

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



David Lukáč

Ekotoxicita směsných odpadů v metodě posuzování životního cyklu
Ecotoxicity of mixed waste in Life Cycle Assessment

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc., Ing. Vladimír Kočí PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27.5.2011

David Lukáč

Poděkování:

Děkuji Doc., Ing. Vladimíru Kočímu Ph.D. za inspiraci při výběru tématu mé bakalářské práce a za možnost tuto práci na VŠCHT Praha uskutečnit.

Také děkuji Ing. Haně Motejlové za skvělé vedení této bakalářské práce v roli konzultantky a za trpělivost a nesmírnou ochotu.

Abstrakt

Předmětem práce je zjištění ekotoxicity (ve formě EC_{50}) a charakterizačních faktorů (CF) dvou reálných půdních vzorků, kontaminovaných směsí těžkých kovů, za využití terestrických testů ekotoxicity. Získané hodnoty jsou následně porovnány s hodnotami CF používanými v metodě posuzování životního cyklu (LCA) v současnosti a jsou diskutovány rozdíly. Obsahy těžkých kovů ve vzorku jsou zjištěny sekvenční extrakcí s ICP-OES. Pro zjištění hodnot EC_{50} jsou používány testy na roupicích *Enchytraeus crypticus*, chvostoskocích *Folsomia candida* (u obou zjišťována inhibice reprodukce) a salátu *Lactuca sativa* (zjišťována inhibice růstu kořene). Hodnoty EC_{50} a CF ukazují vyšší toxicitu v případě vzorku Vodárna oproti vzorku Rampa. Je prokázán rozdíl ve stanovení CF metodou terestrických testů a matematickou metodou používanou standardně.

Abstract

Subject of the study is establishing ecotoxicity (in the form of EC_{50}) and characterization factors (CF) of two real soil samples, contaminated by a mixture of heavy metals, by using terrestrial tests of ecotoxicity. The gained values are then compared to CF values nowadays used in life cycle assessment (LCA) studies and the differences are discussed. The heavy metals contents are assessed by sequential extraction with ICP-OES. To gain the EC_{50} values following organisms are used: enchytraeids *Enchytraeus crypticus*, collembolans *Folsomia candida* (determining inhibition of reproduction) and lettuce *Lactuca sativa* (determining inhibition of root growth). EC_{50} and CF values show higher ecotoxicity in the case of Vodárna sample than in the case of Rampa sample. A difference in CF assessment between the method of using terrestrial tests and mathematical method, which is used generally, is proved.

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt..... | 4 |
| Obsah..... | 5 |
| Seznam použitých zkratek..... | 6 |
| 1 Úvod..... | 7 |
| 2 Teoretická část..... | 8 |
| 2.1 Posuzování životního cyklu, LCA | 8 |
| 2.1.1 Charakterizační faktory | 9 |
| 2.2 Terestrické testy | 10 |
| 2.2.1 Organismy | 10 |
| 2.2.2 Terestrické testy | 12 |
| 2.3 Problematika těžkých kovů v půdě | 13 |
| 2.4 Speciační analýza kovů | 15 |
| 2.5 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd..... | 17 |
| 3 Experimentální část..... | 18 |
| 3.1 Charakteristika materiálu | 18 |
| 3.1.1 Organismy | 18 |
| 3.1.2 Vzorky zeminy | 18 |
| 3.1.3 Artificiální půda | 18 |
| 3.1.4 Použité chemikálie | 19 |
| 3.2 Metodika..... | 19 |
| 3.2.1 Odběr a zpracování vzorků kontaminované půdy..... | 19 |
| 3.2.2 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd..... | 20 |
| 3.2.3 Sekvenční extrakce..... | 22 |
| 3.2.4 Terestrické testy ekotoxicity | 23 |
| 3.2.5 Matematické zpracování výsledků..... | 27 |
| 3.3 Statistické zpracování dat..... | 29 |
| 3.3.1 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd..... | 29 |
| 3.3.2 Testy únikového chování s roupicemi..... | 29 |
| 3.3.3 Terestrické testy ekotoxicity s roupicemi a chvostoskoky..... | 29 |
| 3.3.4 Terestrický test se salátem..... | 29 |
| 4 Výsledky a diskuse..... | 30 |
| 4.1 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd..... | 30 |
| 4.2 Výsledky sekvenční extrakce – získaná data | 30 |
| 4.3 Test únikového chování s roupicemi..... | 32 |
| 4.4 Výsledky terestrických testů ekotoxicity | 34 |
| 4.5 Charakterizační faktory | 38 |
| 5 Závěr..... | 40 |
| 6 Literatura..... | 41 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|------------------|--|
| BCR | Bureau Communautaire de Référence |
| CF | Characterisation Factor; charakterizační faktor |
| CML | Institute of environmental sciences, Leiden University |
| EC ₅₀ | Effective Concentration; efektivní koncentrace; koncentrace látky vyvolávající sledovaný efekt u 50 % testovací populace organismů |
| ICP-OES | Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry; emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem |
| LC ₅₀ | Lethal Concentration; letální koncentrace; koncentrace látky způsobující smrt u 50 % testovaných živočichů |
| LCA | Life Cycle Assessment; posuzování životního cyklu |
| RAM | vzorek Rampa |
| REACH | tzv. registrace, evaluace a autorizace chemických látek; nová chemická politika Evropské unie |
| SES | Sequential Extraction Scheme; schéma sekvenční extrakce |
| TC | Total Carbon; celkový obsah uhlíku |
| TIC | Total Inorganic Carbon; celkový obsah anorganického uhlíku |
| TOC | Total Organic Carbon; celkový obsah organického uhlíku |
| VOD | vzorek Vodárna |
| VPK | vodní kapacita půdy |
| WHC | Water Holding Capacity; vodní kapacita půdy |

1 Úvod

Odpad je dle české legislativy (zákon 185/2001 Sb.¹) každá věc, které se osoba zbavuje a je dále definována v příloze tohoto zákona. Jako o odpadech v takovém případě hovoříme i o zůstatcích z výroby a spotřeby či pozůstatcích těžby nerostných surovin, obrábění materiálů a mnoho dalších. Předmětem našeho zájmu pak bude kategorie Q15: Znečištěné materiály, látky nebo výrobky, které vznikly při sanaci půd.

V případě této bakalářské práce bude zkoumána dvojice vzorků půd získaných v areálu průmyslového podniku Kovohutě Příbram nástupnická, a.s., v nichž je očekáváno nadměrné množství těžkých kovů. Jejich vliv na životní prostředí bude prezentován vlastností nazývanou ekotoxicita. Ekotoxická látka je ve vyhlášce MŽP a MZ ČR 376/2001 Sb.² definována jako látka mající hodnotu $EC_{50} \leq 10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ při testování vlivu jejího vodného výluhu po stanovenou dobu na jeden z testovacích organismů (*Poecilia reticulata*, nebo *Brachydanio rerio*; *Daphnia magna*; *Raphidocelis subcapitata*, nebo *Scenedesmus subspicatus*; *Sinapis alba*). Dle této vyhlášky jsou všechny látky mající nebezpečnou vlastnost H14 Ekotoxicita označovány jako odpady. Proto je toto označení použito i v názvu této bakalářské práce.

Testování ekotoxických vlastností pouze na vodných výluzích látek je však nedostatečné. Například právě těžké kovy se do vodných výluhů uvolňují v mnohem menších množstvích, než jaká jsou ve skutečnosti biologicky dostupná pro organismy a tak by výsledky testu vycházely pro testovaný odpad příznivěji, než jaká je skutečnost. Z toho důvodu bude ekotoxicita směsi těžkých kovů zjišťována využitím terestrických testů ekotoxicity (testů založených na zkoumání toxických vlastností půd či půdních směsí vůči různým půdním organismům).³

Hlavním cílem této práce však nebude samotné zjištění míry ekotoxicity zkoumaných půd, ale zjištění tzv. charakterizačního faktoru daných vzorků. Charakterizační faktor je nástroj umožňující v metodě posuzování životního cyklu (LCA) porovnání vlivů různých škodlivin na určitou oblast životního prostředí. Jak bude vysvětleno v následujícím textu, charakterizační faktory jsou v dnešní době známy pro jednotlivé těžké kovy v různých maticích. Předpokládá se však, že směs těžkých kovů v reálné matici bude mít jiný efekt než jednotlivé těžké kovy působící odděleně a celkový dopad na životní prostředí nebude stejný jako suma dopadů způsobená každým kovem zvlášť. Kromě toho se na celkové míře ekotoxicity vzorků mohou podílet i další kontaminanty či obecně složení půdy. Porovnání experimentálně získaných dat s daty tabelovanými bude předmětem závěrečné diskuse.

2 Teoretická část

2.1 Posuzování životního cyklu, LCA

Posuzování životního cyklu (LCA; Life Cycle Assessment) je, jak už samotný název napovídá, analytická metoda hodnocení vlivu produktů, služeb a technologií na životní prostředí. Hodnotí se všechna stádia života daného předmětu zájmu od získávání surovin pro jeho výrobu, přes výrobní proces, dopravu ke spotřebiteli, používání spotřebitelem a likvidaci po splnění účelu. Takový přístup je pak nazýván „od kolébky do hrobu“.

Analýzu je ovšem možné provádět v zúženém a doposud častějším rozsahu, tak zvaně „od kolébky k bráně“. V takovém případě jsou předmětem zájmu pouze procesy získávání materiálů pro výrobu, samotné zpracování či výroba se všemi jeho aspekty, až po okamžik opuštění výroby. Jedná se o přístup využívaný obvykle výrobcem produktu, kterého další osud jeho výrobku po prodeji již příliš nezajímá.

LCA metody se zaměřují pochopitelně hlavně na environmentální hlediska, ačkoli ani další úhly pohledu nejsou opomíjeny (hlavně ekonomická, sociální a funkční stránka věci).⁴

Studie LCA probíhá ve čtyřech fázích: definice cílů a rozsahu, inventarizace, hodnocení dopadů a interpretace.

Ve fázi **definice cílů a rozsahu** probíhá příprava na samotný proces analýzy. Jsou určeny oblasti zájmu studie, důvody zadání, požadované výstupy. Např. musí být stanoveny hranice zkoumaného systému, popsány zdroje dat a způsob nakládání s nimi. Obecně se dá říci, že je popsáno, co vše bude třeba učinit pro zdárné vypracování studie. V tomto kroku však neprobíhá samotný sběr dat, jejich zpracování ani interpretace.

Druhou fází je **inventarizace**. Její hlavní náplní je shromáždit všechny relevantní informace o zúčastněných procesech, hlavně pak o materiálových a energetických tocích (souhrnně označovaných jako elementární toky, jejich suma a způsob proudění systémem potom jako tzv. ekovektor). Na tyto toky je nahlíženo z hlediska jejich vstupů do systému a výstupů z něj.

Informace zjištěné o elementárních tocích, nemají samy o sobě žádnou konkrétní výpovědní hodnotu. Právě ve fázi **hodnocení dopadů** jsou však ekovektory produktových systémů převáděny na konkrétní měřitelné dopady na životní prostředí. Závažnost environmentálních dopadů je pak možné porovnávat pomocí kvantifikovatelných veličin označovaných jako kategorie dopadu. Kategorie dopadu může být např. globální oteplování, acidifikace, eutrofizace, mořská toxicita či půdní ekotoxicita.

Jednotlivé zjištěné ekovektory jsou přiřazovány kategoriím dopadu tzv. klasifikací a následně kvantifikovány charakterizací. Během ní je vyčíslena velikost dopadů elementárních toků na jednotlivé kategorie dopadu. Proto je potřeba zvolit pro každou kategorii dopadu veličinu, v níž bude velikost poškození vyjádřena (indikátor kategorie dopadu). Toto přiřazení probíhá za využití charakterizačních faktorů, o nichž blíže pojednává samostatná kapitola 5.1.1.

