



## Fytoremediační technologie podporované fytoextrakce

certifikovaná metodika

Pavel Tlustoš a kol.



© Česká zemědělská univerzita v Praze  
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ  
165 21 Praha 6-Suchbátol  
<http://www.af.czu.cz>

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

ISBN 978-80-213-2326-1

Praha 2012

Certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QH 81167.

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.**  
**Praha - Ruzyně**

# **Fytoremediační technologie podporované fytoextrakce**

## **CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**Pavel Tlustoš a kol.**

---

Certifikovaná metodika byla zpracována v rámci  
řešení výzkumného projektu NAZV č. QH 81167.

# Fytoremediační technologie podporované fytoextrakce

## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Dedikace: Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QH 81167 „Využití a optimalizace fytoextrakční technologie s využitím podporované fytoextrakce těžkých kovů při zachování biologické stability půd“.

### Kolektiv autorů:

prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.  
doc. Ing. Jiřina Száková, CSc.  
Ing. Gabriela Mühlbachová, PhD  
Dipl. Ing. Reinhard Neughschvandtner, PhD  
Ing. Jan Habart, PhD.

### Technická spolupráce:

Ing. Jana Najmanová  
Ing. Stanislava Vondráčková

---

## Fytoremediační technologie podporované fytoextrakce

Pavel Tlustoš a kol.

Vydání první, 2012

Vydavatelství Česká zemědělská univerzita v Praze

Tisk powerprint s.r.o., Brandejsovo nám. 1219/1, 165 00 Praha Suchdol, [www.powerprint.cz](http://www.powerprint.cz)

© Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ

165 21 Praha 6 - Suchdol

tel.: +420 224 382 736

<http://www.af.czu.cz>

ISBN 978-80-213-2326-1

## OBSAH

I. Cíl metodiky .....	1
II. Vlastní popis metodiky .....	1
1. Úvod .....	1
2. Metodický přístup .....	3
3. Přímý vliv aplikace EDTA na příjem Cd a Pb rostlinami .....	4
4. Následný vliv aplikace EDTA na příjem Cd a Pb rostlinami .....	6
5. Vliv aplikace chelatačních činidel na mikrobiální charakteristiky .....	11
6. Aplikace EDTA v poloprovozním měřítku .....	14
III. Srovnání novosti postupů .....	17
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky .....	20
V. Bezpečnost práce při aplikaci a používání EDTA .....	20
VI. Ekonomické aspekty používání EDTA v polních podmínkách .....	21
VII. Seznam použité literatury .....	22
VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice .....	24
IX. Dedikace .....	24

## **I. Cíl metodiky**

---

Cílem metodiky bylo shrnout a prohloubit současné poznatky o možnostech podporované fytoextrakce rizikových prvků s využitím komplexotvorných sloučenin, zejména solí kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) při udržení přiměřené biologické aktivity půdy a současně navrhnout opatření vedoucí ke vhodné aplikaci EDTA tak, aby byly zohledněny nejen možnosti zvýšení přijatelnosti rizikových prvků pro rostlinu a tím i zvýšení příjmu nežádoucích prvků rostlinou, ale i zachování přiměřené biologické aktivity v půdách. Níže uvedená doporučení jsou koncipována na základě víceletých experimentů provedených přímo v terénu v podmínkách kontaminovaných půd v oblasti Příbramska. V jednotlivých experimentech byly testovány jednak dělené a jednorázové dávky solí EDTA na mobilitu Pb a Cd v půdě a následně na příjem těchto prvků zemědělskými plodinami a na vybrané biologické vlastnosti půd a to jak přímá aplikace k pěstované plodině, tak i následné působení během tříleté rotace rostlin. V rámci experimentů byla též testována aplikace specializovanou zemědělskou technikou včetně sklizně a zpracování biomasy tak, aby mohl být doporučen optimální postup konkrétní aplikace solí EDTA pro zvýšení fytoextrakční účinnosti omezeně pohyblivých rizikových prvků.

## **II. Vlastní popis metodiky**

---

### **1. ÚVOD**

Zdroje rizikových prvků mohou vážně ohrozit zemědělskou produkci v jejich okolí a možnosti jejich vstupů do potravního řetězce. Celkové obsahy rizikových prvků ovšem nedávají celkovou představu o jejich pohybu v půdě a reálném nebezpečí jejich přechodu do rostlin a dále do živočichů. Rizikové prvky zvláště u dlouhodobých zdrojů totiž mohou být navázány na celou řadu půdních komplexů, jako jsou částice organické hmoty s navázanými kovy (Zhang et al., 2001, Wang et al., 2007) nebo vázané kovy na jílovité částice, případně na Fe/Mn oxidy nebo karbonátové komplexy (Reddy et al., 2010) a jen jejich malý podíl se vyskytuje v přijatelných formách.

Mezi možnostmi, jak odstranit rizikové prvky v půdy patří i fytoextrakční metody, které ovšem u některých prvků, zvláště silně vázaného olova, nemusí být příliš úspěšné. Využití syntetických chelatizujících činidel může zvýšit přijatelnost prvků pro rostliny (Nowack et al., 2001, Kos a Lestan, 2004) a tím urychlit proces extrakce nežádoucích prvků z půdy. Indukovaná fytoextrakce využívá rostlin s vysokou produkcí biomasy, které mají předpoklad odebrat značné množství kovů, jejichž mobilita v půdě je zvýšena aplikací chemických sloučenin, zejména chelátů. Cheláty desorbují toxický kov z půdní pevné fáze vytvářením silných vodorozpustných komplexů, které

mohou být odstraněny z půdy rostlinami prostřednictvím indukované fytoextrakce (Leštan et al., 2007). Pb je v půdě silně imobilní a míra jeho extrakce je snížena nízkou rozpustností a pozvolnou difuzí na povrch kořenů. Pro vyřešení těchto problémů byla vyvinuta metoda chemicky indukované fytoextrakce (Shah a Nongkynrih, 2007). Při využití této techniky je chelát aplikován do půdy nebo na její povrch.

Nejdříve chelát desorbuje kovy z půdní matrice, mobilizované kovy se pak postupně translokují do rhizosféry a jsou přijímány rostlinnými kořeny. Toxické kovy v půdě jsou obvykle ne zcela dostupné pro chelatační činidlo, proto je indukovanou fytoextrakcí odstraněna pouze část z celkového množství kovů v půdě, obzvláště v půdách bohatých na organickou hmotu nebo jílu. Luo et al. (2006a) zjistili, že cheláty zvyšují fytoextrakci olova z kontaminovaných půd. Z chelátů použitých při studiích fytoextrakce byla u EDTA (ethylendiamintetraoctové kyseliny) prokázána vysoká účinnost při mobilizaci kovů v půdách. Ve srovnání s ostatními cheláty, které mají podobné konstanty stability s Pb, jako DTPA (diethylentritrilopentaoctová kyselina), N, N'-di (2-hydroxybenzyl)ethylendiamin a N,N'-dioctová kyselina byla EDTA nejúčinnější v uvolňování Pb z vazeb v půdě do roztoku. Před bezhlavým použitím EDTA však varuje Leštan et al. (2007), kteří uvádějí, že přestože se EDTA jeví jako nejúčinnější chelát pro podpoření odběru kovu rostlinami, obzvláště pro odběr Pb, její nízká biologická rozložitelnost ji omezuje pro rozsáhlejší polní aplikace. Schmidt (2003) uvádí, že při zkoumání extrahovatelnosti Pb z jednotlivých půd bylo řadou autorů dokumentováno, že koncentrace Pb ve výhoncích testovaných rostlin byly přímo úměrné množství EDTA či příbuzného chelatačního činidla přidaného do půdy. Aplikace chelátu v několika menších dávkách (oproti jednorázové aplikaci) může vést k vystupňované akumulaci Pb v rostlinné biomase. Kombinovaná aplikace různých chemických látek může také výrazně zlepšit účinnost fytoextrakce kovu (Leštan et al., 2007).

Reakce půdních mikroorganismů na přídavek chelátových činidel je podle literatury různorodá. Byly pozorovány jak negativní vlivy přídavku chelátových činidel jako je například snížená aktivita dehydrogenasy (Epelde et al., 2008), celkových mikrobiálních aktivit a schopnosti využívání organických substrátů (Ultra et al., 2005). Například ale Sapoundjieva et al. (2003) zjistili, že aplikace EDTA významně zvyšovala koncentrace přijatelných frakcí rizikových prvků, přičemž nebyl zjištěn negativní vliv na půdní mikroorganismy. Chander a Joergensen (2008) zase ukázali, že půdní mikrobiální biomasa lépe tolerovala EDTA v dlouhodobě kontaminovaných půdách než v půdách jen málo kontaminovaných. Protože u EDTA byly v některých případech zjištěny negativní vlivy na půdní mikrobiální aktivity, testovala se i další chelatační činidla, jako je například snadno biodegradabilní EDDS (kyselina [S,S]-ethylenediaminedijantarová), které životní prostředí ovlivňuje méně (Jaworska et al., 1999; Luo et al., 2006b) nebo kyselina citronová (Wen et al., 2009). Účinnost dalších

činidel při uvolňování zejména málo mobilního olova byla zpravidla nižší, a navíc většina testovaných sloučenin byla ekonomicky méně výhodná, proto bylo od jejich dalšího ověřování upuštěno.

## 2. METODICKÝ PŘÍSTUP

Předmětem studia byla oblast v okolí Kovohutě Příbram, a.s. následnická, která je dlouhodobě kontaminovaná rizikovými prvky pocházejícími z dřívějších činností této kovohutě. Pro pokusy byly pozemky s ornou půdou přímo na kontaminovaných stanovištích v blízkosti kovohutí. Koncentrace rizikových prvků v půdách vybraných pro pokusy vždy několikanásobně převyšovaly limity Cd, Pb a v některých případech i Zn povolené vyhláškou 13/1994 Sb. Základní fyzikálně-chemické charakteristiky půdy shrnuje Tabulka 1. Způsob aplikace EDTA byl nejprve ověřován v modelových nádobových experimentech. Půdní vzorky byly odebrány z orniční vrstvy (hloubka 0-20 cm) zemědělsky využívané půdy (N 49°42.441'; E 13°59.603') přibližně 1 km SV od huti (Kovohutě Příbram). Tato plocha byla současně využita pro oba polní pokusy. Půdy pro nádobové experimenty byly před použitím vysušeny na vzduchu, homogenizovány a prosátý přes 10 mm síto.

Nádobový pokus byl založen pro zhodnocení efektu rozdílných koncentrací EDTA (dihydrát disodné EDTA, čistota > 98,0 %, Omikron, Německo) a rozdílných režimů aplikace (jednorázová a dělená aplikace) na mobilitu Cd a Pb. Do nádob s obsahem 5 kg půdy bylo zaseto osm semen kukuřice seté, kultivar Rivaldo, a tři týdny po zasetí byl počet upraven na čtyři rostliny. Dávky EDTA byly použity stejné jako v inkubačním pokusu. Jednorázové dávky (3, 6, 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) a první ze tří dělených dávek (3 x 1, 3 x 2, 3 x 3 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) byly aplikovány 61 dní po zasetí. Následující podíly byly přidány po 10 a 20 dnech. Nádoby byly zalévány demineralizovanou vodou tak, aby byla zachována cca. 60% nasycenost půd.

