

BP 44

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů

Stanovení forem mědi ve viničných půdách

Bakalářská práce

Lenka Soukupová



Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Martin Mihaljevič, CSc.

Praha 2007

Abstrakt

Intenzivní používání tzv. Bordeauxské směsi v boji proti plísním vinic vedlo k postupné akumulaci mědi v povrchových vrstvách půdy. Sloučeniny mědi poté setrvávají v půdě dlouhou dobu, neboť jsou pevně vázané na organické látky, jílové minerály a oxidy železa, hliníku a manganu. Vztahy mezi mědí a složkami půdy závisí na několika proměnných jako jsou koncentrace v půdních roztocích, schopnost adsorpce, koncentrace ligandů, které tvoří organominerální komplexy, pH a redoxní potenciál. Velký vliv mají také klimatické podmínky, protože suché klima středomořských oblastí není pro plísně napadající vinnou révu tak příznivé. V těchto oblastech je proto aplikace Bordeauxské směsi méně intenzivní a tedy i v půdách je akumulace mědi méně intenzivní. Orná půda běžně obsahuje mezi 5 a 30 mg/kg Cu, zatímco početné plochy severofrancouzských vinic obsahují mědi mnohonásobně více (400-500mg/kg). Takové koncentrace by mohly přinést problém toxicity nejen rostlinám, ale následně také živočichům a člověku. Ke stanovení ekotoxikologických rizik mědi je nutné předpovědět biodostupnost mědi pro dané plodiny. Biodostupnost se stanovuje pomocí různých extrakčních metod, jejichž vhodnost mimo jiné tato práce posuzuje. Ze zkoumaných metod (DTPA, EDTA, CaCl₂, NaNO₃ a extrakce založená na rhizosféře) se díky své univerzálnosti jevila jako nejlepší extrakce založená na rhizosféře. Na rozdíl od ostatních metod, které jsou vázány na určité druhy půd a kovů, tato extrakce dává spolehlivé výsledky pro všechny půdy – kyselé, neutrální i mírně zásadité. Její nevýhodou je malé množství rostlin, které byly zatím touto metodou zkoumány.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří se nějakým způsobem podíleli na vzniku této bakalářské práce, zejména pak vedoucímu mé bakalářské práce panu Doc. RNDr. Martinu Mihaljevičovi, CSc. za odborné vedení a věcné rady. Dále bych ráda poděkovala své rodině za korekturu textu, rady a podporu, kterou mi poskytli.

Obsah

1. Úvod	1
2. Vlastnosti kovů	2
2.1 Vyluhovatelnost	2
2.2 Biodostupnost	3
3. Akumulace mědi ve viničních půdách	4
3.1 Vztah obsahu organického materiálu a koncentrace Cu	5
3.2 Vliv mědi na distribuci organického uhlíku a dusíku	5
3.3 Sorpce mědi na vápnnité půdy	7
3.4 Sorpce mědi na půdy neobsahující karbonáty	8
4. Zpracování vzorků	10
4.1 Zpracování vzorků půdy	10
4.1.2 Extrakční metody	10
4.1.3 Komplexotvorná činidla: DTPA a EDTA	10
4.1.4 Činidla kyselé povahy	11
4.1.5 Roztoky neutrálních solí	11
4.1.6 Extrakce založená na rhizosféře	12
4.1.7 Hodnocení metod	12
4.2 Zpracování vzorků rostlin	13
4.2.1 Studium biodostupnosti mědi pro rostliny kukuřice	13
4.2.2 Studium biodostupnosti mědi pro rostliny rajčat	14
5. Závěr	14
6. Literatura	16

1. Úvod

Vinařství je pro Francii důležitým odvětvím zemědělství. Ačkoli tradice a ekonomické zisky ze sklizní jsou značné, intenzivní používání pesticidů v boji proti nemocím, škůdcům a plevelům je momentálně ve středu veřejného zájmu. Opakované používání fungicidních přípravků s obsahem mědi, totiž vyústilo v dlouhodobou akumulaci mědi ve svrchních vrstvách zemědělských půd po celém světě. Prapůvodcem znečištění mědí v Evropě je plíseň, která napadá vinnou révu a je způsobena pro tyto rostliny patogenní houbou *Plasmopara viticola* (vřetenatka révová). Na jihozápad Francie byla tato plíseň zavlečena v roce 1878 a odtud se pak velmi rychle rozšířila na všechny evropské vinice.

Od konce 19. století se proti ní začaly široce používat systematické postřiky měděných solí, tzv. Bordeauxská směs ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$). Vzhledem k tomu, že ve směsi obsažená měď jako kov nepodléhá degradaci, většina aplikované mědi se akumuluje v půdě a je tak odpovědná za těžké znečištění viničních půd. Přestože je měď pro růst rostlin nezbytná, její hromadění může vytvořit nepříznivé podmínky pro půdní mikrobiální činnost a následně i změny ve složení mikrobiálních populací. Jiným faktorem ovlivňujícím akumulaci či transport pesticidu je způsob obhospodařování vinic. Viniční půdy jsou často umístěné na svazích, bez rostlinného pokryvu a s velkými vzdálenostmi mezi jednotlivými rostlinami. To všechno vede k problémům s odtokem a půdní erozí. K omezení eroze bylo navrženo několik opatření, například zatravnění prostoru mezi rostlinami vinné révy. Travnatý povrch navíc podporuje mikrobiální aktivitu, která pomáhá rychlejšímu odbourávání pesticidů a mohla by tak zmírnit i vliv vysokých koncentrací mědi.

Orná půda běžně obsahuje mezi 5 a 30 mg/kg Cu, zatímco početné plochy vinic obsahují mědi mnohonásobně více. Vystává tedy otázka, jaká je biodostupnost mědi pro živé organismy včetně kultivovaných plodin. Měď naakumulovaná v půdách může být zodpovědná za toxicitu překračující mez pro rostliny únosnou. Ta závisí jak na druhu půdy, tak i na druhu rostliny: například u samotné vinné révy se jen zřídka objevují jakékoliv důkazy, že by rostlina toxicitou mědi trpěla. V oblasti Languedoc v jižní Francii však došlo k nahrazení okolo třetiny plochy původních vinic jinými zemědělskými plodinami popřípadě pastvinami, což by mohlo přinést problém toxicity mědi nejen rostlinám, ale následně také živočichům a člověku. Ke stanovení ekotoxikologických rizik, která může měď v takových půdách způsobit, je však nejdříve nutné předpovědět biodostupnost mědi pro dané plodiny.

