Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Obor: Chemie životního prostředí

Příjem chloridu kořenovým systémem smrku ztepilého průsakem

Bakalářská práce

Praha, 2007

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE
3233218541

Radek Lamač

Prohlášení

Já, Radek Lamač, student III. ročníku Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43 –součástí Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3-5,116 36 (IČO: 00216208) jsem v rámci plnění svých studijních povinností vypracoval v akademickém roce 2006/2007 bakalářskou práci s názvem "Příjem chloridu kořenovým systémem smrku ztepilého průsakem", která má povahu školního díla ve smyslu § 60 z.č. 121/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Při vypracování bakalářské práce mi byl nápomocen Dr. Sándor T. Forczek PhD. jako školitel. Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím literatury, která je v bakalářské práci citována a vybavení isotopové laboratoře Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

Toto prohlášení činím na základě své svobodné vůle, svobodně, vážně, srozumitelně, nikoliv v tísni a pod nátlakem.Na důkaz toho připojuji svůj vlastnoruční podpis.

V Praze dne 28.5.2007

Lamač Radek

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří se přímo i nepřímo podíleli na vypracování této bakalářské práce a pomohli mi tak ke zdárnému dokončení – zejména svému školiteli Dr. Sándoru Forczekovi, PhD. a Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc.

Obsah

Prohlášení....2
Poděkování....3
Obsah....4
Abstrakt....5
1. Úvod....6
1.1. Zdroje a výskyt chloru v životním prostředí....7
1.2. Anatomická stavba kořene smrku ztepilého....8
1.3. Chemické ošetřování vozovek a jeho vliv na přilehlou vegetaci a půdu....13
1.4. Fyziologické a morfologické účinky chloridu na rostliny, salinitní stres....14
2. Použité materiály a metody....17
2.1. Pokusný materiál, aplikace NaCl....17
2.2. Odběr a zpracování vzorků....18
2.3. Kapalinová scintilační spektrometrie....19
3. Výsledky....21
4. Diskuze....24
5. Použitá literatura....26

Abstrakt

Náš výzkum se zabýval příjmem různých koncentrací chloridových iontů asimilačními orgány smrku ztepilého (*Picea abies/*L. Karst). Pro studium příjmu a účinků chloridových iontů v jehličí smrku ztepilého jsme použili metodu značení radioisotopem ^{36}Cl. K aplikaci jsme využili vodný roztok chloridu sodného o hmotnostní koncentraci 4 g/l a 200 g/l a o měrné radioaktivitě 639 kBq a 656 kBq. Sledování obsahu chloridových iontů ve smrkovém jehličí probíhalo na vybraných čtyřletých sazenicích smrku ztepilého, které byly pěstovány v růstových kontejnerech. Aplikaci chloridových iontů ke kořenům smrku jsme prováděli zalitím sazenic roztokem $Na^{36}Cl$. Hlavním úkolem našeho výzkumu bylo ověření příjmu chloridových iontů kořenovým systémem smrku ztepilého a určení přijatého množství chloridů v jehličí po aplikaci rozdílné koncentrace NaCl. Detekci radioaktivních chloridových iontů jsme prováděli po extrakci scintilační metodou. Vzorky jehličí jsme odebírali v časovém intervalu přibližně deseti dnů od začátku pokusu až po jeho ukončení. U sazenice s vyšší koncentrací chloridu došlo po několika dnech k vysokému příjmu chloridu následovanému postupnému úhynu stromku. Sazenice s menší koncentrací chloridu nejevila výrazné symptomy poškození v porovnání s kontrolním vzorkem.

1. Úvod

Zdravotní stav lesů v České republice není již řadu let uspokojivý. Jistá změna k lepšímu však nastala po důkladném odsíření elektráren po roce 1990 a novým technologiím spalovacích, popřípadě jiných průmyslových zařízení emitujících škodlivé látky, které jsou ve shodě s regulemi evropské unie. Vzrůst automobilové dopravy a s tím zvýšení emitovaných oxidů dusíku, které při dopadu na lesní půdu způsobují její další okyselování, je velkým problémem zatěžujícím naše lesy. Do popředí škodlivých látek v ovzduší vystoupily tzv. sekundární atmosférické polutanty (SAP), které vznikají i atmosférickou fotooxidací, reakcemi ozonu, vody atd. Patří mezi ně chlorované uhlovodíky, především jejich degradační produkt kyselina trichloroctová (TCA). Negativním faktorem jsou další různé sloučeniny chloru, které jsou pro většinu rostlin ve vyšších koncentracích silně toxické. Do lesního ekosystému přicházejí jednak ze zdrojů přírodního původu, především srážkami z oceánů, jednak ze zdrojů antropogenních. Sloučeniny chloru nejčastěji vstupují do lesního ekosystému jako chloridový iont (Cl^-) v depozici se srážkovou vodou a aerosolovými částicemi, ale také ve formě plynné jako Cl_2 nebo HCl nebo ve formě organických chlorovaných sloučenin. Podstatná část přechází do lesní půdy a půdního roztoku, odkud jsou pak snadno přijímány kořeny , menší část je přijímána rostlinami i přímo přes listy. Látky jsou pak ukládány po asimilaci především ve vegetačních orgánech, jednak jako chlorid nebo v organické formě jako chloroctové kyseliny.

1.1. Zdroje a výskyt chloru v životním prostředí

Chlor je jeden z nejhojnějších prvků na povrchu země, účastní se komplexního biochemického cyklu, je zcela nezbytný pro živé organismy. Mnoho organismů je schopno převádět anorganické chloridy na organochlorové sloučeniny (Oberg 2002). V molekulární formě Cl_2 je to silný oxidant, reaguje s řadou organických molekul za vzniku mnoha chlorovaných látek. Chlorid je pro většinu rostlin ve vyšších koncentracích toxický. Na druhé straně, chlorované organické látky s molekulární hmotností mezi 200 a 600 jsou velmi významné biologicky aktivní látky používané jako farmaceutika či prostředky na ochranu rostlin.

Do lesních ekosystémů chlorid přichází jednak ze zdrojů přírodního původu, především srážkami z oceánu, jednak ze zdrojů antropogenních. Mezi přírodní zdroje solí patří chlorid sodný neboli minerál halit, který vznikal odpařením mořské vody v zálivech ustupujícího moře. Je rozpustný ve vodě. V zemské kůře je chlor přítomen v koncentraci 200 - 1900 ppm. V mořské vodě tvoří chloridové ionty nejvíce zastoupený anion, jejich koncentrace se pohybuje kolem 19 g/dm^3. Chlorid přichází nejčastěji jako chloridový iont (Cl^-) v depozici se srážkovou vodou a aerosolovými částicemi. Mezi antropogenní zdroje chloru do prostředí patří výpusti odpadních vod z průmyslu (papírenský průmysl, výroba rozpouštědel, plastů, zpracování potravin), dále použití v domácnostech (čistící prostředky), služby (bazény, menší čističky).

