

Ústav pro životní prostředí
Přírodovědecká fakulta
Universita Karlova

DISERTAČNÍ PRÁCE

Ekotoxikologické hodnocení kontaminovaných vod a půd
a aplikace testů ekotoxicity pro bioremediace

Praha 2008

Autor: Mgr. Tomáš Hubálek

Školitel: RNDr. Čeněk Novotný, CSc.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych zde poděkoval všem, kteří jakýmkoliv způsobem či formou napomohli ke vzniku, tvorbě a dokončení této práce. Za cenné rady a připomínky vznesené v průběhu celé práce děkuji především svému školiteli RNDr. Čenkovi Novotnému, CSc. a RNDr. Václavu Šaškovi, CSc. i dalším bývalým kolegům ze Sektoru ekologie MBÚ AV ČR, kde byly výsledky této práce zpracovávány v rámci několika výzkumných projektů, především v rámci „Centra pro molekulární a genovou biotechnologii - část 3: Biotechnologie v životním prostředí“. Vyzdvihuji zde též velký přínos RNDr. Tomáše Cajthamla, PhD. při zpracovávání chemických analýz, které jsou uváděny v této práci pro nezbytné doplnění vlastních ekotoxikologických výsledků. Dále bych rád poděkoval Ing. Simoně Vosáhlové, CSc. a jejím kolegům ze společnosti ENVISAN-GEM, a.s, za spolupráci na společném projektu, v jehož rámci byla část této práce vypracována. Poděkování patří také Dr. R. Altenburgerovi z výzkumného centra UFZ Leipzig-Halle v Lipsku a Dr. A. Loibnerovi z výzkumného pracoviště IFA v Tullnu, kteří mi byli nápomocni během mých studijních pobytech na jejich pracovištích. Zároveň bych chtěl poděkovat též všem svým současným kolegům ze společnosti DEKONTA, a.s., kde v současné době pracuji.

Na závěr však musím velice rád vyjádřit nesmírné poděkování celé mé rodině za trvalou podporu při mém studiu; velký dík náleží především mé ženě Hance a synovi Honzíkovi za jejich úžasnou podporu a motivaci nejen ke zpracování této disertace.

Experimentální část této disertační práce byla vypracována Laboratoří experimentální mykologie (Sektor ekologie) MBÚ AV ČR, v.v.i., v rámci několika výzkumných projektů:

- „Centrum pro molekulární a genovou biotechnologii - část 3: Biotechnologie v životním prostředí“ (projekt LN00B030; MŠMT ČR)
- „Stanovení toxických meziproduktů biodegradace substituovaných homologů polyaromatických uhlovodíků tvořících znečištění zemina podzemních vod v souvislosti se starými ekologickými zátěžemi“ (projekt VaV/730/1/00; MŽP ČR)
- „Evaluation of composting and fungal treatment technology for remediation of PAH contaminated soil“(NATO project EST CLG No. 978297)
- „Optimalizace metody mykoremediace a kompostování pro dekontaminaci půd znečištěných polycyklickými aromatickými uhlovodíky (projekt GP206/03/P078; GA ČR)
- „Testy ekotoxicity jako součást hodnocení rizik půd kontaminovaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky“ (juniorský grantový projekt B600200514; GAAV ČR).

Vzhledem k přímé návaznosti výsledků testů ekotoxicity a analytického stanovení kontaminace jsou v kapitole 5.6. (Popis a metodika vybraných bioremediačních postupů) uváděna analytická data, která naměřil RNDr. T. Cajthaml, PhD., případně byla poskytnuta společností ENVISAN-GEM, a.s.

Prohlašuji, že jsem nepředložil tuto disertační práci ani její podstatnou část k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha, květen 2008

Tomáš Hubálek

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a jiných citovaných pramenů, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré informace budou řádně citovány.

Praha, květen 2008

Tomáš Hubálek

Obsah

1. Abstrakt	1
2. Abstract	2
3. Úvod a cíl práce	3
4. Teoretická část – literární rešerše	4
4.1. Ekotoxikologie.....	4
4.2. Výběr testů ekotoxicity	9
4.2.1. Bakteriální testy ekotoxicity.....	9
4.2.2. Testy ekotoxicity s nižšími rostlinami.....	10
4.2.3. Testy ekotoxicity s vyššími rostlinami.....	11
4.2.4. Testy ekotoxicity s nižšími živočichy	12
4.2.4.1. Testy s vodními bezobratlými organismy.....	12
4.2.4.2. Testy s půdními bezobratlými organismy.....	13
4.3. Bioremediace	15
4.3.1. Znečištění životního prostředí vybranými organickými látkami.....	15
4.3.1. Znečištění ropnými látkami.....	15
4.3.2. Polycyklické aromatické uhlovodíky	16
4.3.2. Bioremediace a její možnosti	17
4.3.3. Vybrané bioremediační postupy	19
4.3.3.1. Bioremediace v pevné fázi	20
4.3.3.1. Kompostování	20
4.3.3.1. Přirozená atenuace.....	22
4.3.4. Ekotoxikologické hodnocení bioremediace.....	23
4.4. Ekotoxikologická legislativa v ČR	24
5. Materiál a metody	25
5.1. Příprava vodného výluhu zemin	25
5.2. Příprava standardizované půdy	25
5.3. Maximální vodní kapacita půdy.....	26
5.4. Postup ekotoxikologického hodnocení	26
5.5. Vybrané testy ekotoxicity	29
5.5.1. Test inhibice bioluminiscence bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	29
5.5.2. Test inhibice růstu kořene <i>Sinapis alba</i> ve vodném roztoku.....	32
5.5.3. Test inhibice růstu kořene rostlin kontaktním testem.....	35

5.5.4.	Test inhibice růstu okřehku <i>Lemna minor</i>	37
5.5.5.	Test akutní imobilizace korýše <i>Daphnia magna</i>	42
5.5.6.	Test mortality a inhibice růstu korýše <i>Heterocypris incongruens</i>	45
5.5.7.	Testy se žížalami <i>Eisenia fetida</i>	48
5.6.	Popis a metodika vybraných bioremediačních postupů	51
5.6.1.	Bioremediace kontaminované zeminy	51
5.6.2.	Kompostování kontaminované zeminy	53
5.6.3.	Remediace kontaminované podzemní vody	56
5.6.4.	Biodegradace barviv	58
6.	Výsledky	59
6.1.	Vyhodnocování jednotlivých vybraných testů ekotoxicity	59
6.2.	Bioremediace kontaminované zeminy	65
6.3.	Kompostování kontaminované zeminy	74
6.4.	Remediace kontaminované podzemní vody	81
6.5.	Biodegradace barviv	88
7.	Diskuse	89
7.1.	Bioluminiscenční test s <i>V. fischeri</i>	89
7.2.	Testy ekotoxicity s vybranými rostlinami	92
7.3.	Biotest s okřehkem <i>L. minor</i>	96
7.4.	Biotest s korýšem <i>D. magna</i>	99
7.5.	Biotest s korýšem <i>H. incongruens</i>	100
7.6.	Biotest s žížalami <i>E. fetida</i>	103
7.7.	Baterie testů ekotoxicity	107
7.8.	Výběr testů pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace	110
8.	Závěr	116
9.	Seznam použité literatury	117
10.	Seznam zkratk	133
11.	Seznam tabulek a obrázků	136
12.	Přílohy	140

1. Abstrakt

Tato disertační práce se zabývá ekotoxikologickým hodnocením vod a zemin kontaminovaných některými organopolutanty a využitím tohoto ekotoxikologického přístupu pro vybrané bioremediační postupy. Pro zjišťování toxicity byly do testovací baterie vybrány biotesty využívajících různé organismy- bakterie *Vibrio fischeri*, rostliny *Sinapis alba*, *Hordeum vulgare*, *Lactuca sativa* a *Lemna minor*, korýše *Daphnia magna* a *Heterocypris incongruens* a žížaly *Eisenia fetida*. Testy ekotoxicity byly využity pro ekotoxikologické hodnocení experimentů bioremediace zeminy kontaminované ropnými látkami, kompostování zeminy kontaminované polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU) a remediace podzemní vody se směsnou kontaminací.

V prvním experimentu byla hodnocena ekotoxicita zeminy kontaminované uhlovodíky během 17 měsíců pilotního testu bioremediace. Počáteční koncentrace ropných uhlovodíků (podle parametru NEL) v zemině byla $6380 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny; jejich koncentrace v půdě během bioremediace poklesla o 65,5 %. Nejvyšší toxicita byla zaznamenána v první fázi bioremediace, nicméně některými biotesty byly toxické účinky detekovány během celého procesu bioremediace. Vysokou citlivost v tomto hodnocení projevily především kontaktní testy ekotoxicity. Zjištěná ekotoxicita většinou nekorelovala s poklesem koncentrace ropných látek v zemině během bioremediace.

Ve druhém experimentu byla během 12měsíčního pilotního testu kompostování hodnocena ekotoxicita zeminy kontaminované PAU pocházející z lokality staré ekologické zátěže. Počáteční koncentrace PAU v zemině byla $1723,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny; kompostování se ukázalo být velmi účinným nástrojem při odstraňování PAU z půdy. Nejvyšší toxický efekt byl zaznamenán v první fázi kompostování. Pokles koncentrace PAU v zemině koreloval s celkovým poklesem ekotoxicity během kompostování, nicméně míra zjištěné ekotoxicity byla různá podle typu biotestu.

V posledním experimentu byla testy ekotoxicity hodnocena směsná kontaminace (ropné látky, chlorované látky, aj.) v podzemní vodě během remediace. Vybranými biotesty byla zjištěna ekotoxicita podzemní vody; významná korelace byla nalezena mezi ekotoxikologickými výsledky některých biotestů.

Výsledky jednotlivých experimentů potvrzují nutnost hodnocení procesu bioremediace nejen na základě chemických analýz, ale právě i testy ekotoxicity.

2. Abstract

The aim of this thesis is to identify the ecotoxicity of contaminated soil and water during bioremediation. Different test organisms were selected for the battery of ecotoxicity tests such as the bacterium *Vibrio fischeri*, the terrestrial plants *Sinapis alba*, *Lactuca sativa*, and *Hordeum vulgare*, the water plant *Lemna minor*, the earthworm *Eisenia fetida*, and the crustaceans *Daphnia magna* and *Heterocypris incongruens*. A comparison of individual biotests with various organisms and endpoints should demonstrate their suitability and sensitivity for the ecotoxicity evaluation of contaminated soil and water. The bioassays were used for the evaluation of the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil, composting of PAH-contaminated soil and remediation of contaminated groundwater.

The ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soil originating from a brownfield was evaluated during a 17-month biodegradation pilot test (experiment I). The initial concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH) in the soil was $6380 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight; the concentration of TPH in the soil decreased by 65.5 % after bioremediation. The highest toxicity was detected in the first period of bioremediation; however, certain toxic effects were detectable during the whole bioremediation process. The contact tests were the most sensitive of all of the bioassays. The ecotoxicity results did not always correlate with the decrease in TPH concentrations in the soil during bioremediation.

The ecotoxicity of PAH-contaminated soil originating from a brownfield site was evaluated during a 12-month composting pilot test (experiment II). The initial total content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the soil was $1723.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight; the composting process showed to be an efficient tool in the removal of PAHs from the soil. The highest ecotoxicity was detected in the first period of composting. The decrease in PAH concentrations correlated with the reduction of soil toxicity during composting; however, the ecotoxicity results varied according to the type of the biotest.

Bioassays were also used to evaluate ecotoxicity of contaminated groundwater during remediation (experiment III). The ecotoxicity was detected with the particular bioassays; the significant correlation was found between the results of some tests.

The results of the experiments confirmed the urgency to evaluate bioremediation not only according to chemical analysis, but also with the ecotoxicity tests.

3. Úvod a cíl práce

Cílem této práce je zavedení vybraných testů ekotoxicity a jejich možné využití v hodnocení některých bioremediačních technik. Na základě srovnání citlivosti jednotlivých testů a získaných dalších poznatků vytipovat testy vhodné pro sestavení baterie testů ekotoxicity pro podobný typ znečištění.

Při ekotoxikologickém studiu je vhodné vytvářet tzv. baterii testů, která se skládá z většího počtu sledovaných parametrů na několika druzích organismů. Testy ekotoxicity slouží ke zjištění či odhadu možného toxického vlivu testovaných vzorků na živé organismy. K testování se používá vybraných standardizovaných postupů, které využívají rozdílné organismy jako jsou některé bakterie, rostliny a živočichové. Tyto ekotoxikologické testy jsou nespecifické, to znamená, že zachycují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovaném vzorku a vhodným způsobem tak doplňují chemické analýzy.

Testy ekotoxicity mohou nacházet uplatnění v různých bioremediačních technikách, kdy při odstraňování znečištění mohou vznikat toxické meziproducty, jejichž účinek může být zaznamenán právě pomocí těchto biotestů. A právě tato disertační práce se zabývá sledováním ekotoxikologických aspektů při odstraňování organického znečištění půd a vod některými bioremediačními technikami.

Mezi základní cíle této práce náleží:

- výběr vhodných testů ekotoxicity a jejich zavedení v laboratoři
- aplikace vybraných testů ekotoxicity pro určitý typ kontaminace (vybrána kontaminace ropnými látkami, polycyklickými aromatickými uhlovodíky, aj.)
- posouzení ekotoxikologického hodnocení pro určení účinnosti bioremediace.

Pro účely této práce byly vyzkoušeny a v laboratoři zavedeny testy ekotoxicity využívající tyto organismy:

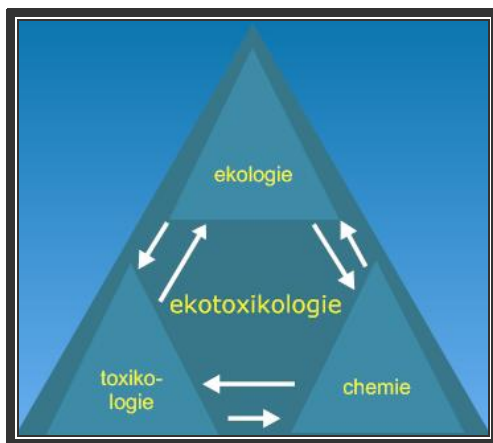
- bakterie *Vibrio fischeri*
- rostliny - hořčici *Sinapis alba*, ječmen *Hordeum vulgare*, salát *Lactuca sativa* a okřehek *Lemna minor*
- korýše *Daphnia magna* a *Heterocypris incongruens*
- žížaly *Eisenia fetida*.

4. Teoretická část – literární rešerše

4.1. Ekotoxikologie

V poslední době se věnuje zvýšená pozornost problematice znečištění životního prostředí různými chemickými látkami a do popředí zájmu se dostává hodnocení vlivu nejrůznějších látek a materiálů na životní prostředí. Antropogenní znečištění životního prostředí dosáhlo počátkem 21. století takových rozměrů, že soustavná a selektivní kontrola všech látek, které kontaminují půdu, vodu a vzduch, je vyloučena. Jsou známy miliony organických látek a každým rokem se objevují a syntetizují další látky. V minulosti se mnohé látky do hromadné výroby zaváděly bez dostatečných informací o jejich potenciální toxicitě nejen pro člověka, ale i pro životní prostředí obecně.

Studiem toxického působení látek lidského či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva se zabývá relativně nová vědní disciplína-ekotoxikologie. Kromě sledování účinků látek na organismy bývá předmětem zájmu pohyb polutantů v životním prostředí. Ekotoxikologie představuje multidisciplinární přístup integrující ekologické, toxikologické a chemické poznatky (obrázek 1). V této disciplíně se zároveň spojují vědecké, technologické a praktické přístupy a cíle (De Coen et al., 2000; Maršálek, 2002; Janssen, 2005).



Obrázek 1 Ekotoxikologie jako multidisciplinární přístup (upraveno podle Janssen, 2005)

Termín „ekotoxikologie“ poprvé použil v roce 1969 René Truhaut, který rozšířil základní pojetí toxikologie (vědy zkoumající účinky látek na jedince) o oblast

ekologických dopadů polutantů na životní prostředí (Calow, 1994). Ekotoxikologie je definována jako studium toxických vlivů chemických a fyzikálních faktorů na živé organismy, zvláště na populace a společenstva určitých ekosystémů, a dále sleduje jejich přenos a interakce v životním prostředí (Rand et al., 1995). Později Newman a Unger (2003) formulovali ekotoxikologii jako vědu o znečišťujících látkách v biosféře a jejich vlivu na složky biosféry včetně člověka.

V současnosti se antropogenní činností dostávají do životního prostředí nové organické sloučeniny, které následně mohou s dalšími přírodními sloučeninami produkovanými organismy či s anorganickými sloučeninami vytvářet různorodé směsi. Toxicitu těchto směsí nelze přesně předvídat ani efektivně monitorovat metodami analytické a environmentální chemie, které jsou většinou cíleny na určitou látku. Zároveň lze prohlásit, že přítomnost a koncentrace jednotlivých polutantů v prostředí nevyovídá zcela o biologickém riziku, které vyplývá např. ze synergických nebo antagonistických efektů současně působících kontaminantů. Z toho důvodu se důležitým nástrojem tohoto hodnocení stávají ekotoxikologické metody (Alexander, 1995; Walker et al., 2003).

Podstatou ekotoxikologické laboratorní práce je provádění tzv. testů ekotoxicity neboli biotestů (z angl. bioassay) využívajících biologické systémy a zahrnujících expozici daného organismu testovanému toxickému vlivu a stanovujících odpověď tohoto organismu. Jako testovací organismy se používá široká škála organismů, nejčastěji se jedná o bakterie, rostliny a bezobratlé živočichy. Spektrum používaných druhů se liší především podle standardizovaných protokolů jednotlivých institucí zabývajících se ekotoxikologickým hodnocením (ASTM, Canada Environment, DIN, ISO, OECD, US EPA, aj.). Testy ekotoxicity lze provádět na všech úrovních organizace biologických systémů (počínaje úrovní molekulární až po úroveň ekosystému).

Při ekotoxikologickém hodnocení se vytváří tzv. baterie testů, která se skládá z většího počtu sledovaných parametrů a několika druhů organismů (Clément, et al., 1996; Jos et al., 2003, Pandard, et al., 2006). Vybrané testovací organismy obvykle zastupují jednotlivé trofické úrovně. Tato kombinace testů je schopna lépe zhodnotit možné ekotoxikologické riziko daného prostředí (Kahru et al., 1998).

Principem biotestu je kontakt testované látky, směsného nebo přírodního vzorku za definovaných a kontrolovatelných podmínek s detekčním systémem (tkání,

zkušebním organismem, populací, společenstvem, apod.). Mezi základní sledované parametry (tzv. endpointy) jednotlivých biotestů patřilo především vyhodnocování mortality testovacích organismů, v současnosti se ale do popředí dostávají dlouhodobější a obtížněji zjistitelné vlivy jako je například mutagenita, karcinogenita, vlivy na růst, reprodukci a další (Chapman, 1995; Walker et al., 2003).

Biotest většinou nemůže podat informaci, která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku přítomna, to je vyhrazeno chemické analýze. Může ale jednoduše a rychle říci, zda jsou látky obsažené ve vzorku biologicky aktivní. Biotest tedy lze definovat jako proces, při němž je testovací systém exponován v přesně definovaných podmínkách různým koncentracím zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku. Testy ekotoxicity jsou nespecifické, to znamená, že vyjadřují celkové toxické účinky všech látek přítomných ve vzorku bez nutné bližší znalosti jeho chemického složení (Kočí, 2002; Maršálek, 2002; Thompson et al., 2005).

Podrobný přehled členění testů ekotoxicity podle různých kritérií provedl Maršálek (2002):

- podle testované matrice: voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka
- podle doby expozice: akutní, semiakutní (semichronické) a chronické
- podle trofické úrovně testovacích organismů: producenti, konzumenti, destruenti
- podle spektra testovacích organismů: jednodruhové či vícedruhové
- podle pokročilosti designu testovacího systému (také 3 generace biotestů)
 1. generace - klasické (standardní)
 2. generace - mikrobiotesty
 3. generace - biosenzory, biosondy a biomarkery
- podle stupně komplexnosti detekčního systému:
 - enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury in vitro, intaktní živý organismus, populace, mikrokosmos a mezokosmos, terénní experimenty
- podle typu testovaného vzorku
 - čisté chemické látky (hydrofilní, hydrofobní, těkavé)
 - směs látek (známých i neznámých)
 - přírodní vzorky (většinou neznámé, směsné, s neznámými interakcemi)

- podle způsobu přípravy vzorku
 - definované koncentrace chemických látek
 - testování výluhů přírodních vzorků (extrakce vodou, organickými rozpouštědly, různé pH, teplota, aj.)
- podle způsobu vyhodnocování
 - letální efekty (mortalita, imobilizace)
 - subletální efekty (chování organismů - např. rychlost a směr pohybu)
 - hodnocení fyziologické aktivity (fotosyntetické asimilace, enzymatická aktivita, přírůstky jako například délka kořene, počet buněk v populaci, hmotnost a velikost organismu, aj.)
 - reprodukční aktivita, malformace a teratogenita atd.
- speciální testy pro hodnocení rizik v životním prostředí v případě nutného jiného stanovení než běžné (toxické, letální) efekty na testovací organismus:
 - trofie
 - mutagenita/genotoxicita
 - teratogenita
 - embryotoxicita
 - reprodukční testy na rybách, koryšících, obojživelnících, ptácích apod.
- další biotesty jako jsou testy biokoncentrace (bioakumulace) či testy pro hodnocení biodegradability, které nepatří mezi základní ekotoxikologické biotesty ve smyslu stanovování toxických a letálních efektů v původním významu, ale patří mezi biotesty ekotoxikologického hodnocení chemických látek i přírodních a odpadních vzorků.

Základní snahou ekotoxikologie je používat a vyvíjet takové metody, které umožňují srovnání účinků různých látek a různých organismů, ale i srovnání výsledků z různých laboratoří (Rand et al., 1995). Současným trendem ekotoxikologie je využívání alternativních biotestů, které jsou miniaturizované, ale umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních, plně reprodukovatelných podmínek (Blaise, 1991; Mitchel et al., 2002; Piňa et al., 2007). Testy ekotoxicity by měly splňovat základní kritéria mezi která patří především relevantnost, reprodukovatelnost, spolehlivost, citlivost a použitelnost v praxi (Calow, 1994).

Testy ekotoxicity se v současnosti stávají stále důležitějším nástrojem v oblasti hodnocení kontaminace prostředí (Janssen, 1998; Kafka and Punčochářová, 1999; Kočí, 2002; Thompson et al., 2005). Tyto metody se vyznačují rozmanitými přístupy v hodnocení toxických vlivů látek jak v tekutém, tak i v pevném mediu (Blaise et al., 2000a; Wharfe, 2005). Historicky nejrozšířenější oblastí ekotoxikologie je její zaměření na znečištění vody. Již koncem 19. století byly při studiu toxických chemikálií v průmyslových odpadních vodách provedeny první jednoduché testy akutní toxicity. V současnosti je známo množství testů a jejich různých modifikací pro testování vzorků vod a půdních výluhů. V poslední době vzrůstá potřeba testovat látky ve vodě špatně rozpustné, které mohou být například základem kontaminace zemin a metodiky testování pomocí vodních organismů začínají být nedostatečné (Fernández et al, 2005). Rozvíjí se metodiky testování zemin v kontaktním uspořádání, kdy se ze vzorku nepřipravuje vodný výluh a testovaná látka v zemině se tak dostává do přímého styku s organismem (Oleszczuk, 2008a). Tyto tzv. kontaktní testy ekotoxicity pracují přímo s nepozměněnou maticí půdy, čímž umožňují relativně přesnou simulaci procesů probíhajících v půdě (Ferrari et al., 1999; Eisentraeger et al., 2004; Kočí et al., 2008).

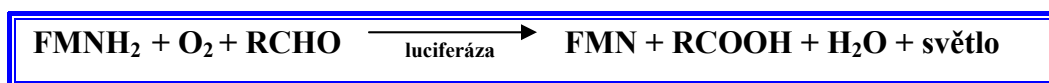
Zároveň v současnosti nacházejí uplatnění různé miniaturizované formy biotestů, tzv. mikrobiotesty (Blaise, 1998). Mikrobiotesty lze definovat jako metody využívající organismy malé velikosti, jejichž provedení je relativně rychlé a jednoduché, a vyžaduje nízké náklady. Tyto metody obvykle vyžadují testovací objem menší než 100 ml, krátkou dobu expozice, naopak nevyžadují jiné než standardní laboratorní vybavení a hlavní výhodou je dostupnost ve formě komerčního kitu. Z tohoto důvodu jsou tyto testy vhodné pro použití v multitrofických testovacích bateriích pro rutinní monitoring kontaminace životního prostředí (Blaise et al., 2000a; Vaal et Folkerts, 2000). Příkladem jsou tzv. toxkity, které jsou většinou založeny na použití klidových stadií různých druhů bezobratlých organismů (např. Daphtoxkit, Protoxkit, Ostracodtoxkit), případně řas (Algaltoxkit) a dalších organismů. Z těchto toxkitů se testovací organismus získává přímo až před zahájením testu. V současnosti jsou tyto toxkity pravděpodobně nejlépe zdokumentované mikrobiotesty z hlediska standardizace i validace (Blaise, 2000; Janssen et al., 2000; Persoone and Vangheluwe, 2000; Persoone et al., 2003).

4.2. Výběr testů ekotoxicity

Následující základní přehled vybraných testů ekotoxicity souvisí se zaměřením této disertační práce. Avšak existuje a zároveň neustále vzniká velké množství dalších různých ekotoxikologických testů a jejich modifikací, které využívají rozličné detekční systémy a nacházejí uplatnění při různém ekotoxikologickém hodnocení.

4.2.1. Bakteriální testy ekotoxicity

Bakteriální testy ekotoxicity představují nedílnou součást ekotoxikologického hodnocení. Řada těchto testů využívá fenoménu bioluminiscence vybraných druhů bakterií. Tento jev lze charakterizovat jako vyzařování světla bez produkce tepla; principem je reakce redukovaného flavinmononukleotidu (FMNH₂) s molekulárním kyslíkem a aldehydem, který uvádí flavinmononukleotid (FMN) do excitovaného stavu. Emise světla je výsledkem návratu flavinu z excitované do základní formy; reakci zprostředkovává enzym luciferáza (Steinberg et al., 1995; Girroti et al., 2008).



Bioluminescence byla nejvíce studována u bakterií slaných vod *Photobacterium* sp. a *Vibrio* sp. (Bulich, 1979; Dutka and Kwan, 1981). Dnes pravděpodobně nejrozšířenějšími bakteriálními bioluminiscenčními testy jsou Microtox[®] (komerčně vyvinutý společností Microbics Corp., Carlsbad, USA) a v Evropě rozšířený LUMISTox[®] (vyvinutý společností Dr. Bruno Lange GmbH, Berlín, Německo) používající bakterie *V. fischeri* (dříve *P. phosphoreum*). Je možno se setkat i v různých variantách těchto biotestů dodávaných dalšími firmami (Kahru, 1993; Nohava et al., 1995; Johnson, 1998). Obecně jsou tyto biotesty založeny na inhibici bioluminiscence bakterie *V. fischeri* působením toxické látky (Loibner et al., 2004; Hale and Battersby, 2005; Hirmann et al., 2007). Na základě délky, po kterou jsou bioluminiscenční bakterie vystaveny působení testovaných látek, je stanovována akutní či chronická toxicita (Bulich et al., 1996; Backhaus et al., 1997; El-Alawi, et al., 2002). Určitou variantu tohoto biotestu s *V. fischeri* je možno využít pro přímé testování pevných vzorků

(Guzzella, 1998; Heinlaan et al., 2007). Další modifikaci bakteriálního testu s *V. fischeri* (tzv. flash-test) lze použít pro měření toxicity silně zbarvených vzorků, ale i pevných vzorků v kontaktním uspořádání (Lappalainen et al., 1999, Pöllumaa et al., 2000).

Existuje také řada bakteriálních testů pracujících na dalších principech hodnocení toxicity jako například sledování účinků toxikantu na různé fyziologické změny mikroorganismů jako je stanovení koncentrace ATP, změny respirace, aj. (Steinberg, 1995). Bylo vyvinuto také několik bakteriálních mikrobiotestů pro hodnocení mutagenních účinků toxikantů, nejznámější z nich jsou Amesův test s bakterií *Salmonella typhimurium*, SOS chromotest využívající *E. coli*, případně Mutatox test používající *V. fischeri* (Ames et al., 1975; Kwan and Dutka, 1990).

4.2.2. Testy ekotoxicity s nižšími rostlinami

Testy používající nižší rostliny, především řasy, představují důležitou součást akvatické ekotoxikologie. Biotesty s těmito primárními producenty jsou často základní složkou testovacích baterií pro testování toxicity látek a odpadů nebezpečných pro sladkovodní prostředí. Výhoda těchto testů spočívá v širokém rozpětí senzitivity řas a prakticky neomezené kombinovatelnosti a lze je tedy použít pro testování ekotoxicity vody a sedimentů (Blaise et al., 2000b; Baun et al., 2002).

Principem standardních metod stanovení toxicity látek pomocí řasových mikroorganismů je vystavení rychle rostoucí populace řas v živném mediu toxikantu na dobu 3-4 dnů (Algaltokit, 1996). Nejčastěji používanými řasami v biotestech jsou *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* a *Chlorella vulgaris* (Rojíčková–Padrtová and Maršálek, 1999; Blaise et al., 2000b). V podmínkách ČR se test provádí na zelené řase *S. capricornutum* (syn. *Raphidocelis subcapitata*) nebo *S. subspicatus* (MŽP, 2007). Tato metoda prodělala v posledních letech značný rozvoj a nové její modifikace zahrnují použití technik jako jsou průtoková cytometrie, použití mikrodestiček a imobilizované řasy. Kromě měření počtu buněk lze jako kritérium hodnocení metody rovněž použít měření obsahu ATP v buňkách nebo fluorescence řasového chlorofylu (Lukavský, 1992; Rojíčková–Padrtová and Maršálek, 1999, Janssen et al., 2000; Cleuvers and Ratte, 2002).

4.2.3. Testy ekotoxicity s vyššími rostlinami

Jako představitelé primárních producentů jsou vybrané druhy vyšších rostlin často využívány při testování vlivů látek na životní prostředí (Wang, 1991; Lewis, 1995). V baterii rostlinných testů se doporučuje alespoň 1 zástupce jednoděložných a 2 zástupci dvouděložných rostlin (Wang and Freemark, 1995). Mezi nejčastěji používané dvouděložné rostliny patří hořčice bílá *Sinapis alba* (syn. *Brassica alba*), salát setý *Lactuca sativa*, okurka setá *Cucumis sativum*, okřehek menší *Lemna minor* (Wang, 1987; Gorsuch et al., 1990; Kapustka, 1997; Song and Huang, 2005; Feiler et al., 2006). Z jednoděložných rostlin se při testování ekotoxicity používá kukuřice *Zea mays*, pšenice *Triticum aestivum*, ječmen *Hordeum vulgare*, oves setý *Avena sativa*, řeřicha *Lepidium sativum* a další druhy (Wickliff and Fletcher, 1991; Gong et al., 2001).

Biotesty s rostlinami sledují vliv toxikantů na klíčení semen a růst rostlin (kořene i nadzemní části rostliny). Sledované parametry těchto rostlinných biotestů se zaměřují na růstový cyklus testované rostliny. Expozice může být akutní nebo chronická. V biotestech je hodnocena nejčastěji hmotnost nadzemní části a kořenů, výška rostliny, počet a plocha listů, ztráta chlorofylu a jiné parametry. Nejpoužívanějšími akutními testy s rostlinami jsou test klíčivosti semen a test rychlosti prodlužování kořenů (Wang and Freemark, 1995). Standardně se v ČR používá právě test klíčivosti semen a test inhibice růstu kořene hořčice *S. alba* v počátečních stádiích vývoje (MŽP, 2007).

Testy na rostlinách se provádějí ve vodném výluhu aplikovaném na interní nosič nebo přímo s kontaminovanou zemínou. Test s vodným výluhem byl vyvinut jako test nepřímé toxicity hodnotící rychlost prodlužování kořenů; v tomto biotestu je velice často používán salát *L. sativa* a hořčice *S. alba* (Bíbrová, 2004; Banks and Schultz, 2005). Za přímý rostlinný test toxicity půdy lze také považovat metodu, kdy je kontaminovaná půda "ředěna" kontrolní půdou geometrickou řadou a 5 dní po zahájení testu je vyhodnocen počet klíčících semen (Kapustka et Reporter, 1995).

Jedním z velice perspektivních testů pro ekotoxikologické hodnocení rozpuštěných látek ve vodě nebo ve výluhu a to i různě barevných a zakalených vzorků se zdá být biotest s okřehekem *L. minor* (Taraldsen and Norbert-King 1990; Pro et al., 2003). Tento biotest s *L. minor* je doporučován jako možná alternativa k řasovým testům (Fairchild et al., 1997; Eberius, 2001b; Cleuvers and Ratte, 2002). Možnost

využití tohoto biotestu s *L. minor* byla potvrzena při hodnocení toxicity barviv i při sledování biodegradace barviv (Eichlerová et al., 2007; Sharma et al., 2007). Jednou ze základních předností biotestu s *L. minor* je detekce toxicity při subchronické expozici, neboť je zahrnut jak okamžitý účinek při uvedení organismu do testu, tak i dlouhodobé působení toxikantu (Wang 1986; Wang, 1990; Cleuvers and Ratte, 2002).

Existuje také řada testů s rostlinami sledujících vliv toxikantu na fyziologické charakteristiky rostlin jako fotosyntéza, příjem CO₂, produkce O₂, fixace N₂, stanovení enzymové aktivity, fluorescence chlorofylu nebo i stanovení genotoxicity (Baudgrasset et al., 1993; Wickliff and Fletcher, 1991, Bierkens et al., 1998; Ferrari et al., 1999).

4.2.4. Testy ekotoxicity s nižšími živočichy

Existují rozmanité testy s nižšími živočichy pomocí kterých se hodnotí vliv toxické látky na ekosystémy. V potravním řetězci vodních i terestrických ekosystémů zauímají tyto organismy klíčovou úlohu, proto jsou často nedílnou součástí ekotoxikologického hodnocení. V akvatické a půdní ekotoxikologii existuje veliké množství standardních testů ekotoxicity využívajících rozličné nižší organismy.

4.2.4.1. Testy s vodními bezobratlými organismy

V testech ekotoxicity mohou být využíváni prvoci, kteří jsou zařazováni mezi obrvené prvoky (*Ciliata*). Většina testů používá organismy druhu *Tetrahymena*, přičemž hodnocení inhibice růstu *T. thermophila* je předmětem také mikrobiotestu Protoxkit FTM (Novotný et al., 2006).

Vodními testovacími organismy mohou být vířníci, korýši, kroužkovci, i larvy hmyzu (Persoone and Janssen, 1993). Sladkovodní bezobratlí patří mezi nejpoužívanější organismy v testech ekotoxicity (Blaise, 1991; Janssen and Persoone, 1993; Sánchez-Bayo, 2006; Wik and Dave, 2006).

V akvatické ekotoxikologii zauímá přední místo využití druhů *Daphnia magna* a *Daphnia pulex*, v USA pak *Ceriodaphnia dubia* (Versteeg et al., 1997; Mark and Solbé, 1998, Wu et al., 2007). Při testování akutní toxicity těchto druhů je často testovaným kritériem imobilizace jedinců po expozici 24h (případně 48h). Chronická toxicita se

posuzuje testováním reprodukce, popřípadě dlouhodobým přežíváním jedinců, jako například 7 denní test přežití a reprodukce *C. dubia* a 21 denní test reprodukce *D. magna* (ISO, 1996; OECD, 2004b). Daphtoxkit FTM představuje komerční provedení tohoto testu s korýši *D. magna* a *D. pulex* (Daphtoxkit FTM, 1996). Podobně je využíván korýš *Thamnocephalus platyurus* ve formě testu Thamnotoxkit FTM (Persoone et al., 1994). V ČR se provádí test na perloočce *D. magna* (MŽP, 2007).

Existují i alternativní biotesty využívající bezobratlých organismů, založené na jiném typu sledovaných parametrů než jen sledování mortality. Například test in vitro inhibice trávicích enzymů *D. magna* či in vivo inhibice enzymové aktivity a míry přijímání potravy organismy jako *D. magna*, *C. dubia* a mořských korýšů *Artemia salina* nebo *Mysidopsis bahia* (Janssen and Persoone, 1993; De Coen et al., 1998).

K hodnocení toxicity sedimentů je k dispozici mikrobiotest s bentickým korýšem *Heterocypris incongruens*, který je dodáván ve formě toxkitu nazývaném OstracodToxkit (Chial and Persoone, 2002c).

V ekotoxikologickém hodnocení nacházejí uplatnění další vodní organismy. Příkladem je třeba využití vířníků, kdy testovacím kritériem je především inhibice jejich reprodukce. Nejčastěji se jedná o druh *Brachionus calyciflorus*, který je také základem komerčního testu Rotoxkit FTM (Snell and Janssen, 1995).

4.2.4.2. Testy s půdními bezobratlými organismy

Také v ekotoxikologii terestrických ekosystémů existuje množství biotestů využívajících různé organismy a sledující rozličné testované parametry (Kula and Larink, 1998; Lokke and Van Gestel, 1998). Půdní testovací organismy lze vystavit působení toxikantů dvojitým způsobem - buď jsou kontaminované půdní částice pohlcovány testovacími organismy perorálně anebo jsou toxické látky rozpuštěné v půdním roztoku přijímány organismy difuzí celým povrchem jejich těla. Třetí způsob, inhalace toxikantů přítomných ve vzdušné fázi půdy, je zatím velmi málo prozkoumán (Van Straalen and Van Gestel, 1995; Paoletti, 1999).

Test s chvostoskoky (*Folsomia candida*) byl původně vyvinut k určení ekotoxikologického působení čistých chemikálií na půdní organismy; v testu se hodnotí zejména mortalita a reprodukce chvostoskoků (Crouau et al., 2002).

Test ekotoxicity, kdy jsou zjišťovány akutní i subletální účinky toxikantu na roupice *Enchytraeus sp.*, se provádí v podobě půdního testu s umělou standardní půdou nebo přirozenou půdou, případně na agarovém mediu (Römbke, 2003).

Žížaly jsou ideálním testovacím organismem pro studium znečištění životního prostředí, především půd. Při testech ekotoxicity se žížalami, které se provádějí v kontaktním uspořádání, lze získat ideální model pro zjišťování toxicity kontaminantů v půdě související s biodostupností (Lanno et al., 2004). Zvolené uspořádání biotestu umožňuje využití žížal pro hodnocení akutní (7 až 28 dní testu) nebo chronické toxicity (2 měsíce testu). Pro testy ekotoxicity s žížalami se používají především žížaly druhu *Eisenia fetida*, *E. fetida andrei*, *Lumbricus rubellus*, *L. terrestris* a *Aporrectodea caliginosa* (Lanno and McCarty, 1997; Kula and Larink, 1998; Lokke and Van Gestel, 1998; Inouye et al., 2006). Přestože pro provádění kontaktních testů s žížalami existují standardizované metody, jsou metodiky často různým způsobem modifikovány (Van Straalen and Van Gestel, 1995). Nejčastěji je využíváno žížal *E. fetida* a *E. andrei*, které lze snadno chovat v laboratoři. Akutní toxicita je hodnocena buď variantou kontaktního testu na filtračním papíru anebo testem se skutečnou nebo standardní umělou půdou (Hund-Rinke and Wiechering, 2001; Loureiro et al., 2005a). V případě testu na filtračním papíru je hodnocena mortalita žížal *E. fetida* po 48 hodinách; v případě testu s půdou je mortalita žížal *E. fetida* hodnocena po kontaktu s kontaminovanou půdou po dobu 7, 14, resp. 28 dnů. Tento test lze však také použít ke zjišťování subletální toxicity, kdy po 4 týdnech expozice při podmínkách testu s půdou jsou stanoveny účinky toxikantu na růst žížal (měřeno tělesnou hmotností) a reprodukci (produkce kokonů). Kokony jsou dále inkubovány po dobu 4 týdnů a je stanoven počet vylíhnutých jedinců a počet mláďat vyprodukovaných dospělým jedincem (Van Gestel et al., 1989; Robidoux, et al., 2000). V poslední době se při testech s *E. fetida* vedle testu reprodukce stále více začíná rozšiřovat sledování dalších parametrů jako jsou úbytek biomasy, bioakumulace, různé behaviorální a fyziologické změny, neurotoxicita a další (Abdul Rida and Bouché, 1997).

4.3. Bioremediace

4.3.1. Znečištění životního prostředí vybranými organickými látkami

4.3.1.1. Znečištění ropnými látkami

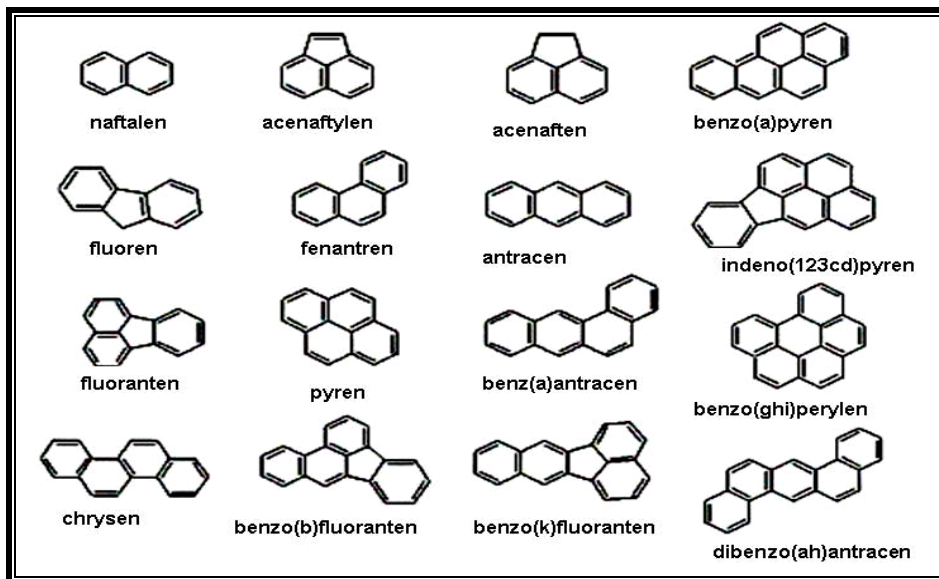
Během posledního století nároky na využití ropných látek jako zdroje energie a suroviny pro chemický průmysl značně vzrostly a jejich světová produkce se pohybuje okolo 3500 milionu tun ročně. Znečištění půdy a vod ropnými látkami představuje závažný problém pro jednotlivé složky životní prostředí včetně člověka. Úniky ropných látek do světových moří činí 0,1 % celkového produkovaného objemu (tj. 35 mil. t), tyto ztráty jsou způsobeny zejména úniky ze zpracovatelského průmyslu, průsaky z transportních systémů nebo zásobních tanků a vypouštěním znečištěných odpadních vod (Atlas and Bartha, 1992). Místa nejčastějšího výskytu kontaminace ropnými látkami v půdách jsou zejména letiště, hangáry a prostory pro údržbu letecké techniky, prostory pro údržbu vozidel, skladovací nádrže a manipulační prostory, kontaminované sedimenty, ale také například vojenské prostory; různá ekotoxicita je spojována s místy s takovým znečištěním (Sherry et al., 1997; Kahru et al., 2000).