Poslední fází je **interpretace životního cyklu**. Forma prezentace zjištěných výsledků může velmi ovlivnit jejich význam a pochopení a právě proto byly zavedeny určité standardy i pro tento krok. Zjištěná data by měla být strukturalizována s ohledem na nejvýznamnější procesy a látky a s ohledem na účel studie. Měla by být provedena analýza citlivosti dat a zhodnocení nejistot, např. vzhledem ke kvalitě vstupních dat. Závěrem by mělo být shrnutí a formulace realistických doporučení. Přesto, že je interpretace poslední fází LCA, iterativním způsobem se podílí na třech předchozích: výstupy z interpretace mohou mnohdy vést k přehodnocení postupů použitých v předchozích krocích a odhadů či aproximací, které byly nezbytné.⁵

2.1.1 Charakterizační faktory

Charakterizace je vyčíslení míry, jak silně se elementární toky podílí na rozvoji určité kategorie dopadu. Pro přepočtení elementárního toku (obvykle vyjádřeného hmotnostně) na jednotku indikátoru kategorie dopadu je využíváno charakterizačních faktorů (CF). Jedná se o konstantní tabelované hodnoty, které umožňují porovnání míry určitého kvantitativně vyjádřeného efektu na životní prostředí (v našem případě hodnoty EC_{50}) s mírou tohoto efektu způsobeného standardní látkou (indikátorem). Pro jednotlivé kategorie dopadu mohou být využívány různé standardní látky. V současnosti existuje několik charakterizačních modelů (metodik zjišťování charakterizačních faktorů a jejich přiřazování k indikátorům kategorie dopadu), z nichž každý může používat pro kategorie dopadu jiné standardy. V případě studií prováděných VŠCHT Praha je nyní využíván model CML-IA (konkrétně verze CML2001), kde je pro kategorii dopadu půdní ekotoxicita indikátorem ekvivalent 1,4-dichlorbenzenu.

Právě v této fázi dochází k propojení převážně teoretické práce na studii LCA s prací experimentální, neboť zjištění charakterizačních faktorů není možné provést jinak než laboratorními pokusy. (Použity budou terestrické testy na běžně používané baterii organismů: *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus*, *Lactuca sativa capitata*).⁶

2.2 Terestrické testy

2.2.1 Organismy

Roupice

Půdní kroužkovci rodu *Enchytraeus* (čeleď *Enchytraeidae*, řád *Oligochaeta*, kmen *Annelida*) jsou ekologicky důležití, neboť se vyskytují v mnoha půdách. Čeleď *Enchytraeidae* je možné využívat mj. k laboratorním testům, kde je značnou výhodou jejich snadný chov, lehká manipulace a krátká doba vývoje (doba trvání reprodukčních testů bývá obvykle 4 až 6 týdnů). Jedná se o živočichy červovitého tvaru a bílé barvy, v dospělosti dosahující délek 15 až 40 mm. Dospělosti dosahují mezi 33 a 74 dnem života.⁷ Roupice jsou hermafroditi (sexuální rozmnožování se uskutečňuje výměnou spermatozoidů mezi dvěma dospělými jedinci), čímž odpadá potřeba rozlišovat samce od samic a zavádět do chovů a testů obě pohlaví v přibližně stejných počtech. Dospělé roupice jsou pak rozeznatelné pouhým okem díky opasku tvořenému sekretovaným kokonem, v němž jsou uchovávána vajíčka (v počtu 1 – 15 ks).⁸

Pro terestrické testy je používáno několik druhů roupic, nejčastěji *Enchytraeus albidus* a *E. crypticus*, které jsou si vzhledem velmi podobné. V laboratorních podmínkách jsou krmeny autoklávovanými ovesnými vločkami.



Obr. 1: Roupice *Enchytraeus albidus*. © Bauchhausen, P.

Chvostoskok

Chvostoskoci rodu *Folsomia* jsou malí bílí živočichové žijící téměř ve všech typech půd (vyjma půd s extrémními vlastnostmi) a s kosmopolitním rozšířením. *F. candida* byl nalezen i v antarktických půdách. Délka těla dospělých jedinců *F. candida* bývá 1,25 mm (samci), respektive 2,0 – 2,5 mm (samice).⁹

Jakožto členovci mají tělo tvořeno jednotlivými články. Na ventrální straně třetího zadečkového článku se nachází kleštičkový úchyt (retinakulum) pro skákací vidličku (furka),

kteřá vyrůstá ze čtvrtého zadečkového článku.⁸ Právě tato vidlička umožňuje chvostoskokům rodu *Folsomia* jejich charakteristický pohyb, díky němuž jsou (např. při přenášení) jednoduše rozeznatelní i při minimální velikosti desetin milimetru.

Chvostoskoci jsou nesmáčiví, což některým druhům umožňuje žít i na hladině vodních ploch. Pro účely testů je tato vlastnost zásadní, neboť umožňuje v závěru testu jedince vyplavit vodou z testované půdy a po vyfocení digitálním fotoaparátem využít obrazové analýzy pro jejich spočítání, jak je popsáno v metodické části.

Ačkoli jsou chvostoskoci dvojího pohlaví, v laboratorních podmínkách se rozmnožují partenogeneticky, a tudíž odpadá potřeba rozlišovat jednotlivá pohlaví a následně je zavádět do testů a chovů v přibližně rovných počtech, aby nebyla ovlivňována plodnost.¹⁰

Rod *Folsomia* se živí odumřelými kořeny rostlin, listovým materiálem a hlavně houbami. Pokud je rostlinný materiál napadený houbami, preferují ho. V laboratorních podmínkách jsou dostatečnou potravou např. sušené kvasnice.¹¹

Pro testy ekotoxicity jsou obvykle používáni dva zástupci rodu *Folsomia* (čeleď *Isotomidae*, řád *Collembola*, třída *Entognatha*) a to chvostoskoci *Folsomia candida* a *F. fimetaria*. *F. candida* je používán hojněji a je o něm známo více než o *F. fimetaria*.



Obr. 2: Chvostoskok *Folsomia candida*. © Kohl, F.

Salát

Salát či locika setá (*Lactuca sativa*) je jednoletá až dvouletá rostlina v zemědělství velmi rozšířená a jako taková je v poslední době s oblibou používána jako vzorový organismus např. při kontaktních testech ekotoxicity u rostlin. Je známo asi 130 kultivarů, které se dělí do 4 skupin, nejběžnější je skupina *capitata* (saláty hlávkové). Poznatky získané zkoumáním salátu mohou být následně užity při vytváření nových odolnějších odrůd, při fytoimediačních procesech či při zavádění preventivních opatření v oblasti nakládání s odpady.¹²

Při terestrických testech ekotoxicity je nejběžněji používána právě nejrozšířenější odrůda *Lactuca sativa capitata* (čeleď *Asteraceae*, řád, *Asterales*, třída *Rodopsida*).



Obr. 3: Salát *Lactuca sativa capitata*. © Deml, M.

2.2.2 Terestrické testy

U velkého množství běžně používaných chemikálií jsou již v dnešní době známy jejich toxické účinky, spousta dalších je právě zkoumána. Napomáhají tomu i nejrůznější legislativní změny a snahy nadnárodních organizací – viz např. REACH.

Doposud se však většina toxikologických studií zaměřovala na účinky xenobiotik na lidský organismus a účinky na životní prostředí, potažmo na jiné organismy než na člověka, byly leckdy opomíjeny. Díky měnícím se názorům a poznatkům ohledně prostředí, ve kterém žijeme, se však ukazuje, že je nesmírně důležité porozumět také účinkům chemikálií na přírodu jako takovou.

Jedním z nástrojů, jak otestovat vliv chemických látek na živočichy a rostliny jsou např. testy ekotoxicity. V případě, že budeme hovořit pouze o organismech žijících hlavně v suchozemském prostředí – v půdě, bude se jednat o tzv. terestrické testy ekotoxicity.

Důvodem existence takových testů může být např. poznatek, že přímý toxický účinek (ať už s expozicí akutní či chronickou) může být zcela odlišný od ostatních toxických účinků, kdy jsou polutanty rozptýleny v prostředí. V takových případech hraje svou nezanedbatelnou roli dostupnost (availability; biologická dostupnost – bioavailability) dané látky pro organismy.

Pojem biologická dostupnost je definován jako míra potenciálu chemikálie vstoupit do biologického receptoru. Je závislá na příjemci, cestě vstupu, době expozice a prostředí, v němž se kontaminant nachází.¹³

Měřit hodnoty biologické dostupnosti je již v dnešní době možné, avšak jedná se o velmi náročné a složité postupy. Pokud tedy nepotřebujeme získat konkrétní hodnoty (např.

množství xenobiotika přijatého do organismu v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), velmi dobře poslouží právě ekotoxikologické testy, které umožňují zjistit např. hodnoty EC_{50} nebo LC_{50} .

V dnešní době je používána celá řada ekotoxikologických testů. Např. pro testování účinků látek na molekulární úrovni jsou využívány vyšší rostliny (mutagenita) či žába drápatka vodní (*Xenopus laevis*; teratogenita). Obecně jsou velmi časté testy s producenty nebo organismy žijícími v aquatických ekosystémech, sedimentech, půdních ekosystémech atd. Poslední zmiňované jsou pak označovány jako terestrické testy a při jejich provádění je využíváno hned několik druhů organismů, ať už rostlin či živočichů: hlístice (*Caenorhabditis elegans*), háďátka (*Panagrellus redivius*), žížaly (*Eisenia fetida*), roupice (*Enchytraeus crypticus*), chvostokoci (*Folsomia candida*), měkkýši (hlavně čeleď *Helicidae* – hlemýžd'ovití), salát (*Lactuca sativa*) ap. Na rozdíl od aquatických testů, kde jsou zkoumány vodné výluhy vzorků, nehrozí u testů terestrických zkreslení výsledků kvůli fázím těžkých kovů a dalších polutantů, které zůstanou adsorbovány na povrchu půdních částic nebo v podobě nerozpustných komplexů.

Nejběžnějším typem terestrických testů s živočichy jsou reprodukční testy, při kterých je zjišťována míra inhibice reprodukce živočichů při pobytu v kontaminované půdě v porovnání s uměle vytvořenou půdou. Testy probíhají delší dobu (většinou 4 – 6 týdnů) a vzhledem k délce rozmnožovacího cyklu používaných organismů tedy testujeme účinek xenobiotik na více než jednu generaci. Jedná se tedy o testy s chronickou expozicí.¹⁴

Možnost testovat akutní expozici vůči organismům nám umožňují např. únikové (avoidance) testy. Vzhledem ke krátké době trvání testu a relativně jednoduchému vyhodnocení jsou vhodné např. pro rychlý screening větších území.¹⁵ V případě roupic probíhají testy po dobu 48 h a jsou konstruovány tak, že do jedné nádoby je vedle sebe umístěna uměle vytvořená půda a kontaminovaná půda ve stejném množství. Na rozhraní obou půd je umístěn určitý počet živočichů a po uplynutí stanovené doby je zjištěn počet jedinců v nekontaminované a kontaminované půdě. Pokud jsou jedinci rozptýleni přibližně rovnoměrně, zkoumaný vzorek nevyvolává stres. Pokud jsou jedinci soustředěni spíše v uměle vytvořené půdě, lze předpokládat, že zkoumaný vzorek působí na organismy nepříznivě.¹⁶

2.3 Problematika těžkých kovů v půdě

Pojem „těžké kovy“ je obecně špatně definovatelný. Různí autoři jej vymezují mírně rozdílně, většinou však na základě specifické hmotnosti, jejíž spodní hranice bývá pro tuto skupinu prvků udávána v rozmezí 4 až $6\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Další kritérium pro označení kovu jako

„těžkého“ může být např. jeho postavení v periodické tabulce prvků (prvky s protonovým číslem 22 – 34 a 40 – 52).

Často je také možno se setkat s termínem „toxické kovy“, který je však definovatelný ještě hůře, neboť jak známo, všechny stopové prvky jsou pro organismus toxické, pokud jich je v organismu nadbytek. Ovšem s narůstajícími znalostmi ohledně této problematiky zjišťujeme, že jako toxické se mohou projevit i kovy, které bychom neoznačili za těžké podle výše zmíněných kritérií. Již delší dobu je také známa skutečnost, že celá řada kovů je pro organismy esenciální ve stopovém množství, překročení této hranice je však velmi jednoduché a může mít drastické následky pro zdravý organismů.

Navíc nesmíme zapomínat, že reakce jednotlivých organismů na přítomnost či nadbytek kovů se může velmi lišit. Například u některých rostlin byla zjištěna velká tolerance vůči vysokým koncentracím těžkých kovů a takové rostliny jsou pak často používány při fytoimediačních procesech.¹⁷

Ve vzorcích, které jsou předmětem této práce, byly zjištěny největší obsahy Al, Pb, Zn a Mn, dále pak ještě malá množství Ni, Cu, As, Cd, Sb. Právě těmto prvkům je proto věnována zvýšená pozornost v následujících odstavcích.

Antropogenní zdroje znečištění půd těžkými kovy mohou být různé. Nejčastějšími zdroji jsou těžba a zpracování kovů, zemědělská činnost, čistírenské kaly, spalování fosilních paliv, chemický průmysl, nakládání s odpady atd.