Působením mikroorganismů je anorganická forma chloru v půdě přeměňována na formy jiné jako jsou kyseliny chloroctové nebo chloroform (Matucha et al. 2007), které mohou ovlivňovat nejen kvalitu lesního prostředí (Frank et al. 1986), ale i kvalitu spodních vod, případně vod odtékajících z lesa do zdrojů pitné vody (Weissflog et al. 1999). Nejvýznamnější a také nejvíce studovanou chlorovanou kyselinou je fytotoxická kyselina trichloroctová. Dlouhodobým studiem a experimenty s kyselinou trichloroctovou, jejím účinkům a osudem v systému půda-smrk ztepilý-ovzduší se zabýval Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR (Uhlířová et al. 2002) a Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti Jíloviště-Strnady.

Rostliny přijímají chlorid rychle a ve značném množství. Příjem chloridu rostlinami je přímo úměrný jeho obsahu v prostředí. V důsledku jeho postavení v lyotropní řadě anionů je Cl^- ve srovnání s ostatními anionty přijímán přednostně před NO_3^-, $H_2PO_4^-$ a SO_4^-. Naopak příjem Cl^- je snižován vysokým obsahem NO_3^- v prostředí, zatímco NH_4^+ jeho příjem podporuje (Richter & Hlušek 2003).

V rostlinách je chlorid snadno pohyblivý. Během vegetace migruje převážně ze starších listů do kořenů. Cl^- ionty nejsou přijímány pouze kořeny, ale také listy. Potřeba chloridů pro fyziologické funkce rostlin je malá, pohybuje se kolem 5 - 7 $kg.ha^{-1}$ ročně (Richter, Hlušek 1994), a jeho role není plně objasněna. Rozdílná citlivost dřevin je dána množstvím proniknutých chloridových iontů a rovněž úrovní protoplasmatické tolerance druhu dřevin k nim. V nadbytku chloridu dochází k toxickému poškození rostlin. Z listů se ztrácí chlorofyl, objevují se na nich žluté skvrny, přičemž zvláště okraje listů jsou chlorotické a svinují se. Dochází i k poškození vodivostních pletiv, v okolí cév a taky na okrajích vznikají nekrózy. Další expozice posléze vede až k defoliaci (Uhlířová et al. 2002).

Samostatnou kapitolu průniku chloridu do lesního prostředí tvoří dnes posypové soli používané v ČR v statisících tun za rok k zimní údržbě vozovek. Kromě přímého účinku na vozovku, stav vozidel, vegetaci poblíž komunikací a průniku do vodotečí, dochází k dříve nepředpokládaným reakcím v půdě, které zatím nejsou dostatečně probádány. Role posypové soli viz níže (v kapitole 1.3.).

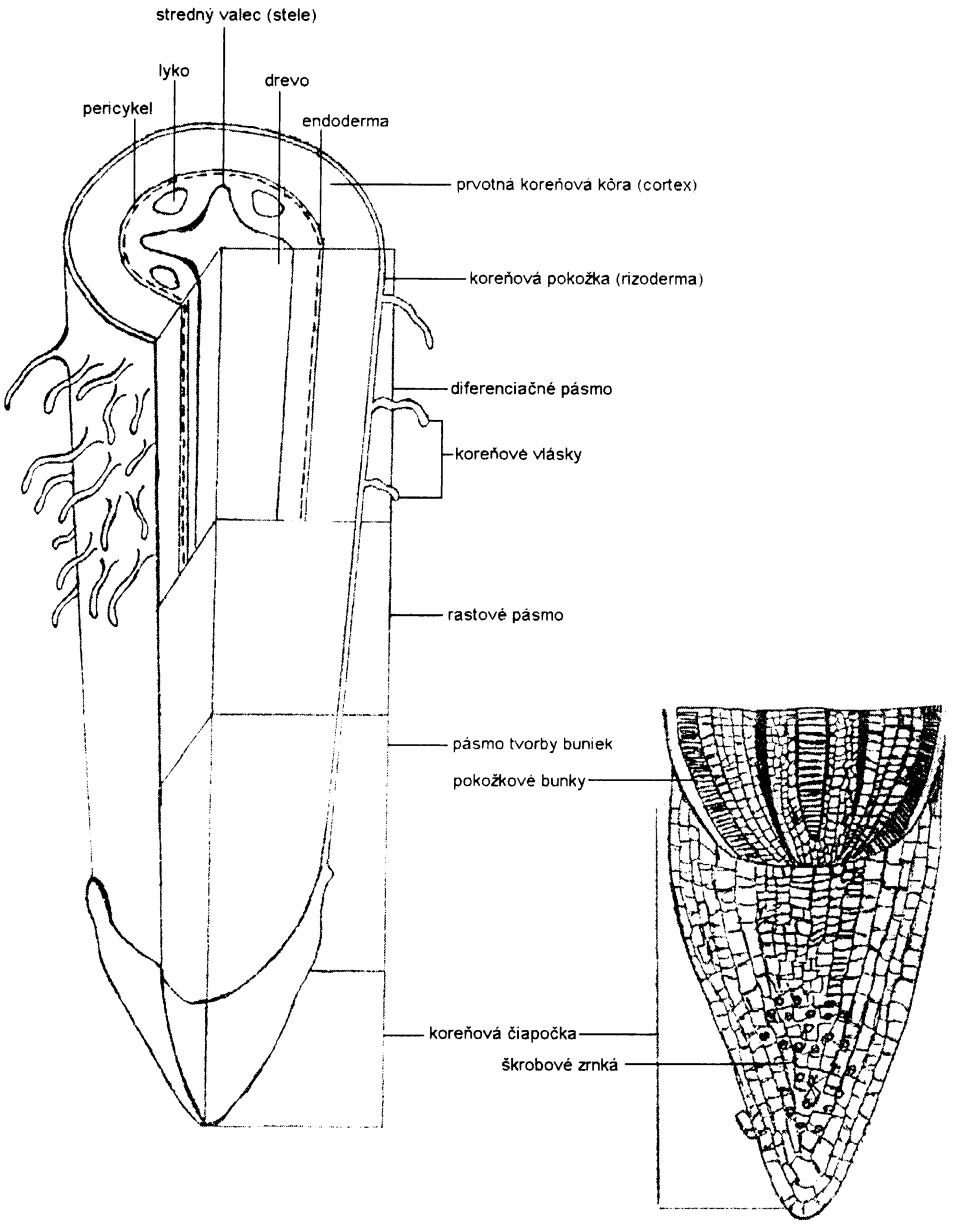
1.2.Anatomická stavba kořene smrku ztepilého

Kořen smrku patří mezi vegetativní orgány rostlin. Smrk ztepilý je stálezelený jehličnatý strom dorůstající výšky v průměru 25 - 35 metrů. Jeho kořenový systém je plochý, mělký

bez hlavního kořene. Díky nízké retenci vody, náchylnosti k polomům se již začalo upouštět od vysazování smrkových monokultur. Hlavní funkcí kořenů je upevnění rostliny v substrátu, příjem vody a minerálních látek z půdy. Druhotně se kořen uplatňuje jako zásobní orgán a orgán vegetativního rozmnožování (Votrubová 2001). Anatomii kořene rozebírám, abych mohl dále pochopit mechanismy příjmů chloridů skrz kořenový systém. Na špičce kořene je kořenová čepička. Na svém povrchu je kořen kryt kořenovou **pokožkou**. Pod ní je dosti silná vrstva základních pletiv označovaná jako **primární kůra**. Středová část kořene tzv. **střední válec** obsahuje vodivá pletiva kořene spolu s pletivy základními (Votrubová 2001).