Přímá fytoremediační účinnost kukuřice seté byla současně zjišťována i v polním pokusu (velikost parcely: 10 m<sup>2</sup>). Jednorázové dávky a první dělené dávky EDTA byly aplikovány 90 dní po zasetí kukuřice seté, druhé a třetí dělené dávky následovaly v dvoutýdenních intervalech. Dávky EDTA byly identické dávkám v nádobovém pokusu a byly aplikovány na povrch půdy do ekvivalentního množství 300 kg .m<sup>-2</sup>. Vodné roztoky chelátu byly aplikovány rovnoměrně manuálně v objemu 10 l. m<sup>-2</sup>. Rostliny byly sklizeny 40 dní po první aplikaci EDTA ve stádiu mléčné zralosti. Vzorkování půdy bylo realizováno půdní sondou do hloubky 50 cm 58. den po první aplikaci EDTA. Vzorky půdního profilu byly rozděleny po 5 cm ve snaze zhodnotit vertikální pohyb prvků po aplikaci EDTA. V dalších dvou letech byla na pokusném stanovišti sledována následná reakce rostlin na přímou aplikaci soli EDTA, na ploše byla po oba roky pěstována pšenice setá, která byla vždy sklizena v plné zralosti, další aplikace EDTA již prováděna nebyla.

Vliv přísadavků EDTA na mikrobiální charakteristiky byl testován ve třech základních typech pokusů. Krátkodobé inkubační pokusy za kontrolovaných podmínek, kdy byla do půd pocházejících z oblasti příbramských kovohutí přidávána EDTA, ty byly využity k testování tolerance půdní mikrobiální biomasy vůči tomuto činidlu. Střednědobé a dlouhodobé pokusy sloužily ke zjištění střednědobého a dlouhodobého vlivu EDTA na mikrobiální charakteristiky půd. Standardně byla prováděna stanovení obsahů mikrobiální biomasy, respirační aktivity, u střednědobých a dlouhodobých pokusů aktivita dehydrogenasy (endogenní enzym), případně poměry mikrobiální biomasy vůči organickému uhlíku.

*Tab. 1: Základní fyzikálně-chemické půdní charakteristiky*

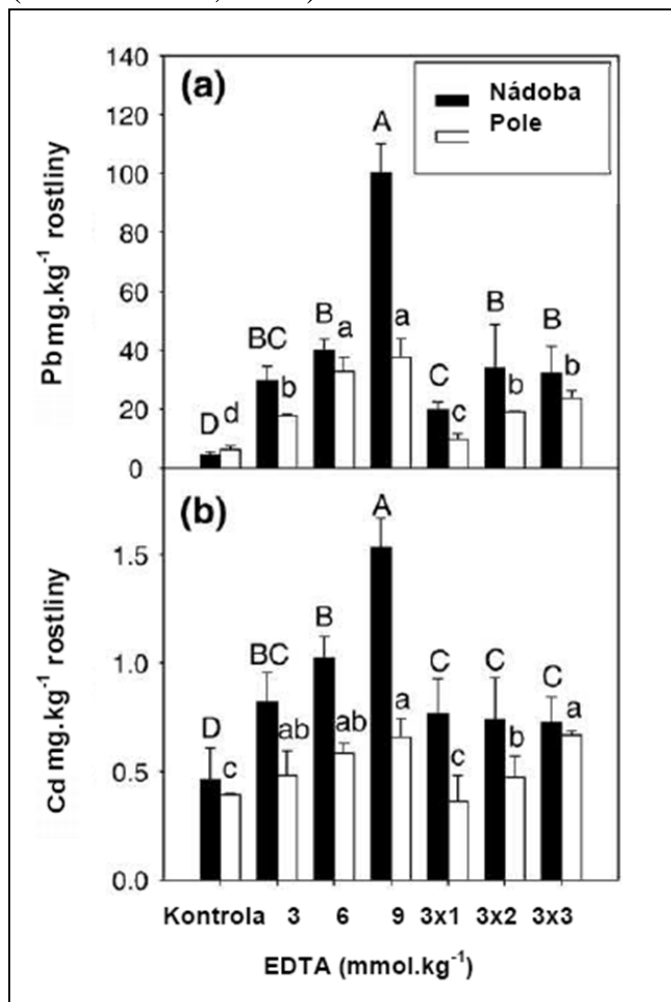
Charakteristika	Hodnota
pH <sub>H2O</sub>	6,5
pH <sub>KCl</sub>	5,7
KVK (cmol.kg <sup>-1</sup> )	13,1
C org (%)	1,74
Písčitá frakce (%)	42,8
Prachová frakce (%)	41,8
Jílová frakce (%)	15,4
Fe (g.kg <sup>-1</sup> )	2,78
Al (g.kg <sup>-1</sup> )	0,36
Pb (mg.kg <sup>-1</sup> )	544±69
Cd (mg.kg <sup>-1</sup> )	4,99±1,72

### 3. PŘÍMÝ VLV APLIKACE EDTA NA PŘÍJEM Cd A Pb ROSTLINAMI

Obsahy Pb a Cd v biomase kukuřice seté po aplikaci EDTA jsou prezentovány v grafu 1. Obsahy Pb v sušině biomasy nadzemní části rostlin kukuřice seté se zvyšovaly lineárně v závislosti na množství použitých jednorázových (3, 6, 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) a dělených dávek (3 x 1, 3 x 2, 3 x 3 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>). Jednorázové aplikace ukazují korelační faktor  $R^2 = 0,90$  (nádobový pokus) a 0,97 (polní pokus) a dělené aplikace korelační faktor  $R^2 = 0,85$  (nádobový pokus) a 0,97 (polní pokus). Nejvyšší obsah Pb (110,5±9,6 mg. kg<sup>-1</sup>) byl zjištěn u nádobového pokusu s nejvyšší jednorázovou dávkou a reprezentoval 23,2 násobné zvýšení v porovnání s kontrolou (4,2±1,2 mg. kg<sup>-1</sup>). Nejvyšší obsah Pb (37,6±6,2 mg. kg<sup>-1</sup> ve variantě 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) v polním pokusu byl 6,0 krát vyšší v porovnání s kontrolou (6,3±1,1 mg. kg<sup>-1</sup>). Odběr Cd se lineárně zvyšoval po aplikaci EDTA. Jednorázové aplikace ukazují korelační faktor  $R^2 = 0,97$  (nádobový pokus) a 0,99 (polní pokus) a dělené aplikace korelační faktor  $R^2 = 0,48$  (nádobový pokus) a 0,72 (polní pokus). Obsahy Cd po přidání nejvyšší jednorázové dávky EDTA se zvýšily 10,5krát v porovnání s kontrolou (4,2±1,2 mg. kg<sup>-1</sup>).



zové dávky (9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) rostly faktorem 3,1 (z 0,46±0,15 na 1,53±0,13 mg.kg<sup>-1</sup>) u nádobového pokusu a faktorem 1,7 (z 0,39±0,00 na 0,66±0,08 mg.kg<sup>-1</sup>) u polního pokusu oproti kontrole. Vyšší rozdíly mezi jednotlivými variantami v modelových podmínkách nádobového pokusu mohou být připsány lepší penetraci půdy kořeny (Friesl et al., 2006), vyšší půdní vlhkosti a lepší homogenizaci použité půdy (Conesa et al., 2006).



Graf 1. Obsah Pb (a) a Cd (b) v sušině biomasy nadzemní části rostlin kukuřice seté v nádobovém a polním pokusu v závislosti na aplikaci rozdílných koncentrací EDTA (0, 3, 6, 9, 3x1, 3x2, 3x3 mmol.kg<sup>-1</sup>). Data jsou zobrazena jako střední hodnota SD (n =4). Data se stejnými písmeny reprezentují statisticky významné hodnoty (p < 0,05)

Fytoextrakční schopnost rostlin je klíčovým parametrem pro určení vhodnosti opatření a hodnotíme ji tzv. remediačním faktorem, který reprezentuje v % podíl prvku odebraného kořeny z daného objemu půdy. Nejvyšší remediační faktor pro Pb (0,30 %) a Cd (0,51 %) byl stanoven po přidání 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> v nádobovém pokusu. V polním pokusu byl nejvyšší

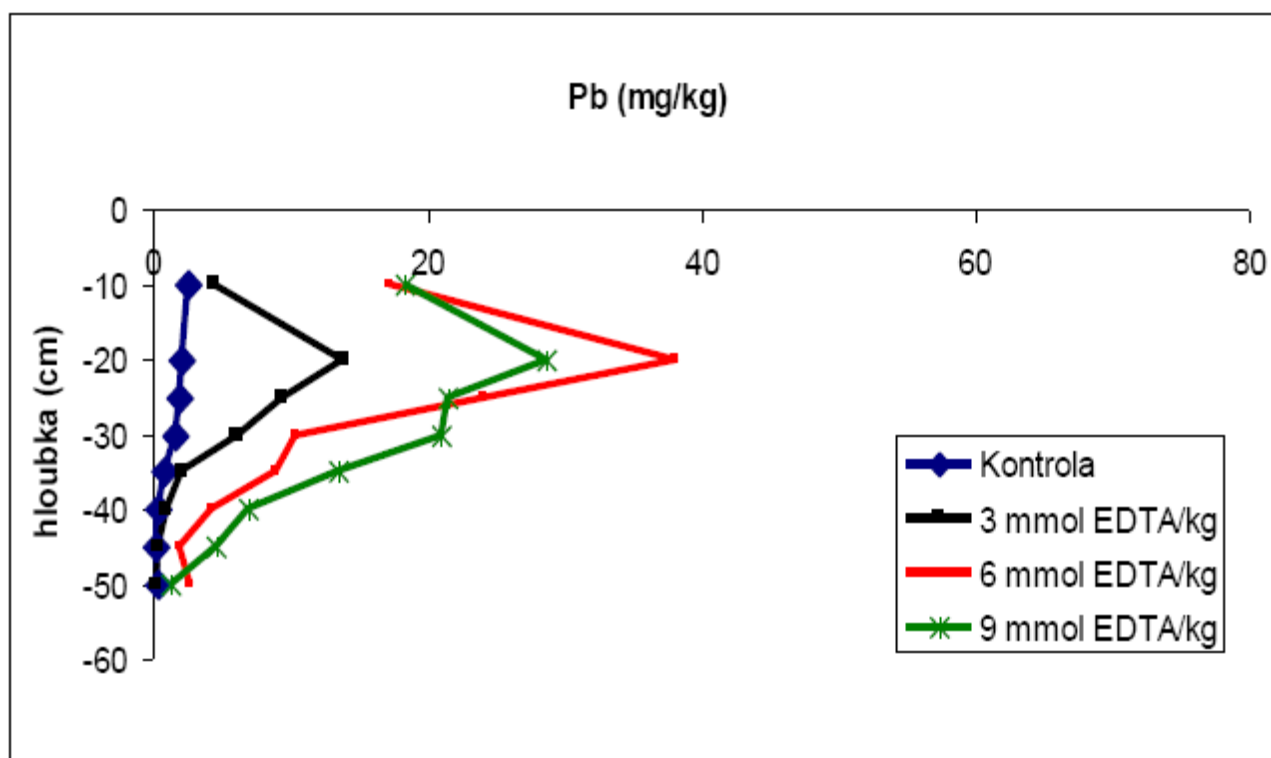
remediační faktor pro Pb (0,0075 %) vypočítán po aplikaci 3 x 2 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> a nejvyšší remediační faktor pro Cd (0,0246 %) byl obdržen v kontrolní variantě. Vyšší fytoextrakční schopnost, 40krát vyšší u Pb a 25krát vyšší u Cd, byla zaznamenána u nádobového pokusu oproti polnímu. Toto lze vysvětlit hlavně vysokým poměrem rostlina/půda, kdy u nádobového pokusu jedna rostlina prokořeňovala 1,25 kg půdy, zatímco ta samá rostlina v polním pokusu prokořeňovala více než 40 kg svrchní vrstvy půdy. V nádobových pokusech jsou navíc všechny kořeny ve styku s ošetřenou půdou, kdežto v polních podmínkách mohou prorůstat do větších hloubek mimo ošetřenou půdní vrstvu. Naše výsledky potvrzují, že fytoremediační schopnost rostlin je nižší v polních podmínkách než v modelových pokusech, jak popisují i Kumar et al. (1995). Celkový fytoextrakční potenciál kukuřice seté pro Pb, pěstované po dobu jedné sezony, byl 122,6 ± 10,4 g Pb.ha<sup>-1</sup> po aplikaci dělené dávky