Při těžbě kovů je hlavním zdrojem kontaminace hlušina – jemné částice vytěžené zeminy se zbytky rudy, kterou se nepodařilo extrahovat v průběhu separace. S postupujícím technologickým pokrokem v oblasti těžby rud se množství kovů v hlušinách postupně snižuje, ale až do začátku dvacátého století byly obsahy kovů v hlušinách velmi vysoké. Částice hlušiny mohou být roznášeny větrem nebo vodou a kontaminanty jsou následně uvolňovány do prostředí. Největší znečištění tak nacházíme v blízkém okolí místa těžby či v naplavených sedimentech podél případných říčních toků.

Nezanedbatelnou je i skutečnost, že rudy (rudní minerály) konkrétního kovu bývají vždy asociovány ještě s dalšími kovy, které jsou často nežádoucí a po jejich odstranění mohou také kontaminovat prostředí kovohutí. Tak například docházelo v minulosti ke kontaminaci prostředí kadmíem při zpracování Pb-Zn rud. Ačkoli je samo Cd používáno teprve přibližně 50 let, kontaminace jím sahá mnohem hlouběji do minulosti. Dalším příkladem může být arsen uvolňovaný při zpracování Cu rud.

Metalurgický průmysl může být zdrojem znečištění velkým množstvím těžkých kovů. Ohledně jejich úniku do prostředí jsou většinou zmiňovány hlavně tři možné problémy: emise

aerosolů obsahujících polutanty, transportovaných vzduchem a následně usazovaných na půdě a rostlinách; odpadní vody hrozící zaplavením půd a kontaminací v době záplav; tvorba skládek, kde kovy korodují a pronikají do půdy.

Příčin kontaminace v zemědělství můžeme nalézt hned několik. Nečistoty v hnojivech mohou obsahovat Cd, Pb, Zn ad. Umělá hnojiva mohou mít acidifikační účinek na půdu a usnadnit tím např. mobilizaci kadmia a jeho dostupnost pro rostliny. Z pesticidů mohou unikat Cu, As, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni, Zn ad. může být kontaminována půda při nevhodném zacházení s čistírenskými kaly. Z hnoje může být uvolňován Zn, Cu a As, které jsou (nebo v případě As byly v minulosti) přidávány zvířatům do potravy pro lepší trávení. Zajímavým a často opomíjeným zdrojem znečištění může být v tomto případě také koroze kovových předmětů, jako jsou pozinkované střechy, drátěné ploty ap., jež mohou být zdrojem Zn a Cd.

Spalování fosilních paliv i přes veškerá prováděná technologická vylepšení představuje jeden z nejrozsáhlejších zdrojů kontaminace. Na rozdíl od ostatních uváděných zdrojů dochází při spalování fosilních paliv k emisi plynů obsahujících širokou škálu kovů (Pb, Cd, Cr, Zn, As, Sb, Se, Ba, Cu, Mn, U, V), ačkoli ne všechny se vyskytují ve všech typech paliv a některé z nich jsou obsaženy pouze v minimálním množství. Znečištění olovem pocházelo v minulosti v největší míře právě z automobilového provozu, neboť do pohonných hmot byla přidávána olovnatá aditiva. V České republice je prodávání, vydávání a používání olovnatých benzinů zakázáno od 1.1.2001 dle zákona 107/2007 Sb. (v aktualizovaném znění).

Při nakládání s odpady (ať už s odpadem domovním, průmyslovým či dalším) hrozí největší znečištění těžkými kovy v okolí skládek, pokud nejsou dostatečně zajištěny. V takových případech je zde velké riziko úniku hlavně Cd, Pb, Cu, Sn a Zn do půdy, podzemních vod a povrchových vod. Skládkové výluhy velmi často obsahují chloridové anionty a mnoho kovů tudíž může být přítomno v podobě chloridových komplexů, které bývají mobilnější a méně absorbovatelné oproti volným kovům. Spalování odpadů ve spalovnách bylo hlavně v minulosti (nebo je i v současnosti v případě starších zařízení) zdrojem kovových aerosolů, které následně při spadu znečišťují široké okolí, což může být zjištěno až s velkým časovým odstupem, kdy je již pozdě na preventivní opatření.¹⁸

2.4 Speciační analýza kovů

Speciační analýza obecně umožňuje určit, v jakých formách se vyskytují dané prvky ve zkoumaném vzorku, ať už se jedná o jednotlivé oxidační stavy prvku, organokovové sloučeniny se silnou kovalentní vazbou kov-uhlík nebo komplexy kovů charakterizované

koordinační vazbou prvek-ligand. Definice říká, že se jedná o stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku.¹⁹

Potřeba rozlišovat jednotlivé formy prvku vychází ze skutečností, že se tyto mohou lišit vlastnostmi jako je rozpustnost, extrahovatelnost různými rozpouštědly, rozdílná reaktivita s různými dalšími činidly.²⁰

A právě na tyto rozdílné vlastnosti je potřeba pamatovat při zjišťování celkové koncentrace daného prvku ve vzorku, neboť se může stát, že pro každou formu bude nutné zvolit samostatný analytický proces. Stejně tak je potřeba brát v úvahu skutečnost, že se jednotlivé formy mohou lišit svou biologickou přístupností pro různé organismy a každá forma prvku může poskytovat jinou reakci např. právě při testech ekotoxicity.

Při samotném procesu speciální analýzy jsou jednotlivé formy kovů extrahovány různými činidly dle zavedených postupů a následně je vhodnou analytickou metodou stanoven celkový obsah jednotlivých kovů v každé fázi extrakce. Pořadí a druh zvolených extrakčních činidel vždy závisí na sledovaných cílech a na fyzikálních charakteristikách zkoumaného vzorku.

Většina schémat sekvenčních extrakcí (sequential extraction schemes – SES) sestává ze 3 až 8 kroků, při kterých jsou uplatňována postupně čím dál silnější extrakční činidla. Ačkoli konkrétní postupy a užitá chemikálie mohou být různé, v principu je možné jednotlivé frakce zjišťovaných kovů rozdělit do následujících pěti skupin: **frakce rozpustná ve vodě** (stopové prvky extrahovatelné H₂O bývají velmi labilní a mohou být tedy velmi biologicky dostupné), **iontově výměnná frakce** (kovy vázané na povrch pevných částic půdy slabými elektrostatickými silami, kovy které mohou být uvolněny iontově-výměnnými reakcemi a kovy, které mohou být vázány na karbonáty), **frakce rozpustná kyselinami** (vysrážené kovy či kovy vázané na karbonáty), **redukovatelná frakce** (kovy vázané na oxidy a hydroxidy Fe a Mn), **oxidovatelná frakce** (kovy vázané na organický materiál) a **reziduální frakce** (zbytková; např. kovy vázané na organický materiál, které se nepodařilo uvolnit). Právě kvůli reziduální frakci jsou zaváděny další SES, které obsahují více kroků a tyto nedostatky řeší. Na druhou stranu je málo pravděpodobné, že by frakce kovů unikající naší pozornosti v reziduální frakci byly biologicky dostupné a tedy pro ekotoxikologické účely podstatné.

Z možných extrakčních schémat je v poslední době nejvíce používáno schéma zavedené Tessierem *et al.* a schéma dle Bureau Communautaire de Référence (BCR), případně jejich modifikace. Původní Tessierovo schéma zahrnuje kromě analýzy vodou rozpustné frakce i analýzu všech pěti následujících. Oproti tomu BCR schéma neobsahuje extrakci vyměnitelné

frakce. BCR metoda není na rozdíl od Tessierovy natolik zatížena chybou způsobenou readsorpční.

Obě schémata používají stejná extrakční činidla, liší se ale v podmínkách, za jakých jsou prováděny extrakce (teplota a doba trvání jednotlivých extrakčních kroků). Nejvýraznější rozdíl mezi oběma schématy však leží v prvním kroku, respektive prvních dvou krocích. Teoreticky by frakce kovů získaná rozpouštěním kyselinou u BCR SES měla odpovídat frakcím získaným Tessier SES ve výměnné a kyselinami rozpustné frakci, některé z provedených srovnávacích pokusů však ukazují, že množství kovů vyextrahovaných v jednotlivých krocích se mohou lišit a i celková množství získaných kovů bývají mírně odlišná.²¹

2.5 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd

Dalšími důležitými faktory půdy, které mohou do určité míry ovlivňovat, zda je nebo není vhodná pro růst rostlin a život živočichů, je její pH a vodní kapacita (VPK, WHC – water holding capacity). To jsou charakteristiky půdy, které je potřeba brát v úvahu při vytváření modelových podmínek pro terestrické testy ekotoxicity. Rozdílné hodnoty pH půdy mohou ovlivňovat reakce zkoumaných znečišťujících látek a proto bývá pH standardní půdy upravováno na normovanou hodnotu, aby neovlivňovalo chování složek půdy, která je předmětem zkoumání a která je v koncentrační řadě se standardní půdou míchána.

Vodní kapacita půdy je množství vody v hmotnostních procentech, které je půda schopna zadržet. VPK nám umožňuje doplnit do půdních směsí takové množství vody, aby jí bylo testovacím organismům k dispozici relativně stejné množství (vztaženo na konkrétní vzorek půdy). Obecně hraje VPK nezanedbatelnou roli při zkoumání vhodnosti půd pro pěstování konkrétních druhů rostlin či chov půdních živočichů, např. při rekultivačních procesech.²²

Kromě pH a VPK je často zjišťován také celkový obsah uhlíku (který je součtem celkového organického – TOC – a anorganického uhlíku – TIC) a obsahy dusíku a fosforu či dalších živin. Nicméně tyto charakteristiky již není žádoucí jakkoliv upravovat, protože se jedná o přirozené vlastnosti půd.

3 Experimentální část

3.1 Charakteristika materiálu

3.1.1 Organismy

Organismy použité pro testy terestrické ekotoxicity vzorků byly roupice (*Enchytraeus crypticus*), chvostokok (*Folsomia candida*) a salát hlávkový, odrůda Safír (*Lactuca sativa capitata*)

Roupice pocházející z chovů výzkumného centra RECETOX v Brně byly před zavedením do testu kultivovány po delší dobu při doporučených podmínkách dle ČSN ISO 16387⁷ na umělé půdě používané v samotném testu (konkrétní složení viz níže).

Chvostokoci pocházejí z chovů ENVISAN-GEM, a.s., Praha. Záložní chovy jsou chovány na ztvrdlé směsi sádry a aktivního uhlí v poměru 10:1, před testem je nutné nechat dospělce naklást vajíčka, následně dospělce odstranit a poté, co se z vajíček vylíhnou juvenilové (asi 2 dny), je možné po cca 12 dnech použít tyto pro účely testů (dle příslušné SOP)¹¹.

V případě salátu se jednalo o semena SEMO, s.r.o., Smržice ČR, z nichž byla vybrána semena nepoškozená, přibližně stejné velikosti.

3.1.2 Vzorky zeminy

Vzorky kontaminované zeminy pochází z areálu společnosti Kovohutě Příbram nástupnická, a.s., společnosti recyklující odpady s obsahem olova, zpracovávající odpady s obsahem drahých kovů a elektroodpad, dále vyrábí olovo a jeho slitiny a výrobky z olova a cínu.

Byla provedena analýza celkového obsahu organického uhlíku (TOC), byla stanovena vodní kapacita vzorků půdy (VPK) a stanovena hodnota pH. Postup stanovení a zjištěné hodnoty jsou uvedeny v dalších kapitolách.

Obsah jednotlivých kontaminantů byl zjištěn metodou sekvenční extrakce s ICP-OES.

3.1.3 Umělé půda

Standardní půda byla připravena dle směrnice OECD 207 a ISO 11268-2²⁵ smísením 69 % hmotnostních křemenného písku (Stavebniny HOSANA, spol. s r.o.; pH = 6,03), 20 % hm. kaolinového jílu (České lupkové závody, a.s., Pecínov; pH = 5,31), 10 % hm. rašeliny (vysušené a přesáté přes 4mm síto; AGRO CS, a.s., Říkov; pH = 3,77) a 1 % hm. uhličitanu vápenatého CaCO₃ (Lachema, o.p.; Brno) pro úpravu celkového pH na 6±0,5. Pro dokonalé smísení jednotlivých přísad byla použita laboratorní míchačka po dobu pěti minut.