Kořenová čepička (*calyptra*) chrání kořenový meristém při pronikání kořene půdou. V buňkách čepičky jsou aktivní diktyozómy, ve kterých vznikají polysacharidické slizy. Ty jsou transportovány ve vezikulech k povrchu buněk, kde tyto vezikuly splývají s plazmalemou a slizy se exocytózou vylučují ven z buněk až na povrch čepičky a usnadňují její pronikání půdou při růstu kořene. Čepička je i sídlem gravitropické reakce kořenů.

Kořenová pokožka (*rhizodermis*) se od epidermis liší především tím, že neobsahuje průduchy a není kryta typickou kutikulou. V mladších částech kořene, kde dochází k intenzivnímu příjmu vody a živin je tvořena buňkami s tenkými, dobře propustnými stěnami. Tyto buňky jsou v určité zóně schopny vytvářet dlouhé, úzké výrůstky- kořenové vlásky. Ty mají charakter jednobuněčných absorpčních trichomů a zvyšují schopnost kořene absorbovat vodu a minerální látky z půdy. Ve starších částech kořene, kde už neprobíhá příjem vody ani živin z půdy, se obvykle mění i charakter rhizodermis. Její stěny mohou lignifikovat a suberizovat či kutinizovat a fungují už pak jenom jako ochranná vrstva (Stevenson & Mertens 1976).

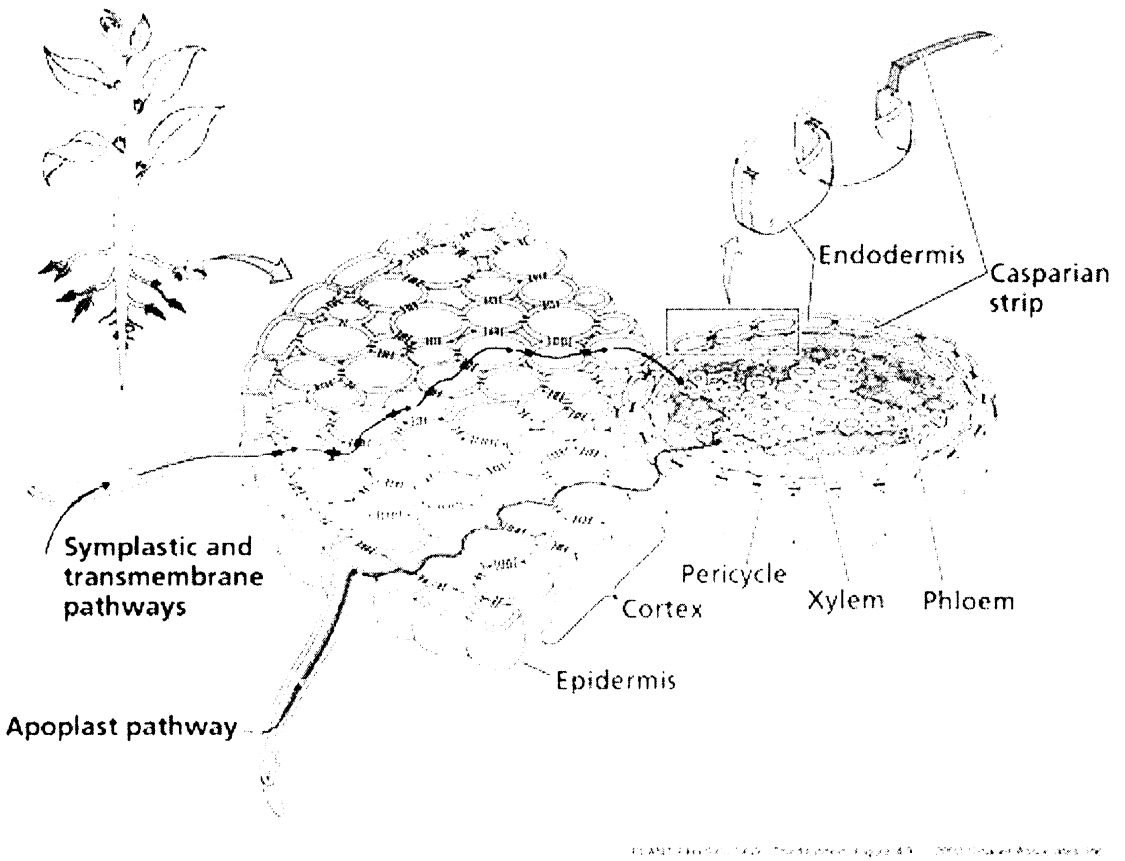


Obr. 1: Anatomická stavba kořene a řezu kořenovou špičkou (wikipedia.org: Anatomy roots).

Primární kůra (*cortex*) se nachází pod pokožkou a je obvykle dosti silná. Buňkami primární kůry jsou transportovány látky přijímané z půdy od povrchu kořene do vodivých pletiv středního válce. Transport všech těchto látek může jít v zásadě dvěma cestami (Obr.2). Ta první je symplastická (symplastic pathway), tj. vede protoplasty živých buněk, které jsou v radiálním směru propojeny plazmodesmy. Druhá cesta je apoplastická a vede buněčnými stěnami. Apoplastická cesta je však přerušena na úrovni poslední vrstvy kůry, zvané *endodermis*. Ta se vyznačuje zvláštní stavbou buněčných stěn. V radiálních a

příčných stěnách endodermálních buněk se nacházejí tzv. Casparyho proužky, které vznikají ukládáním suberinu a ligninu do prostoru celulózní buněčné stěny. Tím dochází k vyplnění mikrokapilárních prostor v buněčné stěně a k uzavření dráhy pro apoplastický transport vody i v ní rozpuštěných látek. Dochází k oddělení apoplastu primární kůry a středního válce, a transportované látky jsou nuceny přejít do nitra protoplastů, tedy do symplastu, který přerušen není. Přitom musí překonat bariéru cytoplazmatické membrány. Díky tomu je příjem látek kořenem selektivní a ve vodivých drahách může docházet k akumulaci látek. Existence endodermis je tedy nezbytná i pro vznik kořenového vztlaku, jehož příčinou je akumulace látek ve středním válci a následný vtok vody osmózou. Ve starších částech kořenů, zejména těch, které druhotně netloustnou, mohou stěny endodermálních buněk ještě výrazně tloustnout a lignifikovat.

Vnější vrstva nebo vrstvy primární kůry bývají často diferencovány jako *exodermis.* Exodermální buňky mají suberinizované a někdy i lignifikované stěny. Funkce exodermis je ochranná. Kromě ochrany před průnikem patogenů nebo toxických látek z půdy může chránit vnitřní pletiva kořene i před ztrátami vody v suché půdě.



Obr. 2: Transport látek apoplastickou a symplastickou cestou (Taiz & Zaiger 2002)

Střední válec (*stéle*) obsahuje především vodivá pletiva uspořádaná jako radiální cévní svazek. Počet floémových a xylémových skupin v radiálním cévním svazku je u smrku obvykle nízký, mezi dvěma až šesti.