3x2 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> do půdy, v porovnání s 58,9±7,7 g Pb ha<sup>-1</sup> u kontrolní varianty. To je o jeden řád nižší hodnota, než zaznamenali Kos et al. (2003) v nádobovém pokuse u fytoextrakčního potenciálu kukuřice seté (940-1380 g Pb ha<sup>-1</sup>). Nicméně v závislosti na celkovém obsahu Pb v orniční vrstvě (1632 kg.ha<sup>-1</sup>, spočítaném pro 3000 tun půdy na ha) byl fytoextrakční potenciál kukuřice seté v daných podmínkách velmi nízký. Fytoextrakční potenciál pro Cd je přidáváním EDTA snižován. Vyšší fytoextrakční schopnost pro Cd u kontrolní varianty byla způsobena lepším růstem rostlin. Mírně zvýšené koncentrace Cd byly příliš nízké na to, aby kompenzovaly sníženou produkci nadzemní suché biomasy. Podobné zjištění učinili také Lesage et al. (2005) při pěstování slunečnice roční ošetřené přídatkem EDTA. Také nejvyšší fytoextrakční potenciál pro Cd (3,7±0,2 g Cd na ha) v kontrolní variantě byl podstatně nižší v porovnání s hodnotami, které zaznamenali Kos et al. (2003) pro kukuřici setou (50-82 g Cd na ha). Přestože prokazatelně došlo ke zvýšení obsahů Pb a Cd v sušině nadzemní biomasy rostlin, není míra odebraných kovů tak vysoká, aby mohla být prakticky využita. K podobným zjištěním dospěli také Kos a Leštan (2003) při indukovaném odběru Pb rostlinami čínského zelí za pomoci EDTA v nádobovém pokusu. Teprve akumulací více než 1 % kovu z celkového obsahu prvku přítomného v půdě do sušiny nadzemní biomasy je dosaženo ekonomicky přijatelné úrovně pro využití fytoextrakce (Huang et al., 1997). Počítáno s maximální hodnotou remediačního faktoru v našem případě by trvalo 300 pěstebních období, než by bylo dosaženo úrovně 220 mg.kg<sup>-1</sup> půdy pro Pb a průměrně 260 pěstebních období, než by bylo dosaženo úrovně 1 mg.kg<sup>-1</sup> pro Cd v nádobovém pokusu.

#### 4. NÁSLEDNÝ VLIV APLIKACE EDTA NA PŘÍJEM Cd A Pb ROSTLINAMI

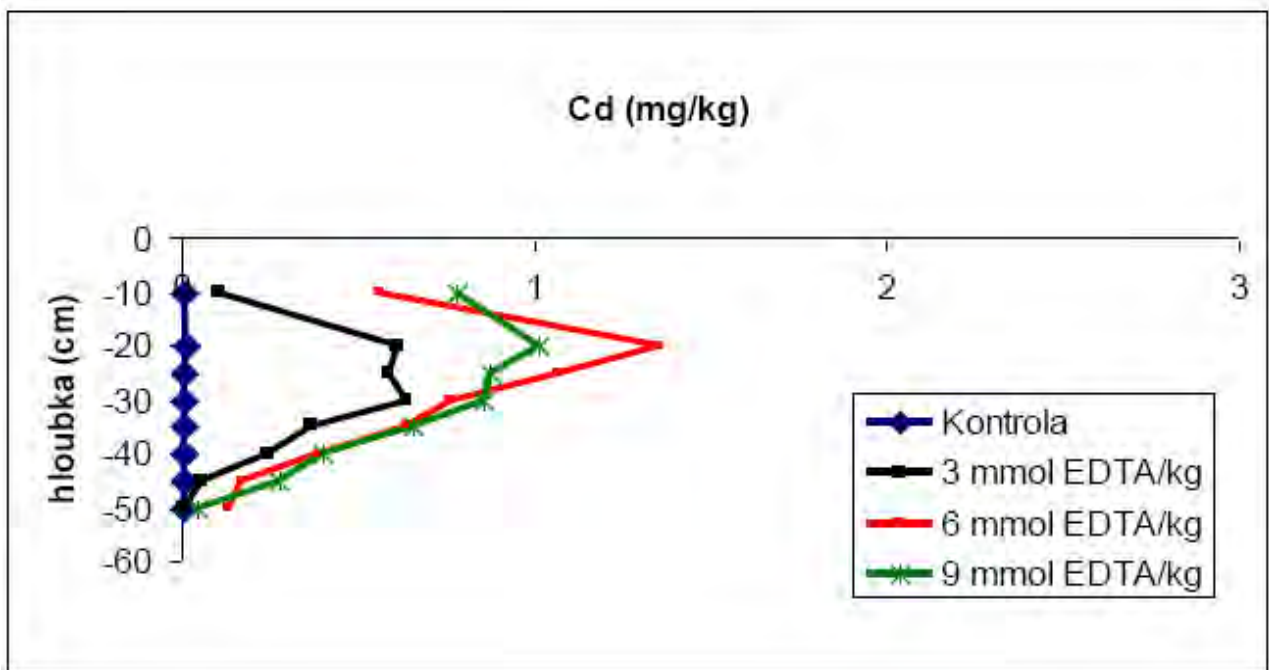
V prvním roce experimentu bylo aplikováno chelatační činidlo EDTA v různých dávkách a aplikačních režimech, jak bylo výše uvedeno. V dalším roce pak byl pouze monitorován následný vliv EDTA jak v nádobovém, tak i v polním experimentu, přičemž testovanou rostlinou byla pšenice setá. Výnosy zrna zůstaly v případě jednorázové aplikace téměř na stejné úrovni ve srovnání s kontrolní variantou. Dělená aplikace se projevovала vyššími výnosy zrna a to až 1,5krát (3x1 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>) oproti variantě kontrolní. Výnosy slámy u variant ošetřených dělenou aplikací byly nižší oproti variantám se stejnou dávkou aplikace jednorázové. Koncentrace Pb v rostlinné hmotě odpovídá i v druhém roce po aplikaci chelatačního činidla výši jeho dávky. Výnosy se snižují s rostoucí aplikační dávkou činidla, naopak obsah Pb ve sklizené biomase s rostoucí dávkou roste. Dávka 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> zvýšila obsah olova v biomase (slámě) pšenice 13krát. Nejúčinnější z dělených aplikací (3x2 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>) 1,6 krát oproti variantě kontrolní. Poněkud odlišná byla situace v případě Cd. Obsahy Cd ve slámě pšenice byly ve všech případech nižší než jeho koncentrace u varianty kontrolní (6,65 mg Cd.kg<sup>-1</sup>). Obsahy v zrně byly významně nižší a jejich obsah téměř nezávisel na dávce EDTA.

V polním pokusu byla především sledována akumulace rizikových prvků do biomasy a mobilita sledovaných prvků v půdním profilu pro odhad případného rizika vyplavování těchto prvků do podzemní vody. Jednorázová aplikace EDTA z prvního roku vedla k posunu mobilního olova do nižších horizontů (viz. graf č. 2). Nejvyšší obsah olova byl v kontrolní variantě v prvních 10 cm vrchní vrstvy půdy. S rostoucí aplikovanou dávkou EDTA koncentrace olova v půdě stoupala přesně odrážející celkovou dávku ošetření. Rozdíl mezi 3 a 6 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> je skokový. Nejvyšších obsahů olova v půdním roztoku bylo dosaženo v hloubce 10-20 cm. Směrem dolů pak zvolna klesá. V hloubce 45-50 cm je u varianty ošetřené 3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> koncentrace srovnatelná s kontrolní variantou, dávky 6 a 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> zvýšily zastoupení olova v půdním roztoku na 10 (2,65 mg Pb.kg<sup>-1</sup>) a téměř 5násobek (1,23 mg Pb.kg<sup>-1</sup>).



