v tenkém filmu.....	29
3.4.2.1 Princip stanovení labilních specií kovů ve vodném prostředí.....	30
3.4.2.2 Aplikace techniky DGT do půd a sedimentů	31

3.4.2.3	DIFS (DGT Induced Flux in Soil and Sediments), efektivní koncentrace C_E ...	33
3.4.3	Porovnání techniky difúzního gradientu v tenkém filmu s extrakčními postupy při hodnocení biodostupnosti kovů z půd	35
4.	Experimentální část	37
4.1	Chemikálie	37
4.2	Instrumentace	37
4.2.1	Přístroj pro mineralizaci rostlinného materiálu DRY MODE MINERALIZER APION	38
4.2.2	Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 600, Perkin Elmer	39
4.3	Pracovní postupy	40
4.3.1	Odběr vzorku půdy	40
4.3.2	Příprava půdních vzorků obohacených mědí	41
4.3.3	Odběr půdního vzorku pro vyluhovací experimenty	42
4.3.4	Nádobové pokusy s ředkví setou	42
4.3.5	Skřízeň rostlinného materiálu	43
4.3.6	Pracovní postup při extrakci mědi z půdního vzorku	43
4.3.6.1	Extrakce půdního vzorku dusičnanem sodným	43
4.3.6.2	Extrakce půdního vzorku kyselinou dusičnou	43
4.3.6.3	Extrakce půdního vzorku deionizovanou vodou	43
4.3.7	Příprava gelů pro aplikaci techniky DGT	44
4.3.7.1	Příprava difúzního gelu	44
4.3.7.2	Příprava sorpčního gelu s iontoměničem Chelex 100	44
4.3.8	Příprava DGT vzorkovacích jednotek	45
4.3.9	Aplikace DGT vzorkovacích jednotek do půdy	45
4.3.10	Příprava eluátů ze sorpčních gelů pro následnou analýzu	46
4.3.11	Studium vlivu změny experimentálních parametrů DGT techniky na množství mědi akumulované v sorpčním gelu	46
4.3.11.1	Test časové závislosti	46
4.3.11.2	Aplikace DGT vzorkovacích jednotek s odlišnou tloušťkou difúzní vrstvy	47
5.	Výsledky a diskuze	48
5.1	Extrakce mědi z půdních vzorků	48
5.2	Technika difúzního gradientu v tenkém filmu	50
5.2.1	Studium vlivu experimentálních parametrů techniky DGT na množství mědi akumulované v sorpčním gelu z půdní suspenze	50

5.2.1.1	Časová závislost při aplikaci vzorkovacích jednotek DGT do půdy	50
5.2.1.2	Aplikace vzorkovacích jednotek DGT s odlišnou tloušťkou difúzní vrstvy	54
5.2.2	Srovnání odezvy techniky DGT s účinností vyluhování extrakčními činidly	56
5.3	Stanovení obsahu mědi ve tkáních ředkve seté (<i>Raphanus sativus</i> L.) .	57
5.3.1	Porovnání výsledků získaných extrakčními postupy, technikou DGT s výsledky nádobových pokusů s ředkvi setou	63
5.3.1.1	Porovnání koncentrace mědi stanovené ve vyluzích kyseliny dusičné, dusičnanu sodného a deionizované vody s koncentrací mědi stanovenou z nádobových pokusů	63
5.3.1.2	Srovnání obsahu mědi stanovené v ředkvi seté s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT.....	66
5.3.1.3	Porovnání koncentrace mědi stanovené v ředkvi seté a koncentrací mědi zjištěné v půdním roztoku	68
6.	Závěr.....	71
7.	Seznam použitých literárních zdrojů.....	73
8.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	82
9.	Příloha.....	84

1. ÚVOD

Přírodní ekosystém je velmi složitý celek s velkým množstvím fyzikálních, chemických a biologických procesů, mezi kterými probíhají vzájemné reakce zajišťující funkčnost tohoto systému. Například důsledkem rychle se rozvíjejícího důlního a hutnického průmyslu, používání pesticidů nebo i aplikací splaškových kalů na zemědělské půdy dochází ke značnému zvyšování koncentrace „těžkých kovů“ v půdním systému, a tím i k narušení těchto přírodních rovnováh. Zvýšené množství nežádoucích prvků v půdách může vést i ke zvýšenému příjmu rostlinami. Při vyšších koncentracích mohou „těžké kovy“ zasahovat do metabolických procesů rostlin a potlačovat tak jejich růst, nebo dokonce způsobit úhyn samotné rostliny.

Rostliny patří mezi velmi důležité složky životního prostředí, protože jsou schopné ve svých tkáních kumulovat různá množství polutantů a přenášet je tak z abiotického prostředí do prostředí biotického. Této vlastnosti je využíváno např. při remediaci půdy kontaminované „těžkými kovy“ nebo při monitoringu přítomnosti těchto kovů v životním prostředí. K takovým účelům jsou nejvhodnější rostliny označované jako hyperakumulátory, jež jsou velmi tolerantní k toxickým kovům, mají schopnost ukládat ve svých tkáních mnohokrát vyšší koncentrace než běžně se vyskytující rostliny a také mohou růst na kontaminovaných půdách bez viditelných znaků toxicity. Mezi nejvíce prostudované rostliny s hyperakumulačními schopnostmi se řadí rostliny z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), jejíž zástupci mohou ve svých tkáních kumulovat více než jeden kov.

Aby bylo možné odhadnout účinky a rizika spojená se zvýšenou koncentrací kovů v půdním systému, je nutné určit tzv. biodostupnou frakci kovu, což je taková forma kovu, která je mobilní, tvoří labilní komplexy a jednoduše vstupuje do rostlin a následně do potravních řetězců a ovlivňuje tak zdraví organismů i člověka.

Pro rozdělení jednotlivých frakcí kovů jsou nejčastěji využívány extrakční postupy. Vyluhovací postupy poskytují informace o celkovém využitelném obsahu kovu než o frakci kovu skutečně dostupné pro kořenový systém rostlin. Během vyluhování je vzorek půdy mechanicky zpracován a může tak dojít k narušení fyzikálně-chemické rovnováhy, jež může ovlivnit rozdělení kovů a jejich forem v půdním systému. Proto jsou stále hledány nové přístupy, které by lépe charakterizovaly transport a příslušnou koncentraci biodostupných frakcí kovů v půdách.

Počátkem 90. let 20. století byla vyvinuta nová *in situ* měřicí metoda, díky které je možné stanovit labilní specie „těžkých kovů“ v půdách. Tato technika je označována jako technika difúzního gradientu v tenkých filmech (technika DGT). Technika DGT je schopna simulovat příjem kovů z půdy kořenovým systémem, čehož není možné dosáhnout pomocí extrakčních postupů.

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je porovnání příjmu mědi ředkvi setou (*Raphanus sativus* L.) pěstovanou na půdách s různým obsahem mědi, určení distribuce mědi v jednotlivých částech rostliny a porovnání výsledků s efektivní koncentrací mědi v půdě zjištěné technikou DGT a koncentrací získanou extrakčními postupy.

Vlastní disertace je zaměřena na:

- Odběr a zpracování vzorku půdy
- Její charakterizaci extrakčními postupy
- Provedení vegetačních nádobových pokusů s rostlinou *Raphanus sativus* L.
- Aplikace techniky DGT do použité půdy
- Zpracování a interpretace výsledků

Vegetační nádobové pokusy byly realizovány ve sklenících Mendelovy univerzity v Brně.

Analytická část práce byla prováděna ve spolupráci s Ústavem analytické chemie Akademie věd ČR.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 PŮDNÍ SYSTÉM

Půda je komplexní heterogenní medium, které obsahuje minerální a organické pevné částice, vodné a plynné složky. Minerální látky se v půdě vyskytují především vlivem zvětrávání skalních úlomků a sekundárních minerálů, jako jsou např. jílové minerály, oxidy hliníku, železa nebo manganu. Organická hmota je pak tvořena živými organizmy, odumřelou rostlinnou tkání (humus) a koloidním humusem, který vzniká rozkladem odumřelé rostlinné tkáně působením půdních mikroorganismů.

Velký význam má půda především pro růst rostlin, biodegradaci a recyklaci odumřelé biomasy. Z půdy přijímají rostliny svými kořeny vodu, kyslík a minerální látky potřebné ke svému růstu. Kořeny do půdy uvolňují oxid uhličitý a vylučují organické sloučeniny, které podporují činnost mikroorganismů na rozhraní mezi kořenem a půdou nazývanou *rhizosféra*. Kořeny rostlin také mění fyzikální a chemické vlastnosti okolní půdy, a tím ovlivňují i biodostupnost některých chemických prvků.

Půda je dynamický systém, jenž je náchylný ke krátkodobému kolísání pH a redoxních podmínek, podléhá také postupným změnám, způsobeným proměnlivými okolními faktory (změna počasí, teploty, změna chemického posypu). Každá z těchto změn ve vlastnostech půdy ovlivňuje formu a biodostupnost kovů.

3.1.1 Půdní vlastnosti ovlivňující mobilitu a biodostupnost kovů

Podle chemického složení a stupni hospodářského zatížení mohou půdy vykazovat určité chemické vlastnosti, které nejsou určovány jen podle původu půdy a okolních parametrů, ale jsou velmi citlivými ukazateli úrovně hospodářského využití. K nejvýznamnějším vlastnostem půdy ovlivňujícími biodostupnost a mobilitu kovů v půdách patří acidita půdy (pH) společně s oxidačními a redukčními procesy a také sorpční vlastnosti půdy [1].

3.1.1.1 pH půdy

Acidita půdy má přímý vliv na dostupnost kovů v půdě, protože ovlivňuje jejich rozpustnost a schopnost vytvářet v půdě komplexy kovů a půdních částic. *Půdní reakce* je určována koncentrací vodíkových iontů v pórové vodě, která je v dynamické rovnováze s převážně záporně nabitým povrchem půdních částic. Vodíkové ionty se v půdním roztoku slučují s molekulami vody za vzniku oxoniových iontů, H_3O^+ . Půdní reakce je udávána buď v jednotkách pH nebo v $meq.H^+100 g^{-1}$ zeminy [1,2].

pH půdy lze ovlivnit různými chemickými látkami, ať už přítomnými v půdě ($\text{Al}(\text{OH})_3$, oxid uhličitý, uhličitany) nebo uměle dodávanými (vápnění). pH se také významně mění v důsledku lokálních změn v půdě. Např. v místech s vyšší vlhkostí dochází ke zvyšování pH vyluhováním bází, v sušších místech naopak dochází k poklesu pH kvůli vypařování a usazování solí na půdním povrchu [2].

3.1.1.2 Oxidační a redukční procesy

Oxidace a redukce jsou součástí komplexních chemických dějů v půdách, které doprovází biochemické pochody při zajišťování energie půdními organizmy. Jejich přítomnost indikuje stupeň aerace půdy anebo množství kyslíku přítomného v půdě [1].

Redoxní rovnováha je řízena aktivitou volných iontů, která může být označena buď jako hodnota pE (záporný logaritmus aktivity iontů) nebo E_h (elektrodotový potenciál). Převodní faktor mezi těmito dvěma veličinami je vyjádřen následujícím vztahem (1) [2]:

$$E_h \text{ (mV)} = 59,2 \text{ pE} \quad (1)$$

Hodnoty *elektrodotového potenciálu* se v krajních případech pohybují nejčastěji v rozmezí od 200 mV při silně redukčních podmínkách až do 750 mV při oxidačních podmínkách. Určením elektrodotového potenciálu jsou zjišťovány přítomné oxidační nebo redukční podmínky, přítomnost těchto procesů je možné určit také i z barvy půdy. Např. červená a hnědá barva signalizuje probíhající oxidační procesy, modrozelená až šedá barva glejových půd je způsobena redukcí železa z trojmocného na dvojmocné [2].

K významným redukčním pochodům v půdě patří např. hnití, tvorba metanu, vodíku, desulfurizace a denitrifikace při anaerobních biologických přeměnách organické hmoty. Z oxidačních procesů jsou nejvýznamnější aerobní mikrobiální transformace organické hmoty, jako je mineralizace, nitrifikace, oxidace aminokyselin, sulfidů a elementární síry, manganatých a železnatých sloučenin [2].

3.1.1.3 Sorpční vlastnosti půdy

Nejvýznamnější chemické procesy probíhající v půdě, které ovlivňují biodostupnost a mobilitu kovů v půdách, jsou spojeny s přechodem kovových iontů mezi pevnou fází a půdním roztokem. Tyto procesy upravují koncentraci kovových iontů a komplexů v půdním roztoku, čímž mají velký vliv na jejich příjem kořeny rostlin. Adsorpce kovových iontů na pevné fázi je spojena s různými mechanismy, mezi něž se řadí např. výměnná sorpce kationů nebo specifická adsorpce [2].

Výměna kationů závisí na vlastnostech půdy, na hodnotě pH půdního roztoku, koncentraci iontů a iontové síle, teplotě půdy nebo na stupni hydratace iontů. Při výměně kationů mezi půdním roztokem a sorpčním půdním komplexem dochází za určitých podmínek k rovnovážnému stavu. Změnou složení a koncentrace prvků v půdním roztoku (hnojení, závlahy) se rovnovážný stav porušuje. Aby došlo k obnovení tohoto stavu, musí kationty přecházet z půdního roztoku do sorpčního komplexu a opačně. Výměna kationů probíhá mezi jednovalentními a vícevalentními ionty. Může k ní docházet mezi ionty o stejné ($K^+-NH_4^+$, $Ca^{2+}-Mg^{2+}$) nebo o různé valenci ($Ca^{2+}-K^+$, $Mg^{2+}-NH_4^+$). Probíhá-li výměna mezi kationy o stejné valenci, je vzájemný poměr absorbovaných iontů proporcionalní jejich vzájemnému poměru v půdním roztoku a nezávisí na jejich koncentraci. Při výměně mezi kationy o různé valenci se uplatňuje iontová síla půdního roztoku [3].

Specifická adsorpce představuje výměnu kladně nabitých iontů kovů a většiny anionů s povrchovými ligandy, při které vznikají částečně kovalentní vazby. V porovnání s výměnou kationů jsou tedy kovové ionty sorbovány rychleji [4]. Specifická adsorpce je závislá na hodnotě pH půdního roztoku, což je potvrzeno ve studii [5] a souvisí s hydrolyzou kovových iontů. Kovy schopné vytvářet velké množství hydroxidových komplexů, podléhají specifické absorpci v největší míře. Míra specifické adsorpce, vyjádřené rovnicí (2), je určena rovnovážnou konstantou pK. S klesajícími hodnotami pK se specifická sorpce kationů zvyšuje [4].



3.1.2 Původ kovů v půdním systému

Deset hlavních prvků (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti a P) představuje přes 99 % z celkového množství prvků přítomných v zemské kůře. Zbývající prvky z periodické soustavy prvků jsou označovány jako *stopové prvky* a koncentrace každého z nich nedosahuje 1000 mg.kg^{-1} (0,1 %). Ve skutečnosti je ale průměrná koncentrace většiny z nich menší než 100 mg.kg^{-1} [2]. Pojem stopový prvek zahrnuje kovy, polokovy (As nebo Sn), nekovy (Se) anebo radionuklidy. Toxicita esenciálních či neesenciálních prvků závisí na jejich koncentraci v prostředí, speciaci, pH a redoxním potenciálu. Mezi stopové prvky (mikronutrienty), které jsou esenciální pro výživu vyšších rostlin, patří např. B, Cu, Fe, Mn, Mo a Zn [6].

Půdní systém obsahuje množství stopových prvků různého původu. *Litogenní prvky* jsou prvky, které mají svůj původ přímo v litosféře. *Antropogenní prvky* v půdě jsou přítomny důsledkem lidské aktivity. Třetí skupina prvků je označována jako *pedogenní prvky*. Tyto prvky se v půdě objevují díky různým půdotvorným procesům a minerálním přeměnám [7].

3.1.2.1 Pedogeneze

Půdotvorný proces (pedogeneze) je souhrn rozmanitých fyzikálních, chemických a biologických procesů probíhajících v půdách, jež podmiňují příslušné složení a vlastnosti půdní hmoty. Tyto procesy zahrnují rozklad minerálních a organických sloučenin a tvorbu jiných sloučenin, dále odnášení různých látek z půdní hmoty a přínos nových látek do půdy [8].

Mezi nejdůležitější aspekty pedogeneze související s chováním těžkých kovů v půdách patří:

- uvolňování kovů z původního materiálu zvětráváním,
- přemísťování a akumulace půdních částic, které absorbují kovy (jíly, oxidy a organická hmota) [8].

Zvětrávání, jež je významným procesem při vzniku všech půd, je fyzikální rozpad a chemický rozklad minerálů. Není typické pouze pro půdní systém, častěji se hovoří o zvětrávání u hornin při působení environmentálních faktorů. Zvětrávání minerálů v půdní matici v sobě zahrnuje hydrolýzu, hydrataci, rozpouštění, oxidaci a redukci a iontovou výměnu [9].

Zmiňované procesy jsou závislé na přítomnosti vody, která iniciuje tyto reakce a také odnáší vzniklé produkty [9].

3.1.3 Antropogenní zdroje těžkých kovů přítomných v půdách

Vlivem antropogenní činnosti dochází ke zvyšování koncentrace kovů vyskytujících se v půdním systému přirozeně. Těžké kovy jsou pak z kontaminované půdy přijímány kořenovým systémem rostlin, a tím dochází k začlenění těchto kovů do životních cyklů [10].

Kontaminace půdy těžkými kovy je z velké části způsobena rozvíjejícím se slévárenským, petrochemickým a textilním průmyslem, koželužstvím, barvířstvím anebo zvyšujícím se používáním hnojiv. Odpady z těchto průmyslových odvětví obsahují velké množství toxických těžkých kovů jako je měď, nikl, zinek, olovo, arzen, kadmium a chrom. Potenciálními zdroji kontaminace půdy jsou např. i staré sady, jež byly ošetřeny insekticidy s obsahem arsenu jako aktivní složky, pole hnojená splašky a městským odpadem nebo místa v okolí míst s těžebními odpady [11,12].

Vzhledem k toxicitě a škodlivým vlivům těžkých kovů na zdraví živých organismů je v současné době věnována stále větší pozornost původu a osudu těchto látek v životním prostředí. Mezi sledované kovy patří i měď, která je přítomna ve formě svých sloučenin v mnoha průmyslových odpadech [12].

3.1.4 Měď v půdě

3.1.4.1 *Obecné vlastnosti mědi*

Měď je jedním z nejdůležitějších prvků, esenciálním pro rostliny i živočichy. Díky své kujnosti a schopnosti vést teplo a elektřinu je měď využívána v různých průmyslových odvětvích. V přírodě je měď přítomna ve formě sulfidů, sulfátů, uhličitanů a dalších sloučenin, při redukčních podmínkách se může vyskytovat jako ryzí kov. Průměrné množství mědi v litosféře je $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, zatímco hodnoty v zemské kůře dosahují od 24 do 55 mg/kg. Měď je v půdě vázána na organickou hmotu, oxidy železa a manganu, na křemičitanové jílky a další minerály [13, 14].

Extrahovatelná měď, označovaná také jako „dostupná“, udává množství tohoto prvku v půdě, které statisticky odpovídá koncentraci Cu absorbované a asimilované rostlinami. Dostupnost mědi je ovlivněna chemickým potenciálem příslušné specíe v půdním roztoku. Úroveň a rozložení celkové a extrahovatelné mědi v půdním profilu se liší v závislosti na půdním typu a půdní matrici. Profilové rozložení mědi může být pozměněno různými pedologickými procesy, jako je např. podzolizace [14,15].

3.1.4.2 *Formy mědi v půdě*

Měď je v půdách přítomná v různých formách, které jsou rozděleny mezi půdní roztok a pevnou fázi, a to ve formě iontů, hydratovaných iontů, komplexů s přírodními ligandy a vázaná na koloidy. Rozpustnost mědi a její specíace závisí na pH půdního roztoku [16].

Měď je vázána prostřednictvím kationové výměny a adsorpce (viz. kap. 3.1.1) a v půdě se může vyskytovat v těchto frakcích:

- *vodorozpustná*, která tvoří méně než 1 % celkového obsahu Cu a s klesajícím pH její podíl výrazně klesá,
- *výměnná frakce*, která tvoří 3 % z celkového obsahu Cu,
- *frakce sorbovaná na organickou hmotu a anorganické složky půd*, jako jsou oxidy Fe a Mn (15 – 50 % celkové Cu),
- *frakce vázaná v oxidech a hydroxidech Fe a Mn* (až 40 % z celkového množství Cu),
- *reziduální, iontová frakce vázaná v krystalové struktuře silikátů* (25 % z celkové Cu u lehkých půd, u těžkých půd až 90 % celkového obsahu Cu) [17].

Z hlediska výživy rostlin mají vodorozpustné a výměnné formy zásadní význam. Měď v půdním roztoku je považována za labilní frakci, formy specificky absorbované na organickou hmotu a oxidy jsou označovány jako semilabilní a reziduální frakce jsou považovány za nelabilní [18].

3.2 TRANSPORT TĚŽKÝCH KOVŮ Z PŮDY DO ROSTLINY

Podle akumulčních schopností mohou být rostliny rozděleny do tří skupin. *Exkludéři* kovů jsou rostlinné druhy, jež jsou schopné ve svých kořenech akumulovat značné koncentrace kovů a zabraňují jejich zpětnému uvolňování zpět do půdy. Rostliny, které akumulují kovy ve svých nadzemních částech, jsou rozděleny do dvou skupin: *indikátory* a *hyperakumulátory*. Množství kovů v nadzemních částech indikátorů obvykle odráží množství kovů přítomných v půdě. Rostliny s hyperakumulací schopnostmi mohou koncentrovat kovy ve svých nadzemních částech až do takových hodnot, které značně převyšují množství kovů přítomné v půdě. Jedna z možných definic říká, že rostliny, jež obsahují v sušině listů více než 0,1 % Ni, Co, Cu, Cr a Pb nebo 1 % Zn, jsou označovány jako hyperakumulátory, bez ohledu na koncentraci kovů v půdě [19,20].

3.2.1 Příjem a akumulace těžkých kovů v rostlinném těle.

Rostliny přijímají a akumulují stopové prvky (těžké kovy) ve svých tkáních buď z půdního roztoku anebo v některých výjimečných případech i ze vzdušného aerosolu. Jsou ale schopné uvolňovat některé prvky zpět do okolního prostředí. Akumulace prvků a jejich koloběh v tělech rostlin je tudíž závislý jak na jejich příjmu, tak i na jejich odstraňování z rostlinných tkání. Proto mohou být těžké kovy přijaté rostlinami přemístovány do různých částí rostlin, aniž by docházelo ke změnám v celkovém akumulovaném množství kovu. Příjem těžkých kovů je ovlivněn absorpční plochou kořenů a listů a dále také produkcí biomasy. Čím větší je absorpční povrch, tím vyšší a efektivnější je příjem prvků [6].

Prvky nutné pro růst rostlin i těžké kovy jsou přijímány rostlinami ve formě rozpustných solí pomocí listů, stonků, případně i generativních orgánů (klas, lata, plod). Tento způsob příjmu prvků označován jako *foliární*. Rozhodující podíl všech prvků přijímá rostlina z půdy *kořenovým systémem* [21].

V rámci této dizertační práce byl studován příjem mědi kořenovým systémem ředkve seté (*Raphanus sativus*), a proto bude nadále věnována pozornost příjmu těžkých kovů kořenovým systémem.

3.2.1.1 Faktory ovlivňující příjem kovů rostlinami

Příjem stopových prvků rostlinami je ovlivněn mnoha faktory, které lze rozdělit na vnitřní a vnější. *Vnitřní faktory*, jako např. vývojová fáze, vnitřní koncentrace stopových prvků nebo rychlost růstu, jsou dané geneticky a souvisí s druhem rostliny. Příjem stopových prvků z půdy je ovlivněn např. rozpínáním kořenů, tokem vody a iontů či jejich interakcemi. Dále je příjem prvků ovlivněn biologickými parametry, jež zahrnují např. kinetiku membránového transportu, a také schopností rostlin vyrovnávat se se stresujícími podmínkami v jejich životním prostředí [22].

Mezi *vnější faktory* se řadí především klimatické podmínky a vlastnosti půdy. Klimatické podmínky jsou dané souborem činitelů, z nichž k těm nejvýznamnějším patří teplota, sluneční záření a složení atmosféry.

Teplota je významný činitel růstu, který vyvolává příjem stopových prvků a růst a ovlivňuje základní biologické procesy (fotosyntéze, transpirace). Většina rostlin mírného pásma začíná vegetovat při 1 – 5 °C. Tento teplotní rozsah bývá označován jako *teplotní minimum*. Při teplotách vyšších než 40 °C rostliny odumírají. Tato hranice se nazývá *teplotní maximum* [21].

Sluneční záření patří k nenahraditelným vegetačním faktorům. Intenzita, kvalita a doba osvětlení ovlivňují celou řadu fyziologických procesů probíhajících v rostlině. Zvýšená intenzita slunečního záření působí pozitivně např. na příjem dusíku, fosforu nebo síry. Při nedostatečném osvětlení dochází ke snížené tvorbě sacharidů a bílkovin a zvyšuje se obsah minerálů [23].

Atmosféra výrazně ovlivňuje růst rostlin a úrodnost půdy. Je zdrojem O₂, CO₂, N₂ především pro rostliny, které jsou schopné poutat vzdušný dusík. Přítomnost tuhých nečistot v atmosféře zvyšuje přítomnost cizorodých prvků, jež jsou rostlinami přijímány formou foliárního způsobu příjmu stopových prvků (Cd, Hg, Pb, Zn). V případě, že je vzduch příliš suchý, dochází ke zvyšování výparu vody a rostlina tak trpí jejím nedostatkem. Pro rostliny je škodlivá i nadměrná vlhkost, protože napomáhá rozvoji houbových chorob a hnilob [23].

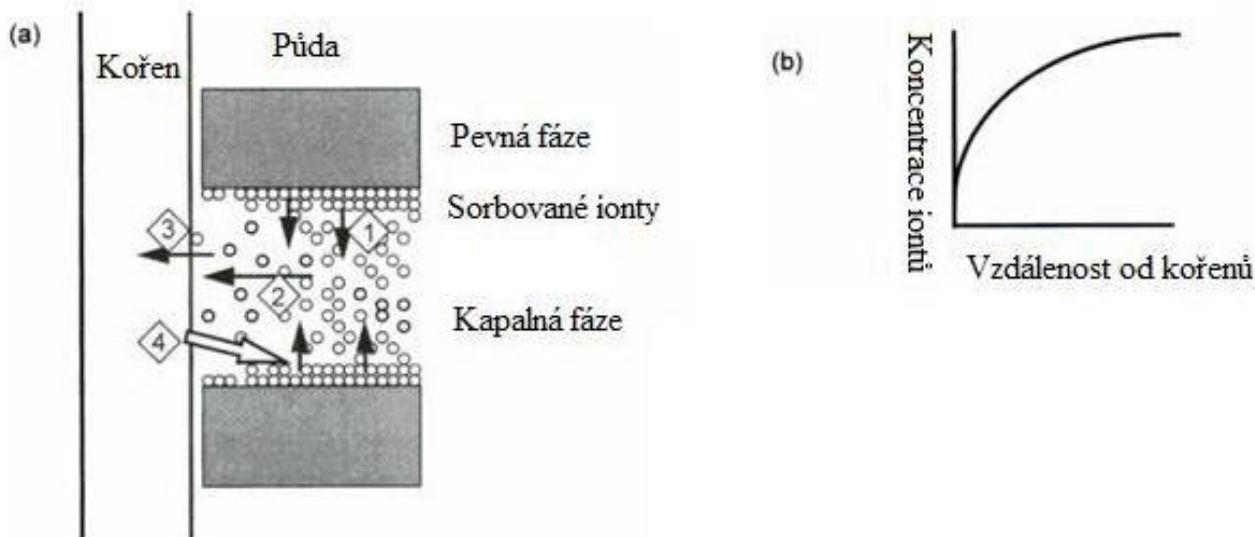
3.2.1.2 Příjem těžkých kovů kořenovým systémem rostlin a jejich akumulace v rostlině

Kořenový systém rostlin poskytuje stonkům a listům neustálý přísun vody a rozpuštěných minerálů. Upevňuje rostlinu v půdě, plní funkci vegetativního rozmnožování a plní funkci zásobárny živin. Růst a metabolismus kořenového systému rostlin je podporován fotosyntetickými procesy probíhajícími v listech. Produkty fotosyntézy jsou transportovány z listů floémem do kořenů, jež jsou při tomto procesu nápomocné [24].