3.1.4 Použité chemikálie

uhličitan vápenatý $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ – Lachema, n.p., Brno (závod Neratovice)

hydroxylamin hydrochlorid $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ – Lachema, n.p., Brno (závod Neratovice)

kyselina octová CH_3COOH – Lachema, a.s., Brno

octan amonný $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ – Ing. Švec, Penta

peroxid vodíku H_2O_2 – Ing. Švec, Penta

chlorid vápenatý CaCl_2 – Ing. Švec, Penta

kyselina dusičná HNO_3 – Lachema, n.p., Brno (závod Neratovice)

ethanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ – Ing. Švec, Penta

kyselina fosforečná H_3PO_4 – Lachema, n.p., Brno (závod Neratovice)

bengálská červeň ($\text{C}_{20}\text{H}_2\text{Cl}_4\text{I}_4\text{Na}_2\text{O}_5$) – Dr. Kulich Pharma, s.r.o.

3.2 Metodika

3.2.1 Odběr a zpracování vzorků kontaminované půdy

1.10.2009 byly odebrány dva vzorky půdy označované nadále jako Vodárna (VOD) a Rampa (RAM). Místa odběru v areálu společnosti Kovohutě Příbram nástupnická, a.s. jsou uvedena v mapě.



Obr. 4: Přibližná místa odběru vzorků a jejich blízké okolí. RAM: N 49°42'31,7"; E 13°58'50,7" (modrá značka). VOD: N 49°42'32,7"; E 13°58'51,7" (červená značka). © <http://mapy.cz/>

K odběru vzorků byla použita lopatka a PE pytel jako vzorkovnice. V okamžiku odběru byla místní teplota vzduchu 16,3 °C, relativní vlhkost vzduchu 45 %, atmosférický tlak 1018,4 hPa, západní vítr 276° vanul rychlostí 3,7 m·s⁻¹. Barva vzorku byla tmavě šedohnědá až černá (viz Obr. 5 a Obr. 6).

V laboratoři byl vzorek vysušen při laboratorní teplotě a přesítován přes 4mm síto.



Obr. 5: Vzorek Rampa.



Obr. 6: Vzorek Vodárna.

3.2.2 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd

Stanovení celkového obsahu organického uhlíku (TOC) v půdě

Pro stanovení TOC je využíváno nepřímé metody, kdy je zjištěn celkový obsah uhlíku (TC) a následně celkový obsah anorganického uhlíku (TIC) ve vzorku. Hodnota TOC je pak zjištěna jako rozdíl TIC oproti TC ($TOC = TC - TIC$).²³

Pracovní postup

Množství TC bylo stanoveno spálením 50 mg jemně rozetřeného vzorku v proudu technického vzduchu při 850 °C a následně bylo zjištěno množství uvolněného oxidu uhličitého CO₂, které bylo převedeno na hmotnostní procenta. Použit byl přístroj LiquiTOC II (křemenná komora; Elementar, Německo).

Množství TIC bylo stanoveno následujícím způsobem: do kádinky bylo nalito 5 ml koncentrované kyseliny fosforečné H₃PO₄ a kádinka byla zakryta hodinovým sklíčkem a takto byla vytárována na analytických vahách. Do kádinky bylo následně přisypáno přibližně přesně 5,000 g jemně mletého vzorku a po odeznění reakce byla opět zjištěna hmotnost vzorku s přesností na 1 mg. Při reakci vzorku (respektive anorganického uhlíku vázaného ve

vzorku) s kyselinou dochází k uvolňování oxidu uhličitého CO₂, jehož množství bylo zjištěno z váhového úbytku vzorku. Výsledek je vyjádřen v hmotnostních procentech.²⁴

Stanovení vodní kapacity půdy (VPK)

Vodní kapacita standardní půdy i kontaminovaných půd byla stanovena dle SOP vypracované podle přílohy normy ISO 11268-2²⁵.

Pracovní postup

50 g vzorku bylo umístěno do předem zváženého kovového válce s vnitřním průměrem 5 cm a s jemným sítkem na dně. Poklepáním na válec došlo k sesednutí zeminy a válec byl umístěn do 1000 ml kádinky naplněné destilovanou vodou přibližně 0,5 – 1 cm nad výšku sloupce zeminy uvnitř válce.

Ve vodě byl vzorek ponechán po dobu 3 h. Následně byl přemístěn na povrch cca 20cm vrstvy písku (zrnitost písku přibližně 2 mm); povrch písku byl zakryt filtračním papírem, aby byla vlhkost odváděna. Po 2 h stání byl válec se zeminou zvážen. V 30min intervalech byl pak vážen opětovně do konstantní hmotnosti.

Válec se vzorkem byl vysušen do konstantní hmotnosti při teplotě 105 ± 5 °C a opětovně zvážen. Z naměřených hodnot byla vypočtena vodní kapacita půdy za využití vzorce

$$VPK = \frac{S - T - D}{D} \cdot 100 \%$$

kde S je hmotnost nasycené zeminy s válcem, T značí hmotnost válce a D je suchá hmotnost vzorku.

Celé měření bylo prováděno ve třech paralelních stanoveních pro každý vzorek půdy. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v kapitole 4.

Stanovení pH půdy

pH standardní i kontaminovaných půd bylo stanoveno dle normy ČSN ISO 10390²⁶.

Pracovní postup

Do uzavíratelných plastových zkumavek bylo odebráno 5 ml pevného vzorku půdy a následně byl přidán pětinašobek jeho objemu (25 ml) 0,01 M roztoku chloridu vápenatého CaCl₂. Uzavřené zkumavky byly umístěny do třepačky, kde byly třepány po dobu 5 min. Následně byly ponechány v klidu 1 h a poté bylo změřeno pH roztoku pH-metrem (WTW, MultiLine P4, Německo).

Měření bylo vždy prováděno ve třech stanoveních. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v kapitole 4.

3.2.3 Sekvenční extrakce

Sekvenční extrakce byla prováděna podle upraveného BCR SES²¹.

Pracovní postup

Všechny kroky byly prováděny ve dvou stanoveních jak pro umělé půdy tak pro vzorky kontaminované půdy.

1) Frakce rozpustná kyselinami

1 g vzorku zeminy (vysušené a přesíťované přes 4mm síto) byl v uzavíratelné sklenici smíchán s 40 ml 0,11M roztoku kyseliny octové CH_3COOH . Pevně uzavřené sklenice byly umístěny do třepačky a při laboratorní teplotě byly vzorky třepány po dobu 16 h.

Po uplynutí této doby byla suspenze přefiltrována přes papírový filtr a usazenina se nechala při laboratorní teplotě vysušit. Filtrát byl podroben analytické koncovce.

2) Redukovatelná frakce

Usazenina získaná na konci předchozího kroku byla kvantitativně převedena do uzavíratelné sklenice a přelita 40 ml 0,04M roztoku hydroxylamin hydrochloridu $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (pH bylo upraveno kyselinou dusičnou na hodnotu 2). Sklenice byly pevně uzavřeny, umístěny do třepačky a při laboratorní teplotě třepány po dobu 16 h.

Poté byla suspenze opět přefiltrována přes papírový filtr, filtrát byl analyzován a usazenina byla při laboratorní teplotě vysušena.

3) Oxidovatelná frakce

Usazenina z předchozího kroku byla z filtračního papíru kvantitativně převedena do Petriho misky, kde byla přelita 10 ml 30% peroxidu vodíku H_2O_2 . Petriho miska byla umístěna do sušárny vyhřáté na teplotu 85 °C, kde byla ponechána po dobu 1 h. Následně byl analyzovaný vzorek opět přelit 10 ml 30% H_2O_2 a znovu umístěn na 1 h do sušárny, kde byl ponechán při teplotě 85 °C.

Po vychladnutí byl vzorek přenesen do uzavíratelné sklenice a přelit 50 ml 1M roztoku octanu amonného $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Sklenice byla umístěna do třepačky a při laboratorní teplotě probíhalo třepání po dobu 16 h.

Poté byla suspenze opět přefiltrována přes papírový filtr a filtrát byl podroben analýze.

Jako analytická koncovka byla zvolena metoda emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), která byla provedena v laboratoři Kovohutě Příbram nástupnická, a.s.

3.2.4 Terestrické testy ekotoxicity

Test únikového chování s roupicemi

Prozatím není test únikového chování standardizován pro roupice jakožto pokusný organismus. Průběh testu je ovšem velmi podobný jako v případě využití žížal dle normy ISO 17512-1.²⁷

Pracovní postup

Testovány byly oba vzorky RAM i VOD a test byl prováděn vždy ve dvou paralelních stanoveních A a B.

Do označené 150ml kádinky byla vždy svisle zasunuta plastová přepážka rozdělující prostor na dvě poloviny. Jedna z polovin byla naplněna 20 g umělé půdy (váženo za sucha) vlhčené na 50 % VPK. Druhá polovina byla plněna 20 g směsí kontaminované půdy s umělou půdou v koncentrační řadě 0,0; 25,0; 50,0; 75,0 a 100,0 % hm. vzorku kontaminované půdy. (0% koncentrace kont. půdy sloužila jako kontrola a v takovém případě byly obě poloviny nádoby plněny umělou půdou.)

Smíchání standardní a kontaminované půdy dle daných hmotnostních poměrů a navlhčení bylo prováděno ve zvláštní nádobě. Teprve po uplynutí krátké doby, během níž došlo k homogenizaci vlhkosti, byla navlhčená půda přenesena do příslušné poloviny testovací nádoby.

Po naplnění obou polovin kádinky půdou byla plastová přepážka vyjmuta a na rozhraní obou typů půd bylo umístěno 10 ks dospělých roupic *Enchytraeus crypticus* rozeznatelných díky viditelnému opasku s vajíčky.

Roupice byly vybírány ze záložních chovů na standardní půdě stejně jako v případě výše zmíněného kontaktního testu s roupicemi. Drobné množství půdy obsahující roupice bylo rozplaveno destilovanou vodou na Petriho misce a požadovaný počet dospělých roupic byl háčkem přenesen do testovací nádoby.

Kádinky byly zakryty parafilmem a umístěny do kultivátoru, kde byly ponechány při teplotě $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ po dobu 48 h.

Po uplynutí této doby $\pm 0,5$ h byla kontaminovaná půdní směs (nebo jedna z polovin standardní směsi v případě kontrol) vždy vyjmuta z původní kádinky, přenesena do další označené 100ml kádinky a obě poloviny testované kombinace (kont. směs v nové kádince a stand. půda v původní kádince) byly zality ethanolem a vodou s přísadkou malého množství bengálské červeně pro obarvení takto usmrcených roupic. Po důkladném promíchání byly kádinky umístěny do lednice, kde byly ponechány déle jak 12 h.

Následující den byl zjišťován počet roupic v každé kádince. Tedy vždy v příslušné dvojici uměle kontaminovaná půda–kontaminovaná směs v celé koncentrační řadě v obou paralelních stanoveních A a B a u obou vzorků RAM i VOD.

Obsah jednotlivých kádinek byl rozplavován po malých dílech vodou na Petriho misce a roupice obarvené bengálskou červení byly ručně počítány.

Reprodukční test s roupicemi

Test vycházel z ČSN ISO 16387⁷.

Pracovní postup

Testy byly pro oba vzorky Rampa a Vodárna vždy prováděny ve dvou paralelních stanoveních označovaných jako A a B.

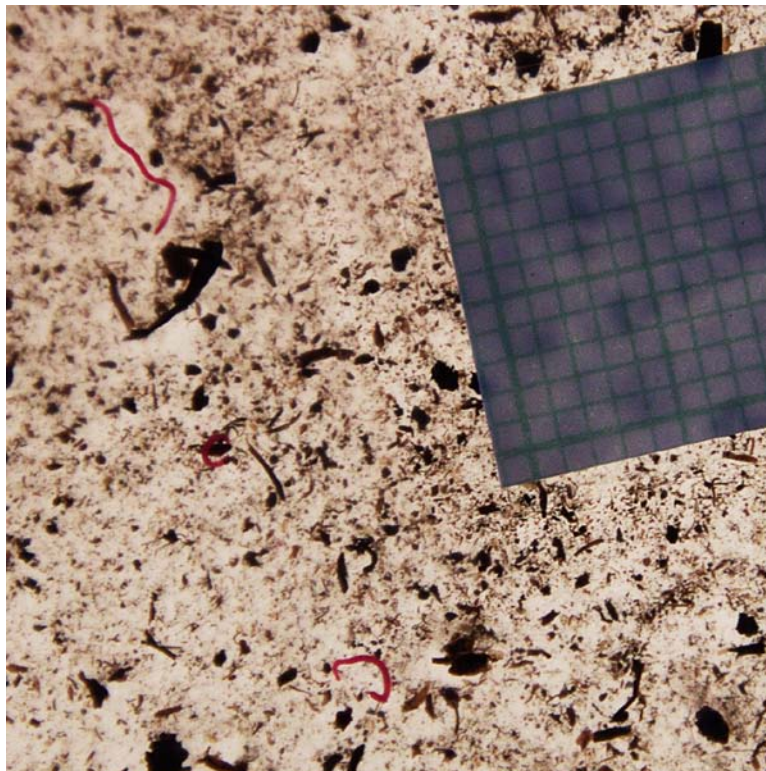
Do 100ml skleněných kádinek bylo naváženo 15 g důkladně promíchané směsi kontaminované a uměle kontaminované půdy (respektive pouze uměle kontaminovaná půda v případě kontrolních stanovení) v koncentrační řadě 0,0; 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 % hm. kontaminované půdy. Půdní směsi byly navlhčeny destilovanou vodou na 60 % VPK a opět důkladně promíchány a ponechány odstát po dobu cca 5 min, aby došlo k homogenizaci vlhkosti.