Diferenciace vodivých pletiv v kořeni probíhá podle obecně platného schématu. Ve směru podélném se nejblíže kořenové špičce diferencuje protofloém. Další vodivá pletiva se pak diferencují v následujícím pořadí: protoxylém, metafloém, a metaxylém. Ve směru radiálním se vodivá pletiva diferencují exarchním způsobem, tedy centripetálně. Znamená to, že nejstarší elementy jak xylémové, tak i floémové se nacházejí nejblíže okraji středního válce, mladší elementy se diferencují směrem do středu (Votrubová 2001). Kromě vodivých elementů jsou ve středním válci kořene velmi důležité různé typy parenchymatických buněk. Některé z nich jsou důležité pro sekreci iontů do vodivých elementů xylému. Mezi vodivými pletivy a endodermis se nachází jedna, někdy i více vrstev parenchymatických buněk, tzv. *pericykl.* Pericykl si uchovává schopnost dělení, je tedy potenciálně meristematický, a v určité vzdálenosti od kořenové špičky se dělením buněk pericyklu vytvářejí základy postranních (laterálních) kořenů. Postranní kořeny se tedy zakládají endogenně a vzniklý kořenový základ tedy musí prorůst pletivy primární kůry a rhizodermy. Endogenní vznik postranních kořenů je z hlediska funkce kořenové soustavy velmi výhodný. V nepříznivých podmínkách, např. při déle trvajícím nedostatku vody v půdě, může odumřít celá primární kůra. Avšak buňky pericyklu, chráněné endodermis mohou zůstat živé a vytvořit nové kořeny v okamžiku, kdy se podmínky zlepší.

1.3. Chemické ošetřování vozovek a jeho vliv na přilehlou vegetaci a půdu

Chemické ošetřování silnic je obvyklá metoda zajištění sjízdnosti silnic v zimním období, jež nahradila posypy inertními materiály, především pískem. Ty se používají už jen v místech nejvyššího stupně ohrožení životního prostředí nebo tam, kde to nařizuje zákon, či vyhláška (chráněná území). Sypání silnic solí souvisí s nárůstem silniční dopravy. Prvním mezníkem byl rok 1960, kdy inertní materiály přestaly stačit a začaly se používat chemická tavidla na bázi chloridů. Velmi záhy se objevují zprávy o vznikajícím poškození vegetace (Soukup & Horký 1981). Druhým mezníkem nárůstu silniční dopravy byl rok 1989, respektive období těsně po něm , kdy došlo k určitému snížení doporučeného množství solí při jednom posypu, intenzivní solení však pokračuje. V blízké době se nepředpokládá odklon od užívání solí, a tedy ani vymizení poškození vegetace a kontaminace půdy.

V současnosti je nejhojnějším prostředkem používaným k solení chlorid sodný (min. 97,5%) s přísadou ferrokyanidu proti spékavosti. Aplikace chloridu je spojená i s uvolňováním jiných chemických látek, které jsou jeho součástí a můžou mít nepříznivý vliv na životní prostředí, např. sloučeniny CN^- (Ramakrishna & Viraraghavan 2005).

Rozeznáváme tři stupně ohrožení pro dané posouzení lokality. Lokality pod úrovní vozovky s podmáčeným podloží patří do prvního stupně - místa nejvyššího ohrožení. Lokality v úrovni vozovky jsou lokalitami středního ohrožení a místa mírného ohrožení jsou pak v úrovni nebo nad úrovní komunikace, kde je možný pouze ostřik solankou. Je tedy vyloučen druhý z možných účinků solí na vegetaci a sice prostřednictvím průsaku půdami. Dosah poškození je ovlivněn především konfigurací terénu. Bezprostředně jsou ohroženy distance do 15 metrů od vozovky, podle Ondráčka (2005) u vod do 7 - 8 metrů. Kritická může být vzdálenost 30 - 70 metrů. Na základě vizuálně rozeznatelných znaků se používá stupnice poškození pro smrk ztepilý, jež má 4 stupně. Jehličnaté dřeviny a jejich poškození je patrné ze změny barvy a délky jehlic (Soukup & Horký 1981).

Nejdůležitějšími indikátory zasolení jsou obsah Cl^- v asimilačních orgánech, především v jehličí, obsah Na^+ v půdě a hodnoty půdních reakcí pH. Poškození rostlin je způsobené především chloridy, zatímco k poškození půd dochází vlivem akumulace iontů Na^+ . Tato akumulace je možná díky vytěsňování Ca^{2+}, K^+ a Mg^{2+} sodíkem, kdy dochází k výraznému ovlivnění poměru živin v půdě (Norrstrom & Bergstedt 2001). Anionty Cl^- jsou málo reaktivní a jsou v závislosti na chemicko fyzikálních vlastnostech půdy převážně transportovány do podzemní vody. Tak dochází ke kontaminaci spodních vod a lze předpokládat, že kontaminace podzemní vody díky chemickému ošetřování vozovek poroste (Howard & Livingstone 2000).

Podrobnější fyziologické a morfologické účinky chloridů na vegetaci viz níže (v kapitole 1.4.).

1.4.Fyziologické a morfologické účinky chloridů na rostliny, salinitní stres

Kořeny přijímají živiny z půdního roztoku a distribuují je mezi listy, stonek a kořen. Jako půdní roztok se označuje veškerá volná voda v půdě s takovým množstvím a poměrem rozpuštěných živin, které odpovídají aktuálním biologickým, fyzikálním a chemickým podmínkám (Procházka et al. 1998). Zpět do půdy se tyto živiny vracejí exudací a vymýváním nebo nepřímo opadem listů nebo rozkladem odumřelých kořenů. Mineralizací jsou pak živiny uvolněny při rozkladu zbytků rostlin nebo organické hmoty pocházející z odumřelých mikroorganizmů nebo v různém stupni rozložených organických látek. Prakticky v libovolném čase se v půdním roztoku nachází jen velmi malý podíl minerálních živin. Většina je uchovávána v živé nebo odumřelé biomase reverzibilně vázaná na organické nebo anorganické výměnné komplexy. Zásoba živin se může zvýšit zvětráváním matečné horniny nebo přísunem z okolí, a to jak atmosférickou depozicí, tak laterálním přísunem spodní vodou. Naopak k poklesu obsahu živin může dojít vymýváním

živin. Hlavním kompartmentem pro ionty i produkty metabolizmu a podílení se na udržování cytoplazmatické homeostáze je **vakuola** (Procházka et al. 1998).

Příjem minerálních živin rostlinami z půdního roztoku vesměs probíhá proti koncentračnímu spádu. V kořeni jsou živiny přeneseny přes plazmalemu transportními bílkovinami, poté jsou aktivně vloženy do xylému a v listech pak znovu obdobnými bílkovinnými přenašeči převedeny do symplastu mezofylových buněk (Luštinec & Žárský 2003). Podle Voeta a Voetové 1995 se transportní mechanizmy živin dělí do dvou skupin. První je tvořena nespecifickým transportem, do kterého spadají prostá difuze a zprostředkovaná difuze. Druhá skupina je zastoupena zprostředkovaným transportem, a sice primárním aktivním transportem (elektroneutrální, elektrogenní) a sekundárním aktivním transportem (uniport, symport, antiport).