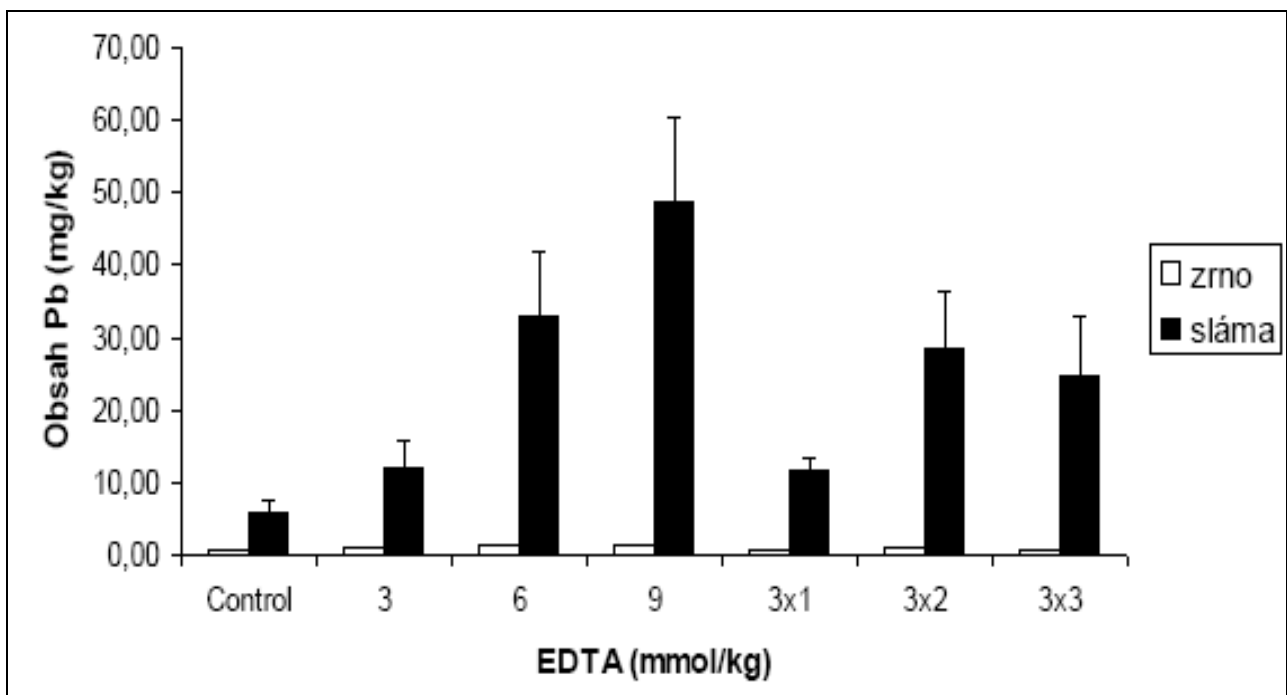
Graf 2: Pohyb Pb v půdním profilu - extrakce deionizovanou vodou  
(data jsou zobrazena jako střední hodnota  $\pm$  SD, n=4)

U kadmia, podobně jako u Pb vliv EDTA narůstal s rostoucí koncentrací aplikované dávky (Graf 3). Nejvyšší koncentrace deionizovanou vodou vyluhovatelného Cd byly naměřeny v hloubce 20 – 25 cm. V hloubce 50 cm zvýšilo ošetření 6 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> koncentraci mobilního Cd 20krát (1,03 mg Cd.kg<sup>-1</sup>), ošetření 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> 6,3 krát (0,04 mg Cd.kg<sup>-1</sup>).

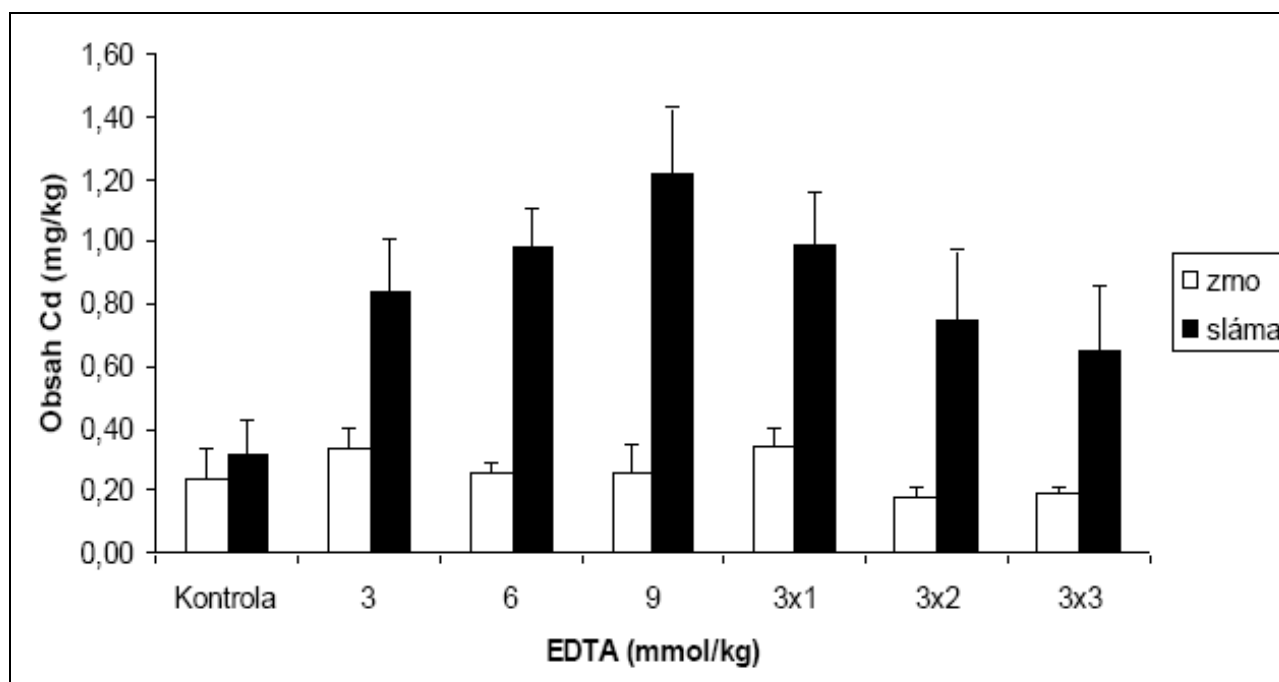


Graf 3: Pohyb Cd v půdním profilu – extrakce deionizovanou vodou (data jsou zobrazena jako střední hodnota  $\pm$  SD,  $n=4$ )

Vliv následné aplikace EDTA na odběr sledovaných prvků rostlinnou biomasou pšenice seté v polním experimentu shrnují grafy 4 a 5.



Graf 4: Obsah Pb v biomase pšenice (data jsou zobrazena jako střední hodnota  $\pm$  SD,  $n=4$ )



Graf 5: Obsah Cd v biomase pšenice seté (data jsou zobrazena jako střední hodnota  $\pm$  SD,  $n=4$ )

Až na výjimku ( $3 \times 3$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>) je obsah Pb v biomase stále úměrný dávce aplikovaného chelatačního činidla v předchozím roce. Obsah olova ve slámě varianty ošetřené dávkou 3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> je dvojnásobný, ve variantě ošetřené 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> pak osminásobný ve srovnání s kontrolou. Dělená aplikace opět dosáhla nižší míry akumulace olova ve slámě pěstované plodiny. Rozdělením dávky 3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> ( $3 \times 1$ ) došlo k 1,9 násobnému zvýšení, u dávky  $3 \times 3$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> pouze 4 násobnému oproti kontrole. Koncentrace Cd v zrna pšenice klesala s rostoucí dávkou EDTA. Odlišný trend byl zaznamenán u slámy. Ve všech případech se projevil vliv aplikace chelatačního činidla z prvního roku. Zatímco u aplikace jednorázové se s rostoucí dávkou obsah Cd ve slámě zvyšoval (u ošetření 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> na téměř 4 násobek), u aplikace dělené s rostoucí celkovou dávkou obsah Cd klesal (0,99 mg Cd.kg<sup>-1</sup> slámy –  $3 \times 1$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>, 0,65 mg Cd.kg<sup>-1</sup> slámy –  $3 \times 3$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>).

Fytoextrakční potenciál je vyjádřením stupně fytoextrakce rizikového prvku pěstovanou biomasou, závisující na koncentraci prvku v biomase a na produkci biomasy na jednotku plochy. Ve srovnání s kukuřicí pěstovanou v prvním roce pokusu fytoextrakční potenciál Cd u pěstované pšenice klesal s výší aplikované dávky, a to jak ve slámě, tak v zrna. Varianty ošetřené 3 a  $3 \times 1$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> vedly k nejvyššímu nárůstu fytoextrakčního potenciálu pšenice a to 2 násobnému a 2,8 násobnému oproti variantě kontrolní. Fytoextrakční potenciál pro Pb byl opět ve všech případech vyšší v porovnání s kontrolní variantou. Vliv formy ošetření se snížil, účinky byly obdobné. Nejefektivnější se ukázaly varianty ošetření 6 a  $3 \times 2$  mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>. Zatímco

fytoextrakční potenciál kontrolní varianty činil 29 g Pb na hektar, u varianty 6 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> bylo dosaženo hodnoty 141 g Pb na hektar a u varianty 3x2 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> 121 g Pb hektar. Přestože v některých případech (zvláště u Cd) bylo dosaženo vyšší fytoextrakční účinnosti než u kukuřice pěstované v prvním roce experimentu, stále se jednalo o příliš nízké hodnoty v porovnání s koncentrací mobilizovaného, a tedy rostlinám „zpřístupněného“ rizikového prvku. To naznačují například i Madrid et al. (2003), kteří uvádí, že v chelátem usnadněné fytořemediaci jsou velká množství prvků vyplavována mimo kořenovou zónu a to i navzdory rostoucímu odběru kovů rostlinami. Množství odběru rostlinami je dle něj minoritní ve srovnání s vyplaveným.

V třetím roce pokusu hodnoty koncentrace vodorozpustného Pb v půdě významně poklesly. Ve srovnání s mobilním obsahem Pb na začátku pokusu byly tyto koncentrace cca 40krát nižší a jejich maxima se posunula do vyšších hloubek. Koncentrace Pb se po aplikaci jednorázové dávky EDTA snížila téměř na nulu v nejsvrchnější vrstvě a dosáhla maxima v hloubce 20-30 cm pod povrchem. Velikost aplikované dávky EDTA korespondovala přímo úměrně s obsahem vodorozpustného Pb v této vrstvě a dosáhla maxima 6,2 mg Pb.kg<sup>-1</sup> půdy po aplikaci 9 mmol EDTA. Také Lai a Chen (2005) prokázali nárůst koncentrace mobilního Pb v půdě s rostoucí dávkou EDTA. Tito autoři, podobně jako i další sledovali vliv aplikace chelátu na mobilitu pouze v daném roce nikoliv v letech následujících. S rostoucí hloubkou poté dochází opět k postupnému poklesu obsahu mobilního Pb. Nejvyšší koncentraci v hloubce 50 cm vykázala opět varianta ošetřená 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> a to 1,7 mg Pb.kg<sup>-1</sup> půdy. V kontrolní variantě obsah mobilního Pb s hloubkou klesal a nejvyšší koncentrace byla stanovena v podpovrchové vrstvě (0,5 mg.kg<sup>-1</sup> půdy). Dělená aplikace vykazuje podobný trend jako v případě jednorázové aplikace. Ve vrstvě půdy 0 - 10 cm se koncentrace mobilního Pb blížila nule. S rostoucí hloubkou se zvyšovala a nejvyšších hodnot dosáhla ve vrstvě 25-35 cm a poté opět klesala. V případě dělené aplikace nebyl zřetelný rozdíl mezi dvěma nejvyššími dávkami a na rozdíl od jednorázové aplikace byla nejvyšší koncentrace olova v hloubce 30 cm a to 5,8 mg Pb.kg<sup>-1</sup> půdy stanovena na variantě s celkovou dávkou 3x2 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>. Nárůst koncentrace mobilního Pb v hloubce 50 cm již odpovídal aplikované dávce a byl ve srovnání s jednorázovou aplikací vyšší u dávek 3x1 a 3x2 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> (3 a 10krát), nižší u dávky 3x3 (1,3krát). Tento posun zvýšených koncentrací Pb do hlubších vrstev půdy znamená určité riziko indukované fytoextrakce a to jak z důvodu omezení dokonalého prokořenění hlubší vrstvy půdy a tím i snížení příjmu olova rostlinami a současně je vážnou hrozbou kontaminace povrchových vod mobilním podílem olova.