Na Petriho misku bylo přeneseno menší množství roupic *Enchytraeus crypticus* z chovu na standardní půdě, roupice byly rozplaveny destilovanou vodou a do každé kádinky obsahující 15 g testované–půdní směsi bylo nasazeno 10 ks dospělých jedinců se zřetelným opaskem obsahujícím vajíčka. Následně bylo přidáno malé množství potravy a celá kádinka byla zakryta parafilmem. Všechny kádinky byly poté zváženy na předvážkách s přesností na jedno desetinné místo a hmotnost každé byla zaznamenána. V pravidelných intervalech byly pak kádinky váženy a úbytek hmotnosti byl kompenzován doplněním destilované vody.

Testovací nádoby byly umístěny do kultivátoru a po dobu 4 týdnů udržovány při teplotě $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a světelné periodě 16/8 (světlo/tma). Pravidelně po 7 dnech byly nádoby zkontrolovány kvůli případnému úbytku vody a zároveň bylo přidáno krmivo. Protože z rozkládajících se roupic se uvolňuje amoniak, byly kádinky vždy ponechány po dobu několika minut odkryté, aby došlo k odvětrání. Dle potřeby byl vyměněn parafilm (v případě protržení, ke kterému může dojít samovolně).

28. den testu bylo do každé kádinky přidáno malé množství ethanolu (2 – 5 ml) pro usmrcení roupic, větší množství destilované vody (takové aby hladina byla cca 1 – 2 cm nad vrstvou testované směsi půd) a několik kapek roztoku bengálské červeně, která kontrastně zbarvila těla roupic. Po důkladném avšak opatrném promíchání kádinek byly tyto umístěny na dobu více jak 12 hodin do lednice.

Následující den byly roupice v každé kádince spočítány. Po malých dílech byla směs z kádinky vždy přelita do velké Petriho misky, rozplavena vodou a za využití plastového kapátka a lupy byly spočítány všechny viditelné roupice. Jejich rozeznání bylo umožněno právě obarvením bengálskou červení (viz Obr. 7).



Obr. 7: Roupice obarvené bengálskou červení pro jednodušší sčítání při vyhodnocování reprodukčního testu. Pro poměření je přiložen milimetrový papír. Výřez z původní fotografie.

Reprodukční test s chvostoskoky

Test vycházel z normy ISO 11267²⁸.

Pracovní postup

Testy byly pro oba vzorky Rampa a Vodárna vždy prováděny ve dvou paralelních stanoveních označovaných jako A a B.

Do 100ml skleněných kádinek bylo naváženo 30 g důkladně promíchané směsi kontaminované a umělé půdy (respektive pouze umělé půdy v případě kontrolních stanovení) v koncentrační řadě 0,0; 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 % hm. kontaminované půdy. Půdní směsi byly navlhčeny destilovanou vodou na 60 % VPK a opět důkladně promíchány a ponechány odstát po dobu cca 5 min, aby došlo k homogenizaci vlhkosti.

Ze synchronizovaného chovu (juvenilové staří 10-12 dní), umístěného v plastové krabici na směsi sádry a aktivního uhlí v poměru 10:1, bylo vybráno pomocí plastové odsávačky nebo

skleněné Pasteurovy pipety 10 jedinců roupic *Folsomia candida*; ti byli opatrně přeneseni na testovanou půdu.

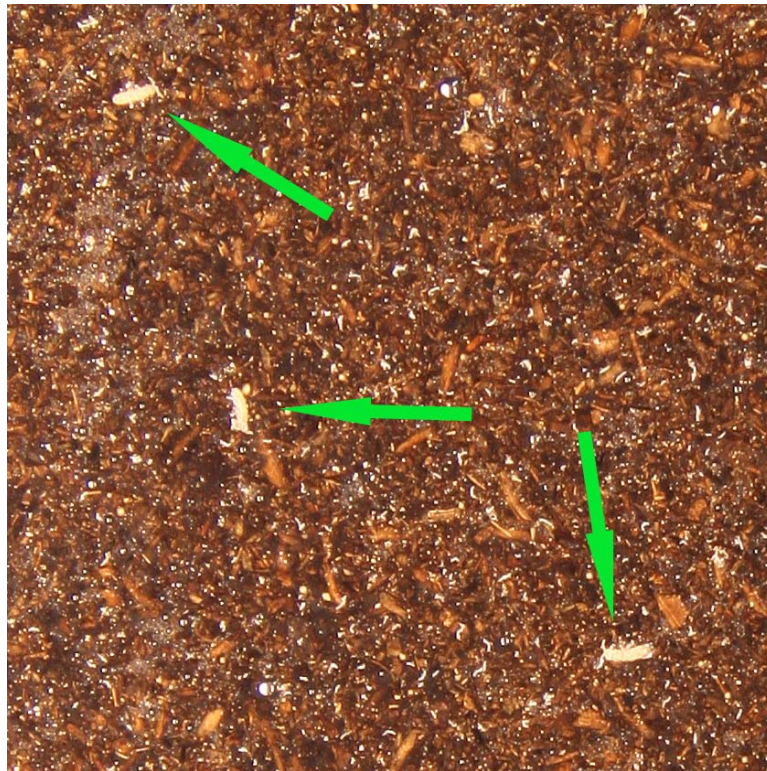
Následně byly přidány 2 mg drcených sušených kvasnic jako potrava. Kádinky byly zakryty parafilmem a každá zvlášť byla zvážena na předvážkách a její hmotnost zaznamenána.

Testovací nádoby byly umístěny do kultivátoru, kde byly uchovávány při teplotě $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a světelné periodě 16/8 hod (světlo/tma) po dobu 4 týdnů.

V pravidelných týdenních intervalech byla kontrolována hmotnost kádinek a případný úbytek vody byl doplněn destilovanou vodou. Ze stejného důvodu jako v případě roupic (tvorba amoniaku) byly kádinky odvětrávány. Zároveň bylo v týdenních či dvoutýdenních intervalech v případě potřeby dodáno nové krmení. V případě potřeby byl vyměněn parafilm.

28. den testu byly kádinky s testovanými půdními směsmi vyndány z kultivátoru a zality směsí černé tuše a vody. Po důkladném promíchání byla směs tuše a zeminy přelita do plastové misky, znovu důkladně promíchána, aby došlo k vyplavení chvostoků na hladinu (díky jejich nesmáčivosti) a hladina byla vyfotografována digitálním fotoaparátem (viz Obr. 8).

Digitální fotografie byly následně analyzovány za využití programu ImageTool, kde byli manuálně spočítáni jednotliví viditelní chvostokoci, zvlášť v každém stanovení.



Obr. 8: Dospělí chvostokoci na hladině směsi černé tuše a vody. Výřez z původní fotografie.

Test se salátem

Test vycházel z normy ISO 11269-1²⁹.

Pracovní postup

Testy byly pro oba vzorky Rampa a Vodárna vždy prováděny ve dvou paralelních stanoveních označovaných jako A a B.

Oproti výše zmíněné normě došlo ke snížení hmotnosti půdy a počtu semen v jednotlivých stanoveních, neboť množství vzorku již neumožňovalo provést test předepsaným způsobem.

Do průhledných plastových krabiček bylo naváženo 100 g důkladně promíchané směsi kontaminované a umělé půdy (respektive pouze umělá půda v případě kontrolních stanovení) v koncentrační řadě 0,0; 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 % hm. kontaminované půdy. Půdní směsi byly navlhčeny destilovanou vodou na 70 % VPK a opět důkladně promíchány a ponechány odstát po dobu cca 5 min, aby došlo k homogenizaci vlhkosti.

Semena salátu *Lactuca sativa*. se nechala předklíčit v Petriho misce na vlhkém filtračním papíru bez přístupu světla přibližně 36 h před použitím.

Následně byla do jamek vyhloubených do půdy kopistou (asi 1 cm hlubokých) zavedena předklíčená semínka salátu hlávkového, do každého stanovení bylo takto pinzetou vpraveno 7 semen v pravidelných rozestupech. Byla vybírána semena, jejichž kořínek byl dlouhý cca 1 – 2 mm.

Uzavřené krabičky s testovanými vzorky byly ponechány v klidu při laboratorní teplotě bez přístupu světla a bez jakéhokoli dalšího zásahu po dobu 120 h.

Po uplynutí 120 h byly krabičky otevřeny a za využití rozplavení zeminy vodou byla každá rostlina postupně opatrně vytažena, její kořínek byl očištěn od hlíny a v nataženém stavu změřen s přesností na 1 mm. Takto byly změřeny všechny kořínky všech testovaných rostlin.

3.2.5 Matematické zpracování výsledků

Pojem „hmotnostní koncentrace“ běžně užívaný v terestrických testech je shodný s termínem „hmotnostní procento“. Shodně jsou tedy obě veličiny označovány w .

Platnost reprodukčních testů

Výsledky reprodukčních testů jsou platné, jestliže 1) mortalita v kontrole nepřekročí v průměru 20 %;

2) variační koeficient pro reprodukční údaje kontrolního stanovení není vyšší než 50 %;

3) na konci určovací zkoušky je průměrný počet juvenilů v kontrole vyšší než 25 na jednu zkušební nádobu.⁷

Pokud by podmínky platnosti nebyly splněny pro jedno paralelní stanovení, může být vyloučeno. V případě, že by ani v jednom z kontrolních paralelních stanovení nebyly splněny podmínky pro platnost, celý test by byl prohlášen za neplatný.

Výpočet inhibice reprodukce a růstu

Pro výpočet inhibice reprodukce I posloužil vzorec:

$$I = \frac{x_{pk} - x_i}{x_{pk}} \cdot 100\%$$

x_{pk} značí aritmetický průměr počtu juvenilů roupic (resp. chvostoskoků) v kontrolních stanoveních;

x_i je počet juvenilů roupic (resp. chvostoskoků) v dané paralelce při dané hm. koncentraci vzorku půdy.

Inhibice délky kořene salátu v jednotlivých stanoveních oproti kontrolnímu stanovení byla spočítána stejně jako inhibice reprodukce v případě testů na živočiších, ovšem po provedení nezbytných statistických úprav.

Výpočet charakterizačních faktorů

Charakterizační faktory (CF) pro jednotlivé kovy jsou v současnosti již tabelované³⁰. Pokud chceme zjistit CF pro směsný odpad (v tomto případě zeminu), je jeho efekt (např. EC_{50}) porovnáván s efektem jiné látky – referenční. V případě charakterizačního modelu CML2001 je pro stanovení terestrické ekotoxicity referenční látkou 1,4-dichlorbenzen (1,4-DCB). Jeho hodnotám EC_{50} (uvedeným v Tab. 1) je přiřazena hodnota $CF = 1$.

Nepřímou úměrou byly poté vypočítány CF pro vzorky RAM a VOD pro jednotlivé organismy. Například CF pro vzorek RAM, testovaný na roupicích byl spočítán následovně:

$$CF(\text{RAM, roupice}) = \frac{EC_{50}(1,4\text{-DCB, roupice}) \cdot CF(1,4\text{-DCB})}{EC_{50}(\text{RAM, roupice})}$$

Tab. 1: Hodnoty EC_{50} 1,4-dichlorbenzenu pro roupice (*Enchytraeus crypticus*) a chvostoskoky (*Folsomia candida*) používané jako referenční při výpočtu charakterizačních faktorů. (Motejlová, H., Kočí V.; 2011)³¹

| organismus | EC_{50} (1,4-DCB) [mg/kg] |
|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Enchytraeus crypticus</i> | 287,3 |
| <i>Folsomia candida</i> | 129,9 |

3.3 Statistické zpracování dat

3.3.1 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd

Měření bylo vždy prováděno ve třech paralelních stanoveních, z nichž byla výsledná hodnota získána jako aritmetický průměr.