Rostliny se dělí podle snášenlivosti salinity do dvou skupin: **Halofyty a Nonahalofyty. Halofyty** jsou schopny tolerovat vysoké stupně salinity a dokončit jejich životní cyklus v přirozených solných půdách. Navíc je jejich růst zvyšován určitými koncentracemi solí v rozmezí mezi 100 - 200 mmol/dm^3, závislý na rostlinných druzích, vývojových stádiích a životních podmínkách. V kontrastu s halofyty, růst **nonhalofytů** je značně snížený dokonce nízkými koncentracemi NaCl, nejsou schopny dokončit svůj životní cyklus v přirozených zasolených půdách (Zhang et. al 2004). Příkladem halofytů, jež tvoří pouze 2% všech rostlinných druhů je např. jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*), nonhalofytem je např. zob obecný (*Ligustrum vulgare*).

Přímé účinky škodlivého zasolení jsou především ovlivnění enzymové aktivity, nerovnováha živin, membránová disfunkce a ovlivnění všeobecných metabolických procesů. Ze všech rostlinných orgánů a vývojových stadií salinita ovlivňuje nejvíce semena a mělké kořeny, protože soli jsou běžně koncentrovány ve vrchních vrstvách půdy. Přímé efekty nadbytečných iontů na rostliny se mění podle druhu iontů, sodíkové ionty jsou toxičtější jako vápenaté a sulfátové ionty jsou toxičtější než chloridové (Orcutt & Nielsen 2000).

Enzymová aktivita – předpokládá se, že in vitro inhibice enzymové aktivity solemi pravděpodobně ukazuje, že zvýšená koncentrace solí (150 mM) by in vivo způsobila

podobnou inhibici. Mechanizmus inhibice enzymové aktivity solemi nejpravděpodobněji zahrnuje inhibici funkce aktivního místa nekompetitivní inhibicí (Orcutt & Nielsen 2000).

Nerovnováha živin – sodík je transportovaný přes membránu proteinovým komplexem, který transportuje Na^+ jedním a H^+ opačným směrem. (Na^+/H^+ antiport). Zdroj energie pro tento antiport je v gradientě H^+ napříč membránou, který vytváří H^+-ATPázová pumpa. ATPáza závislé NA^+/H^+ antiportující proteiny jsou inhibovány NaCl. Dlouhodobé vystavení externímu NaCl může inhibovat vnitřní Na+ stimulaci H^+-ATPázové aktivity, což naznačuje, že dlouhodobé vystavení zasolení způsobuje konformační změnu v H^+-ATPázovém komplexu nebo Na^+ transportního proteinu v buněčné membráně. Poněvadž mnohé transportní proteiny v membráně kořene jsou závislé na elektrochemickém gradientu vytvořeném H^+-ATPázou, tyto transportní proteiny budou inhibovány efektem NaCl na H^+-ATPázovou aktivitu, vedoucí k Na^+ závislé limitaci živin (Orcutt & Nielsen 2000).

Membránová disfunkce – běžně spojené se zvýšenou salinitou je zvýšení tvorby vezikul plazmatické membrány (Flowers 1972). Může se objevit i významné zvětšení endoplazmatického retikula. Zvýšená tvorba vezikul a ENR může být mechanizmem kompartmentalizace a nebo exportu Na^+ iontů. Ve skutečnosti je lineární vztah mezi vnější salinitou a stupněm prosakování membrány. Mechanismus pro vzestup prosakování membrány není způsobený osmotickými faktory, protože průsak membrány se nemění, když koncentrace sorbitolu v médiu okolo kořenů je zvýšená.

Všeobecné metabolické procesy - mezi ně patřící např. fotosyntéza a respirace jsou zasolením inhibovány. Inhibice respirace je primárně spojena s přímými účinky salinity na funkci enzymů. Avšak zvýšený obsah solí v pletivech přímo ovlivňuje fotosyntetické enzymy a druhotně ovlivňuje výměnu plynů a reakce světelné fáze (Orcutt & Nielsen 2000).

Mezi nepřímé účinky zasolení patří vodní poměry, kolaterální limitace živin a oxidační stres. Morfologické změny na jehličnanech jsou pozorovatelné díky poškození solí vegetativních orgánů. Projevující se jako červené a hnědé skvrny na jehličí postupující od vrcholu jehlic, kdy poškozená a zdravá část je znatelně oddělena (Hautala et al. 1992).

2. Použité materiály a metody

2.1. Pokusný materiál, aplikace NaCl

Přirozeným stanovištěm smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.) jsou zejména horské lesy, rašeliniště, rokliny apod., vzhledem k jeho velmi častému pěstování v tzv. smrkových monokulturách je v současnosti rozšířen téměř masově po celém území ČR. Patří mezi neopadavé jehličnany dorůstající v průměru 25 - 35 m.. V České republice se jedná o průmyslově nejdůležitější dřevinu, která poskytuje dřevo lehké, pevné a pružné, ale ne příliš trvanlivé a poněkud měkké. Výhodou smrkových monokultur je snad pouze rychlost růstu. Užívá se ve stavebnictví, nábytkářství, v průmyslu papírenském, jako palivo, k výrobě hudebních nástrojů, intarzií atd., z borky se získává pryskyřice. Pro jeho důležitost jsem vybral smrk jako experimentální subjekt na pokusy modelující působení chloridu zalitím ke kořenům.

Pro potřeby našeho výzkumu jsem vybral tři čtyřleté sazenice smrku ztepilého přibližně stejného vzrůstu a objemu jehličí i kořenů, zajištěno z lesní školky Praha-Baně. Dvě z vybraných sazenic jehličnanu sloužily k aplikaci radioaktivního chloridu ^{36}Cl, zbývající sazenice posloužila ke sběru kontrolních vzorků jehličí a k určování sušiny při jednotlivých odběrech. Sazenice byly pěstovány po celou dobu experimentu v růstových kontejnerech o objemu asi 250 cm^3. Pro vytvoření přirozených nestresových podmínek, byly sazenice pěstovány v polostínu na venkovní zahradě. Protože bylo prokázáno, že podobné makroskopické účinky poškození (nekróza špiček jehličí) může způsobovat také nedostatek vláhy (Stewart & Treshow 1982), snažil jsem se zabránit úplnému vyschnutí pěstebních nádob sazenic pravidelným zalitím.

Radioizotop ^{36}Cl ve formě soli byl zajištěn v Izotopovém laboratoři Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i. $Na^{36}Cl$ (Technoexport, Rusko) měl specifickou aktivitu 5550 kB/g a 325,6 kBq/mmol, čistotu >99,3%. K aplikaci radioizotopu ^{36}Cl na sazenice jsem si připravil dva roztoky. První roztok obsahoval 0,2 g $Na^{36}Cl$ v 50 ml destilované vody, druhý roztok obsahoval 0,2 g $Na^{36}Cl$ a 9,8 g NaCl (čistota p.a., Lachema, Brno) v 50 ml vody. Z naměřených dat jsem výpočtem získal hodnoty použitého množství radioizotopu

^{36}Cl. Do první sazenice jsem aplikoval zalitím 20 ml vodného roztoku $Na^{36}Cl$ o celkové radioaktivitě 640 kBq. Druhou sazenici jsem zalil 20 ml $Na^{36}Cl$ o celkové radioaktivitě 656 kBq.