Typickými zástupci ropných produktů jsou benzín, nafta, letecký petrolej, topný olej, aj. Určit konkrétní složky vyskytující se v pohonných hmotách je velice obtížné, neboť se téměř vždy jedná o velmi složité směsi. Toxicita těchto látek pro životní prostředí je zřejmá (Aruldoss and Viraraghavan, 1998; Lee et al., 2003). Pro odstraňování kontaminace ropnými látkami lze použít mimo jiné metodu bioremediace, kdy jsou využívány některé mikroorganismy schopné znečištění odstraňovat (Atlas, 1981; Atlas, 1991; Lynch and Moffat, 2005). Ropné látky patří k nejčastěji sanovaným kontaminantům v ČR (Matějů, 2003).

Z ropy je vyráběno množství různých chemikálií. Příkladem mohou být organická rozpouštědla, která jsou v dnešní době vyráběna téměř výlučně z ropy. Organická rozpouštědla jsou následně výchozími látkami pro velké množství výrobků jako jsou lepidla, barvy, aerosolové spreje, čisticí prostředky, detergenty, aj. Často se jedná o různé chlorované látky, které mohou představovat závažné riziko pro životní prostředí i člověka. Odstraňování znečištění těmito látkami je velice náročné a nákladné (Kočí et al., 2007).

4.3.1.2. Polycyklické aromatické uhlovodíky

Mezi významné kontaminanty životního prostředí patří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU; angl. PAHs). Do skupiny PAU patří množství uhlovodíků, mezi nejznámější patří 16 PAU podle US EPA (Harvey, 1997; Douben, 2003) (obrázek 2).



Obrázek 2 16 prioritních PAU (podle US EPA)

Úniky PAU do životního prostředí jsou vázány na lidskou činnost i přírodní zdroje. Z přirozených zdrojů PAU jsou důležité vulkanická činnost a rozsáhlé požáry; významný antropogenní zdroj představuje nedokonalé spalování fosilních paliv, ochrana dřeva v impregnačních stanicích dřeva, i některé průmyslové zdroje jako například výroba hliníku a koksovny (Harvey, 1997).

PAU nejsou záměrně vyráběné produkty s výjimkou výroby v laboratorním měřítku, pro použití ve výzkumu a v analytice. Čisté sloučeniny jsou bílé nebo nažloutlé krystalické pevné látky. Jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpouštějí se snadno v tucích a olejích. PAU se vyskytují v široké řadě produktů jako jsou motorová nafta, kreozot, asfalt, dehet a výrobky z černouhelného dehtu (Samantha et al., 2002).

PAU patří do skupiny těkavých organických látek (VOC). Schopnost některých PAU přemisťovat se na dlouhé vzdálenosti atmosférou od emisního zdroje a zároveň známé karcinogenní, teratogenní a mutagenní účinky některých PAU vedly k zařazení těchto látek mezi perzistentní organické polutanty (POPs). Obecně k nebezpečným vlastnostem POPs patří vedle stability zaručující perzistenci v prostředí také často

vysoká toxicita prokázaná pro savce a člověka (Vallack et al., 1998; Holoubek, 1999). Díky vlastnostem, které předurčují jejich nebezpečnost v planetárním měřítku, jsou POPs předmětem regionálních a mezinárodních opatření, v jejichž rámci jsou definovány prioritní POPs, mezi které patří právě PAU (Lerche et al., 2002).

Obecně platí, že s rostoucím počtem jader roste afinita k sorpci, a že mutagenní resp. karcinogenní potenciál PAU roste se zvyšujícím se počtem kondenzovaných cyklů, maximálních hodnot dosahuje u pětijaderných izomerů a s dalším zvyšováním počtu cyklů klesá. Negativní účinky jsou ovlivněny i přítomností substituentů resp. heterocyklického prvku (Harvey, 1997). Stabilita PAU roste v řadě lineární (aromatická jádra uspořádaná vedle sebe - naftalen, antracen), klastrové (alespoň jedno aromatické jádro obklopeno dalšími třemi kondenzovanými jádry - pyren, benzo(a)pyren, benzo(hg)fluoranten) a v řadě angulární (pomyslné linie spojující středy sousedních aromatických jader svírají úhel, přičemž každý kruh sousedí s maximálně dvěma dalšími kruhy - fenantren, chrysen) (Bispo et al., 1999; Kanaly and Harayama, 2000).

Oblasti kontaminované PAU vykazují dlouhodobě přetrvávající ekotoxicitu a odstraňování PAU z prostředí je nesnadné (Altenburger et al., 2003; Eom et al., 2007). Fyzikální metody bývají velice nákladné a mnohdy nevhodné, proto se v některých případech slibným řešením jeví metoda bioremediace, kdy se využívá schopnosti některých mikroorganismů rozkládat některé PAU (Cerniglia, 1992; Ashok and Saxena, 1995; Cuypers et al., 1998; Cajthaml et al., 2002; Bamforth and Singleton, 2005).

4.3.2. Bioremediace a její možnosti

V současnosti dochází k velkému rozvoji využití biodegradační aktivity mikroorganismů v remediačních (sanačních) technologiích pro rozkládání polutantů v životním prostředí. Biologické metody remediace (tzv. bioremediace) jsou zaměřeny na podporu biodegradačního procesu přímo v kontaminované vodě a půdě nebo v různých typech reaktorů, kde je umožněn přímý kontakt kontaminantů s organismy schopných tyto kontaminanty rozkládat. Biologické procesy odstraňování nežádoucích polutantů mohou mít řadu výhod oproti chemickým a fyzikálním metodám. Mezi nejdůležitější tyto výhody patří flexibilita biologických systémů, jednoduchost aplikace a v neposlední řadě nízká cena, ale na druhou stranu je nutné považovat za nevýhodu

omezené využití pro odstraňování anorganických sloučenin, delší doba procesu a nutnost detailní charakterizace znečištěné lokality (Ritter and Scarborough, 1995; Errampalli et al., 1997; Salanitro et al., 1997).

Bioremediace je definována jako jakýkoliv proces, při němž jsou působením živých organismů či enzymů přeměňovány toxické či rizikové látky na netoxické a nerizikové látky, v ideálním případě na CO₂ a H₂O (Atlas and Bartha, 1992; Autry and Ellis, 2006). Většinou se jedná o rozklad organických polutantů prostřednictvím specifických mikroorganismů (aplikací bakteriálního preparátu), případně o optimalizaci podmínek prostředí pro působení již přítomné mikroflóry. Tato optimalizace podmínek spočívá zejména v aeraci, přidávání živin (zajištění optimálního poměru C:N:P), přidávání dalších látek stimulujících mikroorganismy k rozkladu znečištění i v dalších postupech (Agathos and Reineke, 2003; Lynch and Moffat, 2005). Cílem bioremediace je degradace organických polutantů tak, aby jejich koncentrace byla buď pod hranicí detekčního limitu nebo taková, že by nepřevyšovala koncentrační limit daný legislativou (Demnerová, 2003).

Mikroorganismy (bakterie, aktinomycety a houby) představují zdaleka nejvýznamnější skupinu organismů podílejících se na biotransformačních dějích (Colleran, 1997; Iranzo et al., 2001). Existují také další bioremediační postupy využívají pouze rostliny (tzv. fyto-remediace) nebo houby (tzv. myko-remediace). Význam mikroorganismů při biotransformaci kontaminujících látek vyplývá zejména z jejich vysoké rychlosti reprodukce a následně také obrovské přizpůsobivosti prostředí. Mikroorganismy se adaptovaly k životu v kompletním spektru podmínek prostředí na Zemi. Dominantními mikroorganismy v saturované zóně jsou bakterie, zatímco aktinomycety a houby mohou vykazovat značnou aktivitu především v té části zeminy, do níž zasahuje kořenový systém (Kubal et al., 2002; Watanabe, 2001). Rychlosti biodegradace a množství mikroorganismů vykazují obvykle přímou úměru. Zásadními faktory ovlivňujícími množství a aktivitu mikroorganismů v zemině a tím rychlost rozkladu je velikost částic daného typu zeminy, dostupnost živin, redoxní podmínky, pH, vlhkost, povrchová aktivita tuhé matrice, aj. Bakteriální kmeny používané při sanačním procesu musejí patřit mezi běžné půdní bakteriální kmeny a musejí být netoxické a nepatogenní (Kubal et al., 2002).

Samovolný bioremediační proces je většinou bez vnějších zásahů velmi pomalý, a to především z důvodu jako je nízké pozadí původní mikroflóry, nepřítomnost specifické mikroflóry se schopností rozkládat dané polutanty, nízká rozpustnost přítomných polutantů, nehomogenní rozšíření polutantů, nedostatek kyslíku, nedostatek doplňkových živin a biologická nedostupnost polutantu (Liebeg and Cutright, 1999). Vhodným sanačním postupem je ale možno urychlit tento samovolný proces až o několik řádů (Voicu et al., 2003).

Bioremediace lze využít pro čištění půdy, spodních vod, odpadních vod, kalů a plynů. V současné době je počet sloučenin, které mohou podléhat biologické destrukci, značný. Bioremediační technologie se v současnosti zaměřují zejména na degradaci ropy a ropných produktů, PAU, chlorovaných uhlovodíků a v poslední době se ukazuje i perspektivnost využití těchto technologií pro některé další POPs (Demnerová, 2003). Názory na účinnost různých bioremediačních technologií se u některých xenobiotik často dosti liší (El Fantroussi and Agathos, 2005; Mohan et al., 2005). Při výběru metody pro odstraňování polutantů s určité lokality je nutné vycházet z kompletní charakterizace znečištěné lokality a zvážit řadu specifických kritérií daného případu (Breedveld and Karlsen, 2000). S ohledem na cílový kontaminant se při výběru vhodné remediační metody sledují zejména celkové náklady na proces, minimální dosažitelná koncentrace polutantu, spolehlivost, účinnost metody, náklady na úpravy po ukončení bioremediace, a také například i další možné využití vyčištěné půdy (Mueller et al., 1989; Wilson and Jones, 1993).

4.3.3. Vybrané bioremediační postupy

Bioremediační postupy lze rozdělit podle několika hledisek; základní rozdělení je podle přítomnosti kyslíku na metody aerobní a anaerobní. Většina bioremediačních technologií aplikovaných v současné době v ČR na kontaminované zeminy vychází z aerobních procesů, které jsou vhodné zejména pro likvidaci znečištění ropnými látkami (Demnerová et al., 1994; Matějů, 2003).

Bioremediační technologie lze rozdělit dle místa jejich realizace na metody *in-situ*, které jsou aplikovány přímo na kontaminované lokalitě (jsou relativně levné, ale jejich průběh je obtížně kontrolovatelný) a metody *ex-situ*, ve kterých je kontaminovaný

materiál odstraněn z původní lokality a buď k degradaci dochází na místě odstranění (*on site*) nebo je odstraněná kontaminovaná matrice převezena na jiné místo kde probíhá vlastní biodegradační proces na dekontaminační ploše nebo v bioreaktoru (*off site*). Základní výhodou *ex-situ* uspořádání je možnost provést sanaci za lépe kontrolovatelných podmínek, nevýhodou je právě nutnost odtěžení a transportu množství materiálu na speciální plochy (Guerin, 1999; Agathos and Reineke, 2003).

Mezi *in-situ* metody patří bioventing, podpořená bioremediace (neboli biostimulace, angl. enhanced bioremediation), přirozená atenuace (angl. natural attenuation) a fyto-remediace. *Ex-situ* metody zahrnují bioremediace v suspenzním systému (angl. slurry phase bioremediation), bioremediace v pevné fázi (angl. solid phase bioremediation), do které patří technologie jako jsou land farming a kompostování a jejich další modifikace.

4.3.3.1. Bioremediace v pevné fázi

Land farming technologie se obvykle provádí na separovaných dekontaminačních plochách (*ex-situ*) nebo přímo v povrchových vrstvách půdy (*in-situ*). Kontaminovaná zemina je rozprostřena na nepropustné podloží, je provlhčena a případně je aplikováno hnojivo NPK. Na kontaminovanou zeminu se pak následně aplikují bakteriální preparáty s mikroorganismy schopnými rozkládat konkrétní typ znečištění; při dostatečné katabolické aktivitě mikroorganismů přirozeně osidlujících kontaminovanou zeminu se neprovádí žádná další inokulace mikroorganismy. Půda je v průběhu dekontaminace provzdušňována přehazováním. Průběžně se kontroluje vlhkost půdy, koncentrace živin a koncentrace polutantu. Technologie je používána pro čištění různých typů odpadů a kontaminovaných zemin (Guerin, 1999).

4.3.3.2. Kompostování

Kompostování je kontrolovaný biologický rozklad pevné organické hmoty za aerobních podmínek. Biologicky rozložitelný odpad (jako jsou zbytky zelených rostlin, biologicky rozložitelný komunální odpad, čistírenské kaly, zemědělský odpad, dřevní štěpky) je při tomto procesu transformován činností bakterií, hub a dalších organismů

na jednoduché sloučeniny (CO₂, dusičnany, aminokyseliny, aj.) a následně jsou pak v další fázi zpětně zabudovány do struktury humusu (Diaz et al., 2007).

Kompostování představuje bioremediační technologii, která je založena na zvýšení mikrobiální činnosti, čímž se vytvoří vhodné podmínky pro mineralizaci, kometabolismus a akumulaci některých organických látek. Při této technologii se využívají mikrobiální společenstva přítomná ve stanoveném prostředí a ve vnesených organických materiálech, jelikož izolace optimálních mikrobiálních druhů či společenství je poměrně složitá a vnesená kultura bývá často méně vitální a hůře přizpůsobená danému prostředí než kultura autochtonní (Jirků, 1997). Materiál může být uložen v rotačních bubnech, cirkulačních tancích, otevřených nádobách, silech nebo na otevřené hromadách (angl. biopiles) nebo záhonech (angl. windrow composting).

Při kompostování hraje důležitou roli především vhodná surovinová skladba (poměr C:N) a dostatečné množství strukturního materiálu, které dovolí přístup kyslíku, dále také přítomnost mikroorganismů a vhodná vlhkost kompostu; v průběhu kompostování je materiál pravidelně vlhčen a vzdušněn přehazováním, otáčením nebo vzdušnicím systémem. Proces kompostování je kontinuální proces, který se zpravidla rozděluje do následujících tří časových etap: fáze termofilní (rozkladu), fáze zrání (přeměny) a fáze maturace (dozrávání). Fáze rozkladu trvá přibližně 3 až 4 týdny, teplota v kompostovaném materiálu stoupá až na 50-70°C (podle výchozího materiálu) a dochází k rozkladu živin, které jsou vázány v organické hmotě. Fáze zrání trvá přibližně 6 týdnů, teplota postupně klesá a mineralizované živiny jsou zpětně zabudovány do humusového komplexu. V poslední fázi kompost získává stále více zemitou strukturu, živý humus se přeměňuje na trvalý humus, živiny jsou vázány pevněji. Celý proces kompostování trvá přibližně 3 až 6 měsíců v závislosti na použité technologii a druhu materiálu. Cílem intenzifikačních postupů je zrychlení mikrobiální činnosti např. aerací, optimalizací teplotního režimu, dodávaného množství živin či aplikací vhodných druhů mikroorganismů (Semple et al., 2001; Diaz et al., 2007).

Během poslední doby se kompostování stává jednou ze základních technologií pro čištění městských odpadů. Technologie kompostování má všechny základní předpoklady pro dekontaminaci materiálů (zemín, kalů, odpadů) kontaminovaných různými organickými sloučeninami (Beaudin et al., 1996; Kirchmann and Ewnetu, 1998; Semple et al., 2001). Jedná se využití při odstraňování znečištění způsobené

ropnými látkami, aromatickými sloučeninami (benzeny, xyleny, PAU), některými chlorovanými uhlovodíky a dalšími persistentními látkami jako pesticidy či PCB (Potter et al., 1999; Dubourguier, 2003; Šašek et al., 2003; Cajthaml and Šašek, 2005).

4.3.3.3. Přírozená atenuace

Přírozená atenuace je založená na přirozených metabolických procesech, které probíhají v mikrobiálních buňkách a odstraňují organické polutanty z kontaminovaných míst. Přírozená atenuace je spojována především s možností čištění podzemních vod a se situacemi, kdy vliv remediačních technik by nedosáhl účinnosti přirozených procesů (Lee et al., 2003). Pro její stanovení jsou vyžadovány základní informace:

- podrobná charakterizace lokality
- dlouhodobým sledováním lokality je potvrzen pokles koncentrace kontaminantu
- koncepční a prediktivní model k dosažení přirozené atenuace
- stanovení rizika pro ekosystém a pro lidskou populaci.

Pokles koncentrace cílového polutantu během sledované doby může mít řadu důvodů, z nichž jenom jeden je kompletní mineralizace (další důvody mohou být odpařování, adsorpce na částice půdy, biotransformace, chemická a fotochemická oxidace, aj.). Bylo navrženo několik prediktivních a koncepčních modelů, které by mohly umožnit předpovědět biodegradabilitu různých organických látek, ale žádný dosud neumožňuje spolehlivou předpověď zda bude sledovaný polutant mineralizován a jaké intermediáty metabolismu mohou v průběhu procesu vznikat. Tyto modely jsou založeny na fyzikálních a termodynamických vlastnostech polutantů, na bioakumulaci a rychlosti biodegradace polutantů za laboratorních podmínek, případně u koncepčních modelů na konkrétních znalostech biochemických procesů biodegradace.

Jako každou bioremediační metodu také přirozenou atenuaci ovlivňuje řada faktorů, především původ polutantu, jeho biodegradabilita, rozpustnost, koncentrace a případná toxicita. Důležitá je celková charakteristika kontaminovaného místa, tj. vlastnosti půdy, velikost částic, pH, teplota, přítomnost těžkých kovů a jiných toxických látek a v neposlední řadě i vlastnosti přítomné mikrobiální populace (Innemanová and Havlík, 2000). Přírozená atenuace byla prozatím využívána pro halogenovaná rozpouštědla a ropné uhlovodíky (předpoklady mají také další polutanty jako některé chlorované uhlovodíky či PCB) (Matějů and Kycil, 2000). Výhoda přirozené atenuace

spočívá v minimálních nákladech, ale celý proces může trvat i několik let a vyžaduje proto důsledný kontrolní systém (Leipe et al., 2005).

4.3.4. Ekotoxikologické hodnocení bioremediace

Ekotoxikologické hodnocení vhodným způsobem doplňuje chemické analýzy, kdy ne vždy je možno odhadnout případnou toxicitu pro daný ekosystém (Saterbak et al., 1999; Plaza et al., 2005). Testy ekotoxicity mohou nacházet uplatnění při různých bioremediačních technikách (Dorn and Salanitro, 2000; Fernández et al., 2005; Dawson et al., 2007). Využitím testů ekotoxicity v kombinaci s chemickou analýzou lze lépe a přesněji definovat sanační limity a vyhodnocovat úspěšnost bioremediace (Kyclyt et al., 2001; Küster et al., 2004a). Znečišťující látky jsou v prostředí rozkládány či transformovány přítomnou mikrobiální populací. Některé meziprodukty biodegradace či biotransformace mohou někdy představovat pro okolní ekosystémy a zdraví lidí větší nebezpečí než původní kontaminanty a jejich účinek může být zaznamenán právě pomocí biotestů (Tan et al., 1992; Philips et al., 2000a). Pokles koncentrace kontaminantů nemusí být tedy vždy následován poklesem toxicity (Belkin et al., 1994; Aichberger et al., 2004; Hubálek et al., 2007). Dobrým příkladem jsou PAU, které metabolickou aktivací mohou získávat mutagenní a karcinogenní vlastnosti (Bispo, et al., 1999). Významný faktor pro hodnocení situace znečištění půdního ekosystému představuje biodostupnost jednotlivých kontaminantů (Alexander, 2000; Jager et al., 2003). K posouzení, zda bioremediace kontaminovaného území vede skutečně k detoxifikaci, nestačí pouze konvenčně prováděné analytická stanovení, ale také správně zvolené testy ekotoxicity by mohly odhalit potencionální nebezpečí (Aichberger et al., 2004; Küster et al., 2004a; Kyclyt et al., 2004; Hubálek et al., 2007).

V ČR jsou dosud ekotoxikologické testy prováděny pouze ve vodném výluhu, který má modelovat reálné situace nastávající ve volné přírodě jako jsou splachy, vymývání a déšť. Studie prováděné v zahraničí však naznačují, že pro objektivní posouzení ekotoxicity pevných vzorků kontaminovaných zemin je testování vodného výluhu nedostačující, a je třeba tyto metody rozšířit o tzv. kontaktní (terestriální) testy ekotoxicity, kdy se testovaná látka dostává do přímého styku s organismem (Matějů et al., 2005a; Leitgib et al., 2007; Domene et al., 2008; Kočí et al., 2008).

4.4. Ekotoxikologická legislativa v ČR

V současné legislativě ČR je použití testů ekotoxicity uplatňováno při posuzování nebezpečných vlastností odpadů. V souladu s platnými právními předpisy jako je vyhláška MŽP a MZd č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, ve znění pozdějších úprav (MŽP, 2001) a Metodickým pokynem odboru odpadů MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů (MŽP, 2007) se v současné době v ČR hodnotí nebezpečná vlastnost odpadů „H-14 Ekotoxicita“ na základě vybraných a doporučených testů ekotoxicity. Ekotoxicita je obecně definována jako nebezpečná vlastnost odpadu, představující akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí (MŽP, 2001).

Jako bioindikátory se podle uvedeného metodického pokynu a vyhlášky používají hořčice bílá *Sinapis alba*, ryby *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio*, řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve *Selenastrum capricornutum*) nebo *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) a korýš *Daphnia magna*. Tyto testy ekotoxicity se provádějí v souladu se čtyřmi českými normami a předpisy (ČSN EN, 1995; ČSN EN ISO, 1997; ČSN EN ISO, 1999; MŽP, 2007). Všechny předepsané testy ekotoxicity se provádějí výhradně ve vodném výluhu. Testované organismy reprezentují různé články ekosystémů s možnou rozdílnou citlivostí k různým látkám obsaženým ve vzorku. Pro stanovení ekotoxicity jsou rozhodující výsledky testu nejcitlivěji reagujícího organismu.

Pro potvrzení nebo vyloučení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti „H14 - Ekotoxicita“ ve smyslu vyhlášky č. 376/2001 Sb. se vychází z definice této vlastnosti uvedené v příloze č. 1, kde ekotoxicitou se rozumí taková vlastnost odpadu, která představuje akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Nebezpečnou vlastnost „H14 Ekotoxicita“ mají odpady, jejichž vodný výluh ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z předepsaných testů při určené době působení na testovací organismus vykazuje hodnoty LC_{50} (EC_{50} , IC_{50}) $< 10 \text{ ml.l}^{-1}$ (MŽP, 2001).

5. Materiál a metody

5.1. Příprava vodného výluhu zemin

Vodný výluh je roztok, který je připraven ze vzorku podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě (ČSN EN, 2003). Do skleněné zábrusové láhve o objemu 2000 ml se naváží 100 g suché hmotnosti zeminy a přidá se 1000 ml destilované vody (poměr tuhá fáze : voda = 1:10). Po 24 hodinách třepání na rotační třepačce otáčením láhve o 360° přibližně 8krát za minutu při teplotě 15 - 25 °C se oddělí kapalná a tuhá fáze filtrací přes papírové filtry se střední velikostí pórů 5 µm. Testy ekotoxicity se provádějí co nejdříve po přípravě vodného výluhu. Vodný výluh zemin se pro potřebu testů ekotoxicity obohacuje zásobními roztoky a v případě potřeby je ředěn ředící vodou (normalizovaným postupem připravený roztok solí ve vodě) na zvolenou koncentraci. (MŽP, 2007).

5.2. Příprava standardizované půdy

Pro účely terestriálních testů ekotoxicity se používá zemina, která se připravuje z následujících složek (ISO, 1993a):

- rašelina, vysušená na vzduchu, jemně rozemletá, bez viditelných rostlinných zbytků (10 % hm.)
- kaolínový jíl, na vzduchu vysušený, obsahující aspoň 30 % kaolínu (20 % hm.)
- průmyslový křemenný písek, na vzduchu vysušený, převážně jemný s více než 50 % částic velikosti 0,05 – 0,2 mm (70 % hm.)
- případně 0,5 - 1 % CaCO₃ k dosažení pH 6,0 ± 0,5 na začátku testu.

Suché součásti se dokonale promíchají ve velkokapacitním laboratorním nebo domácím mixéru, pak se přidá požadované množství vody, přibližně 40 - 60 % celkové zadržovací kapacity půdy. Takto připravená půda se používá jako kontrolní vzorek v některých testech ekotoxicity.

V testech ekotoxicity této práce byl použit jemný křemenný písek o zrnitosti 4 mm (Sklopísek Střeleč, Mladějov, ČR), jíl - kaolinit (Horní Bříza, ČR) a zahradnická

rašelina tř. I, vrchovištní (AGRO CS, a.s., Česká Skalice), pH 3,5- 5,0, spalitelné látky min. 85 % hm., která byla proseta přes síto s velikostí ok 10x10 mm.

5.3. Maximální vodní kapacita půdy

Maximální vodní kapacita půdy (VPK_{max}) se stanovuje tak, že přibližně 200 g zeminy se umístí do keramického nebo skleněného válce (přibližně 10 cm v průměru) s jemnou tkaninou na dně a zemina se poklepe, aby sesedla. Válec se poté umístí do nádoby s destilovanou vodou tak, aby hladina vody byla asi ve výšce zeminy. Ve vodní lázni se válec ponechá 3 hodiny, poté se přemístí do nádoby s vlhkým pískem (zrnitost 0,1 – 0,7 mm). Přibližně po dvou hodinách se nádoba se zeminou váží v 30 minutových intervalech dokud se dvě po sobě následující měření neshodují. Nádoba s pískem musí být odvodňována (např. umístěním tkaniny na povrch vrstvy písku) a nádoba musí být přikryta, aby se zabránilo vysoušení vzorku. Stanovení se provádí ve třech paralelách. Pro výpočet VPK_{max} se také stanovuje suchá hmotnost zeminy (DECHEMA, 2001; ISO 1998b; ISO, 1993c).

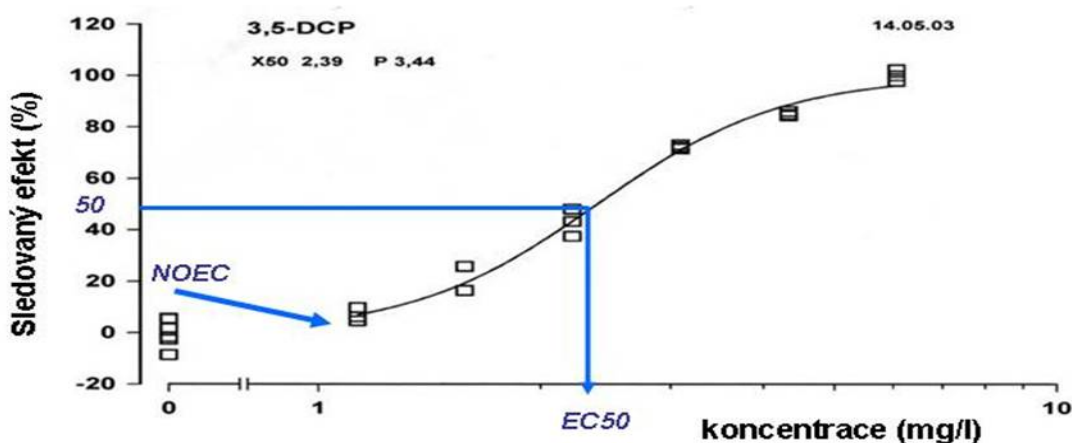
$$VPK_{max} (\%) = (a + b)/c \times 100$$

- a obsah vody ve 100 g zeminy při zahájení
- b obsah přijaté vody ve 100 g zeminy
- c suchá hmotnost 100 g zeminy.

5.4. Postup ekotoxikologického hodnocení

Kvalitativně je hodnocení ekotoxicity provedeno popisem účinku nebo účinků, které škodlivost způsobují. Kvantitativně je provedeno stanovením velikosti těchto účinků. K tomu se využívá měření závislosti velikosti účinku na dávce nebo koncentraci účinné látky. Ideálně má tato závislost tvar symetrické sigmoidy, který je zobrazen na obrázku 3, kde je využito vlastních výsledků biotestu s okřehkem *L. minor* při použití referenční látky. Na základě této sigmoidy lze odvodit koncentraci EC_{50} , která jedním ze základních vyjádření míry toxicity (Kočí et al., 2001a; Walker et al., 2003).

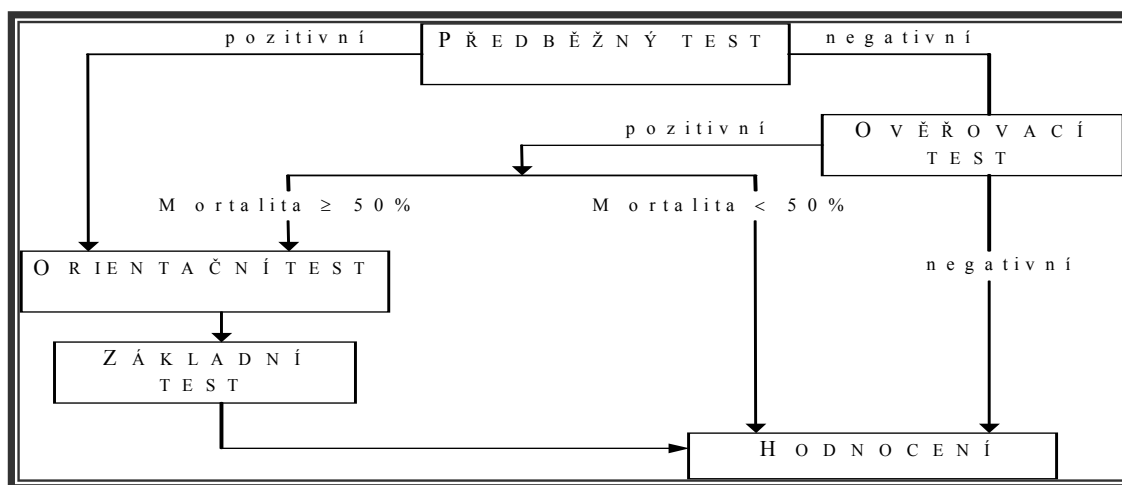
Protože závislost odpovědi organismů na koncentraci testované látky má sigmoidální charakter, který je těžko popsitelný přesnou rovnicí (jedině polynomem vyššího stupně), získaná data je třeba transformovat. Je možné vynést proti hodnotám odpovědi organismů logaritmy koncentrace a závislost vyjádřit pomocí lineární regrese. V bodě EC_{50} má totiž křivka inflexní bod a v jejím okolí je její průběh přibližně lineární. Tato přímka bohužel nekopíruje dostatečně křivku, při koncentracích nižších než EC_{50} je nad křivkou a v koncentracích vyšších je pod ní. Tuto systematickou odchylku lze řešit pomocí probitové analýzy, která transformuje data odpovědi organismů na probity (z angl. probability units). Sledovaná odpověď organismů se proto provádí proložením přímky probitovými hodnotami v závislosti na logaritmu dávky (příloha 1). Hodnoty EC_{50} jsou vyjádřeny u chemických látek v $mg.l^{-1}$, u výluhů v % ředění (příp. $ml.l^{-1}$) (Kočí et al., 2001a).



Obrázek 3 Charakteristický průběh ekotoxicity (inhibice růstu okřehku *L. minor* při použití různých koncentrací referenční látky 3,5-dichlorfenolu)

Pro popis toxicity se používá řada speciálních indexů, vedle EC_{50} (případně IC_{50} či LC_{50}) například $NOEC$ a $LOEC$ (nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které ještě není pozorován žádný účinek; případně nejnižší koncentrace u níž byl pozorován toxický efekt). Postupně se však upouští od používání indexů $NOEC$, $LOEC$ a jednoznačně se doporučuje používání statistických indexů jako např. EC_{50} (Isnard et al., 2001; Hanson and Solomon, 2002), případně přepočtu hodnot EC_{50} na toxické jednotky ($TU = 100 * EC_{50}^{-1}$) (Persoone et al., 2003).

Testy ekotoxicity se provádějí řadou na sebe navazujících testů, které tak ověřují toxické účinky na testovacích organismech. Příklad postupového diagramu testů ekotoxicity zobrazuje obrázek 4 (Kočí et al., 2001a).



Obrázek 4 Příklad postupového diagramu testů ekotoxicity (Kočí et al., 2001a)

Při úvodním předběžném testu dochází k prvnímu kontaktu testovacích organismů s neznámou látkou. Test slouží pro odhad ekotoxicity neředěného testovaného vzorku (vodného výluhu či zeminy) na testovací organismus. Výsledkem je zjištění, zda testovaná látka působí toxicky či nikoliv. Tento test tedy slouží k vyhledání intervalu koncentrací ředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) pro provedení základního testu ekotoxicity. V případě negativní odezvy se provede ověřovací test. Výsledek testu se hodnotí jako negativní, pokud je sledovaný efekt (inhibice, imobilizace aj.) nižší než 10 % ve srovnání s kontrolním vzorkem. V případě efektu nižšího než 50 % se další testy již neprovádějí a zjištěné výsledky jsou vyhodnoceny. Jakmile však sledovaný efekt překročí 50 %, provede se orientační test, jehož účelem je určit rozmezí koncentrací testované látky tak, aby nejnižší koncentrace nevykazovala toxický účinek a nejvyšší vykazovala 100 % účinek. Poté se provede základní test sloužící ke stanovení hodnoty EC_{50} (příp. IC_{50} , LC_{50}). Provádí se v pěti koncentracích v rozmezí určeném orientačním testem. Rozvržení koncentrací by mělo být okolo hodnoty EC_{50} symetrické.

Postupový diagram pro testy toxicity je uveden také v metodice MŽP pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a vychází z obecného postupu ekotoxikologického hodnocení (příloha 2) (MŽP, 2007).

5.5. Vybrané testy ekotoxicity

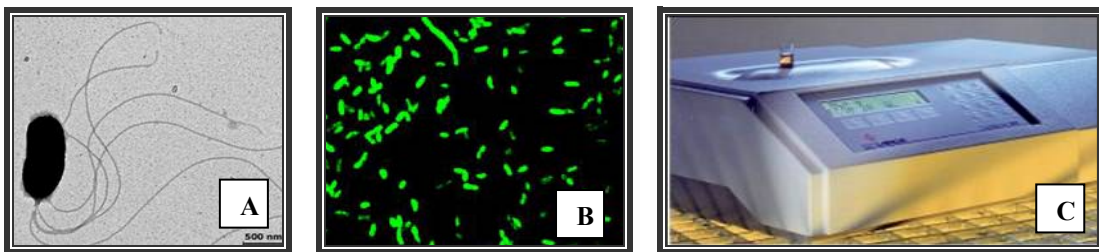
5.5.1. Test inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

5.5.1.1. Podstata testu

Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi kultur bakterie *Vibrio fischeri* (ISO, 1998c; ČSN EN ISO, 2000). Stanovuje se inhibiční účinek vzorku, případně i koncentrace vzorku způsobující 50 %, resp. 20 % inhibici emise světla v porovnání s kontrolním vzorkem (EC₅₀, EC₂₀).

5.5.1.2. Organismus

Testovacím organismem je lyofilizovaná bioluminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*; kmen NRLL-B-11177 (obrázek 5).



Obrázek 5 Bakterie *V. fischeri* (A), bioluminiscence *V. fischeri* (B) a luminometr LUMISTox300 (C)

Mořská bakterie *V. fischeri* je gram-negativní heterotrofní bakterie patřící mezi Vibrionaceae, velkou skupinu gamma-proteobacterií obsahujících mnoho druhů. Bakterie *V. fischeri* se v přírodním prostředí vyskytuje buď ve volném planktonickém stavu, kdy však bioluminiscenci nevykazuje, nebo jako symbiotická bakterie u některých mořských ryb a hlavonožců, kde kolonizuje specifické orgány vykazující tak bioluminiscenci (Ruby and McFall-Ngai, 1999; Visick and McFall-Ngai, 2000). Schopnost buněk bakterie *V. fischeri* emitovat světlo je díky expresi lux operonu, malého shluku 5 genů (luxCDABE), který v současnosti nachází uplatnění v biotechnologiích a v různých monitorovacích aplikacích (Girotti, et al., 2008).

5.5.1.3. Podmínky testu

teplota: $15 \pm 0,1$ °C
délka expozice: 15 min (příp. 5 min nebo 30 min)
pH vzorku: 6 - 8,5

5.5.1.4. Přístroje a pomůcky

- analytický luminometr : LUMINO M90a (ZD Dolní Újezd u Litomyšle, ČR) a LUMIStox 300 (Dr. Lange GmbH., Německo)
- termostat s řízenou teplotou $15 \pm 0,1$ °C
- pH metr (Denver Instr., USA)
- zkumavky
- pipety

5.5.1.5. Chemikálie

Jako ředící voda (normalizovaným postupem připravený roztok solí ve vodě k ředění vzorků a ke kontrolnímu stanovení) se používá 2 % roztok NaCl (pH $7 \pm 0,2$).

5.5.1.6. Postup testu

Nejprve se ověřuje pH a vodivost vzorku; pH by mělo být v rozmezí 6 - 8 (úprava HCl nebo NaOH) a vodivost vzorku by neměla přesáhnout 70 mS.cm^{-1} (při vodivosti vyšší než 35 mS.cm^{-1} se již nepřidává NaCl). Velmi toxické vzorky lze ředit 2 % NaCl, obvykle se volí ředění v poměru 1:2, 1:4, 1:8, atd.

Lyofilizované bakterie jsou uchovávány při -18 °C a před testem se rozmrazí a resuspendují v reaktivačním roztoku (2 % NaCl, příp. glukóza + 2 % NaCl). Připravují se požadované řady ředění testovaného vzorku. Základní měření je u ředění D2 (0,5 ml bakteriální suspenze + 0,5 ml testovaného vzorku). Při požadované teplotě 15 °C se v časových intervalech 30 s měří intenzita bioluminiscence v 0,5 ml zkušební suspenzi bakterií v ředící vodě (I_0). Ihned po té se do každé zkumavky se zkušební suspenzí přidává 0,5 ml testovaného vzorku, resp. 0,5 ml ředící vody do kontrolního vzorku. Po 15 min (resp. 30 min) se opět měří hodnota bioluminiscence (I_{15} , I_{30}). Testování se provádí ve dvou paralelních stanoveních.

5.5.1.7. Vyhodnocování testu

Kritériem hodnocení je snížení bioluminiscence měřené po 15 min, resp. 30 min expozici. Z naměřené změny intenzity bioluminiscence v kontrolním vzorku se vypočte korekční faktor (f_k), který slouží ke korekci počátečních hodnot I_0 všech vzorků (korekční faktor je měřítkem změny intenzity bioluminiscence kontroly během expozice). Výsledky bioluminiscence se nejčastěji uvádějí jako relativní inhibice bioluminiscence H či jako efektivní koncentrace EC_{20} (resp. EC_{50}). Hodnota EC_{20} není stanovována pokud se u neředěného vzorku (tj. 1. ředící stupeň) zjistí inhibice $H < 20$ %

při expozici 15 min či 30 min. Pro zjištění hodnoty EC₂₀ (resp. EC₅₀) se naměřené hodnoty produkovaného světla se nejprve transformují pomocí tzv. funkce gama (Γ₁₅), jež je definována jako poměr světla ztraceného v důsledku působení toxikantu (H) a světla zbývajícího. Logaritmus funkce gama (logΓ₁₅) se potom vynese v závislosti na logaritmu koncentrace do grafu, z něhož se grafickou interpolací nebo výpočtem zjistí efektivní koncentrace EC₂₀ (resp. EC₅₀) (tabulka 5 v kapitole 6.1.).

Postup výpočtu relativní inhibice bioluminiscence H (%):

$$f_k = I_k * I_0^{-1}$$

f_k korekční faktor

I_k intenzita bioluminiscence kontrolního vzorku po expozici 15 minut v relativních jednotkách bioluminiscence

I₀ intenzita bioluminiscence kontrolního vzorku zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředící vody v relativních jednotkách bioluminiscence

$$I_c = I_0 * f_k^*$$

f_k^{*} průměr hodnot f_k

I_c korigovaná hodnota pro zkumavky se zkoušeným vzorkem bezprostředně před přidáním zkoušeného vzorku

$$H = ((I_c - I_{15}) * I_c^{-1}) * 100$$

I₁₅ intenzita bioluminiscence zkoušeného vzorku po expozici 15 minut v relativních jednotkách bioluminiscence

$$\text{gamma } (\Gamma_{15}) = \% H / (100 - \% H)$$

5.5.1.8. Platnost testu

- hodnota korekčního faktoru pro expozici 15 nebo 30 min je v rozsahu 0,6 - 1,8
- paralelní stanovení se neodchylují od svých průměrů o více než 5 %
- referenční látka způsobuje při 15 min (resp. 30 min) expozici inhibici:
 - 1) 7,5 % NaCl (15 min či 30 min expozice a ředění D = 2) → inhibice 40 - 60 %
 - 2) 25 mg.l⁻¹ Zn²⁺ jako ZnSO₄*7H₂O (15 či 30 min expozice) → inhibice 20 - 80 %
 - 3) 4,0 mg.l⁻¹ Cr⁶⁺ jako K₂Cr₂O₇ (5 min či 30 min expozice) → inhibice 20 - 80 %.