Pohyb těžkých kovů k povrchu kořenů je závislý:

- *na difúzi kovů ve směru koncentračního gradientu, který vzniká úbytkem kovů v blízkosti kořenů,*
- *na záhytu kořeny - objem půdy je zmenšován objemem kořenů kvůli jejich růstu,*
- *na hmotnostním toku kovů, kdy jsou látky přenášeny z vnějšího prostředí ve směru potenciálního gradientu* [25].

Na Obr. 3-1 je znázorněn pohyb iontů kovů ke kořenům rostlin a snižování koncentrace na povrchu kořenů, které zvyšuje difúzi kovů povrchem kořenů a uvolňuje ionty z pevné fáze. Důsledkem odčerpávání iontů z pevné fáze jejich koncentrace asymptoticky klesá se zmenšující se vzdáleností od kořenů rostlin [26].



Obr. 3-1 a) Systém půda-kořen sestávající se z kořene obklopeného půdou; b) Koncentrační profil iontů kovů v rhizosféře. Procesy vztahované k sorpci živin jsou (1) uvolnění sorbovaných iontů do kapalné fáze - desorpce, (2) transport do kořenů v kapalné formě, (3) sorpce kořeny. Proces (4) symbolizuje uvolňování kořenových výpotků měnících rozpustnost iontů kovů vázaných v pevné fázi. Převzato z [26].

Rozpustné kovové ionty jsou přijímány kořeny buď cestou mimobuněčnou (apoplastický transport) anebo cestou vnitrobuněčnou (symplastický transport). *Apoplastický transport* je limitován vysokou kapacitou výměny kationtů buněčných stěn, výjimku tvoří pouze ionty kovů přenášené jako nekationaktivní cheláty kovů. *Symplastický transport* probíhá tehdy, pronikají-li ionty kovů buněčnou membránou, která má obvykle velký záporný potenciál (170 mV). Tento membránový potenciál vytváří velký elektrochemický gradient pro vnitřní pohyb kovových iontů. Většina kovových iontů proniká rostlinnými buňkami pomocí procesů závislých na energii. Tyto procesy mohou být zprostředkovány specifickými nebo generickými nosiči nebo kanály [27].

Neesenciální těžké kovy mohou účinně soutěžit o stejné transmembránové nosiče jako esenciální těžké kovy. Tato nedostatečná selektivita v transmembránovém transportu iontů částečně vysvětluje, proč neesenciální těžké kovy mohou pronikat buňkami i proti koncentračnímu gradientu [27].

Bylo prokázáno, že kořeny rostlin vykazují větší aktivitu při mobilizaci rozpustných stopových prvků vázaných na půdních částicích [24]. Aby mohly být specíe vázané na půdní částice přijímány a akumulovány v tělech rostlin, musí být nejprve mobilizovány z půdního roztoku. Mobilizace kovů z půdního roztoku může být uskutečněna několika různými způsoby [28].

Prvním způsobem je uvolnění kovů z půdního roztoku prostřednictvím tzv. *fytosideroforů* (viz. také kap. 3.3.1). Fytosiderofory jsou látky vylučované kořeny rostlin do rhizosféry a mají schopnost rozpouštět a chelátovat kovy vázané na půdních částicích. K těmto látkám se řadí aminokyseliny jako např. kyselina mugineová, kyselina avenová, které jsou syntetizovány v obilovinách, nebo nikotinamid [29,30]. Tyto látky jsou uvolňovány z kořenů rostlin v důsledku nedostatku železa a zinku a mohou z půdního roztoku mobilizovat Cu, Zn, a Mn [31]. Mnoho těžkých kovů je transportováno z půdy vazbou na ligandy s nízkou nebo naopak vysokou molekulovou hmotností, obzvláště sirmé ligandy (metalothieiny [32], glutathion a proteiny odvozené od glutationu, např. γ -glutamylcysteinyl-isopeptid [33,34]).

K látkám s nízkou molekulovou hmotností, které zlepšují rozpustnost a příjem kovových iontů díky svým chelatačním vlastnostem, se řadí tzv. *nízkomolekulární organické kyseliny* (*natural low molecular weight organic acids*, NLMWOA). Chelatační efekt organických kyselin klesá zhruba podle následujícího pořadí: kyselina citrónová > kyselina maleinová > kyselina octová. Díky vysokým konstantám stability komplexů těchto kyselin s kovy přítomnými v půdě, nedochází po jejich uvolnění do půdy ke zvýšení toxických vlastností kovů. NLMWOA mají také schopnost detoxikovat intracelulární těžké kovy jejich navázáním [35,36].

Za druhé, kořeny mohou redukovat kovové ionty vázané na půdní částice *reduktázami kovů*, jež jsou vázané v plazmatické membráně. Např. úbytek železa nebo mědi v hrachovitých rostlinách zvyšuje schopnost redukovat Fe(III) a Cu(II) za současného zvýšení příjmu Cu, Mn, Fe a Mn [37].

Za třetí, kořeny mohou rozpouštět těžké kovy *okyselením okolního prostředí* a uvolnit tak ionty vázané na půdních částicích do půdního roztoku. Při nízkých hodnotách pH jsou rozpouštěny usazeniny kovů a kovy vázané na půdní částice jsou tak uvolňovány do půdy. Podobný mechanismus byl pozorován při mobilizaci Fe u dvouděložných rostlin s nedostatkem Fe [38].

Jakmile kovové ionty proniknou do kořenů, mohou být buďto uloženy nebo přenášeny do nadzemních částí rostlinného těla. Velmi důležitou úlohu při uchovávání kovových specií má vakuola [39]. Ve vakuole jsou kovové ionty chelátovány buď organickými kyselinami (kyselina citrónová, kyselina maleinová) anebo enzymaticky syntetizovanými isopeptidy, obecně nazývanými fytochelatiny. Schopnost proteinů vázat kovy uložených v metalothioneinech zůstává stále neobjasněna [40].

3.2.2 Měď v rostlinách

Kvůli schopnosti vyskytovat se v různých oxidačních stavech (Cu^{2+} a Cu^+) se měď účastní mnoha fyziologických procesů probíhajících v rostlinách. Měď působí jako stavební prvek v řídicích proteinech a podílí se na transportu elektronů při fotosyntéze, mitochondriálním dýchání, odezvách na oxidativní stres anebo na metabolismu buněčných stěn [25, 41].

Měď působí také jako kofaktor mnoha enzymů, jako jsou např. superoxid dismutáza Cu/Zn (SOD), cytochrom c oxidáza. Na buněčné úrovni potom měď představuje základní prvek v mechanismu přenosu proteinů, při aerobní fosforylaci a mobilizaci železa. Proto je měď základním prvkem pro normální růst a vývoj rostlin. Není-li tento kov rostlinám dostupný, vykazují rostliny specifické symptomy nedostatku, jež jsou viditelné na mladých listech a reprodukčních orgánech [42].

3.2.2.1 Deficit mědi v rostlinách

Přesto, že měď je pro rostliny esenciálním prvkem, při vysokých koncentracích vykazuje extrémní toxické vlastnosti. Proto je nezbytné, aby koncentrace mědi v rostlinných buňkách dosahovala takového množství, které je nezbytné pro růst a vývoj rostliny. Průměrný obsah Cu v rostlinných tkáních je $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny [15]. Kritická koncentrace volných iontů v živném roztoku se pohybuje od 10^{-14} do 10^{-16} M. Při nedostatečném množství Cu ve svých tkáních doplňují rostliny chybějící množství Cu z půdního roztoku, kde se koncentrace Cu pohybuje v rozmezí od 10^{-6} – 10^{-9} M [42].

Nedostatek Cu v rostlinných tkáních se projevuje aktivací morfologických změn např. ve stavbě listů a kořenů. Bylo také zjištěno, že nedostatečné množství Cu má vliv na transport elektronů v I. fázi fotosyntézy (PS1). V této fázi dochází při nedostatečném množství Cu ke snížení vzniku plastocyaninu, který je hlavním ukazatelem nedostatku Cu [43, 44]. Na základě měření aktivity fotosyntézy rostlin kukuřice byl zjištěn vliv nedostatečného množství Cu na transport elektronů také ve II. fázi fotosyntézy (PS2). Nedostatek Cu snižuje aktivitu PS2 bez současné modifikace polypeptidové struktury v thylakoidových membránách. Cu může ovlivnit aktivitu fotosyntézy jako prostetická skupina polypeptidů účastnících se transportu elektronů [45].

Měď také ovlivňuje aktivitu enzymů zapojených do dalších životních procesů rostlin, které jsou obvykle spojeny s funkcí chloroplastů. Např. ve studii [46] byla potvrzena nevyhnutelnost přítomnosti tohoto kovu při zachování aktivity askorbát oxidázy. Ve studiích [47,48] bylo prokázáno, že přítomnost mědi je nutná pro správnou funkci aminoxidázy při navázání molekul kyslíku na enzymy v redukujícím médiu. Tento enzym katalyzuje aerobní deaminaci polyenů, při které vznikají odpovídající aldehydy, amoniak a peroxid vodíku (3)



Ve studii [49] bylo zjištěno, že měď významně zpomaluje růst rostliny ředkve seté (*Raphanus sativus* L.). Stejně tak měď ovlivňuje aktivitu kationaktivní a anionaktivní peroxidázy, jež má vliv na růst kořenů.

3.2.2.2 Toxicita mědi v rostlinách

Redoxní vlastnosti, které činí z mědi esenciální prvek, též přispívají k její inherentní toxicitě. Redoxní přeměny mezi Cu^{2+} a Cu^+ mohou katalyzovat vznik vysoce toxických hydroxylových radikálů, s následným poškozením DNA, lipidů, proteinů a dalších biomolekul [50]. Proto může měď při vysokých koncentracích vykazovat extrémně vysokou toxicitu, která se projevuje např. chlorózou nebo nekrózou, zakrněním, odbarvením listů a inhibicí růstu kořenů [25,51].

Na buněčné úrovni mohou toxické vlastnosti mědi pocházet z jejího navázání na sulfhydrylové skupiny proteinů, čímž dochází k inhibici aktivity enzymů nebo funkce proteinů. Dále může být toxicita mědi vyvolána nedostatkem jiných esenciálních iontů, poškozením procesů buněčného transportu anebo oxidativním zničením [48,52].

Nadbytek mědi může v rostlinách způsobit oxidativní stres a následovně zvýšit reakci antioxidantů v důsledku zvyšujícího se vzniku vysoce toxických volných radikálů kyslíku. Bylo zjištěno, že nadbytek mědi ve tkáních ředkve seté (*Raphanus sativus* L.) vede ke zvýšení akumulace prolinu a ke změnám v obsahu proteinů a aktivity enzymů [53]. Reakce antioxidantů na nadbytek Cu byla pozorována v listech a kořenech, v závislosti na koncentraci Cu, tak i na době expozice. Bylo zjištěno, že na nadbytek Cu v rostlinných tkáních reaguje i askorbát-glutathionový cyklus [54,55].

3.2.2.3 Příjem mědi, její distribuce a akumulace v rostlinách

Mobilita Cu je kvůli jejím silným vazbám na organickou hmotu a další půdní koloidy velmi omezena a frakce celkové mědi dostupné pro rostliny je obvykle nízká. Proto není celková koncentrace mědi v půdě obvykle vztažena na příjem rostlinou a přídavky mědi do půdy (obzvláště půdy s vysokým obsahem organické hmoty, aplikace materiálů s vysokým obsahem Cu – splaškové kaly, odpady z koželužen) nemají často vliv na zvýšení koncentrace tohoto kovu v rostlinných tkáních [56]. Ve studii [57] bylo ale prokázáno, že koncentrace mědi v nadzemní části rostliny ředkve seté (*Raphanus sativus* L.) vzrůstá se zvyšující se koncentrací Cu v půdě po použití chlévské mrvy. Koncentrace mědi v rostlinných tkáních ale nedosahuje hodnot, které by byly pro rostlinu toxické.

Podle studie [58] je míra přenosu Cu mezi půdou a rostlinou několikanásobně nižší než v případě Zn, Cd a Ni v závislosti na tom, zda byly kovy přidány v podobě anorganických solí do písčitých půd anebo byly součástí splaškových kalů aplikovaných na jemnozrnné půdy. Koncentrační faktor mědi ve vodném porostu je nižší než v případě Cd, Hg, Pb, Zn nebo Ni [59].

Příjem mědi je částečně nezávislý na pH půdy (zejména pro $\text{pH} > 5,5$) [60,61]. Naopak, příjem mědi řasami z vodného prostředí je jev velmi závislý na pH. Tento fakt byl prokázán při experimentech na modrozelené řase *Chroococcus parisi* [62] a *Nostoc muscorum* [63], kdy množství přijaté mědi znatelně vzrůstá se zvyšujícím se pH v rozmezí 4 – 7.

Mobilita Cu v půdě je též omezena. Velké množství mědi absorbované rostlinami je ukládáno v kořenech rostlin, jak dokazují experimenty prováděné s rostlinami *Lolium perenne* [64], *Mimulus guttatus* [65], *Spinacia oleracea* [66] a *Avena sativa* [67]. Množství mědi absorbované v rostlinách a ukládání v jednotlivých částech je závislé také na způsobu pronikání tohoto kovu do rostliny. Ve studii [68] bylo prokázáno, že větší množství Cu bylo absorbováno listy než kořeny rostliny *Raphanus sativus* L. v důsledku aplikovaného roztoku Cu buď na listy rostliny, nebo v půdním roztoku.

3.3 METODY EXTRAKCE PŮD

Stanovení biodostupnosti těžkých kovů je velmi důležitým krokem při určení rizik spojených s kontaminací půdního ekosystému těmito kovy. Toxicita nebo bioakumulace těžkých kovů je předpovídána z korelací koncentrací těchto iontů v půdním roztoku, koncentrací volných iontů v půdním roztoku anebo z vyluhovatelných frakcí [69]. Ačkoliv se existující legislativa či směrnice týkající se limitních koncentrací těžkých kovů obsažených v půdách zabývá především určením celkové koncentrace kovů v půdách, většina z těchto frakcí není pro rostliny, mikroorganismy nebo půdní faunu dostupná [70].

Pro zjištění podílu těžkých kovů vázaných v různých formách a fázích půdního systému, jejich dostupnosti a mobility jsou od 70. let 20. století využívány extrakční postupy [71]. Mobilita stopových prvků, jejich biodostupnost a relativní ekotoxicita pro rostliny závisí na specifických chemických formách, tzv. frakcích, nebo na způsobu jejich navázání na půdní částice. Stanovení těchto parametrů je proto z hlediska určení toxických účinků mnohem důležitější než určení celkové koncentrace kovů v půdním systému [72].

Na základě definice IUPAC se termínem „*frakcionace*“ rozumí proces klasifikace analytu nebo skupiny analytů v určitém vzorku podle jejich fyzikálních (velikost, rozpustnost) a chemických (vazba, reaktivita) vlastností [73]. Počátkem 80. let 20. století A. Tessier ve své práci [74] formuloval frakcionační postup, v němž rozdělil stopové prvky do pěti frakcí:

- *Iontově výměnná frakce* charakterizuje podíl stopových prvků sorbovaných na povrchu anorganických solí, vyměnitelných z povrchu půdních koloidů změnou koncentrace bivalentního iontu.
- *Frakce vázaná na uhličitany* označuje podíl těžkých kovů vázaných na uhličitanech. K uvolnění této frakce dochází při změně acidobazických podmínek v prostředí.
- *Frakce vázaná na oxidy Fe a Mn* popisuje podíl toxických kovů vázaných na oxidy železa a manganu, jež jsou termodynamicky nestabilní za anodických podmínek a uvolňují těžké kovy do roztoku např. změnou oxidačně-redukčního potenciálu.
- *Frakce vázaná na organickou hmotu* určuje podíl toxických kovů vázaných v organické hmotě (živé organismy, usazeniny, atd.). Prvky jsou uvolňovány v důsledku degradace organických látek.
- *Zbytková frakce* představuje podíl prvků vázaných v silikátové matici na primární a sekundární minerály. V přírodě nejsou ale prvky z této frakce uvolňovány do vodného prostředí [74,75].

Frakce kovů mohou být také identifikovány a kvantifikovány třemi způsoby. *Funkčně*, kdy v tomto případě mohou být frakce asimilovány rostlinami, za druhé *operativně*, tzn. podle způsobu nebo činidla použitého k jejich extrakci a za třetí *specificky*, jako určité komponenty nebo oxidační stavy kovů. Druhý způsob identifikace frakcí zahrnuje jednorázové a sekvenční extrakce [76]. Jednorázové extrakční metody probíhají za použití jednoho činidla a sekvenční extrakce zahrnují více extrakčních kroků s činidly o různé účinnosti. Jednotlivé kovy v připravených extraktech jsou následně stanoveny vhodnými instrumentálními metodami, nejčastěji AAS, ICP-AES nebo ICP-MS.

3.3.1 Jednorázové extrakce

Jednorázové extrakce [77,78] jsou často aplikovány díky své jednoduchosti a snadnému provedení s využitím běžně přístupných extrakčních činidel. Navážka vysušeného vzorku půdy umístěná ve vhodné nádobce je smíchána s extrakčním činidlem v určitém poměru a míchána nebo třepána při konstantní teplotě po určitou dobu. Ze získaných půdních výluhů je filtrací oddělen supernatant, v němž jsou pomocí instrumentálních metod stanoveny přítomné prvky [79].

Jako jednorázová extrakční činidla jsou často využívány roztoky chelátů (EDTA [80,81], EDDS [82,83], DTPA [84,85]), neutrální soli (CaCl_2 [86,87,88,89], NH_4Cl [90,91], NH_4NO_3 [86]), minerální kyseliny o různých koncentracích a roztoky pufrů (NH_4OAc). Nově jsou používány extrakční postupy s roztoky snadno degradovatelných a slabých fyto toxických sloučenin (např. kyselina nitrilotrioctová, NTA) anebo přírodních nízkomolekulárních organických kyselin [78,92], kterým byla věnována kapitola 3.2.1.2.

Jednorázové extrakce s 0,1 HCl, směsí HCl a H_2SO_4 a EDTA byly poprvé použity v 50. a 60. letech 20. století pro stanovení koncentrace esenciálních kovů v půdách. Při určení úrovně kontaminace půdy byly jednostupňové extrakční postupy použity v 70. letech 20. století [93].

V České republice byl jako jednorázová extrakční technika legislativně přijat výluh 2 M kyselinou dusičnou [94,95], která extrahuje všechny zmiňované frakce kovů kromě nerozpustné reziduální frakce a slouží k odhadu míry kontaminace, a lučavkou královskou [94].

3.3.2 Sekvenční extrakční postupy

Sekvenční neboli *postupné extrakce* (SEP) [74,96,97,98] jsou standardními metodami využívanými pro zjištění chemických frakcí jak v půdách, tak v sedimentech. Obvykle zahrnují 3 až 8 kroků, při kterých jsou postupně aplikována extrakční činidla se zvyšující se účinností. Postup vyluhování je shodný s postupem při jednorázových extrakcích. Po první extrakci je směs odstředěna, v supernatantu jsou stanoveny přítomné kovy a pevný zbytek je loužen v dalším kroku silnějším činidlem. Chemické formy prvků obvykle stanovované SEP jsou klasifikovány jako výměnné frakce (biodostupné a mobilní), frakce vázané na uhličitany, oxidy a organickou hmotu [93].

Během posledních desítek let bylo vypracováno velké množství extrakčních postupů [74,99], ale získané výsledky byly však zřídka porovnatelné vzhledem k odlišným extrakčním postupům. Některé z těchto metod byly stále široce používány, žádná z nich ale nebyla uznána vědeckou společností. Proto byl v roce 1987 *Komisi evropských komunit (European Community Bureau of References – BCR)* započat program, ve kterém byla sjednocena metodologie používaná při sekvenčních extrakčních postupech aplikovaných při stanovení těžkých kovů v půdách a sedimentech [100] a ve kterém byly také definované certifikované referenční materiály [101]. Tento postup byl s úspěchem použit při analyzování velkého množství matric, jako jsou např. sedimenty pocházející z jezer, lagun a moří, splaškové kaly, půdy a místa kontaminovaná průmyslem [102,103,104].

3.3.3 Extrakční činidla

Nejzávažnějším hlediskem při volbě rozpouštědla, jehož se má použít pro určitou extrakci, je pravděpodobně extrahovatelnou oddělovaného prvku. Má-li se snadno dosáhnout oddělení, musí být rozdělovací poměr rozpuštěných látek velký. Ze stejného důvodu musí být extrakce ostatních rozpuštěných látek malá [105].

Extrakční činidla mohou být rozdělena do několika skupin podle jejich účinnosti při extrakci specifických kovových frakcí:

- *roztoky neutrálních solí, alkálií a běžná rozpouštědla*: voda, vodné roztoky solí (CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), NH_4Ac , hořečnaté soli, BaCl_2);
- *redukční činidla*: askrobát sodný, hydrogensířičitan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$);
- *slabé kyseliny*: zředěné roztoky kyseliny octové a citrónové;
- *silná chelatační činidla*: EDTA, DTPA (občas v kombinaci s triethylaminem nebo kyselino askorbovou), NTA;
- *činidla obsahující kyselinu a její sůl*: amonium oxalát-kyselina oxalová, acetát sodný-kyselina octová, a další;
- *zředěné silné kyseliny*: HNO_3 , HCl , směs HCl a H_2SO_4 (Mehlich I);
- *koncentrované silné kyseliny*: HNO_3 , HCl , $\text{HNO}_3 + \text{HF}$, aqua regia [93].

Z počátku byla využívána extrakční činidla, která uvolňují z pevné fáze velké množství kovů, jako chelatační činidla (EDTA, DPTA, NTA) nebo silné kyseliny (HNO_3 a HCl). Zavedení nových instrumentálních metod s velmi nízkým limitem detekce, díky kterým lze stanovit kovy v roztocích o nízkých koncentracích, umožnilo použít pro extrakci kovů z půd slabší činidla jako např. 0,01 M CaCl_2 a 1,0 M NH_4NO_3 . Přesto jsou i nadále používány pro extrakci kovů z půd základní postupy jako rozpouštění, chelatace, desorpce, iontové výměny a redukce nebo oxidace [93].

Při studiích napodobujících příjem kovů rostlinou a při vyhodnocení úrodnosti a nedostatků půdy jsou používána slabá činidla (zředěné roztoky CaCl_2 nebo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), EDTA, DTPA a kyselina octová jsou často používány při studii fyzikálně-chemických procesů probíhajících v půdě (např. mobilita těžkých kovů). Chlorid amonný a šťavelany jsou s výhodou využívány při rozlišení litogenního nebo antropogenního původu prvků v půdě [81].

3.4 TECHNIKA DIFÚZNÍHO GRADIENTU V TENKÝCH FILMECH

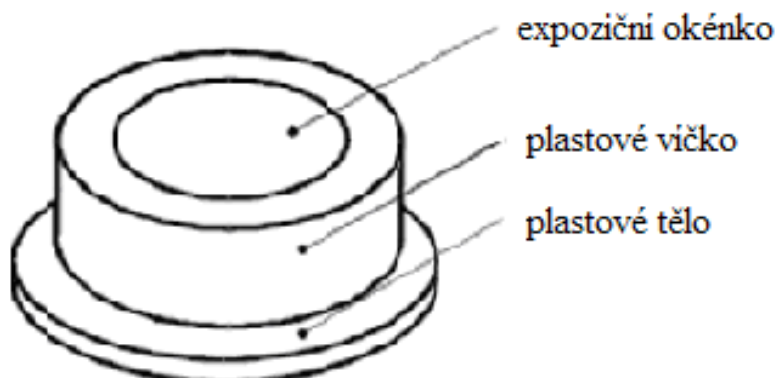
Technika difúzního gradientu v tenkém filmu (*Diffusive Gradients in Thin Films Technique, technika DGT*) je relativně novým přístupem pro stanovení labilních specií kovů in situ ve sladkovodních a mořských systémech, v půdách a sedimentech. Objevena a poprvé popsána byla tato technika v roce 1993 W. Davisonem a H. Zhang [106].

Výhodou techniky DGT je schopnost prekoncentrace analytů in situ, jež dává výbornou citlivost stanovení (10^{-12} mol.l⁻¹) a zabraňuje problémů spojeným s kontaminací vzorků. Dále poskytuje časové průměrné koncentrace, které jsou ideální pro kontrolní monitorování. Lze ji také použít pro speciální analýzu se zaměřením na kovové specie nebo také pro odhad biodostupnosti kovů v půdách [107].

Aby bylo možné stanovit technikou DGT co nejvíce kovových specií přítomných v životním prostředí, je nutné použít vhodný sorpční materiál. Nejvíce využívaným sorbentem v technice DGT je iontoměnič Chelex 100 (styrendivinylnbenzenový kopolymer s funkčními skupinami kyseliny iminodioctové), který je selektivní např. pro Cd²⁺, Cu²⁺ nebo Ni²⁺. Pro stanovení fosfátů jsou využívány oxidy železa a pro stanovení sulfidů jsou využívány minerální fáze (jodid stříbrný v sorpčním gelu) [106].

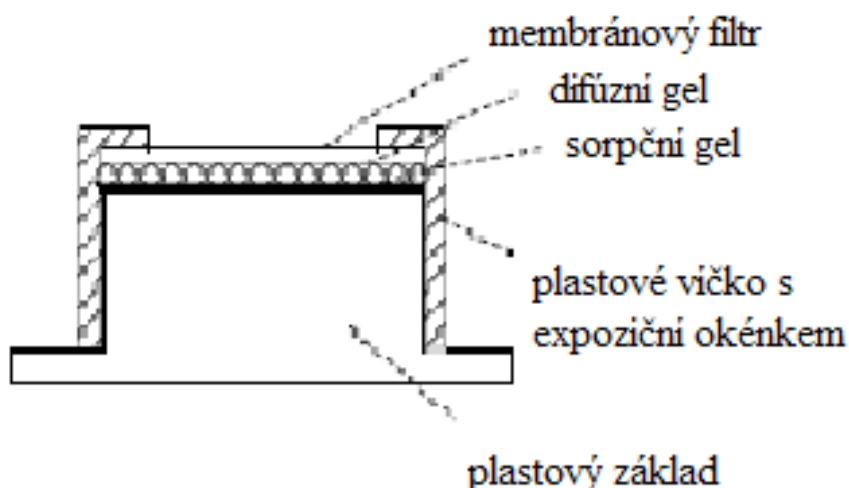
3.4.1 Vzorkovací jednotka DGT

Vzorkovací jednotka používaná v technice difúzního gradientu v tenkém filmu ke stanovení labilních specií má tvar pístu (Obr. 3-2).



Obr. 3-2 Vzorkovací jednotka DGT – celkový pohled. Upraveno a převzato z [108].

Na plastovém pístovém těle jsou uloženy dvě vrstvy polyakrylamidového hydrogelu a membránový filtr. Spodní vrstva označovaná jako *sorpční gel* je tvořena polyakrylamidovým hydrogelem obvykle o tloušťce 0,4 mm obsahujícím sorbenty s navázanými vhodnými funkčními skupinami. Druhá vrstva je tvořena také polyakrylamidovým hydrogelem s přesně definovanou tloušťkou (obvykle 0,8 mm) obsahující 95 % vody, který bývá označován jako *difúzní gel*. *Membránový filtr* (velikost pórů 0,45 μm) chrání difúzní gel před mechanickým poškozením. Vše je uzavřeno plastovým víčkem s expozičním okénkem o průměru 2 cm (Obr. 3-3) [109].



Obr. 3-3 Uložení polyakrylamidových gelů ve vzorkovací jednotce DGT.
Převzato z [108].