2.2. Odběr a zpracování vzorků

Odběry vzorků jehličí smrku s aplikovaným množstvím chloridu 36 probíhaly od února 2007 do konce dubna 2007 přibližně v desetidenních intervalech. Protože v růstové periodě dochází k nejrychlejšímu příjmu živin především v nejmladším jehličí (s nejintenzivnější transpirací), odebíral jsem k analýze jehličí posledního ročníku. Vzorky ke zpracování jsem se snažil odebírat z celé části koruny sazenic v množství přibližně 0,4 g. Po odběru jsem vzorky z jednotlivých sazenic zvážil a v třecích miskách pomocí kapalného dusíku, který jehličí zmrazil a stalo se tak křehčím, rozetřel na prášek. Rozdrcené vzorky jehličí jsem kvantitativně přenesl do zkumavek, přidal 10 ml vody a protřepal. Poté jsem vložil zkumavky na pět minut do ultrazvukové lázně (Kraintek K-5, Slovensko), kde proběhla homogenizace vzorků jehličí a extrakce $^{36}Cl^-$. Po skončení extrakce jsem zkumavky vyňal z ultrazvukové lázně a vložil do centrifugy. Centrifugace vzorků probíhala při 5-ti tisících otáčkách po dobu 20-ti minut (~ 4200 xg). Odstředěním ve zkumavce se oddělily dvě fáze, spodní obsahovala usazené rozetřené jehličí a svrchní roztok s extrahovaným $^{36}Cl^-$. Roztoky jsem dekantoval do připravených, předem zvážených kádinek a poté znovu zvážil. Stejným způsobem jsem prováděl i druhou extrakci. Nejprve jsem do zkumavek se zbytky rozetřeného jehličí po první extrakci přidal 10 ml vody, protřepal a vložil do ultrazvukové lázně na extrakci. Poté jsem vzorky odstředil v centrifuze a opatrně dekantoval do připravených a zvážených kádinek. Celkem jsem získal ze dvou vzorků jehličí dvěma extrakcemi čtyři roztoky s extrahovanými chloridovými ionty. Do připravených scintilačních vialek jsem automatickou byretou odměřil 5 ml scintilačního roztoku (Rotiszint® eco plus) a přidal 1 ml extrahovaného roztoku. Pro přesnější stanovení obsahu chloridu ^{36}Cl jsem z každé extrakce připravil dva vzorky k analýze. Jako slepý vzorek (blank) jsem si připravil roztok, který obsahoval 5 ml scintilačního roztoku a 1 ml destilované vody. Všechny připravené vzorky jsem protřepal na automatické třepačce a odevzdal k analýze na kapalinově scintilační měření. Konečné výsledky obsahu chloridu užitého ke stopování celkového množství NaCl v jehličí jsem vypočetl z průměru naměřených hodnot po jednotlivých extrakcí a následného odečtu hodnoty slepého vzorku.

2.3. Kapalinová scintilační spektrometrie

Kapalinově scintilační měření je jednou z účinných metod detekce a spektrometrie ionizujících částic. Zejména při měření nízkoenergetických zářičů beta nebo radionuklidů emitujících Augerovy elektrony má své nezastupitelné místo.Využití kapalinově scintilační spektrometrie proto nachází uplatnění v rozličných oblastech od archeologie a geologie (radiouhlíkové datování) přes výzkum antropogenních vlivů na obsah CO_2 v atmosféře (stanovení obsahu fosilního uhlíku v isotopické směsi), hydrologii a hydrogeologii (datování, využití radionuklidových stopovacích metod) až po biologický a medicínský výzkum (stanovení značených sloučenin) (Šimek 2006).

U scintilačních detektorů je k záznamu průletu jaderného záření transparentním dielektrikem využito deexcitace elektronů vzbuzených do excitovaných stavů. Deexcitace (návrat do základního stavu) je doprovázena emisi světelného záření, jehož intenzita je úměrná energii, kterou detekované částice nebo fotony záření gama ztratily při interakci se scintilátorem. Vlnová délka emitovaného světla tj. vyzářených luminiscenčních fotonů se registruje pomocí fotonásobiče. Ve fotonásobiči vznikají elektrické impulsy, jejichž amplituda je úměrná počtu fotonů vyzářených při průletu jednotlivého paprsku detektorem, tedy energii absorbované v prostředí detektoru. Jako detekčního dielektrika lze použít organické látky ve formě kapalných roztoku (Gosman & Jech 1989).

U kapalných scintilátorů dochází k primární ionizaci a excitaci v rozpouštědle, a teprve sekundárně je excitační energie přenesena na rozpuštěné molekuly vlastního scintilátoru. Protože k deexcitaci často dochází emisí v ultrafialové oblasti, přidává se do rozpouštědla další látka (tzv. posunovač), která způsobuje, že se vlnová délka luminiscenčního záření posune k delším vlnovým délkám vhodným pro detekci fotonásobičem. Kapalinové scintilační spektrometry pro přesná měření mají obvykle dva protilehlé fotonásobiče se vzorkem umisťovaným mezi ně. Elektrické signály na výstupu obou fotonásobičů jsou zpracovány elektronickými obvody a jako výsledek kapalinově scintilačního měření dostáváme elektrický impuls s amplitudou úměrnou kinetické energii detekované částice. Výšce pozorovaného impulsu je pomocí analogově - digitálního převodníku přiřazeno číslo kanálu impulsového kapalinově scintilačního spektra.

Výhodou kapalných scintilátorů je to, že je lze snadno používat i ve velkých objemech a že měřené vzorky lze případně přímo rozpustit ve scintilátoru, čímž se dosáhne plné absorpce emitovaného záření beta v detekčním prostředí. Protože doby nárůstu světelných pulsů v kapalných scintilátorech jsou podstatně kratší než ve scintilátorech anorganických, používá se těchto detektorů též při různých koincidenčních měřeních. Používá se jich zejména při měření látek značkovaných ^{3}H, ^{14}C, ^{36}Cl, a to selektivně, využitím amplitudové analýzy. Pro detekci záření gama mají tyto scintilátory nízkou účinnost (Gosman & Jech 1989).

3. Výsledky

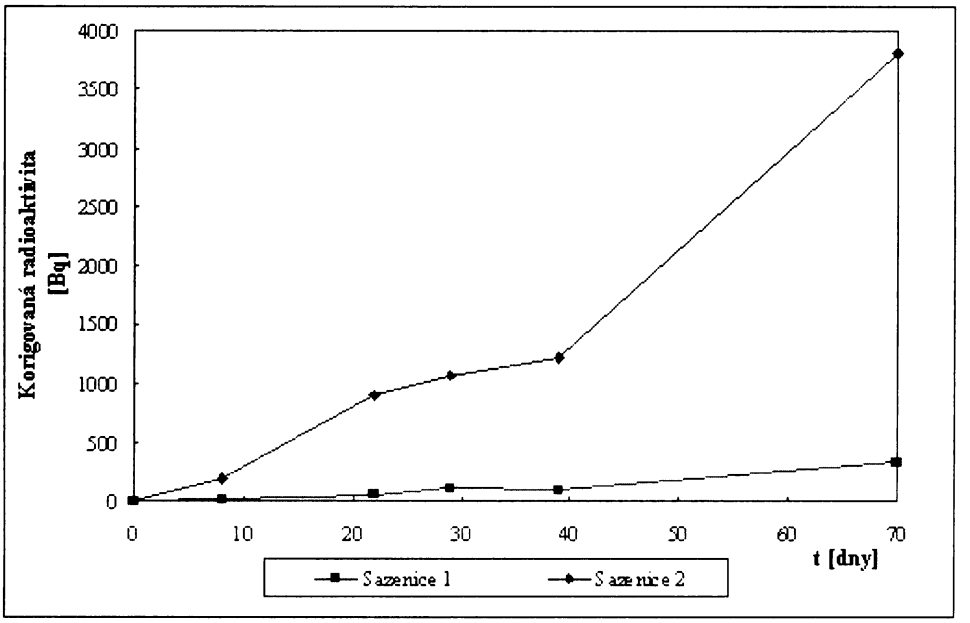
Pro studium příjmu a účinků chloridových iontů na jehličí sazenic smrku jsem si připravil dva roztoky chloridu sodného o různých koncentracích, které měly modelovat následky používání posypových solí v lesním ekosystému. Roztok chloridu sodného o vyšší koncentraci představoval nasycený roztok, který může vznikat při solení zasněžených komunikací (sazenice 2). Druhý roztok představoval naředěnou dávku, aplikovanou na sazenici 1. Celkové použité množství chloridu sodného a aplikovaná dávka izotopu ^{36}Cl ke stopování jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Přehled celkového množství NaCl a radioaktivity