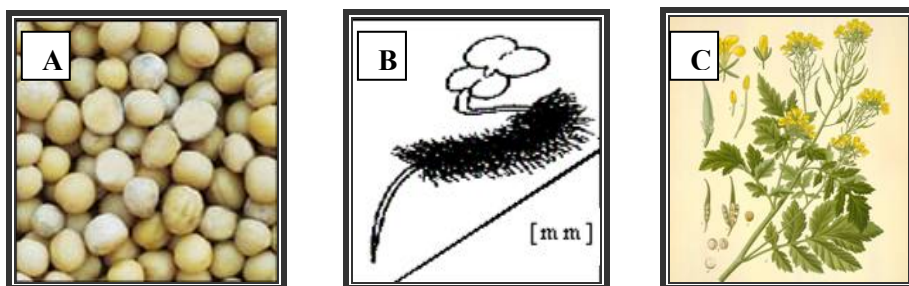
5.5.2. Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba* ve vodném roztoku

5.5.2.1. Podstata testu

Stanovení toxického účinku látek obsažených ve vodním výluhu na klíčivost semen a růst kořene v počátečních stádiích vývoje rostliny hořčice bílé *Sinapis alba* (ISO, 1993b; ISO, 1995; OECD, 2006a; MŽP, 2007). Test je založen na určení tzv. účinné počáteční inhibiční koncentraci testovaného vzorku, která za 72 hodin inhibuje růst rostlin o 50 % ve srovnání s kontrolním vzorkem (72h IC₅₀).

5.5.2.2. Organismus

V baterii testů ekotoxicity představuje hořčice bílá *Sinapis alba* (*Brassica alba* L.) zástupce vyšších rostlin a kulturních plodin (obrázek 6). Tato jednoletá olejnina patří do čeledi brukvovitých (Brassicaceae). Semeno rostliny je na brukvovité rostliny poměrně velké, je žluté nebo bělavě žluté kulovitého tvaru. Dosahuje průměru 1,5 - 4 mm, hmotnost tisíce semen se pohybuje od 3 do 6,8 g. Po vyklíčení vyrůstá jednoduchý kořen s hypokotylem; později je kořen kulovitý a bohatě rozvětvený (Bíbrová, 2005).



Obrázek 6 Hořčice bílá *S. alba* (**A** - semena; **B**- vyklíčená rostlinka s hypokotylem; **C**- dospělá rostlina)

5.5.2.3. Podmínky testu

teplota:	20 ± 2 °C
pH:	6 - 8 (úprava pomocí H ₂ SO ₄ 1:10 nebo 3 % NaOH)
množství roztoku:	10 ml na 2 vrstvy filtračního papíru na dně krabičky
počet semen:	15 - 30 v jedné nádobě
délka expozice:	72 hodin
osvětlení:	bez přístupu světla

5.5.2.4. Přístroje a pomůcky

- pH metr (Denver Instr., USA)
- Petriho misky (průměr 110 mm)
- filtrační papír
- pipety
- pinzeta
- milimetrové měřítko
- nůžky
- termostat

5.5.2.5. Chemikálie

Kontrolní vzorek (ředící voda) se připravuje ze zásobních roztoků (MŽP, 2003):

zásobní roztok 1: 18,5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

zásobní roztok 2: 49,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

zásobní roztok 3: 25,9 g/l NaHCO_3 ,

zásobní roztok 4: 2,3 g/l KCl

Z každého zásobního roztoku se odebere 0,5 ml a směs se doplní na 200 ml destilovanou vodou, pH se upraví na hodnotu $7,0 \pm 0,5$.

5.5.2.6. Postup testu

Filtrační papír vystřižený podle velikosti dna krabičky se uloží ve dvou vrstvách do Petriho misky a nasytí se 10 ml testovaného vzorku (vzorku vody, vodného výluhu či ředící vody jako kontroly). Na vlhké filtrační papíry se rovnoměrně rozmístí 15 - 30 semen. Takto připravené Petriho misky se umístí do termostatu (20 ± 2 °C), kde se inkubují bez přístupu světla po dobu 72 hodin.

Úvodní test se provádí s neředěným vodným výluhem. Poté se stanoví koncentrační rozmezí, v němž bude prováděn základní test. K vodnému výluhu se přidává ředící voda v poměru 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 (tabulka 1) a v návaznosti na předběžné testy se provede základní test (Kočí et al., 2001b).

Tabulka 1 Ředění výluhu v testu se *S. alba*

Ředění	Dávkování výluhu [ml]	Dávkování vody [ml]
1:2	3,33	6,67
1:4	2,00	8,00
1:8	1,11	8,89
1:16	0,59	9,41
kontrola	0	10

podle Kočí et al. (2001b)

5.5.2.7. Vyhodnocování testu

Zaznamenává se délka všech kořenů ve vzorku i v kontrole. Následně se vypočítá inhibice (stimulace) růstu kořene v dané koncentraci látky. Pro každé ředění se vypočítá aritmetický průměr délky kořenu z obou paralelních stanovení. Na základě průměrných délek kořenů v jednotlivých koncentracích se spočítá inhibice růstu podle následujícího vzorce:

$$I = ((L_K - L_V) / L_K) * 100$$

I inhibice nebo stimulace růstu kořene (%)

L_K průměrná délka kořene v kontrole (mm)

L_V průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

Základem pro hodnocení testu inhibice růstu je průměrná délka kořene zjištěná v kontrole a testovaném vzorku. Je-li **I** > 0, jedná se o inhibici, je-li **I** < 0, jedná se o stimulaci růstu kořene. Nevyklíčená semena i semena, která vyklíčí, ale nevytvoří koříněk, se započítávají do aritmetického průměru jako nulová délka kořene.

Jako kritérium ekotoxicity vzorků je použit statisticky významný rozdíl mezi průměrnou délkou kořene rostlin v referenčním vzorku (kontrola) a testovaném vzorku.

5.5.2.8. Platnost testu

- klíčivost semen v kontrole je nejméně 90 %,
- stanovená hodnota 72 IC₅₀ standardu (K₂Cr₂O₇ p.a) pro testovaná semena je v rozsahu 10 - 50 mg.l⁻¹

5.5.3. Test inhibice růstu kořene rostlin kontaktním testem

5.5.3.1. Podstata testu

Stanovení toxického účinku látek obsažených ve vzorku zeminy na klíčivost semen a růst kořene vybraných rostlin v počátečních stádiích vývoje. Základem tohoto biotestu jsou standardizované metodiky (ISO, 1993b; ISO, 1995; ISO, 2005; OECD, 2006a; OECD, 2006b).

5.5.3.2. Organismus

Testovací organismus – přebraná nepoškozená semena rostlin stejné velikosti, s klíčivostí minimálně 90 %. Pro testy ekotoxicity v rámci této práce byly vybrány tyto rostliny:

- hořčice bílá *Sinapis alba*
- salát hlávkový *Lactuca sativa*
- ječmen setý *Hordeum vulgare*



Obrázek 7 Kontaktní test ekotoxicity s rostlinami

5.5.3.3. Podmínky testu

teplota:	20 ± 2 °C
pH:	6 - 8 (úprava pomocí H ₂ SO ₄ 1:10 nebo krystalickým CaCO ₃)
množství zeminy:	250 g vlhké zeminy na nádobu
počet semen:	30 semen v jedné nádobě (příp. 100 semen pro test klíčivosti)
délka expozice:	5 dní (120 hodin)
osvětlení:	bez přístupu světla
kontrola:	standardizovaná půda

5.5.3.4. Přístroje a pomůcky

- plastové misky 11,0 x 13,5 cm, výška 4 cm, víčko stejných rozměrů
- filtrační papír
- pipety
- pinzeta
- milimetrové měřítko
- nůžky
- termostat
- pH metr (Denver Instr., USA)

5.5.3.5. Postup testu

Vzorky testované zeminy se zpracují do 10 dnů od odběru při skladování v lednici. Je-li pH vzorku menší než 6 nebo větší než 8, provádí se test se vzorkem s neupraveným i upraveným pH. Do plastových misek se naváží přibližně 250 g zeminy zvlhčené na hodnotu 70 ± 5 % VPK_{max}, pinzetou se rovnoměrně rozmístí po 30 semenech (příp. 100 semen) a s výjimkou semen salátu se zakryjí vrstvou zeminy. Misky se umístí do termostatu s teplotou 20 ± 2 °C, bez přístupu světla. Po 5 dnech se rostlinky opatrně oddělí od zeminy a hodnotí se klíčivost a zaznamenává se délka kořenů v testovaném i kontrolním vzorku.

5.5.3.6. Vyhodnocování testu

Při hodnocení klíčivosti se zjišťuje % rozdíl klíčivosti v kontrolním a testovaném vzorku. Základem pro hodnocení testu inhibice růstu je průměrná délka kořene zjištěná v kontrolním a testovaném vzorku. U rostlin s větším počtem kořenů se měří nejdelší kořen. Jestliže semeno nevyklíčí nebo vyklíčí, ale nevytvoří kořínek, započítává se tato hodnota do aritmetického průměru jako nulová.

Výpočet inhibice nebo stimulace se počítá pro neředěný vzorek zeminy:

$$I = ((L_K - L_V) / L_K) * 100$$

I inhibice nebo stimulace růstu kořene (%)

L_K průměrná délka kořene v kontrole (mm)

L_V průměrná délka kořene v neředěném testovaném vzorku zeminy (mm)

Je-li I > 0, jedná se o inhibici, je-li I < 0, jedná se o stimulaci růstu kořene.

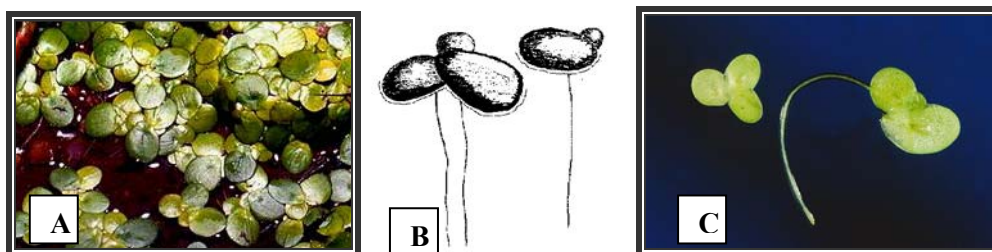
5.5.4. Test inhibice růstu okřehku *Lemna minor*

5.5.4.1. Podstata testu

Test je obecně navržen pro stanovení toxického vlivu rozpuštěných látek ve vodě nebo ve výluhu na růst okřehku *Lemna minor* (USEPA, 1996; Environment Canada, 1999; ISO/FDIS, 2005; OECD, 2006c). Zjišťuje se inhibice růstu okřehku (%); případně se určuje i koncentrace testované látky, která za 168 hodin způsobí 50 % inhibici růstu (168h IC₅₀). Inhibice růstu se stanovuje podle parametrů jako je počet listenů, plocha listenů, změna čerstvé nebo suché hmotnosti a změna množství chlorofylu.

5.5.4.2. Organismus

Testovacím organismem je krytosemenná rostlina okřehek menší *Lemna minor* (obrázek 8). Okřehek *L. minor* představuje rychle rostoucí, na hladině volně plovoucí rostlinu, jednu z nejmenších představitelů vyšších vodních makrofyt a kvetoucích rostlin. *L. minor* patří do třídy jednoděložných rostlin, čeleď okřehkovité (Lemnaceae). Nejznámějším druhem této čeledi je právě okřehek menší *L. minor*, mezi další zástupce této čeledi patří *L. gibba*, *L. valdiviana* a *Spirodella punctata* a také tyto druhy jsou někdy využívány v testech ekotoxicity (Greenberg et al., 1997; ASTM, 2000).



Obrázek 8 Okřehek menší *Lemna minor*

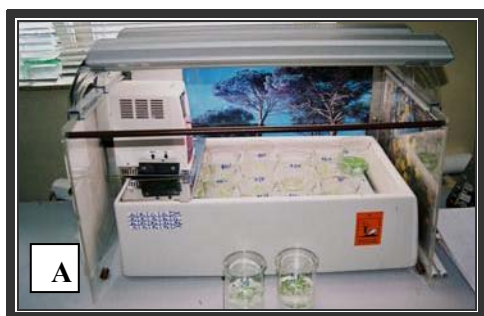
Okřehek menší *L. minor* (známý je lidový název - žabinec) je rostlina kosmopolitní, v ČR je rozšířena ve stojatých nebo mírně tekoucích vodách od nížin až do hor. Základem okřehku jsou ploché listeny, které mají tvar opačně vejcovitých destiček, širokých 2 až 3 mm a rozdělených podlouhlou žilkou na dvě části. Horní povrch listenu a jeho kraj jsou vodou nesmáčivé. Zdravé kolonie okřehku jsou tvořeny 2 až 5 listeny. Z dolní strany listenu vyrůstá jeden kořínek, který má tvar vlásku dlouhého několik cm, přizpůsobuje se pohybu hladiny a dává listenu stabilitu. Účinné přijímání,

vedení vody a v ní rozpuštěných látek je právě listenem. Okřehek se převážně rozmnožuje vegetativně a je schopen za vhodných podmínek (dostatečné fotosyntetické záření, dostatek živin) svoji biomasu exponenciálně zvyšovat (Wang, 1990).

Okřehek *L. minor* pro testy ekotoxicity byl získán z RWTH Aachen (Německo) a srovnávací kultura okřehku byla odebrána z přírodní lokality v Ohnišově (ČR).

5.5.4.3. Podmínky testu

- délka testu: 168 hodin (7 dní)
- světlo: 4 000 - 10 000 lx ($85 - 125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
- teplota: $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- pH: 5 - 10
- počet listenů v kádince: 10 (většinou 3 kolonie po 2 - 4 listenech)
- množství vzorku: 100 ml testovacího vodného vzorku ve 250 ml kádince
(90 ml vzorku + 10 ml 10krát koncentrovaného media)
10 g zeminy + 40 ml 2krát koncentrovaného media
- kontrola: živné medium, resp. křemitý písek
- udržování kultury okřehku *L. minor* v laboratorních podmínkách po dobu přibližně 8 týdnů před zahájením testování.



Obrázek 9 Kultivační zařízení testu s okřehkem *L. minor* (**A**- pracoviště MBÚ AV ČR, Praha, ČR; **B**- pracoviště UFZ, Lipsko, Německo)

5.5.4.4. Přístroje a pomůcky

- | | |
|--|--|
| ▪ kultivační zařízení- termostat
nebo vodní lázeň (obrázek 9) | ▪ zdroj světla- lampa (intenzita osvětlení
6 000- 8 000 lx) |
| ▪ pH metr (Denver Instr., USA) | ▪ pipety |
| ▪ sušárna | ▪ pinzety |

- digitální kamera LemnaTec, GmBH (Německo)
- nůžky
- kultivační a testovací nádoby - kádinky o objemu 250 ml
- analytické váhy

5.5.4.5. Chemikálie

Pro testování se používá buď tzv. SIS medium nebo Steinbergovo medium (ISO/FDIS, 2005, OECD, 2006c). V této práci bylo používáno Steinbergovo medium připravené podle ISO/FDIS (2005). Ředící vodou v testu je živný roztok (pH $5,5 \pm 0,2$, úprava NaOH nebo HCl), který je připraven smícháním zásobních roztoků a destilované vody. Složení jednotlivých zásobních roztoků živin a přípravu živného roztoku zobrazuje příloha 3.

5.5.4.6. Postup testu

V případě testování vzorků vody či vodného výluhu je do 250 ml kádinek připravena koncentrační řada vzorku o celkovém objemu 100 ml. Nejvyšší možnou použitou testovanou koncentrací vzorku je 90 ml vzorku a 10 ml 10krát koncentrovaného Steinbergova media. Pro testování vzorku sedimentu či půdy se v tomto testu jeví jako nejvhodnější použití 40 ml 2krát koncentrovaného Steinbergova média a 10 g sedimentu či půdy (Hubálek et al., 2004). Jako kontrolní vzorek je při testování výluhů použit živný roztok, pro testování vzorků půd je použit čistý křemičitý písek. Do každé kádinky je následně přidáno 10 listenů (tj. přibližně 3 kolonie; každá kolonie o počtu 2-4 listenů). Takto připravené kádinky jsou vloženy do vodní lázně s termostatem, kde jsou vzorky s okřehkem inkubovány za kontinuálního osvětlení po dobu 168 hodin. Na začátku a na konci testu je stanovováno pH.

5.5.4.7. Vyhodnocování testu

V testu se hodnotí inhibice růstu okřehku *L. minor* na základě specifické rychlosti růstu, která vychází z výsledků změn parametrů jako je počet listenů, plocha listenů, čerstvá a suchá hmotnost nebo množství chlorofylu. Doporučuje se sledovat alespoň 2 z těchto parametrů. Na konci testu (po 168 h) jsou listeny vizuálně spočítány, následuje hodnocení podle dalšího vybraného parametru (plocha listenů, změna hmotnosti, obsah chlorofylu). Počet listenů se doporučuje zaznamenávat nejen na konci

testu, ale i během jeho průběhu (nejlépe další dvě pozorování během sledovaného období) (ISO/FDIS, 2005).

Kromě grafického vyjádření lze růstovou rychlost μ (specifickou růstovou rychlost) vypočítat pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek:

$$\mu = (\ln N_n - \ln N_0) / t_n$$

N_0 počet listenů (či jiný parametr) na počátku testu

N_n počet listenů (či jiný parametr) na konci testu

t_n doba trvání testu

Na základě růstové rychlosti μ lze vypočítat hodnotu času zdvojení T_d :

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Z růstové rychlosti se získává % inhibice růstu $I_{\mu i}$ pro každou koncentraci:

$$I_{\mu i} = ((\mu_c - \mu_i) / \mu_c) * 100$$

je-li $I_{\mu i} < 0$, jedná se o stimulaci růstu

μ_c růstová rychlost v kontrole

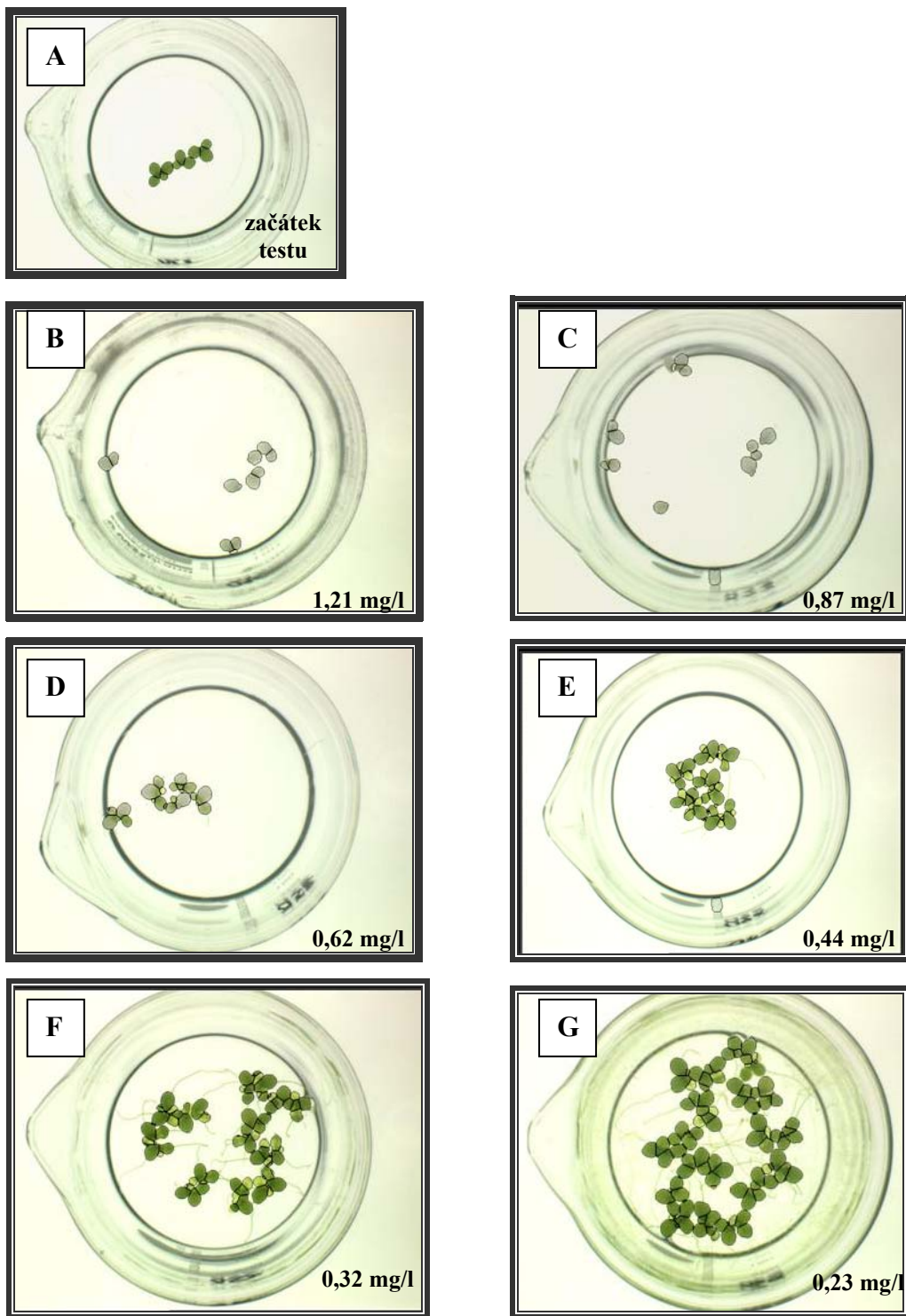
μ_i růstová rychlost v testované koncentraci

Výsledky jsou tedy založeny na srovnání nárůstu biomasy v kontrolním vzorku s nárůstem v jednotlivých testovaných koncentracích. Poměr mezi nárůstem v kontrolním roztoku a testované koncentraci je vyjádřen v procentech. Inhibice růstu biomasy lze hodnotit také pomocí probitové analýzy. Dalším výstupním parametrem může být hodnota IC_{50} .

5.5.4.8. Platnost testu

Při optimálních podmínkách je splněna validita testu právě na základě výsledků kontrolního vzorku a testu s referenční látkou (obrázek 10 a příloha 4):

- počet listenů v kontrolním roztoku se na konci testu zvýší nejméně 7krát
- pH v kontrolním roztoku se nezvýší o více než 1,5 jednotky
- specifická rychlosti růstu v kontrole je alespoň 0,275 dne, což koresponduje s časem zdvojení kratším než 2,5 dne
- hodnota IC_{50} 3,5-dichlorfenolu v rozmezí 1,8-3,6 mg/l.



Obrázek 10 Výsledky testu s okřehkem *L. minor* pro různé koncentrace referenční látky 3,5-dichlorofenolu (*A* - počátek testu; *B* - *G* po 7 dnech testu)

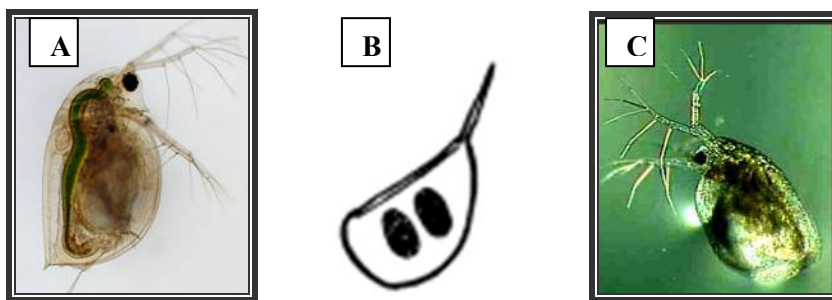
5.5.5. Test akutní imobilizace korýše *Daphnia magna*

5.5.5.1. Podstata testu

Test je založen na určení vlivu testovaného roztoku na pohyblivost neonat korýše *Daphnia magna*. Stanovuje se počáteční koncentrace zkoušené látky, která za 24 hodin imobilizuje 50 % jedinců *D. magna* (24h EC₅₀) vystavených podmínkám určených normami (OECD, 2004b; ISO, 1996; ČSN EN ISO, 1997).

5.5.5.2. Organismus

Zkušebním organismem je perloočka *Daphnia magna* (obrázek 11). Používají se neonaty (jedinci čerstvě vylíhli z vajíček; ne starší než 24 hodin) pocházející nejméně ze třetí generace získané acyklickou partenogenezí za definovaných chovných podmínek. Testovací organismy byly získány z komerčního testu (Daphtoxkit, 1996).



Obrázek 11 *Daphnia magna* (A, C) a její zimní vajíčko-ephipium (B) (foto R.Wagner)

Korýš rodu *Daphnia* je jedním z nejoblíbenějších testovacích organismů mezi bezobratlými (Adema, 1978; Mark and Solbé, 1998; Sanchez-Bayo, 2006; Bae and Freeman, 2007; Wu et al., 2007). *Daphnia* patří mezi korýše (Crustacea) do třídy lupenonožci (Cladocera), organismy běžně se vyskytující ve sladkovodních vodách. Tito korýši jsou důležitým článkem potravního řetězce, mají poměrně krátkou generační dobu, jsou citliví k širokému okruhu sladkovodních kontaminantů, relativně dobře se chovají v laboratorních podmínkách a v neposlední řadě se jedná o organismy poměrně malé, nevyžadující rozsáhlé chovné a testovací prostory.

5.5.5.3. Podmínky testu

- osvětlení: fotoperioda 16h světla / 8h tmy
- teplota: 20 ± 2 °C
- pH: 6-8
- rozpuštěný O₂: $\geq 7 \text{ mg.l}^{-1}$
- množství roztoku: 10 ml na 1 komůrku testovací destičky
- počet jedinců v testu: 5
- délka expozice: 24 h, případně 48 h

5.5.5.4. Přístroje a pomůcky

- přístroj na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku GOX 20 (Greisinger, Německo)
- pH metr (Denver Instr., USA)
- light box ULB – 150 (Microbiotests Inc., Belgie)
- testovací destička (Microbiotests Inc., Belgie)
- pipety
- Petriho misky
- skleněné láhve o objemu 1 a 5 l

5.5.5.5. Chemikálie

Ředící voda pro test inhibice pohyblivosti *D. magna* je identická s ředící vodou používanou pro test inhibice růstu kořene *S. alba* (viz kap. 5.5.2.5). Hodnota pH takto připravené ředící vody musí být $7,8 \pm 0,2$ (úprava pomocí NaOH nebo HCl). Provdušňováním se docílí hodnot koncentrace rozpuštěného O₂ nad 7 mg.l^{-1} .

5.5.5.6. Postup testu

V chovu je pravidelně kontrolováno pH a množství rozpuštěného O₂ ve vodě. Organismy jsou tříděny přibližně jednou za čtrnáct dní. Jako krmivo je používána zelená řasa *S. capricornutum*. Před provedením testu se rozdělují neonaty a mateřští jedinci přes síta průměru 0,5 mm a 0,01 mm. Neonaty se ihned po odběru používají pro test; mateřské jedince je možno vrátit do chovu. Během testu se organismy nekrmí.

Testovací destička je rozdělena na šest řádků odpovídajících různým koncentracím testované látky (1-5) a kontrolní vzorek (X), a pět sloupců zásobní komůrky + čtyři paralelní stanovení pro každou koncentraci A, B, C, D.

Test se provádí se vzorkem vody nebo vodného výluhu v různém koncentračním rozmezí v ředící vodě. Komůrky testovací destičky o obsahu 10 ml se naplní těmito koncentračními řadami podle výše uvedeného schématu. Do zásobních komůrek se přenese po dvaceti neonatech a odtud se umísťují po pěti jedincích do každé z paralelních komůrek A-D. Testovací destička se přikryje z důvodu zamezení výparu parafilmem a víčkem. Po 24 hodinách se zaznamenají počty imobilizovaných jedinců (za imobilizované se považují jedinci, kteří do 15 sekund po mírném zamíchání roztokem nedokáží aktivně plavat).

5.5.5.7. Vyhodnocování testu

Procentuální imobilizace korýšů se vypočítává na základě počtu imobilizovaných korýšů ve vzorku ve srovnání s kontrolou po 24, resp. 48 h testu.

$$I_{24(48)} = ((N_k - N_v) / N_k) * 100$$

$I_{24(48)}$ imobilizace korýšů po 24, resp. 48 h (%)

N_k počet přežívajících (aktivně se pohybujících) korýšů v kontrolním vzorku (%)

N_v počet přežívajících (aktivně se pohybujících) v testovaném vzorku (%)

5.5.5.8. Platnost testu

Platnost výsledků se posuzuje z hlediska dodržení následujících podmínek:

- koncentrace rozpuštěného O_2 na konci testu je větší nebo rovna 2 mg.l^{-1}
- procento imobilizace korýšů v kontrole je menší nebo rovno 10%
- 24h- EC_{50} pro $K_2Cr_2O_7$ je v rozsahu $0,6 - 1,7 \text{ mg.l}^{-1}$

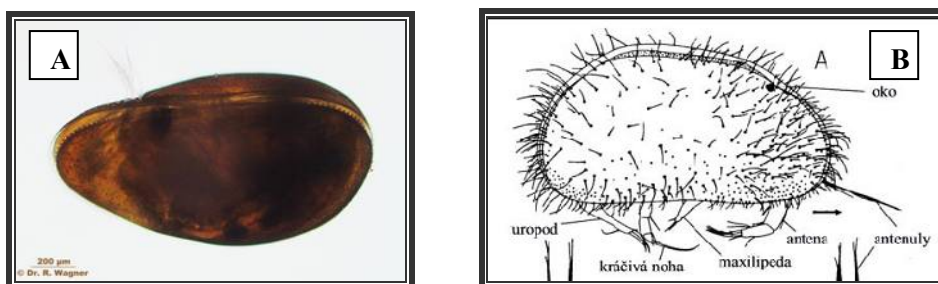
5.5.6. Test mortality a inhibice růstu korýše *Heterocypris incongruens*

5.5.6.1. Podstata testu

Kontaktní 6-denní test ekotoxicity s korýšem *Heterocypris incongruens* je určen pro přímé testování vzorků sedimentů a půd. Sledovanými parametry testu jsou mortalita a inhibice růstu korýše. Komerční provedení tohoto mikrobiotestu se nazývá OstracodToxkit FTM (Chial and Persoone, 2002a; Chial and Persoone, 2002b).

5.5.6.2. Organismus

Zkušebním organismem testu je bentický korýš *Heterocypris incongruens*. Tento drobný sladkovodní korýš náleží do třídy lasturnatky (Ostracoda). Lasturnatky mají laterálně zploštělé tělo, které je uzavřeno ve schránce inkrustované CaCO₃. Obecná morfologie lasturnatek je znázorněna na obrázku 12. Potrava lasturnatek se skládá většinou z řas, bakterií, živého či mrtvého rostlinného materiálu a výměšků bezobratlých. Lasturnatky procházejí osmi instary než dospějí. Teplota a chemismus vody ovlivňuje populační dynamiku lasturnatek, protože působí na vývoj jedince a životní cyklus (Nováček, 2007).



Obrázek 12 Korýš *Heterocypris incongruens* (foto R.Wagner (A); Nováček (B))

Testovací organismy pocházejí z komerčního kitu OstracodToxkit FTM (MicroBioTests Inc., Belgie).

5.5.6.3. Podmínky testu

- teplota: 25 °C
- množství vzorku: 2 ml řasové suspenze + 300 µl sedimentu (půdy)
- počet jedinců: 10 jedinců v testovací jamce
- délka expozice: 6 dní

- osvětlení: tma
- kontrola: sediment dodávaný v kitu (příp. jiný referenční vzorek)

5.5.6.4. Chemikálie

Ředící voda pro tento test se připravuje pomocí zásobních roztoků dodávaných v kitu. Zásobní roztoky jsou připravené koncentrace NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄, KCl, které se doplní do 1 l destilovanou vodou. Tato ředící voda se používá jako kultivační medium i jako medium pro přípravu řasové suspenze (Ostracodtoxkit, 2001).

5.5.6.5. Přístroje a pomůcky

- testovací kit - OstracodToxkit FTM (MicroBioTests Inc., Belgie)
- zdroj světla - kontinuální osvětlení (3000- 4000 lx)
- light box (MicroBioTests Inc., Belgie)
- mixér Vortex
- pipety



Obrázek 13 Biotest s korýšem *H. incongruens* – OstracodToxkitTM

5.5.6.6. Postup testu

Ředící voda se použije jako kultivační medium pro vylíhnutí korýšů z dodávaných cyst. 10 ml této ředící vody se přidá na Petriho misky s cystami korýše *H. incongruens*. Překryté misky jsou umístěny pod kontinuální osvětlení při teplotě 25 °C po dobu 52 hodin. Ředící voda se použije také pro přípravu řasové suspenze používané v testu jako krmivo. Z dodávaného prášku řasy *Spirulina* se pomocí přidané ředící vody a zamíchání na mixéru Vortex připravuje krmivo pro korýše. 48 h po startu inkubace cyst korýšů se krmivo přidává na Petriho misky, aby čerstvě vylíhnutí korýši měli dostatek potravy. Po vylíhnutí korýšů je u 10 jedinců zaznamenána jejich délka pomocí dodávané speciální měřicí destičky pod disekční mikroskop (čerstvě vylíhli korýši mají

velikost přibližně 200- 250 μm). Do každé jamky testovací destičky se při testu používá 2 ml připravené řasové suspenze, 10 čerstvě vylíhlých korýšů a 300 μl sedimentu (půdy). Přesné množství navlhčeného sedimentu (půdy) se nabírá a umísťuje do testovací jamky pomocí dodávané stříkačky. Testovací destička se překryje parafilmem a umístí na 6 dní při teplotě 25 °C do tmy. Po 3 dnech inkubace je doporučeno mírné promíchání testovací destičky z důvodu opětovného rozmíchání řas. Po 6 dnech je obsah každé jamky vybrán pomocí speciální mikropipety a je promýván přes síťku, kdy je tak odstraněn nejjemnější sediment. Zbytek obsahu (sediment a korýši) je poté umístěn na Petriho misky a pod disekčním mikroskopem je zaznamenáván počet a velikost korýšů (Ostracodtoxkit, 2001).

5.5.6.7. Vyhodnocování testu

Úmrtnost a inhibice růstu korýšů se vypočítává podle následujících vzorců:

$$X = ((N_k - N_v) / N_k) * 100$$

X úmrtnost korýšů po 6 dnech testu (%)

N_k počet přežívajících korýšů v kontrolním vzorku (%)

N_v počet přežívajících v testovaném vzorku (%)

$$I = 100 - ((L_v - L_0) * (L_k - L_0)^{-1}) * 100$$

I inhibice růstu korýšů (v %)

L_v průměrná délka korýšů v testovaném vzorku na konci testu

L_0 průměrná délka korýšů na počátku testu

L_k průměrná délka korýšů v kontrolním vzorku na konci testu

5.5.6.8. Platnost testu

Musí být splněna 2 základní kritéria testu:

- průměrná mortalita korýšů v kontrolním vzorku s referenčním sedimentem nesmí překročit 20 %
- průměrný přírůstek délky korýšů v kontrolním vzorku s referenčním sedimentem musí být nejméně 400 μm .

5.5.7. Testy se žížalami *Eisenia fetida*

5.5.7.1. Podstata testu

Při akutním testu s žížalami *Eisenia fetida* se zjišťuje mortalita žížal po působení určitých koncentrací testované látky (OECD, 1984; ISO, 1993a); subletální testy jsou hodnoceny podle inhibice reprodukce a inhibice růstu (ISO, 1998a; OECD, 2004a).

5.5.7.2. Organismus

Eisenia fetida je standardní testovací organismus hojně využívaný v terestrické ekotoxikologii (Kula and Larink, 1998). Dospělý jedinec této epigeické žížaly má délku těla cca 40-120 mm, průměr těla 2-4 mm, hmotnost 0,3-1,2 g. Vylíhnutí jedinci bývají nitkovití, jejich délka 12-20 mm. Dospělí jedinci jsou hnědočervené až červenofialové barvy (obrázek 14). Žížala *E. fetida* náleží do čeledi Lumbricidae. Tato vlhkomilná žížala se vyvíjí v substrátu při teplotě 18-25 °C, hranice pro existenci je asi 35 °C, resp. 5 °C (optimální vlhkost substrátu 60-85 %, optimální pH 6,5-7,5). Žížala *E. fetida* se vyskytuje nejčastěji v kompostu, hnoji a jiných organických substrátech, které postupně zpracovává a přeměňuje na humus. Je to oboupohlavní živočich. Kokony této žížaly jsou žlutozelené, někdy hnědavé až oranžové, jejich velikost je přibližně 3 mm. Z jednoho kokonu se přibližně po 3- 4 týdnech vylíhne několik (obvykle 2-5) mláďat, která dospívají přibližně už za 30 dní (Lowe and Butt, 2007).



Obrázek 14 Žížaly *E. fetida* (A), nádoby pro chov žížal (B), sklenice pro testování (C)

Pro účely této práce byly zakoupeny žížaly od firmy Pecl- Ekovermex, s.r.o., Pustějov, ČR.

5.5.7.3. Podmínky testu

- osvětlení: bez regulace osvětlení (případně kontinuální osvětlení)
- teplota: 20 ± 2 °C
- pH: 6-8

- množství zeminy: 250-300 g
- počet jedinců v testu: 10
- délka expozice: 28 dní
- referenční zemina: uměle připravená standardizovaná zemina

5.5.7.4. Přístroje a pomůcky

- chovné nádoby o obsahu 50 l s perforovaným víkem
- pinzeta
- klimatizovaná místnost (20 ± 2 °C).
- sklenice o obsahu 500 ml
- váhy

5.5.7.5. Postup testu

Chov žížal byl prováděn v 50 l nádobách se směsí zahradní zeminy, slámy a rašeliny, při teplotě 20 ± 2 °C, bez regulace osvětlení (obrázek 17). Nádoby byly překryty perforovaným víkem (případně perforovaným alobalem). Zemina byla podle potřeby zvlhčována tak (přibližně 50 % VPK_{max}). Přídavek krmiva (kukuřičného šrotu nebo sušených pelet vojtěšky) a rozemleté slámy byl regulován spotřebou tak, aby byla zajištěna stálá přítomnost přiměřeného množství na povrchu zeminy. Přibližně jednou za 2- 4 týdny byl obsah chovné nádoby provzdušněn promícháním. Přibližně po 3 měsících byly dospělé žížaly převedeny na čerstvý substrát, přičemž v původním substrátu s kokony se během dvou měsíců vytvoří nová generace žížal. Žížaly se považují za zdravé pokud se v substrátu pohybují a nesnaží se opouštět chovnou nádobu a kontinuálně se množí (Kula and Larink, 1998).

Vzorky zemin se zpracovávají do 10 dnů od odběru při skladování v lednici, zeminy se zvlhčují destilovanou vodou na hodnotu 50 ± 5 % VPK_{max}. Je-li pH vzorku menší než 6 nebo větší než 8, provádí se test se vzorkem s upraveným pH. Pro test se používají dospělé žížaly s relativně homogenním věkovým zastoupením (přibližně 2 až 12 měsíců) a s dobře vyvinutým opaskem (clitellum). Vybrané žížaly se 7 dní aklimatizují v referenční zemině používané v testu. Během této periody se žížaly krmí stejným substrátem jako v testu. Čerstvá hmotnost žížal *E. fetida* by měla být mezi 300 až 600 mg. Žížaly se opláchnou v misce s vodou o teplotě asi 20°C, poté se umístí na filtrační papír a po odkapání vody se váží celkový počet žížal na nádobu najednou. Do 500 ml sklenice se přidává přibližně 250-300 g zvlhčené zeminy. Do každé nádoby se umístí 10 dospělých žížal. Do 15 minut zdravé žížaly zalezou do zeminy, pokud

některá žížala zůstává na povrchu zeminy, je nutné ji vyměnit. Nádoby se zakryjí perforovaným víkem, umožňujícím přístup vzduchu. Přídavek potravy se provádí následující den po zahájení testu. Na povrch zeminy se dává přibližně 3 ml nabobtnalé vojtěšky (vojtěška ve vodě v objemovém poměru 1:3) na 300 ml zeminy v testovací nádobě a další přídavek vojtěšky se provádějí 1krát týdně během 4 týdnů testu. Pokud krmení zůstává na povrchu zeminy nespotřebováno, dávky se sníží. Během akutního testu toxicity se v časových intervalech po 7 dnech stanovuje počet živých žížal, po 14 a 28 dnech se zjišťuje hmotnost žížal. Nádoby se zeminou se umístí do vodní lázně s teplotou 40 °C a teplota se zvyšuje až na 60 °C, přibližně po 20 minutách se žížaly objeví u povrchu zeminy, odkud je lze snadno odstranit a spočítat. Pro kontrolu se ještě prohlídí celý obsah zeminy.

5.5.7.6. Vyhodnocování testu

Výsledky akutního testu toxicity se statisticky vyhodnotí, vliv vzorku na růst a mortalitu žížal se posuzuje ve srovnání s referenčním vzorkem.