3.4.2 Princip techniky difúzního gradientu v tenkém filmu

Technika DGT je založena na difúzi specifických látek vrstvou difúzního gelu a jejich následné imobilizaci v gelu sorpčním. Při aplikaci jednotky DGT do sledovaného prostředí se mezi difúzním gelem a vnějším roztokem vytváří *mezní difúzní vrstva* (*diffusive boundary layer, DBL*), jejíž tloušťka δ souvisí s intenzitou promíchávání roztoku v okolí sondy. Ionty kovů z vnějšího roztoku pronikají touto mezní vrstvou molekulovou difúzí. Velikost pórů polyakrylamidového hydrogelu dosahuje hodnoty 2 – 5 nm, takže hydratované ionty kovů s průměrem 0,2 – 0,3 nm a menší komplexy s organickými ligandy do gelu snadno difundují. Po velmi krátké době se v difúzním gelu ustaví lineární koncentrační gradient (Obr. 3-4) [107].

3.4.2.1 Princip stanovení labilních specií kovů ve vodném prostředí.

Tok iontů difúzní vrstvou je dán I. Fickovým zákonem difúze (4):

$$F = D \frac{dC}{dx} \quad (4)$$

kde F je tok iontů kovů difúzní vrstvou ($\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$), D je difúzní koeficient ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) a dC/dx je koncentrační gradient (mol.cm^{-4}).

Jestliže difúzní koeficienty iontů přítomných v gelu jsou shodné s difúzními koeficienty iontů ve vodě, lze I. Fickův zákon difúze napsat ve tvaru

(5(5):

$$F = \frac{D(C_b - C')}{(\Delta g + \delta)} \quad (5)$$

kde C_b je koncentrace iontů ve vnějším roztoku (mol.cm^{-3}), C' je koncentrace iontů kovů na rozhraní sorpčního a difúzního gelu (mol.cm^{-3}), Δg je tloušťka difúzní vrstvy a δ je tloušťka difúzní hraniční vrstvy, která vzniká mezi vrstvou difúzního gelu a vnějším roztokem.

Ustaví-li se rychle rovnováha při sorpci volných iontů na iontoměniči, potom je koncentrace C' rovna nule za předpokladu, že iontoměnič nebyl zcela nasycen. V dobře míchaných roztocích je tloušťka difúzní hraniční vrstvy δ (cm) zanedbatelně malá ve srovnání s tloušťkou difúzní vrstvy Δg (cm). Rovnici (5) tak lze napsat ve zjednodušeném tvaru (6):

$$F = \frac{DC}{\Delta g} \quad (6)$$

Hmotnostní tok iontů kovů (7) je definován jako množství iontů M (g) prošlé danou plochou exponované části gelu A (cm^2) za jednotku času t (s):

$$F = \frac{M}{At} \quad (7)$$

Při aplikaci v praxi jsou jednotky DGT exponovány po určitý čas t . Množství kovu M navázané během doby expozice na iontoměnič může být po vysušení gelu stanoveno přímým měřením nedestruktivními technikami, např. PIXE (částicemi indukovaná rentgenová emise) nebo laserovou ablací ve spojení s ICP-MS. Častěji jsou ionty eluovány ze sorpčního gelu známým objemem elučního činidla, V_e . Koncentrace iontů v eluátu C_e je stanovována obvykle pomocí atomové absorpční spektrometrie (*atomic absorption spectrometry* – AAS) nebo optické emisní či hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry* – ICP-OES, *mass spectrometry* – ICP-MS).

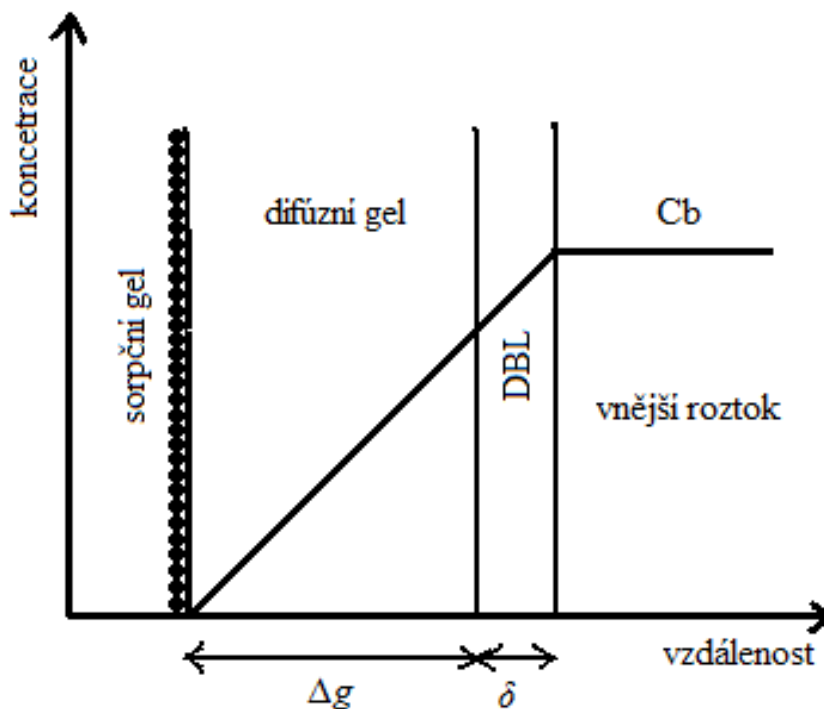
Podíl eluovaných iontů kovů z celkového množství navázaných iontů je označován jako *eluční faktor*, f_e . Množství prošlých iontů je potom dáno vztahem (8), kde V_g je objem sorpčního gelu (cm^3):

$$M = \frac{C_e(V_g + V_e)}{f_e} \quad (8)$$

Spojením rovnic (6) a (7) je dán vztah pro stanovení koncentrace ve vnějším roztoku, C_b (9):

$$C_b = \frac{M\Delta g}{DA t} \quad (9)$$

kde M je množství kovů akumulovaných v sorpčním gelu (g), Δg je tloušťka difúzní vrstvy (obvykle 0,93 mm), D je difúzní koeficient při dané teplotě měření ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), A je plocha exponované části gelu ($3,14 \text{ cm}^2$) a t je doba expozice jednotky DGT (s) [106,107].



Obr. 3-4 Schematické znázornění koncentrace volných specií iontů v hydrogelu při kontaktu s vnějším roztokem. Převzato a upraveno z [106].

3.4.2.2 Aplikace techniky DGT do půd a sedimentů

Základní princip vytvoření koncentračního gradientu v tenkém filmu difúzního gelu, vazbě sledovaných kovů v sorpčním gelu a jejich následné stanovení je platný také pro aplikace techniky DGT v sedimentech a půdách. Interpretace získaných výsledků není ovšem tak jednoznačná jako je tomu v případě aplikace techniky DGT do vodných systémů.

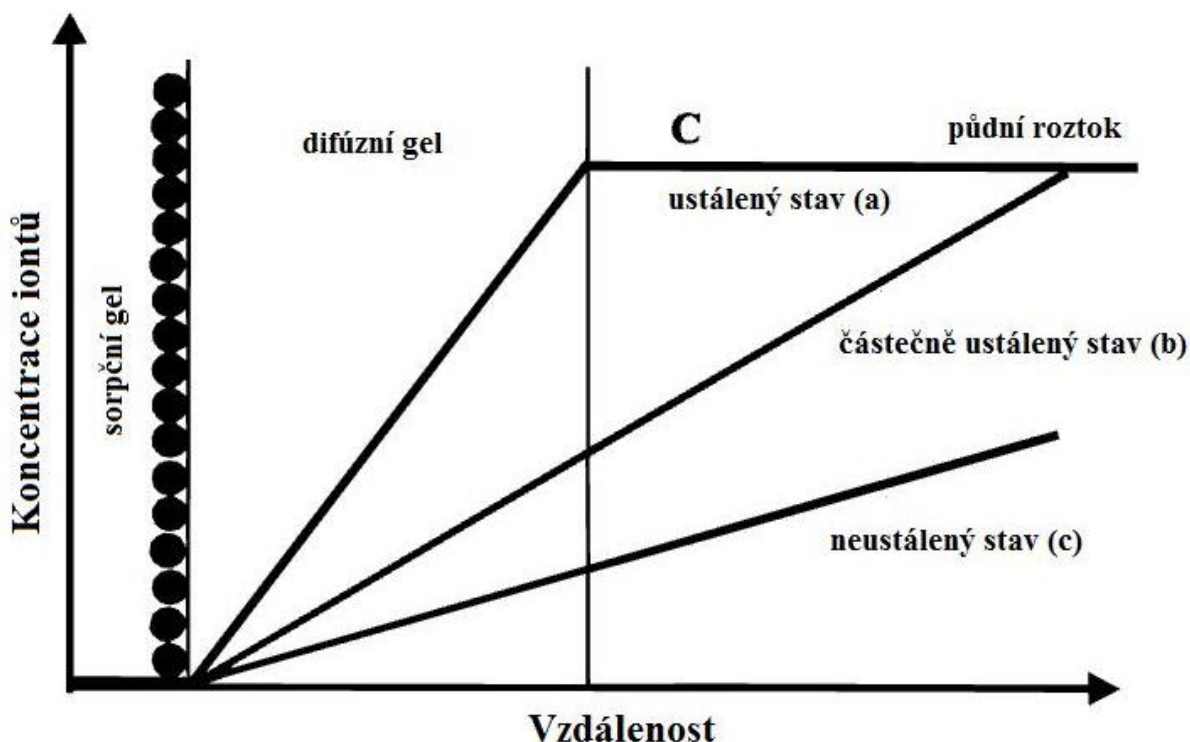
Vodné systémy představují velmi dobře míchané roztoky, ve kterých je koncentrace kovů v blízkosti vzorkovací jednotky DGT konstantní. Půdní roztok nebo pórová voda sedimentů představuje objemově omezený a nemísitelný systém, v němž může docházet v blízkosti vzorkovací jednotky DGT ke změnám v koncentraci kovů, především k poklesu této koncentrace.

Aby bylo možné výsledky správně interpretovat, je nutné dostatečně pochopit pochody probíhající v půdách a sedimentech. Jsou to především procesy spojené s uvolňováním kovů z pevné fáze a jejich difúze půdním roztokem nebo pórovou vodou sedimentů.

Jsou-li ionty z roztoku odstraňovány jednotkou DGT, potom mohou být zpět do roztoku doplňovány z pevné fáze. Míru doplňování iontů kovů z pevné fáze do půdního roztoku či pórové vody sedimentů je možné vyjádřit pomocí *poměru* R [69,70,110,111], vyjádřeného rovnicí (10):

$$R = \frac{C_{DGT}}{C_{pw}}, \quad 0 < R < 1 \quad (10)$$

kde C_{DGT} je koncentrace kovových specií zjištěná technikou DGT (mol.l^{-1}) a C_{pw} je koncentrace labilních specií kovů v půdním roztoku či pórové vodě sedimentů stanovená nezávislou analytickou metodou (mol.l^{-1}). Hodnotu R lze získat experimentálně a využít ji při vyhodnocení jednotlivých případů znázorněných na Obr. 3-5.



Obr. 3-5 Schematické znázornění koncentračního gradientu ve vzorkovací jednotce DGT a jejím okolí při aplikaci do půd či sedimentů. Převzato a upraveno z [69].

Nedochází-li v systému k uvolňování kovů z pevné fáze do půdního roztoku či pórové vody sedimentů, nastává v systému tzv. *neustálený stav* (Obr. 3-5, (c)). V tomto případě, v literatuře [69] označovaném jako „*unsustained case*“ závisí hodnota R ($R = R_{diff}$) na difúzních koeficientech látek přítomných v půdním roztoku nebo pórové vodě a na době expozice. Numerické vztahy potřebné k vyjádření koncentračních gradientů i koncentrace C_{pw} jsou definovány dle II. Fickova zákona difúze (11)

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (11)$$

Je-li v roztoku koncentrace iontů vyrovnávána tak, aby v blízkosti jednotky DGT byla tato koncentrace relativně konstantní, bývá tento stav označován jako *ustálený stav* („*sustained case*“ [69], Obr. 3-5, (a)). Hodnotu poměru R v tomto případě dosahuje hodnot $R > 0,95$. Zjištěná koncentrace DGT tak může být vyjádřena jako koncentrace labilních kovových specií v půdním roztoku či pórové vodě a pro její výpočet je tak možné využít I. Fickův zákon difúze, vyjádřeného vztahem (4).

Oba popsané způsoby chování systému při aplikaci vzorkovací jednotky DGT jsou mezními stavy. Protože po aplikaci sondy DGT dochází ke změnám počátečních podmínek, může se ustálený stav změnit na *stav částečně ustálený* („*partially sustained case*“ [69], Obr. 3-5, (b)). I když koncentrace kovů v blízkosti jednotky DGT aplikované do půdy nebo sedimentu postupně klesá, je systém obvykle schopný do určité míry úbytek kovů tlumit a vyrovnávat jejich uvolňováním z pevné fáze. Hodnota koncentrace zjištěné technikou DGT, C_{DGT} , je v tomto případě považována za aktuální koncentraci na rozhraní vzorkovací jednotky a okolního systému, C_a (12) [108]:

$$C_{DGT} = C_a = \frac{M\Delta g}{DtA} \quad (12)$$

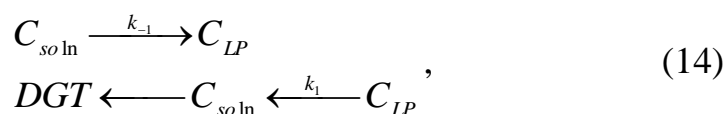
Pokud ve sledovaném systému nedochází k uvolňování kovů z pevné fáze konstantní rychlostí, je koncentrace C_{DGT} chápána jako časově průměrná hodnota koncentrace C_a podle tohoto vztahu (13) [108]:

$$C_{DGT} = \frac{1}{t} \int_{t_i=0}^t C_a(t_i) dt \quad (13)$$

3.4.2.3 DIFS (DGT Induced Flux in Soil and Sediments), efektivní koncentrace C_E

Ke studiu časové závislosti interakcí, probíhajícími mezi vzorkovací jednotkou DGT a půdou či sedimentem v 1D nebo 2D provedení, byl vypracován matematický model *DIFS (DGT Induced Flux in Soil and Sediment)*. Tento model popisuje současně difúzi kovových iontů v půdním roztoku v určitém čase a místě a zároveň i odpověď systému na indukované koncentrační gradienty [70,112,113].

Výměna kovových iontů mezi půdním roztokem a pevnou fází se řídí I. zákonem kinetiky, vyjádřeného vztahem (14).



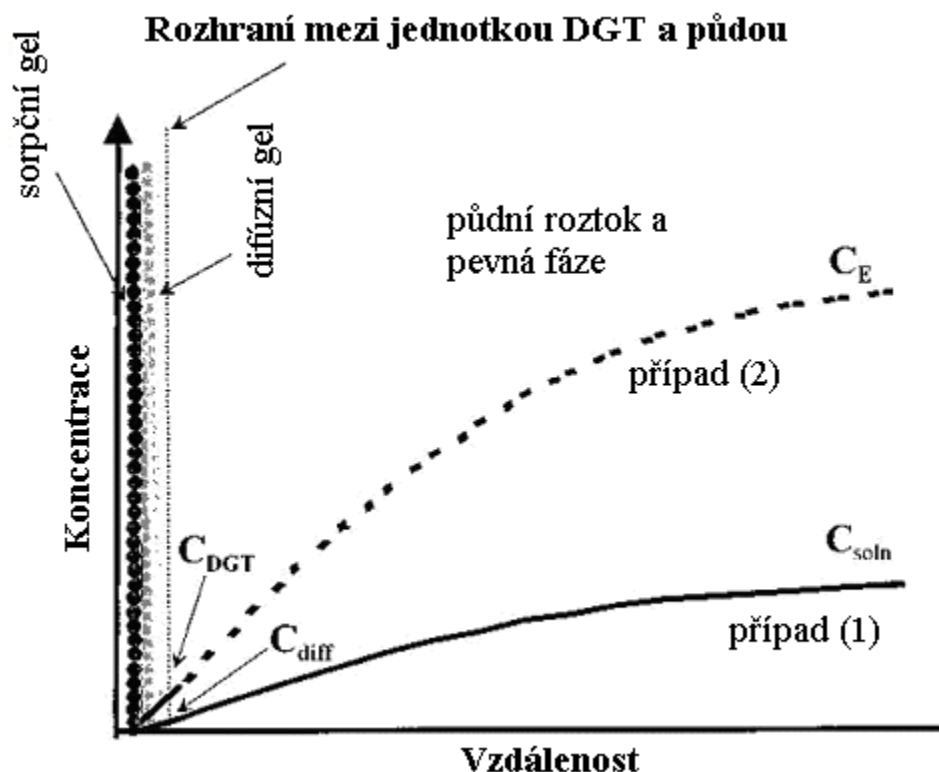
kde C_{soln} a C_{LP} jsou koncentrace iontů kovů v půdním roztoku a fáze obsahující labilní kovové částice. Rychlost doplňování iontů, daná vztahem $k_{-1}C_{LP}$, je tedy závislá na rychlostní konstantě určující rychlost přenosu částic z pevné fáze do roztoku, k_{-1} , tak na koncentraci labilních částic na rozhraní pevná fáze-roztok [7070112].

Vstupními hodnotami pro tento model nejsou jenom výsledky získané technikou DGT, ale i řada dalších parametrů jako např. porózita půdy, tloušťka difúzní vrstvy nebo difúzní koeficienty iontů v difúzní vrstvě. Řešením modelu DIFS je možné odhadnout rychlostní konstanty výměnných procesů a distribučních koeficientů kovů ve sledovaných systémech [11270,113].

Model DIFS se využívá pro výpočet *efektivní koncentrace*, C_E [70], která udává koncentraci kovových iontů přítomných v půdním roztoku a zároveň koncentraci iontů uvolněných do půdního roztoku z pevné fáze. Efektivní koncentraci lze vyjádřit následující rovnicí (15).

$$C_E = \frac{C_{DGT}}{R_{diff}}, \quad (15)$$

kde C_{DGT} je koncentrace kovových specií zjištěná technikou DGT (mol.l^{-1}), R_{diff} je poměr koncentrace kovových iontů v půdním roztoku, C_{soln} , a koncentrace na rozhraní jednotky DGT a půdního roztoku, C_{diff} (**Obr. 3-6**). Efektivní koncentrace C_E vyjadřuje koncentraci kovových specií, která by měla být přítomná v půdním roztoku, aby bylo možné doplnit úbytek těchto specií difundujících do vzorkovací jednotky DGT [70]. Jestliže rostlinný příjem lokálně snižuje koncentraci iontů v půdě, efektivní koncentrace je přímo vztažena k tomuto příjmu. V tomto případě, kdy je transport kovových specií limitován absorpčními schopnostmi rostliny, jsou ionty kovů doplňovány jak z půdního roztoku, tak i z pevné fáze půdy. Proto stanovení C_E umožňuje vyhodnotit potenciální znečištění analyzovaných půd [70].



Obr. 3-6 Schematické znázornění koncentračního gradientu ve vzorkovací jednotce DGT a jejím okolí při aplikaci do půd či sedimentů. Případ (1) popisuje doplňování iontů prostou difúzí, případ (2) představuje stav, kdy jsou ionty kovů do blízkosti jednotky DGT doplňovány z půdního roztoku. Převzato a pozměněno z [70].

3.4.3 Porovnání techniky difúzního gradientu v tenkém filmu s extrakčními postupy při hodnocení biodostupnosti kovů z půd

Ve studii [114] byla použita technika DGT ke stanovení kadmia, olova a zinku v rhizosféře čtyř rozdílných rostlinných druhů. Byl též sledován vliv chelatačních činidel EDTA a EDDS na mobilitu těchto prvků. Bylo zjištěno, že technika difúzního gradientu v tenkém filmu je schopná registrovat velmi malé koncentrace prvků v rhizosféře podle jednotlivých rostlinných druhů anebo chemického ošetření půdy.

Vyhodnocením biodostupnosti Zn pomocí extrakčních postupů a techniky DGT se zabývá práce [115]. V tomto případě byla použita extrakční činidla 0,01 M CaCl_2 a 0,43 M HNO_3 a aqua regia. Množství zinku extrahované chloridem vápenatým velmi dobře korelovalo s množstvím zinku nalezeným pomocí techniky DGT. Součástí této studie bylo také porovnání obsahu zinku v organizmech (tráva, salát a vlíčí bob) a půdě. Dobré korelace byly zjištěny mezi koncentrací Zn stanovenou v trávě a salátu, efektivní koncentrací Zn stanovenou technikou DGT, koncentrací Zn extrahovaného pomocí CaCl_2 a obsahem zinku v pórové vodě analyzovaných půd. Ze zjištěných výsledků

plyne, že technika DGT je rovnocennou metodou pro stanovení biodostupnosti zinku použitým extrakčním postupům.

Stejně závěry potvrzují i výsledky zjištěné v pracích [116] a [117]. Bylo potvrzeno, že technika DGT je schopná stanovit množství biodostupného zinku v mírně kontaminovaných půdách použitých v těchto experimentech. Efektivní koncentrace C_E stanovená pomocí techniky DGT koreluje s celkovou koncentrací tohoto prvku v půdním roztoku, tak i v kořenech sledované rostliny *Lactiva sativa* cp Appia.

Technika DGT byla také použita při vyhodnocení biodostupnosti mědi přijímané rostlinami *Elsholtzia splendens* a *Silene vulgaris* [118]. Koncentrace zjištěná v obou rostlinách velmi dobře korelovala s frakcí Cu extrahovatelnou NH_4NO_3 , s množstvím mědi přítomným v půdním roztoku nebo efektivní koncentrací stanovenou pomocí techniky DGT.

Ve studii [70] byl proveden experiment, při kterém byla porovnávána efektivní koncentrace mědi nalezená technikou DGT, koncentrace stanovená extrakcí půdy EDTA a koncentrace volných iontů Cu^{2+} , stanovená voltametriky, v půdním roztoku s obsahem mědi nalezeným v rostlinách. Výsledky získané technikou DGT nejlépe korelovaly s množstvím kovu obsaženým v rostlině *Lepidium heterophyllum* v porovnání s dalšími použitými postupy. Tento fakt dokazuje, že technika DGT relativně dobře simuluje proces příjmu těžkých kovů kořeny rostlin.

Ve studii [69] byla porovnána efektivní koncentrace mědi a zinku s příjmem těchto kovů výhonky jílku (*Lolium perenne*). Bylo opět potvrzeno, že pomocí techniky DGT lze lépe určit množství přijatých kovů do roštin než analyzováním půdního roztoku. Některé rostliny přijaly svými tkáněmi větší množství kovů, než bylo stanoveno technikou DGT. Tento rozdíl mohl být způsoben místními rozdíly v mitotických podmínkách, např. světlo, teplota vody a přítomné nutrienty.

Studie [119] ukazuje, že i přesto, že byly zjištěny dobré korelace mezi koncentrací zinku obsaženého v travách a salátu a efektivní koncentrací zjištěnou technikou DGT, v případě včelího bobu nebyly tyto korelace příliš významné.

Závěrem je možné říci, že technika difúzního gradientu v tenkém filmu je schopná simulovat příjem kovů rostlinami. V porovnání s extrakčními technikami není v takové míře destruktivní, tzn., že nedochází k přílišnému porušení půdní matrice a k narušování fyzikálně-chemických rovnováh, ovlivňujících rozdělení kovů a jejich forem v půdách nebo sedimentech.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE

Při experimentech prováděných v této práci byly použity následující chemikálie:

- Akrylamid, 40% roztok - Merck, Darmstadt, Německo
- agarózové síťovadlo, 2% roztok- DGT Research, Lancaster, Velká Británie
- N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED) - Merck, Darmstadt, Německo
- peroxosíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ p.a. – Penta, Chrudim, Česká republika
- Chelex 100 Resin, Na-forma, 200-400 mesh - Biorad Laboratories, Hercules, USA
- dihydrát chloridu měďnatého, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. - Lachema, Brno, Česká republika
- kyselina dusičná, HNO_3 p.a. - Penta, Chrudim, Česká republika
- dusičnan sodný, NaNO_3 p.a. - Penta, Chrudim, Česká republika
- standardní roztok Cu (1 g/l), Astasol®-Cu – Analytika Co. Ltd, Praha, Česká republika

Ve všech uskutečněných experimentech byla použita destilovaná voda, která byla dále přečištěna přístrojem SG Ultra CLEAR UV System (Barsbüttel, Německo). Kvalita deionizované vody připravené tímto způsobem dosahovala na výstupu v jednotkách specifické vodivosti hodnot $0,055 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2 INSTRUMENTACE

Při přípravě experimentů a analýze vzorků byly použity tyto přístroje:

- dry mode mineralizer APION, Tessek, Praha, Česká republika
- atomový absorpční spektrometr AAnalyst 600 firmy Perkin Elmer, Analytical, USA, vybavený transverzálně ohřívaným grafitovým atomizátorem a Zeemanovským longitudinálním kompenzátozem nespecifické absorbance
- automatický dávkovač AS 800 firmy Perkin Elmer, Analytical, USA
- počítačový software AA WinLab32 verze 1.20 použitý k ovládání atomového absorpčního spektrometru
- plastové DGT vzorkovací jednotky pro aplikaci do půd, DGT Research Ltd. Velká Británie
- homogenizátor MS3 basic Minishaker, IKA - Wilmington, USA
- mikropipety Finnpiette Focus, Hermo Elektron - USA
- reakční nádobky Eppendorf 1,5 ml - Hamburg, Německo
- analytické váhy Denver Instruments – New York, USA

- centrifuga Mechanika Precyznyja Warsava typu MPW-6 – Varšava, Polsko
- sušárna
- Mitscherlichovy vegetační nádoby
- membránové filtry Supor®-450 (průměr 2,5 cm, tloušťka 0,13 mm s póry o průměru 0,45 μm), Pall Corporation - Michigan, USA
- celulózové filtry 589/5, Schleicher and Schuell – Dassel, Německo

4.2.1 Příklad pro mineralizaci rostlinného materiálu DRY MODE MINERALIZER APION

Příklad DRY MODE MINERALIZER APION (Obr. 4-1) byl v předkládané disertační práci využit při rozkladu vzorků rostlinného materiálu pro jeho následnou analýzu atomovou absorpční spektrometrií.



Obr. 4-1 Dry mode mineralizátor APION.

Mineralizace byla prováděna na suché cestě, za atmosférického tlaku. Její princip spočívá v zavádění superoxidační směsi plynů do nádobek se vzorkem, které jsou současně vyhřívány na nastavenou teplotu. Oxidační směs plynů je tvořena kyslíkem, oxidy dusíku a ozonem a v přístroji je vyráběna spalováním amoniaku a ozonizací. Vedlejším produktem je chemicky čistá kyselina dusičná, jež byla dále využita při rozpouštění popele vzniklého při mineralizaci.

Postup pro mineralizaci vzorků specifikovaný v tabulce 4-1 je složen ze 4 kroků s definovanou dobou trvání, teplotou a nastavením převodních plynů (kyslík, oxidy dusíku, ozon). V prvním kroku byl vyhříván hliníkový box na teplotu sušení, v druhém kroku probíhalo samotné sušení vzorku. V průběhu třetího kroku docházelo k opětovnému zvyšování teploty až na teplotu mineralizace a poslední krok byl tvořen samotnou mineralizací rostlinného materiálu.

Po ukončení procesu mineralizace a dostatečném zchladnutí skleněných rozkladných nádobek byl vzniklý popel rozpuštěn přídavkem 1 ml kyseliny dusičné o koncentraci 1 mol.l⁻¹. Roztok byl převeden do scintilačních nádobek a skleněné nádobky byly vypláchnuty 4 ml deionizované vody, jež byly přidány k rozpuštěnému popelu.