2. Vlastnosti kovů

2.1 Vyluhovatelnost

Vyluhovatelnost mědi a schopnost rostlin ji přijímat závisí na mobilitě a dostupnosti v půdě, což jsou vlastnosti ovlivněné pH a obsahem pevného a rozpuštěného organického uhlíku. Nízké pH zvyšuje rozpustnost a tedy i mobilitu. Také tvorba komplexů s rozpuštěným organickým uhlíkem zvyšuje rozpustnost těžkých kovů. Pokud je tedy zemědělská půda obohacována mědí z umělých hnojiv a okyseluje se atmosférickou depozicí a aplikací splaškového kalu, rozpustnost kovů narůstá. Přídavek rozpuštěného organického uhlíku k extrahovanému roztoku vedl k urychlení poklesu pH.

Sorpce těžkých kovů v půdách je jedním z procesů, které ovlivňují dostupnost kovů pro rostliny a jejich mobilitu v půdě. Schopnost půdy zadržovat kovy je závislá na třech různých mechanismech: specifické adsorpci, výměně kationtů a srážení nových minerálních fází. Adsorpce a srážení jsou charakteristické reakce těžkých kovů s např. povrchem některých uhličitánů, adsorpce probíhá, pokud jsou kovy přítomny pouze v malé koncentraci, srážení pak převládá při vysokých koncentracích kovů. Měď se nejčastěji váže na CaCO_3 prostřednictvím vysrážení jako hydroxid nebo hydroxykarbonát. Adsorpce, srážení a tvorba komplexů jsou všeobecně považovány za faktory ovlivňující koncentrace kovů a jejich aktivitu v půdních roztocích. V tomto ohledu, pokud by srážení omezeně rozpustných anorganických pevných částic bylo jediným uvažovaným faktorem, pak by koncentrace mědi v půdních roztocích a vodě byly značně přeceňovány.

Karbonáty těžkých kovů mohou v půdě vznikat. Bylo dokázáno, že odstraněním karbonátů z půdy znatelně poklesne množství sorbované mědi. Pokud by byly karbonáty odstraněny acetatovým pufrům o $\text{pH} = 5$, došlo by k výraznému poklesu mědi vázané ve vápnatých půdách, pokud by však původní kontaminovaná půda neobsahovala žádné karbonáty, pak by použití tohoto pufru mělo účinek jen velmi malý popřípadě by dokonce do jisté míry došlo k vzrůstu vázaných kovů. Jsou však i zastánci teorie, že vápnění půd podporuje mineralizaci organického materiálu a to může vést k uvolnění Cu. Přidáním velkého množství vápenatých či jiných vhodných iontů do půd nedochází k odstranění specificky adsorbovaných iontů Cu^{2+} prostřednictvím výměny kationtů.

Dvě nejdůležitější půdní vlastnosti ovlivňující dostupnost a vyluhovatelnost kovů jsou pH a obsah organického materiálu. Problém recyklace odpadů z obydlených oblastí nebo zemědělského průmyslu a jejich použití při hnojení půdy je známý z části díky zvyšujícímu se zájmu o ochranu životního prostředí. Využívání odpadů tímto způsobem je levné, dochází k recyklaci živin a působí proti snižování množství organického materiálu v půdách. Často dochází k zvyšování půdní pH a v důsledku také snižuje dostupnost kovů pro rostliny. Různé typy organického odpadu se liší různým obsahem rozpustných ligandů, které vstupují do půdy. Organický materiál sorbuje Cu za vzniku komplexů mědi. Tento děj závisí na pH způsobeném hydrolyzou kovů a slabě kyselém prostředí, ve kterém dochází k výměně kationtů. Rozpustné ligandy tak mohou zvýšit rozpustnost mědi.

Temminghoff et al. (1997) zjistil, že rozpuštěný organický uhlík zvyšuje rozpustnost mědi obsažené v písčitých půdách kontaminovaných mědí. Zjistili, že v prostředí s pH 3,9 bylo okolo 30% mědi v půdních roztocích svázáno s rozpuštěným uhlíkem a při pH 6,6 to bylo dokonce více než 99%. Měď v roztoku klesala téměř lineárně s klesajícím obsahem rozpuštěného uhlíku. Velká část mědi je v půdě velmi mobilní a její transport může být usnadněn rozpuštěným uhlíkem.

2.2 Biodostupnost

Biodostupnost mědi charakterizuje takové množství mědi obsažené v půdě, které je daný organismus schopný absorbovat. Přesné stanovení biodostupnosti kovů v půdách a pevných odpadech postupně nabíralo na důležitosti a momentálně je důležitější než riziková analýza. Biodostupnost ovlivňuje skupina biotických a abiotických procesů, například adsorpce na jílové minerály a jejich desorpce, srážení, vylučování rozpouštěním minerálů, interakce s půdou, rostlinami a mikroorganismy. Proto přesná definice biodostupnosti vyžaduje porozumění procesům nejen v půdě, ale také rhizosféře.

Snadno rozpustné frakce kovů se všeobecně považují za biodostupné, ale postupně roste vědomí nutnosti přehodnocení metod určujících rozpustné a biodostupné frakce, kvůli jejich značné variabilitě v prostoru a čase. Tyto variace mohou vycházet z fluktuací klimatu, a tak by ideálně měly být testy určující akumulaci stopových kovů v rostlinách prováděny v podmínkách podobných těm v rhizosféře. Nicméně biodostupnost kovů je všeobecně stanovována rozličnými chemickými činidly jako jsou neutrální soli, slabé kyseliny, organické sloučeniny, ovšem všechny mají jen limitované možnosti. Staré metody testování stopových kovů byly často chemicky agresivní, především protože dřívější analytické metody byly generálně příliš málo citlivé na to, aby zaznamenaly nízké hodnoty částic ve vzorku. Ačkoliv nedávno zaznamenala dobré výsledky řada nových sloučenin, momentálně je stále ještě málo dat k adekvátnímu hodnocení těchto nových přístupů.

Pokusy o kvantitativní odhad biodostupnosti a toxicity ze sekvenčních extrakčních dat nebyly úspěšné. Limity analytických technik nejsou jediným problémem, důležitá je také komplexnost interakcí mezi kovy a biotou a je nutné brát ji při stanovení biodostupnosti kovů v potaz.

Vhodnost jakékoliv půdní sloučeniny pro předpovídání biodostupnosti stopových kovů závisí na její schopnosti předpovědět míru, do jaké bude rostlina ten daný stopový kov akumulovat. Ačkoliv porovnání nejrůznějších studií může být problematické kvůli variacím druhů půd a délky studií, efektivní činidlo by mělo být schopné určit biodostupnost stopového kovu i v rozdílných podmínkách. Větším problémem je skutečnost, že rozdílné druhy rostlin rostoucí ve stejných podmínkách akumulují ve svých tkáních různé koncentrace stopových kovů. Identifikace tohoto zdroje variací je důležitá pro úvahy o obnovení vegetačního krytu kontaminovaných oblastí.