	NaCl(mg)	*Radioaktivita ^{36}Cl ke stopování(kBq)*
Kontrolní sazenice	0	0
Sazenice č.1	81, 8	453, 8
Sazenice č.2	4000, 0	448, 8

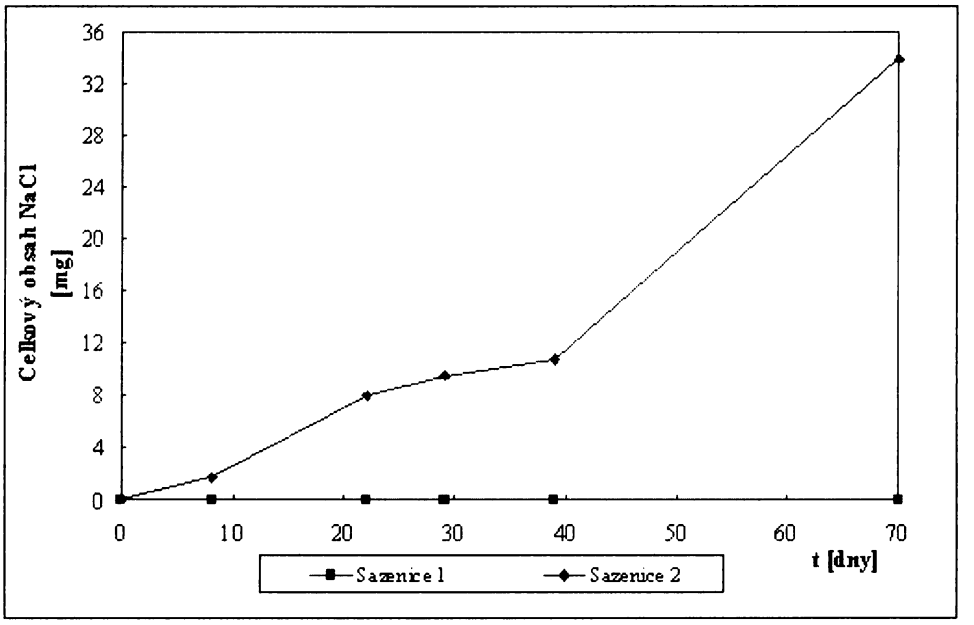
Z údajů v tabulce je zřejmé, že aplikovaná dávka chloridu na druhou sazenici byla takřka 49krát větší než v případě první sazenice. Tato diference v množství použitého chloridu se projevila při makroskopickém pozorování jehličí a celkového zdravotního stavu sazenic. Po 19 dnech od zalití se na jehličí sazenice s větší dávkou chloridu začaly objevovat hnědošedé skvrny, které se nejdříve vyskytovaly v tenkých proužcích u kořenů jednotlivých poškozených jehlic. Při opakovaném pozdějším pozorování, začala nekróza postupovat až ke špičkám poškozeného jehličí a množství takto postižených jehlic začalo narůstat, až nastal totální úhyn sazenice dva. U sazenice s nižším aplikovaným množstvím chloridu jsem nepozoroval takovéto viditelné poškození jehlic. Protože náš pokus probíhal na živých sazenicích v jarních měsících, kdy dochází k nejvyšší růstové aktivitě, mohl jsem pozorovat účinky chloridu na tvorbu nových přírůstků. U sazenice s nižší použitou dávkou chloridu jsem mohl pozorovat lepší tvorbu nových přírůstků, než u sazenice s vyšší dávkou chloridu, kde byla míra toxicity tak velká, že žádné přírůstky se ani neobjevily. U sazenice jedna byl tedy pozorován přírůstek nového jehličí, ovšem v porovnání s kontrolou byl přírůstek menší.

Cíl naší práce byl pozorovat radionuklidem $^{36}Cl^{-}$ množství přijatého chloridu sodného kořenovým systémem smrku ztepilého. Vzorky sem odebíral zhruba po deseti dnech, po odběru jsem je ihned analyzoval. Výsledky jsem vynášel do grafů.



Obr. 3.1: Graf závislosti korigované na teoreticky stejné množství radioaktivity na čase.

V grafu (Obr 3.1) je vynesena závislost nalezené radioaktivity ve vzorkách jehličí v závislosti na čase. Uvedené hodnoty na grafu ukazují časový průběh příjmu chloridu 36 užitého ke stopování v jehličí. Obrázek 3.2 představuje celkové množství přijatého chloridu kořenovým systémem, jež bylo naměřeno ve vzorkách jehličí v sledovaném období. Celkové hodnoty obsahu chloridu sodného v jehličí jsem vypočítal z naměřené radioaktivity, korigované na teoreticky stejné množství radioaktivity a přepočítané na celkové kvantum chloridu aplikovaného ke kořenům. Hodnoty obsahu NaCl jsou v mg NaCl na gram jehličí. Z obrázku je patrný nárůst množství NaCl u sazenice č.2 s vyšším obsahem soli především mezi prvním a druhým měřením. Od této doby až do konce pokusu množství soli pravidelně stoupalo. V jehličí sazenice č.1 bylo nalezeno velmi nízké množství soli přijaté kořenem v porovnání se sazenicí číslo dvě, což se projevilo rozdílným poškozením obou sazenic, postřehnutelných pouhým okem po několika dnech po aplikaci.



Obr. 3.2: Graf závislosti celkového obsahu NaCl (na gram jehličí) na čase.

4. Diskuze

Problémy, které rostliny musí překonat při růstu na zasolených půdách, jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů (zejména Na^+, Cl^-) to bývá velmi nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy (Procházka et al. 1998). V důsledku vytlačování iontů Ca^{2+} z membrány může docházet ke zvětšení plazmatické membrány a tím ke snadnějšímu průchodu Cl^-, což může vést k jeho kumulaci do cytosolu (Orcutt & Nielsen 2000). V nadbytku chloridu dochází k toxickému poškození smrku. Z jehličí se ztrácí chlorofyl, objevují se na nich žluté skvrny, přičemž zvláště okraje listů jsou chlorotické a svinují se, snižuje se fotosyntetická kapacita rostlin. Dochází i k poškození vodivostních pletiv, v okolí cév a taky na okrajích listů vznikají nekrózy. Další expozice posléze vede až k defoliaci (Uhlířová et al. 2002).