Ve třetím roce experimentu, kdy byla na polním stanovišti pěstována opět pšenice setá, byly obsahy Pb ve slámě pšenice z ošetřených variant vyšší ve srovnání s kontrolní variantou. Podobně i Komárek et al. (2007) zjistili, že dodání EDTA jednoznač-

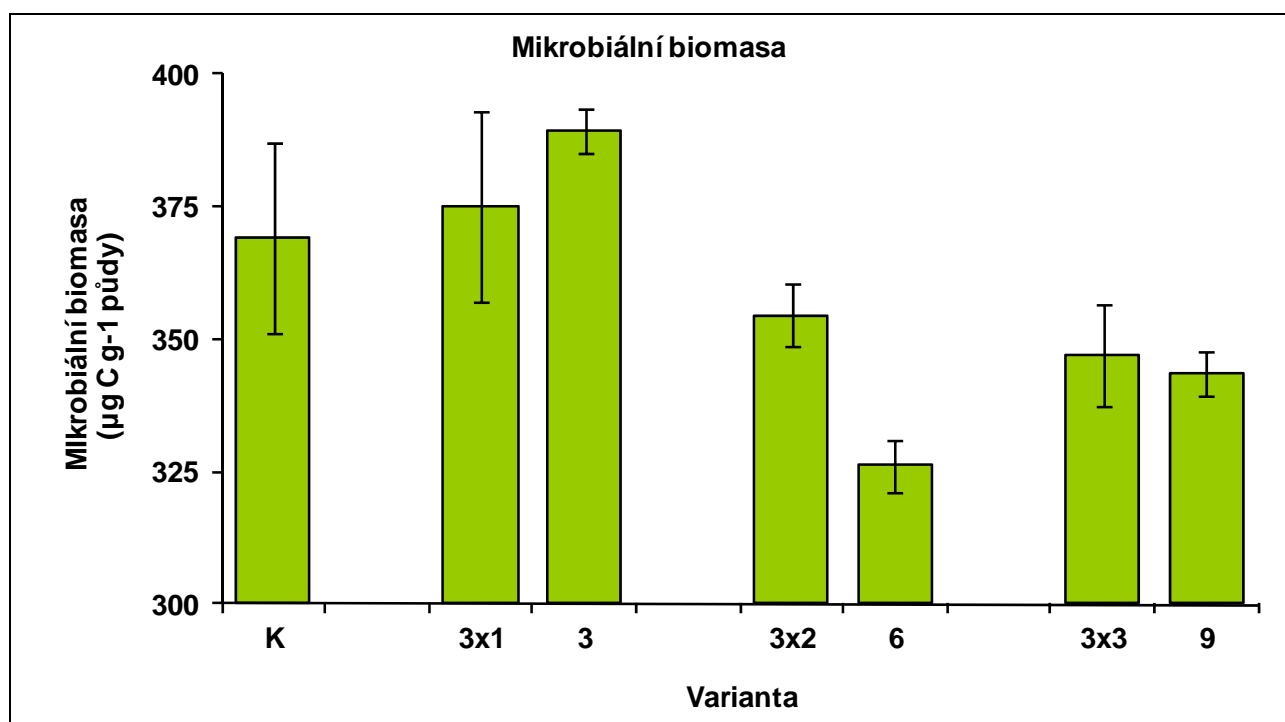
ně zvýšilo obsah olova zvláště v listech topolu, což dokazuje silnou míru translokace Pb-EDTA komplexů do nadzemní biomasy. Obsahy Pb v biomase zrna i slámy variant s dělenou aplikací EDTA jsou mírně vyšší ve srovnání s aplikací jednorázovou. Stejně jako v předcházejícím, tak i v tomto roce obsahy Pb ve slámě pšenice několikanásobně převyšovaly jeho obsahy v zrně. Obsahy olova ve slámě pšenice u varianty 3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> byly 1,2krát vyšší, u varianty 9 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> téměř dvojnásobné oproti kontrolní variantě ve třetím roce trvání experimentu. U dělené aplikace byla dávka 3x1 1,4krát účinnější a dávka 3x3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup> 2,2krát oproti kontrolní variantě. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že i přes celkově nižší změny v koncentraci mobilního Pb v půdě u dělených dávek EDTA byla v tomto roce jejich účinnost fytoextrakce vyšší v porovnání s jednorázovou dávkou a rostla s vyšší dávkou EDTA.

Experimenty dále prokázaly zvýšenou mobilitu základních živin (Ca, K, Mg a P) a stopových prvků (Fe a Mn) po aplikaci EDTA, kdy může dojít ke kompetici těchto prvků se sledovanými rizikovými prvky (Neugschwandtner et al., 2009). V souvislosti s Pb a Cd je nejčastěji zmiňována kompetice Fe a Ca z důvodu jejich vysokého obsahu v půdách a relativně vysoké konstantě stability. Z tohoto důvodu je pro mobilizaci prvků jako Pb a Cd zapotřebí poměrně vysoká dávka EDTA. Je tedy zřejmé, že při optimalizaci aplikace EDTA je třeba přihlížet i k fyzikálně-chemickým vlastnostem konkrétní půdy, zejména k obsahu dominantních kationtů.

## 5. VLIV APLIKACE CHELATAČNÍCH ČINIDEL NA MIKROBIÁLNÍ CHARAKTERISTIKY

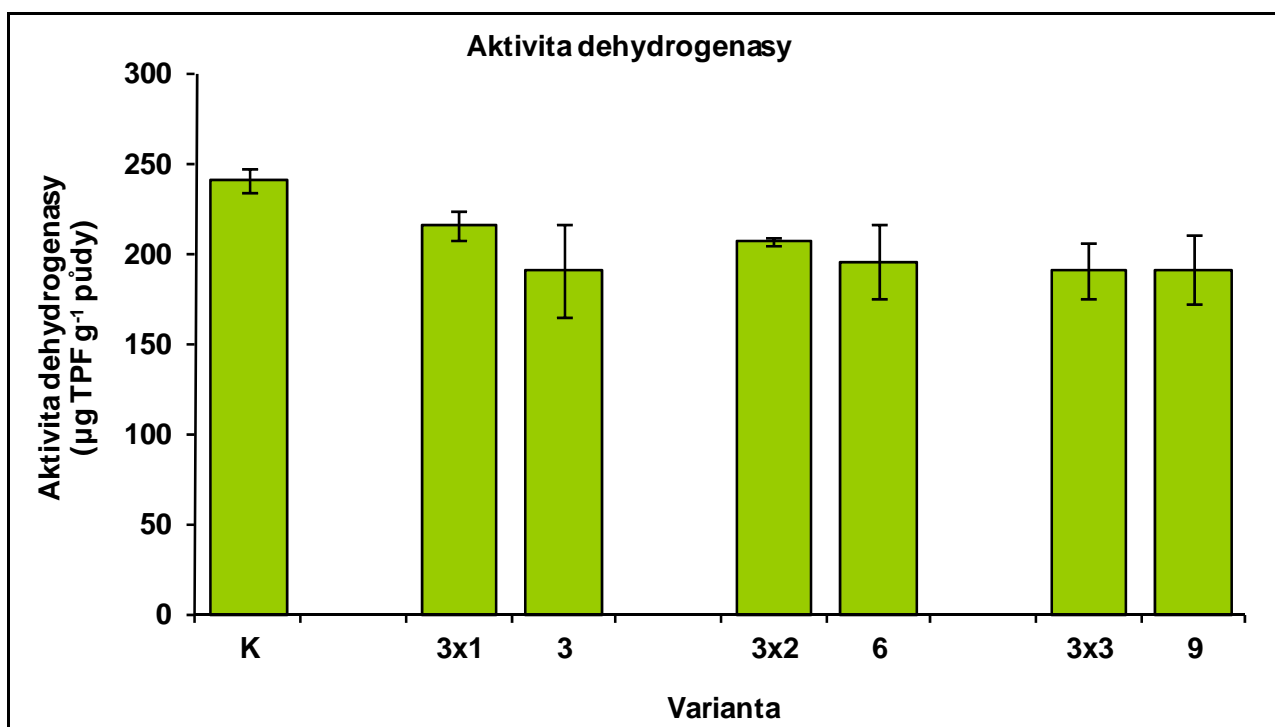
Přídavek EDTA zvyšuje respirační aktivity především v prvních měsících po aplikaci EDTA. Tento jev souvisí nejpravděpodobněji se snížením celkového obsahu mikrobiální biomasy a s tím souvisejícím rozkladem mikrobiálních buněk, částečně lze vyšší respirační aktivity připsat stresu vyvolaného aplikací EDTA (Giller et al., 1998). Po akutní fázi následující po přidavku chelátu, kdy se významně snížily obsahy mikrobiální biomasy, aktivita dehydrogenasy a naopak vzrostla respirační aktivita, došlo k určité adaptaci mikroorganismů na nové podmínky. Dlouhodobý vliv EDTA a vliv vícenásobné aplikace EDTA na mikrobiální charakteristiky byl ověřován v polním pokusu na orné půdě obsahem Corg 1,95%. Aplikace různých koncentrací EDTA do půdy ovlivňuje půdní mikrobiologické charakteristiky v delším časovém úseku. Nižší dávky (3 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>) po třech letech od aplikace EDTA významněji neovlivňovaly obsahy mikrobiální biomasy. Vyšší přídavky EDTA (6 a 9 mmol EDTA g<sup>-1</sup> půdy) obsahy mikrobiální biomasy snižovaly, v případě dělené dávky bylo snížení obsahů mikrobiální biomasy výraznější a představovalo pokles zhruba o 12% (Graf 6). Podobně aplikace EDTA do půdy snižuje aktivitu dehydrogenasy, endobuněčného enzymu, který přímo odpovídá buněčné aktivitě (Graf 7). Respirační aktivity

jako další možné ukazatele mikrobiální aktivity se v polních podmínkách ve variantách s přidavkem EDTA většinou zvyšovaly, prokazatelně vyšší respirační aktivity byly zjištěny vysokých dávkách EDTA (9 a 3 x 3 mmol EDTA g<sup>-1</sup> půdy) (Graf 8). Vyšší respirační aktivitu v tomto případě nelze pokládat za pozitivní trend, protože množství mikrobiální biomasy bylo působením EDTA sníženo a pravděpodobněji se půdní mikroorganismy nacházely ve stresu způsobeném působením EDTA, na který reagovaly zvýšenou respirační aktivitou. Vyšší respirační aktivita může být výsledkem vynaložení vyššího množství energie na přežití a adaptaci (Giller et al., 1998). Celkový poměr mezi obsahem mikrobiální biomasy a organickým uhlíkem byl snížený u všech pokusných variant, snížení tohoto parametru (Giller et al., 1998) svědčí o negativním ovlivnění půdních mikroorganismů. Ve sledovaném případě lze konstatovat, že aplikace EDTA negativně ovlivnila mikrobiální aktivity, lepších výsledků bylo dosaženo při aplikaci nižších neopakovaných dávek EDTA.