3.3.2 Testy únikového chování s roupicemi

Test byl prováděn ve dvou paralelních stanoveních, jejichž výsledky byly zpracovány jako aritmetický průměr. Test je pouze orientační a výsledky, které poskytuje, jsou zjevné z jednoduchého grafu.

3.3.3 Terestrické testy ekotoxicity s roupicemi a chvostoskoky

Směrodatná odchylka s a variační koeficient kontrolních stanovení CV byly vypočteny podle vzorců

$$s = k_n \cdot R ; \quad CV = \frac{s}{x_{pk}} \cdot 100 \%$$

kde k_n je koeficient tabelovaný pro daný počet stanovení n ($k_2 = 0,8862$) a R je rozpětí maximální a minimální změřené hodnoty;

x_{pk} značí aritmetický průměr počtu juvenilů roupic (resp. chvostoskoků) v kontrolních stanoveních.

Inhibice byla vypočtena pro každé paralelní stanovení zvlášť a získané hodnoty byly zpracovány v softwaru GraphPad Prism 5.01³², který poskytl hodnoty EC_{50} s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$.

3.3.4 Terestrický test se salátem

Z jednotlivých naměřených délek kořínků byl zjištěn aritmetický průměr L , směrodatná odchylka s a variační koeficient CV podle následujících vztahů:

$$L = \frac{\sum_{i=1}^k l_i}{k} ; \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (l_i - L)^2}{k-1}} ; \quad CV = \frac{s}{L} \cdot 100 \%$$

l_i značí délku jednotlivých kořínků, k je počet měření.

V případě, že $CV \geq 20 \%$, je možné vyloučit nejodlehlejší hodnotu, aby byl CV snížen pod 20 %.

Po této statistické úpravě byla spočítána inhibice délky kořene v jednotlivých stanoveních oproti kontrolnímu stanovení.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Fyzikálně-chemické charakteristiky půd

Stanovení celkového obsahu organického uhlíku (TOC) v půdě

Za využití postupu popsaného v oddíle 6.2.2 bylo zjištěno, že vzorky kontaminované půdy a standardní půdy obsahují následující množství organického uhlíku.

Tab. 2: Výsledky stanovení TOC u vzorků kontaminované půdy Rampa a Vodárna a standardní půdy.

| vzorek půdy | TOC [%] |
|-----------------|---------|
| RAM | 10,4 |
| VOD | 5,3 |
| standardní půda | 3,2 |

Stanovení vodní kapacity půdy (VPK)

Dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.2 byly zjištěny následující hodnoty VPK pro vzorky kontaminované půdy a standardní půdy.

Tab. 3: Výsledky měření VPK u vzorků kontaminované půdy Rampa a Vodárna a standardní půdy. U standardní půdy pro avoidance test byl použit jíl a rašelina od stejného výrobce avšak jiné kvality.

| vzorek půdy | VPK [%] |
|------------------------------------|---------|
| RAM | 46 |
| VOD | 44 |
| standardní půda pro avoidance test | 41 |
| standardní půda | 49 |

Stanovení pH půdy

Postupem uvedeným v kapitole 6.2.2 byly zjištěny hodnoty pH jednotlivých vzorků kontaminovaných půd a standardní půdy.

Tab. 4: Výsledky měření pH u vzorků kontaminované půdy Rampa a Vodárna a standardní půdy.

| vzorek půdy | pH |
|-----------------|------|
| RAM | 4,66 |
| VOD | 6,43 |
| standardní půda | 6,29 |

Protože hodnoty VPK i TOC jsou v případě vzorku RAM příznivější pro organismy než v případě vzorku VOD, je možné, že tyto charakteristiky budou podporovat nebo naopak mírně tlumit vliv kontaminantů – těžkých kovů – v půdních vzorcích, pokud budeme vztahovat tento vliv na hodnotu EC₅₀.

4.2 Výsledky sekvenční extrakce – získaná data

V následujících tabulkách jsou uvedeny zjištěné obsahy těžkých kovů pro oba vzorky a standardní půdu. Pro zajímavost jsou uvedena také množství zjištěná z jednotlivých částí

sekvenční extrakce, neboť (jak již bylo zmíněno výše) biologicky dostupné nemusí být veškeré množství kovů v půdě obsažených, ale např. pouze slaběji vázané formy. Pro určitý typ organismu tak mohou hrát roli pouze kovy, které jsme schopni vyextrahovat již v první fázi extrakce, pro jiný typ organismu mohou být zásadní i všechny další silněji vázané frakce.

Tab. 5: Obsahy kovů ve vzorku Rampa zjištěné sekvenční extrakcí s ICP-OES. Hodnoty ^d jsou velmi blízko dolní mezi stanovitelnosti.

| RAM [mg/kg] | Al | Mn | Ni | Cu | Zn | As | Cd | Sn | Sb | Pb | součet |
|--------------------------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------------|------------|------------------|-------------|--------------|
| 1) frakce rozpustná kyselinami | 25,3 | 4,4 | 0,2 | 0,3 | 10,0 | 0,0 | 0,1 ^d | 0,0 | 0,0 ^d | 6,6 | 46,9 |
| 2) redukovatelná frakce | 48,2 | 1,7 | 0,1 | 0,2 | 4,1 | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 9,0 | 63,7 |
| 3) oxidovatelná frakce | 29,2 | 0,6 | 0,1 | 0,8 | 1,6 | 0,2 | 0,0 ^d | 0,0 | 0,0 ^d | 4,5 | 37,0 |
| součet | 102,7 | 6,7 | 0,3 | 1,3 | 15,7 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 20,1 | 147,5 |

Tab. 6: Obsahy kovů ve vzorku Vodárna zjištěné sekvenční extrakcí s ICP-OES.

| VOD [mg/kg] | Al | Mn | Ni | Cu | Zn | As | Cd | Sn | Sb | Pb | součet |
|--------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| 1) frakce rozpustná kyselinami | 1,6 | 4,7 | 0,1 | 0,3 | 23,2 | 0,4 | 0,5 | 0,0 | 0,3 | 13,9 | 44,8 |
| 2) redukovatelná frakce | 21,4 | 16,0 | 0,1 | 0,3 | 15,9 | 1,2 | 0,3 | 0,0 | 0,2 | 70,0 | 125,3 |
| 3) oxidovatelná frakce | 3,6 | 1,0 | 0,0 | 2,6 | 2,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 43,0 | 53,5 |
| součet | 26,6 | 21,6 | 0,2 | 3,2 | 41,9 | 1,6 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 126,8 | 223,6 |

Tab. 7: Obsahy kovů ve standardní půdě zjištěné sekvenční extrakcí s ICP-OES. Hodnoty ^d jsou velmi blízko dolní mezi stanovitelnosti.

| stand. půda [mg/kg] | Al | Mn | Ni | Cu | Zn | As | Cd | Sn | Sb | Pb | součet |
|--------------------------------|------------|------------|------------------|------------|------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| 1) frakce rozpustná kyselinami | 0,5 | 0,3 | 0,0 ^d | 0,1 | 0,2 | 0,0 ^d | 0,0 ^d | 0,0 | 0,0 | 0,0 ^d | 1,1 |
| 2) redukovatelná frakce | 2,8 | 0,3 | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 ^d | 0,0 | 0,0 | 0,0 ^d | 0,1 | 3,7 |
| 3) oxidovatelná frakce | 0,8 | 0,1 | 0,0 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,0 ^d | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 1,6 |
| součet | 4,1 | 0,6 | 0,1 | 0,4 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,6 | 6,4 |

Při bližším pohledu na získaná data je vidět, že ve vzorcích je největší množství Al, Mn, Zn a Pb. Avšak při pohledu do tabulky obsahů kovů ve standardní půdě zjistíme, že hliník je přítomen v relativně velké míře i přirozeně, tudíž se vůči němu dá u organismů očekávat vyšší míra tolerance. Vysoký obsah Pb v půdě je pro průmyslové oblasti zcela typický.

Naopak některé kovy jsou přítomny v minimálním množství, které je používaná metoda schopna zachytit. V případě As si je však potřeba uvědomit, že se jedná o těkavý prvek, jehož koncentrace v půdě (či v nesprávně skladovaných vzorcích) může s časem klesat.

Již z pouhých součtů celkových množství těžkých kovů zjištěných sekvenční extrakcí se dá odhadnout, že vzorek VOD bude obecně toxickejší, než vzorek RAM. V předchozím oddíle navíc již bylo naznačeno, že i fyzikálně-chemické parametry půd mluví ve prospěch vzorku

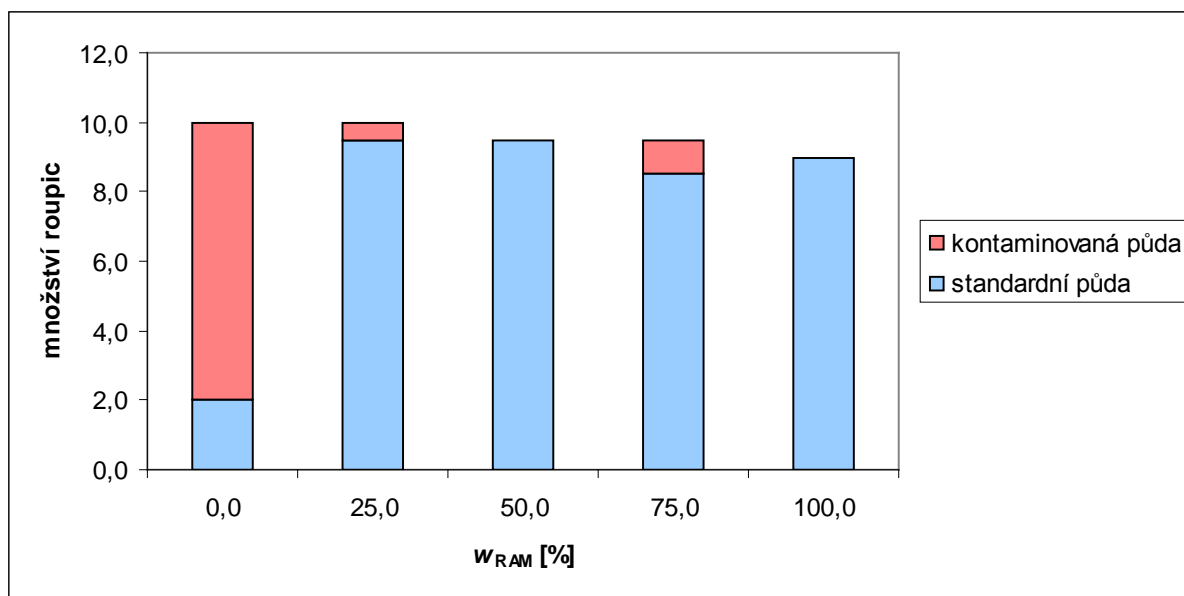
RAM.. Tato skutečnost byla poté ověřena všemi provedenými testy, jak bude vidět z následujících výsledků.

4.3 Test únikového chování s roupicemi

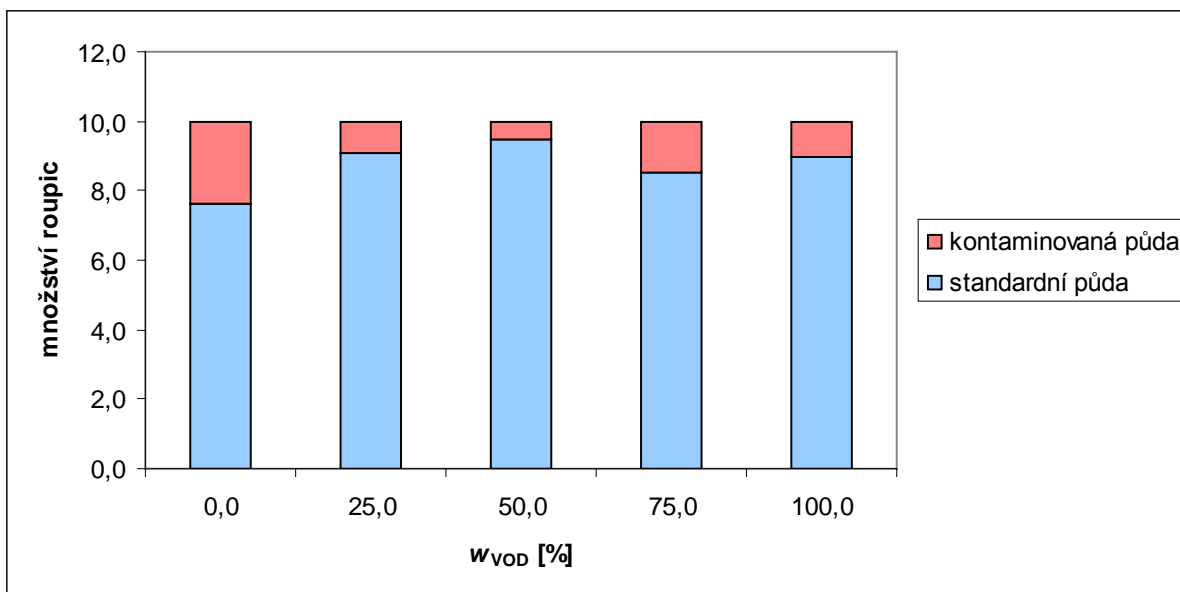
Test únikového chování sloužil pouze jako rychlý screeningový test, který umožnil orientačně stanovit toxicitu vzorků.