Tabulka 4-1. Pracovní režim mineralizátoru

	Operační krok	Doba trvání [hod]	Teplota [°C]
A	Ohřátí na sušící teplotu	0,75	Vzestup na 110
B	Sušení vzorku	1	110
C	Ohřátí na mineralizační teplotu	4	Vzestup na 380
D	Mineralizace vzorku	12	380

4.2.2 Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 600, Perkin Elmer

Sledovaný kov (Cu) v půdních vzorcích a v rostlinném materiálu byl stanoven na atomovém absorpčním spektrometru AAnalyst 600 firmy Perkin Elmer, Analytical, vybavený transversálně ohříváním grafitovým atomizátorem a Zeemanovským longitudinálním kompenzátorem nespecifické absorbance. Vzorky byly dávkovány automatickým dávkovačem AS 800 téže firmy. K ovládní spektrometru byl využit počítačový software AA WinLab32 verze 1.20.

Atomizace probíhala v příčně vyhříváném grafitovém atomizátoru (THGA – *Transversely Heated Graphite Atomizer*) s integrovanou L'vovovou platformou (typ B3000641). Jako zdroj specifického záření při stanovení mědi sloužila odpovídající výbojka s dutou katodou, jež pracovala s napájecím proudem 15 mA. Byly měřeny hodnoty spektrální absorbance, tj. plošné obsahy integrálů, při vlnové délce 324,8 nm. Spektrální šířka šterbiny činila 0,7 nm.

Objem dávkovaného vzorku činil 20 μl . Kalibrace byla prováděna metodou kalibrační křivky a metodou standardních přídavek v rozmezí 0 – 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu. Teplotní režim používaný při stanovení sledovaného kovu ve vzorcích vycházel z doporučení výrobce. Základní experimentální parametry pro daný prvek jsou uvedeny v tabulce 4-2.

Tabulka 4-2 Základní parametry pro stanovení mědi ve vzorcích

		průtok Ar (250 ml/min)	
sušení	teplota [°C]	110	ANO
	doba trvání [s]	30	
	teplota [°C]	130	ANO
	doba trvání [s]	30	
pyrolýza	teplota [°C]	900	ANO
	doba trvání [s]	20	
atomizace	teplota [°C]	2200	NE
	doba trvání [s]	5	
čištění	teplota [°C]	2450	ANO
	doba trvání [s]	2	

4.3 PRACOVNÍ POSTUPY

4.3.1 Odběr vzorku půdy

Vzorek půdy, který byl v rámci disertační práce studován, byl odebrán ze školního zemědělského podniku Žabčice spravovaného Mendelovou univerzitou v Brně. Pracoviště Žabčice se nachází 25 km jižně od Brna, v okrese Brno – venkov v Jihomoravském kraji. Půdy v katastru pracoviště jsou neutrální (pH 6,9-7,4) až slabě kyselé s nedostatkem humusu. Na území pracoviště Žabčice se nejčastěji vyskytují genetické půdní typy černozemě, mírně podzolované drnové půdy a nivní půdy glejové.

Vzorky byly odebírány v hloubkovém profilu 0 – 10 cm na ploše o rozloze 1000 m^2 Edelmanovou vzorkovací tyčí a uskladněny v polyethylenových pytlích. Celkem bylo odebráno 300 kg půdy. Po převozu do areálu Mendelovy univerzity v Brně byla půda zbavena všech nečistot a usušena na volném prostranství. Po vyschnutí byla půda homogenizována odstraněním větších složek (kamínky, rostlinné části apod.) a použita pro kultivaci rostlinného materiálu.

4.3.2 Příprava půdních vzorků obohacených mědí

K založení pokusu bylo použito 24 Mitscherlichových vegetačních nádob (Obr. 4-2). Do každé vegetační nádoby bylo naváženo 6 kg homogenizované suché půdy. Půda byla obohacena roztokem dihydrátu chloridu měďnatého, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pro každou z variant (půda kontrolní – neobohacená, půda obohacená roztokem A, půda obohacená roztokem B) byla provedena 4 opakování.

Pro přípravu zásobních roztoků bylo do 100 ml odměrných baněk naváženo 16,0930 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (roztok A) a 32,1870 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (roztok B).



Obr. 4-2 Mitscherlichovy vegetační nádoby.

Do kádinky bylo pipetováno 5 ml zásobního roztoku A a doplněno deionizovanou vodou na objem 250 ml. Z každé vegetační nádoby byla oddělena polovina zeminy do přídatné misky nádoby a ke spodní vrstvě zeminy byl přidán připravený roztok. Kádinka byla vymyta přímo do nádoby 100 ml deionizované vody. Oddělená polovina zeminy byla přisypána zpět do nádoby. Do kádinky bylo opět pipetováno 5 ml roztoku A a doplněno deionizovanou vodou na objem 250 ml. Kádinka byla po přilítí roztoku do půdy opět vypláchnuta 100 ml neionizované vody. Přídavek roztoku A do půdy odpovídal přidávané koncentraci $100 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$ půdy.

Postup při aplikaci roztoku B do půdního vzorku byl totožný s předchozím postupem. Přídavek roztoku B do půdy odpovídal přidané koncentraci 200 mg Cu.kg⁻¹ půdy.

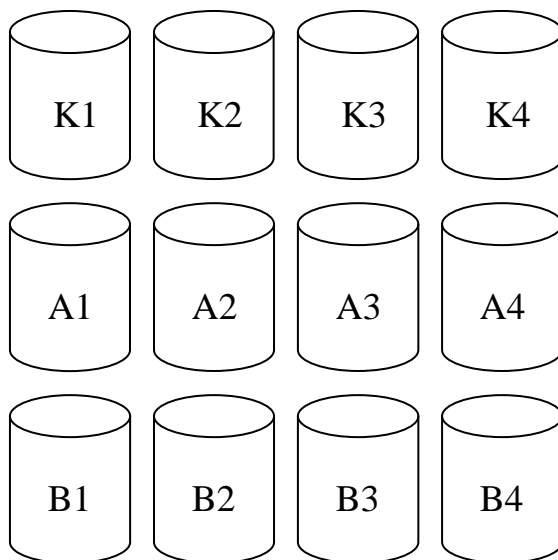
Mitscherlichovy vegetační nádoby s kontrolním půdním vzorkem a neobohacenou půdou byly ponechány k ekvilibraci po dobu 1 měsíce, aby se měď přidaná ve formě Cu²⁺ iontů navázala na půdní složky.

4.3.3 Odběr půdního vzorku pro vyluhovací experimenty

Z každé čtveřice vegetačních nádob se shodným obsahem kovu a z půdy neobohacené byly pomocí trubkového vzorkovače provedeny 2 odběry. Pro každou variantu byl z odebraného množství připraven směsný vzorek půdy, který byl sušen po dobu 5 dnů při laboratorní teplotě. Po úplném vysušení byla půda přesáta přes plastová síta a byla tak získána frakce o velikosti zrn menších než 2 mm. Půda byla skladována v řádně označených papírových pytlících v suchu a temnu pro další zpracování.

4.3.4 Nádobové pokusy s ředkví setou

Celkem byly provedeny 4 výsevy ředkve seté v období od dubna do září roku 2008. První dva osevy byly provedeny odrůdou Věra, druhé dva osevy s odrůdou Lidka. Mitscherlichovy vegetační nádoby s připraveným půdním vzorkem byly osázeny vždy 5 rostlinkami (Obr. 4-3).



Obr. 4-3 Schéma nádobových pokusů s ředkví setou.

Vegetační nádoby byly umístěny ve skleníku v areálu Mendelovy univerzity v Brně. Doba růstu rostlin v jednotlivých výsevech byla postupně zkracována v závislosti na prodlužující se světelné fázi fotosyntézy (prodlužování dne) ze 46 dnů na 28 dnů.

4.3.5 Sklizeň rostlinného materiálu

Po sklizni byly kořeny rostlin zbaveny přebytečné půdy a celé rostliny byly opláchnuty deionizovanou vodou. Poté byly z ředkvičky odděleny listy, kořínky a kořenová bulva byla rozdělena na bílou část a červenou slupku. Jednotlivé části byly zváženy a uskladněny v řádně popsaných papírových a polyethylenových pytlících a uchovány v mrazničce až do té doby, než byly rozloženy v mineralizátoru APION.

4.3.6 Pracovní postup při extrakci mědi z půdního vzorku

Kontrolní a obohacené půdní vzorky (kap. 4.3.3) byly dále extrahovány 2 M kyselinou dusičnou, 0,1 M dusičnanem sodným a deionizovanou vodou dle běžně používaných postupů [79,120].

4.3.6.1 Extrakce půdního vzorku dusičnanem sodným

Výluh v dusičnanu sodném je využíván pro stanovení biologicky významných koncentrací těžkých kovů v půdách. Podíly vzorku o hmotnosti 4 g byly po dobu 16 hodin třepány v extrakčních polypropylenových nádobkách při laboratorní teplotě s 10 ml 0,1 mol.l⁻¹ NaNO₃. Po centrifugaci při 3000 ot./min. po dobu 10 minut byl supernatant přefiltrován přes celulózový filtrační papír 589/5. Filtrát byl jímán do polypropylenové nádoby a pro stabilizaci okyselen 50 µl koncentrované kyseliny dusičné. Současně byl zpracován i slepý vzorek.

4.3.6.2 Extrakce půdního vzorku kyselinou dusičnou

Podíly vzorku o hmotnosti 10 g byly třepány v extrakčních polyethylenových nádobkách po dobu 16 hodin se 100 ml 2 mol.l⁻¹ kyseliny dusičné při laboratorní teplotě. Extrakt byl přefiltrován přes celulózový filtrační papír 589/5 do polyethylenových nádobek. Opět byl současně zpracován slepý vzorek.

4.3.6.3 Extrakce půdního vzorku deionizovanou vodou

Obsah prvků extrahovatelných vodou byl stanoven následujícím způsobem. Podíly vzorku o hmotnosti 50 g byly třepány s 50 ml deionizované vody v plastové nádobce po dobu 2 hodin a směs byla pak ponechána po dobu 24 hodin v klidu. Po centrifugaci byl supernatant přefiltrován přes polyethersulfonový membránový filtr Supor®-450. Filtrát byl jímán do polypropylenových nádobek a stabilizován přidáním 50 µl koncentrované kyseliny dusičné. Současně s extrakcí půdního vzorku byl opět zpracován i slepý vzorek.

4.3.7 Příprava gelů pro aplikaci techniky DGT

Difúzní i sorpční gel byl připraven dle dohodnutých postupů uvedených v literatuře [108].

4.3.7.1 Příprava difúzního gelu

Na přípravu difúzního gelu byly použity 2 ml gelového roztoku s 0,25 % katalyzátoru polymerace TEMED a 0,75 % iniciátoru polymerace 8% roztoku peroxosíranu amonného. Gelový roztok obsahoval 15 % monomeru akrylamidu, 0,3 % agarózového síťovadla v deionizované vodě. Směs gelového roztoku s přísadkami výše zmíněných polymeračních činidel byla promíchána a co nejrychleji pipetována mezi dvě skla oddělená distanční teflonovou fólií o tloušťce 0,5 mm. Skla se směsí byla vložena ve svislé poloze k polymerizaci do sušárny vytemperované na teplotu 42 °C po dobu 60 minut.

Po 60 minutách byla skla rozebrána a gel spláchnut deionizovanou vodou do plastové nádoby, v níž byly gely ponechány k hydrataci minimálně 24 hodin. Během hydratace byla voda několikrát vyměňována, aby bylo zajištěno odstranění zbytků polymeračních činidel z difúzního gelu. Po nabobtnání gelu do tloušťky 0,8 mm byly z gelu vykrájeny disky o průměru 2,5 cm. Takto připravené disky difúzního gelu byly uchovány v roztoku 0,01 mol.l⁻¹ dusičnanu sodného v ledničce při teplotě 4 °C do doby použití.

4.3.7.2 Příprava sorpčního gelu s iontoměničem Chelex 100

Příprava sorpčního gelu je založena na podobném principu jako příprava gelu difúzního. Do zkumavky bylo naváženo 0,4 g suchého iontoměniče Chelex 100 a přidány 2 ml gelového roztoku. Směs gelového roztoku a iontoměniče před přidávkou polymeračních činidel bobtnala 20 minut. Po přidávku 3 μl katalyzátoru TEMED a 12 μl 8% roztoku peroxosíranu amonného byla tato směs pipetována mezi dvě skla oddělená distanční fólií o tloušťce 0,3 mm. Po dobu 60 minut byla skla se směsí umístěna ve vodorovné poloze k polymeraci do vytemperované sušárny na teplotu 42 °C tak, aby byly částice iontoměniče v gelu rovnoměrně rozloženy.

Po uplynutí dané doby byla skla se ztuhlým gelem vytažena a rozebrána. Gel byl spláchnut do plastové nádoby deionizovanou vodou a ponechán k hydrataci minimálně 24 hodin, přičemž voda byla opět několikrát vyměněna. Z gelu byly vykrájeny disky o průměru 25 mm a uchovány v roztoku 0,01 mol.l⁻¹ NaNO₃ při teplotě 4 °C v ledničce.

4.3.8 Příprava DGT vzorkovacích jednotek

Vzorkovací jednotky (DGT Research Ltd.) byly sestavovány vždy před jejich expozicí v půdní suspenzi. Na spodní díl vzorkovací jednotky byl umístěn disk sorpčního gelu tak, aby vrstva iontoměniče byla orientována směrem vzhůru. Na sorpční gel byl položen disk difúzního gelu tak, aby zcela zakrýval gel sorpční. Poslední vrstva byla tvořena přiložením polyethylensulfonového membránového filtru (Supor®-450, Pall Corporation, USA) o velikosti pórů 45 µm, který chrání difúzní gel před poškozením. Všechny tři vrstvy byly nakonec uzavřeny prstencovým víčkem s expozičním okénkem o průměru 2 cm.

4.3.9 Aplikace DGT vzorkovacích jednotek do půdy

Stanovení obsahu biodostupného podílu v půdním vzorku bylo provedeno aplikací jednotek DGT do suspenze této půdy a vody (Obr. 4-4). Do plastové misky byla připravena půdní suspenze navážením 55 g suchého homogenizovaného vzorku půdy a přidáním 13 ml deionizované vody. Důkladným promícháním obou fází byla vytvořena příslušná půdní suspenze.

Do misek se suspenzí byly vloženy malé Petriho misky s navlhčenou buničinou, aby byly zachovány konstantní vlhkostní podmínky. Misky byly uzavřeny a ponechány k ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi minimálně po dobu 24 hodin.

Následně byly do plastové misky vloženy tři DGT vzorkovací jednotky, které byly předem omyty deionizovanou vodou, aby vodní film umožnil lepší splynutí vzorkovacích jednotek a půdní suspenze. Při vkládání vzorkovacích jednotek do půdní suspenze bylo vždy dbáno na to, aby se mezi expozičním okénkem a suspenzí nevytvořily vzduchové bublinky. Na vzorkovací jednotky byla opět vložena Petriho miska s navlhčenou buničinou, aby byly dodrženy podmínky konstantních vlhkostních poměrů. Na počátku i na konci experimentu byla vždy změřena teplota v laboratoři.

Také byl odebírán půdní roztok před a po expozici DGT jednotek. Polypropylenové lahvičky byly naplněny půdní suspenzí a umístěny do centrifugy. Suspenze byly odstředovány po dobu 10 - 15 minut při 3000 ot./min. Po odstředění byl půdní roztok přefiltrován pro úplné odstranění koloidních částic přes celulózový filtr Supor®-450 uložený v plastovém pouzdře. Přefiltrovaný roztok byl stabilizován 30 µl koncentrované kyseliny dusičné a analyzován pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET – AAS).



Obr. 4-4. Aplikace DGT vzorkovacích jednotek do plastové misky s půdní suspenzí.

4.3.10 Příprava eluátů ze sorpčních gelů pro následnou analýzu

Po ukončení expozice byly vzorkovací jednotky vyjmuty a opláchnuty deionizovanou vodou. Poté byly jednotky rozebrány a jednotlivé vrstvy gelů byly od sebe odděleny. Disk sorpčního gelu byl pomocí plastové pinzety vložen do polypropylenových nádobek a byl k němu přidán 1 ml $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$. Po 24 hodinové eluci v kyselině dusičné byly disky sorpčních gelů vytaženy a eluáty byly následně analyzovány pomocí atomového absorpčního spektrometru. Současně byl také připraven slepý pokus elucí neexponovaných disků sorpčního gelu.

4.3.11 Studium vlivu změny experimentálních parametrů DGT techniky na množství mědi akumulované v sorpčním gelu

4.3.11.1 Test časové závislosti

Pro každý testovaný půdní vzorek byla sledována závislost obsahu zachyceného kovu v sorpčním gelu na době expozice.

DGT vzorkovací jednotky s tloušťkou difúzní vrstvy 0,93 mm byly ve třech variantách vloženy do homogenizovaných a ekvilibrovaných půdních suspenzí. Tloušťka difúzní vrstvy je dána součtem tloušťky difúzního gelu (0,8 mm) a tloušťky membránového filtru (0,13 mm). Doba expozice činila 6, 12, 24, 30, 48, 72 a 96 hodin při laboratorní teplotě $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Po uplynutí jednotlivých časových intervalů byly vzorkovací jednotky vyjmuty, vždy důkladně opláchnuty deionizovanou vodou a rozebrány. Disky sorpčních gelů byly

eluovány v 1 mol.l⁻¹ kyselině dusičné po dobu 24 hodin. Obsah mědi v eluátech a v půdním roztoku byl opět stanoven metodou ET – AAS.

4.3.11.2 Aplikace DGT vzorkovacích jednotek s odlišnou tloušťkou difúzní vrstvy

Do připravených a ekvilibrovaných půdních suspenzí byly vloženy 3 DGT vzorkovací jednotky s rozdílnými tloušťkami difúzní vrstvy 0,43; 0,63; 0,93; 1,43 a 1,79 mm. Pro přípravu největší tloušťky difúzní vrstvy byly použity dva disky difúzního gelu o tloušťce 0,5 mm, jeden disk difúzního gelu o tloušťce 0,3 mm a membránový filtr. Doba expozice při teplotě 24 ± 1 °C činila 24 hodin. Poté byly DGT vzorkovací jednotky z plastových misek vyjmuty a zpracovány obvyklým způsobem. Obsah mědi v eluátech a v půdním roztoku byl opět stanoven metodou ET – AAS.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole budou diskutovány výsledky týkající se DGT experimentů prováděných s osetou půdou a výsledky ze třetí a čtvrté vegetace ředkve seté. Výsledky z první a druhé vegetace budou uvedeny pouze v tabulkách, protože klimatické podmínky při osevu první a druhé vegetace byly různé a nemohly být tak dostatečně porovnány a vyhodnoceny.

5.1 EXTRAKCE MĚDI Z PŮDNÍCH VZORKŮ

Ke zjištění podílu těžkých kovů vázaných v různých formách a fázích půdního systému, jejich dostupnosti a mobility jsou využívány extrakční postupy. V této dizertační práci byla aplikována běžně používaná extrakční činidla, a to kyselina dusičná, dusičnan sodný a deionizovaná voda. Kyselina dusičná extrahuje frakce kovů zmiňované v úvodu kapitoly 3.3., kromě nerozpustné reziduální frakce, a slouží k odhadu míry kontaminace. Výluhy dusičnanem sodným a deionizovanou vodou slouží k odhadu biodostupných forem v půdním roztoku.

Extrakce byly provedeny pro každou variantu sledovaného půdního vzorku. Půdní vzorek byl loužen použitými extrakčními činidly dvakrát, nejprve před kultivací ředkvi setou (*Raphanus sativus* L.) a po její sklizni. Pro každé činidlo byly provedeny tři repliky. Aby bylo možné porovnat obsahy mědi stanovené v jednotlivých výluzích, bylo nutné hodnoty C_{Cu} přepočítat s ohledem na poměr fází aplikovaných v prováděných testech na koncentrace kovů v jednotkách $mg.kg^{-1}$.

Výsledky extrakce 2 M HNO_3 , jež poskytuje údaj o celkovém (quazitotálním) obsahu mědi v půdě ukazují, že půdy byly obohaceny mědí v požadovaném množství (100 a 200 $mg.kg^{-1}$). Hodnoty jsou shrnuty v tabulce 5-1.

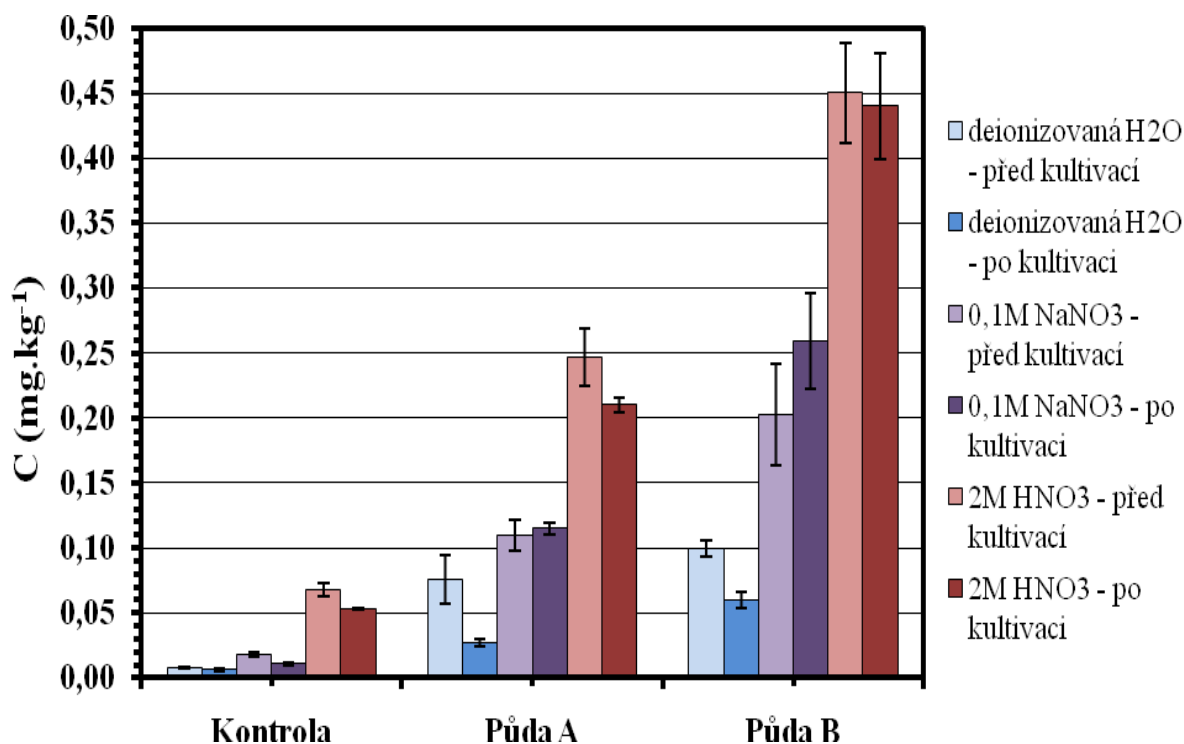
Tabulka 5-1 Shrnutí výsledků získaných extrakcí půdního vzorku jednotlivými extrakčními činidly.

<i>Obsah mědi v půdě před její kultivací ředkvi setou ($mg.kg^{-1}$)</i>			
Vyluhovací činidlo	2 M HNO_3	0,1 M $NaNO_3$	deionizovaná voda
Kontrolní půda	6,8 ± 0,5	0,018 ± 0,002	0,0077 ± 0,0004
Půda A	124 ± 11	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Půda B	225 ± 19	0,20 ± 0,04	0,08 ± 0,01

<i>Obsah mědi v půdě po její kultivaci ředkvi setou ($mg.kg^{-1}$)</i>			
Vyluhovací činidlo	2 M HNO_3	0,1 M $NaNO_3$	deionizovaná voda
Kontrolní půda	5,3 ± 0,1	0,011 ± 0,001	0,006 ± 0,001
Půda A	105 ± 3	0,115 ± 0,004	0,027 ± 0,003
Půda B	220 ± 20	0,26 ± 0,04	0,06 ± 0,01

Hodnoty obsahu mědi zjištěné před a po výsevu ředkve pro jednotlivá činidla se významně neliší (Obr. 5-1). Ředkev během svého růstu přijímala z půdy do svých tkání určité množství mědi, to však neovlivnilo její obsah v půdě. Výjimkou je výluh deionizovanou vodou, v němž je obsah mědi v půdě před kultivací vyšší než po kultivaci. Po osetí půdy rostlinami došlo zřejmě k vyčerpání frakcí mědi rozpustných ve vodě, které jsou dostupné rostlinám, a v půdě zůstaly pouze frakce vázané na půdní částice, jejichž koncentrace byla stanovena vodným výluhem.

Obsah mědi ve výluzích kyseliny dusičné je v porovnání s obsahem mědi stanoveným ve výluzích dusičnanu sodného a vody několikanásobně větší. Kyselina dusičná patří mezi silná extrakční činidla a je tedy schopna z půdy extrahovat většinu specií mědi. Obsah mědi ve výluzích dusičnanu sodného a vody jsou řádově nižší. Předpokládá se, že tato činidla poskytují informace o biodostupných formách kovu přítomných v půdě.



Obr. 5-1 Porovnání obsahu mědi stanovené ve výluzích jednotlivých extrakčních činidel aplikovaných do půdy před a po její kultivaci ředkví setou.

5.2 TECHNIKA DIFÚZNÍHO GRADIENTU V TENKÉM FILMU

5.2.1 Studium vlivu experimentálních parametrů techniky DGT na množství mědi akumulované v sorpčním gelu z půdní suspenze

Při studiu vlivu parametrů techniky DGT na množství mědi akumulované v sorpčním gelu byly provedeny dva základní testy. V prvním testu byl sledován vliv doby expozice vzorkovacích jednotek DGT na množství zachyceného kovu a v druhém testu byly použity vzorkovací jednotky DGT s odlišnými tloušťkami difúzní vrstvy.

V časové závislosti na době expozice jednotek DGT byla sledována odezva půdy na odčerpávání iontů mědi v důsledku jejich záchytu na funkční skupiny kyseliny iminodioctové přítomné v sorpčním gelu vzorkovacích jednotek. Byl tak simulován časový průběh příjmu těchto iontů kořenovým systémem rostlin a tomu odpovídající odezva půdy. Druhý test umožnil modelování odlišných požadavků kořenových systémů rostlin a sledování schopnosti půdy doplňovat úbytek kovových iontů do půdního roztoku v důsledku jejich odčerpávání.

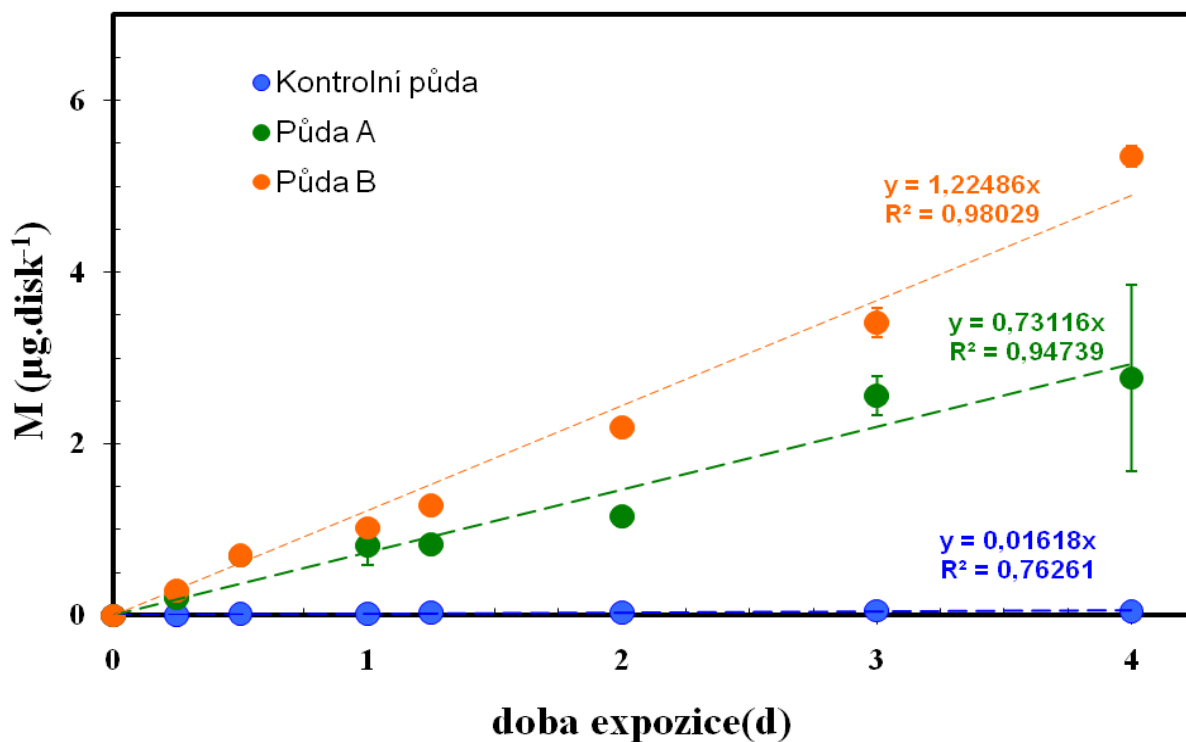
5.2.1.1 Časová závislost při aplikaci vzorkovacích jednotek DGT do půdy

Závislost množství mědi vázané v sorpčním gelu M ($\text{ng}\cdot\text{disk}^{-1}$) na době expozice t byla sledována v časovém intervalu 0 až 96 hodin pro jednotlivé půdní vzorky, jak je uvedeno v kapitole 4.3.2. Vzorkovací jednotky s tloušťkou difúzní vrstvy 0,93 mm byly vloženy do homogenizovaných a ekvilibrovaných půdních suspenzí. Po uplynutí doby expozice byly disky sorpčních gelů eluovány v $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselině dusičné. Obsah mědi v těchto eluátech byl stanoven metodou ET – AAS.