Inhibice růstu žížal (I_{14} , I_{28}) – změna hmotnosti žížal ve srovnání s referenčním vzorkem, která je zjišťována po 14 a 28 dnech testu (vyjádření v %):

$$I_{14(28)} = ((m_k - m_v) / m_k) * 100$$

$I_{14(28)}$ inhibice nebo stimulace růstu žížal po 14, resp. 28 dnech testu (%)

m_k průměrná hmotnost žížal vztažená k počáteční hodnotě v kontrole (%)

m_v průměrná hmotnost žížal vztažená k počáteční hodnotě ve vzorku (%)

Úmrtnost žížal (I_{14} , I_{28}) - změna počtu uhynulých žížal ve srovnání s kontrolou, která je zjišťována po 14 a 28 dnech testu (vyjádření v %):

$$I_{14(28)} = ((n_k - n_v) / n_k) * 100$$

$I_{14(28)}$ úmrtnost žížal po 14, resp. 28 dnech testu (%)

n_k průměrný počet přežívajících žížal vztažený k počáteční hodnotě v kontrole (%)

n_v průměrný počet přežívajících žížal vztažený k počáteční hodnotě v testu (%)

5.5.7.7. Platnost testu

Musí být splněno základní kritérium testu, kdy mortalita žížal v kontrolním vzorku nesmí přesáhnout 10 %.

5.6. Popis a metodika vybraných bioremediačních postupů

Vzhledem k tomu, že toxicita uměle kontaminovaných vzorků nemusí přesně odrážet toxicitu starých zátěží, které jsou častým předmětem bioremediačních postupů, pro experimenty v rámci této disertační práce byly vybrány materiály reálně kontaminované různými typy polutantů (ropné látky, PAU, aj.)

5.6.1. Bioremediace kontaminované zeminy

Byla hodnocena změna ekotoxicity zeminy kontaminované ropnými uhlovodíky v průběhu bioremediace. Zemina byla odebrána z dekontaminační plochy společnosti ENVISAN-GEM, a.s. a testy byly prováděny v poloprovozním měřítku. Zemina byla kontaminována minerálními a hydraulickými oleji a mazivy. Experiment byl zahájen v květnu roku 2002 a trval do listopadu 2003.

Kontaminovaná zemina (koncentrace NEL = $6380 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) byla na dekontaminační ploše odebrána v přibližném množství 200 kg a poté byla aplikována inokulace 1,5 l bakteriálního preparátu GEM-100, který byl připraven společností ENVISAN-GEM, a.s. Základem bakteriálního preparátu GEM-100 jsou bakteriální kmeny *Pseudomonas* sp. a *Acinetobacter* sp. (optická denzita při 620 nm 8,25; pH 6,8; celkový počet aerobních heterotrofních bakterií $5,3\cdot 10^{10}$ KTJ.ml⁻¹). Počty bakterií v kontaminované zemině se během bioremediačního procesu pohybovaly v rozmezí 10^6 - 10^9 KTJ.g⁻¹ sušiny. Bylo odhadnuto, že množství bakterií schopných rozkládat uhlovodíky bylo 10^2 - 10^4 krát nižší než celkové množství aerobních heterotrofních bakterií a klesalo do okamžiku reinokulace stejným bakteriálním vzorkem po 14 měsících bioremediace.

Před zahájením experimentu byly stanoveny vybrané fyzikálně-chemické parametry zeminy a koncentrace NEL a vybraných těžkých kovů v zemině (příloha 5). Koncentrace vybraných kovů v kontaminované zemině byly podobné jejich přirozené koncentraci v prostředí, proto nebyl v biotestech předpokládán toxický účinek kovů. Změny koncentrací NEL v zemině a ve výluhu během bioremediačního experimentu jsou zobrazeny v tabulce 2. Výsledky uvedené v tabulce 2 a příloze 5 byly zpracovávány společností ENVISAN-GEM, a.s.

Množství NEL v zemině pokleslo během 17 měsíců bioremediace o 66 % (z původních 6380 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na 2200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Koncentrace NEL ve výluhu připravovaném pro ekotoxikologické testování také poklesla během bioremediace. Na konci experimentu byl zaznamenán pouze vyšší obsah některých uhlovodíků, jejichž biodegradace je již poměrně pomalá. Během bioremediace docházelo k poklesu obsahu živin (dusíku a fosforu) v důsledku bakteriální aktivity, proto byly tyto živiny přidávány do zeminy několikrát během experimentu (tabulka 2).

Tabulka 2 Vybrané parametry kontaminované zeminy během bioremediace

čas (měsíce)	dusík $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	fosfor PO_4^{3-}P ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	NEL v zemině ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	NEL ve výluhu ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	sušina (%)	pH (pH- KCl)
začátek	45,1	1,3	6380	900	86,6	7,9
1	5,2	1,9	4840	110	93,8	7,9
2	103,5	17,4	4360	150	96,8	7,3
3	22,7	8,8	4490	140	92,5	7,7
4	14,9	5,7	3680	80	93,5	7,6
5	20,0	9,5	3840	330	95,7	7,3
6	33,4	6,7	3650	80	92,0	7,6
7	65,5	11,0	3220	60	88,2	7,7
9	39,7	9,3	3450	60	93,2	7,6
10	28,9	10,7	3390	70	90,7	7,9
11	10,8	8,5	3290	50	91,9	7,7
12	4,7	7,9	2960	20	91,8	7,7
13	28,4	7,7	2520	10	91,0	7,5
14	4,4	6,3	2480	30	91,5	7,5
15	7,8	7,9	2410	50	93,3	7,6
17	7,3	6,1	2200	20	87,5	7,7

Ekotoxicita kontaminované zeminy v průběhu bioremediace byla hodnocena několika testy ekotoxicity - s bakteriemi *V. fischeri*, s korýši *H. incongruens*, s žížalami *E. fetida* a s vybranými druhy rostlin (*S. alba*, *H. vulgare*, *L. sativa* a *L. minor*).

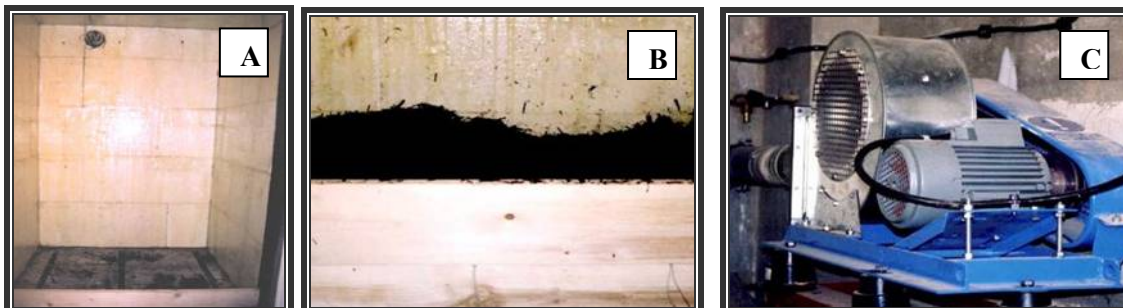
5.6.2. Kompostování kontaminované zeminy

Kontaminovaná zemina byla získána z areálu dřevařského závodu JDZ Soběslav. Zemina v tomto areálu byla dlouhodobě kontaminována během impregnace dřeva a v současné době v areálu probíhá sanace této staré ekologické zátěže. JDZ Soběslav je největším výrobcem železničních pražců a telegrafních sloupů v ČR. Impregnace dřevěných výrobků probíhá na lokalitě již od počátku minulého století, a to jednak kreosotovým olejem (produkt destilace černouhelného dehtu), jednak solemi těžkých kovů. Důsledkem dlouhodobé činnosti závodu je znečištění půdy a podzemních vod především PAU a fenoly, lokálně doprovázené kontaminací těžkými kovy a ropnými látkami (obrázek 15).



Obrázek 15 Kontaminace území jako následek impregnace dřeva

Kompostování bylo uskutečněno v kompostovací jednotce (obsah 2 t) s aktivní regulací vzduchu (obrázek 16). Přibližně 120 kg kontaminované zeminy bylo smícháno s 500 kg substrátu pro přípravu kompostu pro pěstování žampionů (tento substrát byl použit pro nastartování procesu kompostování). Celkem 6 vrstev kontaminované zeminy bylo vloženo mezi vrstvy tohoto čerstvého substrátu. Celková výška kompostovaného materiálu byla 1,5 m na počátku kompostování.



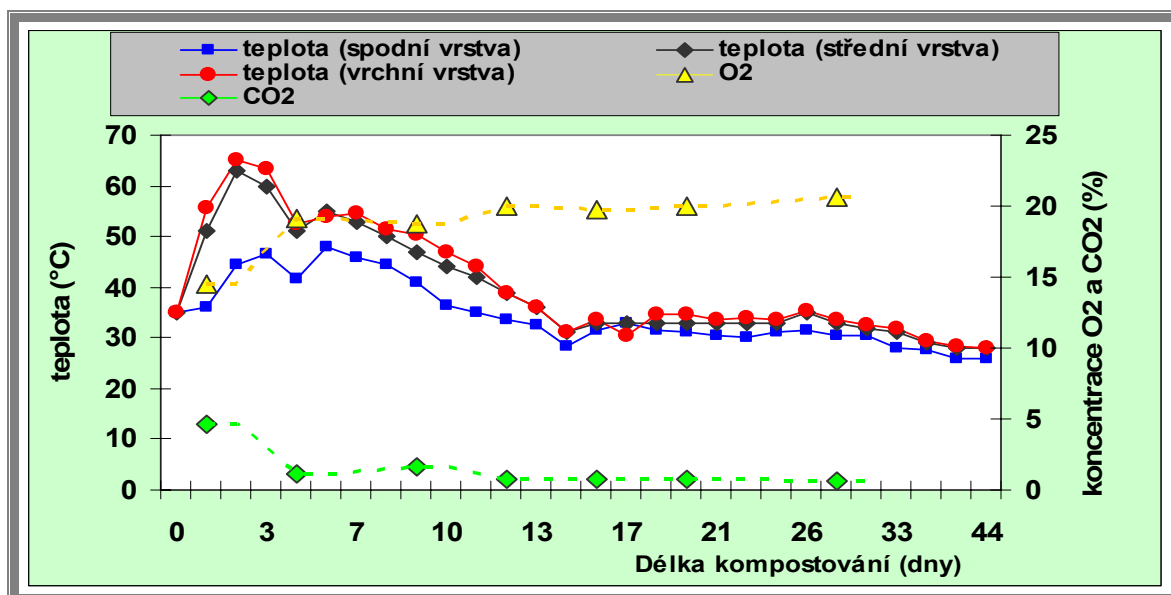
Obrázek 16 Kompostovací jednotka (A, B) a zajištění aerace této jednotky (C)

Celková počáteční koncentrace 16 PAU byla $1724 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (DIN 38407-F8 Standard). Kontaminovaná půda byla před zahájením experimentu sušena a prosívána sítím o velikosti ok 2 mm. Koncentrace jednotlivých PAU v zemině před zahájením kompostování zobrazuje tabulka 3. Další parametry kontaminované zeminy (struktura/textura zeminy, obsah některých živin, koncentrace vybraných těžkých kovů) z lokality JDZ Soběslav jsou zobrazeny v tabulce v příloze 6.

Tabulka 3 Koncentrace PAU v kontaminované zemině před kompostováním

suma PAU	1723,5	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
fenantren [PHE]	365,9	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
antracen [ANT]	102,3	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
fluoranten [FLT]	668,3	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
pyren [PYR]	427,2	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
benzo(a)antracen [BaA]	77,5	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
chrysen [CHR]	62,9	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
benzo(b)fluoranten [BbF]	9,3	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
benzo(k)fluoranten [BkF]	6,4	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
benzo(a)pyren [Bap]	3,7	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Během první fáze kompostování byl uvnitř kompostovací jednotky zaznamenáván průběh koncentrace O_2 a CO_2 a průběh teploty v různých částech kompostovací jednotky (u dna, ve středu a v horní vrstvě) (obrázek 17).

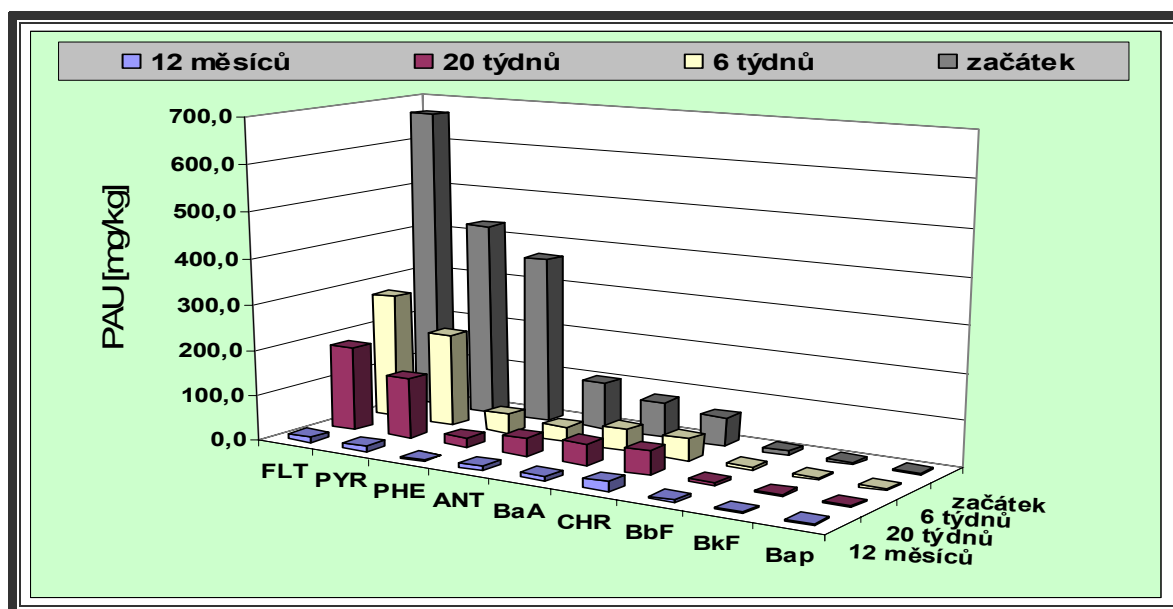


Obrázek 17 Průběh první fáze kompostování kontaminované zeminy

Délka první kompostovací fáze byla 6 týdnů, následovala 14-týdenní fáze maturace (zrání). Poté byl kompostovaný materiál převezen na plochu, kde následovala další venkovní fáze maturace trvající přibližně dalších 30 týdnů (přibližně 200 dní).

Vzorky kompostovaného materiálu pro analýzy a testy ekotoxicity byly odebrány po termofilní fázi kompostování a po fázi přeměny ze 3 částí kompostovací jednotky. Vzorkování bylo provedeno použitím kovové trubky (délka 1,5 m; průměr 100 mm), kterou byly odebrány vzorky ze středové a okrajové části kompostovací jednotky. Vzorkování půdy po venkovní maturaci bylo provedeno z náhodných míst hromady kompostu. Vzorky byly homogenizovány a sušeny při 40°C. Homogenizovaný vzorek byl podstoupen soxhlet extrakci při použití směsi aceton - hexan (1:3) po 12 hodin. Po odpaření rozpouštědla byl extrakt rozpuštěn v malém množství acetonitrilu a po sušení byl analyzován pomocí HPLC (Hewlet-Packard 1090) (ISO, 1998d).

Během kompostování byl zaznamenán významný pokles koncentrace PAU v zemině (obrázek 18). Obsah PAU po první intenzivní fázi kompostování činil 42 % původní koncentrace, po fázi přeměny 30,2 % a následně 5 % po další 200-denní venkovní maturaci kompostu. Celkový obsah PAU v zemině poklesl během 12 měsíců o 95 % (z hodnoty 1723,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na konečnou hodnotu 87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny zeminy).



Obrázek 18 Pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování

Pro hodnocení ekotoxicity byly do testovací baterie zahrnuty biotesty s *V. fischeri*, *S. alba*, *L. minor*, *H. incongruens* a *E. fetida*.

5.6.3. Remediaci kontaminované podzemní vody

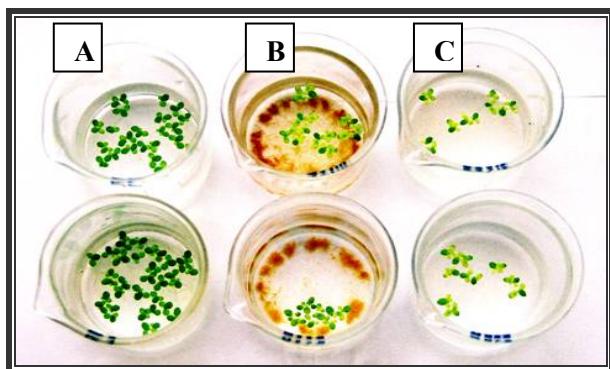
Ekotoxicita podzemní vody z lokality OZ-Chemie Horní Počernice byla hodnocena během období 2002-2005 (celková doba sledování představovala 34 měsíců). Sledovaná lokalita byly po desetiletí využívána jako sklad chemikálií a od roku 1995 probíhá na této lokalitě remediaci kontaminované podzemní vody. Podzemní voda z areálu OZ-Chemie Horní Počernice byla kontaminována směsnou kontaminací s hlavním podílem ropných látek a chlorovaných etylenů. Směsnou kontaminaci této podzemní vody tvořily chlorované etyleny (TCE, 1,1-, *cis*-1,2,- a *trans*-1,2-DCE, VC, aj.), chlorované alkany (chloroform, dichlor-, trichlor- a tetrachloretany, dichlormetan, tetrachlormetan), BTEX, chlorbenzeny, styren, organická rozpouštědla a patrně spousta dalších doprovodných polutantů, které nebyly předmětem sanace. Koncentrace hlavních kontaminantů (BTEX a chlorovaných etylenů) ve sledované podzemní vodě v roce 2002 před zahájením ekotoxikologického sledování podzemní vody na vybraných třech vrtech (HP-72, HP-81 a HP-88) zobrazuje tabulka 4. Podrobnější vyjádření koncentrací hlavních znečišťujících látek v podzemní vodě na vybraných 3 vrtech před zahájením ekotoxikologického hodnocení je uvedeno v příloze 7. V letech 2003-2004 bylo ekotoxikologické hodnocení rozšířeno také pro vzorky kontaminované podzemní vody z dalších dvou vrtů (HP-83 a HP-92) z důvodu potvrzení některých trendů při sledování procesu remediaci. Výsledky chemických analýz v tabulce 4 a v příloze 7 byly zpracovávány společností ENVISAN-GEM, a.s. Nejen vzhledem k složité situaci kontaminace (různé podmínky pro biologické odbourávání přítomných polutantů) nakonec nebylo nakonec přistoupeno k použití biologických metod (např. o uvažované přirozené atenuaci), přestože biologická dehalogenace v zájmové lokalitě byla prokázána (Matějů et al., 2005b). Od roku 2003 tak byly klasické fyzikálně-chemické sanační metody (sanační čerpání, stripping) podporovány aplikací neionogenní povrchově aktivní látky (NPAL) SUPERNEU[®]. Účelem aplikace NPAL bylo uvolnit sorbované znečištění a zvýšit výtěžnost sanačního čerpání. Toto promývání bylo provedeno ve dvou etapách v roce 2003 a v třetí etapě v roce 2004. Aplikací NPAL se zvýšila celková výtěžnost organických polutantů při sanačních čerpání, pozitivní vliv však nebyl zjištěn na všech čerpaných objektech (Matějů et al., 2005b).

Testy ekotoxicity byly realizovány z důvodu dalšího hodnocení této směsné kontaminace podzemní vody. Případné změny ekotoxicity vzorků kontaminované vody jsou vyjádřeny bez ohledu na změny koncentrací rozličných kontaminantů v podzemní vodě během remediacce, neboť byla zdokumentována silná fluktuace kontaminace v podzemní vodě mezi jednotlivými vrty. Z tohoto důvodu nejsou ekotoxikologické výsledky přímo porovnávány s množstvím dat získaných během chemických analýz, ale testy ekotoxicity jsou vyhodnocovány jako doplnění pohledu na hodnocení vybrané metody remediacce podzemní vody.

Tabulka 4 Koncentrace BTEX a chlorovaných látek v podzemní vodě na počátku sledování ekotoxicity

místo odběru	datum odběru	typ vzorku	suma BTEX ug/l	suma CIU ug/l
HP-72	13.03.02	voda	11,8	395,4
HP-81	21.03.02	voda	52,2	10898
HP-88	21.03.02	voda	-	53,2

Pro hodnocení ekotoxicity podzemní vody byly do testovací baterie zahrnuty biotesty s *V. fischeri*, *S. alba*, *L. minor*, *D. magna*. Obrázek 19 zobrazuje názorné využití biotestu s okřehkem *L. minor* při hodnocení vzorků kontaminované podzemní vody.

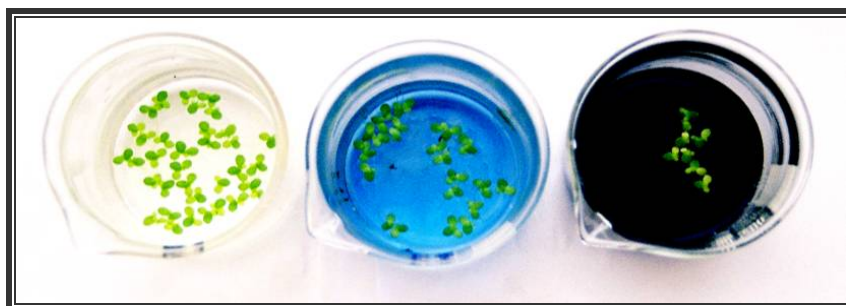


Obrázek 19 Růst okřehku *L. minor* v kontaminované podzemní vodě (A- kontrolní vzorek; B- podzemní voda z vrtu HP-72; C- podzemní voda z vrtu HP-81)

5.6.4. Biodegradace barviv

Cílem tohoto biodegradačního projektu byla dekolorizace dvou vybraných barviv (Orange G a RBBR) pomocí houby bílé hniloby *Dichomitus squalens*. V průběhu biodegradace byl sledován možný toxický vliv barviv na morfologické změny. Účinnost dekolorizace *D. squalens* byla hodnocena pro obě barviva v koncentracích 0,5 g.l⁻¹ a 3 g.l⁻¹ ve statické a třepané tekuté kultuře i na pevném agarovém mediu během 14 dní. Přítomnost barviva snížila produkci biomasy a rychlost růstu *D. squalens*, toto snížení bylo významnější u RBBR. Po 14 dnech dekolorizace byly elektronovým mikroskopem zaznamenány velice významné morfologické změny mycelia *D. squalens* rostoucích v mediích s barviv. Různé deformace jednotlivých hyf *D. squalens* byly významnější v pevném než tekutém mediu a při vyšší koncentraci barviv. Ve všech případech byly morfologické změny výraznější v přítomnosti barviva RBBR než Orange G (Eichlerová, et al., 2007).

Biodegradace (dekolorizace) barviv ale nemusí být vždy znakem úspěšné detoxifikace; příkladem může být vznik karcinogenních aromatických aminů při redukci a štěpění azo-vazeb. Toxicita barviv (Orange G a RBBR) v průběhu jejich biodegradace byla sledována biotestem s okřehkem *L. minor*, který byl vybrán jako vhodný klasický test ekotoxicity na doplnění výsledků hodnocení průběhu biodegradace barviv (obrázek 20). Inhibice růstu *L. minor* byla hodnocena podle 2 parametrů - inhibice počtu listenů a inhibice hmotnosti listenů. Vliv media (Kirkovo dusíkem limitované medium) použitého při dekolorizaci barviv nebyl brán v úvahu při hodnocení ekotoxicity biotestem s *L. minor*.



Obrázek 20 Využití biotestu s *L. minor* při hodnocení biodegradace barviv - růst *L. minor* v přítomnosti různých koncentrací barviva RBBR

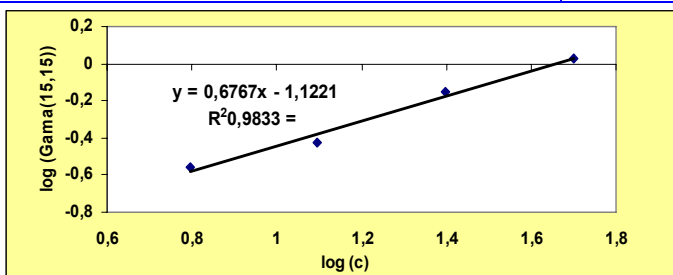
6. Výsledky

6.1. Vyhodnocování jednotlivých vybraných testů ekotoxicity

Výsledkové protokoly jednotlivých biotestů zobrazují příklady vyhodnocování testů ekotoxicity při vybraných bioremediačních experimentech (tabulka 5 až 10). Tabulka 5 znázorňuje protokol výsledků bakteriálního testu s *V. fischeri*. Jako příklad je v tabulce 5 využito vyhodnocení vzorku kontaminované zeminy použité v experimentu kompostování; podrobné ekotoxikologické výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny v kapitole 6.3.

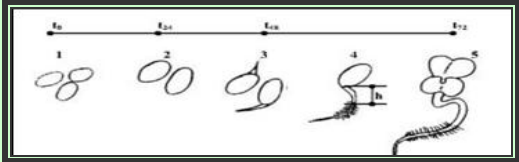
Tabulka 5 Protokol testu ekotoxicity - inhibice bioluminiscence bakterie *V. fischeri*

LUMISTOX							
vzorek	1A						
test	ředení D=2 (0,5 ml bakteriální suspenze + 0,5 ml vzorku)						
ředění (%)	50	25	12,5	6,25	2%NaCl		
čas 0	180	186,4	176,3	197,7	202,8		
	176,8	197,5	175,3	197,1	183,5		
čas (15 min)	61,6	84,2	99,78	117,1	144,7		
	68,6	85,6	93,4	116,3	145,9		
				Inhibice bioluminiscence (%)			
vzorek	I ₀	I ₁₅	I _c	H ₁₅	průměr	SD	
50	a	180	62	136	54,6	51,6	4,29
	b	177	69	133	48,6		
25	a	186	84	141	40,1	41,3	1,72
	b	198	86	149	42,5		
12,5	a	176	100	133	25,0	27,2	3,11
	b	175	93	132	29,4		
6,25	a	198	117	149	21,5	21,6	0,21
	b	197	116	149	21,8		
2%NaCl	a	203	145	153	5,4	0,0	7,65
	b	184	146	138	-5,4		
Průměr (I ₀)	187,34			$x=\log c$	$y=\log \Gamma_{15}$	c	Γ_{15}
SD (I ₀)	10,0			1,69897	0,0277	50	1,066
Korekční faktor (f _k)	0,754			1,39794	-0,1522	25	0,704
				1,09691	-0,4283	12,5	0,373
				0,7959	-0,5592	6,25	0,276
				$y = 0,6767x - 1,1221$ $R^2 = 0,9833$			
				$\log \Gamma_{15} = 0,6767 \log c - 1,1221$			
				$\text{pro } EC_{20}: \log \Gamma_{15} = 0,25$ EC₂₀ = 5,9 %			
				$\text{pro } EC_{50}: \log \Gamma_{15} = 1$ EC₅₀ = 45,5 %			




Tabulky 6 až 8 zobrazují příklady ekotoxikologického hodnocení vzorků kontaminované podzemní vody na základě průběhu biotestu s hořčicí *S. alba* (tabulka 6), biotestu s okřehkem *L. minor* (tabulka 7) a biotestu s korýšem *D. magna* (tabulka 8). Podrobnosti k výsledkům experimentu sledování změn ekotoxicity v průběhu remediací kontaminované podzemní vody jsou uvedeny v kapitole 6.4.

Tabulka 6 Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu kořene hořčice *S. alba*

testovaná semena: hořčice <i>S. alba</i> vzorek: neředitelný výluh																																			
kontrolní vzorek			vzorek č. 72			vzorek č. 81			vzorek č. 83			vzorek č. 88			vzorek č. 92																				
k1	k2	k3	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c																		
počet vyklíčených semen			počet vyklíčených semen			počet vyklíčených semen			počet vyklíčených semen			počet vyklíčených semen			počet vyklíčených semen																				
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15																		
délka kořenu (mm)			délka kořenu (mm)			délka kořenu (mm)			délka kořenu (mm)			délka kořenu (mm)			délka kořenu (mm)																				
46	62	35	37	52	33	14	22	23	13	29	37	10	26	15	38	46	32																		
43	47	38	24	46	47	18	15	20	41	33	46	12	28	24	42	48	30																		
40	42	43	30	36	38	12	33	22	33	35	27	23	17	20	25	42	43																		
30	38	42	53	30	35	10	15	24	42	38	38	13	18	24	36	40	30																		
34	52	40	48	40	37	14	23	30	24	25	32	27	22	38	35	36	41																		
33	55	43	44	43	30	13	18	22	38	28	25	15	23	28	43	30	35																		
40	43	52	35	28	38	10	22	38	34	22	36	30	24	30	40	35	30																		
42	45	47	52	60	42	12	28	25	38	30	35	25	40	15	38	35	32																		
44	35	40	43	50	26	8	20	18	36	32	38	22	18	20	30	37	35																		
31	45	37	38	40	33	7	23	15	27	27	33	25	22	16	35	38	25																		
42	42	38	35	47	25	9	17	13	45	32	32	26	32	18	33	42	22																		
49	46	53	30	38	35	12	24	20	32	37	36	28	18	20	44	45	35																		
38	33	57	33	38	40	15	16	25	35	33	48	20	25	15	32	35	42																		
34	38	35	38	43	38	16	15	21	48	25	34	18	22	21	48	26	38																		
45	41	38	40	32	39	12	20	22	25	22	30	19	24	25	38	28	29																		
průměrná délka kořenu			průměrná délka kořenu			průměrná délka kořenu			průměrná délka kořenu			průměrná délka kořenu			průměrná délka kořenu																				
39	44	43	39	42	36	12	21	23	34	30	35	20	24	22	37	38	33																		
průměr:			42			průměr:			39			průměr:			19			průměr:			33			průměr:			2,2			průměr:			36		
			inhibice: 8,1			inhibice: 56,1			inhibice: 21,5			inhibice: 47,1			inhibice: 14,5																				

Tabulka 7 Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu okřehku *L. minor*

vzorek	Den 0 (24,5°C)	Den 2 (25,1°C)	Den 5 (24,3°C)	Den 7 (23,2°C)	Datum: 6-13.9.2004					
					Rozmístění testovaných vzorků					
72 - A	10	14	19	32	<p>Na počátku testu (n= 20) :</p> <p>- průměrná hmotnost 10 listů: 0,97 µg</p> 	72 - A	81 - A	83 - A	88 - A	92 - A
- B	10	14	17	31		K - 1	72 - B	81 - B	83 - B	88 - B
- C	10	14	19	30		92 - B	K - 2	72 - C	81 - C	83 - C
81 - A	10	21	28	36		88 - C	92 - C	K - 3		
- B	10	17	25	38						
- C	10	18	25	34						
83 - A	10	16	22	31						
- B	10	15	22	30						
- C	10	14	19	28						
88 - A	10	16	19	29						
- B	10	15	19	25						
- C	10	15	19	27						
92 - A	10	14	19	32						
- B	10	16	24	40						
- C	10	16	22	38						
K - 1	10	22	39	89						
- 2	10	22	44	90						
- 3	10	18	33	77						
POČET LISTENŮ	Počet listů t ₀ = 10 (čas t ₇)	Průměr počtu listů (čas t ₇)	SD (čas t ₇)	Čas zdvojení (dny)	Průměr času zdvojení (dny)	Specific. Rychlost růstu	Prům. specific. rychlost růstu	Inhibice růstu (%)		
72 - A	32	31,0	0,82	4,17	4,29	0,166	0,162	47,2		
- B	31			4,29		0,162				
- C	30			4,42		0,157				
81 - A	36	36,0	1,63	3,79	3,80	0,183	0,183	40,2		
- B	38			3,63		0,191				
- C	34			3,96		0,175				
83 - A	31	29,7	1,25	4,29	4,47	0,162	0,155	49,3		
- B	30			4,42		0,157				
- C	28			4,71		0,147				
88 - A	29	27,0	1,63	4,56	4,91	0,152	0,142	53,7		
- B	25			5,30		0,131				
- C	27			4,88		0,142				
92 - A	32	36,7	3,4	4,17	3,77	0,166	0,185	39,5		
- B	40			3,50		0,198				
- C	38			3,63		0,191				
K - 1	89	85,3	5,91	2,22	2,27	0,312	0,306	-		
- 2	90			2,21		0,314				
- 3	77			2,38		0,292				

Tabulka 7 – pokračování Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu okřehku *L. minor*

HMOTNOST LISTENŮ	Váha misky	Váha (listeny + miska)	Váha listenů	Prům. váha listenů	SD	Specific. rychlost růstu	Prům. specific. rychlost růstu	Inhibice růstu
vzorek	(μg)	(čas t_7) (μg)	(čas t_7) (μg)	(čas t_7) (μg)	(čas t_7) (μg)			(%)
72 - A	112,3	115,6	3,3	3,7	0,3	0,171	0,185	34,3
- B	106,5	110,4	3,9			0,194		
- C	83	86,8	3,8			0,191		
81 - A	97,6	102,7	5,1	4,6	0,4	0,233	0,217	22,9
- B	124,5	129,1	4,6			0,218		
- C	107,4	111,5	4,1			0,202		
83 - A	102,1	106,6	4,5	4,2	0,3	0,215	0,205	27,4
- B	131,6	135,9	4,3			0,208		
- C	118,4	122,2	3,8			0,191		
88 - A	94,6	97,6	3,0	3,1	0,3	0,157	0,163	42,3
- B	107,3	110,8	3,5			0,179		
- C	096,2	99,1	2,9			0,152		
92 - A	122,9	126,6	3,7	5,0	0,9	0,187	0,226	19,7
- B	095,2	100,8	5,6			0,246		
- C	095,3	100,9	5,6			0,246		
K - 1	104,6	112	7,4	7,2	0,2	0,286	0,282	-
- 2	105	112,3	7,3			0,284		
- 3	117,4	124,3	6,9			0,276		
PLOCHA LISTENŮ	Plocha listenů	Plocha listenů	Změna plochy listenů	Prům. změna plochy	SD	Specific. rychlost růstu	Prům. specific. rychlost růstu	Inhibice růstu
vzorek	(čas t_0) (mm)	(čas t_7) (mm)	(čas t_7) (mm)	(čas t_7) (mm)	(čas t_7) (mm)			(%)
72 - A	109	269	160	148,0	8,6	0,129	0,129	51,1
- B	103	243	140			0,123		
- C	90	234	144			0,137		
81 - A	103	242	139	154,7	12,3	0,122	0,132	50,3
- B	109	278	169			0,134		
- C	95	251	156			0,139		
83 - A	107	234	127	129,0	4,3	0,112	0,118	55,3
- B	96	221	125			0,119		
- C	98	233	135			0,124		
88 - A	105	205	100	104,7	7,3	0,096	0,102	61,3
- B	96	211	115			0,113		
- C	99	198	99			0,099		
92 - A	90	299	209	221,0	12,4	0,172	0,172	35,0
- B	101	339	238			0,173		
- C	93	309	216			0,172		
K - 1	103	657	554	543,7	13,2	0,265	0,265	-
- 2	106	658	552			0,261		
- 3	95	620	525			0,268		

Tabulka 8 Protokol testu ekotoxicity - imobilizace koryšů *D. magna*

7.-8.10.2003	počet koryšů <i>D. magna</i> (den 0)	počet koryšů <i>D. magna</i> (den 1)	imobilizace <i>D. magna</i> (%)
vzorek			
72 - A	5	5	30
- B	5	5	
- C	5	5	
- D	5	4	
81 - A	5	3	30
- B	5	4	
- C	5	4	
- D	5	3	
83 - A	5	4	25
- B	5	3	
- C	5	4	
- D	5	4	
88 - A	5	5	5
- B	5	4	
- C	5	5	
- D	5	5	
92 - A	5	4	10
- B	5	5	
- C	5	5	
- D	5	4	
K - 1	5	5	0
- 2	5	5	
- 3	5	5	
- D	5	5	

Příklad vyhodnocování testu ekotoxicity s žížalami *E. fetida* zobrazuje tabulka 9; tento biotest byl využit pro hodnocení ekotoxicity bioremediace a kompostování kontaminované zeminy (kapitola 6.2. a 6.3).

Tabulka 9 Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu a mortalita žížal *E. fetida*

vzorek	Den 0		Den 7	Den 14			
	počet	hmotnost (g)	počet	počet	mortalita (%)	hmotnost / inhibice růstu (%)	
S1 - A	10	3,64	1	0	100	-	100
- B	10	4,26	2	0	100	-	100
- C	10	3,87	0	0	100	-	100
K - 1	10	3,92	10	10	0	4,19	0
- 2	10	4,65	10	10	0	4,75	
- 3	10	4,16	10	10	0	4,29	

Pozn. S1- zemina kontaminovaná PAU, K- kontrolní vzorek

V tabulce 10 je zobrazeno podrobné vyhodnocení biotestu nazývaného OstracodToxkit FTM s korýšem *H. incongruens*. V tomto protokolu je použito vyhodnocení biotestu se vzorky kontaminované zeminy z areálu Carborundum Svijany (kontaminace lehkými topnými oleji; NEL = 13 000 mg/kg), s kontaminovaným sedimentem z potoka Mlynařice (kontaminace motorovým olejem a naftou; NEL = 3 500 mg/kg) a referenční zeminou z areálu MBÚ Praha. Na základě těchto výsledků při první aplikaci biotestu s korýšem *H. incongruens* byl tento biotest dále využit pro hodnocení ekotoxicity bioremediačních postupů (kapitola 6.2. a 6.3.).

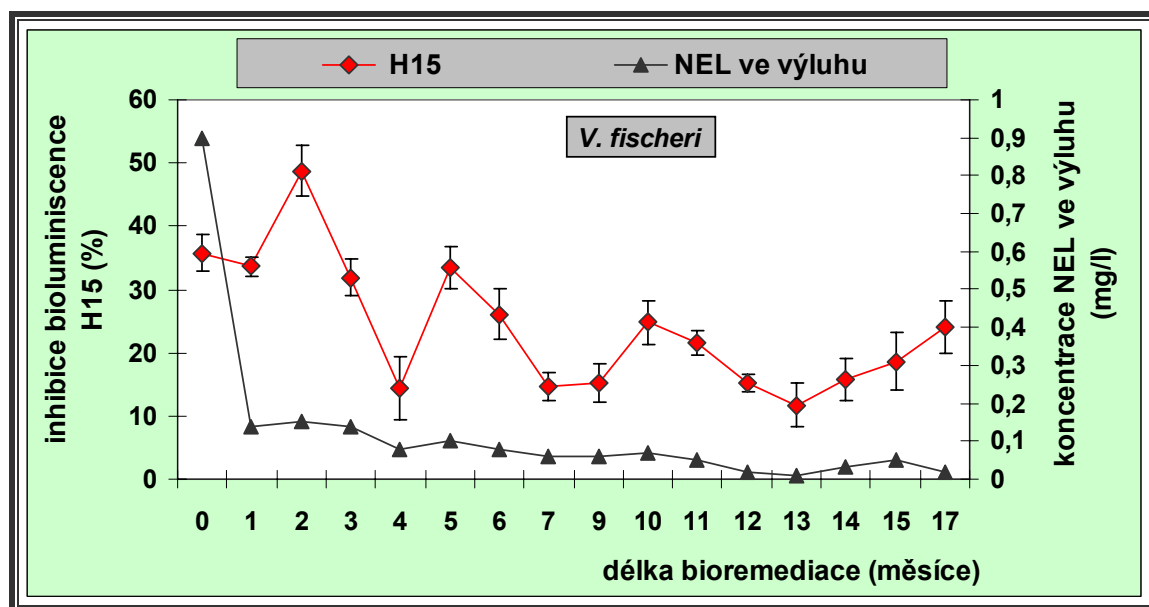
Tabulka 10 Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu a mortalita korýše *H. incongruens*

OstracodToxkit FTM													
testovaný organismus:	vzorky	MBÚ Praha				Mlynařice				Carborundum			
<i>Heterocypris incongruens</i> (velikost v µm) úmrtnost = d	den 0 vzorek	den 6.				den 6.				den 6.			
		č.1	č.2	č.3	č.4	č.1	č.2	č.3	č.4	č.1	č.2	č.3	č.4
	200	600	550	600	550	450	350	300	400	d	d	d	d
	200	600	600	650	600	300	400	350	450	d	d	d	d
	200	600	550	650	500	300	300	400	300	d	d	d	d
	200	550	600	600	550	400	350	450	350	d	d	d	d
	200	600	500	600	600	350	300	400	400	d	d	d	d
	200	650	600	650	600	350	350	350	d	d	d	d	d
	200	650	600	550	550	d	d	450	d	d	d	d	d
	200	600	650	600	600	d	d	400	d	d	d	d	d
	200	550	600	650	600	d	d	d	d	d	d	d	d
	200	600	600	500	600	d	d	d	d	d	d	d	d
ÚMRTNOST													
počet mrtvých korýšů		0	0	0	0	4	4	2	5	10	10	10	10
průměrná úmrtnost					0				4				10
průměrná úmrtnost (%)		0	0	0	0	40	40	20	50	100	100	100	100
průměrná úmrtnost (%)		MBÚ Praha 0				Mlynařice 37,5				Carborundum 100			
SD					0				1,26				0
INHIBICE RŮSTU													
průměrná délka korýšů	200	600	585	605	575	358	342	388	380				
průměrná délka	200				591				367				
průměrný přírůstek délky		400	385	405	375	158	142	188	180				
průměrný přírůstek délky					391				167				
průměrná inhibice růstu						233	250	204	211				
průměrná inhibice růstu									224				
průměrná inhibice růstu (%)						60	64	52	54				
prům. inhibice růstu (%)						Mlynařice 57				Carborundum -			
SD									5				

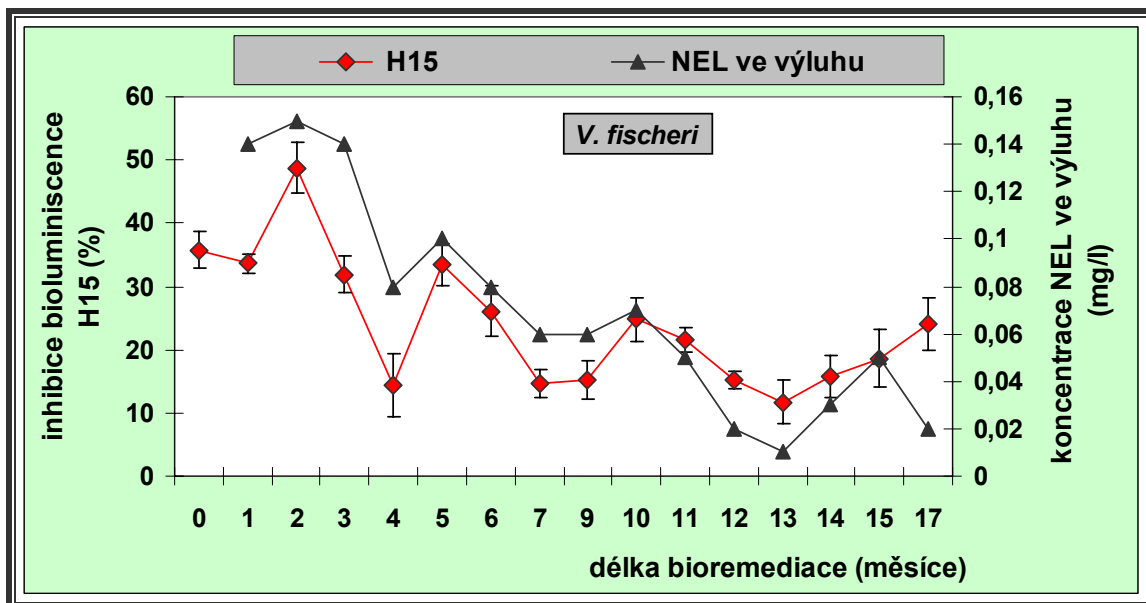
6.2. Bioremediace kontaminované zeminy

Ekotoxicita zeminy kontaminované ropnými látkami byla hodnocena v průběhu bioremediace několika testy ekotoxicity s následujícími organismy- s bakteriemi *V. fischeri*, s korýši *H. incongruens*, s žížalami *E. fetida* a biotesty s vybranými rostlinami (*S. alba*, *H. vulgare*, *L. sativa* a *L. minor*).