Tab. 8: Výsledky testu únikového chování roupic *Enchytraeus crypticus* pro vzorek Rampa a Vodárna. Počet roupic v první polovině nádoby naplněné standardní půdou a v druhé polovině naplněné kontaminovanou půdou – vzorkem (resp. pouze identickými standardními půdami v případě kontrolního stanovení).

| w_{kp} [%] | RAM | | VOD | |
|--------------|-----------|----------|-----------|----------|
| | stand. p. | kont. p. | stand. p. | kont. p. |
| 0 | 2,0 | 8,0 | 7,6 | 2,4 |
| 25 | 9,5 | 0,5 | 9,1 | 0,9 |
| 50 | 9,5 | 0,0 | 9,5 | 0,5 |
| 75 | 8,5 | 1,0 | 8,5 | 1,5 |
| 100 | 9,0 | 0,0 | 9,0 | 1,0 |



Graf 1: Výsledky testu únikového chování roupic *Enchytraeus crypticus* pro vzorek Rampa.



Graf 2: Výsledky testu únikového chování roupic *Enchytraeus crypticus* pro vzorek Vodárna.

Z výsledků testu plyne skutečnost, že oba vzorky jsou velmi toxické, neboť již při koncentraci 25 % hm. kontaminované půdy ve směsi se výrazně uplatňuje únikové chování roupic – většina preferuje standardní půdu. Hodnoty EC₅₀ tedy můžeme očekávat relativně nízké. Mezi únikovým chováním roupic v jednotlivých koncentracích vzorků ve směsi není vidět žádný signifikantní rozdíl.

V kontrolním stanovení by rozdělení roupic mělo být náhodné, tedy průměrně rovnoměrné v celé kádince. Jedná se však o jev, který není možné ověřit na 4 paralelních stanoveních. Použitá paralelní stanovení tedy slouží pouze ke kontrole testovacích podmínek a skutečnost, že distribuce roupic mezi jednotlivými polovinami kádinky není rovnoměrná, není důvodem ke znevažení výsledků testu.

Důvodem by naopak mohla být skutečnost, že doposud nebyly detailně prozkoumány fototaktické pohyby roupic a obecně jejich citlivost na světlo, která může při nevhodném umístění kádinek do kultivátoru určitou roli v distribuci sehrát. Tento problém je dán nedostatečnou pokročilostí metody a poskytuje prostor pro další výzkum a zdokonalování.

Během provádění testu na VOD byl zjištěn jev, kdy téměř všechny dospělé roupice byly po skončení testu fragmentovány na mnoho drobných kousků. Důvod tohoto jevu není znám, avšak na vypovídací hodnotě testu nic nemění. Jejich počet se musel rovnat celkovému množství 10 dospělých roupic. Množství fragmentů byla tedy přepočítána na podíly, tak aby součet podílů v obou polovinách kádinky vždy dával dohromady 10.

V některých stanoveních nebyly při vyhodnocování nalezeny všechny původně nasazené roupice, jelikož nemusí v ojedinělých případech dojít k jejich obarvení bengálskou červení nebo mohou být přehlédnuty vlivem chyby lidského faktoru.

4.4 Výsledky terestrických testů ekotoxicity

Samotné stanovení ekotoxicity probíhalo testováním inhibice reprodukce při různých hmotnostních koncentracích kontaminované půdy v celkové půdní směsi.

Reprodukční test s roupicemi *Enchytraeus crypticus*

Tab. 9: Hodnoty inhibice *I* reprodukce roupic pro vzorky Rampa a Vodárna při různých hmotnostních koncentracích *w* kontaminované půdy v celkové směsi.

| <i>w_{kp}</i> [%] | <i>I</i> [%] | |
|---------------------------|--------------|-----|
| | RAM | VOD |
| 0,0 | 0 | 0 |
| 12,5 | 52 | 48 |
| 25,0 | 49 | 62 |
| 50,0 | 65 | 92 |
| 75,0 | 94 | 96 |
| 100,0 | 100 | 99 |

Tab. 10: Hodnoty *EC*₅₀ pro inhibici reprodukce roupic.

| | RAM | VOD |
|--|--------------|---------------|
| <i>EC</i> ₅₀ [% hm.] | 16,47 | 14,82 |
| interval spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) [% hm.] | 9,27 - 29,26 | 12,74 - 17,24 |

Výsledky v Tab. 10 nám říkají, že již při 16,47 % hm. (RAM) či 14,82 % hm. (VOD) je rozmnožovací schopnost roupic potlačena na polovinu. Vzorek Rampa se jeví být méně toxickým (jeho hodnota *EC*₅₀ je vyšší, než hodnota *EC*₅₀ vzorku Vodárna) pro roupice. Grafické znázornění poskytuje Graf 3.

Hodnoty variačních koeficientů pro kontrolní stanovení jsou 9,85 % (RAM) a 1,70 % (VOD).

Reprodukční test s chvostoskoky *Folsomia candida*

Tab. 11: Hodnoty inhibice *I* reprodukce chvostoskoků pro vzorky Rampa a Vodárna při různých hmotnostních koncentracích *w* kontaminované půdy v celkové směsi.

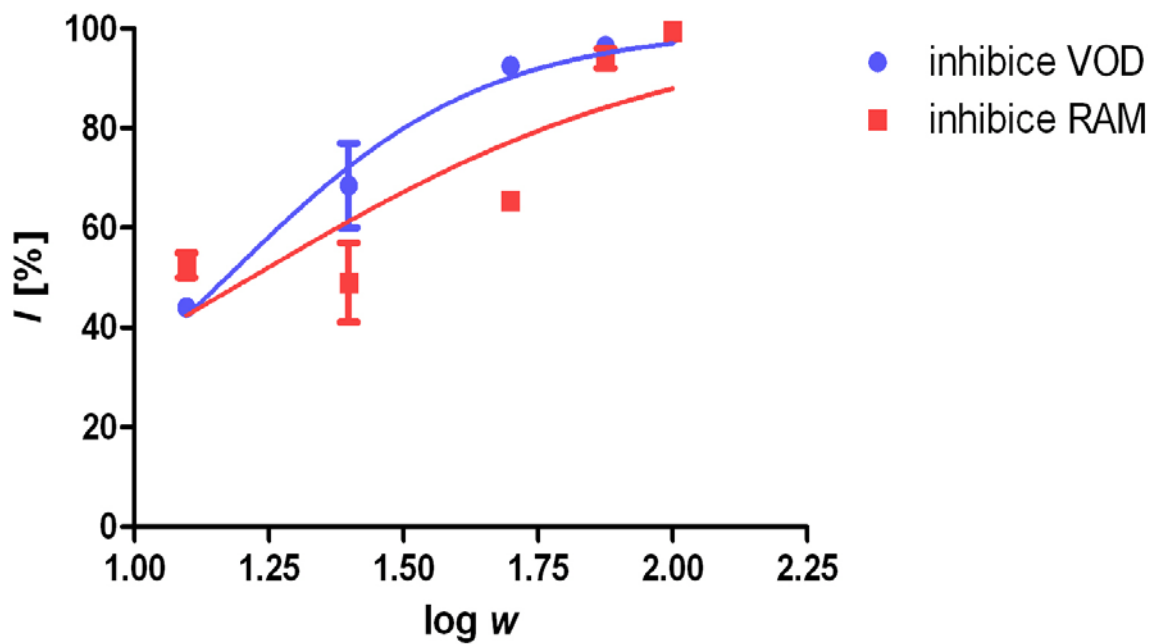
| <i>w_{kp}</i> [%] | <i>I</i> [%] | |
|---------------------------|--------------|-----|
| | RAM | VOD |
| 0,0 | 0 | 0 |
| 12,5 | 27 | 22 |
| 25,0 | 46 | 60 |
| 50,0 | 67 | 74 |
| 75,0 | 78 | 84 |
| 100,0 | 85 | 94 |

Tab. 12: Hodnoty EC₅₀ pro inhibici reprodukce chvostoskoků.

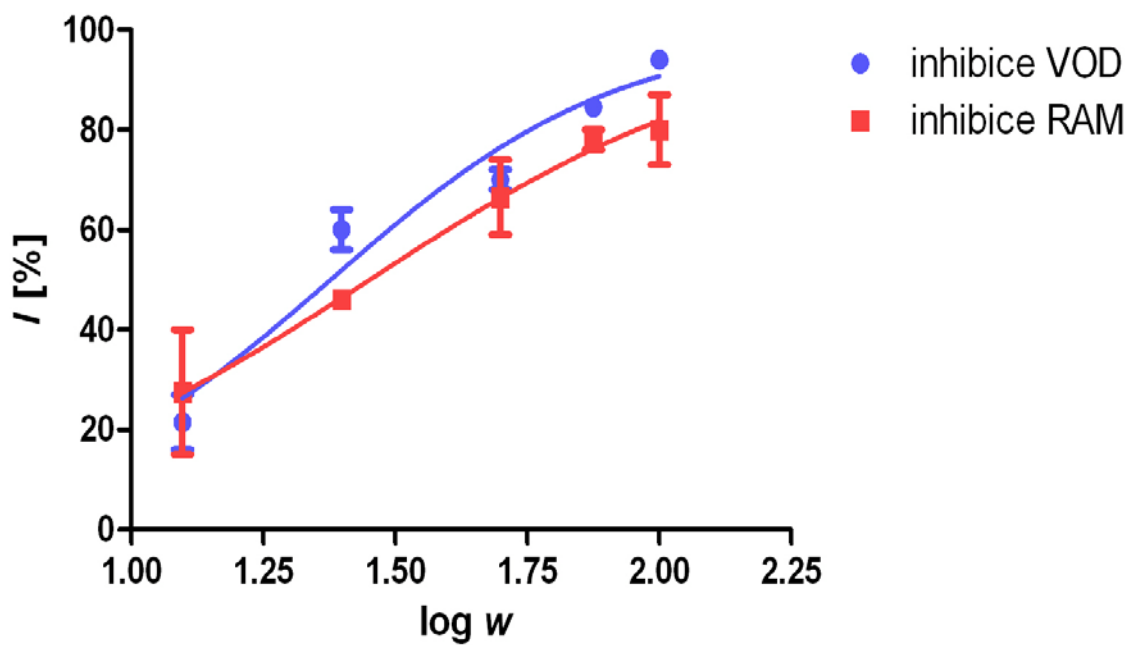
| | RAM | VOD |
|--|---------------|---------------|
| EC₅₀ [% hm.] | 28,25 | 23,85 |
| interval spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) [% hm.] | 21,72 - 36,74 | 19,71 - 28,84 |

Z hodnot EC₅₀ v Tab. 12 je zřejmé, že toxicita vzorku VOD je pro chvostoskoky vyšší stejně jako v případě roupic. Interval spolehlivosti by se na první pohled mohl zdát široký, avšak je potřeba si uvědomit, že se jedná o testy na živých organismech, jejichž odezvy není možné kalibrovat či standardizovat. Kromě toho je odezva organismů dána také celou řadou dalších okolností, které nejsou zmiňovány (např. podmínky panující v kultivátoru) nebo které jsou opomenuty či vůbec nejsou známy. Grafické znázornění poskytuje Graf 4.

Hodnoty variačních koeficientů pro kontrolní stanovení jsou 12,56 % (RAM) a 8,60 % (VOD).



Graf 3: Závislost inhibice reprodukce *I* roupic na logaritmu hmotnostní koncentrace kontaminované půdy $\log w$.