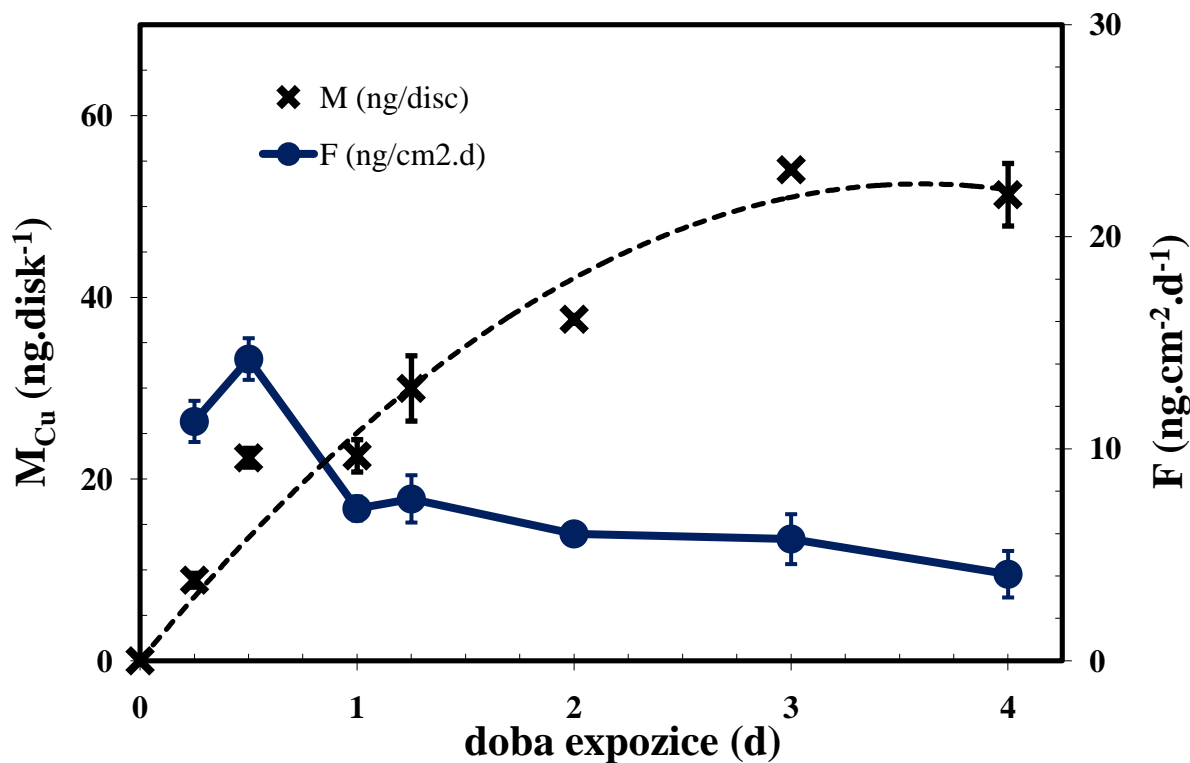
Na Obr. 5-2 je zobrazena grafická závislost pro půdu osetou – kontrolní půda, půda A (obohacená $100 \text{ mg Cu}\cdot\text{kg}^{-1}$) a půda B (obohacená $200 \text{ mg Cu}\cdot\text{kg}^{-1}$). Z grafu je patrné, že množství měďnatých iontů navázaných v sorpčním gelu vzrůstá úměrně s dobou expozice. Lineární průběh závislosti ukazuje, že koncentrace měďnatých iontů v půdním roztoku a na rozhraní vzorkovací jednotky DGT a půdního systému je konstantní.

Z časové závislosti také vyplývá, že u obohacených vzorků půd byl tok iontů v rámci statistických chyb měření nezávislý na čase t (až do 96 h). V případě kontrolní půdy hmotnostní tok iontů po 12 h klesá z hodnoty $14 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ na $5 - 7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ (Obr. 5-3). Tento fakt opět potvrzuje existenci jiné formy mědi v obohacených půdách. Mobilní, uvolnitelná část mědi se v neobohacené půdě po 24 hodinách snížila, tok poklesne a uvolňování mědi do půdy neprobíhá dostatečnou rychlostí.

S ohledem na lineární průběh časové závislosti se lze domnívat, že DGT tok je ovlivňován komplexními rovnovahami a jejich kinetikou jak v homogenní fázi půdního roztoku, tak v heterogenním systému pevná fáze/půdní roztok.



Obr. 5-2 Osetá půda. Závislost množství mědi zachyceného v sorpčním gelu na době expozice.



Obr. 5-3 Kontrolní půda. Závislost hmotnostního toku a zachyceného množství Cu²⁺ iontů na době expozice.

5.2.1.1.1 *Mobilita a doplňování iontů mědi z pevné fáze půdy do půdního roztoku*

Jak již bylo zmiňováno v předchozích kapitolách, jsou pro stanovení biodostupnosti a mobility iontů kovů aplikovány extrakční postupy za použití různých extrakčních činidel. Pro odhad biodostupných forem kovů se osvědčilo i stanovení obsahu kovů v půdním roztoku, v němž obsah kovů koreluje s obsahem kovů pěstovaných na analyzovaných půdách.

Biodostupnost není určována pouze koncentrací kovu v půdním roztoku, ale též jeho mobilitou a doplňováním iontů kovů z pevné fáze do půdního roztoku.

Měření DGT je možné vyjádřit také pomocí *poměru R* [69,70,110,111], který udává míru doplňování kovových iontů z pevné fáze půdy do půdního roztoku. Koncentrace změřená technikou DGT, C_{DGT} , může být menší nebo rovna koncentraci rozpuštěných forem kovů v půdním roztoku, C_{SOL} , změřené nezávislou analytickou metodou. Blíží-li se hodnota poměru *R* jedničce, znamená to, že kov je v pevné fázi přítomen ve formách mobilních a kineticky labilních a že doplňování kovů z pevné fáze do půdního roztoku je konstantní. Blíží-li se hodnota poměru *R* nule, kov je doplňován z pevné fáze pouze omezeně anebo nikoliv, přičemž koncentrace kovu v blízkosti vzorkovací jednotky DGT klesá s dobou expozice.

V tabulce 5-2 jsou shrnuty výsledky testu s odlišnou dobou expozice jednotek DGT aplikovaných do půdy. Celková koncentrace Cu, C_{SOL} , v půdním roztoku byla zjištěna dle pracovního postupu pospaného v kapitole 4.3.9.

Tabulka 5-2 Shrnutí výsledků testu s odlišnou dobou expozice jednotek DGT aplikovaných do půdy.

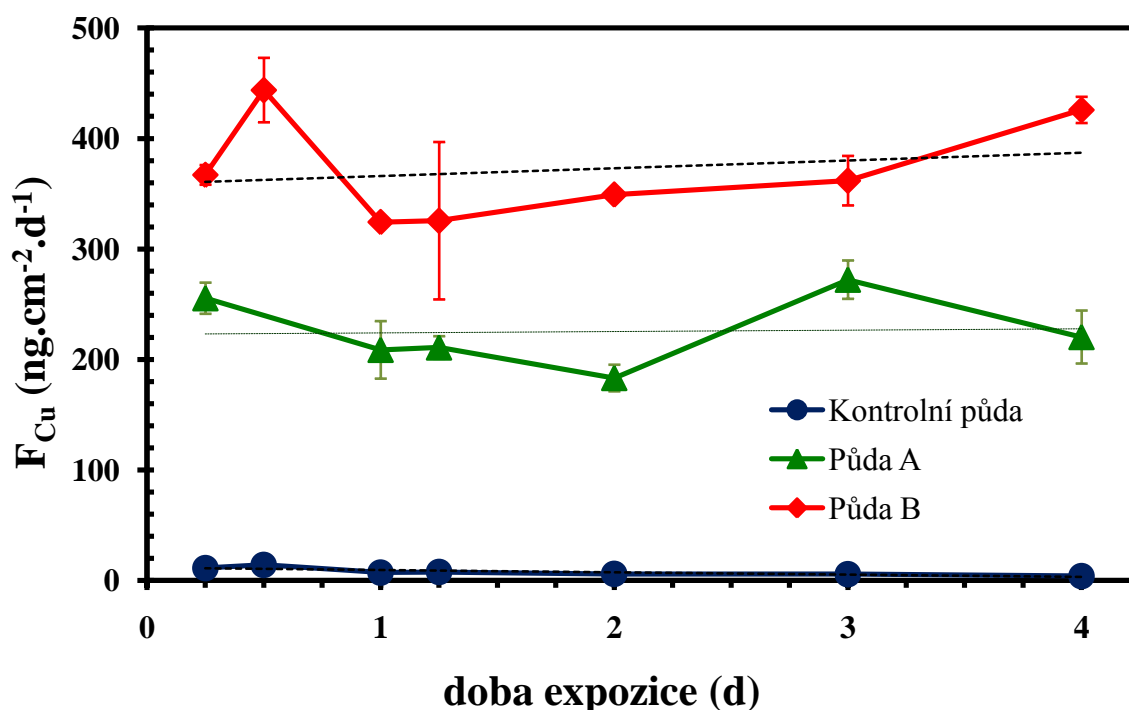
Půdní vzorek	C_{SOL} (ng.ml⁻¹)	C_{DGT} (ng.ml⁻¹)	<i>Poměr R</i>
<i>Kontrolní půda</i>	13 ± 3	1,4 ± 0,6	0,11 ± 0,04
<i>Půda A</i>	127 ± 12	45 ± 14	0,32 ± 0,11
<i>Půda B</i>	202 ± 13	64 ± 7	0,32 ± 0,04

Celková koncentrace mědi zjištěná v půdním roztoku, C_{SOL} , je v porovnání s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT, C_{DGT} , několikanásobně větší. Tento rozdíl může být způsoben změnami ve vazbách mědi na půdní částice či huminové složky. Velikost těchto komplexů může být větší, než jsou póry difúzního gelu, a nedochází tak jejich navázání na funkční skupiny kyseliny iminodiocetové přítomné v sorpčním gelu.

Hodnoty poměru R jsou nízké, což svědčí o tom, že půdní systém je schopen koncentraci iontů pouze částečně vyrovnávat jejich uvolňováním z pevné fáze do půdního roztoku. Tento stav bývá v literatuře [69] označován jako „*částečně ustálený stav*“ (partially sustained case). Hodnoty R pro obě obohacené půdy jsou trojnásobně vyšší, což svědčí o vyšší mobilitě mědi. Přidaná měď se tedy chová odlišně než měď přirozeně se v půdě vyskytující. Dle práce [110] tato nízká hodnota poměru C_{DGT}/C_{SOL} signalizuje přítomnost určitého podílu kovu, který není stanoven technikou DGT v důsledku stabilní vazby na částice půdní hmoty.

Tok forem kovů měřitelných technikou DGT, jenž je nezávislý na tloušťce difúzní vrstvy aplikovaných vzorkovacích jednotek DGT, je určen maximální schopností půdy uvolňovat kovové ionty do půdního roztoku, a proto je možné označit tento tok jako tok maximální, F_{max} . Hodnota F_{max} udává maximální množství kovu, jež může být dostupné v daném půdním systému při měření technikou DGT.

Vzorkovací jednotka DGT aplikovaná do půdního systému funguje podobně jako kořenový systém rostlin, protože váže kovy, a podmiňuje tím tak průběh dalších procesů spojených s uvolňováním kovů. Maximální tok iontů F_{max} lze chápat jako maximální tok biodostupných kovů v půdě. Grafické znázornění závislosti $F = f(t)$ je uvedeno na Obr. 5-4. Hodnoty F_{max} byly odečteny z této závislosti a jsou shrnuty pro všechny tři varianty půdního vzorku v tabulce 5-3.



Obr. 5-4 Osetá půda. Závislost hmotnostního toku měďnatých iontů na době expozice.

Tabulka 5-3 Maximální toky biodostupných forem mědi v půdě stanovené technikou DGT

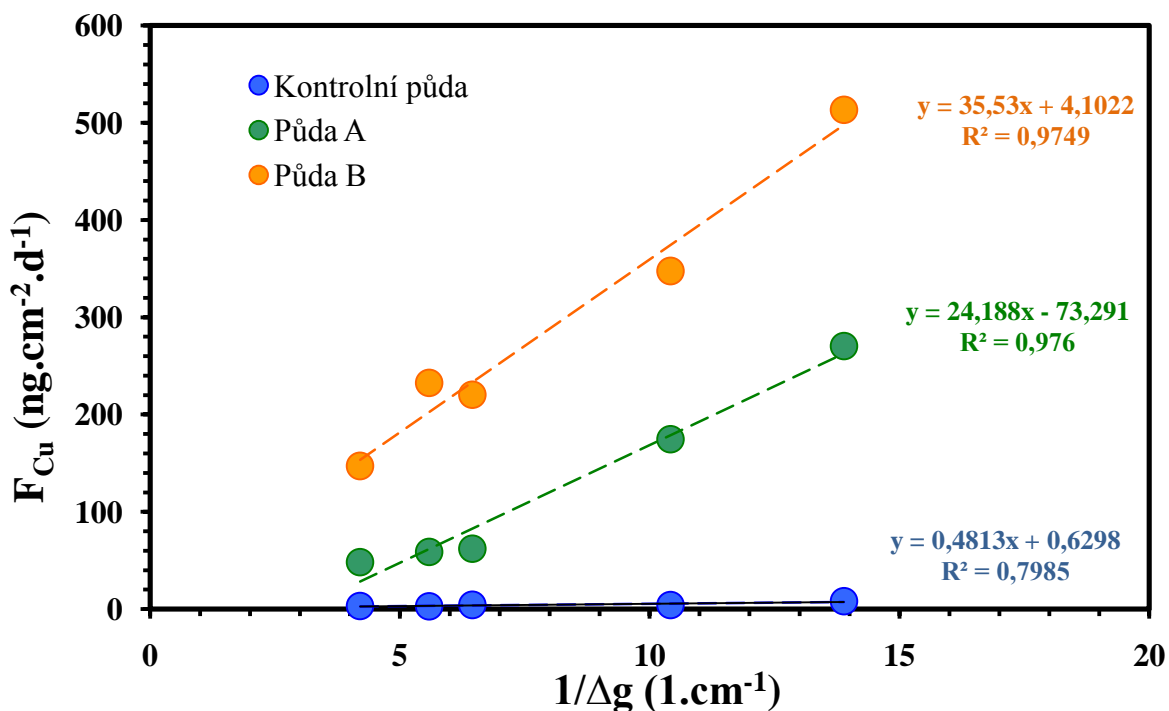
Půdní vzorek	Maximální tok iontů mědi, F_{max} (ng.cm⁻².d⁻¹)
Kontrolní půda	11 ± 1
Půda A	272 ± 24
Půda B	443 ± 29

5.2.1.2 Aplikace vzorkovacích jednotek DGT s odlišnou tloušťkou difúzní vrstvy

Vliv odlišné tloušťky difúzní vrstvy na množství mědi stanovené technikou DGT byl zjišťován aplikací vzorkovacích jednotek DGT s tloušťkou difúzní vrstvy od 0,07 cm do 0,24 cm u sledovaných vzorků. Vlhkost půdní suspenze byla nastavena na 24 %, doba expozice při teplotě 24 ± 1 °C činila 24h.

Grafické zobrazení výsledků je na Obr. 5-5. Výsledky byly zpracovány jako závislost toku forem měřitelných technikou DGT na reciproké hodnotě tloušťky difúzní vrstvy $F = f(\Delta g)$.

Závislosti toku forem mědi měřitelných technikou DGT na zátěži půdní suspenze vytvářené vzorkovací jednotkou DGT jsou lineární pro všechny tři půdní varianty, což svědčí o tom, že při 24 hodinové expozici jsou ionty mědi uvolňovány z pevné fáze do půdního roztoku velkou rychlostí a hodnoty tak nekonvergují k maximálnímu toku. V literatuře [69] je tento stav, kdy je koncentrace iontů v půdním roztoku vyrovnávána tak, aby v blízkosti vzorkovací jednotky DGT byla tato koncentrace konstantní, označována jako „*částečně ustálený stav*“ (partially sustained case).



Obr. 5-5 Osetá půda. Závislost toku forem mědi měřitelných technikou DGT na reciproké hodnotě tloušťky difúzní vrstvy.

5.2.1.2.1 Mobilita a doplňování iontů mědi z pevné fáze půdy do půdního roztoku

Z výsledků uvedených v tabulce 5-4 je zřejmé, že celková koncentrace mědi v půdním roztoku, C_{SOL} , je několikanásobně větší v porovnání s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT, C_{DGT} , podobně jako u předchozího testu s rozdílnou dobou expozice. Hodnoty poměru R rovněž odpovídají předchozímu experimentu. U kontrolní půdy jsou koncentrace mědi v půdním roztoku desetkrát vyšší než koncentrace nalezené technikou DGT, v obohacených půdách třikrát vyšší, což opět svědčí o tom, že měď přidaná ve formě měďnaté soli do půdy se nachází i po měsíční době ekvilibrace v jiné formě než měď přirozeně se v půdě vyskytující.

Tabulka 5-4 Shrnutí výsledků testu s odlišnou tloušťkou difúzní vrstvy vzorkovacích jednotek DGT aplikovaných do půdní suspenze.

Půdní vzorek	C_{SOL} (ng.ml ⁻¹)	C_{DGT} (ng.ml ⁻¹)	Poměr R
<i>Kontrolní půda</i>	9,7 ± 4,6	1,0 ± 0,4	0,11 ± 0,02
<i>Půda A</i>	99,0 ± 3,6	25,3 ± 7,6	0,25 ± 0,07
<i>Půda B</i>	275,8 ± 17,1	67,4 ± 7,9	0,24 ± 0,02

Hodnoty maximálního toku iontů kovů, F_{max} , pro všechny tři varianty půdního vzorku odečtené ze závislosti $F = f(l/\Delta g)$ jsou shrnuty v tabulce 5-5. Vysoké hodnoty F_{max} opět vypovídají o tom, že půdní systém je schopen uvolňovat měďnaté ionty do půdního roztoku z pevné fáze půdy počáteční rychlostí po celou dobu expozice a jejich koncentrace je v blízkosti vzorkovací jednotky DGT konstantní po celou dobu expozice.

Tabulka 5-5 Maximální toky biodostupných forem mědi v půdě stanovené technikou DGT

Půdní vzorek	Maximální tok iontů mědi, F_{max} (ng.cm ⁻² .d ⁻¹)
Kontrolní půda	13 ± 2
Půda A	266 ± 8
Půda B	571 ± 20

5.2.2 Srovnání odezvy techniky DGT s účinností vyluhování extrakčními činidly

Koncentrace mědi ve variantách půdního vzorku získané technikou DGT byly dále porovnávány s výsledky získanými pomocí běžných extrakčních postupů. Jako extrakční činidla byla aplikována běžná činidla, a to 2 M kyselina dusičná, 0,1 M dusičnan sodný a deionizovaná voda. Pro každý výluh byly provedeny 3 repliky. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5-6.

Aby bylo možné porovnat výsledky získané technikou DGT s výsledky získanými extrakčními postupy, byly hodnoty C_{DGT} (μg.l⁻¹), a C_{SOL} (μg.l⁻¹) vyjádřeny s ohledem na poměry fází aplikovaných v prováděných testech na koncentrace kovů v jednotkách μg.kg⁻¹.

Tabulka 5-6 Obsah mědi ve vzorku půdy stanovený různými extrakčními činidly, koncentrace mědi v půdní suspenzi stanovená technikou DGT a v půdním roztoku.

Půdní vzorek	Vyluhovací činidlo (μg.kg ⁻¹)			C_{DGT}	C_{SOL}
	HNO ₃ (mg.kg ⁻¹)	NaNO ₃	deion. voda		
Kontrolní půda	5,3 ± 0,1	18 ± 1	6,2 ± 0,9	0,0019 ± 0,0008	0,018 ± 0,005
Půda A	105 ± 3	115 ± 4	27 ± 3	0,06 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Půda B	220 ± 20	259 ± 37	76 ± 6	0,09 ± 0,01	0,3 ± 0,1

Ve všech případech obsahy mědi zjištěné jednotlivými extrakčními činidly klesají v pořadí 2 M HNO₃ > 0,1 M NaNO₃ > deionizovaná voda. Obsah mědi stanovený pomocí výluhu vodou a v dusičnanu sodném byl nejnižší. Předpokládá se, že poskytují informace o biodostupných formách kovů podobně jako v půdním roztoku.

Obsahy stanovené technikou DGT byly u všech půdních variant o několik řádů nižší v porovnání s běžně používanými extrakčními činidly. Rozdíl mezi DGT a nejsilnějším použitým činidlem, HNO₃, činil pro jednotlivé varianty 5 řádů. Rozdíl mezi výsledky poskytnutými výluhem dusičnanu sodného, jež je používán pro stanovení biodostupného podílu mědi, a technikou DGT činil 2 řády.

Technika DGT umožňuje na rozdíl od vyluhovacích postupů nedestruktivní *in situ* způsob stanovení kovů v půdách, a tudíž koncentrace kovů stanovená touto technikou je v porovnání s výsledky získanými extrakčními postupy blíže ke skutečnému obsahu biodostupných forem kovů přítomných v půdě.

5.3 STANOVENÍ OBSAHU MĚDI VE TKÁNÍCH ŘEDKVE SETÉ (*RAPHANUS SATIVUS L.*)

Rostlinkami ředkve seté (*Raphanus sativus L.*) byly osázeny všechny varianty půdního vzorku (kontrolní půda, půda A obohacená roztokem o koncentraci 100 mg.kg⁻¹ Cu a půda B obohacená roztokem o koncentraci 200 mg.kg⁻¹ Cu). Po uplynutí doby růstu, která se měnila v závislosti na délce světelné fázi fotosyntézy (Tabulka 5-7), byly z rostlinek po sklizni odděleny jednotlivé části – listy, kořínky a kořenová bulva, která byla rozdělena na část bílou a slupku. Tyto části byly rozloženy v mineralizátoru APION. V mineralizátu byl obsah mědi v jednotlivých částech byl stanoven metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET – AAS).

Tabulka 5-7 Doba růstu ředkve seté v jednotlivých vegetacích.

	1. sklizeň	2. sklizeň	3. sklizeň	4. sklizeň
dobu růstu (d)	47	38	36	28

V rámci disertační práce byly při stanovení obsahu mědi sledovány dva parametry určující chování mědi v systému rostlina/půda, a to celkový obsah mědi v ředkvičce, m^{Cu}_r , a průměrný tok mědi do rostliny během jejího růstu, F^{Cu}_r . Celkový obsah mědi v ředkvičce udává množství mědi, které se akumulovalo v rostlině během jejího růstu až do její sklizně. Průměrný tok mědi do rostliny vyjádřený množstvím mědi přijatým ředkvičkou během jednoho dne je ovlivňován především kořenovým systémem, jeho plochou a hmotností půdy, ze které rostlina kov čerpá.

V tabulce 5-8 jsou shrnuty hodnoty celkového obsahu mědi v čerstvé ředkvičce a průměrný tok mědi do ředkvičky během doby jejího růstu pro všechny 4 vegetace.

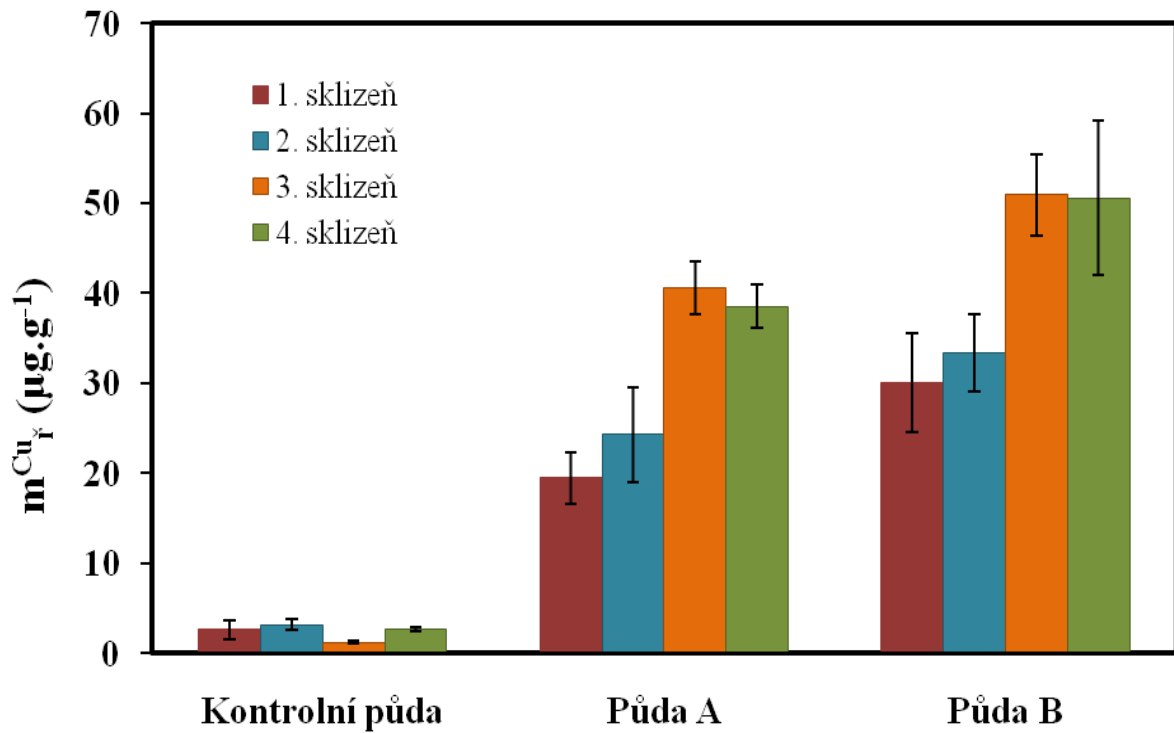
Tabulka 5-8 Hodnoty celkového množství mědi a průměrný tok mědi do rostliny stanovené v jedné ředkvičce pro 4 vegetace.