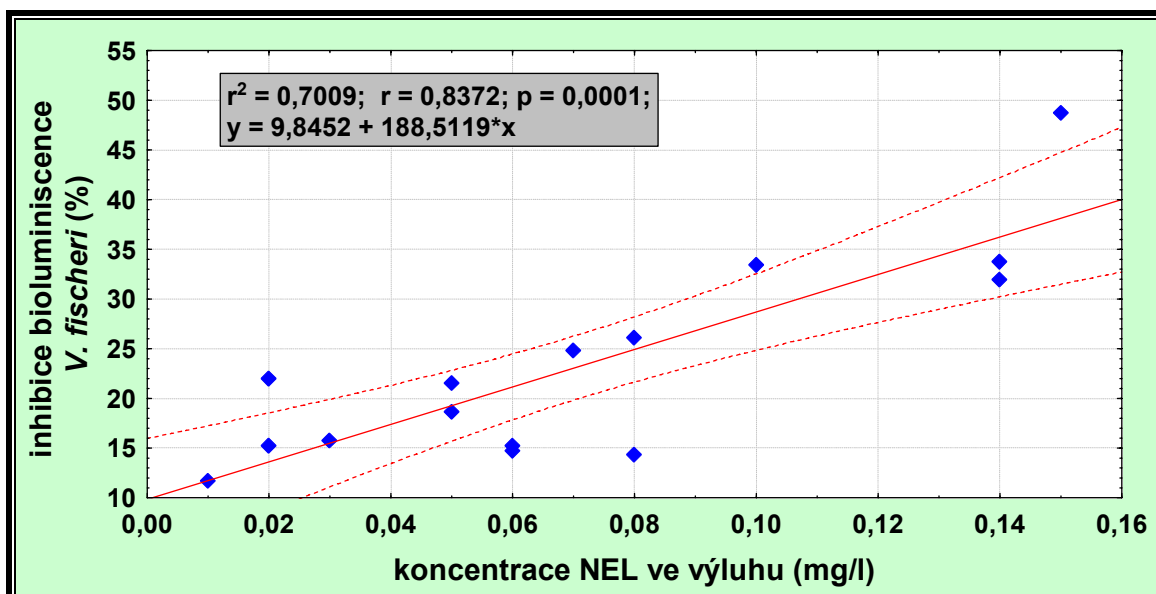
Biotest s bakterií *V. fischeri* byl vyhodnocován jako inhibice bioluminiscence (H_{15}), příp. byla vypočítávána hodnota EC_{20} . Během celého období experimentu hodnoty EC_{20} kolísaly, ale v některých fázích bioremediace nebylo možné EC_{20} určit kvůli nízké toxicitě výluhu, proto se při využití biotestu s *V. fischeri* ukázal vhodnější parametr inhibice bioluminiscence H_{15} . V průběhu bioremediačního procesu byl zaznamenán trend klesající inhibice bioluminiscence H_{15} (obrázek 21). Na obrázku 21 je znázorněn též pokles koncentrace NEL ve výluhu (podrobné výsledky uvedeny již uvedeny v tabulce 3, kapitola 5.1.). V případě že je z grafického i statistického hodnocení vyloučena hodnota koncentrace NEL ve výluhu na počátku bioremediace (obrázek 22), lze získat korelaci mezi výsledky inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a koncentracemi NEL ve výluhu v průběhu bioremediace (korelační koeficient $r = 0,84$; $p < 0,001$) (obrázek 23).



Obrázek 21 Inhibice bioluminiscence *V. fischeri* během bioremediace kontaminované zeminy

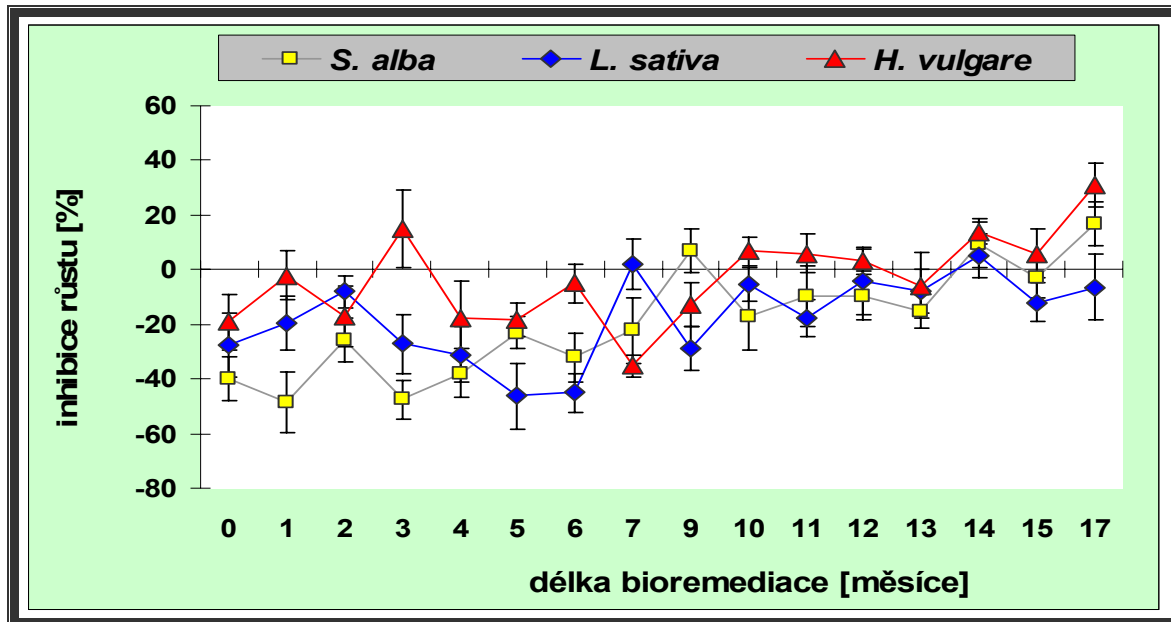


Obrázek 22 Grafické srovnání výsledků inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a poklesu koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy

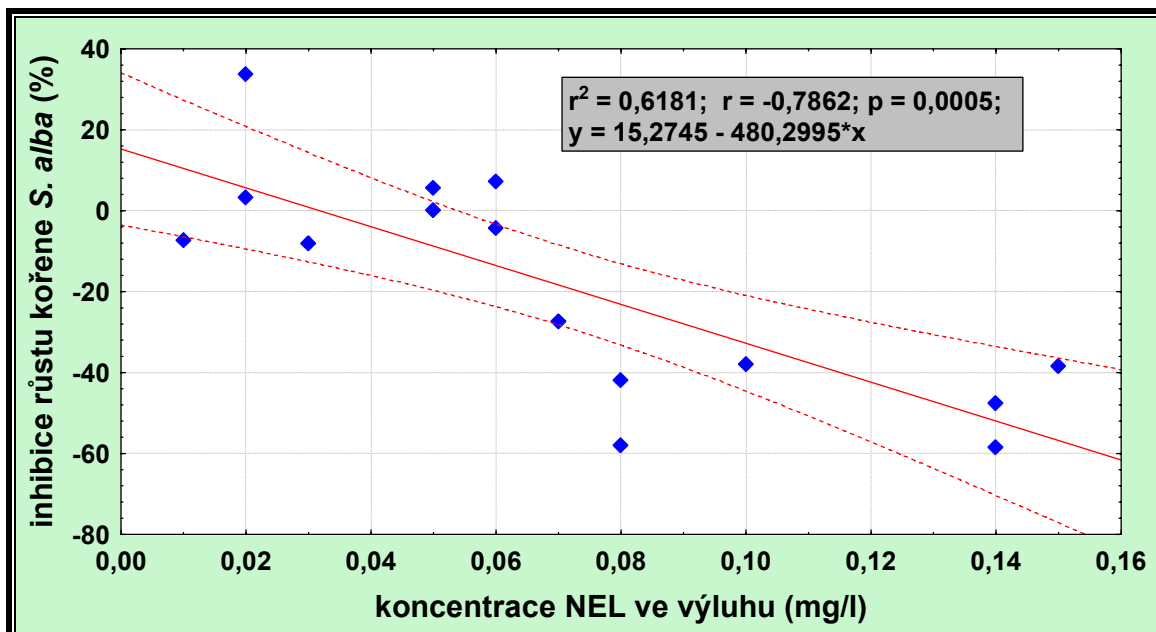


Obrázek 23 Inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy

Pro testování ekotoxicity ve variantě s výluhem z kontaminované zeminy i v kontaktním upořádání byly využity rostliny *S. alba*, *H. vulgare* a *L. sativa*. Při testování výluhů byl zaznamenán během téměř celého bioremediačního experimentu především stimulační účinek na růst kořene všech použitých rostlin (obrázek 24). V průběhu bioremediačního procesu byl zaznamenán určitý trend poklesu stimulačního účinku výluhu z kontaminované zeminy na růst kořene rostlin, který na konci bioremediace v případě *H. vulgare* a *S. alba* vyústil až k záznamu inhibice růstu kořene *H. vulgare* a *S. alba*. Tento trend není v souladu s poklesem koncentrací NEL ve výluhu a zjištěné závislosti výsledků biotestu s *V. fischeri*. Nejvyšší rozdíl mezi koncentracemi NEL ve výluhu a inhibicí růstu kořene byl zaznamenán pro *S. alba*, kdy při postupném poklesu koncentrace NEL docházelo k poklesu stimulace růstu kořene *S. alba*; tj. při nejnižších hodnotách koncentrace NEL byla naopak zaznamenána nejvyšší míra inhibice růstu kořene (negativní korelace) (obrázek 25). Při výluhovém testu se salátem *L. sativa* nebyla zaznamenána inhibice růstu kořene během celého sledovaného období bioremediace. Výsledky rostlinných testů s výluhy jsou tedy v rozporu s výsledky testu s *V. fischeri*.



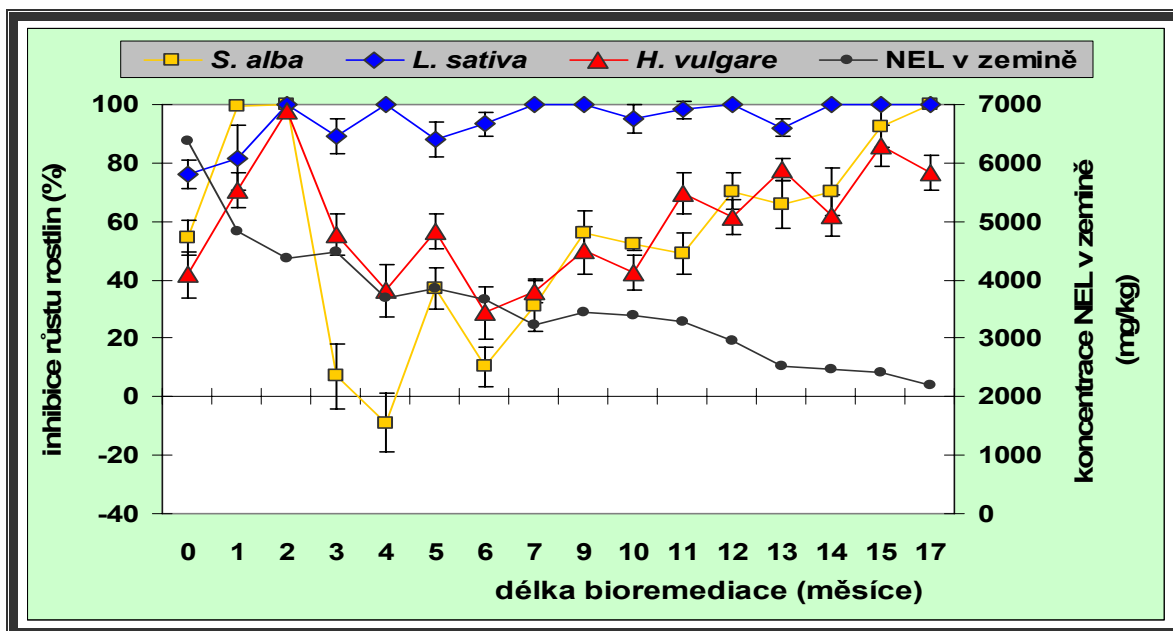
Obrázek 24 Inhibice růstu kořene rostlin během bioremediace kontaminované zeminy - test s výluhy



Obrázek 25 Inhibice růstu kořene *S. alba* ve vztahu k poklesu koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy

Rostliny *S. alba*, *H. vulgare* a *L. sativa* byly také využity pro testování ekotoxicity ve variantě v kontaktním upořádání s kontaminovanou zemínou. Byly získány rozdílné výsledky kontaktních testů s rostlinami ve srovnání s rostlinnými biotesty, které hodnotily půdní výluhy. Na rozdíl od biotestů s výluhy tyto 3 vybrané rostliny projevily značnou citlivost na kontaminovanou zeminu v kontaktním uspořádání. Výsledky kontaktních testů s rostlinami zaznamenaly významný ekotoxický vliv kontaminované zeminy v průběhu celého období bioremediace (obrázek 26). Velice podobný průběh výsledků byl zaznamenán pro kontaktní test s *S. alba* a *H. vulgare*; byla zjištěna významná korelace ($r = 0,82$; $p < 0,001$) mezi výsledky těchto dvou biotestů (obrázek 31). Nejvyšší inhibice růstu kořenů byla zaznamenána u *S. alba* a *H. vulgare* během prvních 2 měsíců a pak ke konci období bioremediace, zejména po reinokulaci bakteriálního preparátu na zeminu ve 14. měsíci. V této souvislosti je možné vyjádřit souvislost se zvýšenou bakteriální aktivitou v zemině po aplikaci bakteriálního preparátu a možným vznikem určitých toxických meziproductů biodegradace kontaminantů; přesná příčina zvýšení toxicity po inokulaci je nicméně neznámá. Nejcitlivější rostlinou v kontaktním uspořádání byl salát *L. sativa*; inhibiční účinek kontaminované zeminy na růst kořene *L. sativa* dosahoval téměř maximální hodnot

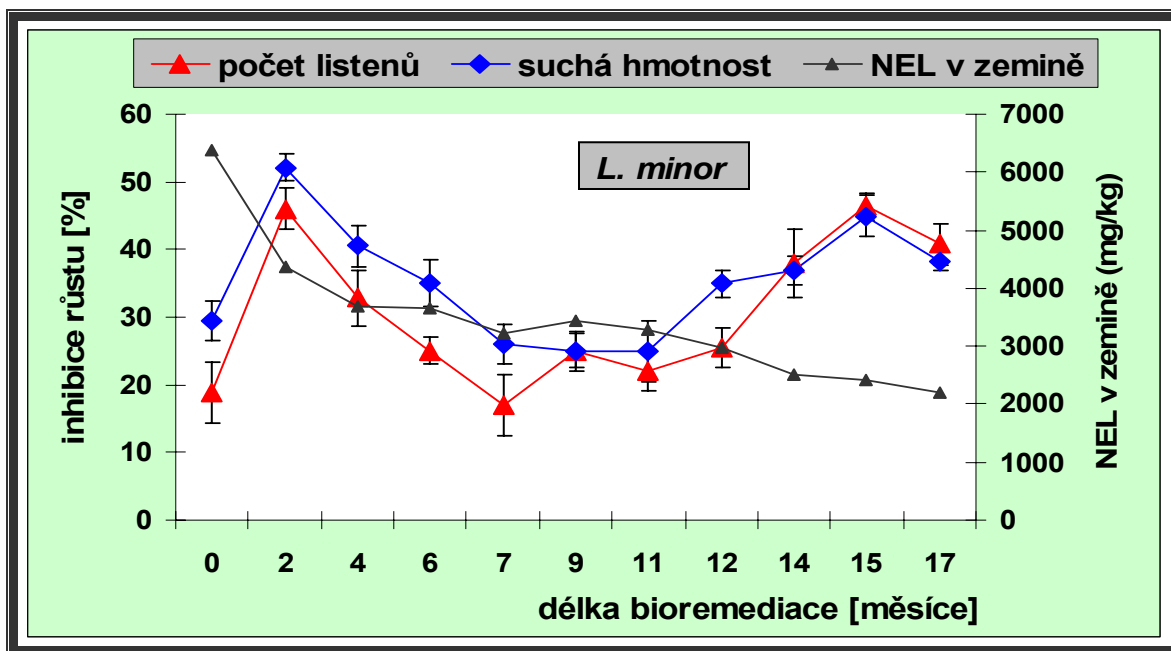
během celého období bioremediace. Výsledky ekotoxicity kontaktních testů s rostlinami *S. alba*, *H. vulgare* a *L. sativa* nekorespondovaly s poklesem koncentrací NEL v zemině během bioremediace.



Obrázek 26 Inhibice růstu kořene rostlin během bioremediace kontaminované zeminy - kontaktní test

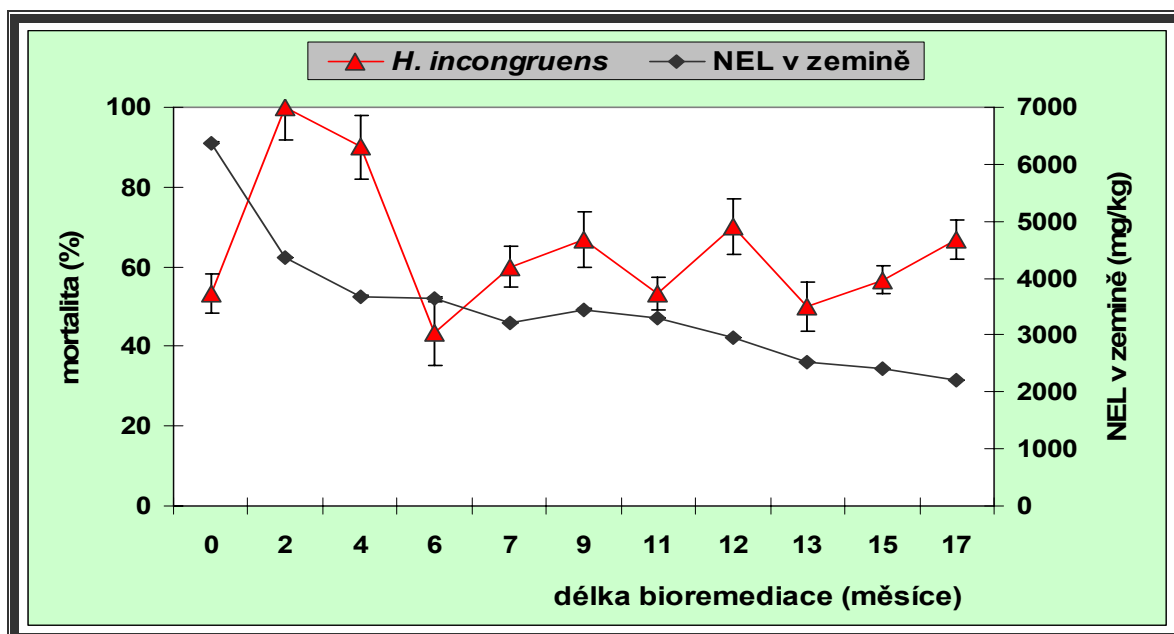
Dalším testem v ekotoxikologickém hodnocení tohoto experimentu byl biotest s okřeškem *L. minor* (obrázek 27). Tato rostlina je v ekotoxikologii využívána především pro testování výluhů, ale v tomto experimentu bylo rozhodnuto pro použití v tzv. semi-kontaktním uspořádání, kdy do 250 ml testovací kádinky bylo vloženo 10 g kontaminované zeminy a 40 ml 2krát koncentrovaného Steinbergova média (příloha 3). Vybrané dva parametry pro hodnocení inhibice růstu *L. minor* (počet listů a suchá hmotnost listů) vykázaly podobný trend záznamu toxického účinku zeminy během bioremediace; byl získán korelační koeficient $r = 0,88$ ($p < 0,001$) mezi výsledky těchto dvou parametrů. Nejvyšší inhibice růstu *L. minor* byla zaznamenána ve 2. měsíci a dále na konci období bioremediace; podobně jako u kontaktních testů s rostlinami *S. alba* a *H. vulgare*. Od 3. do 11. měsíce byl sledován pokles inhibice růstu *L. minor*, který tak byl v této fázi bioremediace v souladu s poklesem koncentrace NEL v zemině. Následný vzrůst hodnot inhibice růstu *L. minor* podle obou hodnocených parametrů už

byl ale v rozporu s dalším poklesem NEL v zemině. Na konci experimentu byl zaznamenán přetrvávající toxický účinek zeminy na růst okřehku *L. minor*; po 17 měsících bioremediace zeminy byla zjištěna vyšší inhibice růstu *L. minor* než před samotným zahájením bioremediace. Celkový průběh inhibice růstu *L. minor* proto nekoreloval s poklesem koncentrací NEL v testované zemině během bioremediace.



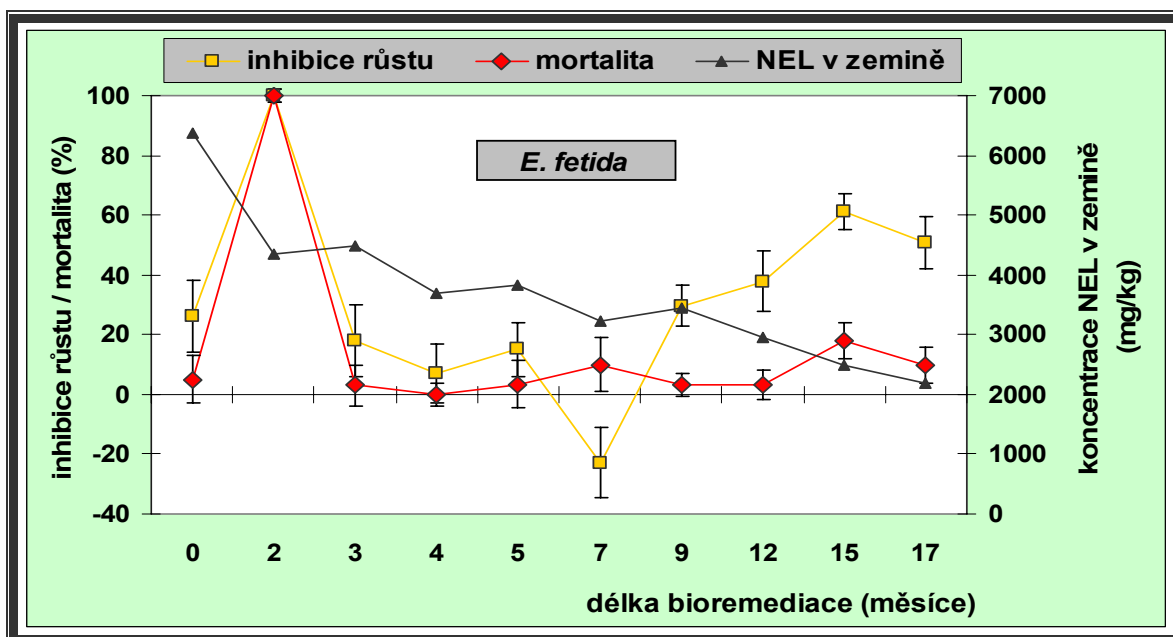
Obrázek 27 Inhibice růstu *L. minor* během bioremediace kontaminované zeminy

Kontaktní test s korýšem *H. incongruens* (OstracodToxkit FTM) se ukázal jako velmi citlivý k toxicitě zeminy během bioremediace (obrázek 28). Relativně vysoký stupeň mortality korýše *H. incongruens* byl zaznamenán během celého bioremediačního procesu. Před zahájením bioremediace byla v kontaminované zemině zaznamenána úmrtnost 53 %. Nejvyšší úmrtnost korýšů byla poté zaznamenána ve 2. a 3. měsíci bioremediace, kdy dosahovala maximálních hodnot, poté se hodnota mortality *H. incongruens* v tomto biotestu ustálila na hodnotě okolo 60 % až do konce období bioremediace. Vzrůst hodnoty mortality ve 2. a 3. měsíci bioremediace by mohl být opět vysvětlován zvýšenou bakteriální aktivitou v zemině po aplikaci bakteriálního preparátu a případným možným vznikem určitých toxických meziproductů biodegradace kontaminantů. Výsledky ekotoxicity s *H. incongruens* nejsou v souladu s poklesem koncentrací NEL v zemině během bioremediace.



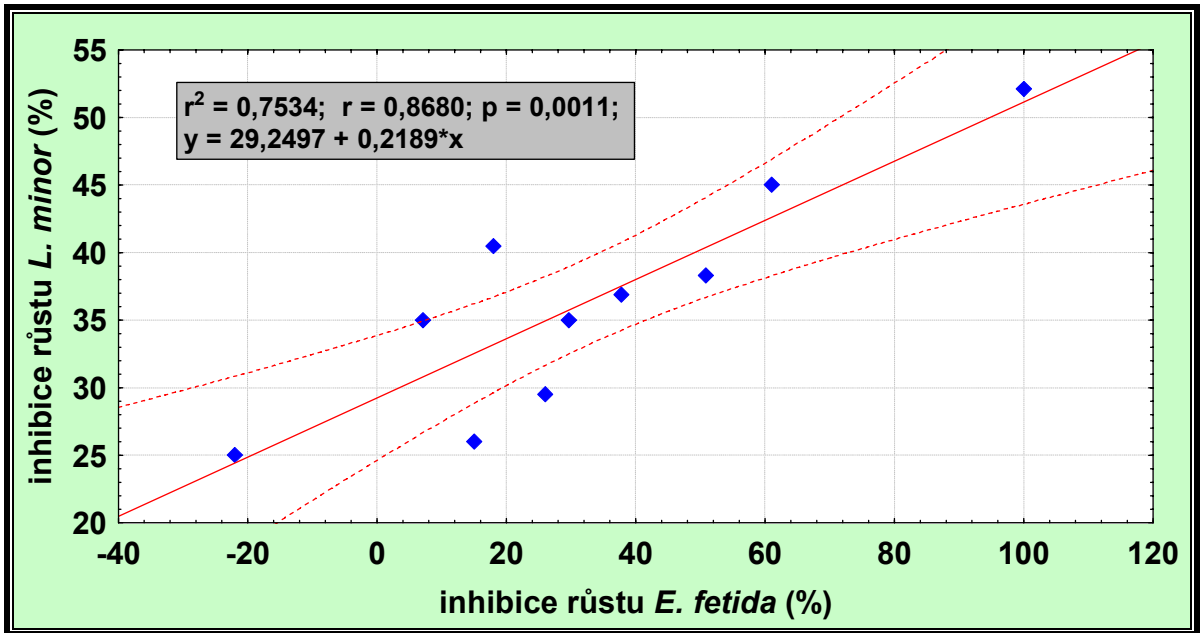
Obrázek 28 Mortalita *H. incongruens* během bioremediace kontaminované zeminy

Výsledky akutních kontaktních testů s žížalami *E. fetida* byly velmi podobné po expozici 14 i 28 dní; z důvodu větší přehlednosti zobrazuje obrázek 29 pouze výsledky získané po 14 dnech expozice žížal v kontaminované zemině. Výsledky testu hodnocené podle mortality žížal *E. fetida* ukázaly vysoký toxický účinek pouze ve 2. měsíci. Tato vysoká hodnota mortality *E. fetida* z počátku bioremediace by mohla být vysvětlována již zmíněnou možnou přítomností toxických meziproductů na počátku bioremediace podobně jako v případě kontaktních testů s rostlinami a korýši *H. incongruens*. Další hodnocený parametr *E. fetida* (sledování inhibice růstu) však poskytl poněkud odlišné výsledky záznamu toxického účinku kontaminované zeminy. Vysoká inhibice růstu *E. fetida* byla zjištěna v 2. měsíci bioremediace a poté po prudkém poklesu hodnot inhibice růstu byl v druhé polovině bioremediačního procesu detekován trend zvyšující se inhibice růstu *E. fetida*. Reakce žížal *E. fetida* (podle obou sledovaných parametrů) na toxicitu zeminy však nebyla v souladu s poklesem koncentrací NEL v testované zemině během bioremediace.

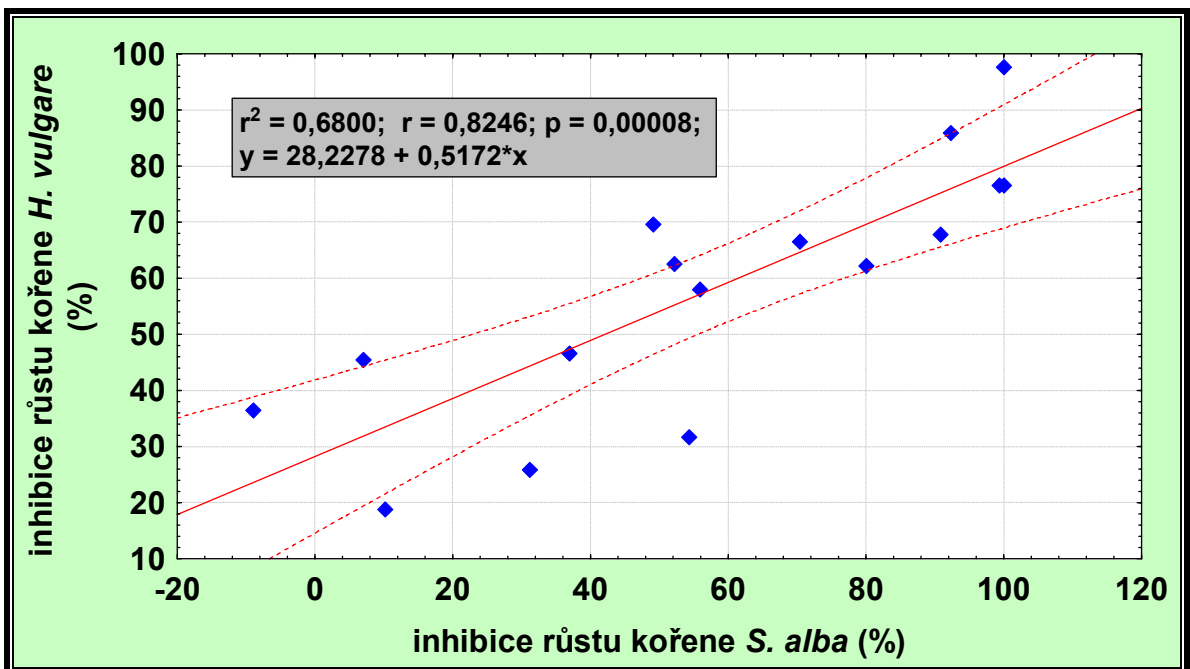


Obrázek 29 Mortalita a inhibice růstu *E. fetida* během bioremediace kontaminované zeminy

Nejlépe hodnocené testy ekotoxicity tohoto bioremediačního experimentu byly kontaktní (resp. semi- kontaktní) biotesty s rostlinami *L. sativa*, *S. alba*, *H. vulgare* a *L. minor*, korýši *H. incongruens* a žížalami *E. fetida*. Nejvyšší toxický účinek byl u většiny těchto kontaktních testů zaznamenán během první fáze bioremediace po inokulaci bakteriálního preparátu na kontaminovanou zeminu, poté po určitém následném poklesu míry ekotoxicity byl u těchto biotestů zaznamenán trend vzrůstající ekotoxicity zeminy v průběhu bioremediace. Výsledky některých biotestů byly navzájem velmi podobné, nejvýraznější korelace mezi výsledky jednotlivých testů byly zaznamenány pro akutní test ekotoxicity s *E. fetida* hodnocený podle parametru inhibice růstu a biotest s *L. minor*, kdy inhibice růstu byla hodnocena změnou hmotnosti (obrázek 30). Podobné reakce při detekci toxicity byly zaznamenány pro rostliny *S. alba* a *H. vulgare* v kontaktním uspořádání (obrázek 31). Ekotoxicita zeminy určená výsledky těchto kontaktních biotestů nekorespondovala s poklesem kontaminace (koncentrace NEL) v zemině během bioremediace.



Obrázek 30 Hodnoty inhibice růstu *L. minor* ve vztahu k hodnotám inhibice růstu *E. fetida* během bioremediace kontaminované zeminy



Obrázek 31 Hodnoty inhibice růstu kořene *H. vulgare* ve vztahu k hodnotám inhibice růstu kořene *S. alba* v kontaktním testu během bioremediace kontaminované zeminy

6.3. Kompostování kontaminované zeminy

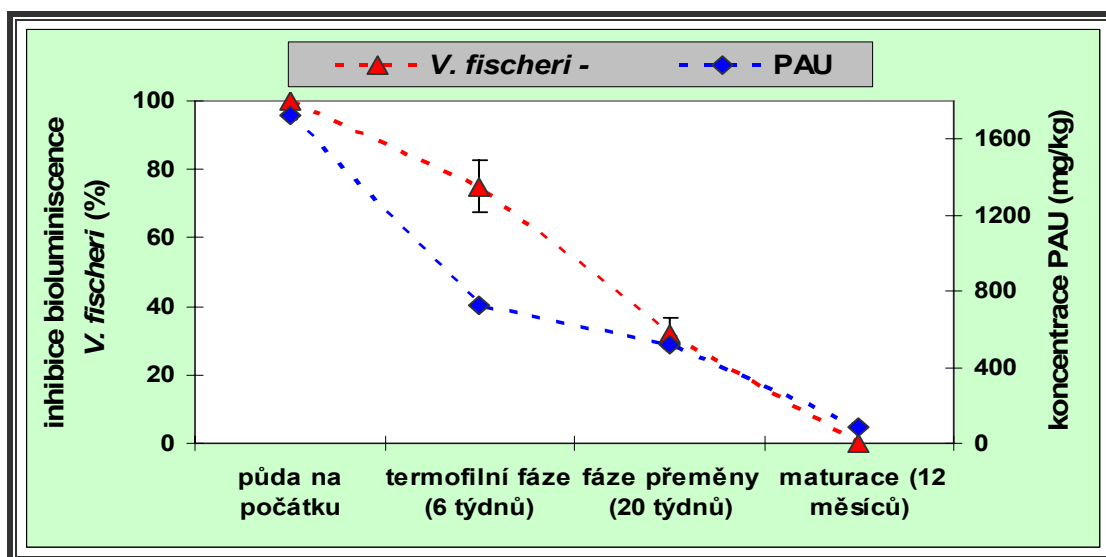
Pro hodnocení ekotoxicity experimentu kompostování kontaminované zeminy byly do testovací baterie zahrnuty biotesty s *V. fischeri*, *S. alba*, *L. minor*, *H. incongruens* a *E. fetida*. Výsledky jednotlivých biotestů ekotoxicity nebyly navzájem vždy v souladu, nicméně kompostování vedlo k celkovému poklesu ekotoxicity zeminy (tabulka 11). Samotná kontaminovaná zemina vykazovala vysokou toxicitu před zahájením kompostování podle výsledků většiny biotestů. Vysoký toxický účinek zeminy byl jednotlivými biotesty zaznamenán v první fázi kompostování. Přetrvávající toxický účinek byl však zaznamenán až do fáze přeměny v biotestech s okřeškem *L. minor*, korýšem *H. incongruens* a žížalami *E. fetida*. Velmi nízká ekotoxicita byla zjištěna jednotlivými biotesty po následné 200-denní venkovní maturaci kompostu. Na konci kompostování byla již zemina hodnocena jako netoxická podle výsledků biotestů s *V. fischeri* a *E. fetida*.

Tabulka 11 Ekotoxikologické hodnocení metody kompostování- souhrn výsledků jednotlivých biotestů

	<i>Vibrio fischeri</i> EC ₂₀ (%)	<i>Sinapis alba</i>		<i>Lemna minor</i> inhibice růstu * (%)	<i>Heterocypris incongruens</i> mortalita (%)	<i>Eisenia fetida</i> mortalita (%)
		výluh inhibice růstu kořene (%)	zemina inhibice klíčivosti (%)			
zemina (na počátku)	5 ± 0,3	43,2 ± 9,3	19,3 ± 3,3	100	100	100
substrát (na počátku)	5,8 ± 0,9	64,8 ± 7,9	67,0 ± 5,9	38,1 ± 2,3	0	10 ± 2,3
zemina + substrát (na počátku)	8,3 ± 1,2	59,4 ± 12,1	25,3 ± 2,5	74,8 ± 4,9	100	55 ± 7,5
po termofilní fázi (6 týdnů)	25,5 ± 2,7	51,1 ± 5,3	10,7 ± 3,7	55,9 ± 1,3	100	58,9 ± 23,9 ***
po fázi přeměny (20 týdnů)	39,1 ± 1,8	48,6 ± 6,2	1,3 ± 1,2	51 ± 2,7	100	30 ± 9,6 ***
po maturaci (12 měsíců)	NT **	27 ± 4,3	0,3 ± 0,2	12 ± 1,3	27,5 ± 1,0	3,3 ± 0,5

Pozn: * podle počtu listenů; ** netoxický vzorek; *** centrální část kompostování jednotky

Významný pokles toxicity byl zaznamenán během celého procesu kompostování (po kompostovací fázi i po fázi zrání) na základě výsledků bioluminiscenčního testu s *V. fischeri* vyjádřené hodnotou EC₂₀ (tabulka 11) i podle inhibice bioluminiscence (H₁₅) (obrázek 32). Po venkovní maturaci kompostu již nebyl zjištěn toxický účinek půdního výluhu zeminy v testu s *V. fischeri*. Významnou inhibici bioluminiscence *V. fischeri* však vykazoval také čerstvý substrát před použitím pro kompostování (před smícháním s kontaminovanou zemínou). Toxicita tohoto samotného substrátu byla prokázána též pro další testovací organismy ve vybrané baterii biotestů. Byla zjištěna významná korelace mezi poklesem inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a poklesem koncentrace PAU v zemině během kompostování ($r = 0,91$; $p < 0,05$).