Biodostupnost je definována jako míra vystavení receptorů kontaminantům v půdě nebo sedimentech. Vlastnosti půdy, typ kovu, druh rostliny a především vztah půdy a rostliny ovlivňují biodostupnost

kovů v půdě. Pro stanovení biodostupnosti jsou velmi často užívané jednokrokové extrakce, především pro jejich jednoduchost. DTPA a EDTA byly široce využívány díky své schopnosti tvořit velmi stabilní, ve vodě rozpustné a dobře definovatelné komplexy s kationty kovů. Také roztoky CaCl_2 a NaNO_3 byly často používány pro stanovování biodostupnosti. Všechny výše uvedené metody jsou používány v jasně stanovených podmínkách, neboť žádná z nich není univerzální. Společným znakem těchto metod je jejich zaměření na částice kovů spojených s určitými geochemickými vlastnostmi půdy, ale žádná z nich nebere v úvahu biologické reakce v půdě, především interakce půdy a rostlin v rhizosféře.

Jednoduché organické kyseliny, které jsou jednak vylučované rostlinnými kořeny a jednak vznikají činností hub a bakterií, ovlivňují řadu procesů probíhajících v rhizosféře. Díky acidifikaci, chelataci, oxidačně-redukčním reakcím, mohou tyto kyseliny ovlivnit transport těžkých kovů v rhizosféře. Různé kyseliny mohou díky vzniku organokovových komplexů mobilizovat těžké kovy z různých půd a zvýšit jejich rozpustnost.

3. Akumulace mědi ve viničních půdách

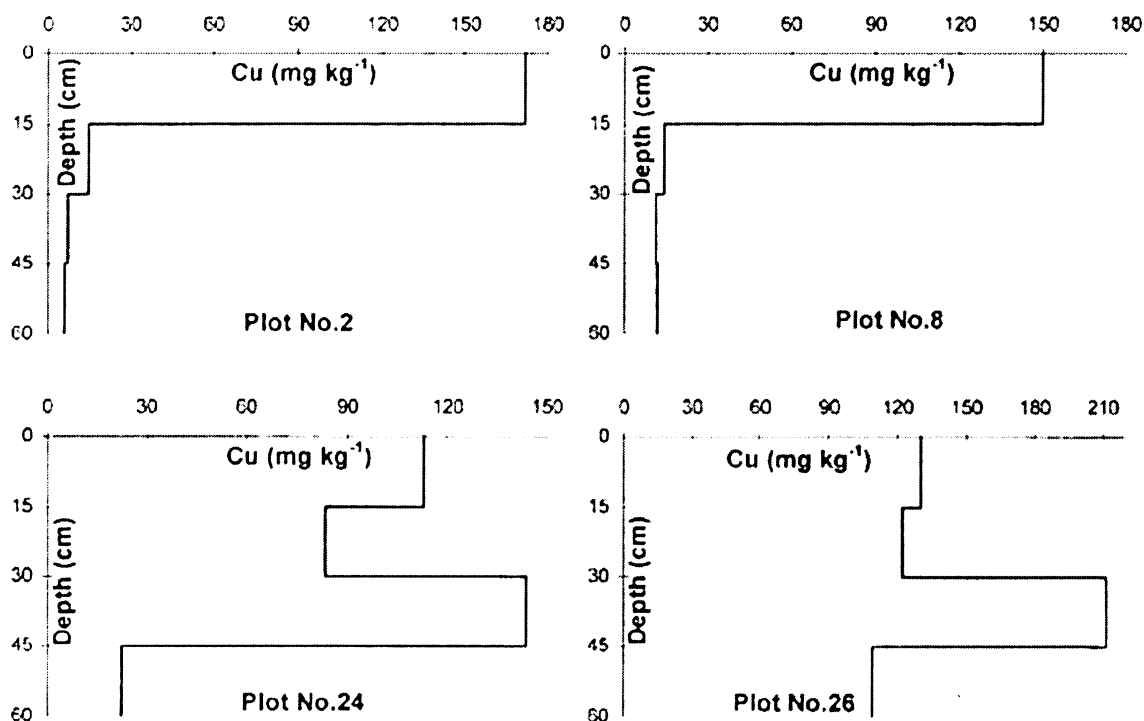
Ve středomořských oblastech půda nevykazuje obsahy mědi větší než 250 mg/kg, což je méně než hodnoty zjištěné v severnějších oblastech pěstování vinné révy jako je Francie. Obsahy mědi dosahují v oblastech Alsace, Champagne či Burgundska hodnot 400–500mg/kg a v Bordeaux dokonce až 800mg/kg (Flores Velez, 1996). Takovéto rozdíly mohou být přisuzovány suchým klimatickým podmínkám středomořských oblastí, které nejsou tak příznivé pro plísň napadající vinnou révu a jež jsou příčinou méně intenzivní aplikace tzv. Bordeauxské směsi. Studie v Itálii ukázaly, že koncentrace mědi ve viničních půdách byly ve vlhkých hornatých oblastech severní Itálie, kde se fungicidní přípravky používají často, třikrát větší než v suchých jižních oblastech, kde jejich použití tak časté není.

K redistribuci antropogenní mědi v půdě přispívají tři hlavní procesy: půdní eroze, loužení a hloubková orba, která může bez odstranění rostlin vinné révy rozšířit kontaminaci až do hloubky 40cm (Flores Velez, 1996). Sklízni hroznů se z vinice odstraní jen malá část aplikované mědi, neboť prostřednictvím opadávajících a tlejících listů se většina mědi vrátí zpět do viniční půdy.

Na Obr. 1 vidíme grafy znázorňující průběh obsahu mědi v půdách s rostoucí hloubkou. Grafy 2 a 8 ukazují půdu, na níž se počátek pěstování vinné révy datuje do minulého století (Brun a kol., 1998). Je to vápnatá půda, na které nedocházelo k hluboké orbě od začátku aplikace mědi. Proto obohacení mědi nenajdeme v půdě hlouběji než 15cm. Zdá se, že v takových podmínkách je měď pevně vázána ve svrchní vrstvě půdy a nedochází k loužení, jediným procesem, který zde probíhá transport mědi, je eroze. Grafy 24 a 26 vykazují, že koncentrace mědi ve zkoumaných půdách je v podloží vyšší než ve vrchních vrstvách půdy. To značí, že rostliny vinné révy byly na těchto vinicích během minulého

století několikrát odstraněny a opět zasazeny a vyšší koncentrace mědi je pravděpodobně dána pohřbíváním obohacené ornice do hlubších částí půdního profilu.

L. A. Brun et al. (1998)



Obr. 1. Vertical distribution of total Cu along soil profiles.

Sloučeniny mědi aplikované na vinicích setrvávají v půdě, protože jsou pevně vázané na organické látky, jílové minerály a oxidy železa, hliníku a manganu. Vztahy mezi mědí a složkami půdy závisí na několika proměnných jako jsou koncentrace v půdních roztocích, schopnost adsorpce, koncentrace ligandů, které tvoří organominerální komplexy, pH a redoxní potenciál. K pochopení chování mědi v půdě je nutné nejen měřit celkové koncentrace, ale také pomocí nejrůznějších fyzikálních a chemických metod zkoumat její distribuci. Metody fyzikální frakcionace, především na základě velikosti ale také hustoty, se používají při zkoumání organického materiálu a organominerálních komponent v půdě. Dalším možným přístupem ve studiu vztahů mezi obsahem Cu a vlastností půd je chemická frakcionace, při níž dochází k loužení Cu z jednotlivých minerálních a organických částí vzorku půdy.