Obsah mědi v čerstvé rostlině ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)				
Půdní vzorek	1. sklizeň	2. sklizeň	3. sklizeň	4. sklizeň
<i>Kontrolní půda</i>	2,59 ± 1,11	3,17 ± 0,58	1,16 ± 0,25	2,64 ± 0,53
<i>Půda A</i>	19,49 ± 2,84	24,28 ± 5,24	40,54 ± 2,47	38,54 ± 8,29
<i>Půda B</i>	23,06 ± 5,54	33,35 ± 4,35	50,93 ± 8,62	50,64 ± 7,12
Průměrný tok mědi do rostliny ($\mu\text{g Cu}\cdot\text{ředkvička}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)				
<i>Kontrolní půda</i>	0,14 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,094 ± 0,019
<i>Půda A</i>	0,41 ± 0,07	0,66 ± 0,11	1,58 ± 0,09	1,38 ± 0,30
<i>Půda B</i>	0,49 ± 0,08	0,90 ± 0,15	1,96 ± 0,03	1,66 ± 0,25

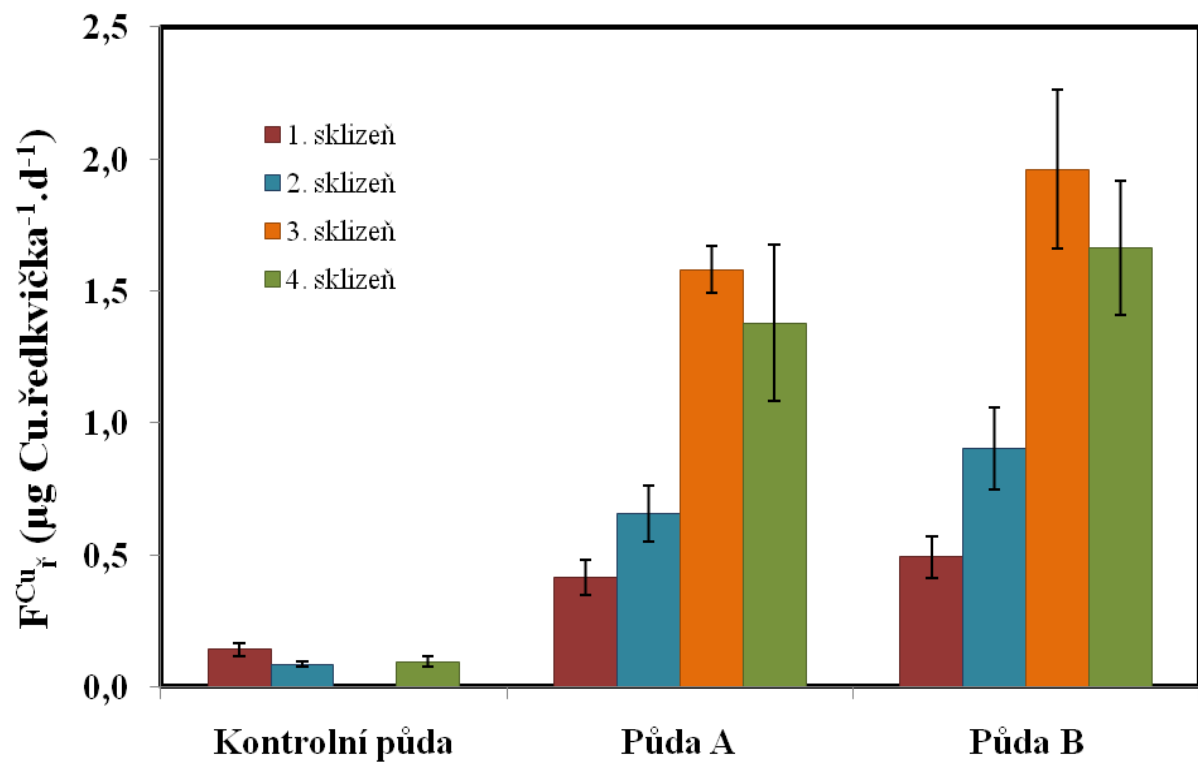
Z grafů zobrazených na Obr. 5-6 a Obr. 5-7 jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými vegetacemi. Tyto rozdíly v obsahu mědi a jejím toku do rostliny během růstu mohou být způsobeny odlišnými klimatickými podmínkami při jednotlivých vegetacích. Jak bylo popisováno v experimentální části této dizertační práce (kap. 4.3.4), rostliny byly vysety v rozmezí od března do září ve vegetační hale, kde nemohly být zaručeny stejné podmínky pro všechny vegetace. V podmínkách stresu přijímají rostliny látky z půdy intenzivněji, než za podmínek přirozených pro jejich růst.

Rozdíly v obsahu přijaté mědi a v toku tohoto kovu do rostliny mohou být způsobeny také výnosem při jednotlivých vegetacích. Hmotnosti čerstvých rostlin první vegetace byly v porovnání hmotností rostlin druhé vegetace téměř dvojnásobné, proto je množství mědi přijaté rostlinami první vegetace menší než v případě druhé sklizeň. Hmotnosti rostlin třetí a čtvrté vegetace se od sebe příliš nelišily, proto je množství mědi stanovené v těchto dvou sklizních téměř totožné. Rozdíly mezi první, druhou a třetí vegetací může být způsobený i odlišnými odrůdami ředkve seté.

Rostliny první a druhé sklizeň byly vystaveny odlišným klimatickým podmínkám, které způsobily rozdíly v přijatém množství a tocích mědi do rostliny během jejího růstu. Z těchto důvodů je další pozornost věnována pouze třetí a čtvrté vegetaci, kdy tyto dva důležité faktory (klimatické podmínky a výnos rostlin) ovlivňující příjem mědi ředkvi setou nebyly tak rozdílné.

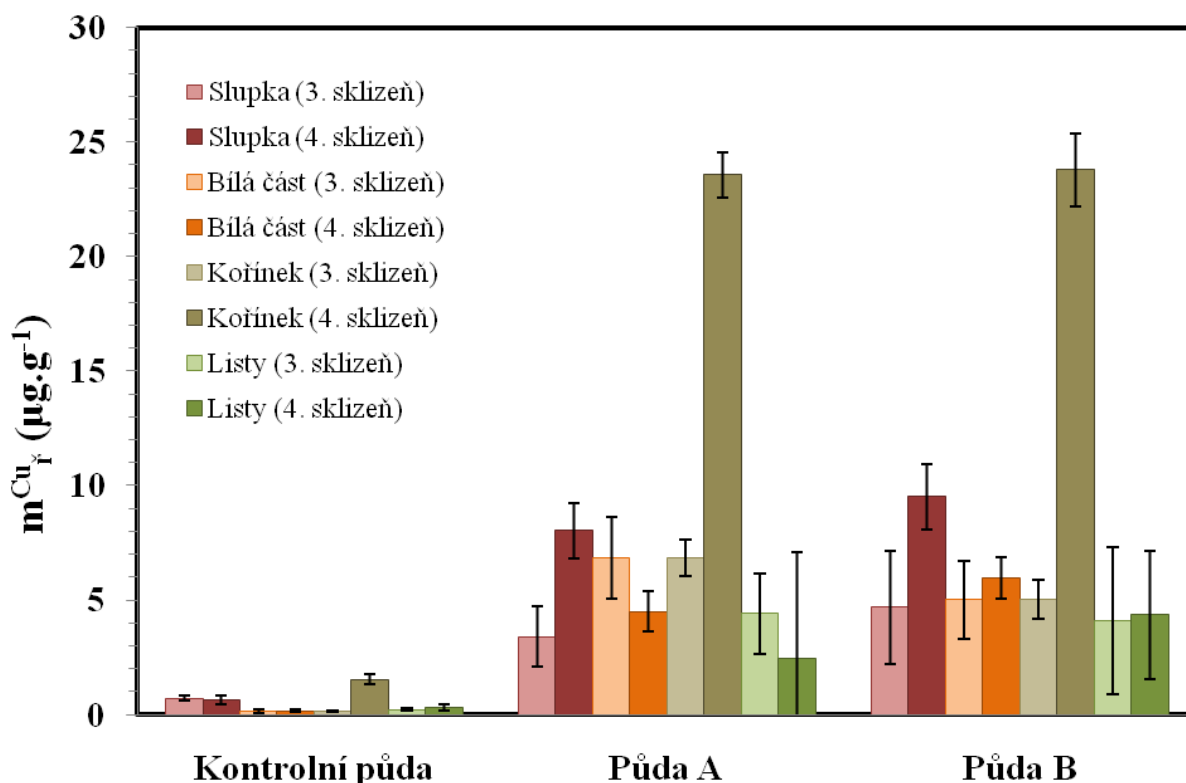


Obr. 5-6 Porovnání celkového množství mědi, m^{Cu}_Y , v čerstvé ředkvičce stanovené ve 4 vegetacích.



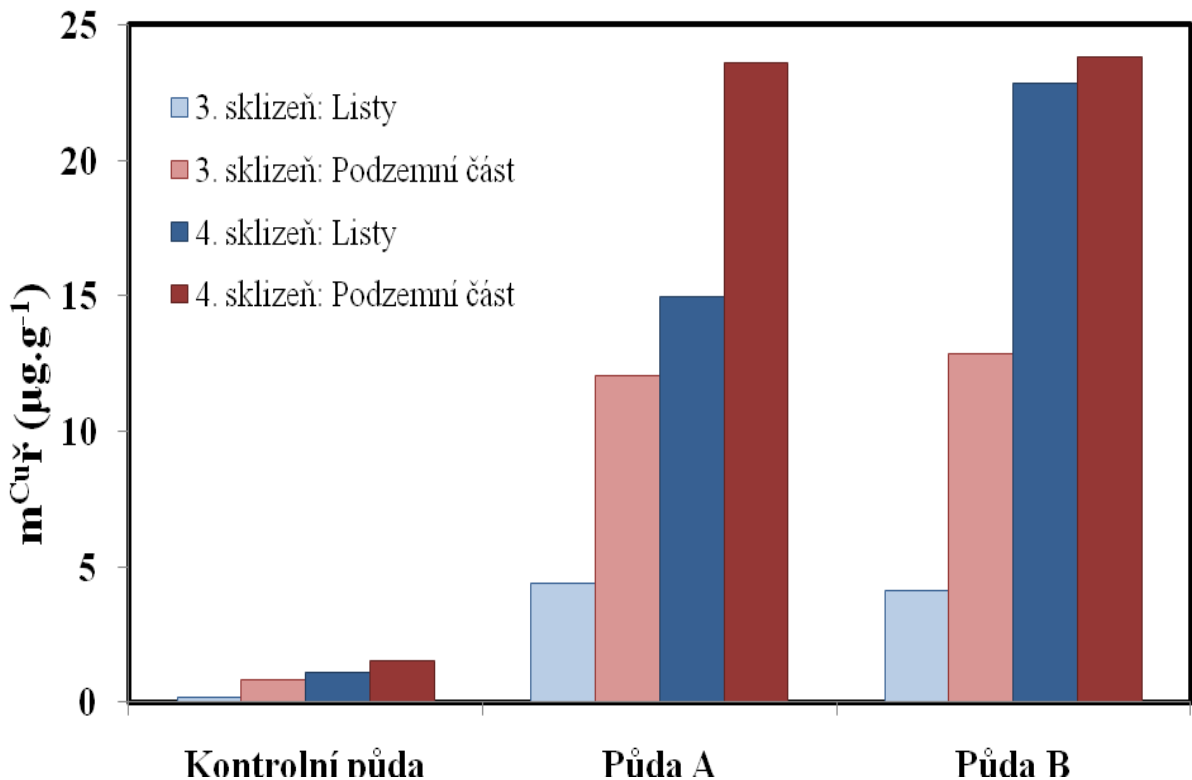
Obr. 5-7 Porovnání průměrného toku mědi do ředkvičky během jejího růstu stanoveného ve 4 vegetacích

Obsah mědi v jednotlivých částech rostlin ředkve seté třetí a čtvrté vegetace je znázorněn na Obr. 5-8. Z této závislosti je patrné, že obsah mědi v rostlině se zvyšuje s rostlucím množstvím měďnatých iontů přidaných do půdy. K ukládání mědi v jednotlivých tkáních rostliny dochází v následujícím pořadí: kořínky > slupka > bílá část bulvy > listy, což je nejvíce patrné u obohacených vzorků. Nejvyšší koncentrace mědi jsou přítomny v kořenovém systému rostlin. Měď je vázána nejvíce v kořenech především kvůli své vysoké afinitě ke karboxylovým skupinám, které jsou přítomné v buněčných membránách kořenového systému [121,122].



Obr. 5-8 3. a 4. sklizeň. Obsah mědi stanovený v jednotlivých částech ředkve seté.

Tento fakt potvrzuje i grafická závislost na Obr. 5-9, kde jsou porovnány třetí a čtvrtá vegetace z pohledu množství mědi vázaného v podzemní části rostliny (kořínek a kořenová bulva) a v listech. Největší koncentrace mědi jsou opět přítomny v kořenovém systému u všech půdních variant. Vysoké koncentrace mědi v listech rostlin čtvrté vegetace mohou být způsobeny malým množstvím vytvořené hmoty listů, což mohlo být způsobeno krátkodobým stresem během doby růstu.

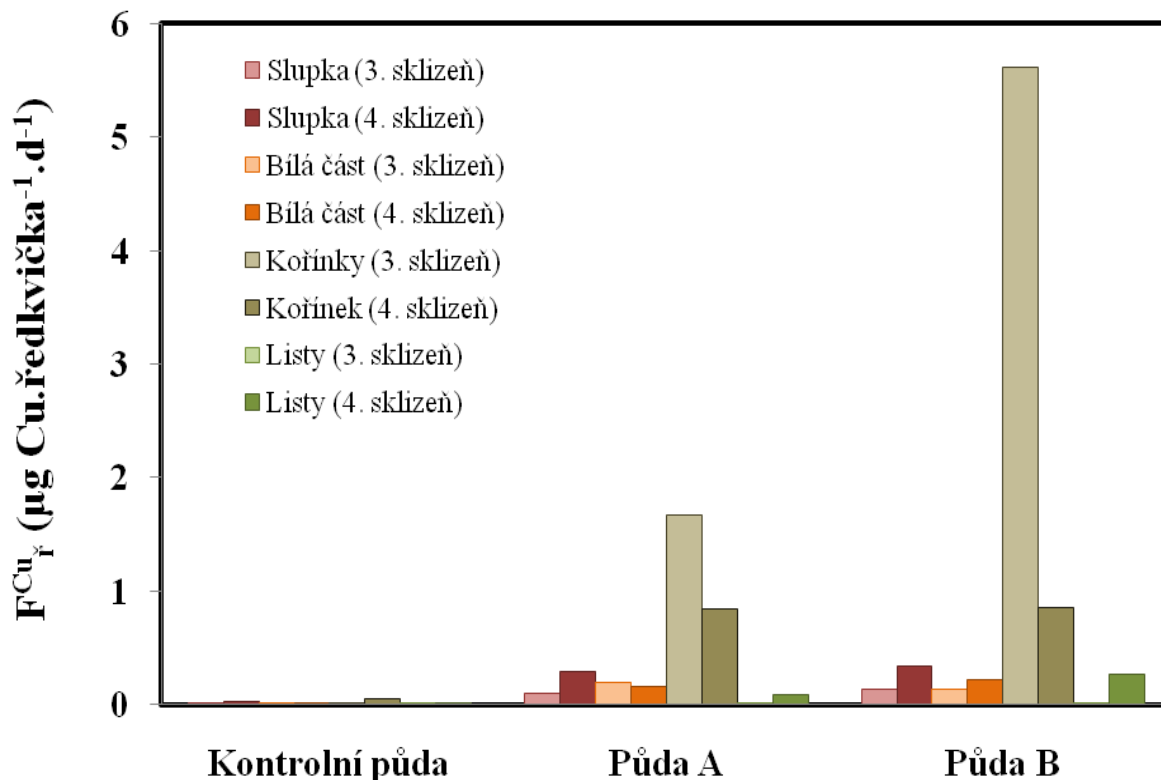


Obr. 5-9 3. a 4. sklizeň. Porovnání obsahu mědi v podzemní části a listech rostliny.

Další veličina, která byla sledována při vegetativních nádobových pokusech, byl průměrný tok mědi do rostliny během jejího růstu, F^{Cu} . Hodnoty tohoto toku stanovené pro všechny půdní varianty ve všech 4 sklizních jsou shrnuty v tabulce 5-8. Grafické znázornění jednotlivých toků mědi do rostliny během odby jejího růstu je zobrazeno na Obr. 5-7.

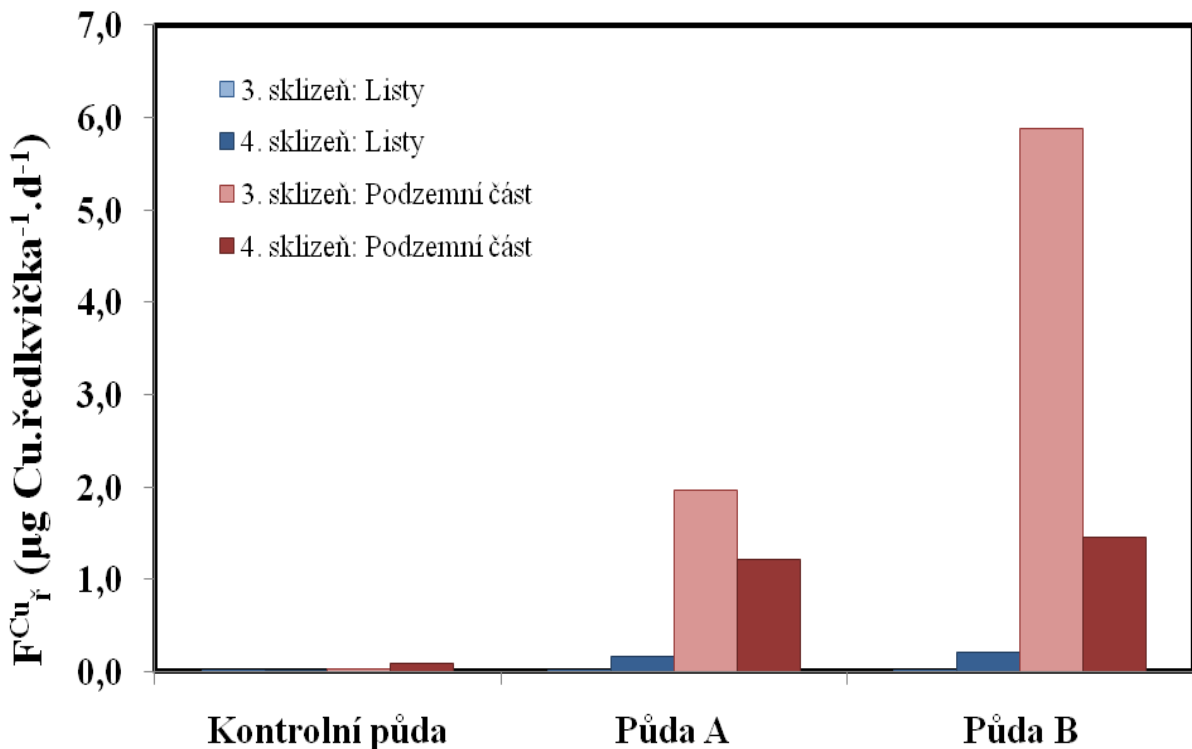
Na Obr. 5-10 je znázorněn průměrný tok iontů mědi do jednotlivých částí ředkvičky během růstu. Tok iontů do jednotlivých částí rostliny odpovídá postupnému ukládání mědi v rostlinných tkáních. Z této závislosti je také patrné, že průměrný tok iontů do kořínků rostlin třetí sklizně je několikrát vyšší než tok iontů do kořínků rostlin čtvrté sklizně. Tento rozdíl je možné vysvětlit změnou pH v průběhu doby růstu. Měď je nejvíce dostupná při pH rovném nebo menším než 6. Se zvyšujícím se pH dochází ke vzniku pevných vazeb mědi na půdní částice [13,123]. pH stanovené ve třetí sklizni se pohybovalo v rozmezí 6,2 až 6,5 a ve čtvrté sklizni v rozmezí 7,6 až 7,8. pH přirozených půd v oblasti Žabčic, odkud byl půdní vzorek odebíráán, se pohybuje v neutrální oblasti (6,5 až 7,4). V průběhu třetí kultivace došlo zřejmě k okyselení půdy v okolí kořenů rostlin, kdy dochází ke zvýšenému uvolňování iontů do půdního roztoku a ke zvýšení biodostupných forme mědi [38].

Vysoké hodnoty toku iontů do podzemní části rostlin třetí vegetace mohou být způsobeny také vyloučením látek z kořenového systému ředkve seté, které mají schopnost rozpuštět kovy vázané v půdních částicích [29,30]. Tyto látky jsou vylučovány v důsledku nedostatku železa nebo zinku a uvolňují měď do půdního roztoku [31].



Obr. 5-10 3. a 4. sklizeň. Porovnání průměrného toku mědi do jednotlivých částí rostlin.

Graf na Obr. 5-11 znázorňuje porovnání toku mědi do podzemní části a listů rostlin třetí a čtvrté vegetace. I zde je patrné, že tok mědi do podzemní části je v porovnání tokem mědi do listů je několikanásobně větší, což je možné vysvětlit jednak tím, že měď je nejvíce koncentrována v kořenovém systému rostlin a slupce kořenové bulvy a nižším pH zjištěným ve třetí vegetaci.



Obr. 5-11 3. a 4. sklizeň. Porovnání průměrného toku iontů mědi do podzemní části a listů rostliny.

5.3.1 Porovnání výsledků získaných extrakčními postupy, technikou DGT s výsledky nádobových pokusů s ředkvi setou

Hlavním cílem této práce bylo porovnání jednotlivých výsledků získaných z dílčích experimentů. V následující kapitole jsou porovnávány průměrné hodnoty obsahu mědi v celé rostlině, v listech a podzemní části rostliny stanovené ve třetí a ve čtvrté vegetaci s obsahem mědi stanovené ve výluzích kyseliny dusičné, dusičnanu sodného a deionizovanou vodou. Dále jsou v této kapitole porovnávány výsledky získané z nádobových pokusů s ředkvi setou s koncentrací mědi stanovené technikou DGT a koncentrací mědi stanovené v půdním roztoku.

5.3.1.1 Porovnání koncentrace mědi stanovené ve výluzích kyseliny dusičné, dusičnanu sodného a deionizované vody s koncentrací mědi stanovenou z nádobových pokusů

Množství mědi stanovené v celé rostlině ředkve seté, její podzemní části a listech bylo vztaženo ke koncentraci mědi stanovené ve výluzích použitých činidel (kyselina dusičná, dusičnan sodný a deionizovaná voda). Hodnoty koeficientů pravděpodobnosti byly získány ze závislosti $m_{\bar{r}}^{Cu} = f(C_{HNO_3}, C_{NaNO_3}, C_{H_2O})$ proložením závislosti lineární regresí.

Grafické znázornění těchto závislostí je uvedeno na Obr. 5-12 až 5-14. Protože závislosti pro čtvrtou vegetaci mají stejný průběh jako závislosti množství mědi stanovené v rostlině na množství mědi stanovené v jednotlivých výluzích pro třetí vegetaci, jsou znázorněny pouze závislosti pro třetí vegetaci.

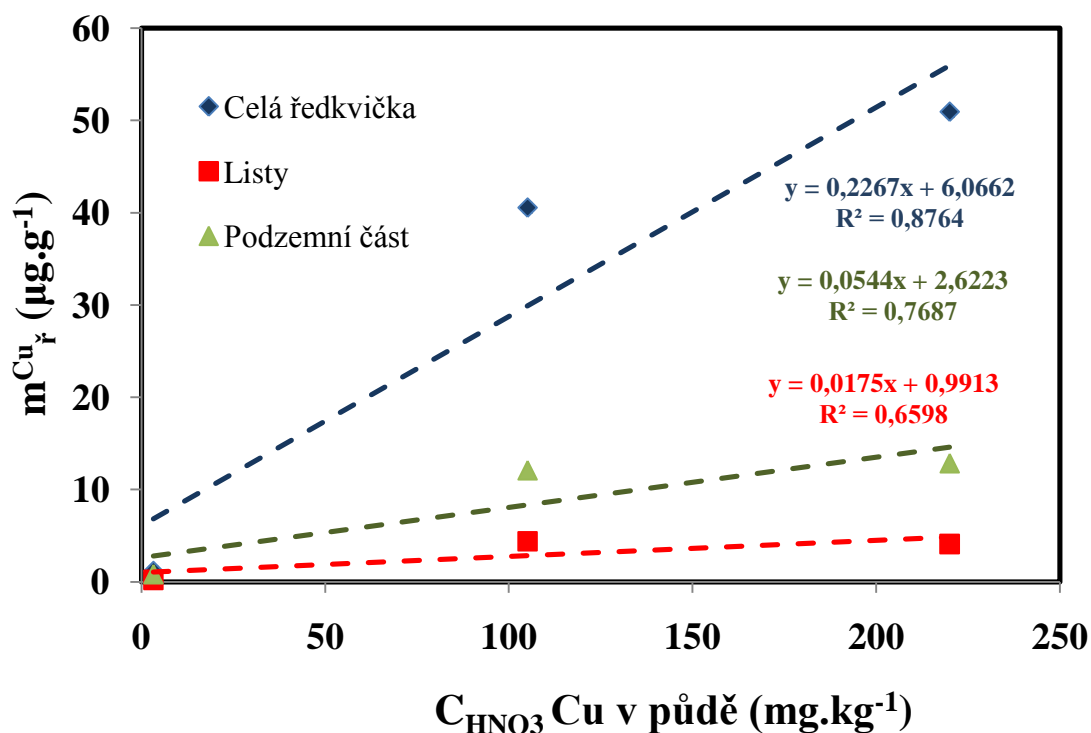
Z grafických závislostí na Obr. 5-12 až 5-14 a z hodnot uvedených v tabulce 5-9 lze usoudit, že koncentrace mědi přítomná v rostlinách dobře koreluje s koncentracemi mědi stanovené v jednotlivých výluzích. Velmi dobré korelace mědi stanovené v celé ředkvi a v její podzemní části jsou s výluhem dusičnanu sodného ($R^2 = 0,82$, $R^2 = 0,87$), který poskytuje informace o biodostupných formách prvků přítomných v půdě. Nízké hodnoty R^2 v případě listů potvrzují, že měď je převážně vázána v buněčných stěnách kořenového systému rostlin.

Tabulka 5-9 Shrnutí hodnot koeficientů pravděpodobnosti získaných ze závislosti $m^{Cu}_r = f(C_{HNO_3}, C_{NaNO_3}, C_{H_2O})$ pro třetí a čtvrtou vegetaci

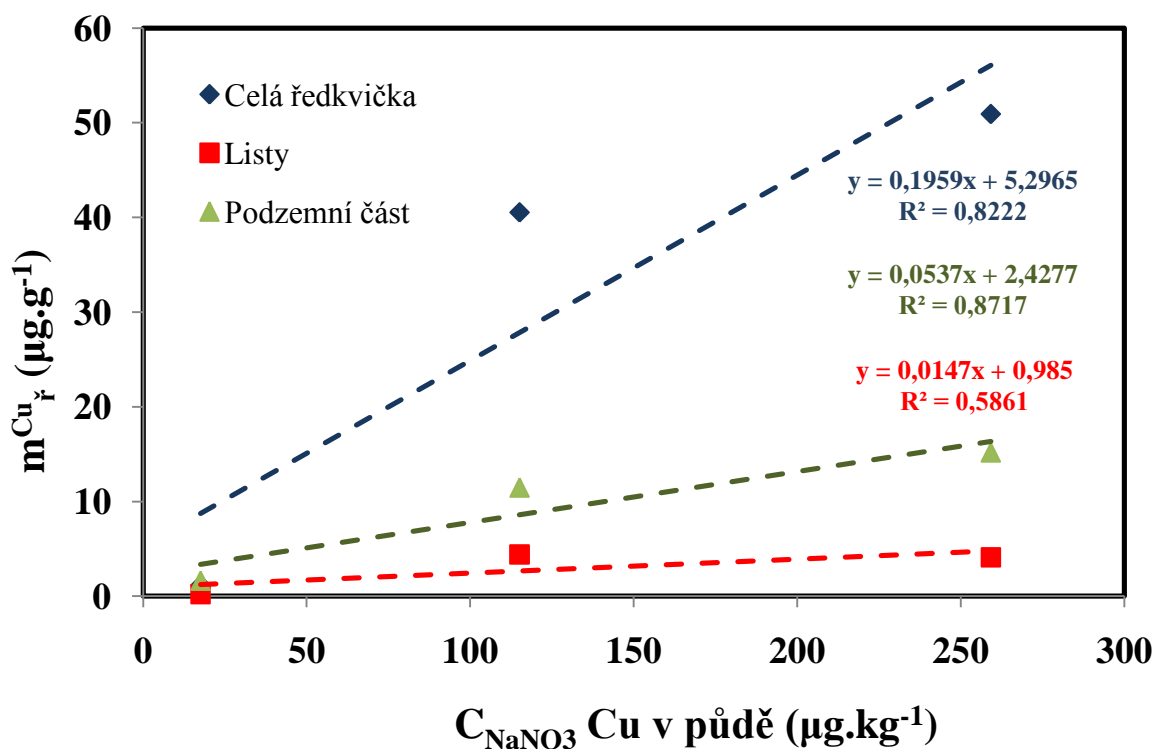
3. sklizeň (hodnoty koeficientů pravděpodobnosti)			
	HNO₃	NaNO₃	deion. H₂O
celá rostlina	0,8764	0,8222	0,7301
podzemní část	0,7687	0,8717	0,5959
listy	0,6598	0,5861	0,4755
4. sklizeň (hodnoty koeficientů pravděpodobnosti)			
celá rostlina	0,9044	0,8552	0,7689
podzemní část	0,9629	0,9290	0,8618
listy	0,7268	0,6567	0,5482

Dobré korelace mezi množstvím mědi přítomným v celé rostlině a ve výluzích kyselinou dusičnou ($R^2 = 0,88$), která podává informace o všech frakcích přítomných v půdě.