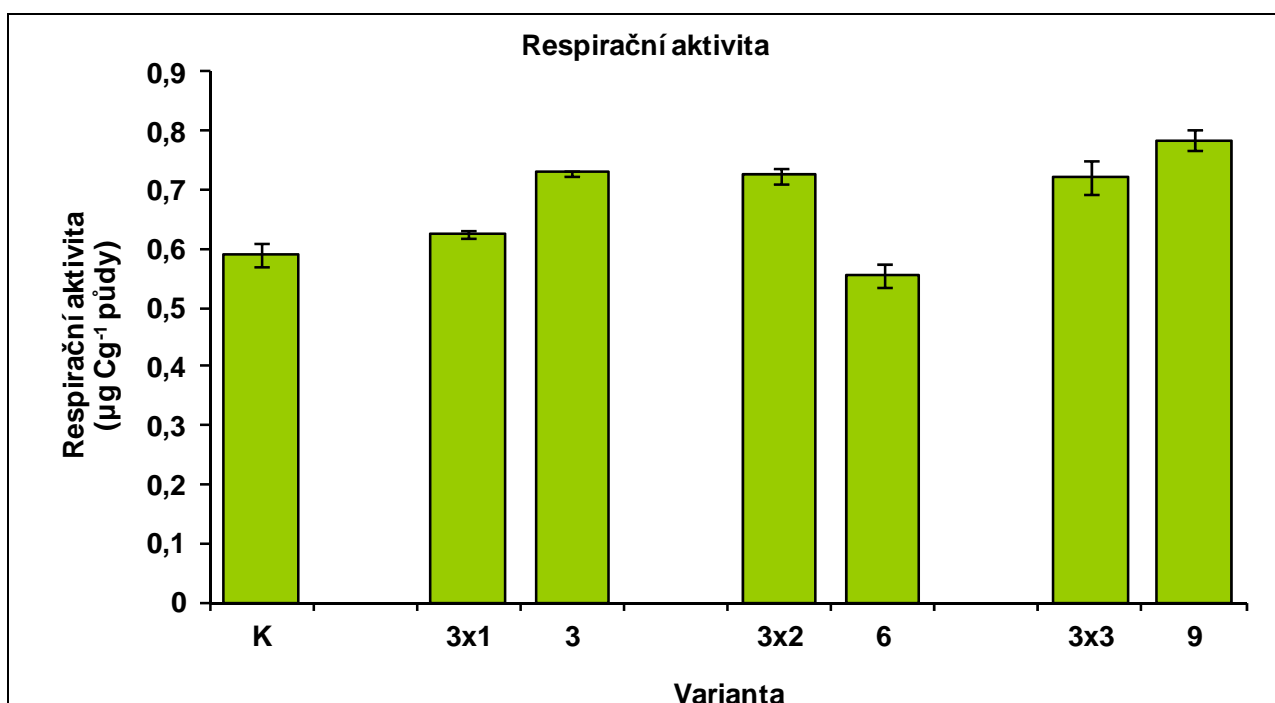


Graf 6: Obsah mikrobiální biomasy v polním pokusu s jednorázovými a dělenými přídávky různých koncentrací EDTA (K – kontrola, 3 – 3 mmol EDTA, 3x1 – 3 x 1 mmol EDTA, 6 – 6mmol EDTA, 3x2 – 3 x 2 mmol EDTA, 9 – 9 mmol EDTA, 3x3 – 3x3 mmol EDTA).





Graf 7: Aktivita dehydrogenasy v polním pokusu s jednorázovými a dělenými přídávky různých koncentrací EDTA (K – kontrola, 3 – 3 mmol EDTA, 3x1 – 3 x 1 mmol EDTA, 6 – 6 mmol EDTA, 3x2 – 3 x 2 mmol EDTA, 9 – 9 mmol EDTA, 3x3 – 3x3 mmol EDTA).



Graf 8: Respirační aktivita v polním pokusu s jednorázovými a dělenými přídávky různých koncentrací EDTA (K – kontrola, 3 – 3 mmol EDTA, 3x1 – 3 x 1 mmol EDTA, 6 – 6 mmol EDTA, 3x2 – 3 x 2 mmol EDTA, 9 – 9 mmol EDTA, 3x3 – 3x3 mmol EDTA).

Lze shrnout, že aplikace EDTA a její koncentrace do dlouhodobě kontaminované půdy by s ohledem na přiměřené mikrobiální aktivity v půdě měla být pečlivě zvážena. Půdní mikroorganismy lépe reagují na nižší dávky EDTA. U půd s vyšším obsahem organické hmoty (od 2,5 % Corg výše) lze akceptovat koncentraci do 6 mmol EDTA kg<sup>-1</sup>, u orných půd s obsahem Corg nižším než 1,9% lze za akceptovatelnou koncentraci považovat 3 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> a nižší. Vyšší dávky EDTA působí na půdní mikrobiální biomasu toxicky i po několika letech. Z hlediska mikrobiálních aktivit je dále výhodnější jednorázová aplikace. Pokud je aplikace EDTA pro zvýšení fytoextrakčního účinku vícenásobná, vhodnější jsou nižší dávky do 3 mmol EDTA.kg<sup>-1</sup>. V polních podmínkách je pro podporu mikrobiálních aktivit, zvláště při přídávku EDTA do půd s nižším obsahem organické hmoty, je v období před aplikací EDTA vhodné zvážit možnosti přídávku organické hmoty, například využitím meziplodin s jejich následnou zaorávkou nebo zaorání posklizňových zbytků a možnosti organického hnojení.

## 6. APLIKACE EDTA V POLOPROVOZNÍM MĚŘÍTKU

Pro ověření kompletní aplikační technologie praktické využitelnosti indukované extrakce byl založen také poloprovozní experiment s porostem kukuřice. Kukuřice byla zasetá 10.5. po sklizni žita. Měsíc po vzejití byla aplikována tetra sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) ve formě vodného roztoku pomocí samojízdného aplikátoru tak, aby v orniční vrstvě půdy bylo dosaženo koncentrace EDTA 1 mmol na kg zeminy (obrázky 1 a 2).

V průběhu června a července byl pozorován poměrně silný negativní vliv aplikace na habitus rostlin. Ošetřené rostliny měly světlejší barvu, na koncích listů se objevovaly drobné nekrózy a jejich růst byl asi o 50 % menší než růst neošetřených rostlin. V následujících měsících bylo pozorováno pozvolné zlepšení stavu rostlin, byť byly stále světlejší než neošetřený porost. Na konci vegetace již nebyly pozorovány vizuálně kvantifikovatelné nedostatky výživy rostlin. Také tento poloprovozní pokus potvrdil, že i aplikace nízkých dávek EDTA na povrch půdy během vegetace vedla k růstové depresi těsně po aplikaci, s postupným zlepšováním stavu rostlin v pozdějším období. Při sklizni byla kukuřice zhruba o 30 % nižší, než neošetřený porost. Výnos byl 12 tun z 6900 m<sup>2</sup>, což odpovídá výnosu cca 17 tun biomasy na ha. V porovnání s průměrným výnosem kukuřice na kontrolní variantě se jednalo o 40 % poklesu výnosu. Výnos na kontrolní variantě dosáhl 28,3 t biomasy na ha. Porost byl sklizen koncem října pomocí samojízdné sklízecí řezačky.



*Obrázek 1 Porost kukuřice ve fázi 8 listů 7. července 2011*





Obrázek 2 Aplikace vodného roztoku soli EDTA samojízdným postřikovačem

Tab č. 2 Obsah sledovaných prvků ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v biomase sušiny kukuřice

Vzorek	Sledovaný prvek ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )					
	Cd	Pb	Zn	K	Ca	Mg
Palice - kontrola	1,03±0,14	0,20±0,23	23,5±5,5	4838±857	99±12	783±285
Nadzemní biomasa - kontrola	1,74±0,17	13,14±4,35	35,8±4,7	15228±927	2157±330	979±124
Palice - EDTA	1,00±0,06	1,60±1,70	38,5±12,1	5406±544	333±171	769±201
Nadzemní biomasa - EDTA	2,69±0,14	22,47±4,93	99,6±4,9	14891±134	2528±63	946±34

Kukuřice byla po sklizni usušena, namleta a následně analyzována. Byl zjištěn obsah rizikových prvků v biomase kukuřice (tab. 2). Aplikace EDTA způsobila zvýšení obsahu všech tří rizikových prvků v nadzemních částech rostlin, které tvořily i nejvyšší množství biomasy. Téměř trojnásobný nárůst obsahu byl stanoven u zinku a dvojnásobný u olova pro nadzemní biomasu. U palic byly změny v obsazích nižší. Obsah Pb se statisticky významně zvýšil v nadzemních částech rostliny po aplikaci EDTA. Obsah olova v palicích se významně nelišil oproti kontrole, zřejmě díky jeho nízké mobilitě nejen v půdě, ale také v pletivech rostlin. Vliv chelatačního činidla byl sledován i v případě makroprvků, zjištěné změny ale nevedly k jednoznačným trendům a nebyly statisticky významné. Hodnocení fytoextračního potenciálu potvrdilo, že i když po aplikaci EDTA se statisticky významně zvýšil obsah rizikových prvků

v takto ošetřené biomase, výnosová redukce biomasy znamenala jen celkově mírný, statisticky nevýznamný nárůst remediačního faktoru olova, ale i dalších sledovaných rizikových prvků

### **III. Srovnání novosti postupů**

**Navržená technologie je unikátní metodou vedoucí ke snížení obsahu rizikových prvků šetrnou metodou a k zachování nebo ke zlepšení všech prvků půdní úrodnosti.**

Poznatky ze čtyřletého sledování, kdy se testovala v nádobovém, polním a polo-provozním experimentu účinnost aplikace solí EDTA na zvýšení fytoextrakční účinnosti olova a dalších prvků v kontaminované půdě lze shrnout do následujících bodů:

- i. hodnocení rozdílů v účinnosti fytoextrakce v modelových a polních podmínkách
- ii. mobilizace rizikových prvků, které mohou mít za následek znečištění podzemních vod
- iii. mobilizace makro - a mikroživin vedle mobilizace cílových rizikových prvků,
- iv. technické aspekty aplikace používání EDTA v polních podmínkách

(i) rozdíly v účinnosti fytoextrakce v modelových a v polních podmínkách

Přestože řada autorů vykázala slibné výsledky v účinnosti indukované fytoextrakce u nádobových experimentů, tyto výsledky nemusí být přenositelné do polních podmínek z důvodu vyššího poměru rostlin a půdy v oblasti než se běžně vyskytuje v nádobových experimentech. V našem experimentu připadala v nádobovém experimentu jedna rostlina na 1,25 kg půdy, zatímco v polních podmínkách připadala jedna rostlina na 40 kg půdy. Fytoextrakční účinnost pak byla v nádobách 40 - krát vyšší ve srovnání s polními podmínkami. Snížení obsahu olova v půdě na hodnotu maximálního přípustného obsahu Pb by trvalo 300 pěstebních období než by bylo dosaženo úrovně 220 mg.kg<sup>-1</sup> půdy pro Pb. Jiní autoři pak dokonce udávají delší období pro úspěšnou remediaci kontaminované půdy u některých potenciálně toxických kovů (např. Meers et al., 2004). Dalším omezením je snížení výnosu možné biomasy po aplikaci EDTA a obecně příliš nízký příjem olova rostlinami. Huang et al. (1997) počítá, že fytoextrakce Pb může být účinná pouze tehdy, když jsou rostliny schopny odebrat ročně více než 1 % Pb z půdy. V našem experimentu mělo přidání 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> za následek maximální absorpci Pb 0,30 % (nádobový experiment) a 0.0049 % (polní pokus) z celkového obsahu Pb v půdě. Navíc se po přidavku EDTA snížila produkce suché biomasy kukuřice z 9.4±0.4 na 2.1±0.2 t ha<sup>-1</sup>. Aplikace velmi nízké dávky solí EDTA v poloprovozním pokusu také vedla ke snížení tvorby biomasy a i přes celkově vyšší akumulaci rizikových prvků v biomase se neprokázal očekávaný efekt významně vyššího remediačního faktoru u ošetřených rostlin.