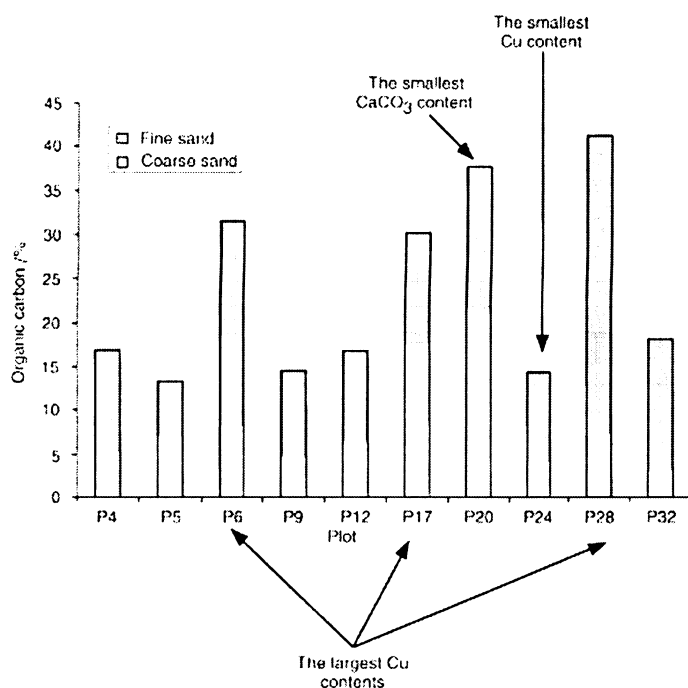
3.1 Vztah obsahu organického materiálu a koncentrace Cu

Parat a kol. (2002), který na Burgundských vinicích zkoumal vztah mezi množstvím akumulované Cu a obsahem organického materiálu v půdě, zjistil, že celkový obsah organického uhlíku ve zkoumaných

půdách kolísal mezi 11,0 a 44,9 g/kg a kromě jediného vzorku (P12), který představoval zatravněnou plochu, se na jeho obsahu neprojevil vliv žádné zemědělské činnosti. Celkový obsah organického dusíku se pohyboval mezi 1,1 a 4,5 g/kg a stejně jako u organického uhlíku, ani zde se neprojevil vliv zemědělství. Poměr C/N byl pak mezi 9,3 a 11,6 s nejvyššími hodnotami ve vzorcích P6 a P28, které také obsahovaly největší podíl mědi. Poměr C/N se tedy jeví jako silně závislý na celkovém obsahu Cu v půdě a naznačuje možnost, že měď zabraňuje mineralizaci organického materiálu.

3.2 Vliv mědi na distribuci organického uhlíku a dusíku

Parat a kol. (2002) také tvrdí, že největší množství organického uhlíku a organického dusíku byly vždy nalezeny v jílových frakcích, zatímco nejnižší hodnoty byly pozorovány v hrubozrnném či jemnozrnném písku. Z Obr. 2 je vidět, že vzorky půdy mědi nejvíce kontaminované (P6, P17, P28) mají větší množství organického uhlíku akumulované v hrubozrnné a jemnozrnné písčité frakci, což ukazuje, že celkový obsah mědi má vliv na distribuci organického uhlíku v jednotlivých velikostních frakcích půdy. Naproti tomu tyto tři vzorky vykazují v porovnání s ostatními menší množství organického dusíku akumulovaného v jílové frakci. Ve vzorku půdy s nejmenším množstvím vápníku (P20) je větší množství organického uhlíku v hrubých frakcích a méně organického dusíku ve frakcích jílových. To by mohlo být způsobeno buď nedávným obohacením půdy organickým materiálem nebo nedostatkem CaCO₃ v ornici, popřípadě obojím. Obvykle stupeň rozkladu organického materiálu roste s klesající velikostí půdních částic. Části rostlin převládají v hrubých frakcích, zatímco organominerální složky se hromadí spíše v jemných frakcích. Bylo zjištěno, že poměr C/N klesá s klesající velikostí půdních částic. To naznačuje, že nejvíce humusu se nachází v jemných frakcích půd, které pravděpodobně obsahují na dusík bohaté organické látky. Vzorky číslo P6 a P28 však mají vyšší poměr C/N v jemnozrnných frakcích a tedy humifikace organických látek musela být pomalejší než v ostatních vzorcích, možná právě kvůli většímu obsahu mědi. Poměr C/N u vzorku půdy číslo P20 neobsahující vápník je vyšší než je průměrná hodnota v této frakci. Naopak vzorek obsahující nejmenší množství mědi (P24) má poměr C/N v jemné frakci nejmenší. Tato zjištění posilují teorii, že měď může ovlivnit rozklad organických látek, jak je dokázáno silnou korelací mezi poměrem C/N v jemných frakcích půdy a celkovým obsahem mědi. Což je také zdůrazněno vzorkem půdy neobsahující CaCO₃ (P20). Zdá se, že vyšší obsah mědi způsobuje akumulaci organických zbytků s velkým obsahem organického uhlíku v hrubozrnných a jemnozrnných píscích. Tento jev je ještě výraznější v půdách neobsahujících vápník, neboť v nich je pro mikroorganismy dostupná větší část mědi. Nicméně ani obohacení organickým materiálem v případě vzorku číslo P20 nemůže být vyřazeno z vysvětlení obsahu velkého množství organického materiálu v hrubozrnných frakcích.



Obr. 2 Proportions of organic carbon in coarse sand and fine sand fractions; the most Cu-contaminated plots showed an accumulation of organic carbon in coarse fractions.

3.3 Sorpce mědi na vápnité půdy

Rodriguez-Rubio a kol. (2003) prováděl na vinicích v jižním Španělsku výzkum vazeb Cu ve vápnitých půdách. Obr. 3 ukazuje adsorpční izotermy mědi na vápnité půdy s hnojivem a bez přidaného hnojiva. Množství mědi navázané na nehnojené vzorky bylo značné. pH roztoků nehnojených půd a půd s přidavkem A (olivová drť) a V (vinaša – reziduální kapalina při destilaci alkoholů, především při zpracování cukrové řepy) bylo v rovnovážném stavu podobné, nárůst sorpce mědi tedy nezáviselo na změnách pH. Problém pak musí být ve zvýšeném obsahu organického materiálu v půdách v přidavkem olivové drti, neboť tento materiál poskytuje mnohem více organického uhlíku než materiál V. Obsahy organického uhlíku ve hnojených i nehnojených vzorcích půdy jsou v Tab. 1.