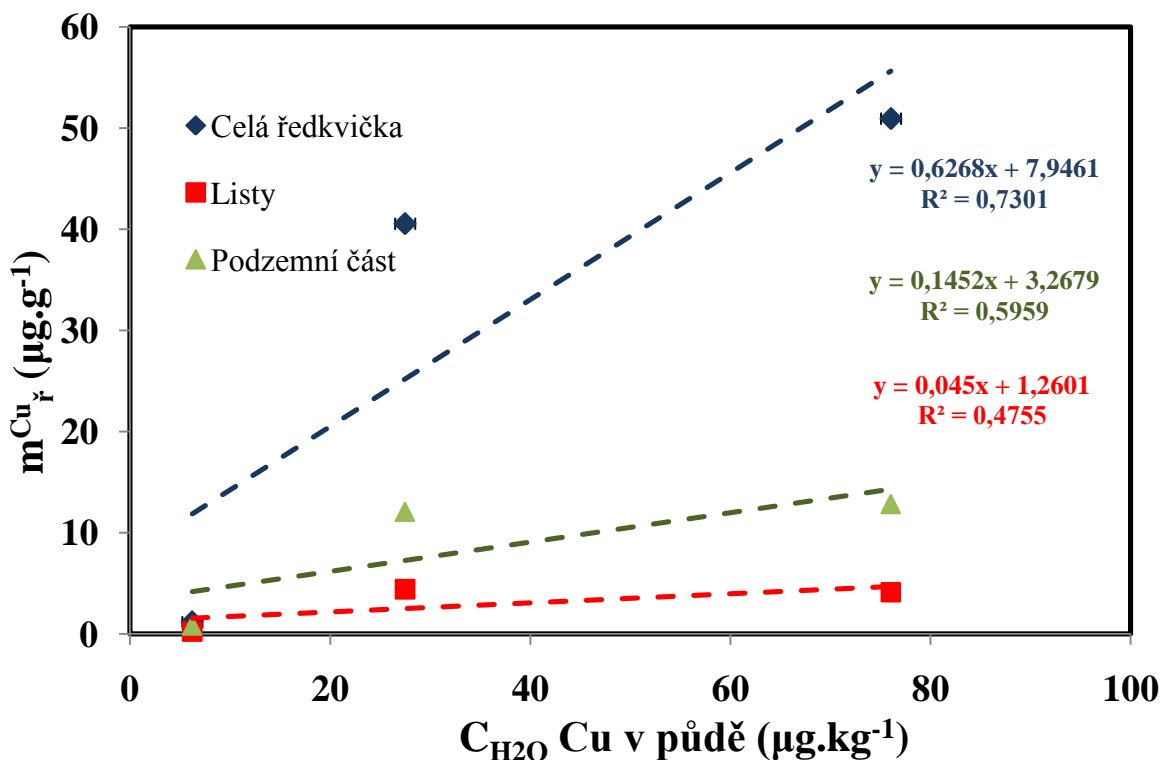
Nejnižší hodnoty koeficientů pravděpodobnosti byly zjištěny při porovnání množství mědi v ředkvi s množstvím mědi stanoveným ve vodném výluhu.



Obr. 5-12 3. sklizeň. Porovnání množství mědi obsažené v ředkvi seté a její podzemní části a listech s množstvím mědi stanoveným ve výluhu HNO_3 .



Obr. 5-13 3. sklizeň. Porovnání množství mědi obsažené v ředkvi seté a její podzemní části a listech s množstvím mědi stanoveným ve výluhu $NaNO_3$.



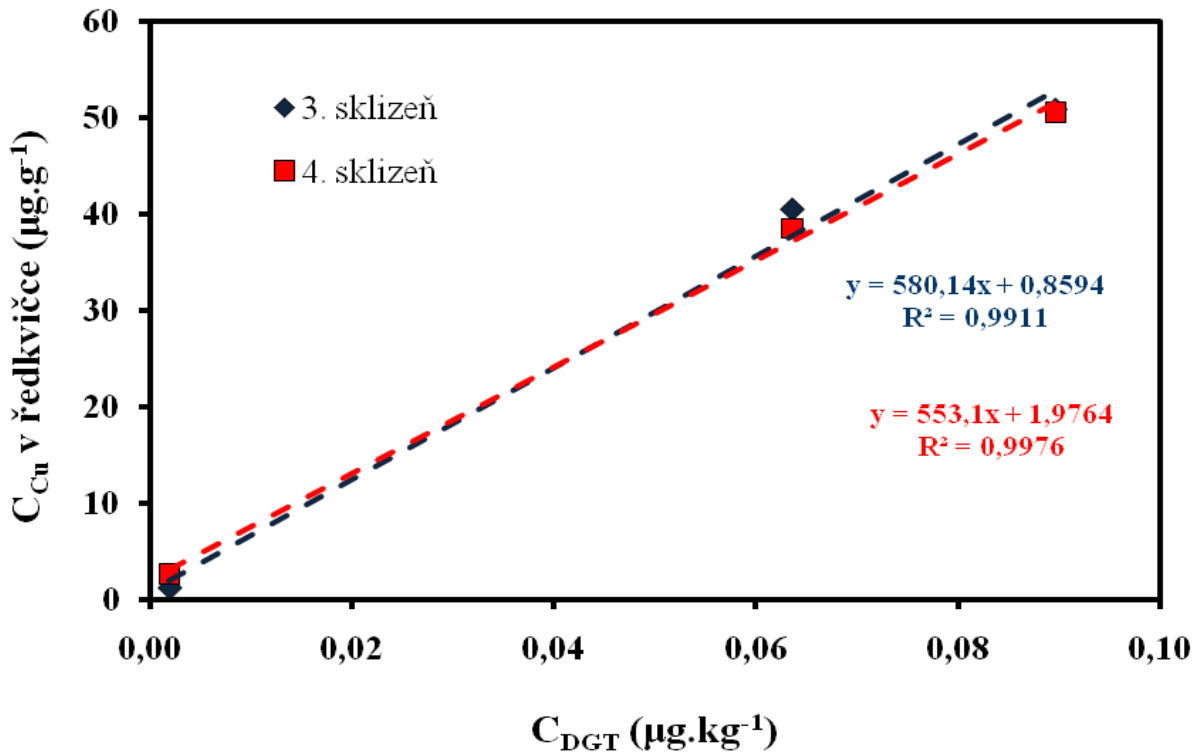
Obr. 5-14 3. sklizeň. Porovnání množství mědi obsažené v ředkvi seté a její podzemní části a listech s množstvím mědi stanoveným ve výluhu deionizované vody.

5.3.1.2 Srovnání obsahu mědi stanovené v ředkvi seté s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT

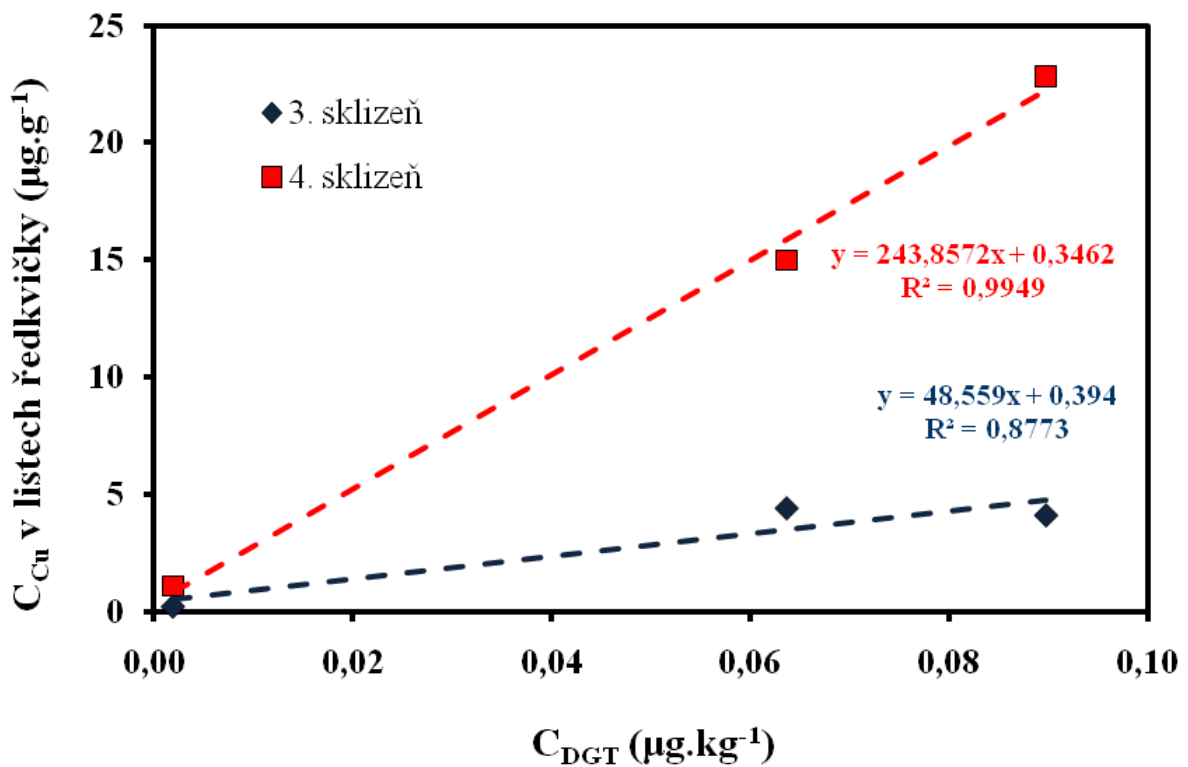
Jak již bylo zmiňováno v kapitole o technice DGT v teoretické části této dizertační práce (kap 3.4), technika DGT aplikovaná do půd je schopna stanovit formy kovů dostupné rostlinám, jejichž koncentrace je vyjádřena tzv. efektivní koncentrací, C_E . V následující kapitole jsou diskutovány korelace této efektivní koncentrace s koncentrací mědi stanovené v ředkvičce a její podzemní části a listech ve třetí a čtvrté vegetaci (Obr. 5-15 až 5-17).

Významné korelace mezi jednotlivými koncentracemi jsou patrné pro čtvrtou vegetaci v případě koncentrace stanovené v celé rostlině ($R^2 = 0,998$) a v listech ($R^2 = 0,995$). V případě porovnání koncentrace mědi stanovené v podzemní části ředkve seté a koncentrace mědi stanovené technikou DGT spolu tyto hodnoty korelují ve třetí sklizni ($R^2 = 0,945$). V případě čtvrté sklizně je hodnota koeficientu pravděpodobnosti $R^2 = 0,921$. Tento rozdíl může být způsoben systematickou chybou při měření.

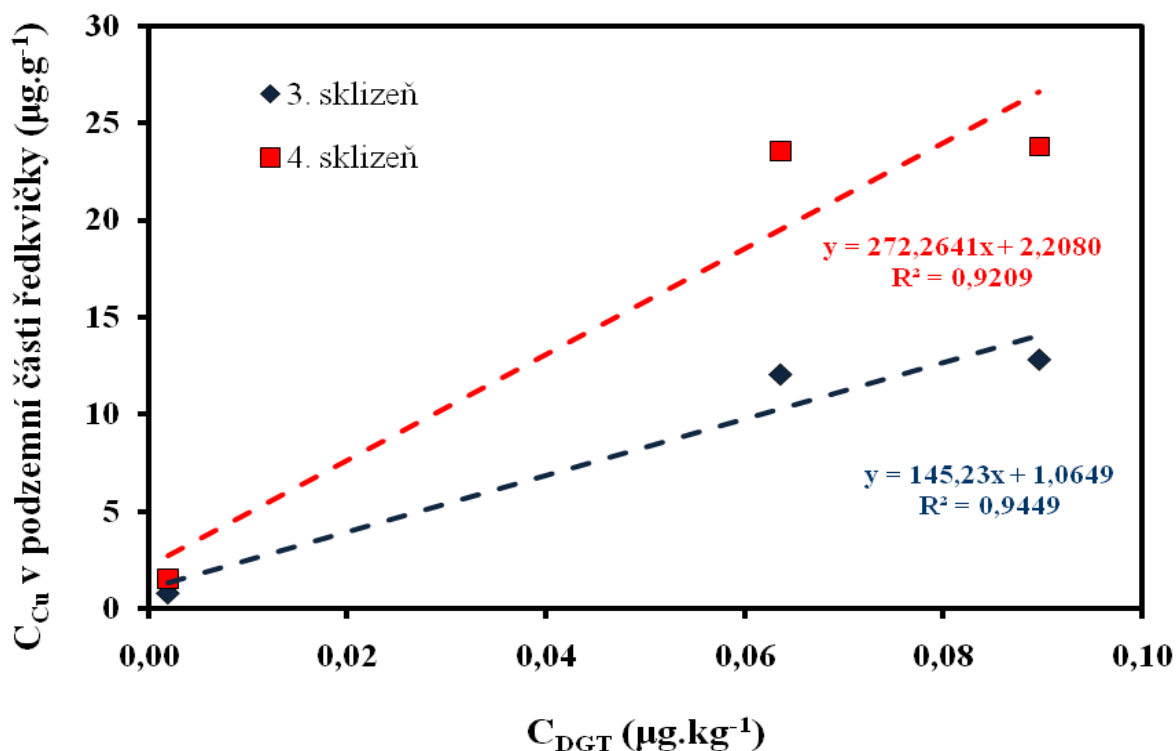
Hodnoty koeficientů pravděpodobnosti R^2 ukazují dobré lineární závislosti mezi koncentrací mědi stanovené v rostlině a koncentrací mědi stanovené technikou DGT, což potvrzuje, že pomocí techniky DGT je možné stanovit biodostupné formy mědi přítomné v půdě a že technika DGT simuluje příjem mědi kořenovým systémem.



Obr. 5-15 Porovnání celkové koncentrace mědi v ředkviče s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT.



Obr. 5-16 Porovnání koncentrace mědi stanovené v listech ředkve seté s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT.

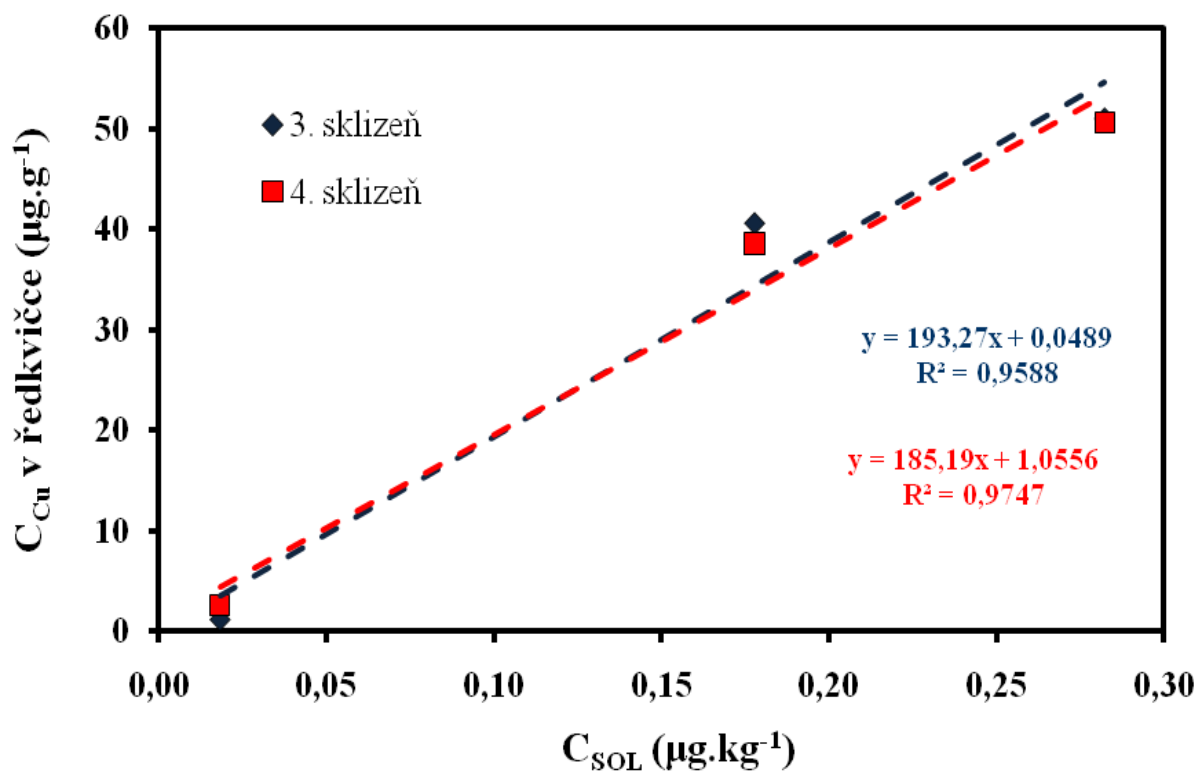


Obr. 5-17 Porovnání koncentrace mědi stanovené v podzemní části ředkve seté s koncentrací mědi stanovenou technikou DGT.

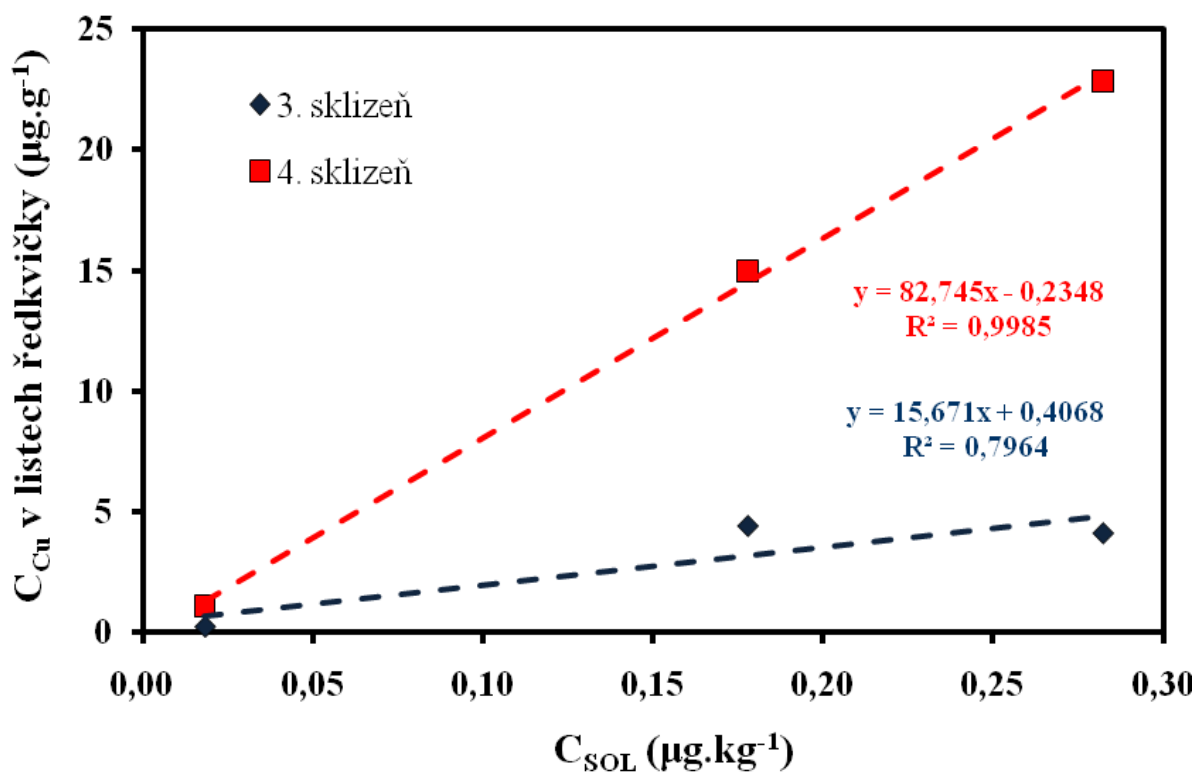
5.3.1.3 Porovnání koncentrace mědi stanovené v ředkvi seté a koncentrací mědi zjištěné v půdním roztoku

Grafické znázornění závislosti množství mědi stanovené v rostlině, její podzemní části a listech na množství mědi stanovené v půdním roztoku, $C_{Cu}^r = f(C_{SOL})$, jsou znázorněny na Obr. 5-18 až 5-20. Z těchto grafů jsou patrné lineární závislosti mezi těmito veličinami, ze kterých lze říci, že obsah mědi v ředkvičce se vzrůstá se zvyšujícím se množstvím měďnatých iontů přítomných v půdním roztoku.

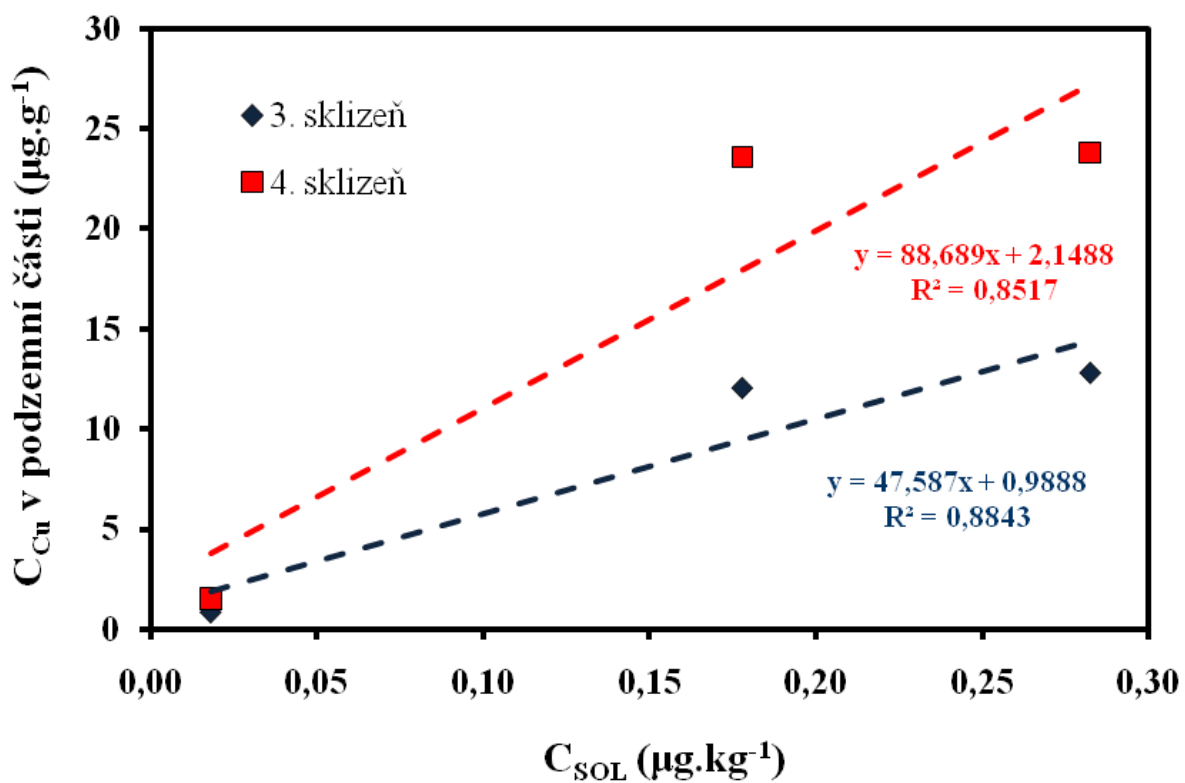
Významné korelace jsou patrné stejně jako v případě porovnání koncentrace mědi stanovené v ředkvičce s koncentrací mědi stanovené technikou DGT pro čtvrtou vegetaci v případě celkového množství v ředkvičce ($R^2 = 0,9747$) a listech ředkvičky ($R^2 = 0,9985$).



Obr. 5-18 Porovnání obsahu mědi stanovené v půdním roztoku a obsahu mědi stanovené v celé rostlině.



Obr. 5-19 Porovnání obsahu mědi stanovené v půdním roztoku s množstvím mědi přítomným v listech ředkvičky.



Obr. 5-20 Porovnání obsahu mědi stanovené v půdním roztoku s množstvím mědi stanoveným v podzemní části ředkvičky.

6. ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo porovnat příjem mědi ředkvi setou (*Raphanus sativus* L.) pěstovanou na půdách s různým obsahem tohoto kovu, dále určit distribuci mědi v jednotlivých částech rostliny a získané výsledky porovnat s koncentrací mědi v půdě zjištěné technikou DGT a koncentrací získanou extrakčními postupy a analýzou půdního roztoku.

Vegetační nádobové pokusy s ředkvi setou probíhaly v období od dubna do září roku 2008. Rostliny byly pěstovány na přirozeném neobohaceném půdním vzorku a půdních vzorcích obohacených roztokem mědi o koncentraci 100 a 200 mg.kg⁻¹ v Mitscherlichových vegetačních nádobách na volném prostranství. Po uplynutí doby růstu byly rostliny sklizeny a odděleny jednotlivé části – kořínky, kořenové bulva, jež byla rozdělena na slupku a bílou část, a listy. Tyto části byly rozloženy v mineralizátoru APION a obsah mědi v každé části rostliny byl stanoven metodou ET – AAS. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že měď přijatá z půdy je nejvíce vázána v podzemní části rostliny, především v kořenech a slupce kořenové bulvy. Rostlina je schopná do svých tkání přijmout určité množství mědi, které ale není pro člověka závadné a nevytváří zdravotní riziko. Doporučená denní dávka mědi pro člověka je 1 mg Cu, otrava mědí se projeví teprve po požití 250 g měďnatých solí. Bylo též zjištěno, že množství mědi přijaté rostlinou je ovlivněno některými faktory, a to klimatickými podmínkami, pH půdy a hmotností rostlin.

Pro odhad celkového obsahu, biodostupnosti a mobility mědi v odebraném půdním vzorku byly použity extrakce kyselinou dusičnou, dusičnanem sodným a deionizovanou vodou. Současně byl analyzován odebraný půdní roztok. Množství mědi zjištěné ve výluzích kyseliny dusičné dokazuje, že půdní vzorky byly obohaceny v požadovaném množství 100 a 200 mg.kg⁻¹ Cu. Byly zjištěny vysoké hodnoty korelačních koeficientů pro korelaci obsahu mědi v rostlině a její podzemní části s obsahem mědi v půdě stanoveném extrakcí dusičnanem sodným ($R^2 > 0,8$), který poskytuje informace o biodostupných formách kovů přítomných v půdě. Nízké hodnoty koeficientů ($R^2 > 0,5$) z porovnání obsahu mědi ve výluzích a v listech ředkve ukazují, že měď je vázána především v buněčných stěnách kořenového systému rostlin.