Graf 4: Závislost inhibice reprodukce *I* chvostoskoků na logaritmu hmotnostní koncentrace kontaminované půdy $\log w$.

Terestrické testy se salátem *Lactuca sativa*

Tab. 13: Hodnoty průměrné délky *L* kořenů salátu z jednotlivých paralelních stanovení společně s průměrnými variačními koeficienty *CV* a průměrnými inhibicemi *I* růstu kořene při různých hmotnostních koncentracích *w* kontaminované půdy ve směsi.

| w_{kp} [%] | RAM | | | VOD | | |
|----------------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|
| | L [cm] | CV[%] | I[%] | L [cm] | CV[%] | I[%] |
| 0,0 | 3,18 | 22,65 | 0,00 | 3,30 | 23,70 | 0,00 |
| 12,5 | 3,00 | 33,24 | 5,43 | 2,24 | 52,63 | 32,09 |
| 25,0 | 3,26 | 20,56 | -2,57 | 2,56 | 40,24 | 22,36 |
| 50,0 | 2,55 | 39,93 | 19,41 | 2,20 | 34,90 | 33,28 |
| 75,0 | 1,65 | 73,98 | 48,04 | 2,06 | 44,15 | 37,71 |
| 100,0 | 2,28 | 49,39 | 28,09 | 2,21 | 42,85 | 33,06 |

Hodnoty uvedené v Tab. 13 jednoznačně ukazují, že test provedený na salátu nemá vypovídací hodnotu. Aby mohl být test uznán, variační koeficient pro žádné paralelní stanovení při žádné hmotnostní koncentraci nesmí překročit 20 % (ani po vyloučení jedné odlehle hodnoty). V tomto případě však variační koeficienty překračují nejvyšší povolenou mez ve všech případech. Pro lepší představu byly do tabulky zahrnuty i inhibice růstu kořene, kde je sice naznačen mírný nárůst, který byl očekáván na základě testů s živočichy. V případě 75% koncentrace vzorku ve směsi je však vždy inhibice větší než v případě 100% koncentrace. Stejně tak je možné pozorovat i další extrémní odchylky od předpokládaného průběhu (např. stimulace při 25% koncentraci u RAM).

Celý test byl opakován, aby byly vyloučeny možné vlivy na růst rostlin. Bylo ovšem prokázáno, že velikost krabičky, v níž je test prováděn, ani počet rostlin použitých pro každé stanovení, ani mírné odchylky od doporučeného vlhčení nemají na stanovení vliv a hodnoty variačních koeficientů vždy vedou k diskvalifikaci testu. Další opakování testu (s novou koncentrační řadou s menším krokem ve vyšších hodnotách), které by za normálních okolností proběhlo, již nebylo možné kvůli nedostatku vzorku a času.

Příčiny zjištěných výsledků se nepodařilo objasnit. Bylo proto rozhodnuto o vyloučení testu z baterie. Hodnoty EC₅₀ nebyly zjišťovány, neboť jejich vypovídací hodnota by byla minimální.

Z obou testů vyplývá, že ekotoxicita vzorků Vodárna je vyšší oproti toxicitě vzorku Rampa. Pokud mluvíme pouze o ekotoxicitě, je evidentní, že za rozdíl mohou odlišné koncentrace těžkých kovů. K vyšší celkové příznivosti prostředí pro život organismů v případě RAM ovšem jednoznačně přispívá i vyšší hodnota TOC a VPK.

4.5 Charakterizační faktory

Dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.5 byly spočítány charakterizační faktory pro oba vzorky a vždy pro oba organismy.

Tab. 14: Charakterizační faktory vzorku Rampa a Vodárna v jednotkách ekvivalentu 1,4-dichlorbenzenu.

| CF [1,4-DCB-eq] | RAM | VOD |
|-------------------------------------|------------|------------|
| <i>Enchytraeus crypticus</i> | 17,44 | 19,39 |
| <i>Folsomia candida</i> | 4,60 | 5,45 |

Aby bylo možné přiblížit si míru toxicity vzorků, která je vyjádřena právě charakterizačním faktorem, jsou níže uvedeny CF jednotlivých těžkých kovů zjištěných v půdě.⁵

Tab. 15: Charakterizační faktory kovů zjištěných v půdě v jednotkách ekvivalentu 1,4-dichlorbenzenu. Pro Al a Mn nejsou CF v metodice CML2001 doposud stanoveny.⁵

| | Al | Mn | Ni | Cu | Zn | As | Cd | Sn | Sb | Pb |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CF [1,4-DCB-eq] | - | - | 240,00 | 14,00 | 25,00 | 3300,00 | 170,00 | 30,00 | 1,30 | 33,00 |

Chybějící data pro Al a Mn mohou závažně ovlivnit celkové výsledky studií LCA. Tab. 5 a Tab. 6 ukazují, že jejich obsahy v půdě jsou značné a proto by pro úplné posouzení životního cyklu zkoumaných vzorků bylo potřeba dodatečně jejich CF stanovit.

V současné době je v LCA k těžkým kovům v půdě přístupováno způsobem, kdy jsou jejich CF sečteny v poměrech, v jakých jsou jejich celkové obsahy (zjištěné úplnou mineralizací) ve vzorku. Takový přístup ovšem nezohledňuje fakt, že nejpevněji vázané frakce kovů nejsou biologicky dostupné; i slaběji vázané frakce mají ale rozdílnou biodostupnost, neboť nemusí docházet k jejich kompletnímu uvolňování. Další chybou tohoto postupu je zanedbání synergických a antagonických vztahů mezi všemi složkami půdy (např. mezi kovy a organickými látkami, které samy o sobě mohou být také považovány za kontaminanty), jež opět vedou k rozdílné míře dostupnosti. Proti použití terestrických ekotoxikologických testů však hovoří jejich časová a tudíž finanční náročnost.

CF, které byly zjištěny pro RAM a VOD tak necharakterizují pouze sumu kovů, která je v těchto vzorcích obsažená a která je hlavním kontaminantem. Vyjadřují celkovou příznivost či nepříznivost půd pro život. Na této vlastnosti se podílejí všechny látky obsažené ve vzorcích společně s fyzikálně-chemickými parametry půd jako VPK, pH, TOC, množství dalších živin (N, P) a celkové složení půdy (množství písků, jílu atd.).

Z tohoto hlediska je velmi nešťastné, že nemohly být stanoveny CF také pro salát, neboť odpadní zeminy jsou často využívány na povrchu půdy pro sanační a rekultivační účely. Zde by bylo samozřejmě velmi užitečné umět odhadnout osud vysazovaných rostlin.

Odhadem ze získaných CF vzorků a tabelovaných hodnot CF jednotlivých kovů je možné očekávat, že směs kovů v reálné matrici má celkově menší ekotoxicitu pro terestrické prostředí oproti předpokladům. Výsledky LCA studií tak pravděpodobně v současnosti nadhodnocují skutečný vliv těžkých kovů na terestrické životní prostředí.

Charakterizační faktory získané pro jednotlivé organismy by v metodě LCA byly následně sjednoceny vždy pro daný vzorek, přepočítány na výsledky indikátorů kategorie dopadu (v tomto případě terestrická ekotoxicita) a výsledky by byly dále zpracovávány potřebným způsobem. Tato činnost však již svým rozsahem přesahuje rámec této bakalářské práce a proto není zahrnuta.

Předmětem další vědecké činnosti by mohlo být porovnávání dat získaných analýzou reálných matric a dat získaných výpočtem. V případě zjištění významného rozdílu mezi oběma metodami je možné postupné vytvoření zcela nové metodiky.

5 Závěr

Na základě terestrických reprodukčních testů na testovacích organismech *Enchytraeus crypticus* a *Folsomia candida* byly stanoveny hodnoty EC₅₀ (Tab. 10 a Tab. 12) pro dva vzorky průmyslových půd získaných z areálu společnosti Kovohutě Příbram nástupnická, a.s., u nichž byla zjištěna kontaminace těžkými kovy (Tab. 5 a Tab. 6). Z hodnot EC₅₀ byly vypočítány charakterizační faktory (Tab. 14) v jednotkách ekvivalentu 1,4-dichlorbenzenu, které dále budou sloužit pro dokončení posuzování životního cyklu směsi kovů v reálné matrici.

Vzorek Vodárna je toxičtější než vzorek Rampa. Roupice *Enchytraeus crypticus* jsou vůči zkoumaným kontaminantům citlivější než chvostoskoci *Folsomia candida*.

6 Literatura

-
- ¹ Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, v platném znění.
- ² Vyhláška MŽP a MZ č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, v platném znění.
- ³ Kočí, V.; Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy* **100**, 882-888 (2006)
- ⁴ Kočí, V.; *Posuzování životního cyklu - Life cycle assessment – LCA*. Chrudim, Ekomonitor 2009
- ⁵ Guinée, J. B. et al.; *Life cycle assessment. An operational guide to the ISO standards*. Leiden, Leiden University 2001
- ⁶ Kočí, V.; *Příručka základních informací o posuzování životního cyklu*. Praha, VŠCHT Praha 2010
- ⁷ ČSN ISO 16387:2010 *Kvalita půdy – Vliv znečišťujících látek na Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Stanovení vlivu na reprodukci a na přežití*.
- ⁸ Priessnitz, J.; *Testy unikového chování v půdní ekotoxikologii*. MU Brno, Recetox 2008
- ⁹ Krogh, P. H.; Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. *Danish ministry of the environment – Environmental agency* (2009)
- ¹⁰ Crouau, Y.; Cazes, L.: What causes variability in the *Folsomia candida* reproduction test? *Applied soil ecology* **22**, 175 – 180 (2003)
- ¹¹ SOP 10 (Test toxicity s akutní a chronickou expozicí vůči chvostoskoku *Folsomia candida*.); VŠCHT Praha, 2010
- ¹² Slavík, B.; Štěpánková, J.; *Květena české republiky 7*. Praha, Academia 2004
- ¹³ Lanno, R.; Wells, J.; Conder, J.; Bradham, K; Basta, N.: The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and environmental safety* **57**, 39 – 47 (2004)
- ¹⁴ Kočí, V.; Mocová, K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha, VŠCHT Praha 2009
- ¹⁵ Amorim, M. J. B.; Novais, S.; Römbke, J.; Soares, A. M. V. M.: Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): Effects of different exposure time and soil properties. *Environmental pollution* **155**, 112 – 116 (2008)
- ¹⁶ Kobetičová, K.; Hofman, J.; Holoubek I.: Ecotoxicity of wastes in avoidance tests with *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Waste management* **30**, 558 – 564 (2010)

-
- ¹⁷ Komínková, D.; *Ekotoxikologie*. Praha, Česká technika – nakladatelství ČVUT, 2008
- ¹⁸ Alloway, B. J. *et al.*; *Heavy metals in soils, second edition*. Glasgow, Blackie Academic and Professional 1995
- ¹⁹ Rychlovský, P.; *Moderní analytické metody v geologii. Prvková analýza a speciace*. Praha, VŠCHT Praha 2008
- ²⁰ Koplík, R.; Čurdová, E.; Mestek, O.: Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. *Chemické listy* **91**, 38 – 47 (1997)
- ²¹ Filgueiras, A. V.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *Journal of environmental monitoring* **4**, 823 – 857 (2002)
- ²² Piedallu, Ch.; Gégout, J.-C.; Bruand, A.; Seynave, I.: Mapping soil water holding capacity over large areas to predict potential production of forest stands. *Geoderma* **160**, 355-366 (2011)
- ²³ Klouda, P.; *Moderní analytické metody*. Ostrava, Nakladatelství Pavel Klouda 2003
- ²⁴ Janků, J.: *Analytika odpadů*. Praha, VŠCHT Praha 2002
- ²⁵ ISO 11268-2:1998 *Soil quality: Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida), Part 2: Determination of effects on reproduction*.
- ²⁶ ČSN ISO 10390:1994 *Kvalita půdy – Stanovení pH*.
- ²⁷ ISO17512-1:2008 *Soil quality – avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – part 1: test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*.
- ²⁸ ISO 11267:1999 *Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida) by soil pollutants*.
- ²⁹ ISO 11269-1:1993 *Soil quality: Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth*.
- ³⁰ Oers, L. *et al.*; *Handbook on LCA – Annex spreadsheet: Characterization factors*. Leiden, Leiden University 2010
- ³¹ Motejlová, H.; Kočí, V.: Application of 1,4-dichlorobenzene as a reference substance in the LCA methodology (Life Cycle Assessment). *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae* **19**, 243-246 (2011)
- ³² GraphPad Prism 5.01 for Windows; GraphPad Software Inc. 1999-2007