## (ii) mobilizace rizikových prvků v půdním roztoku

Přídavek EDTA do půdy značně zvyšuje mobilní podíly potenciálně toxických kovů v půdě. Neugschwandtner et al. (2008) zaznamenali v polním experimentu 326-násobné zvýšení koncentrace vodorozpustných podílů Pb ve svrchní vrstvě půdy (0–5 cm) 58 dní po aplikaci 9 mmol EDTA kg<sup>-1</sup> půdy. V hloubce 45–50 cm pak byl vodorozpustný Pb stále ještě 4 krát vyšší ve srovnání s kontrolní variantou. Pouze malé procento mobilizované frakce je pak přijatelné rostlinami. Meers et al. (2005) zjistili, že z podílu Pb v půdě mobilizovaného EDTA bylo rostlinami přijato pouze 1,1 %. Zbývající komplexy prvků s chelatačním činidlem zůstávají v půdě a mohou být degradovány nebo vyplavovány. Monitorování koncentrace vodorozpustných podílů Pb v našem experimentu ukázalo vyšší koncentrace tohoto prvku v půdním profilu i dva roky po aplikaci EDTA. Je tedy zřejmé, že po aplikaci vyšších dávek soli EDTA existuje nebezpečí vymývání olova z půdního profilu do povrchových vod, riziko je vyšší zejména ve vlhkých oblastech s promyvným půdním režimem.

## (iii) mobilizace makro - a mikroživin v půdě

Experimenty dále prokázaly zvýšenou mobilitu základních živin (Ca, K, Mg a P) a stopových prvků (Fe a Mn) po aplikaci EDTA, kdy může dojít ke kompetici těchto prvků se sledovanými rizikovými prvky (Neugschwandtner et al., 2009). V souvislosti s Pb a Cd je nejčastěji zmiňována kompetice Fe a Ca z důvodu jejich vysokého obsahu v půdách a relativně vysoké konstantě stability. Mobilizace živin může vést na jedné straně k jejich vyplavování a ztrátě úrodnosti půdy, na druhé straně by mohla aplikace EDTA do méně úrodné půdy mít pozitivní dopad na výživu rostlin vzhledem k zvýšenému využívání málo mobilních a rostlinám špatně dostupných prvků (např. Fe) (Komárek et al., 2007).

## (iv) technické úvahy o používání EDTA v polních podmínkách

Zbývající body shrnují technické realizace aplikace chelatačních činidel v polních podmínkách. Aplikace chelatačních činidel se provádí na dobře vyvinutý porost, aby byl zaručen co nejvyšší příjem prvků rostlinami a byl minimalizován nepříznivý vliv činidla na rostliny ve fázi klíčení a raných růstových fází. U takového porostu jsou ale omezené možnosti využití vhodné zemědělské techniky. Možným řešením by mohla být závlaha, s ohledem na vysoké náklady však není použitelná. Za současných technických podmínek se jeví jako nejlevnější aplikace samojízdným postřikovačem. Tyto stroje jsou v zemědělských podnicích běžně používané, jsou mobilní, mají nastavitelnou aplikační dávku, ale vyžadují dokonalý roztok k rovnoměrné aplikaci. Navíc jsou dostupné postřikovače na zvýšeném podvozku, které umožňují aplikaci i do vzrostlého porostu. Nevýhodou v tomto případě je, že roztok může ulpívat na listech, rostliny se tak mohou popálit a EDTA se nedostane do půdy. Tato situace

by se dala řešit tak, že EDTA bude aplikována před deštěm nebo bude ošetřený porost po aplikaci zkropen vodou, tím se však celá aplikace prodraží. Další možností aplikace je spojení EDTA s aplikací hnojiv. Přímé rozprašování soli EDTA nelze doporučit, protože hrozí rozptýlení aplikované dávky větrem. Lze ale uvažovat o aplikaci EDTA v granulované formě, která by mohla být výhodně aplikována společně s aplikací granulovaného hnojiva. Li et al. (2005) popsali použití pomalu působících potahovaných granulí EDTA s pomalým uvolňováním chelatačního činidla. Jakákoliv úprava vlastní látky bude znamenat výrazný nárůst její ceny a tím zhoršení ekonomiky aplikace. Námi provedená aplikace tetrasodného roztoku EDTA ukázala, že rozpuštění při dodržení vhodného poměru EDTA/voda nedělalo problém, stejně jako vlastní aplikace tohoto roztoku.

#### (v) vlastní provozní aplikace

Následující postup je určen k aplikaci soli EDTA na 1 ha půdy.

Podle hmotnosti orniční vrstvy a požadované koncentrace EDTA v půdě je stanoveno množství EDTA, které budeme aplikovat. Celkové množství účinné látky je následně upraveno podle obsahu nečistot v dostupném komerčním přípravku.

Dávka účinné látky EDTA se vypočte podle následující vzorce:

$$m_{\text{EDTA}} (\text{kg}) = m_{\text{půdy}} (\text{t}) \cdot c_{\text{EDTA}} (\text{mol}) \cdot M_r (\text{g/mol})$$

Například při hmotnosti ornice 3000 tun je dávka Na<sub>4</sub>EDTA stanovena takto:

$$m_{\text{EDTA}} = 3000 \text{ t} \cdot 0,001 \text{ mol/l} \cdot 380 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{EDTA}} = 1140 \text{ kg/ha}$$

použijeme-li například pevný Trilon B je obsah nečistot 13 %, obsah EDTA, tzv. hmotnostní zlomek označovaný jako W je 87 % (100 - 13). Dávka komerčního přípravku je stanovena následujícím výpočtem:

$$m_{\text{přípravku}} = m_{\text{EDTA}} \cdot 100 / W$$

$$m_{\text{přípravku}} = 1140 \cdot 100 / 83$$

$$m_{\text{přípravku}} = 1373 \text{ kg}$$

Výslednou dávku EDTA rozpustíme, tak abychom vytvořili 20 % roztok. Na jeden díl přípravku tedy dávkujeme 4 díly vody. Při přípravě roztoku se postupuje tak, že se do nádrže postřikovače nejprve nalije požadované množství vody. Plnicí komorou se nechá voda cirkulovat. Za neustále cirkulace je do plnicí komory přidáván přípravek EDTA,

Obdobně postupujeme při využití tekuté formy EDTA, ale pokud dávkujeme kapalný přípravek a nevážíme jej, ale dávku stanovujeme pomocí objemu, musíme ještě udělat korekci na hustotu roztoku.

Připravený roztok rovnoměrně aplikujeme na celý pozemek. Poté aplikátor vymyjeme a naplníme čistou vodou. Následně je minimálně dvakrát na ošetřený celý pozemek aplikátorem nastříkána voda, která smyje roztok EDTA s povrchu listů. Doba mezi aplikací roztoku EDTA a vody by měla být co nejkratší.

## **IV. Popis uplatnění certifikované metodiky**

Předkládaná metodika ukazuje výhody i rizika uplatnění solí EDTA při podporované fytoextrakci rizikových prvků z kontaminovaných zemědělských půd. Metodika jasně dokumentuje, že příznivé výsledky podporované fytoextrakce v modelových pokusech prezentované v řadě prestižních časopisů nejsou realizovatelné v polních podmínkách, především z důvodu odlišné hustoty kořenové sítě v jednotlivých druzích experimentů. Ze všech realizovaných experimentů jasně vyplynulo, že aplikace EDTA vedla k vyššímu příjmu olova pěstovanými zemědělskými plodinami, které je za běžných podmínek téměř imobilní. Také příjem ostatních rizikových prvků byl vyšší. Toxicita EDTA se projevila redukcí tvorby biomasy při všech aplikovaných dávkách. Tento fakt výrazně omezil využití popisované technologie. Jeho eliminace je částečně možná vyšším výsevkem, zvýšením počtu rostlin na jednotku plochy a v konečné fázi vyšším výnosem, který by znamenal nárůst nemediačního faktoru a zkrácení doby na redukcí obsahu rizikových prvků v půdě. Dalším negativem je pohyb mobilizovaných kovů půdním profilem a možné riziko jejich vyplavování z půdy i krátkodobé snížení biologické aktivity půdy.

Předkládaná technologie může být využívána pouze při aplikaci nízkých dávek solí EDTA do  $1 \text{ mmol.kg}^{-1}$  půdy a to buď jednorázově nebo dělenou foliární aplikací na vzrostlý zapojený porost nejlépe před deštěm a na půdách s nepromyvným nebo jen omezeně promyvným režimem kontaminovaných zejména olovem. Předpokladem je dlouhodobá strategie fyto-remediační strategie na dané lokalitě a následné řízené využívání produkované biomasy.

Při nerovnoměrné aplikaci se snižuje pravděpodobnost úspěšné extrakce. V místech s vyšší koncentrací mohlo dojít ke zvýšení vyplavování EDTA do podzemních vod. Aplikaci je tedy nutné provádět pouze specializovanými stroji se školenou obsluhou.

## **V. Bezpečnost práce při aplikaci a používání EDTA**

EDTA a její soli jsou zařazeny do působnosti Evropské dohody o mezinárodní silniční přepravě nebezpečných materiálů. Bez zvláštních předpisů může prodejce předat komukoliv maximálně 25 kg této látky. Při přepravě většího množství je nutné realizovat přepravu podle pravidel této úmluvy, označované jako pravidla ADR. Mezi tyto povinnosti patří viditelně označit auto přepravující nebezpečnou látkou identifikační tabulkou s kódem látky (UN číslo). Řidič musí mít v kabině v písemné formě pokyny pro případ nehody nebo mimořádné události a průvodní listinu. V případě cisternové přepravy dále osvědčení vozidla a osvědčení řidiče.