Tab. 1 pH and chemical composition of the waste fertilizers used (in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry matter)

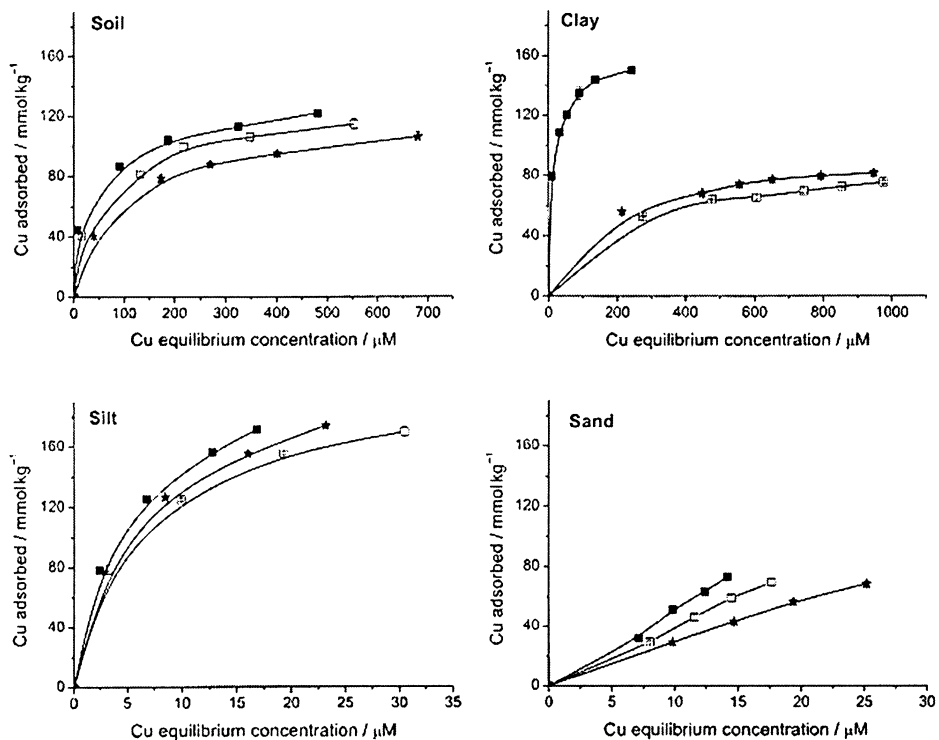
	pH	Dry matter	Organic C	N	P	K	Ca	Mg
A	7,7	807	126,4	9,0	2,5	17,5	86,3	6,6
V	5,0	540	230,8	32,5	0,2	34,2	2,5	9,6

V- olive mill sludge; A- vinasse

P. Rodriguez-Rubio et al. (2003)

Množství mědi adsorbované jílovou složkou nehnojeného vzorku půdy bylo menší než celková hodnota pro půdu. V půdě s přidavkem olivové drti bylo naopak množství adsorbované mědi vyšší. To by mohlo být způsobeno zvýšeným obsahem kalcitu v jílovité složce půdy stejně tak jako větším obsahem organického uhlíku. V prachové frakci bylo adsorbováno velké množství mědi v nehnojeném vzorku, což by mohlo být vysvětleno obsahem karbonátů v této frakci. Také obsah organického uhlíku je v prachové frakci větší, a to dvakrát větší než v jílovité frakci a více než dvacetkrát oproti písčité frakci. Ve všech případech bylo pH roztoků v rovnováze podobné, pravděpodobně jako důsledek tlumícího účinku vysoce zastoupených karbonátů. V písčité frakci množství sorbované mědi sledovalo stejnou posloupnost jako v případě celé půdy. Sorpce byla větší než se by předpokládalo pro tuto velikostní frakci, opět především díky obsahu přítomných karbonátů.

P. Rodriguez-Rubio et al. (2003)



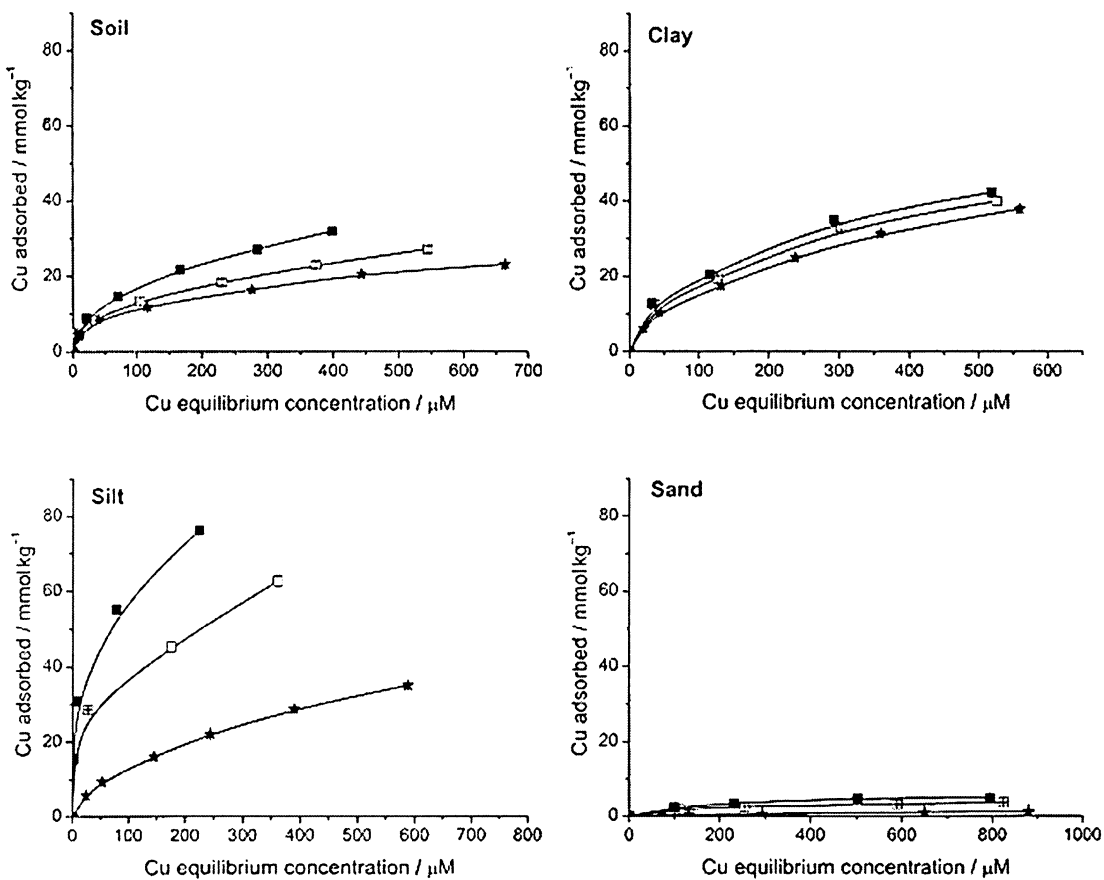
Obr. 3 Adsorption isotherms of copper on unamended and amended samples of the calcareous soil. Unamended (★), vinasse (□) and olive mill sludge (■). The error bars indicate ± standard error (some error bars are not visible because they are shorter than the symbol size).