V porovnání mnou naměřených koncentrací chloridu v jehličí s kritickými hodnotami, které uvádějí jiní autoři, jsem zjistil následující. Podle Leha (1973) je hranicí poškození NaCl hodnota 10mg/g (stanovovaná všeobecně pro rostliny). Z grafu 3.2 je zřejmé, že u sazenice s nižším obsahem chloridu této hranice nebylo dosaženo a tudíž ani nebylo pozorováno žádné poškození. Sazenice s vyšším obsahem NaCl však přijala několikanásobně vyšší množství chloridu. Při prvním odběru jehličí (osm dní po zalití), byl obsah chloridu na gram jehličí kolem 2 mg. Na sazenici nebylo patrné poškození. Při odběru číslo tři bylo naměřeno množství NaCl cca 10 mg/g a od této doby bylo možno pozorovat viditelné makroskopické poškození jehličí stejně jak to definoval Leh (1973), a sice červenohnědé skvrny postupující od vrcholů jehlic, kdy poškozená a zdravá část byla znatelně oddělena. Symptomy poškození odpovídají pozorování Hautala et al. (1992). Na sazenici s menším obsahem přijatého chloridu bylo možné sledovat nové přírůstky jehličí, které však ve srovnání s kontrolní sazenicí byly kratší (neměřeno), což může být v korelaci se zjištěním Semorádové (2003), že obsah Cl^- je nejvyšší v 1. ročníku jehličí, což způsobuje menší roční přírůstky. Příjem chloridu kořenovým systémem byl několikrát vyšší než aplikované stejné množství postřikem solnou břečkou, jež zkoumal Kodym (2007).

Při dalších experimentech s $Na^{36}Cl$ kořenovým systémem smrku ztepilého bych se zaměřil na sledování vývoje poškození jehlic po opakované aplikaci NaCl v malých koncentracích. Dále by bylo zajímavé pozorovat změny obsahu makrobiogenních prvků v závislosti na příjmu různého množství chloridu jehličím.

5. Použitá literatura

Flowers, T. J.: The effect of NaCl on enzyme activities from four halophytes species of chenopodiaceae. *Phytochemistry*, 11, s. 1881-1886 (1972)

Frank, H.; Frank, W.: Photoactivierung luftgetragener Chlorkohlen-wasserstpffe. *Nachr. Chem. Techl. Lab.* , 34, Nr. 1: 15-20 (1986)

Gosman, A.; Jech, Č.: Jaderné metody v chemickém výzkumu, *Academia*, Praha, s. 73-77 (1989)

Hautala, E. L.; Wulf, A., Oksanen, J.: Effect of deicing salt on visible symptoms element concentrations and membrane damage in first-year needless of roadside Scots pine (Pinus Silvestris). *Ann. Bot. Fenn.* , 29, 179-185 (1992)

Howard, K. W. F.; Livingstone, S.: Transport of urban contaminants into Lake Ontario via sub-surface-flow. *Urban Water*, Vol. 2, Num. 3: 183-195 (2000)

Kodym, T.: Příjem chloridu jehličím smrku ztepilého postřikem solnou břečkou. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze: 23-27 (2007)

Leh, H. O.: Untersuchungen űber die Auswirkungen der Andwendung von Natriumchlorid als Auftaumittel auf die Strassenbaume in Berlin. *Nachr. d. deutsch. Pflanzens chutzdienstes*, 11: 163-167 (1973)

Luštinec, J.; Žárský, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. *Karolinum*, Praha, 140-165 (2003)

Matucha, M.; Gryndler, M.; Forczek, S. T.; Schroder, P.; Bastviken, D.; Rohlenová, J.; Uhlířová, A.; Fuksová, K.: A chlorine-36 and carbon-14 study the role of chlorine in the forest ecosystem. *J. Lab. Comb. Radiop.*, 50, 437-439 (2007)

Norrström, A. C.; Bergstedt, E.: The impact of road de – icing salts on colloid dispersion and base cation pools in roadside soils. *Water, Aair and Soil pollution*, 127, 281-299 (2001)

Öberg, G.: The natural chlorine cycle – fitting the scattered pieces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 565-581 (2002)

Ondráček, P.: Vlivy chemického ošetřování vozovky na kvalitu podzemní vody, *Geol. Výzk. Mor. Slez.*, s. 130-133 (2006)

Orcutt, D. M.; Nielsen, E. T.: Plants under stress, Salinity stress. *John Willey & Sons*, NY, 177-236 (2000)

Procházka, S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek, J. a kol.: Fyziologie rostlin. *Academia*, Praha, 412-430 (1998)

Ramakrishna, D. M.; Viraraghavan, T.: Environmental impact of chemical deicers – a review, *Water, Air and Soil Pollution*, 166, 49-63 (2005)

Richter, R.; Hlušek, J.: Výživa a hnojení rostlin (I. obecná část), *VŠT*, Brno, 177 (1994)

Richter, R.; Hlušek, J.: Půdní úrodnost, *ÚZPI*, Praha, 44 (2003)

Soukup, J., Horký, J.: Vliv soli na městskou zeleň, *TOMOS*, Praha, 72 (1981)

Semerádová, E.: Poškozování lesních porostů posypovou solí, *Lesnická práce* 82, 1 (2003)

Stevenson, F., Mertens, T.: Plant anatomy, *J. Wiley*, NY, 132-139 (1976)

Stewart, D.; Treshow M.: Pathological anatomy of conifer needle necrosis, *Can. J. Bot.* 51, s. 983-988 (1972)

Šimek, O.: Kapalinová scintilační spektrometrie (2006). Dostupné z URL.: <http://www.jaderne.info/fileadmin/jinfo/odb_prisp/K_Rov/kapalinovka.pdf> [cit. 18.4.2007]

Taiz, L.,Zeiger, E.: Plants Physiology 3rd edition, *Sinair associate*. Sunderland, Ma, (2002).

Uhlířová, H.; Matucha, M; Forczek, S. T.: Účinky chloroctových kyselin na smrk ztepilý (*Picea abies*/L./ Karst.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 47, 16-20 (2002)

Voet, D.; Voetová, J. G.: Biochemie. *Victoria Publishing*, Praha, 300-350 (1995)

Votrubová, O: Anatomie rostlin, *Karolinum*, Praha, 67-74 (2001)

Weissflog, L., Manz, M., Popp, P., Elansky, N., Arabov, A., Putz, E., Schüürmann, G.: Airborne trichloroacetic Acid and its deposition in the catchment area of the Caspian Sea, *Environmenta Pollution* . 104, 359-364 (1999)

Zhang, Q. F., Lin, Y. Y., Fang, C. H., Lu, C. M., Wang, B. S..: NaCl enhancers thylakoid – bound SOD activity in the leaves of C_3 halophyte Suaeda salsa L., *College od Life Science*. Jinan, (1972)

Wikipedie.org: Anatomy roots. Dostupné z URL: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Anatomy_roots.jpg 2006> [cit. 20.1.2007]