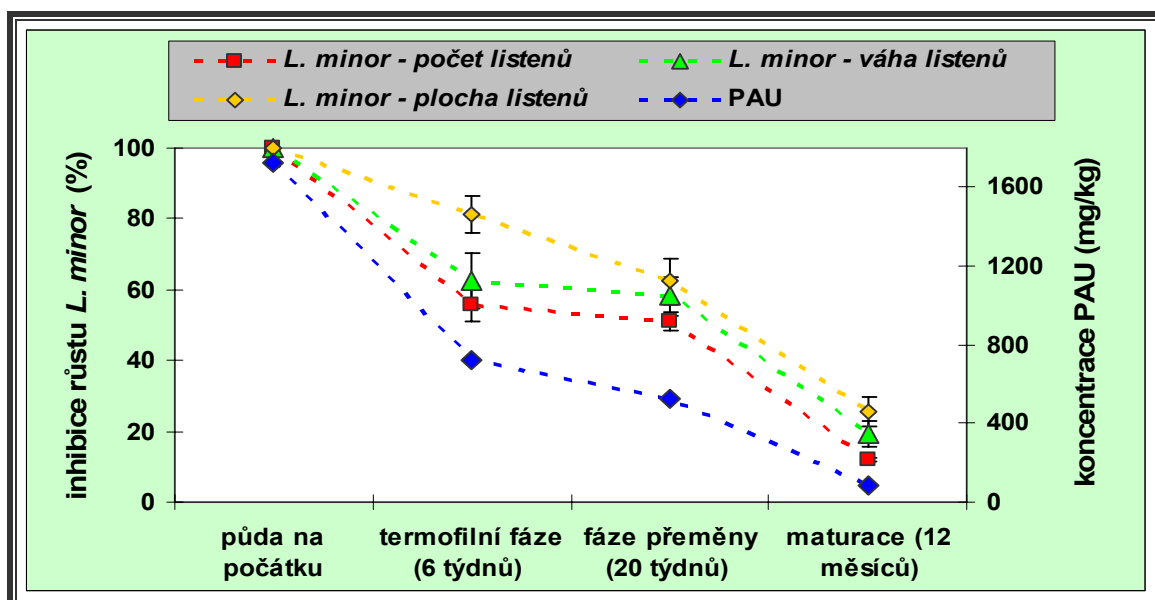


Obrázek 32 Inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a pokles PAU během kompostování kontaminované zeminy

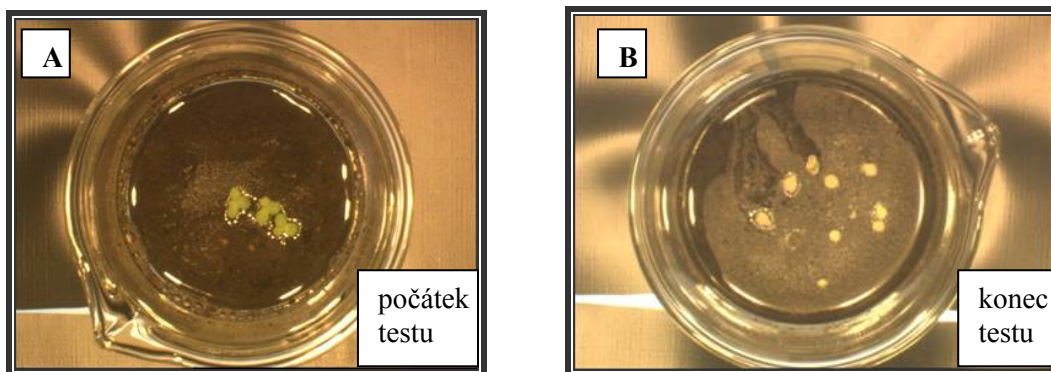
Také u testu klíčení semen *S. alba* byl zaznamenán pokles ekotoxicity během kompostování (tabulka 11). Původní čerstvý substrát použitý v kompostovací směsi však vykazoval mnohem vyšší toxický účinek na semena rostliny *S. alba* než samotná kontaminovaná zemina před kompostováním, a to jak v kontaktním (test klíčivosti), tak i ve výluhovém testu se *S. alba*. Kontaktním testem klíčení semen *S. alba* byl zjištěn pokles ekotoxicity zeminy během kompostování; na konci experimentu již toxický účinek nebyl zaznamenán. Ve srovnání s kontaktním testem byly při testování rostlin v testu s vodným výluhem získány odlišné výsledky. Při použití výluhů v testu s *S. alba*

byla zaznamenána inhibice růstu kořenů 27 % i na konci kompostování. Výluhový test s hořčicí *S. alba* se tak ukázal jako nevhodný pro hodnocení ekotoxicity zeminy v experimentu kompostování (čerstvý substrát určený pro míchání s kontaminovanou zemínou vykazoval v biotestu se *S. alba* vyšší ekotoxicitu než samotná kontaminovaná zemina před kompostováním). Až po dvou týdnech sušení substrátu bylo možné tento substrát pro biotest s *S. alba* použít. Tato skutečnost s vysokou toxicitou substrátu pro kompostování byla potvrzena také v testu se žížalami *E. fetida*.

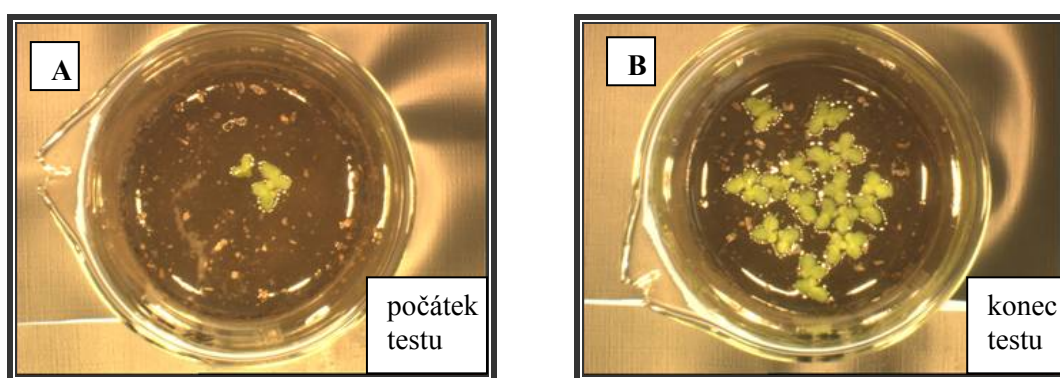
Podobný průběh změny ekotoxicity jako u testu s *V. fischeri* byl zjištěn biotestem s okřehkem *L. minor* (obrázek 33). Nejvyšší inhibice růstu *L. minor* byla stanovena u půdy kontaminované PAU před zahájením kompostování, kdy byl pozorován úplný rozpad kolonií a nekróza listenů okřehku *L. minor* a inhibice růstu *L. minor* (podle třech hodnocených parametrů) dosahovala maximálních hodnot 100 %. Během kompostování byl zaznamenán celkový pokles inhibice růstu *L. minor* a na konci experimentu (po maturaci kompostu) byla inhibice růstu okřehku *L. minor* už jen 12 % (hodnocení biotestu podle počtu listenů), resp. 23 % (hodnocení biotestu podle plochy listenů). Výsledky inhibice růstu *L. minor* podle všech třech hodnocených parametrů byly významně závislé na koncentraci PAU v zemině během kompostování. Zjištěný rozdíl inhibice růstu *L. minor* na počátku a po skončení experimentu kompostování je názorně zdokumentován také na obrázku 34 a 35.



Obrázek 33 Inhibice růstu *L. minor* během kompostování kontaminované zeminy

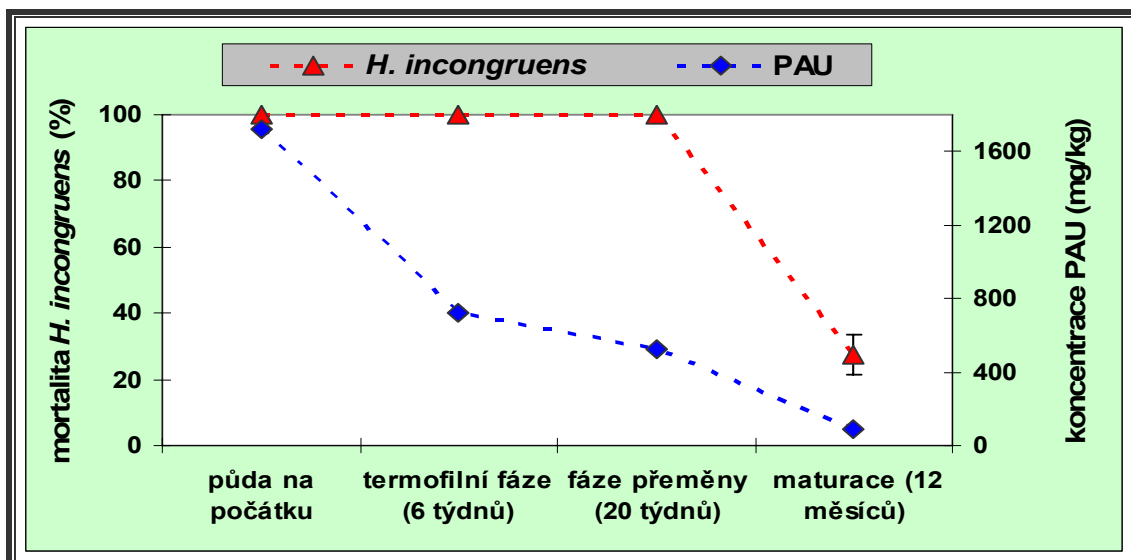


Obrázek 34 Vzorek kontaminované zeminy před kompostováním - test s *L. minor* (**A** - na počátku testu; **B** - po 7 dnech testu)



Obrázek 35 Vzorek zeminy po kompostování - test s *L. minor* (**A** - na počátku testu; **B** - po 7 dnech testu)

Při testu s korýšem *H. incongruens* byl zaznamenán trvalý toxický účinek až do fáze zrání kompostu. Test hodnocení úmrtnosti *H. incongruens* vykazoval přetrvávající extrémní hodnotu mortality (100 %) až do poslední fáze venkovní maturace kompostu, kdy byl detekován významný pokles mortality korýšů *H. incongruens* (pokles úrovně mortality z původních 100 % na 27,5 %). Obrázek 36 vyjadřuje výsledky toho biotestu s *H. incongruens* ve vztahu k poklesu obsahu PAU v zemině během kompostování; nebyla však zjištěna žádná statistická závislost. Pouze na konci experimentu kompostování byl významný pokles úrovně mortality korýšů *H. incongruens* v souladu s výrazným poklesem koncentrace PAU v kompostu.

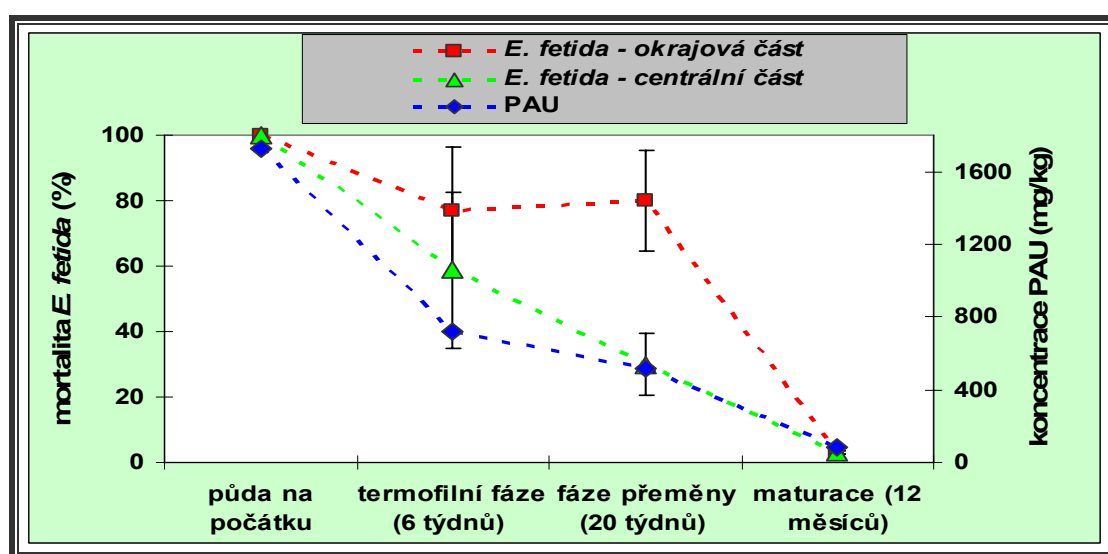


Obrázek 36 Mortalita *H. incongruens* a pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování kontaminované zeminy

Výsledky testu se žížalami *E. fetida* vykazaly během kompostování kontaminované zeminy přetrvávající toxický účinek po termofilní fázi i fázi přeměny (tabulka 12; obrázek 37). Po závěrečné maturaci kompostu byl zaznamenán významný pokles mortality *E. fetida*. Před zahájením kompostování byl zjištěn významný toxický vliv samotného čerstvého substrátu, kdy žádné žížaly v tomto čerstvém substrátu použitém pro kompostovací směs s kontaminovanou půdou nepřežily. Když byl ale čerstvý substrát před použitím vysušen (2 týdny při pokojové teplotě), toxicita již dramaticky poklesla a téměř 90 % žížal *E. fetida* v daném vzorku přežilo. Důležitou roli v testech s *E. fetida* představovalo také přesné místo odběru vzorku z kompostovací jednotky. V zemině z prostřední části byla prokázána nižší toxicita pro *E. fetida* než v zemině z okrajové části kompostovací jednotky (tabulka 12). Tento významný vliv místa odběru vzorku pro test s *E. fetida* může být vysvětlován možnou rychlejší zralostí kompostu ve středové části kompostování jednotky. Pokles mortality žížal *E. fetida* byl v souladu s poklesem koncentrace PAU v zemině během kompostování; významná závislost úrovně mortality *E. fetida* a koncentrace PAU v zemině byla zaznamenána pro vzorky zeminy odebrané z centrální části kompostovací jednotky ($r = 0,96$; $p < 0,05$).

Tabulka 12 Biotest s *E. fetida* při hodnocení kompostování kontaminované zeminy

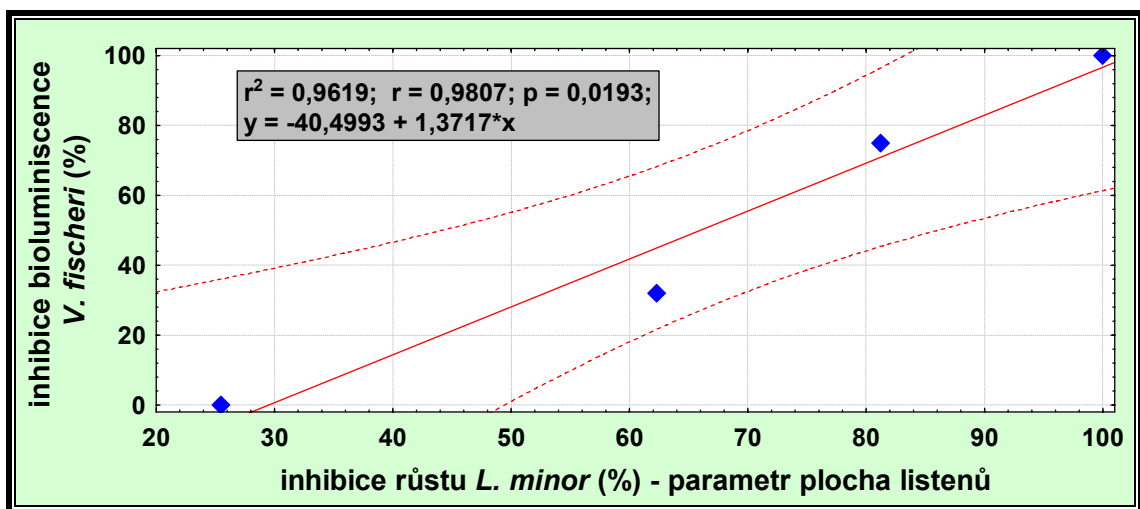
	<i>E. fetida</i> - mortalita po 14 dnech (%)	SD
půda na počátku	100	-
čerstvý substrát	100	-
suchý substrát	10	2,3
půda + suchý substrát na počátku	55	7,5
okrajová část po termofilní fázi	76,7	19,7
okrajová část po fázi přeměny	80	15,3
centrální část po termofilní fázi	58,9	23,9
centrální část po fázi přeměny	30	9,6
po maturaci (po 12 měsících)	3,3	0,5



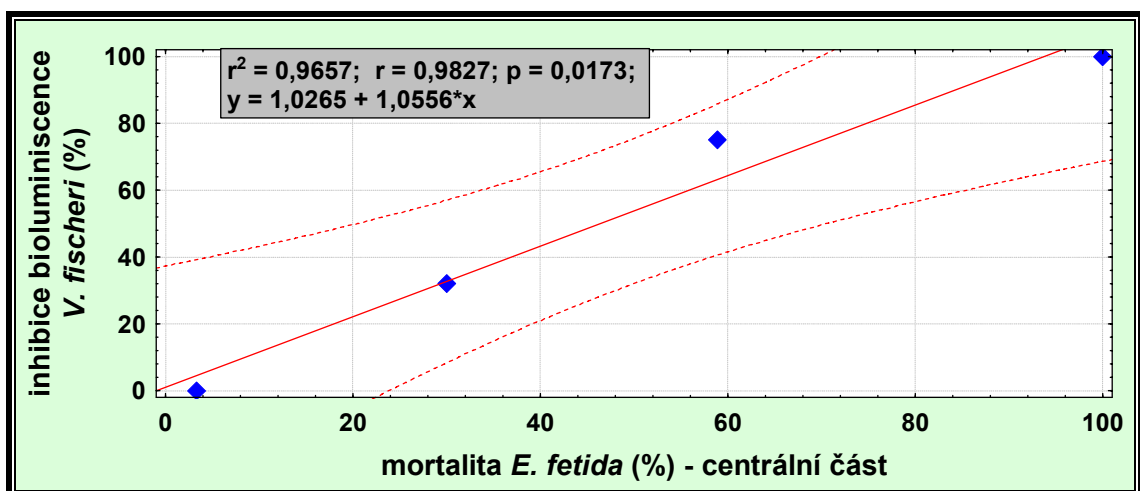
Obrázek 37 Mortalita žížal *E. fetida* v různých částech kompostování jednotky a pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování kontaminované zeminy

Během tohoto experimentu kompostování zeminy kontaminované PAU byl zaznamenán celkový pokles ekotoxicity, který byl ve shodě s významným snížením koncentrace PAU v zemině během kompostování. Zemina kontaminovaná PAU byla před kompostováním vysoce toxická podle výsledků všech biotestů. Avšak čerstvý substrát použitý pro přípravu směsi s kontaminovanou zeminou způsobil specifický problém v testech s *V. fischeri*, *S. alba* a *E. fetida*, protože také tento substrát byl hodnocen jako ekotoxický. V této souvislosti byla vyjádřena hypotéza toxicity tohoto čerstvého substrátu pro organismy v testech ekotoxicity z důvodu možného vyššího obsahu amoniaku. Na konci experimentu kompostování (po maturaci kompostu) byla

již významně nižší ekotoxicita podle většiny biotestů; při biotestech s *V. fischeri* a *E. fetida* byl výsledný kompost vyhodnocen již jako netoxický. Výsledky některých biotestů byly statisticky velmi podobné, významná závislost byla zjištěna dokonce mezi výluhovým testem s *V. fischeri* a kontaktními testy s *L. minor* a *E. fetida* (obrázek 38 a 39). Poslední fáze kompostování (venkovní maturace) se ukázala být velice důležitou částí celého procesu kompostování, protože došlo nejen k významnému poklesu koncentrace PAU v kompostu, ale i k významnému snížení ekotoxicity. Všechny vybrané biotesty kromě testu s *S. alba* lze doporučit pro ekotoxikologické hodnocení průběhu kompostování kontaminovaných zemín.



Obrázek 38 Výsledky biotestu s *V. fischeri* ve vztahu k výsledkům biotestu s *L. minor* při ekotoxikologickém hodnocení kompostování kontaminované zeminy

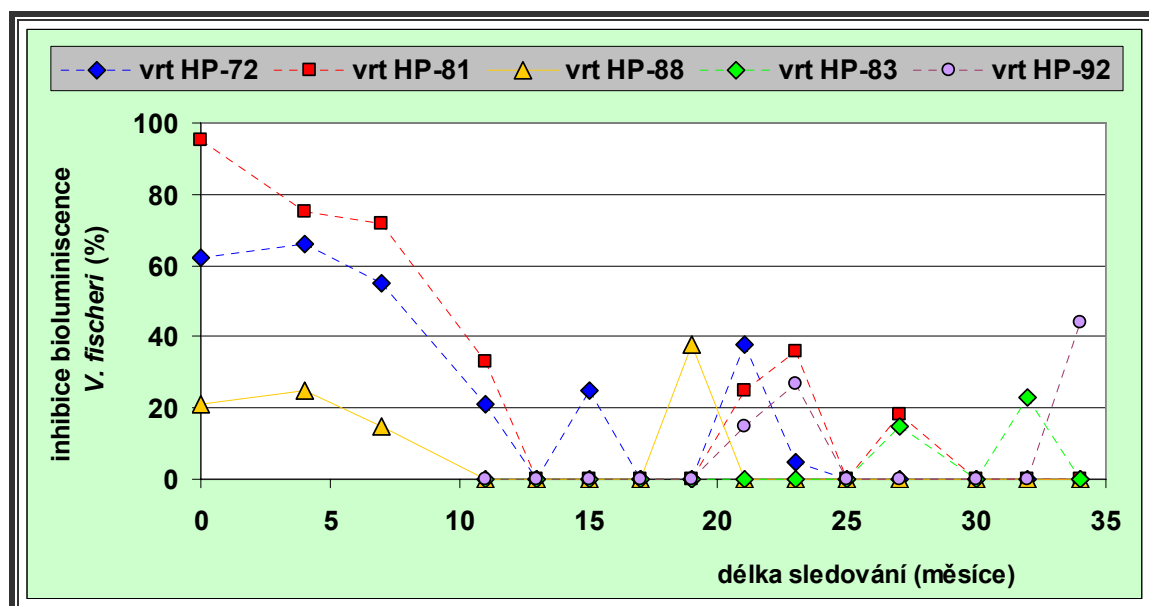


Obrázek 39 Výsledky biotestu s *V. fischeri* ve vztahu k výsledkům biotestu s *E. fetida* při ekotoxikologickém hodnocení kompostování kontaminované zeminy

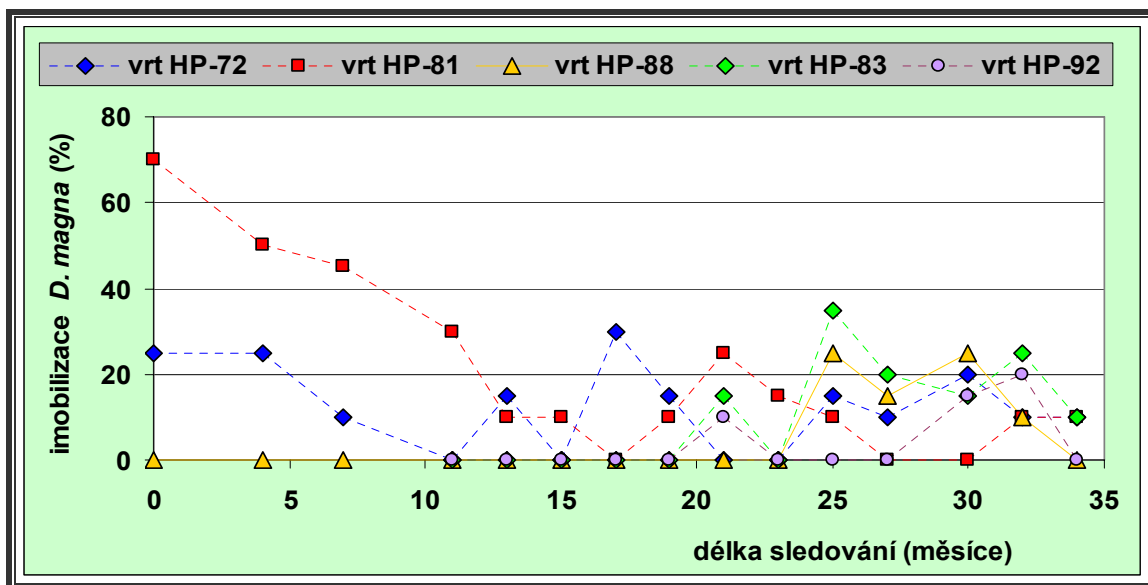
6.4. Remediací kontaminované podzemní vody

Pro hodnocení ekotoxicity podzemní vody byly do testovací baterie zahrnuty biotesty s *V. fischeri*, *S. alba*, *L. minor* a *D. magna*.

Při sledování ekotoxicity kontaminované podzemní vody biotestem s *V. fischeri* bylo možné stanovit hodnoty EC₂₀ (resp. EC₅₀) pouze v prvním roce sledování pro vzorky vody z vrtů HP-81 a HP-72. Poté už z důvodu nižší toxicity vzorků vody, kdy efektivní koncentrace již nemohly být stanoveny, se v celkovém hodnocení pro využití biotestu s *V. fischeri* ukázal vhodnější parametr inhibice bioluminiscence H₁₅ (obrázek 40). Nejvyšší hodnoty inhibice bioluminiscence *V. fischeri* byly zjištěny v prvním období sledování (v případě vody z vrtu HP-81 dosahovaly maximálních hodnot); v následujícím 2 letech pozorování se inhibice bioluminiscence H₁₅ vody z jednotlivých vrtů (bylo zahájeno sledování podzemní vody z dalších dvou doplňkových vrtů) pohybovala v rozmezí 0-30 %, jen v několika málo případech přesáhla hodnotu 30 %. Celkově byla tedy zaznamenána biotestem s *V. fischeri* relativně nižší toxicita sledovaných vzorků podzemní vody v daném období. Velice podobný průběh ekotoxicity byl v jednotlivých vrtech zaznamenán též biotestem s *D. magna* (obrázek 41). Vysoká míra toxicity pro korýše *D. magna* byla zjištěna pouze pro podzemní vodu z vrtu HP-81 a to jen v prvním roce sledování.

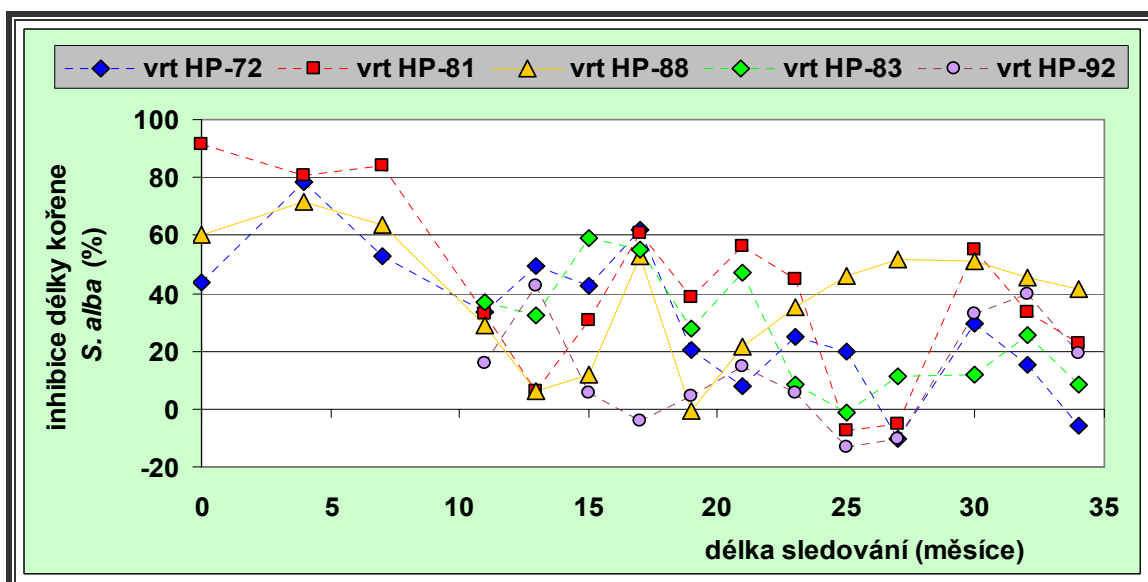


Obrázek 40 Inhibice bioluminiscence *V. fischeri* během remediací podzemní vody



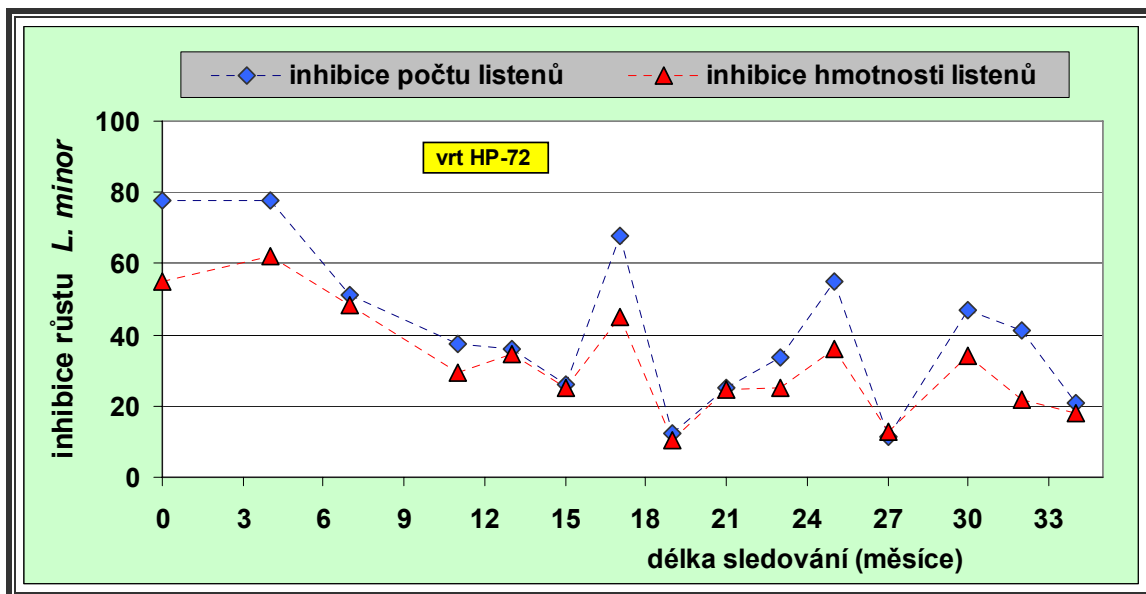
Obrázek 41 Immobilizace *D. magna* během remediac podzemní vody

Biotestem s hořčicí *S. alba* byla zaznamenána velká míra fluktuace ekotoxicity v podzemní vodě v jednotlivých vrtech během sledovaného období (obrázek 42). Vysoké hodnoty inhibice délky kořene *S. alba* byly zjištěny pro podzemní vodu z třech sledovaných vrtů v prvním roce sledování. Poté byl sledován kolísavý inhibiční účinek podzemní vody z jednotlivých vrtů na růst kořene *S. alba* v rozmezí 0 - 60 % (v některých případech byl zaznamenán dokonce stimulační účinek na růst kořene *S. alba*) bez vyjádření určitého trendu průběhu ekotoxicity během sledovaného období.

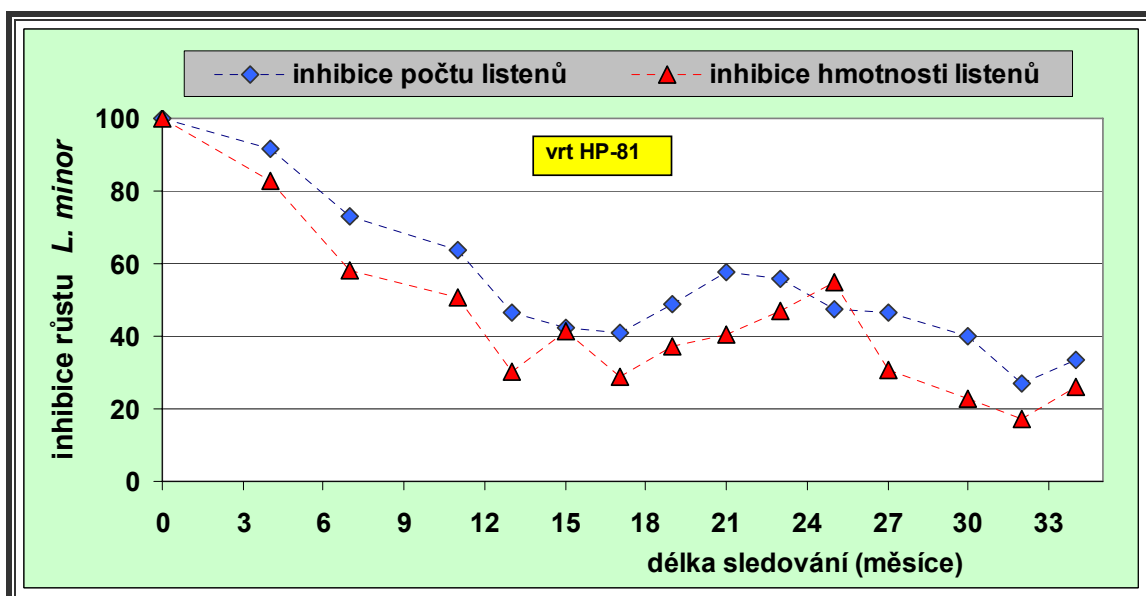


Obrázek 42 Inhibice růstu kořene *S. alba* během remediac podzemní vody

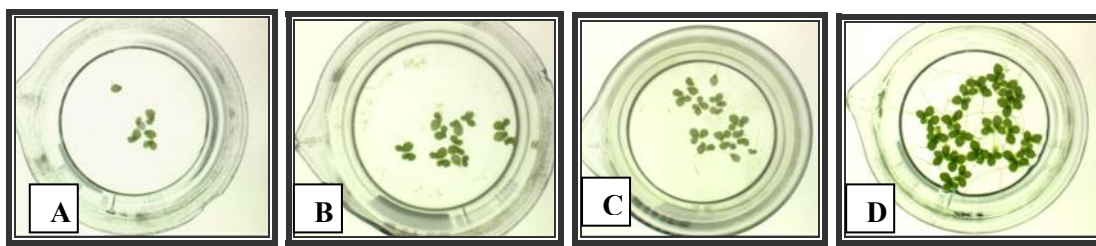
Podrobné hodnocení ekotoxicity podzemní vody z jednotlivých vrtů bylo uskutečněno biotestem s okřehkem *L. minor*. Příklad vyhodnocení biotestu s *L. minor* pro vzorky podzemní vody zobrazuje již tabulka 7 (kapitola 5.6.3.), kde jsou zobrazeny všechny 3 hodnocené parametry tohoto biotestu (inhibice růstu *L. minor* podle počtu listenů, hmotnosti listenů a plochy listenů). Plocha listenů *L. minor* však ale nebyla hodnocena u všech vzorků během celé doby pozorování (34 měsíců), proto jsou výsledky průběhu inhibice růstu *L. minor* ve vzorcích podzemní vody z jednotlivých vrtů vyjádřeny podle dvou parametrů (počet listenů, resp. hmotnost listenů) (obrázek 43 až 48). U vzorků podzemní vody ze všech sledovaných vrtů byla vyšší míra inhibice růstu okřehku *L. minor* určena počtem listenů; srovnání těchto parametrů tak zaznamenalo ve vzorcích podzemní vody menší počet nových malých listenů vytvářejících nové kolonie okřehku *L. minor* ve srovnání s kontrolním vzorkem. Byl pozorován trend poklesu míry inhibice růstu okřehku *L. minor* během 34 měsíců pozorování pro vzorky podzemní vody z vrtu HP-72 a především z vrtu HP-81 (obrázek 43 a 44). Podzemní voda z vrtu HP-81 byla velice toxická pro okřehku *L. minor* především na počátku sledování remediacce, kdy neředitelný vzorek podzemní vody z vrtu HP-81 vykazoval 100 % inhibici růstu *L. minor*; tato extrémní toxicita vzorku způsobila úhyn okřehku *L. minor* během několika hodin testu. Tento vzorek podzemní vody z vrtu HP-81 z prvního odběru byl podroben podrobnějšímu hodnocení testem s *L. minor*. Také ve variantě biotestu s *L. minor* při několikanásobném zředění (ředění D = 8; resp. D = 16) vzorku podzemní vody byla stále stanovena vysoká míra inhibice růstu *L. minor* a byl pozorován rozpad kolonií a následná nekróza listenů okřehku *L. minor* (obrázek 45). Pro podzemní vodu z vrtu HP-81 z počátku sledování remediacce byla zjištěna hodnota $EC_{50} = 5,7 \%$ na základě inhibice růstu podle počtu listenů, resp. $EC_{50} = 7 \%$ podle inhibice růstu podle hmotnosti listenů *L. minor*. Po 34 měsících sledování remediacce podzemní vody již hodnota EC_{50} pro vzorek podzemní vody z vrtu HP-81 nemohla být vypočítána z důvodu nižší míry inhibice růstu *L. minor*. Významný pokles inhibice růstu *L. minor* v podzemní vodě z vrtu HP-81 byl zaznamenán především během prvních 12 měsíců remediacce.



Obrázek 43 Inhibice růstu *L. minor* během remediace podzemní vody (vrt HP-72)

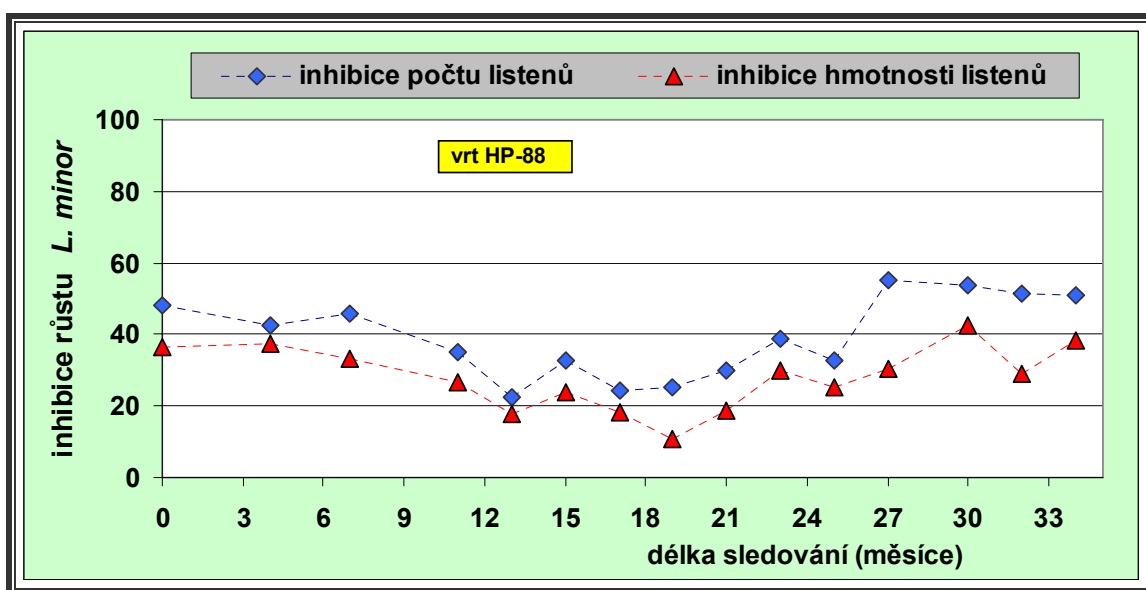


Obrázek 44 Inhibice růstu *L. minor* během remediace podzemní vody (vrt HP-81)

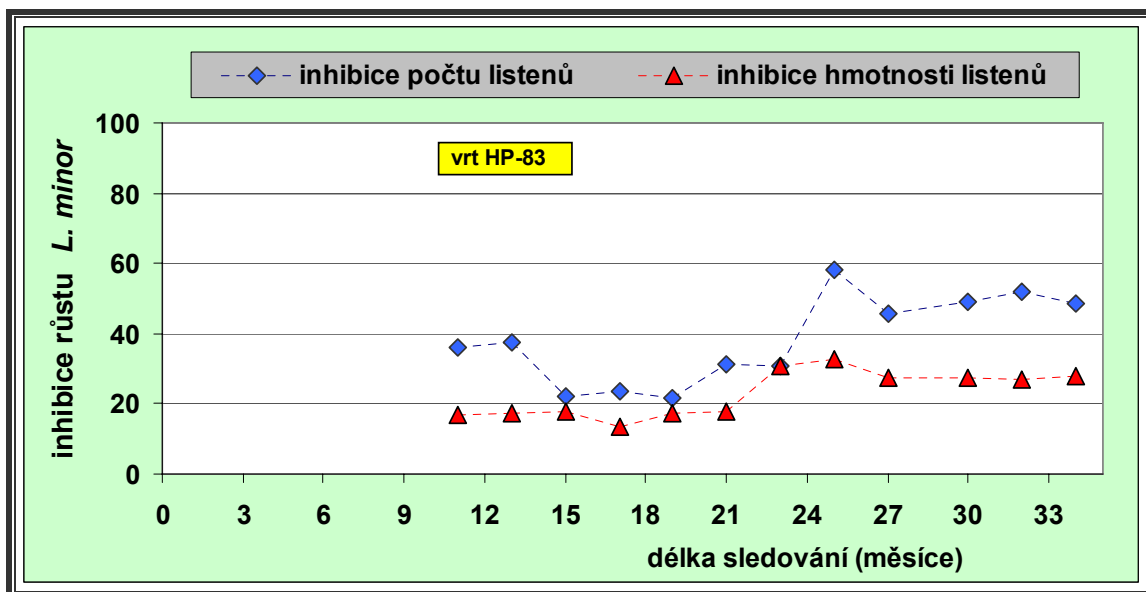


Obrázek 45 Růst okřehku *L. minor* při různém ředění vzorku podzemní vody (vrt HP-81); (A- neředěný vzorek; B- ředění D8; C- ředění D16; D- kontrolní vzorek)

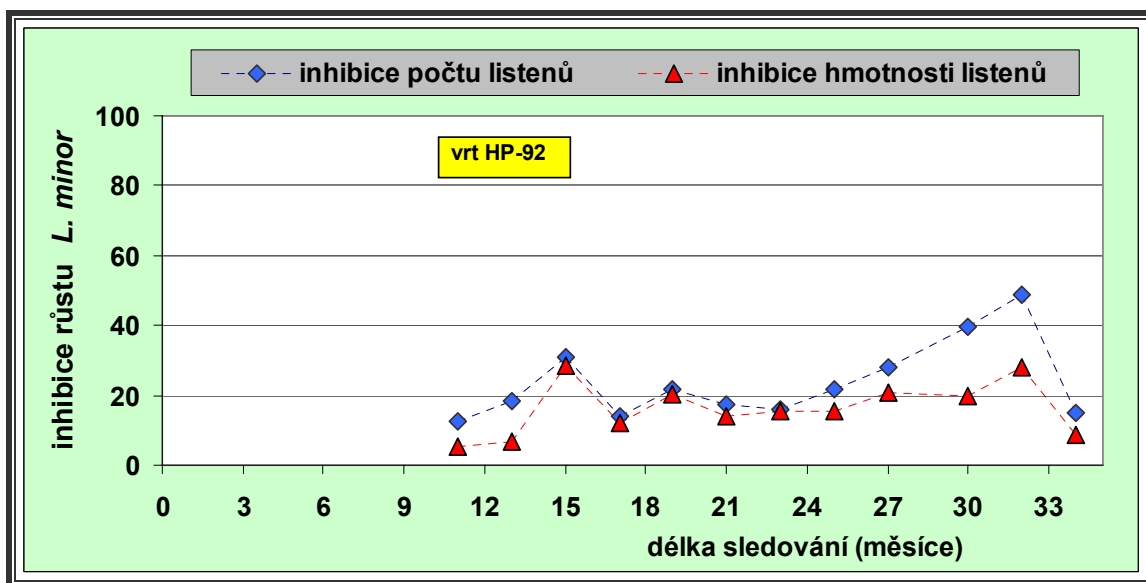
Naopak méně významné změny byly pozorovány biotestem s *L. minor* při hodnocení podzemní vody z vrtu HP-88 (obrázek 46). Přestože koncentrace chlorovaných látek na počátku sledování byly ve vrtu HP-88 o 2 řády nižší než ve vrtu HP-81, také v podzemní vodě z vrtu HP-88 byla testem s *L. minor* zaznamenána určitá míra ekotoxicity v průběhu celého období remediace. Inhibice růstu *L. minor* (podle obou sledovaných parametrů) v podzemní vodě z vrtu HP-88 dosahovala po 34 měsících remediace podobných hodnot jako na počátku pozorování (inhibice růstu *L. minor* se pohybovala kolem hodnot 50 % podle počtu listenů, resp. 40 % podle hmotnosti listenů *L. minor*). Výsledky biotestu s *L. minor* při hodnocení ekotoxicity podzemní vody ze dvou doplňkových vrtů (HP-83 a HP-92) vykazovaly relativně podobný průběh inhibice růstu *L. minor* jako v případě vrtu HP-88 a během dvou let pozorování bylo zaznamenáno pozvolné zvýšení hodnot inhibice růstu *L. minor* (obrázek 47 a 48).