3.4 Sorpce mědi na půdy neobsahující karbonáty

Rodriguez-Rubio a kol. (2003) se věnoval i půdám neobsahujícím karbonáty a Obr. 4 zobrazuje adsorpční izotermy mědi po použití acetátového pufru. Drastický pokles sorpce po odstranění karbonátů je dalším důkazem, že karbonáty jsou jednou z hlavních půdních komponent, které ovlivňují zadržování kovů v půdách. Výsledná pH byla o jednotku nižší než jaká měla původní vápnatá půda. Ve všech frakcích této půdy byla sorpce mědi menší než ve vápnatých vzorcích. Narozdíl od

vápnitých půd vykazovala jílovitá frakce nehnojeného vzorku jen o málo větší sorpci než prachové částice. To by mohlo znamenat, že karbonáty převládající v prachové frakci originální půdy jsou zodpovědné za zvýšenou sorpci těchto frakcí. Stejně jako to bylo zjištěno u vápnitých půd, také v půdách neobsahujících karbonáty oba typy hnojiv zvyšují sorpci mědi. Přidaný organický materiál se přednostně hromadí prachové frakci. Proto se i měď hromadí více v této frakci hnojených půd než ve stejné frakci z nehnojených půdách. Rovnovážné pH je v porovnání s nehnojenými půdami vyšší v experimentech s prachovou frakcí hnojených půd. Měď vázaná písčitou frakcí byla v porovnání s frakcemi ostatními vždy zanedbatelná.

P. Rodríguez-Rubio et al. (2003)



Obr. 4 Adsorption isotherms of copper on unamended and amended samples of the carbonate-free soil. Unamended (▲), vinasse (◻) and olive mill sludge (■). The error bars indicate ± standard error (some error bars are not visible because they are shorter than the symbol size).

Pokles sorbované mědi po odstranění karbonátů ukazuje, že kovy se vážou na povrch karbonátů a v důsledku toho se mobilita mědi zvyšuje, pokud dojde k odstranění vápence.

4. Zpracování vzorků

4.1 Zpracování vzorků půdy

Vzorek každé půdy je složen z většího množství vzorků (průměrně 10), které jsou na ploše zkoumané půdy sesbírány náhodně, ovšem vždy z vrchních vrstev půdy, nejčastěji v hloubkách mezi 15-30 cm. Hloubka odběru při jednom výzkumu musí být konstantní, aby byla zachována reprodukovatelnost. Následně jsou tyto vzorky smíšeny v jeden, který se usuší a rozeleme natolik, aby se mohl prosít přes síto s 2 mm oky. Tak vznikne vzorek vhodný k dalším analýzám pro určení biodostupnosti mědi pro rostliny. Velikostní frakce byly určeny prostřednictvím sedimentace, pH bylo změřeno v deionizované vodě nebo v 1 M roztoku KCl, množství organického materiálu bylo určeno pomocí sulfochromitové oxidace, kationtové výměnné kapacity NH_4OAc a celkový obsah karbonátů extrakcí pomocí HCl. Pro určení celkového obsahu mědi byly vzorky půdy vylouženy lučavkou královskou: 0,5g půdy bylo louženo 7,5 ml koncentrovaného HCl a 2,5 ml koncentrované HNO_3 , 12 hodin při pokojové teplotě a 2 hodiny při 150°C . Poté prošly filtrací a byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody.

Koncentrace mědi v půdních vyluzích je pak určena buď pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS) nebo optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-AES).

4.1.2 Extrakční metody

Všechny extrakce probíhají za stálého míchání při teplotě 20°C a následně jsou přefiltrovány

EDTA extrakce: 7,5 g půdy se extrahuje dvě hodiny pomocí 50 ml 0,01M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ a 1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

DTPA extrakce: 10g půdy je dvě hodiny extrahováno 20 ml 0,005M TPA, 0,1M TEA a 0,01M CaCl_2

NH_4OAc extrakce: 10g půdy se jednu hodinu extrahuje 200 ml 1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

CaCl_2 extrakce: 5g půdy se extrahuje dvě hodiny 50 ml 0,01M CaCl_2

4.1.3 Komplexotvorná činidla: DTPA a EDTA

Činidlo DTPA (kyselina dietyltriampentaoctová) bylo široce používané ke stanovení biodostupnosti mnoha stopových kovů, a koncentrace stopových kovů extrahovatelných pomocí DTPA velmi dobře korelovala s příjmem některých kovů rostlinami. Nicméně když došlo v dnešních studiích ke srovnání širokého spektra druhů půd, jak EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová) tak i DTPA poskytly jen nedostatečný obraz biodostupnosti kovů. Tento problém může být alespoň z části způsoben rozdíly v obsahu organického materiálu, pH, množství, zdroji a formě zdroje kontaminantu a také jeho stářím. Bylo také zaznamenáno, že při studiích vykazujících dobrou korelaci byl použit jeden

nebo dva vzorky půdy a tudíž přestože byla korelace vysoká, vztahy z ní odvozené nemohly být aplikovány všeobecně. Modifikace metod (modifikace složení chemického činidla) nebo použití metody pro jiné kovy než Fe, Zn, Mn a Cu bez detailní studie mohou přispět k rozporuplným výsledkům. Také pH 7,3 používané při extrakci pomocí DTPA často jen málo reprezentuje skutečné pH půdy a vede ke změnám charakteristik půd a kovů.

DTPA i EDTA používají jako základ extrakce organické ligandy schopné vytvořit s kovy pevný komplex. Tento postup byl vyvinut pro reprezentaci mechanismu, který používají rostliny s deficitem kovů. Nicméně dnes jsou tato činidla používána pro široké spektrum půd a stanovuje se dostupnost nevhodných kovů. Další důležitý činitel, který bývá často přehlížen je poměr půda:roztok a koncentrace ligandů. V málo znečištěných půdách nemusí být schopnost DTPA tvořit komplexy vyčerpána, naopak ve vysoce kontaminovaných půdách může dojít k saturaci ligandů. Aby při extrakci stopových kovů k saturaci ligandů nedocházelo, měla by být uvažována koncentrace ligandů i poměr půda:roztok.

DTPA je vhodná pouze pro neutrální a mírně alkalické půdy. Pokud je aplikována na kyselé půdy, může dojít k překročení tlumící kapacity půdního roztoku, značné množství kovů se naváže na oxidy železa a manganu a dojde k uvolnění karbonátů. EDTA extrakce je vhodná pouze pro kyselé půdy. EDTA je schopná extrahovat stopové prvky z půd obsahujících labilní i stabilní částice.