Technika difúzního gradientu v tenkých filmech byla použita pro měření obsahu mědi v neobohacené a obou obohacených půdních vzorcích. Při studiu vlivu experimentálních parametrů techniky DGT na množství mědi v půdě bylo zjištěno, že půdní systém obohacených půd je schopen uvolňovat měďnaté ionty do půdního roztoku z pevné fáze půdy a doplňovat úbytek způsobený sorpcí měďnatých iontů na iontoměnič Chelex-100 v sorpčním gelu, takže je jejich koncentrace v blízkosti vzorkovací jednotky DGT konstantní. Půda neobohacená po 24 hodinách přestává plně doplňovat úbytek iontů. Měď přidaná do půdy ve formě měďnaté soli se i po měsíční době ekvilibrace

před experimentem nachází v půdě i v jiné formě než měď přirozeně se v půdě vyskytující.

V závěrečné části této dizertační práce byl obsah mědi zjištěný technikou DGT porovnáván s obsahem mědi stanoveným ve výluzích použitých extrakčních činidel a obsahem mědi zjištěným v ředkvi seté a jejích částech. Rozdíl v obsahu mědi v půdách získaný pomocí extrakce kyselinou dusičnou a technikou DGT činil pět řádů, mezi dusičnanem sodným a DGT dva řády. Pomocí analýzy půdního roztoku byla nalezena trojnásobná koncentrace mědi v půdě oproti obsahu stanovenému DGT technikou. Lze se domnívat, že koncentrace mědi změřená technikou DGT odpovídá lépe skutečnému obsahu biodostupných forem mědi v půdě než hodnoty získané běžně používanými extrakčními postupy.

Techniku DGT lze tedy doporučit jako techniku vhodnou pro stanovení biodostupných forem mědi, což lze podpořit vysokým korelačním koeficientem ($R^2 > 0,95$) mezi obsahem mědi v ředkvi a obsahem mědi v půdách stanoveným technikou DGT. Technika DGT je v současné době jediná technika, která *in situ* simuluje kořenový systém rostlin.

7. SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

-
- [1] MIRSAL, I. A. *Soil Pollution: Origin, Monitoring and Remediation*. 2nd edition. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2008. Soil Properties, s. 50-55. ISBN 978-3-540-70775-2.
- [2] ALLOWAY, B.J. Soil processes and the behavior of heavy metals. In *Heavy metals in soils*. 2nd edition. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, 1995. s. 11-38. ISBN 0751401986.
- [3] RICHTER, R. *Multimediální učební texty z výživy rostlin: Sorpční vlastnosti půdy. Fyzikálně chemická sorpce*. Ústav agrochemie a výživy rostlin, Mendelova univerzita v Brně, 2003. [cit. 2010-11-17]. Dostupné z: <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/a_index_agrochem.htm>.
- [4] BRUEMMER, G.W.; GERTH, J.; HERMS, U. Heavy metal species, mobility and availability in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 1986, vol. 149, s. 382-398.
- [5] TIWARI, R.C.; KUMAR, B.M. Specific adsorption of copper and zinc in different soils. *Proc. Indian nat. Sci. Acad.* 1980, 4, s. 393-398.
- [6] PRASAD, M.N.V. Plant-mineral nutrition: macro- and micro nutrients, uptake, functions, deficiency and toxicity symptoms. Hyderabad. 1 - 31 s. University of Hyderabad.
- [7] KABATA-PENDIDAS, A. Behavioral properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry*. 1993, 2, s. 3-9.
- [8] CHESWORTH, W. Factors of soil formation. In *Encyclopedia of soil science*. Netherlands: Springer, 2008, s. 229-230.
- [9] *Earth Science Australia: Weathering and Soils*. 1996 [cit. 2010-11-17]. Dostupné z: <<http://earthsci.org/education/teacher/basicgeol/weasoil/weasoil.html>>.
- [10] D'AMORE, J.J., et al. Methods for speciation of metals in soils. A review. *J. Environmental. Quality*. 2005, 34, s. 1707-1745.
- [11] Heavy metal soils contamination. Soil Quality - Urban Technical note. 2000, 3, s. 7.
- [12] SHAMA, S.K., et al. Transport and fate of copper in soils. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*. 2009, 1, s. 1-6.
- [13] ADRIANO, D.C. Copper. In *Trace elements in Terrestrial Environments: Biochemistry, Bioavailability and Risks of metals*. 2nd edition. New York, USA: Springer, 2001, s. 499-547. ISBN 0-387-98678-2.
- [14] BAKER, D.E.; SENEFF, J.P. Copper. In *Heavy metals in soils*. 2nd edition. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, 1995. s. 179-206. ISBN 0-7514-0198-6.

-
- [15] THORNTON, I.; PLANT, J. Regional geochemical mapping and health in the United Kingdom. *Journal of the Geological Society of London*. 1979, 137, s. 575-586.
- [16] SAUVÉ, S., et al. *Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: Effect of copper level, pH and organic matter*. *Water, Air and Soil Pollution*. 1997, 100, s. 133-149.
- [17] Podklady k provádění Protokolu o PRTR - Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd. Praha: VŠB, MŽP, 2008. 9 s.
- [18] MCLAREN, R.G.; CRAWFORD, D.V. Studies on soil copper I: The fractionation of copper in soils. *Journal of Soil Science*. 1973a, 24, s. 172-181.
- [19] BAKER, A.J.M.; WALKER, P.L. Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants, In *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 1990, s. 155-177.
- [20] BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements - A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery*. 1989, 1, s. 81-126.
- [21] RICHTER, R. *Multimediální učební texty z výživy rostlin: Příjem živin rostlinami*, Ústav agrochemie a výživy rostlin, Mendelova univerzita v Brně, 2003. [cit. 2010-5-10]. Dostupné z: <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/prijem_zivin/a_index_prijem_zivin.htm>.
- [22] TRČKOVÁ, M.; ZMRHAL, Z. Genetické rozdíly v příjmu živin obilovinami. *Obilnářské listy*. 1998, 2.
- [23] HYKEL, Z. *Zahrady Hykel.cz* [online]. Dostupné z: <http://zahradyhykel.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=99&Itemid=1>.
- [24] SOCHOR, M. *Botanika - teorie a praxe: Kořen (radix, rhiza)*. [online]. [cit. 2010-05-05]. Dostupné z: <http://botanika.borec.cz/o_koren.php>.
- [25] MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press Limited, 1995. 889 s. ISBN 0-12-473543-6.
- [26] CLAASEN, N.; STEINGROBE, B. *Mechanistic simulation models for a better understanding of nutrient uptake from soil*, In *Mineral nutrition of crops: fundamental mechanism and implications*. Binghamton, BY: Food Products Press, 1999, s. 328-329.
- [27] CLARKSON, D.T.; LÜTTGE, U. III. Mineral nutrition: Divalent cations, transport and compartmentation. *Prog Botany*. 1989, 51, s. 93-112.
- [28] RASKIN, I., et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 1994, 5, s. 285-290.
- [29] KINNERSLEY, A.M. The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Plant Growth Revolution*. 1993, 12, s. 207-218.

-
- [30] Terminologický slovník Biologických listů. In Biologické listy [online]. Praha, ČR: Ústav molekulární genetiky AV ČR, 1995 [cit. 2010-12-17]. Dostupné z: <http://www.img.cas.cz/bl/termin_slov_serazen040628.htm>.
- [31] RÖMHELD, V. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant and Soil*. 1991, 130, s. 127-134.
- [32] KAY, J., et al. Naturally occurring and recombinant methallothioneins: Structure, Immunoreactivity and metal-binding function. *Int. J. Biochem.* 1991, 23, s. 1-5.
- [33] RAUSER, W. Phytochelatins. *Annu Rev. Biochem.* 1990, 59, s. 61-86.
- [34] BABULA, P., et al. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: A review. *Environ. Chem. Lett.* 2008, 6, s. 189-213.
- [35] VAMERALLI, T.; BANDIERA, M.; MOSCA, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land: A review. *Environ. Chem. Lett.* 2009
- [36] KIM, S., et al. Enhanced heavy metal phytoextraction by *Echinochloa crus-galli* using root exudates. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2003, 109, s. 47-50.
- [37] WELCH, R.M., et al. Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta.* 1993, 190, s. 555-561.
- [38] CROWLEY, D.E., et al. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*. 1991, 130, s. 179-198.
- [39] VÖGELI-LANGE, R.; WAGNER, G.J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implications of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.* 1990, 92, s. 1086-1093.
- [40] ROBINSON, N.J., et al. Genes with similarity to methallothionein genes and copper, zinc ligands in *Pisum sativum* L.. *Plant and Soil*. 1992, 146, s. 271-280.
- [41] RAVEN, J.A.; EVANS, M.C.V.; KORB, R.E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthetic Research.* 1999, 60, s. 111-149.
- [42] INMACULADA, Y. Copper in plants. *Brazil. J. Plant. Physiol.*, 2005, 17, s. 145-156.
- [43] BASZYNSKI, T., et al. The effect of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 1978, 89, s. 207-216.
- [44] SHIKANAI, T., et al. PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, Functions in Copper Transport in Chloroplasts. *The Plant Cell.* 2003, 15, s. 1333-1346.

-
- [45] BARR, R.; CRANE, F.L. A study of chloroplast membrane polypeptides from mineral deficient maize in relation to photosynthetic activity. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 1974, 83, s. 95-100.
- [46] SAVINI, I., et al. The role of copper in the stability of ascorbate oxidase towards denaturing agents. *European Journal of Biochemistry*. 1990, 190, s. 491-495.
- [47] DOOLEY, D.M., et al. A Cu(I)-semiquinone state in substrate-reduced amine oxidases. *Nature*. 1991a, 349, s. 262-264.
- [48] DOOLEY, D.M., et al. Coordination chemistry of copper-containing amine oxidase: nuclear magnetic relaxation dispersion studies of copper binding, solvent-water exchange, substrate and inhibitor binding and protein aggregation. *J. amer. chem. Soc.* 1991b, 113, s. 754-761.
- [49] CHEN, E.L, et al. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiol. Biochem.* 2002, 40, s. 439-444.
- [50] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984, 219, s. 1-14.
- [51] VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity of plants. *Plant, Cell & Environment*. 1990, 13, s. 195-206.
- [52] MEHARG, A.A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell & Environment*. 1994, 17, s. 989-993.
- [53] TEKLIĆ, T., et al. Antioxidative responses in radish (*Raphanus sativus* L.) plants stressed by copper and lead in nutrition solution and soil. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 2008, 50/2, s. 79-86.
- [54] GUPTA, M., et al. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant*. 1999, 106, s. 262-267.
- [55] DRAZKIEWICZ, M.; SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Sci.* 2003, 164, s. 195-202.
- [56] FERNANDES, J.C.; HENRIQUES, F.S. Biochemical, Physiological and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *The Botanical Review*. 1991, 57, s. 246-273.
- [57] ZHOU, D.M., et al. Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected application of livestock and poultry manures. *Chemosphere*. 2005, 59, s. 167-175.
- [58] KIEKENS, L.; COTTENIE, A.; VAN LANDSCHOOT, G. Chemical activity and biological effects of sludge-born heavy metals and inorganic metal salts added to soils. *Plant and Soil*. 1984, 79, s. 89-99.
- [59] MOORE, J.W.; RAMAMOORTHY, S. *Applied monitoring as impact assessment*, In *Heavy metals in natural waters*. New York: Springer-Verlag, 1984, s. 268.

-
- [60] SANDERS, J.R.; MCGRATH, S.P.; ADAMS, T.M. Zinc, cadmium and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. *Sci. Food Agric.*. 1986b, 37, s. 961-968.
- [61] DIJKSHOORN, W.; LAMPE, J.E.; VAN BROEKHOVEN, L.W. Influence of soil pH on heavy metals in ryegrass from sludge-amended soil. *Plant and Soil*. 1981, 61, s. 277-284.
- [62] LES, A.; WALKER, R.W. Toxicity and binding of copper, zinc, and cadmium by the blue-green alga, *Chroococcus parisi*. *Water, Air and Soil Pollution*. 1984, 23, s. 129-139.
- [63] SCHECHER, W.D.; DRISCOLL, C.T. Interactions of copper and lead with *Nostoc muscorum*. *Water, Air and Soil Pollution*. 1985, 24, s. 85-101.
- [64] JARVIS, S.C.; WHITEHEAD, D.C. The influence of some soil and plant factors on the concentration of copper in perennial ryegrass. *Plant and Soil*. 1981, 60, s. 275-286.
- [65] MCNAIR, M.R. The uptake of copper by plants of *Mimulus guttatus* differing in genotype primarily at a single major copper tolerance locus. *New Phytol.* 1981, 88, s. 723-730.
- [66] BASZYNSKI, T., et al. Photosynthetic apparatus of spinach exposed to excess copper. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982, 108, s. 385-395.
- [67] TUKENDORF, A. Copper binding in roots by cytosol proteins in vitro. *J. Pl. Physiol.*. 1987, 130, s. 201-209.
- [68] SALIM, R.; AL-SUBU, M.M.; ATALLAH, A. Effects of root and foliar treatments with lead, cadmium, and copper on the uptake distribution and growth of radish plants. *Environment International*. 1993, 19, s. 393 - 404.
- [69] NOWACK, B., et al. Use of diffusive Gradients in Thin Films (DGT) in undisturbed field soils. *Ibid.* 2004, 38, s. 1133-1138.
- [70] ZHANG, H., et al. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science and Technology*. 2001, 12, s. 2602-2607.
- [71] KOPLÍK, R.; ČURDOVÁ, E.; MESTEK, O. Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. *Chemické listy*. 1997, 91, s. 47-54.
- [72] FUENTES, A., et al. Simple and sequential extractions of heavy metals from different sewage sludge. *Chemosphere*. 2004, 54, s. 1039-1047.
- [73] TEMPLETON, D.M., et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 2000, 8, s. 1453-1470.
- [74] TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*. 1979, 7, s. 844-851.

-
- [75] TOKALIOGLU, S., et al. Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta.* 2000, 413, s. 33-40.
- [76] DAVISON, C.M.; THOMAS, R.P.; MCVERY, S.E. Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation of heavy metals in sediments. *Anal. Chim. Acta.* 1994, 291, s. 277-286.
- [77] AGEMIAN, H.; CHAU, A.S.Y. Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments. *Talanta.* 1976, 101, s. 761-767.
- [78] SORIANO-DISLA, J.M., et al. Evaluation of single chemical extractants for the prediction of heavy metal uptake by barley in soils amended with polluted sewage sludge. *Plant and Soil.* 2010, 327, s. 303-314.
- [79] ISO 11466. *Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia.* Geneva: International Organization for Standardization, 1995. 6 s.
- [80] ZHANG, W., et al. Influence of EDTA washing on the species and mobility of heavy metals residual in soils. *Journal of Hazardous Materials.* 2010, 173, s. 369-376.
- [81] QUEVAUVILLER, P. The EC standards, measurements and testing program in support of the quality control of waste analysis. *Talanta.* 1998a, 46, s. 457-463.
- [82] MCGRATH, D. Application of single and sequential extraction procedures to polluted and unpolluted soils. *The Science of the total Environment.* 1996, 178, s. 37-44.
- [83] ZHANG, L., et al. Extraction of copper from sewage sludge using biodegradable chelant EDDS. *Journal of Environmental Science.* 2008, 20, s. 970-974.
- [84] ESNAOLA, M.V.; MILLAN, E. Effect of acid precipitation on the mobilization and leaching of heavy metals from contaminated soils. *Environmental Technology.* 1998, 19, s. 567-578.
- [85] BUCCOLIERI, A., et al. Monitoring of total and bioavailable heavy metal concentration in agricultural soils. *Environ. Monit. Assess.* 2009.
- [86] HORNBURG, V.; WELP, G.; BRÜMMER, G.W. Behavior of heavy metals in soils 2. Extraction of mobile heavy metals with CaCl_2 and NH_4NO_3 . *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 2007, 158, s. 137-145.
- [87] PUEYO, M.; LOPÉZ-SÁNCHEZ, J.F.; RAURET, G. Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 504, s. 217-226.
- [88] HOUBA, V.J.G., et al. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *The Science of the total Environment.* 1996, 178, s. 21-28.

-
- [89] NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, Th. M.; HOUBA, V.J.G. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1992, 51, s. 47-58.
- [90] KOMÁREK, M., et al. The role of chloride salts in chemically enhanced phytoextraction of heavy metals from a contaminated agricultural soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2007, 2, s. 176-180.
- [91] KOMÁREK, M., et al. The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environmental Pollution*. 2008, 1, s. 27-38.
- [92] FENG, M.H., et al. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere*. 2005a, 59, s. 939-949.
- [93] PEIJNENBURG, W.J.G.M.; ZABLOSKAJA, M.; VIJVER, M.G. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007, 67, s. 163-179.
- [94] Česká republika. Vyhláška Ministerstva životního prostředí ze dne 29. prosince 1993. In *13/1994 Sb.* 1994, 38/2007 a 18/2007, s. 1-12.
- [95] LAVADO, R.S.; PORCELLI, C.A. Contents and main fractions of trace elements in Typic Argiudolls of the Argentinean Pampas. *Chem. Spec. Bioavailab.* 2000, 2, s. 67-70.
- [96] KAASALAINEN, M.; YLI-HALA, M. Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environ. Pollut.* 2003, 136, s. 225-233.
- [97] HANZHOU, H., et al. Seven-step extraction procedure to evaluate Cd and Zn mobility in soils. In *2009 International Conference on Environmental Science and Information Application Technology*. [s.l.]: IEEE Computer society, 2009. s. 70-72.
- [98] MALO, B.A. Partial extraction of metals from aquatic sediments. *Environmental Science and Technology*. 1977, 11, s. 277-282.
- [99] FÖRSTNER, U.; SALOMONS, W. Trace metal analyses on polluted sediments. Part I: Evaluation of environmental impact. *Environ. Technol. Lett.* 1980, 1, s. 506-517.
- [100] URE, A.M., et al. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspice of the BCR of the Commission of European Communities. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1993, 51, s. 135-151.
- [101] MOSSOP, K.F.; DAVIDSON, Ch.M. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Anal. Chim. Acta.* 2003, 478, s. 111-118.

-
- [102] THOMAS, R.P., et al. Three-stage sequential extraction procedure for the determination of metals in river sediments. *Anal. Chim. Acta.* 1994, 286, s. 423-429.
- [103] PÉREZ-CID, B.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison between conventional and ultrasound accelerated Tessier sequential extraction schemes for metal fractionation in sewage sludge. *J. Anal. Chem.* 1999, 363, s. 667-672.
- [104] SCANCAR, J., et al. Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 2000, 250, s. 9-19.
- [105] MORRISON, G.H.; FREISER, H. *Extrakční metody v analytické chemii*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962. Extrakční technika, s. 104-105.
- [106] DAVISON, W.; ZHANG, H. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the *In Situ* Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry*. 1995, 67, s. 3391-3400.
- [107] DAVISON, W., et al. *In Situ Monitoring of Aquatic systems: Chemical Analysis and Speciation*. 6. Lancaster, UK: IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, 2000. Dialysis, DET and DGT: *in situ* diffusional techniques for studying water, sediments and soils, s. 495-569. ISBN 0-471-48979-4.
- [108] *DGT for measurements in waters, soils and sediments* [online]. Lancaster, UK: DGT Research Ltd., 2003 [cit. 2006-10-15]. Dostupné z WWW: <<http://www.dgtresearch.com/dgtresearch/dgtresearch.pdf>>.
- [109] DIVIŠ, P.; DOČEKALOVÁ, H.; ŘEZÁČOVÁ, V. Gelové techniky pro měření *in situ* ve vodách, v půdách a v sedimentech. *Chemické listy*. 2005, 99, s. 640-646.
- [110] ZHANG, H., et al. *In Situ* Measurements of Solution Concentrations and Fluxes of Trace Metals in Soils Using DGT. *Environmental Science & Technology*. 1998, 32, s. 704-710.
- [111] HARPER, M.P., et al. Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1998, 62, s. 2757-2770.
- [112] HARPER, M.P.; DAVISON, W.; TYCH, W. DIFS - a modelling and simulation tool for DGT induced trace metal remobilization in sediments and soils. *Environmental Modelling and Software*. 2000, 15, s. 55-66.
- [113] SOCHACZEWSKI, L., et al. 2D DGT induced fluxes in sediments and soils (2D DIFS). *Environmental Modeling & Software*. 2007, 22, s. 14-23.
- [114] FISCHEROVÁ, Z., et al. The application of diffusive gradient technique (DGT) for assessment of changes in Cd, Pb and Zn mobility in rhizosphere. *Plant Soil Environ*. 2005, 12, s. 532-538.

-
- [115] KOSTER, M., et al. Comparison of method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zincs accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution*. 2005, 133, s. 103-116.
- [116] NOLAN, A. L.; ZHANG, H.; MCLAUGHIN, M. J. Prediction of Zinc, Cadmium, Lead, and Copper Availability to Wheat in Contaminated Soils Using Chemical Speciation, Diffusive Gradients in Thin Films, Extraction, and Isotopic Dilution Techniques. *Journal of Environmental Quality*. 2005, 34, s. 496-507.
- [117] CORNU, J.-Y.; DENAIX, L. Prediction of Zinc and Cadmium Phytoavailability within a Contaminated Agricultural Site using DGT. *Environ. Chem.* 2006, 3, s. 61-64.
- [118] SONG, J., et al. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*. 2004, 128, s. 307-315.
- [119] KOSTER, M., et al. Comparison of the method diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zincs accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution*. 2005, 133, s. 103-116.
- [120] GUPTA, S.K.; ATEN, C. Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *Int. j. environ. anal. chem.*. 1993, 51, s. 25.
- [121] NIELSEN, N.E. A transport kinetic concept for ion uptake by plants. III. Test of a concept by results from water culture and pot experiments. *Plant and Soil*. 1976, 45, s. 659-677.
- [122] QUARTACCI, M.F. et al. Uptake and translocation of copper in *Brassicaceae*. *J. Plant. Nutr.*. 2003, 26, s. 1065-1083.
- [123] KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 POUŽITÉ ZKRATKY

AAS	atomová absorpční spektrometrie
BCR	Komise evropských komunit (European Community Bureau of References)
DBL	difúzní hraniční vrstva (Diffusive Boundary Layer)
DGT	technika difúzního gradientu v tenkém filmu (Diffusive Gradients in Thin Films Technique)
DIFS	technika DGT s indukovaným tokem v půdách a sedimentech (DGT Induced Flux in Soil and Sediment)
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctová
EDDS	kyselina ethylendiamin-N,N'-disukcinová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraethanová
ET-AAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
NLMWOA	nízkomolekulární organické kyseliny (Natural Low Molecular Weight Organic Acids)
NTA	kyselina nitrilotrioctová
PIXE	částicemi indukovaná rentgenová emise (Particle-Induced X-ray Emission)
PS 1	1. světelná fáze fotosyntézy
PS 2	2. světelná fáze fotosyntézy
SEP	sekvenční extrakční postupy (Sequential Extraction Procedures)
SOD	superoxid dismutáza
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
THGA	příčně vyhřívaný grafitový atomizátor (Transverse Heated Graphite Atomizer)

8.2 POUŽITÉ SYMBOLY

A	expoziční plocha (cm^2)
C'	koncentrace iontů kovů ve vnějším roztoku (mol.cm^3)
C_a	koncentrace iontů kovů na rozhraní vzorkovací jednotky a okolního systému (mol.cm^3)
C_b	koncentrace iontů kovů na rozhraní sorpčního a difúzního gelu (mol.cm^3)
C_{DGT}	koncentrace iontů nalezená technikou DGT (mol.cm^3)
C_{diff}	koncentrace na rozhraní jednotky DGT a půdního roztoku (mol.cm^3)
C_E	efektivní koncentrace iontů kovů stanoven technikou DGT (mol.cm^3)
C_{LP}	koncentrace iontů kovů ve fázi obsahující labilní specie (mol.cm^3)
C_{pw}	koncentrace labilních specií kovů v pórové vodě nebo půdním roztoku (mol.cm^3)
C_{sol}	koncentrace iontů kovů v půdním roztoku (mol.cm^3)
E_h	elektrodotový potenciál (mV)
D	difúzní koeficient ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
δ	tloušťka difúzního rozhraní (cm)
Δg	tloušťka difúzní vrstvy (cm)
f_e	eluční faktor kovů ze sorpčního prostředí
F	tok iontů kovů ($\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
F_{max}	maximální tok iontů kovů ($\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
k_1	rychlostní konstanta přenosu částic z roztoku do pevné fáze
k_{-1}	rychlostní konstanta přenosu částic z pevné fáze do roztoku
M	hmotnostní tok iontů (g)
pE	záporný logaritmus aktivity volných iontů
R	míra doplňování iontů kovů z pevné fáze do půdního roztoku
R_{diff}	poměr koncentrace kovových iontů v půdním roztoku
R^2	koeficient pravděpodobnosti
t	doba expozice jednotky DGT (s)
V_e	objem roztoku (cm^3)
V_g	objem sorpčního gelu (cm^3)

9. PŘÍLOHA

Seznam prací prezentovaných formou posterů na národních a mezinárodních konferencích

1. Mládková, Z., Trávníčková, J., Dočekal, B., Dočekalová, H. Concentration Of Metals In Radish Compared To Their Measurements In Soils. 2009.
2. Trávníčková, J., Kadlecová, M., Szkandera, R. New resin gel for application in DGT technique. Journées nord-ouest européennes des jeunes chercheurs, Lille, France 2010. p. 88-88.
3. Diviš, P., Szkandera, R., Kadlecová, M., Ouddane, B., Trávníčková, J. Testování sorpčního gelu s TiO₂ pro stanovení rtuti v přírodních vodách technikou DGT. Sborník 14. Česko- Slovenské spektroskopické konference. 2010.
4. Kadlecová, M., Szkandera, R., Diviš, P., Kovaříková, V., Trávníčková, J., Dočekalová, H., Ouddane, B. Measuring of dissolved mercury depth profiles in river sediments by diffusive gradients in thin films technique with different specific resins. Journées nord-ouest européennes des jeunes chercheurs, Lille, France. 2010. p. 86-86.
5. Szkandera, R.; Kadlecová, M.; Trávníčková, J., Diviš, P., Frišhansová, H., Dočekalová, H., Ouddane, B. Determination of dissolved mercury by diffusive gradients in thin films technique - the choice of resin. Journées nord-ouest européennes des jeunes chercheurs, Lille, France. 2010. p. 87-87.
6. Kadlecová, M.; Diviš, P., Szkandera, R., Trávníčková, J., Dočekalová, H., Ouddane, B. Application of diffusive gradients in thin films technique with different specific resins in contaminated and uncontaminated river sediments and its comparation with other common techniques. The 36th International symposium on environmental analytical chemistry: Abstract book. 2010. p. 145-145. ISBN: 978-88-8286-228- 2.
7. Szkandera, R., Diviš, P., Kadlecová, M., Trávníčková, J., Dočekalová, H. Use of TiO₂ in diffusive gradients in thin films technique for mercury determination in aquatic environment. The 36th International symposium on environmental analytical chemistry: Abstract book. 2010. p. 38-38. ISBN: 978-88-8286-228- 2.
8. Trávníčková, J., Dočekal, B., Dočekalová H.: Application of DGT technique in assessment of availability of copper to Raphanus sativus. The 36th International symposium on environmental analytical chemistry: Abstract book. 2010. p. 43-43. ISBN: 978-88-8286-228- 2

Zahraníční stáž

Program: Socrates-Erasmus

Období: 19. 10. 2009 – 30. 4. 2010

Místo: Université Sciences et Technologies Lille 1, Laboratoire de Chimie Analytique et Marine, Géosystèmes, Francie

Studium: Studium techniky DGT aplikované do říčních sedimentů, stanovení methylrtuti různými analytickými metodami, příprava nového sorpčního gelu s TiO_2