Obrázek 46 Inhibice růstu *L. minor* během remediace podzemní vody (vrt HP-88)



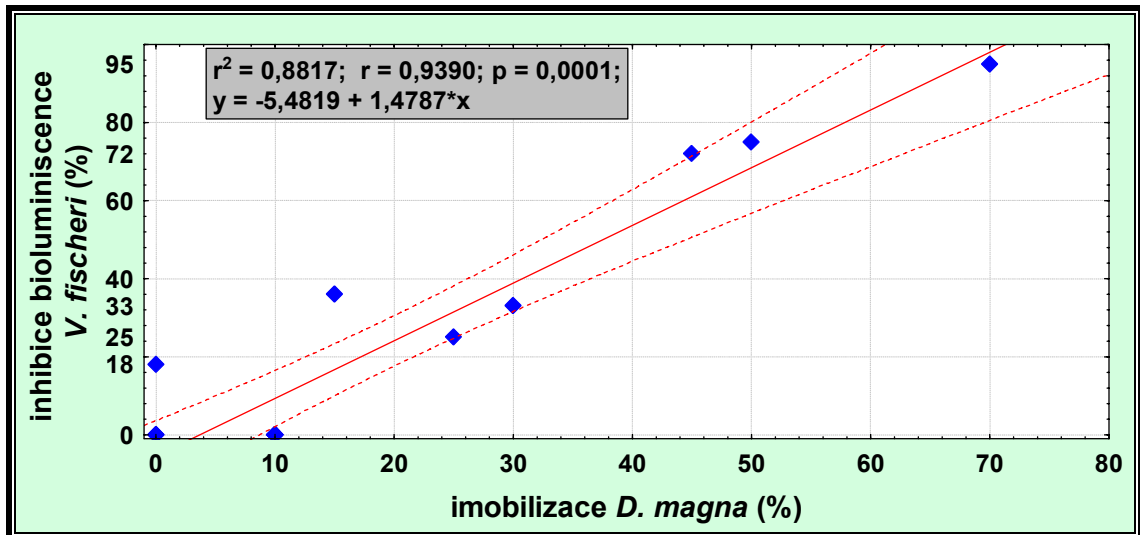
Obrázek 47 Inhibice růstu *L. minor* během remediacce podzemní vody (vrt HP-83)



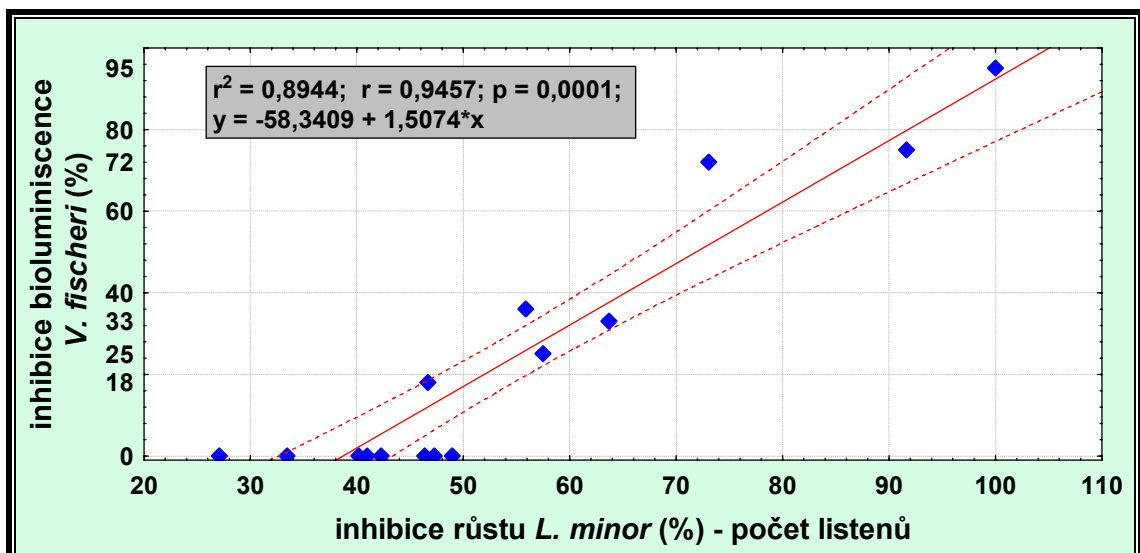
Obrázek 48 Inhibice růstu *L. minor* během remediacce podzemní vody (vrt HP-92)

V kontaminované podzemní vodě byla v průběhu několika měsíců pozorování stanovována relativně nižší míra ekotoxicity podle výsledků biotestů s *V. fischeri* a *D. magna*. Avšak pro vzorky podzemní vody z vrtu HP-81 z počátku sledovaného období byla těmito biotesty určena významná ekotoxicita, což bylo ve shodě s vysokou kontaminací tohoto vrtu. Mezi výsledky biotestů s *V. fischeri* a *D. magna* při stanovení

ekotoxicity podzemní vody z vrtu HP-81 je možno nalézt významnou závislost (obrázek 49). Výsledky biotestu s *S. alba* vykázaly vysokou míru fluktuace celého období pozorování. Biotest s *L. minor* se ukázal jako vhodný test pro ekotoxikologické stanovení kontaminované podzemní vody. Také při porovnání výsledků biotestu s *V. fischeri* a biotestu s *L. minor* je v některých případech (vrt HP-81) možno nalézt významnou závislost (obrázek 50).



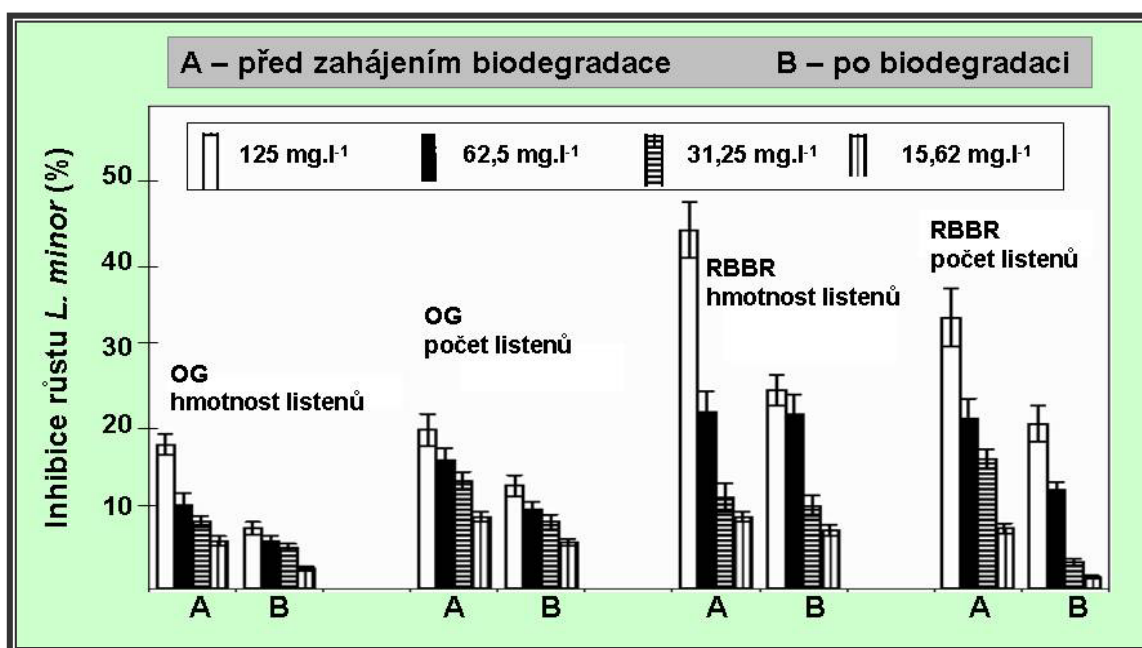
Obrázek 49 Výsledky biotestu s *V. fischeri* ve vztahu k výsledkům biotestu s *D. magna* při ekotoxikologickém hodnocení remediace podzemní vody (vrt HP-81)



Obrázek 50 Výsledky biotestu s *V. fischeri* ve vztahu k výsledkům biotestu s *L. minor* Při ekotoxikologickém hodnocení remediace podzemní vody (vrt HP-81)

6.5. Biodegradace barviv

Výsledky testu ekotoxicity s okřeškem *L. minor* ukázaly vyšší toxicitu barviva RBBR než Orange G před biodegradací i po následné biodegradaci (dekolorizaci). Po biodegradaci barviv byla zaznamenána nižší toxicita obou vybraných barviv při sledování inhibice růstu *L. minor* podle dvou parametrů (počet listenů, resp. hmotnost listenů) (obrázek 51). Podle změny hmotnosti listenů *L. minor* byla zaznamenána vyšší míra inhibice růstu okřešku *L. minor* ve vzorku barviva RBBR před biodegradací i po následné biodegradaci oproti výsledkům inhibice růstu *L. minor* podle parametru počtu listenů. Rozdíl mezi 2 sledovanými parametry hodnocení biotestu s *L. minor* lze vysvětlovat vlivem přítomnosti různých koncentrací barviva RBBR na růst velikosti listenů *L. minor* (menší listeny byly zjištěny v přítomnosti barviva před biodegradací i po následné dekolorizaci). Zjištění nižší toxicity biotestem s *L. minor* pro obě barviva po dekolorizaci předurčuje využití houby bílé hniloby *D. squalens* pro další biotechnologické aplikace jako v tomto případě pro dekolorizaci barviv RBBR a Orange G.



Obrázek 51 Hodnocení toxicity barviv Orange G a RBBR během jejich biodegradace-biotest s *L. minor*

7. Diskuse

Testy ekotoxicity se mohou stát základním a rutinně používaným prostředkem nejen pro zjišťování možného toxického vlivu neznámých látek, ale i k vyjádření celkové kvality prostředí (Walker, et al., 2003; Thompson, et al., 2005). Testy ekotoxicity mohou zároveň doplňovat standardní chemické analýzy, které možný přímý toxický vliv zkoumaného materiálu na jednotlivé složky prostředí vyjadřují v omezené míře (Küster et al., 2004a). Ekotoxikologické hodnocení lze proto také využívat při sledování a hodnocení různých bioremediačních postupů.

Při praktické aplikaci jednotlivých testů ekotoxicity pro bioremediační experimenty v rámci této disertační práce byly zjištěny různé ekotoxikologické výsledky v závislosti na testovaném organismu, vybraných sledovaných parametrech a typu testovací metody. Proto jsou v následující části jednotlivé biotesty podrobně diskutovány z hlediska jejich předností a nevýhod s ohledem na jejich citlivost a spolehlivost i náročnost jejich provedení.

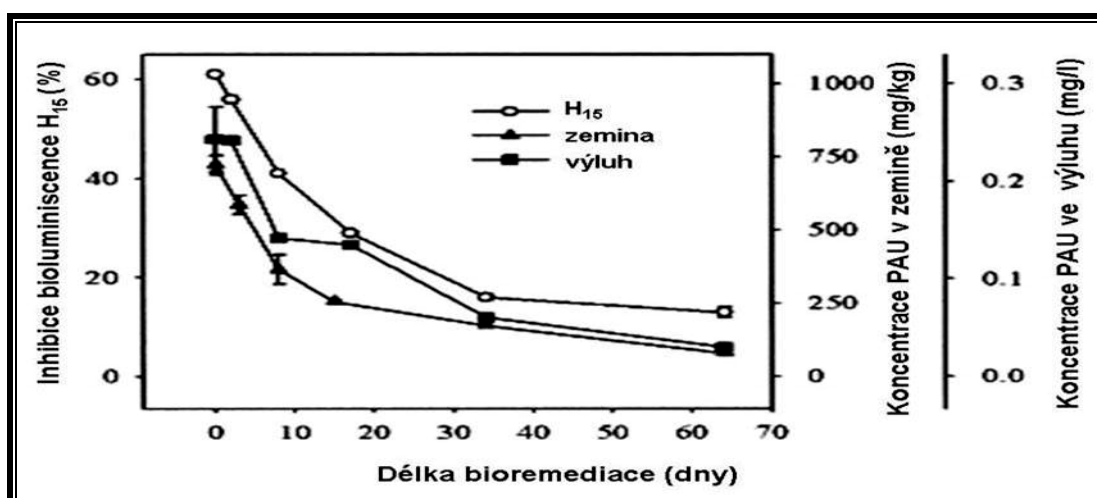
7.1. Bioluminiscenční test s *V. fischeri*

Výhodou bioluminiscenčního testu s bakterií *V. fischeri* je jednoduché a rychlé provedení testu, nutnost pouze malého množství objemu vzorku pro testování, a především také skutečnost, že testovací organismy jsou komerčně dostupné a skladovatelné v lyofilizované podobě a není je tedy třeba před testem složitě kultivovat. Udržování a kultivace testovacích organismů totiž představuje jedno z úskalí řady metod v ekotoxikologii (Persoone et al., 2003; Walker et al., 2003). Mohou existovat rozdíly ve výsledcích biotestu s *V. fischeri* především díky různým modifikacím standardního bioluminiscenčního testu vyplývajícím z typu použitého luminometru, z použitého bakteriálního kmene *V. fischeri* od různých dodavatelů a zda jsou v testu použity čerstvě připravené, sušené nebo lyofilizované bakterie *V. fischeri* (Kahru and Borhardt, 1994; Vosáhlová et al., 2004). Soldán and Gálková (2004) porovnávali výsledky biotestu s *V. fischeri* získané na stejném luminometru, ale s bakteriemi *V. fischeri* (kmen NRLL-B-11177) od 4 různých dodavatelů působících na českém trhu a zaznamenali podstatné rozdíly v citlivosti bakterie *V. fischeri* při různém typu

znečištění (roztoky obsahující soli kovů, organické znečištění, výluh z odpadu a výluh ze sedimentu). Nejčastěji je bioluminiscenční test s *V. fischeri* znám pod označením Microtox[®] nebo LUMISTox[®]. Ze srovnání výsledků mezi různými bioluminiscenčními systémy však byly získány relativně malé rozdíly (Kahru, 1993; Kahru and Borchardt, 1994). Jennings et al. (2001) shrnují, že při hodnocení toxicity 81 chemických látek třemi komerčními systémy stanovení inhibice bioluminiscence *V. fischeri* (Microtox[®], LUMISTox[®] a ToxAlert[®]) jsou získány velmi podobné výsledky při dodržení standardních podmínek testování. Kaiser and Palabrica (1991) analyzovali data o toxicitě 850 chemických látek v bioluminiscenčním testu a zaznamenali pro stejné chemické látky množství rozdílů mezi výsledky jednotlivých laboratoří. Tuto rozdílnost ve výsledcích bioluminiscenčního testu mezi různými laboratořemi zdůrazňuje také Ribo (1997), naopak Hernando et al. (2006) získali při srovnávání výsledků testu s *V. fischeri* různých laboratoří podobné výsledky.

Výsledky tohoto biotestu jsou běžně srovnávány s výsledky dalších standardních testů ekotoxicity s různými organismy. V řadě ekotoxikologických studií byla právě inhibice bioluminiscence *V. fischeri* určena jako nejcitlivější parametr (Jos et al., 2005). Byly nalezeny významné korelace mezi výsledky toxicity určené testem s *V. fischeri* a biotesty s dalšími testovacími organismy jako například rybami, korýši a řasami (Kaiser, 1998; Doherty et al., 1999). Při použití biotestu s *V. fischeri* pro hodnocení odpadních vod z kanadské rafinérie byla zjištěna významná lineární závislost ($r = 0,68$; $F = 5,9$) mezi výsledky biotestu s *V. fischeri* (vyjádřené hodnotami EC_{50}) a koncentracemi ropných látek ve vodě (Aruldoss and Viraraghavan, 1998). To je v souladu se závěry uvedenými v kapitole 6.2. (obrázek 22 a 23), kdy byla zjištěna významná závislost mezi inhibicí bioluminiscence *V. fischeri* a koncentrací NEL ve výluhu. Biotest s *V. fischeri* byl použit pro vyjádření změn ekotoxicity během bioremediace půdy kontaminované ropnými látkami a PAU v řadě studií. Významná korelace mezi výsledky biotestu s *V. fischeri* a poklesem koncentrací 16 PAU v zemině i ve výluhu byla zjištěna při hodnocení bioremediace zeminy z bývalého rakouského závodu impregnace železničních pražců (Hirmann et al., 2002). Při podrobnějším hodnocení jednotlivých PAU bylo zjištěno, že vícekruhové PAU nebyly toxické pro *V. fischeri* pravděpodobně z důvodu jejich nízké rozpustnosti ve výluhu, zatímco rozpustnější nízkomolekulární PAU vedly k záznamu toxicity v tomto biotestu.

V toxických výluzech ze zeminy byly totiž detekovány především nízkomolekulární PAU; s postupem bioremediace byl ve výluhu pozorován právě významný pokles PAU s nižším počtem kruhů a s tím pravděpodobně souvisel také pokles toxicity (Hirrmann et al., 2002). Předmětem mikrobiální degradace jsou především PAU s méně kruhy, proto biotest s *V. fischeri* může představovat vhodný nástroj pro sledování postupu bioremediace (Girrotti et al., 2008). Nicméně pro hodnocení rizik remediované zeminy může být velmi nedostačující nezohlednění možného vlivu vysokomolekulárních PAU. Pokles toxicity podle testu s *V. fischeri* koreloval s poklesem koncentrace ropných látek, případně i PAU také v dalších studiích (Symons et al., 1988; Wang et al., 1990; Antiainen et al., 2002; Lee et al., 2003). Loibner et al. (2004) našli významnou závislost poklesu bioluminiscence *V. fischeri* a poklesu 16 PAU v zemině i ve výluhu během bioremediace zeminy kontaminované PAU (obrázek 52). Také zjištěný pokles inhibice bioluminiscence *V. fischeri* během experimentů mykoremediace a kompostování zemin kontaminovaných PAU byl v souladu s významným poklesem koncentrace PAU v remediované zemině (Cajthaml et al., 2002; Šašek et al., 2003). Přesto v několika studiích nalezená toxicita biotestem s *V. fischeri* nebyla ve shodě s poklesem kontaminace během bioremediace (Aichberger et al., 2004; Küster et al., 2004a). Při bioremediaci chlorfenolů a krezotu v kontaminované podzemní vodě byl zjištěn pokles koncentrace několika kontaminantů pod detekční limit, ale jen nepatrný pokles toxicity podle testu s *V. fischeri* (Mueller et al., 1991).



Obrázek 52 Závislost inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a koncentrace 16 PAU v zemině i ve výluhu během bioremediace (upraveno podle Loibner et al., 2004)

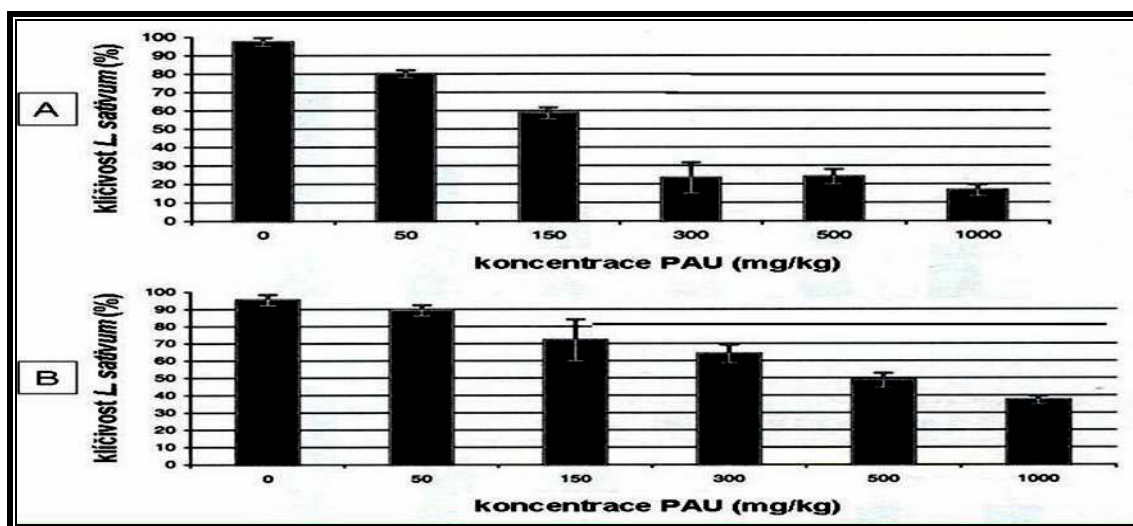
Bioluminiscenční test s *V. fischeri* proto plně vyhovuje základním požadavkům ekotoxikologické monitorovací metody (Hale and Battersby, 2005). Tento biotest s *V. fischeri* se už nyní běžně používá pro stanovení akutní toxicity různých látek například v Německu, Nizozemsku, Švýcarsku, Francii a v řadě dalších evropských zemích (Wharfe, 2005; Farré et al., 2006; Giroti et al., 2008). Je navrhováno začlenění právě tohoto biotestu do základních testovacích baterií pro hodnocení environmentálních rizik (Repetto et al., 2001; Parvez et al., 2006). Rovněž v ČR je tato metoda navrhována pro širší uplatnění v praxi (Rojíčková-Padrťová et al., 1998; Kulovaná et al., 2006). Využití testu s *V. fischeri* lze v budoucnosti nalézt především jako rychlé předběžné hodnocení toxicity kontaminovaných území (Kahru et al., 1998); včetně možného využití luminometru přímo v terénu (Gotzl et al., 1999; Hernando et al., 2007). Lze dokonce očekávat i další různorodé využití biotestu s *V. fischeri* jako například přímé on-line metody sledování bioremediace (Küster et al., 2004a).

7.2. Testy ekotoxicity s vybranými rostlinami

Testy ekotoxicity používající rozličné druhy rostlin se hodnotí podle různých parametrů, nejčastěji se jedná o hodnocení inhibice klíčivosti semen a inhibice růstu kořene rostlin, nicméně interpretace výsledků těchto parametrů je často velmi problematická (Kummerová et al., 1995). Také údaje o citlivosti těchto dvou parametrů biotestu s rostlinami se liší; někteří autoři jako Baudgrasset et al. (1993) považují za citlivější test klíčivosti, jiní uvádějí vyšší citlivost pro test inhibice růstu kořene rostlin (Wang, 1987; Smith et al., 2006). Test klíčení semen není vždy dostatečně citlivý k působení řady toxikantů; chemické látky obecně nepronikají snadno do semene rostlin, a protože rostliny při klíčení využívají zásobní materiály ze semene, klíčící semeno tak může být účinně izolováno od prostředí (Kapustka and Reporter 1995). Výsledky pouze testu klíčivosti rostlin zároveň nepředvídají úspěšnost následného růstu rostlin v různě kontaminovaných půdách (Maliszewska-Kordybach and Smreczak, 2000; Gong et al., 2001). V případě hodnocení fytotoxicity 15 různých zemin kontaminovaných ropnými látkami pro 4 vybrané rostliny byla vedle stanovení klíčivosti semen úspěšně hodnocena také inhibice růstu nadzemní části rostlin po 2 týdnech testu (Gong et al., 2001). Tito autoři také zaznamenali významnější vliv živin

oproti vlivu struktury půdy na výsledky testů ekotoxicity s rostlinami. Nejen různá dostupnost živin, ale řada dalších faktorů má vliv na rozdílnou citlivost různých druhů rostlin v testech ekotoxicity (Kapanen and Itävaara, 2001). Také pokud jsou v testech ekotoxicity pro stejné testovací organismy použity rozdílné parametry pro vyhodnocení biotestů, mohou být získávány značně rozdílné výsledky určení toxicity (Cedergreen and Streibig, 2005). Významné rozdíly v citlivosti mezi jednotlivými druhy rostlin byly zjištěny na základě klíčivosti semen a růstu rostlin (podle čerstvé a suché hmotnosti rostlin) během 3 týdnů v kontaktních testech s třemi druhy rostlin (*S. alba*, *Trifolium pratense* a *Lolium perenne*) při hodnocení toxicity PAU v zemině (Sverdrup et al., 2003). Druhovú citlivost rostlin v testech ekotoxicity byla zaznamenána také v dalších studiích jako například při sledování toxického vlivu zeminy kontaminované PAU na 7 druhů trav a luštěnin (Smith et al., 2006) nebo při zjišťování toxicity půd kontaminovaných ropnými látkami (Baudgrasset et al., 2003). Henner et al. (1999) hodnotili fytotoxicitu zeminy uměle kontaminované PAU, zeminy kontaminované ze starých zátěží, výluhy těchto kontaminovaných zemin a přímo také tekutý dehet testy ekotoxicity s množstvím rozličných druhů rostlin (včetně například *S. alba* nebo *H. vulgare*) a podle zjištěné inhibice růstu rostlin hodnocené podle výšky rostliny po 2 měsících testu byly testované vzorky kontaminované PAU rozděleny do dvou kategorií podle odlišné citlivosti k PAU. První skupinu tvořil tekutý dehet a čerstvě odkrytá kontaminovaná půda (vzorky silně zapáchající a stanovené jako fytotoxické) a do druhé skupiny zařadili půdu ze starých zátěží (půda vystavena vlivům prostředí po dlouhou dobu a podle výsledků biotestů s rostlinami vyhodnocena jako netoxická). Dále bylo zjištěno, že v biotestech s rostlinami je klíčení a růst rostlin velmi inhibováno přítomností těkavých uhlovodíků rozpustných ve vodě s nízkou molekulární hmotností mající méně než 3 benzenová jádra (BTEX, styren, naftalen aj.), naopak v podmínkách této studie PAU s vysokou molekulární hmotností (3-5 benzenových jader) nevykazovaly fytotoxicitu. Tato zjištění mohou naznačovat, že pokud dojde v půdě k odstranění aromatických uhlovodíků s nízkou molekulární hmotností (například vytěkáním, bioremediací aj.) může být tato zemina netoxická pro rostliny (Henner et al., 1999). Maliszewska-Kordybach and Smreczak (2000) uvádějí souvislost mezi mírou fytotoxicity zemin kontaminovaných PAU pro 6 různých druhů rostlin a obsahem organické hmoty v zemině, která reguluje koncentrace PAU v půdním roztoku. Podle

parametru klíčivosti byla hodnocena citlivost řeřichy *Lepidium sativum* v půdách uměle kontaminovaných PAU a v půdách ze starých záteží (Maila and Cloete, 2002). Citlivost *L. sativum* byla prokázána v testu s kontaminovanou zemínou z areálu rafinérie (hodnoty koncentrace PAU v zemině se pohybovaly kolem 1200 mg/kg), kdy žádná semena *L. sativum* nevyklíčila a v testu s uměle kontaminovanou zemínou zaznamenaly hodnoty klíčivosti *L. sativum* pokles při vzrůstající koncentraci PAU (obrázek 53). Při koncentraci PAU v půdě 1000 a 50 ppm byly hodnoty klíčivosti *L. sativum* přibližně 16 %, respektive přes 75 %; podobné hodnoty klíčivosti byly zaznamenány i v případě použití surfaktantu v množství 100 mg/kg půdy za účelem zvýšení biodostupnosti PAU (Maila and Cloete, 2002). Také v jiné studii byl potvrzena citlivost *L. sativum* a zároveň byl určen významný vliv biodostupnosti PAU z půd průmyslově kontaminovaných lokalit (Bogolte et al., 2007). Podle zjištěných výsledků biotestu s *L. sativum* navrhuje tato autoři řeřichu *L. sativum* jako vhodnou rostlinu pro sledování odstraňování PAU z kontaminovaných půd. Naopak na rozdíl od jiných biotestů test klíčivosti s třemi druhy rostlin (včetně *L. sativum*) nebyl dostatečně citlivý například při hodnocení toxicity půdy kontaminované různými herbicidy a při hodnocení následného procesu kompostování této zeminy (Dubova and Zarina, 2004).



Obrázek 53 Klíčivost *L. sativum* v zeminách kontaminovaných různými koncentracemi PAU; bez přítomnosti surfaktantu (A); s přítomností surfaktantu (B) (upraveno podle Maila and Cloete, 2002)

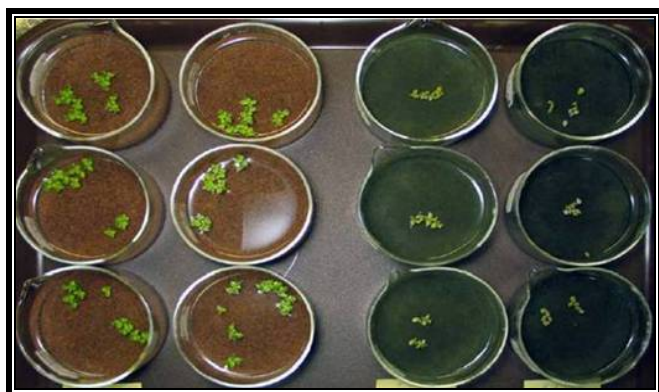
Využití biotestů s rostlinami na hodnocení účinnosti vybrané bioremediační technologie doporučují například Baudgrasset et al. (1993) nebo Gunderson et al. (1997). Ekotoxicita byla sledována třemi vybranými druhy rostlin (salát *L. sativa*, oves *Avena sativa*, proso *Panicum miliaceum*) v testech s výluhem i v testech klíčivosti přímo s kontaminovanou zemínou o původní koncentraci PAU 5878 mg/kg (Baudgrasset et al., 1993). Celkový pokles obsahu PAU o 86 % (tj. na koncentraci PAU 798 mg/kg) po skončení bioremediace koreloval s celkovým poklesem ekotoxicity zaznamenané právě těmito třemi druhy rostlin. Nejméně citlivý byl test s *A. sativa*, kdy po bioremediaci nebyl toxický účinek zeminy zaznamenan, salát *L. sativa* byl nejcitlivější pro hodnocení toxicity zeminy před zahájení bioremediace a proso *P. miliaceum* se ukázalo jako nejcitlivější druh pro detekci toxicity po skončení bioremediace. Z výsledků tak lze vyjádřit vyšší citlivost salátu *L. sativa* k původním PAU než k vzniklým metabolitům (Baudgrasset et al., 1993). Při podobném hodnocení bioremediace velmi kontaminovaných zemin ropnými látkami (koncentrace NEL v rozmezí 56 500 - 142 000 mg/kg; koncentrace PAU 16,4 - 36 mg/kg) byla zjištěna významná korelace ($p < 0,05$) především mezi výsledky rostlinných biotestů s výluhy pro *L. sativa* (resp. *Triticum aestivum*) a koncentracemi uhlovodíků a PAU v zeminách i výluhu; pro přípravu výluhu však byly využity organické extrakty (Plaza et al., 2005). Významná korelace ($p < 0,01$) mezi poklesem koncentrace ropných látek v zemině a mírou klíčivosti *T. pratense* byla také zjištěna během 4 měsíců kompostování (Juvonen et al., 2000). Kontaktní test klíčivosti s *S. alba* nebyl na rozdíl od biotestu s *V. fischeri* dostatečně citlivý při jiném ekotoxikologickém hodnocení kompostování zeminy kontaminované PAU; v tomto případě nebyla zaznamenána žádná významná změna míry inhibice klíčivosti během kompostování ani po fázi maturace (Cajthaml et al., 2002). V testech ekotoxicity v ČR se standardně používá právě test klíčivosti semen a test inhibice růstu kořene hořčice *S. alba* (Ambrožová, 2003; Bíbrová, 2004; MŽP, 2007). Tento biotest se *S. alba* se však ukázal být pro plošné testování pevných odpadů nevhodný; naopak je v této studii vyzdvihována citlivost salátu *L. sativa* a ječmene *H. vulgare* v kontaktním uspořádání (Kočí et al., 2008). Také při porovnávání toxicity zeminy kontaminované ropnými látkami v testu klíčivosti s 5 různými druhy rostlin byl vyhodnocen salát *L. sativa* jako nejvhodnější rostlina pro ekotoxikologické hodnocení takovéto kontaminace (Banks and Schultz, 2005). Citlivost salátu *L. sativa* byla také

potvrzena při vyhodnocování klíčivosti semen této rostliny v roztoku s různými koncentracemi benzo[*a*]pyrenu a fluorantenu (Kummerová et al, 1995; Kummerová and Kmentová, 2004). Biotest hodnocený podle klíčivosti semen *L. sativa* ve variantě ve výluhu i v kontaktním uspořádání byl relativně nedávno standardizován (ISO, 2005), lze tedy očekávat častější využití tohoto druhu v ekotoxikologických studiích. Tyto závěry jsou plně v souladu se získanými výsledky při hodnocení bioremediačních postupů v průběhu této disertační práce, kdy ekotoxicita byla stanovena právě pomocí biotestů s *H. vulgare* a *L. sativa* a nižší citlivost byla zjištěna pro *S. alba* (kapitola 6.2.).

7.3. Biotest s okřehkem *L. minor*

Test ekotoxicity s okřehkem *L. minor* se používá především pro testování toxicity rozpuštěných látek ve vodě nebo ve výluhu (Joutti et al, 2000; Mackenzie et al., 2003; Pro et al., 2003). Při srovnávání metodik a citlivosti dvou akvatických rostlinných biotestů s *S. alba* a *L. minor* byla na vybrané typy znečištění vod zjištěna mnohonásobně vyšší citlivost okřehku *L. minor* a zároveň byla vyzdvihována možnost sledování více parametrů v biotestu s *L. minor* (Motejlová, 2008). Vysoká citlivost *L. minor* byla zaznamenána například při použití 7 různých biotestů pro ekotoxikologické hodnocení vody kontaminované těžkými kovy, kdy okřehek *L. minor* byl nejcitlivější organismus ve vybrané sadě biotestů (Fenske et al., 2006). Okřehek *L. minor* je vhodný a dostatečně citlivý také při testování výluhů zemin a sedimentů kontaminovaných těžkými kovy (Jenner and Janssen-Mommen, 1993). Pro hodnocení toxicity zemin a sedimentů kontaminovaných organickými látkami se může v biotestu s *L. minor* ale místo použití výluhu lépe uplatnit testování zemin a sedimentů v tzv. semi-kontaktním uspořádání, které bylo úspěšně aplikováno v rámci této disertační práce. Tato modifikace biotestu s *L. minor*, kdy je na rozdíl od výluhů kontaminovaná půda nebo sediment používán přímo společně s médiem, může přinášet v tomto biotestu další upřesnění interpretace výsledků ekotoxicity pro hodnocení různě kontaminovaných půd. Okřehek *L. minor* byl úspěšně aplikován ve stejné variantě modifikace tohoto biotestu jako v této disertační práci (10 g kontaminovaného sedimentu a 40 ml 2krát koncentrovaného media připraveného podle ISO/FDIS (2005)) pro hodnocení sedimentů kontaminovaných PAU řeky Niger (Olajire et al., 2005). Schultz and Joutti

(2007) se zabývali hodnocením ekotoxicity arzenu v půdách a používali „semi-kontaktní“ uspořádání biotestu s *L. minor* při aplikaci 50 g vzorku půdy a 100 ml standardního media připraveného podle ISO/FDIS (2005) v 250 ml kádince (průměr 80 mm) (obrázek 54). Také pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace sedimentů kontaminovaných PAU byl využit biotest s *L. minor* v „semi-kontaktním uspořádání (15 ml sedimentu + 2 ml vody) při zkrácené délce testu na 4 dny (Tabak et al., 2003).



Obrázek 54 Využití modifikace biotestu s *L. minor* na stanovení ekotoxicity zeminy kontaminované arzenem (Schultz and Joutti, 2007)

Kultivace okřehku *L. minor* i samotné provedení biotestu bývá relativně jednoduché, biotest může být prováděn při běžném vybavení laboratoře bez nároků na specifické přístroje. Pro vyhodnocování výsledků jednotlivých parametrů biotestu s *L. minor* však zároveň existuje možnost využití různých fotopřístrojů (případně i jednoduchého digitálního fotoaparátu). V rámci této disertační práce byl vyzkoušen analyzátor Scanalyzer od společnosti LemnaTec GmbH (Německo), jehož software byl koncipován pro hodnocení růstu *L. minor* ve vzorcích vody. Přesto lze tento software využít také pro testování vzorků zemin (Eberius, 2001c). Určitou nepřesnost při vyhodnocování vzorků zemin tímto analyzátozem (možná interference zabarvení vzorku zeminy) vyvažuje velká časová úspora při testování většího množství vzorků. V příloze 8 je uvedeno srovnání výsledků inhibice růstu *L. minor* podle počtu listenů, které byly získávány pomocí analyzátoru Scanalyzer a výsledků klasického vizuálního hodnocení u vzorků zemin v průběhu této disertační práce. Tyto výsledky jen potvrzují zkušenosti výrobce tohoto analyzátoru (Eberius, 2001a). Pro základní, rychlé a jednoduché hodnocení tohoto biotestu (parametr počet listenů) může postačovat pouhé vizuální

hodnocení, ale analyzátor Scanalyzer vhodně doplňuje vyhodnocení tohoto testu o další důležitý parametr, kterým je plocha listenů. Již Wang (1990) upozorňuje na skutečnost, že počet listenů není často v souladu plochou listenů a biomasou okřehku *L. minor*, kdy pod vlivem toxických látek může okřehek přirůstat pomalu rostoucími listeny (větší množství menších listenů může podhodnotit výslednou toxicitu vzorku) nebo naopak může být inhibován přírůstek nových malých listenů *L. minor*. Toxický vliv tak může být zaznamenán právě jiným parametrem než pouhým stanovením počtu listenů a inhibice růstu *L. minor* může být lépe vyjádřena podle plochy listenů, případně podle změny hmotnosti *L. minor*. Příkladem může být zaznamenaná různá citlivost okřehku *L. minor* podle tří parametrů při použití referenční látky K_2CrO_7 , kdy inhibice růstu *L. minor* podle plochy listenů byla téměř o 20 % vyšší než podle počtu listenů (Eberius, 2001a). Důležitý aspekt výběru vhodného parametru pro vyhodnocování konkrétního testu ekotoxicity je zdůrazňován právě na příkladu biotestu s okřehkem *L. minor* (Cedegreen and Streibig, 2005; Cayuela et al., 2007).

Biotest s okřehkem *L. gibba* je využíván v testech ekotoxicity především v USA (Brain et al., 2004; Mkandawire and Dudel, 2005). Aplikace tohoto druhu okřehku *L. gibba* byla úspěšně použita například pro hodnocení toxicity odpadu z výroby olivového oleje a následného experimentu kompostování (Cayuela et al., 2007). Pokles toxicity byl zaznamenán během všech fází kompostování; z původní téměř 100 % inhibice růstu *L. gibba* podle počtu listenů (resp. 70-80 % inhibice podle plochy listenů) inhibice růstu *L. gibba* významně poklesla po termofilní fázi kompostování a po závěrečné fázi zrání (po 31 měsících procesu kompostování) už inhibice růstu *L. gibba* nebyla vůbec zaznamenána. Především koncentrace hlavních chemických sloučenin zodpovědných za toxicitu odpadu z výroby olivového oleje (fenoly a lipidy) byla vysoká v první fázi kompostování, ale během průběhu kompostování došlo k výraznému snížení koncentrace těchto látek v kompostu (Cayuela et al., 2007). Hodnocení kvality kompostu tak často souvisí s poklesem fytotoxických látek a s mikrobiální aktivitou (Hue and Liu, 1995; Wu et al., 2000). I přes výhody biotestu s okřehkem *L. minor* při dalším ekotoxikologickém hodnocení procesu kompostování (Juvonen et al., 2000) není tento biotest zatím pro hodnocení bioremediace více využíván. V současnosti je dokončována standardizace norem ISO a OECD testu s *L. minor* (ISO/FDIS, 2005; OECD, 2006), zároveň se již objevila i česká verze této

metody (ČSN, 2007). Lze tedy očekávat větší uplatnění biotestu s okřehkem *L. minor*, kdy by mohl být tento biotest používán také ve variantě “semi-kontaktního” uspořádání pro hodnocení kontaminovaných zemín a sedimentů.