4.1.4 Činidla kyselé povahy

Kyselé činidla jako 0,1 M HCl poskytují jen nepřesnou předpověď dostupnosti jak Zn, tak i Cu. Takovéto činidlo odstraňuje kovy vázané na organický materiál. Přesto jsou výsledky v přijatelném poměru s celkovým obsahem kovu v půdě.

4.1.5 Roztoky neutrálních solí

Pro měření stopových kovů v půdách bylo navrženo velké množství neutrálních solí (1 M NH_4OAc , 1 M NH_4NO_3 , 0,1 M NaNO_3 , a 0,01 M CaCl_2). Ze všech vyzkoušených činidel poskytují roztoky neutrálních solí nejlepší obraz vztahů mezi dostupnými stopovými kovy a jejich akumulací v rostlinných tkáních. Nicméně tato technika je poměrně nová a je jen omezený počet studií poskytujících data. Problém tkví také v tom, že studie se často omezují na určení, zda je či není dané činidlo vhodné k určení biodostupnosti, a tedy vztahy jsou zkoumány především prostřednictvím porovnávání různých studií. Dobré výsledky studií by tak mohly alespoň z části souviset s omezeností dostupných dat.

Za zmínku stojí, že předběžné důkazy indikují možnou efektivnost 0,01 M CaCl_2 v určování biodostupnosti Cu. Nicméně použití zředěného CaCl_2 k extrakci nebylo úspěšné univerzálně a k

použití analytických metod k vyloučení mědi vázané na organické sloučeniny je také potřeba činidel s charakterem zředěné soli. Metoda použití neutrálních solí je podporována také kvůli předpokladu, že biodostupné stopové kovy jsou převážně navázány na povrch minerálů a tudíž mohou být nahrazeny jinými kationty. Na rozdíl od činidel jako je DTPA, neutrální soli odstraňují stopové kovy z pevné fáze pomocí kationtů schopných desorpce přidaných do půdy. Pro extrahování kovů, které tvoří komplexy s iontem Cl^- , je vhodné použití soli obsahující Cl^- , protože díky vzniku komplexů volných iontů s Cl^- dojde k podnícení desorpce. Velkým množstvím studií bylo potvrzeno, že roztoky neutrálních solí jsou při stanovování dostupnosti kovů pro rostliny podstatně efektivnější než agresivnější testy jako DTPA. Ačkoliv používání CaCl_2 je podporováno v Evropě, USA, Novém Zélandu a Austrálii, jsou také zprávy, že jiné neutrální soli jako 1 M NH_4Cl nebo 0,1 M NaNO_3 poskytují lepší indikaci rostlinami přijímaných koncentrací kovů než CaCl_2 .

CaCl_2 a NaNO_3 jsou použitelné pouze pro zaměnitelné kovy. Vápník je dominantním kationtem půdy a odráží pevnost vazeb či míru rozpustnosti jednotlivých půd. NaNO_3 může extrahovat zaměnitelné kovy díky iontové síle a přitom neovlivňuje rovnováhu mezi půdním roztokem a pevnou půdou. Ačkoliv snadno zaměnitelné kovy mohou být extrahovány jak CaCl_2 , tak i NaNO_3 , NaNO_3 je méně agresivní při vytváření vazeb s povrchem organické hmoty a oxidů.

4.1.6 Extrakce založená na rhizosféře

Podle Mu-Hua Feng a kol. (2005) byly 2 g vlhké rhizosféry smíšeny s 20 ml směsí organických kyselin (kyseliny octové, mléčné, citrónové, jablečné a mravenčí). Konečná koncentrace kyselin byla 10 mM a jejich molární poměr 4:2:1:1:1. Směs byla 16 hodin míchána a poté 10 minut ponechána v centrifuze. 5 ml kalu bylo ihned odpipetováno do 10 ml odměrné baňky a do 10 ml doplněno 2% HNO_3 . Získaný extrakt byl použit k určení těžkých kovů. Půdní vlhkost byla změřena dvoudenním sušením půdy při 65°C.

Zdá se, že extrakce založená na rhizosféře je nejen nejjednodušší, ale také byla pro stanovení biodostupnosti Cr, Cu, Zn a Cd v půdách lepší než kterákoliv jednoduchá extrakční metoda, ačkoli je naprosto nevhodná k určení biodostupnosti Ni a Pb, neboť tyto dva kovy nejsou pro rostliny nepostradatelné. Nejzřetelnějším rysem této metody pak je skutečnost, že je vhodná jak pro kyselé tak i pro neutrální až mírně zásadité půdy, což ukazuje, že by potenciálně mohla být univerzální pro stanovování biodostupnosti kovů v půdách. Úspěšnost metody může být připisována použití čerstvé rhizosféry a jednoduchých kyselin coby extrakčních činidel. Koncentrace kyselin a jejich poměr byly zvoleny podle množství v rhizosféře. Kyseliny octová a mléčná byly zastoupeny v největším množství, protože tyto dvě organické kyseliny jsou produktem bakterií v rhizosféře a jsou nejhojnějšími karboxylovými kyselinami v půdním roztoku. Důležitou roli v míře rozpustnosti kovů hraje tvorba komplexů kovů s organickými kyselinami. Také pH rhizosféry ovlivňuje extrakční

schopnosti kyselin, neboť pH mění afinitu půdy a působí i na některé druhy samotných kyselin. Protože různé organické kyseliny mají různá pKa, koncentrace organických ligandů bude při daném pH odlišná.

4.1.7 Hodnocení metod

Variace koncentrací Cu ve výhoncích zjištěná kteroukoliv metodou byla malá a nezávislá na vlastnostech zkoumané půdy a obsahu mědi. Naopak, koncentrace mědi v kořenech se výrazně lišily. U vápnatých zásaditých půd byla zjištěna přímá závislost mezi koncentrací mědi v kořenech, celkovým obsahem mědi, množstvím mědi extrahovaným metodou EDTA či pyrofosfátem draselným a obsahem organického uhlíku v půdě. Koncentrace mědi v kořenech je mnohem citlivější ukazatel dostupnosti mědi obsažené v půdě než koncentrace mědi ve výhoncích. Jednoduché metody extrakce mědi jako EDTA poskytují vhodný obraz biodostupnosti mědi ve vápnatých půdách

4.2 Zpracování vzorků rostlin

4.2.1 Studium biodostupnosti mědi pro rostliny kukuřice

Zrna kukuřice naklíčená na vlhké buničině byla přesazena do kořenáčů obsahujících vzorky kontaminované půdy. Rostlina nebyla hnojena, aby nedošlo k ovlivnění mobility a biodostupnosti mědi v půdách, a byla pěstována ve skleníkových podmínkách: s 14 hodinovým slunečním zářením a 10 hodinovou nocí, při minimální teplotě 22°C, maximální teplota dosahovala 28°C. Rostliny kukuřice byly sklizeny po 35 dnech růstu. Po 72 hodinách sušení při 70°C byla zjištěna váha podzemních i nadzemních částí každé rostliny. Pro získání neporušeného čistého kořenového systému, byly rostliny vyjmuty z půdy za stálého promývání vodou a rostlinné zbytky byly z kořenů odstraněny pinzetou v destilované vodě. Poté byly rostlinné vzorky vylouženy: 1g rostlinného materiálu byl loužen 5ml koncentrované HNO₃ a 10ml 30% H₂O₂. A to 12 hodin při pokojové teplotě, 50 minut při teplotě 60°C, 35 minut při 90°C, 35 min při 150°C a nakonec 150 min při 250°C. konečný objem byl rozpuštěn ve 100ml destilované vody. Koncentrace mědi v rostlinných výluzích byly určeny pomocí metody ICP-AES.