EDTA a její soli jsou dráždivé v případě zasažení očí a pokožky. Manipulaci s touto látkou je možné provádět pouze s ochrannými pomůckami, zejména s ochrannými brýlemi a rukavicemi. Rozpouštění tuhé formy EDTA provází exoter-



mická reakce a vznikající roztok se zahřívá. Nebezpečí, že dojde k varu roztoku je nízké, přesto postupujte maximálně opatrně.

Při používání EDTA a jejich solí pro zvýšení fytoextrakce se používají velmi nízké koncentrace použitého roztoku na úrovni 1 mmol/kg půdy.

Přípravu roztoku může provádět pouze osoba vlastníci osvědčení pro práci s pesticidy, podobně je tomu s aplikací i toto musí být zabezpečeno pouze proškolenou osobou.

Aplikace EDTA není vymezena v naší legislativě, proto je nutné v provozním měřítku toto nejprve projednat s orgány státní správy, vodohospodářským úřadem a Ústřední kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským.

## **VI. Ekonomické aspekty používání EDTA v polních podmínkách**

V následující tabulce jsou vyčísleny hektarové náklady poloprovozní aplikace. Protože bylo použito přesné dávkovací techniky a balených chemikálií jsou náklady nad 100 tis. na ha. Viz následující tabulka. Použití stejné látky v jiné formě a aplikace na větší plochu však může celou aplikaci výrazně zefektivnit.

*Tab. 3: Náklady na aplikace tetrasodné soli EDTA v poloprovozním měřítku (trilon B powder balení po 25 kg) a skutečné náklady aplikace včetně prostojů*

Náklady na použití chelátů (trilon B - BASF)		
Skutečné náklady při poloprovozním pokusu		
dávka na ha (odpovídá cca 1 mmol/kg zeminy)	1310	kg
cena	81	Kč/kg
cena na ha	106 110	Kč
aplikace (samojízdný postřikovač)	8000	Kč/ha
Cena vč. aplikace	<b>114 110</b>	Kč/ha

*Tab. 2: Odhad nákladů aplikace EDTA (trilon B liquid doprava autocisternou) v provozní praxi a odhad nákladů aplikace dle normativů rostlinné výroby (Kafka, 2010)*

Odhad nákladů v provozních podmínkách Trilon B liquid		
dávka na ha	1515	l
cena	27,04	Kč/l
cena na ha	40965,6	Kč/ha
aplikace samojízdným aplikátorem	2 300	Kč/ha
zapravení do půdy (rotační brány)	1000	Kč/ha
Cena vč. aplikace	<b>44 266</b>	Kč/ha

Oproti provedené poloprovozní aplikaci je navržena provozní metoda o více než polovinu levnější. Nižší cena je dána zejména použitím výrazně levnější tekuté formy EDTA dopravované autocisternou o objemu 20 m<sup>3</sup>. Další úspory nákladů vychází

z efektivnější a rychlejší aplikace, kdy odpadá celá řada prostojů. Odhad provozních nákladů vychází ze skutečných tržních cen. V případě, že by se jednalo o větší pozemek v řádu stovek hektarů, lze pravděpodobně dohodnout ještě výrazně lepší podmínky a tedy levnější způsob aplikace.

## VII. Seznam použité literatury

- Conesa, H.M., Robinson, B.H., Schulin, R., Nowack, B. 2006. Growth of *Lygeum spartum* in acid mine tailings: response of plants developed from seedlings, rhizomes and at field conditions. *Environmental Pollution* 145, 700–707.
- Epelde, L., Allica, J.H., Becerril, J.M., Blanco, F., Garbisu, C. 2008. Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Sci Tot. Environ.*, 401, 21-28
- Friesl, W., Friedl, J., Platzer, K., Horak, O., Gerzabek, M.H., 2006. Remediation of contaminated agricultural soils near a former Pb/Zn smelter in Austria: batch, pot and field experiments. *Environmental Pollution* 144, 40–50.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389–1414.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., Cunningham, S.D., 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31, 800–805.
- Chander, K., Joergensen, R.G., 2008. Decomposition of Zn-rich *Arabidopsis halleri* litter in low and high metal soil in the presence and absence of EDTA. *Water, Air, and Soil Pollution* 188, 195-204.
- Jaworska J.S., Schowanek D. Feijtel T.C.J. 1999. Environmental risk assessment for trisodium [S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications, *Chemosphere*, 38, 3597–3625.
- Komárek, M., Tlustoš, P., Száková, J., Chrástný, J., Ettler, V., (2007): The use of maize and poplar in chelant enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soil. *Chemosphere* 67, 640-651
- Kos, B., Grčman, H., Leštan, D., 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil Environment* 49, 548–553.
- Kos, B., Leštan, D., 2003. Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant and Soil* 253, 403–411.
- Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1232–1238.
- Lai H.-Y., Chen Z.-S., (2005): The EDTA effect on phytoextraction of single and combined metals-contaminated soils using rainbow pink (*Dianthus chinensis*), *Chemosphere* 60, 1062-1071.
- Lesage, E., Meers, E., Vervaeke, P., Lamsal, S., Hopgood, M., Tack, F.M., Verloo, M.G., 2005. Enhanced phytoextraction: II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from a calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation* 7, 143–152.
- Leštan D., Luo Ch., Li X., (2007): The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review, *Environmental Pollution* 153, 3-13
- Li, H., Wang, Q., Cui, Y., Dong, Y., Christie, P., 2005. Slow release chelate enhancement of lead phytoextraction by corn (*Zea mays* L.) from contaminated soil—a preliminary study. *Science of the Total Environment* 339, 179–187.

- Luo, C.L. Shen, Z.G. Li, X.D.; Baker A.J.M. (2006a): Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS, *Chemosphere* 63, 1773-1784
- Luo, C.L., Shen, Z.G., Li X.D., Lou, L.Q., 2006b. EDDS and EDTA-enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds, *Environ. Pollut.*, 144, 862–871.
- Madrid F., Liphadzi M.S., Kirkham M.B., (2003): Heavy metal displacement in chelate-irrigated soil during phytoremediation, *Journal of Hydrology* 272 (2003) 107-119
- Meers, E., Hopgood, M., Lesage, E., Vervaeke, p., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2004. Enhanced Phytoextraction: In Search of EDTA Alternatives . *International Journal of Phytoremediation* 6, 95-109.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M., Lesage, E., Tack, F.M.G., 2005. Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere* 61,561-572.
- Neugschwandtner, R.; Tlustoš, P.; Komárek, M. ; Száková, J. (2008): Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: Laboratory versus field scale measures of efficiency, *Geoderma* 144: 446 - 454.
- Neugschwandtner R.W., Tlustoš P., Komárek M., Száková J. (2009) Nutrient mobilization and nutrient contents of *Zea mays* in response to EDTA additions to heavy-metal-contaminated agricultural soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 172:520-527.
- Nowack, B., Kari, F.G., Krüger, H.G., 2001. The remobilization of metals from iron oxides and sediments by metal–EDTA complexes. *Water, Air, and Soil Pollution* 125, 243–257.
- Reddy, K. R., Danda, S., Yukselen-Aksoy, Y., Al-Hamdan, A. Z., 2010: Sequestration of heavy metals in soils from two polluted industrial sites: implications for remediation. *Land Cont. & Reclam.*, 18, 13-23.
- Sapoundjieva, K., Kartalska, Y., Vassilev, A., Naidenov, M., Kuzmanova, I., Krastev, S. 2003. Effects of the chelating agent EDTA on metal solubility in the soil, metal uptake and performance of maize plants and soil microorganisms. *Bulgarian J. Agric. Sci.*, 9, 659-663.
- Shah K., Nongkynrih J.M., (2007): Metal hyperaccumulation and bioremediation, *Biologia Plantarum* 51, 4, 618-634
- Schmidt U., (2003): Enhancing phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals, *Journal of Environmental Quality*, 32, 6, 1939-1954
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2006. Uptake of metals during chelant assisted phytoextraction with EDDS related to the solubilized metal concentration. *Environmental Science and Technology* 40, 27-53.
- Ultra, V.U. Jr., Yano, A., Iwasaki, K., Tanaka, S., Mei K.-Y., Sakurai, K. 2005. Influence of chelating agent addition on copper distribution and microbial activity in soil and copper uptake by brown mustard (*Brassica juncea*). *Soil Sci Plant Nutr.* 51, 193-202.
- Wang, G., Koopmans, G. F., Song, J., Temminghoff, E.J.M., Luo, Y., Zhao, Q., Japanenga, J. 2007. Mobilization of heavy metals from contaminated paddy soil by EDDS, EDTA and elemental sulphur. *Environ Geochem Health* 29, 221-235.
- Wen, J., Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., Kirby. J. K. 2009. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 41. 2214 – 2221
- Zhang, H., Zhao, F.J., Sun, B., Davison, W. and McGrath, S.P. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602–2607.

## VIII. Seznam publikací, které předcházeły metodice

---

- Králová L, Száková J., Kubík Š., Tlustoš P., Balík J. (2010): The variability of arsenic and other risk element uptake by individual plant species growing on contaminated soil. *Soil & Sediment Contamination*, 19, s. 617-634.
- Mühlbachová G.: (2010) Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecological Engineering*. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.08.004
- Mühlbachová G. (2010): Influence of EDTA and alfalfa amendment on the mobility of heavy metals and microbial biomass in long-term contaminated soils. In: *Proceedings of Agro2010 the XIth ESA Congress, Montpellier, France, 29.8.-3.9. 2010: 225-226*
- Mühlbachová G. (2009). Microbial biomass dynamics after addition of EDTA into heavy metal contaminated soils. *PLANT SOIL ENVIRON.*, 55(12): 544–550
- Neugschwandtner R., Tlustoš P., Komárek M., Száková J. (2010): Enhanced Cu and Zn phytoextraction from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes and *Zea mays*. In: *Proceedings of Agro2010 the XIth ESA Congress, Montpellier, France, 29.8.-3.9. 2010: 205-206*
- Neugschwandtner, R.; Tlustoš, P.; Komárek, M. ; Száková, J., Jakoubková L. (2012): Chemically enhanced phytoextraction of risk elements from a contaminated agricultural soil using *Zea mays* and *Triticum aestivum*: Performance and metal mobilization over a three years period. **International Journal of Phytoremediation accepted for publication**
- Száková J. Miholová D. Tlustoš P. Šestáková I., Frková Z. (2010): Effect of soil properties and sample preparation on extractable and soluble Pb and Cd fractions in soils. *Agricultural Sciences*, 1, No.3, 119-130
- Tlustoš, P. ; Száková, J. ; Pavlíková, D. ; Balík, J. (2009): The risk of growing wheat and barley on a Cd and Pb contaminated site, In: *Proceeding of 3rd International Symposium on Trace Elements in the Food Chain, Budapešť, s.207 -211*

## IX. Dedikace

---

Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QH 81167 „Využití a optimalizace fytoextrakční technologie s využitím podporované fytoextrakce těžkých kovů při zachování biologické stability půd“.