Pozorované koncentrace mědi jsou závislé na vlastnostech půdy jako je celkový obsah mědi, CEC, pH a obsah organického materiálu. Koncentrace mědi v kořenovém systému kukuřice byly vysoké a značně závislé především na celkovém obsahu mědi v půdě, který je nepřímě úměrný kationtové výměnné kapacitě. Naopak koncentrace mědi zjištěné v nadzemních částech rostlin byly velmi nízké, ať byla koncentrace mědi v kořenovém systému rostlin jakákoliv. Z toho vyplývá, že koncentrace mědi v nadzemních částech rostlin nejsou závislé na mědi obsažené v kořenech a zdá se, že se měď

přednostně akumuluje v kořenech a kukuřice má schopnost kontrolovat její koncentrace ve svých nadzemních částech.

4.2.2 Studium biodostupnosti mědi pro rostliny rajčat

Nejprve byla rajčata pro získání složitého kořenového systému 3 týdny pěstována v hydroponických podmínkách. Během prvního týdne byla zásobena 600 μM CaCl_2 a 2 μM H_3BO_3 a v průběhu zbývajících 2 týdnů kompletním výživným roztokem. Než byly rostlinky na 8 dní přesazeny do malých misek s vlhkou půdou, zralé vzorky 6 dní v růstové komoře. Měď nebyla žádným způsobem dodávána, a tak jejím jediným zdrojem zůstala v této části experimentu půda. Misky s půdou byly po těch 8 dní udržovány vlhké pomocí výživného roztoku.

Kořeny a výhonky byly sklizeny na konci hydroponického období a 8 dní po kontaktu rostlin s půdou. Pro každý pokus bylo sklizeno a analyzováno 5 vzorků. Kořeny a výhonky byly zváženy, vysušeny při 105°C a vyluhovány směsí HNO_3 a HClO_4 v poměru 1:1 odděleně. Měď z rostlinného výluhu byla zkoumána metodou AAS.

Variace koncentrací Cu ve výhoncích zjištěná kteroukoliv metodou byla malá a nezávislá na vlastnostech zkoumané půdy a obsahu mědi. Naopak, koncentrace mědi v kořenech se výrazně lišily a zdály se být přímo úměrná obsahu oxidů železa a nepřímo úměrná pH půdy. U vápnatých zásaditých půd byla zjištěna přímá závislost mezi koncentrací mědi v kořenech, celkovým obsahem mědi, množstvím mědi extrahovaným metodou EDTA či pyrofosfátem draselným a obsahem organického uhlíku v půdě. Koncentrace mědi v kořenech je mnohem citlivější ukazatel dostupnosti mědi obsažené v půdě než koncentrace mědi ve výhoncích. Jednoduché metody extrakce mědi jako EDTA poskytují vhodný obraz biodostupnosti mědi ve vápnatých půdách

Obsah těžkých kovů v půdě, kořenovém systému a nadzemních částech rostlin byl změřen ICP-MS.

5. Závěr

Sloučeniny mědi aplikované na vinicích setrvávají v půdě, neboť jsou pevně vázané na organické látky, jílové minerály a oxidy železa, hliníku a manganu. Obsah sorbované mědi v půdách pak ovlivňuje velké množství nejrůznějších faktorů: ať už je to podnebí, způsob hnojení a typ hnojiva, zrnitostní frakce půdy, pH půdy, obsah organických látek či obsah karbonátů.

Sorpce mědi na vápnaté půdy je dost rozšířená sama o sobě, často je navíc zvětšována hnojením nevhodnými látkami (např. olivová drť). V jílových frakcích nehnojených půd najdeme kovů jen málo, ovšem přidávkem olivové drti jeho obsah dramaticky vzroste. Vzhledem k obsahu karbonátů a organického materiálu v písčité frakci je také v této frakci zadržováno velké množství kovů. A právě karbonáty jsou podle všeho tou komponentou půdy, která má na obsah mědi v půdě největší vliv.

Pokles sorbované mědi po odstranění karbonátů ukazuje, že kovy se vážou na povrch karbonátů a pokud dojde k odstranění vápence, dojde sice ke snížení sorpce mědi, mobilita mědi se však zvyšuje.

Co se týče účinnosti jednotlivých extrakčních metod, výsledky ukazují, že extrakce založená na rhizosféře je nejlepší metodou k odhadu biodostupnosti mědi. Zatímco DTPA a EDTA jsou vhodné jen pro vápňité respektive kyselé půdy a CaCl_2 s NaNO_3 jsou metody, které lze použít pouze pro zaměnitelné kovy, extrakce založená na rhizosféře je potenciálně univerzálním způsobem stanovování biodostupnosti kovů. Jejím nejdůležitějším rysem je schopnost podávat spolehlivé výsledky jak v kyselých, tak i v mírně zásaditých půdách. Nicméně její výzkum je teprve v počátcích a proto je třeba zahrnout do testování spolehlivosti této metody více rostlin.

6. Literatura

Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C., 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* 102: 151-161.

Brun L.A., Maillet J., Hinsinger P., Pépin M., 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111: 293-302.

Flores-Velez L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M., Robert M., 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyards soil by three different methods. *European Journal of Soil Science* 47: 523-532.

Chaignon V., Sanchez-Neira I., Herrmann P., Jaillard B., Hinsinger P., 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123: 229-238.

Mu-Hua Feng, Xiao-Quan Shan, Shuzhen Zhang, Bei Wen, 2005. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl_2 , and NaNO_3 extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137: 231-240.

Parat C., Chaussod R., Lévêque J., Dousset S., Andreaux F., 2002. The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *European Journal of Soil Science* 53: 663-669.

Rodriguez-Rubio P., Morillo E., Madrid L., Undabeytia T., Maqueda C., 2003. Retention of copper by a calcareous soil and its textural fractions: influence of amendment with two agroindustrial residues. *European Journal of Soil Science* 54: 401-409

Temminghoff E.J.M., van der Zee S.E.A.T.M., de Haan F.A.M., 1998. Effects of dissolved organic matter on the mobility of copper in a contaminated sandy soil. *European Journal of Soil Science* 49: 617-628.