7.4. Biotest s korýšem *D. magna*

Jsou známy stovky studií využívající sledování imobilizace korýše *D. magna* při ekotoxikologickém hodnocení především látek rozpuštěných ve vodě nebo pro různé výluhy. Vysoká citlivost *D. magna* je zmiňována při použití tohoto organismu v bateriích testů využívajících různé organismy pro vyjádření ekotoxicity různého typu znečištění (Loureiro et al., 2005b; Molina-Barahona, et al., 2005). Test imobilizace *D. magna* byl hodnocen jako nejcitlivější biotest v rozsáhlé baterii několika biotestů s různými organismy při stanovení toxicity znečištění tekoucích vod v Estonsku fenolovými látkami (Kahru et al., 1998). Také při testování 24 organických a anorganických vzorků byla zjištěna nejvyšší citlivost *D. magna* ve srovnání s dalšími 4 organismy včetně salátu *L. sativa* (Arkhipchuk et al., 2000). Naopak například ve studii testující 43 vzorků podzemních vod ze 26 lokalit byl korýš *D. magna* hodnocen jako méně citlivý organismus než řechička *L. sativum*, případně i řasa *S. capricornutum* (Helma et al., 1998). Také v této disertační práci byla v případě použití korýše *D. magna* zaznamenána relativně nižší citlivost tohoto organismu při hodnocení kontaminace podzemní vody (kapitola 6.4.; obrázek 41). I přes prokázanou citlivost biotestu s *D. magna* v řadě ekotoxikologických studií je někdy relevantnost výběru tohoto druhu korýše jako nejvhodnějšího zástupce zooplanktonu pro ekotoxikologická hodnocení zpochybňována (Koivisto, 1995). Versteeg et al. (1997) srovnávají citlivost korýšů rodu *Daphnia* a *Ceriodaphnia* v testech ekotoxicity a zdůrazňují pro ekotoxikologická hodnocení především výhody korýše rodu *Ceriodaphnia*. Také Wu et al. (2007) při srovnání výsledků biotestů s 6 druhy korýšů ze stejné třídy Cladocera vyzdvihují výsledky jiného druhu korýše než *D. magna*. Přesto využití *D. magna* v testech ekotoxicity má své důležité opodstatnění nejen z důvodu možnosti srovnání současných výsledků tohoto biotestu s množstvím dat záznamu toxicity různých chemikálií při testech s tímto korýšem z minulosti (Adema, 1978; Janssen and Persoone, 1993). *D. magna* představuje mezi perloočkami druh, se kterým se nejlépe

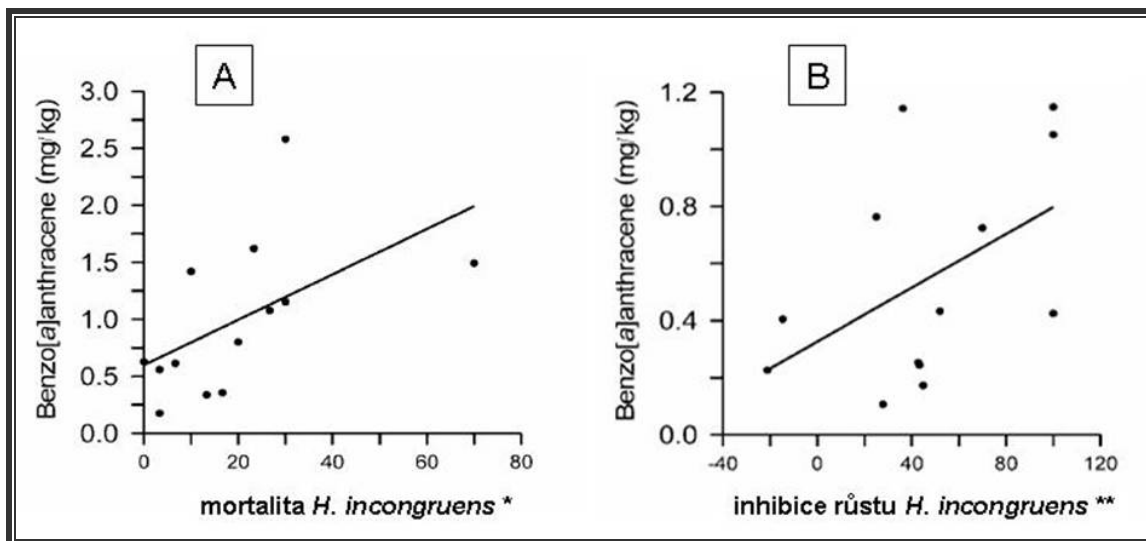
manipuluje při testech, a ve srovnání s ostatními perloočkami má velké množství neonat v jedné snůšce a zároveň tyto neonaty jsou poměrně velké, často mírně zbarvené, proto je jednodušší vyhodnocovat výsledky imobilizace právě tohoto druhu korýše (Veselá, 2004). Nejen z těchto důvodů je perloočka *D. magna* vybírána do testovací baterie testů ekotoxicity (Vangheluwe, et al., 2000; Zurita et al., 2005). Biotest s *D. magna* byl úspěšně použit pro hodnocení toxického vlivu ropných látek ve vodě během bioremediace (Diamantino et al., 2000). Byla potvrzena také možnost využití biotestu s *D. magna* pro hodnocení účinnosti bioremediace zeminy kontaminované ropnými látkami (Molina-Barahona, et al., 2005). V této studii byla výchozí koncentrace ropných látek v kontaminované zemině před bioremediací přibližně 45 000 mg/kg a byla zjištěna vysoká toxicita pro *D. magna* i pro rostliny; během 80-denní biostimulace této kontaminované zeminy byl zaznamenán v zemině pokles koncentrace ropných látek o 50,6 %, což bylo v souladu s poklesem toxicity vyjádřené především biotestem s *D. magna*. V budoucnu se při vyhodnocování biotestu s *D. magna* bude pravděpodobně více uplatňovat hodnocení jiných parametrů než pouhé vyhodnocení imobilizace jedinců (De Coen, et al., 1998; Baun et al., 2004). Už nyní tento biotest dokonce našel uplatnění jako vhodná metoda pro kontinuální monitoring při hodnocení kvality vody nebo přímo monitoring procesu bioremediace podzemní vody. Pro tento on-line monitoring může být v biotestu s *D. magna* použito sledování několika biochemických endpointů jako například detekce cholinesterázových inhibitorů (De Hoogh and Wagenvoort, 2004; Küster et al., 2004b).

7.5. Biotest s korýšem *H. incongruens*

Na rozdíl od zavedeného ekotoxikologického biotestu s korýšem *D. magna* začíná být pro testování toxicity kontaminovaných sedimentů a půd využíván relativně nový komerční kontaktní mikrobiotest (tzv. Ostracodtoxkit FTM) s korýšem *H. incongruens* (Chial and Persoone, 2002a; Chial and Persoone, 2002b). Protože korýš *H. incongruens* je vodní bentický organismus, který je v neustálém styku se sedimentem, lze jej využít pro testování kontaminovaných sedimentů přímo v kontaktním uspořádání. V této disertační práci bylo vyzkoušeno využití mikrobiotestu s *H. incongruens* pro hodnocení bioremediačních postupů s kontaminovanou zeminou;

byla zjištěna vysoká citlivost *H. incongruens* při určování ekotoxicity. Nejen vysoká citlivost, ale i ekonomická výhodnost používání komerčních mikrobiotestů řady „toxkit“ (včetně Ostracodtoxkitu) ve srovnání s konvenčními biotesty byla potvrzena řadou studií (Johnson, 2000; Blaise et al., 2004; Dubova and Zarina, 2004). Citlivost korýše *H. incongruens* byla například srovnávána s dalšími kontaktními testy ekotoxicity používajících korýše *Hyaella azteca* a larvy pakomárů *Chironomus riparius* pro ekotoxikologické hodnocení kontaminovaných sedimentů jezera Superior v Kanadě (Chial et al., 2003a). A v této studii stejně jako v případě monitoringu kvality říčních sedimentů v Belgii, kde byl tento mikrobiotest použit v testovací baterii společně s korýši *Hyaella azteca*, *Thamnocephalus platyurus* a řasou *S. capricornutum*, byla prokázána právě vysoká citlivost právě biotestu s korýšem *H. incongruens* na kontaminované sedimenty (Chial and Persoone, 2002c). Na základě těchto zkušeností byl Ostracodtoxkit s *H. incongruens* aplikován také pro hodnocení 15 kontaminovaných zemín v Belgii; pro 10 z 15 vzorků byla dokonce zaznamenána 100 % mortalita korýše *H. incongruens* a právě tento biotest se tak v některých případech ukázal jako mnohem citlivější než biotest s chvostoskokem *Folsomia candida* (Chial and Persoone, 2003a). Tato vysoká citlivost *H. incongruens* vyjádřená maximální mírou mortality potvrzuje možnou reakci tohoto organismu zjištěnou při hodnocení experimentu kompostování kontaminované zeminy (obrázek 36). V současné době byla také potvrzena vysoká citlivost korýše *H. incongruens* například při ekotoxikologickém hodnocení toxicity čistírenských kalů a následných kompostů vzniklých z čistírenských kalů (Oleszczuk, 2008a; Oleszczuk, 2008b). Při ekotoxikologickém studiu 13 čistírenských kalů z jihovýchodního Polska byly v biotestu s *H. incongruens* dosaženy hodnoty mortality 0 - 70 % (průměr 19,5 %) při aplikaci čistírenských kalů v dávce 6 %, mortalita v rozmezí 4,7 - 72,1 % (průměr 41 %) při aplikaci čistírenských kalů v dávce 12 % a hodnoty mortality *H. incongruens* v rozsahu 0 - 100 % (průměr 60,3 %) byly zaznamenány při aplikaci čistírenských kalů v dávce 24 % (Oleszczuk, 2008a). Zároveň v tomto biotestu byla zjištěna vysoká inhibice růstu *H. incongruens* při hodnocení většiny čistírenských kalů, tento parametr však na rozdíl od hodnot mortality nevyjádřil v tomto biotestu tak významné rozdíly v závislosti na použité dávce kalu (v jednotlivých případech aplikace určité dávky kalu dosahovala průměrná inhibice růstu *H. incongruens* hodnot 39,7 až 46,6 %). V této studii byla zjištěna významná

závislost ($p < 0,05$) mezi koncentrací benz(a)antracenu v kontaminovaných čistírenském kalu a výsledky biotestu s *H. incongruens* hodnoceného podle obou sledovaných parametrů - mortality a inhibice růstu (Oleszczuk, 2008a) (obrázek 55).



Obrázek 55 Závislost mezi koncentrací benz(a)antracenu v čistírenském kalu a výsledky biotestu s *H. incongruens* (A- hodnoceno podle parametru mortality; B- hodnoceno podle parametru inhibice růstu *H. incongruens*) (upraveno podle Oleszczuk, 2008a)

Při studiu kompostů z čistírenských kalů se hodnota mortality *H. incongruens* pohybovala od 0 do 90 % a další sledovaný parametr tohoto biotestu (inhibice růstu) dosahoval hodnot až 55 % v závislosti na použitém čistírenském kalu (Oleszczuk, 2008b). Další aplikace biotestu s *H. incongruens* byla použita společně s biotestem s *Hyalella azteca* pro ekotoxikologické hodnocení 5 různých bioremediačních postupů na odstraňování kontaminace ropnými látkami z říčních sedimentů (Chial et al., 2003b). Před zahájením bioremediace byly všechny vzorky sedimentů toxické pro oba vybrané druhy korýšů; hodnota mortality *H. incongruens* se pohybovala mezi 80 - 100 %. Po 6 týdnech bioremediace byla zaznamenána nižší mortalita korýše *H. azteca* a přetrvávající toxický účinek pro korýše *H. incongruens*; tento trend byl potvrzen po dalších 15 týdnech bioremediace, kdy biotest s korýšem *H. azteca* již toxicitu neprokázal, ale byla zjištěna přetrvávající toxicita v biotestu s *H. incongruens* (Chial et al., 2003b). V nedávné době byla zjištěna též vysoká citlivost korýše *H. incongruens* pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace půd kontaminovaných ropnými látkami a PAU (Plaza et al., 2005; Hamdi et al., 2006), ale například i pro sledování průběhu

ekotoxicity během kompostování půdy kontaminované různými herbicidy (Dubova and Zarina, 2004).

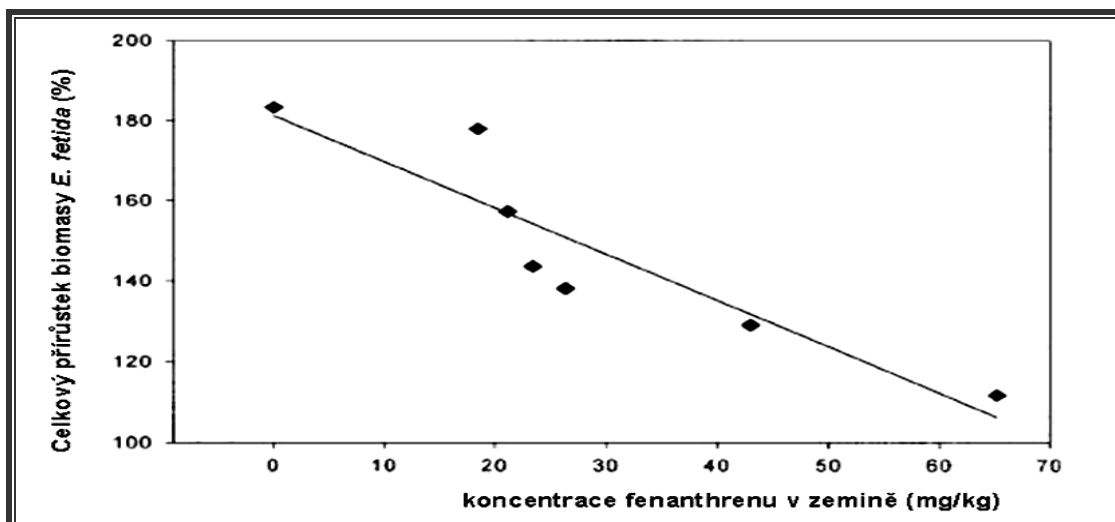
7.6. Biotest s žížalami *E. fetida*

Žížala *Eisenia fetida* je ideální testovací organismus pro hodnocení kontaminovaných půd a sedimentů. Vysoká citlivost žížaly *E. fetida* byla potvrzena v bioremediačních experimentech s kontaminovanou zemínou (kapitola 6.2 a 6.3.).

Výhodou použití žížaly *E. fetida* v testech ekotoxicity je její relativně krátký generační čas (2-3 měsíce), vysoký generační potenciál i relativně snadný chov (Kula and Larink, 1998). Možnou nevýhodou může představovat skutečnost, že se v přírodě *E. fetida* vyskytuje pouze na velmi organicky bohatých stanovištích především kompostech a není to tak reprezentativní zástupce půdních organismů všech typů půdního prostředí. Například Johnson et al. (2002) doporučují v testech ekotoxicity při hodnocení kontaminace půd kontaminovanými PAU uplatnění žížal *Aporrectodea longa* oproti zavedenému použití žížal *E. fetida*. Na velice rozdílnou citlivost jednotlivých druhů žížal k různým kontaminantům upozorňují Rungren and Van Gestel (1998). Přesto na právě žížala *E. fetida* představuje jeden ze základních standardních testovacích organismů používaných v terestrické ekotoxikologii s rozsáhlou databází účinků množství chemických látek (Gibbs et al., 1996; Lokke and Van Gestel, 1998). Žížaly *E. fetida* lze též aplikovat při zjišťování biodostupnosti kontaminantů v půdě (Lanno et al., 2004). Obecně lze prohlásit, že pro žížaly jakožto organismy s měkkým tělem žijící v neustálém těsném kontaktu s půdou, je z hlediska toxicity nejdůležitější expozice zprostředkovaná vodou z půdních pórů. To znamená, že pro tyto organismy je toxicita kontaminované půdy dána především koncentrací chemických látek přítomných v půdních pórech, která je výslednicí celkové koncentrace látky v půdě a její sorpce na půdní částice. Neutrální organické látky, které nenesou žádný náboj, jsou převážně adsorbovány na půdní organickou hmotu. Sorpce látek obecně vzrůstá s časem a proto pokusy s čerstvě přidanými látkami do půdy mohou nadhodnocovat jejich toxicitu vzhledem k situaci, kdy jsou tyto látky přítomny dlouhou dobu v půdě (Van Straalen and Van Gestel 1995; Eom et al., 2007). Také Lanno and McCarty (1997) zmiňují skutečnost, že pro žížaly je efektivní koncentrace půdních kontaminantů ta část, která

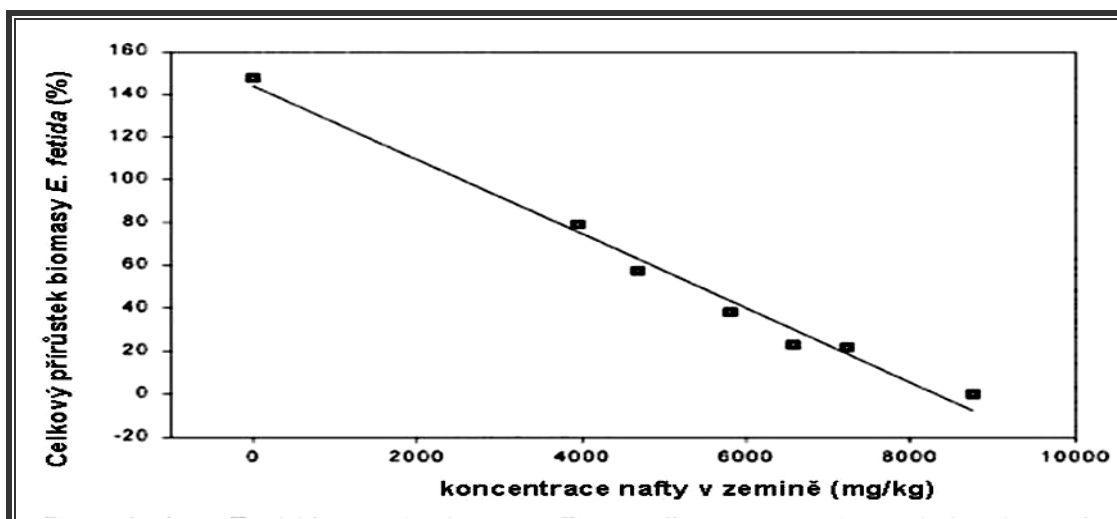
zůstává půdní vodě a proto lze nalézt souvislosti mezi toxicitou v půdě, sedimentech i ve vodě. Obecně je doporučováno používat v testech ekotoxicity s *E. fetida* jako kontrolní vzorek standardizovanou půdu OECD i přes některé výhody standardizované referenční půdy LUFA 2.2 (Kula and Larink, 1997; Kula and Larink, 1998).

Akutní test toxicity se žížalami *E. fetida* byl využit například pro hodnocení bioremediace zemin kontaminovaných PAU, kdy dva typy zemin pocházející ze starých zátěží kontaminace kreosotem při úpravách dřeva byly podrobeny 52-denní bioremediaci v bioreaktorech (výchozí koncentrace PAU 1320 mg/kg, resp. 1500 mg/kg) (Charrois et al., 2001). Byl zaznamenán celkový pokles PAU v obou sledovaných zeminách (výsledné koncentrace PAU byly 80 mg/kg, resp. 1180 mg/kg) Koncentrace 3-kruhových PAU poklesly o více jak 85 % v obou zeminách, koncentrace 4-kruhových PAU o 94 % v jednom typu zeminy, ale jen mírný pokles byl zaznamenán v druhé půdě a také koncentrace vícekruhových PAU poklesly opět jen v jedné testované zemině. Při bioremediaci zůstala nezměněna koncentrace naftalenu, benzo(ghi)perylenu a dibenzo[a,h]antracenu. U neředitelné kontaminované půdy byly zaznamenány 100 % úhyn žížal již během 1 až 2 dnů. Při expozici žížal *E. fetida* při zředění kontaminované půdy 3,13 % a nižším byla zjištěna 100 % úmrtnost během 4, resp. 7 dní. Bioremediace eliminovala akutní toxicitu žížal *E. fetida* u jednoho typu půdy, ale u druhé zeminy se projevovala přetrvávající vysoká akutní toxicita (hodnota mortality 100 %) žížal *E. fetida* (Charrois et al., 2001). Využití dalších parametrů (reprodukce a inhibice růstu žížal) v biotestu s *E. fetida* přináší podrobnější ekotoxikologické vyhodnocení než pouhé sledování parametru mortality (Bierkens et al., 1998). Shin and Kim (2001) použili biotest s *E. fetida* pro monitoring procesu promývání dvou různě kontaminovaných zemin; první typ zeminy byl uměle kontaminován fenantrenem (výchozí koncentrace fenantrenu v půdě byla 200 ppm), druhá zemina byla kontaminována naftou (výchozí koncentrace nafty v zemině byla přibližně 20 000 ppm). V testu akutní toxicity se zeminou kontaminovanou fenantrenem bylo možné inhibici růstu (vyjádřenou jako přírůstek biomasy) *E. fetida* považovat za vhodnější parametr hodnocení tohoto biotestu, protože na rozdíl od projevené inhibice růstu *E. fetida* byla zaznamenána relativně nízká míra mortality *E. fetida*. Byla zjištěna významná závislost ($r = 0,841$) celkového přírůstku biomasy *E. fetida* za 7 dní v akutním testu na koncentraci fenantrenu v zemině (obrázek 56).



Obrázek 56 Závislost mezi celkovým přírůstkem biomasy *E. fetida* a koncentrací fenanthrenu v zemině (upraveno podle Shin and Kim, 2001)

Zemina kontaminovaná naftou byla v akutním testu hodnocena jako toxická podle obou sledovaných parametrů. Inhibice růstu *E. fetida* se však opět ukázala jako citlivější parametr, mezi inhibicí růstu hmotnosti žížal *E. fetida* vyjádřenou jako přírůstek biomasy *E. fetida* během 7 dní testu a koncentrací nafty v zemině byla nalezena významná korelace ($r = 0,985$) (obrázek 57). Pokles toxicity v akutním biotestu s *E. fetida* byl v souladu s postupující remediací zeminy, kdy byl zaznamenán výrazný pokles koncentrací fenanthrenu, respektive ropných látek v zemině (Shin and Kim, 2001). Tyto závěry v biotestu s *E. fetida* korespondují s výsledky podobné studie pro hodnocení zeminy kontaminované naftou, kde *E. fetida* byl zároveň ve srovnání s *V. fischeri* a biotestem s rostlinami nejcitlivější organismus pro detekci toxicity tohoto typu znečištění (Dorn et al., 1998).



Obrázek 57 Závislost mezi celkovým přírůstkem biomasy *E. fetida* a koncentrací nafty v zemině (upraveno podle Shin and Kim, 2001)

Také při zjišťování toxicity 2 kompostovaných zeminy bylo v biotestu s *E. fetida* využito více hodnotících parametrů (stanovení mortality, růstu a několik reprodukčních charakteristik *E. fetida*) a právě inhibice růstu a reprodukce *E. fetida* vyjádřily lépe toxicitu zeminy (Gibbs et al., 1996). Výsledky těchto studií zároveň potvrzují situaci zaznamenanou při ekotoxikologickém hodnocení bioremediace kontaminované zeminy v rámci této disertační práce, kdy v akutním testu ekotoxicity s *E. fetida* byly zjištěny rozdílné výsledky podle 2 parametrů biotestu s *E. fetida* (hodnocení inhibice růstu se ukázalo jako citlivější parametr ve srovnání s mírou mortality) (obrázek 29).

Některé studie prokázaly v biotestu *E. fetida* stejnou míru ekotoxicity podle inhibice růstu a inhibice reprodukce *E. fetida* (Neuhauser and Callahan, 1990; Van Gestel et al, 1992; Van Gestel et al, 2001). Jiní autoři ale upozorňují na možné negativní korelace mezi reprodukcí a růstem žížal *E. fetida* (Robidoux et al., 2000). Na základě hodnocení růstu a reprodukce žížal *E. fetida* při expozici výluhu z impregnace dřeva (s obsahem i těžkých kovů) aplikovaného do připravené zeminy byla vyjádřena hypotéza, že *E. fetida* může v kontaminované zemině vyčlenit více energie pro růst než pro reprodukci (Leduc et al., 2008). V biotestech s žížalami *E. fetida* tak nezbývá než doporučit kombinaci dvou různých endpointů pro přesnější vyhodnocování tohoto testu.

7.7. Baterie testů ekotoxicity

Citlivost jednotlivých standardních biotestů vyplývá nejen z různé biologické úrovně působení jednotlivých toxikantů a různého stupně biologické složitosti testovacích organismů, ale má spojitost i s typem kontaminace (Kyclet et al., 2001; Dawson et al, 2007). Odpověď jednotlivých organismů ovlivňuje mnoho faktorů jako například biodostupnost, způsob přijímání toxikantu, jeho případná bioakumulace, schopnost škodlivou látku odbourávat apod. Proto by se při ekotoxikologickém hodnocení nemělo zobecňovat pouze z výsledků biotestu jednoho organismu, jak bohužel bylo častým zvykem v minulosti. Vzhledem k velmi různé a obtížně predikovatelné citlivosti testovacích organismů k toxikantům, je zároveň velmi obtížné a nákladné vybrat organismy specifické pro jednotlivé stresory. Jedinou cestou se zdá být výběr vhodných baterií biotestů, neboť zapojením většího počtu testovacích organismů vzrůstá nejen informace o zkoumaném vzorku, ale zvyšuje se zároveň i výpovědní hodnota celého hodnocení (Maršálek, 2004). Ekotoxicitu je třeba v těchto sadách biotestů stanovovat na úrovni producentů, konzumentů i destruentů (Maršálek and Rojíčková-Padrťová, 2000). Důležitý je též aspekt výběru vhodného parametru pro daný biotest (Cedegreen and Streibig, 2005). Existuje množství kritérií pro výběr jednotlivých biotestů do této souhrnné sady biotestů. Do baterie jsou vybírány biotesty především takovým způsobem, aby tato sada biotestů byla schopna detekovat co nejvíce různých tříd toxikantů s vysokou spolehlivostí (Johnson, 2000; Maršálek, 2002). Nicméně názory různých autorů pro výběr vhodných biotestů do souhrnné testovací baterie se velice liší.

Již Slooff and Canton (1983) se pokusili o jedno z prvních doporučení pro použití určitých biotestů pro ekotoxikologické hodnocení vodního prostředí. Willemsen et al. (1995) při podrobném hodnocení 26 mikrobiotestů (využívajících bakterie, řasy, bezobratlé organismy, včetně testů genotoxicity a teratogenicity) uskutečnili výběr třech reprezentativních biotestů do testovací baterie, kdy podle různých kritérií vybrali bioluminiscenční test s *V. fischeri*, test s řasami na mikrodestičkách a test Thamnotoxkit FTM s korýšem *Thamnocephalus platyurus*. Výběr právě těchto tří organismů v testovací baterii byl například realizován v případě hodnocení výluhů skládek komunálního odpadu v jižní Itálii (Isidori et al., 2003). Na základě zkušeností z aplikace různých

biotestů při hodnocení kvality povrchových vod v Estonsku jsou navrhovány v testovací baterii pro určení potenciálního rizika pro vodní ekosystém biotesty s *D. magna*, *L. minor*, řasou *S. capricornutum* a případně i s korýšem *T. platyurus* (Blinova, 2000). Rojíčková-Padrťová et al. (1998) shrnují výběr organismů do baterie biotestů, jejíž součástí by měl být bioluminiscenční test, řasový test a test s korýši nebo vířníky. Při vytváření jednoduché a dostatečně citlivé baterie biotestů, která by byla použitelná pro hodnocení toxicity kontaminované vody také v rozvojových zemích, bylo navrženo použití testu klíčivosti *L. sativa*, test imobilizace *D. magna* a 3-denní test mortality *Hydra attenuata* (Forget et al., 2000). Existuje řada dalších doporučení pro výběr testovací baterie pro konkrétní typy znečištění, která ale mají velice specifické uplatnění (Clément et al., 1996; Zurita et al., 2005; Alvarenga et al., 2007; Macken et al., 2008).

Přetrvávajícím problémem v současnosti zůstává výběr vhodné sady biotestů, která by byla obecněji použitelná pro ekotoxikologické hodnocení pevných vzorků-půdy, sedimentu či pevného odpadu. Při testování toxicity kontaminovaných půd a sedimentů se zatím stále ještě nejčastěji používají biotesty s testovacími organismy žijícími ve vodě; půdní matrice je tak před ekotoxikologickým stanovením převáděna do formy výluhu (Maxam et al., 2000). Polutanty z půd je možné extrahovat buď vodou nebo organickým rozpouštědlem. Vodný výluh by měl modelovat reálné situace nastávající ve volné přírodě jako jsou splachy, vymývání a déšť a při jeho přípravě se ze vzorku extrahuje pouze určitý podíl polutantů související s rozpustností ve vodním prostředí. Naopak organický extrakt obsahuje všechny polutanty přítomné ve vzorku, tedy i ty, které byly imobilizovány vazbou na půdní částice a organismům nebyly dostupné, avšak tento extrakt již představuje v přírodě odlišnou situaci (Kahru et al., 2002). Většinou jsou pro testy ekotoxicity připravovány vodné výluhy, avšak už pouhá rozdílná metodika přípravy výluhů, kdy je používáno například různé množství zeminy, může odhalit řadu problému nejen při porovnávání ekotoxikologických výsledků řady autorů. Nejčastěji se v testech ekotoxicity užívá poměr zeminy a vody 1:10 (Kyclt et al., 2004; MŽP, 2007) nebo 1:4 (Šašek et al., 2003; Loibner et al., 2005), avšak řada autorů používá své upravené metodiky pro přípravu výluhu (Bispo, et al., 1999; Bierkens et al., 1998; Plaza et al., 2005). Pokud je v pevné matrici (půda, sediment, odpad) toxický polutant, který je ve vodě nerozpustný (příkladem mohou být hydrofobní organické látky typu chlorovaných pesticidů nebo PAU), zvolená sada biotestů používající pouze

testy s výluhy nemůže toxicitu vhodně postihnout (Kočí et al., 2008). Z toho vyplývá, že pokud například nebezpečné odpady obsahují polutanty ve vodě nerozpustné či méně rozpustné, stanovená ekotoxicita jen na základě testů s vodným výluhem může být značně podhodnocená. To je také základním nedostatkem využití testů ekotoxicity v ČR, kdy hodnocení ekotoxicity legislativně zavedenými testy pro posuzování nebezpečné vlastnosti odpadu se provádí jen na základě testů s vodnými výluhy. Při ekotoxikologickém hodnocení by se tedy měla zvolit taková sestava testů ekotoxicity, která nedostatek metod s výluhem řeší zahrnutím kontaktních (terestriálních) testů ekotoxicity do základní baterie biotestů. Ve světě a v současné době i v ČR se objevuje řada studií, jejichž závěry jasně prokazují rozdílné výsledky testů ekotoxicity s vodným výluhem a v kontaktním uspořádání (Ferrari, et al., 1999; Leitgib et al., 2007; Domene et al., 2008; Kočí et al., 2008). Tuto skutečnost však nedokázal postihnout ani nový metodický pokyn MŽP pro stanovení ekotoxicity odpadů (MŽP, 2007). V minulosti již Keddy et al. (1995) kriticky porovnávali 18 biotestů pro hodnocení kvality půdy, 9 biotestů pro hodnocení sladkovodních sedimentů a 25 biotestů sledujících kvalitu vody a rozdělili testy do tří kategorií: běžně použitelné, prototypové a testy vyžadující další vývoj. Z výběru vybrali vždy tři vhodné biotesty pro zařazení do základní baterie testů; pro ekotoxikologické hodnocení kontaminovaných půd byly vybrány test mortality s *E. fetida*, 5-denní test klíčivosti *L. sativa* a test inhibice růstu řasy *S. capricornutum*, pro hodnocení vodního prostředí byly do sady biotestů vybrány bioluminiscenční test s *V. fischeri*, test inhibice růstu řasy *S. capricornutum* a test imobilizace *D. magna*. Tato baterie třech biotestů byla úspěšně vyzkoušena při aplikaci na hodnocení kvality vodního ekosystému včetně sedimentů v řekách v Německu a Belgii (Ziehl and Schmidt, 2000; Vangheluwe et al., 2000); zároveň byla potvrzena možnost využití upravených metodik právě těchto biotestů v případě hodnocení chronické toxicity při různém typu znečištění (Radix et al., 2000). Při výběru vhodné testovací baterie pro vyjádření toxicity půdy byly hodnoceny odlišné typy znečištění v zeminách 20 testy ekotoxicity s různorodými endpointy, z nichž žádný nebyl nejcitlivější pro vybrané čtyři typy znečištění v zeminách (Bierkens et al., 1998). Zároveň autoři rozdělili hodnocení této sady biotestů podle použití výluhu nebo přímo kontaminované zeminy v jednotlivých testech ekotoxicity. Jako nejcitlivější test při testování výluhů byl hodnocen fluorescenční řasový test a z kontaktních testů nejcitlivější odezvy poskytly

biotesty s *E. fetida*, kdy se sledovaly imunologické parametry a inhibice růstu (Bierkens et al., 1998). V této souvislosti je třeba zmínit ověřování experimentální testovací strategie v rámci EU pro výběr biotestů do baterie pro hodnocení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti odpadů, kdy do rozšířené verze této baterie testů ekotoxicity jsou zahrnovány 2 kontaktní biotesty - inhibice růstu s *L. sativa* a test mortality s *E. fetida* a 4 biotesty s výluhy - inhibice bioluminiscence s *V. fischeri*, inhibice růstu s *S. capricornutum*, test imobilizace s *D. magna* a inhibice reprodukce s *C. dubia*; při výběru 3 biotestů jsou do souhrnné baterie navrhovány testy ekotoxicity s *V. fischeri*, *L. sativa* a *C. dubia* (Pandard et al., 2006).

7.8. Výběr biotestů pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace

V současné době je stále aktuálnější diskuse o možnosti zařazení vybraných testů ekotoxicity do systému pro hodnocení rizik vyplývajících ze starých zátěží, jak je tomu již v některých evropských státech (Rila and Eisentraeger, 2003; Kyclt, et al., 2005). Zatím ale neexistuje univerzální doporučení pro výběr testů ekotoxicity do jediné sady biotestů, která by byla schopna hodnotit různé bioremediační procesy.

Tabulky 13 a 14 shrnují výběr organismů a jejich hodnocených parametrů v biotestech do souhrnné baterie testů, kterou lze doporučit pro ekotoxikologické hodnocení bioremediačních procesů na základě výsledků uvedených v experimentální části této disertační práce. Pro výběr organismů a jednotlivých parametrů byly uplatňovány výsledky bioremediačních experimentů z kapitol 6.1. až 6.5. a zároveň i další získané praktické zkušenosti z realizace jednotlivých testů ekotoxicity.

Jednotlivé testovací organismy a jejich parametry pro vyhodnocení v testech ekotoxicity vykazují odlišnou citlivost k různým kontaminantům. Proto vybrané testovací organismy v baterii biotestů reprezentují různé trofické úrovně (destruenti - test I; producenti - test II a konzumenti - test III). V případě testování vzorků vody i zemin jsou proto vybrány vždy 3 organismy do této baterie biotestů. Pro ekotoxikologické hodnocení kontaminovaných vod a výluhů z kontaminovaných zemin při bioremediacích jsou na základě získaných výsledků z jednotlivých bioremediačních experimentů (kapitoly 6.1. až 6.5.) vybrány biotesty s *V. fischeri* (test I) , *L. minor* (test

II) a *D. magna* (test III) (tabulka 13). Na základě získaných výsledků lze na rozdíl od rostlinných testů s výluhy doporučit bakteriální biotest s *V. fischeri* pro hodnocení výluhů z kontaminovaných zemin. Především podle závislosti inhibice bioluminiscence *V. fischeri* a množstvím NEL ve výluhu z kontaminované zeminy v případě bioremediace v kapitole 6.2. (obrázek 23) se tento test s *V. fischeri* jeví jako vhodný biotest pro předběžné hodnocení do baterie testů pro ekotoxikologické hodnocení zemin v průběhu bioremediace. Do této testovací baterie testů ekotoxicity pro hodnocení průběhu bioremediace zemin s podobnou kontaminací jako v experimentech v kapitole 6.2. a 6.3. lze na základě potvrzené citlivosti doporučit vedle testu s *V. fischeri* (test I) také testy s rostlinami jako je semi-kontaktní biotest s *L. minor* nebo biotest s *H. vulgare* či *L. sativa* v kontaktním uspořádání (test II). Jako poslední test ekotoxicity zastupující v této baterii biotestů úroveň konzumentů je navrhován biotest s korýši *H. incongruens* nebo žížalami *E. fetida* (test III) (tabulka 14).

Tabulka 13 Baterie testů ekotoxicity pro testování kontaminovaných vod a výluhů při bioremediacích

test č.	testovací organismus	typ testu	délka testu	sledovaný parametr	postup podle
I	bakterie <i>V. fischeri</i>	akutní	15 min; 30 min	inhibice bioluminiscence (H ₁₅); EC ₂₀ ; EC ₅₀	ISO, 1998/c
II	okřehek <i>L. minor</i>	subchronický	7 dní	inhibice růstu *; EC ₅₀	ISO/FDIS, 2005
III	korýš <i>D. magna</i>	akutní	24 h; 48 h	% imobilizace; EC ₅₀	ISO, 1996

Pozn. * inhibice růstu okřehku *L. minor* podle počtu, plochy, resp. hmotnosti listů

Tabulka 14 Baterie testů ekotoxicity pro testování kontaminovaných zemín při bioremediacích

test č.	testovací organismus	typ testu	délka testu	sledovaný parametr	postup podle
I	bakterie <i>V. fischeri</i>	akutní	15 min; 30 min	inhibice bioluminiscence (H ₁₅); EC ₂₀ ; EC ₅₀	ISO, 1998/c
II	rostliny <i>H. vulgare</i> a <i>L. sativa</i>	subchronický	5- 14 dní	inhibice růstu kořene; inhibice klíčivosti	ISO, 1993/b; ISO, 2005
II	okřehek <i>L. minor</i>	subchronický	7 dní	inhibice růstu *; EC ₅₀	ISO/FDIS, 2005
III	korýš <i>H. incongruens</i>	subchronický	6 dní	mortalita; inhibice růstu **	Ostracodtoxkit, 2001
III	žížala <i>E. fetida</i>	akutní, subchronický	14- 28 dní	mortalita; inhibice růstu ***; EC ₅₀	ISO, 1993/a

Pozn. * inhibice růstu okřešku *L. minor* podle počtu, plochy, resp. hmotnosti listů

** inhibice růstu korýše *H. incongruens* podle velikosti

*** inhibice růstu žížal *E. fetida* podle hmotnosti

Souhrnný výběr jednotlivých testů ekotoxicity pro hodnocení bioremediace na základě ekotoxikologických výsledků této disertační práce (tabulka 13 a 14) lze porovnat s řadou studií a jejich výběrem baterie testů ekotoxicity sledujících různé bioremediační postupy.

Tento výběr testovací baterie je částečně v souladu s již zmiňovaným výběrem testovacích organismů pro testovací baterii hodnocení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti odpadů (Pandard et al., 2006). Jak bylo vyjádřeno vybranými biotesty pro ekotoxikologické hodnocení procesu bioremediace s kontaminovanými zeminami (tabulka 14), výsledky jednotlivých testů ekotoxicity nejsou vždy v souladu s koncentracemi polutantů při bioremediaci kontaminovaných zemín a různé biotesty tak vyjadřují rozdílné pohledy na hodnocení bioremediace (Knoke et al, 1999; Rila and Eisentraeger, 2003). Při ekotoxikologickém hodnocení bioremediace zeminy kontaminované ropnými látkami byly například v testovací baterii využity vedle kontaktního biotestu s rostlinami také výluhové testy s korýší *D. magna* a s hlísticemi (Molina-Barahona, et al., 2005). Dorn and Salanitro (2000) použili pro sledování toxicity při bioremediaci zemín kontaminovaných ropnými látkami bioluminiscenční test s *V. fischeri* (v modifikaci pro pevné vzorky), 14-denní test mortality žížalami

E. fetida a testy klíčivosti a inhibice růstu třech vybraných druhů rostlin (pšenice *T. aestivum*, oves *A. sativa* a kukuřice *Zea mays*). Jako velmi citlivý se v této ekotoxikologické studii ukázal test mortality s *E. fetida*, nejméně citlivý byl naopak test s *V. fischeri*; přes stanovený pokles ekotoxicity po 360-denní bioremediaci však nebyla zjištěna jakákoliv závislost zjištěné toxicity a koncentrace ropných látek během bioremediace (Dorn and Salanitro, 2000). Ne každý pokles koncentrace kontaminantů během bioremediace je následován poklesem toxicity; neúplný rozklad a vznik různých meziproductů při bioremediaci může vést dokonce i ke zvýšení toxicity půdy (Belkin et al., 1994; Jarvis et al., 1998; Philips et al., 2000a). Také například Marwood et al. (1998) vyjádřili rozdílný pohled na bioremediaci čtyř různých zemin kontaminovaných ropnými látkami, neboť při poklesu kontaminace během bioremediace byla určena přetrvávající toxicita u všech zemin biotestem s *L. sativa* a dvou zemin také bioluminiscenčním testem s *V. fischeri*. Philips et al. (2000a) dokonce při sledovaném poklesu koncentrace ropných látek během bioremediace zaznamenali zvýšení toxicity biotesty s *V. fischeri*, *L. sativa* a *E. fetida*; tuto skutečnost vysvětlovali právě detekcí vznikajících toxických meziproductů biodegradace polutantů. Ve stejné studii však při hodnocení bioremediace půdy kontaminované PAU byl záznam poklesu toxicity stejnými biotesty v souladu s poklesem koncentrací PAU v zemině během bioremediace (Philips et al., 2000a). Také další studie ukázaly významný pokles ekotoxicity na základě výsledků několika různých akutních a chronických biotestů při poklesu koncentrace PAU při bioremediaci zeminy (Sayles et al., 1999; Philips et al., 2000b). Naopak jiná studie sledující bioremediaci zemin kontaminovaných PAU zaznamenala významný vzrůst toxicity a genotoxicity při zjištěném poklesu koncentrace PAU v zeminách během bioremediace (Belkin et al., 1994). Bioremediace zemin kontaminovaných ropnými látkami byla hodnocena několika testy ekotoxicity s výluhy (testy s 6 druhy rostlin a test s *V. fischeri*) i testy ekotoxicity v kontaktním uspořádání (test s *H. incongruens* a test s prvokem *Spirostomum ambiguum*) a všechny biotesty v této studii potvrdily možnost jejich využití právě pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace půd kontaminovaných ropnými látkami (Plaza et al., 2005). V této studii byla zjištěna významná korelace především mezi výsledky rostlinných biotestů s výluhy pro *L. sativa* (resp. *Triticum aestivum*) a koncentracemi uhlovodíků a PAU v zeminách i výluhu během bioremediace (Plaza et al., 2005). Ale i v jiných studiích byly nalezeny

významné korelace mezi vybranými biotesty a výsledky chemické analýzy během bioremediace kontaminované zeminy (Hund and Traunspurger et al., 1994; Salanitro et al., 1997; Juvonen et al., 2000; Saterbak et al., 2000; Dubova and Zarina, 2004; Hamdi et al., 2006). Příkladem může studie, kdy na základě zjištěné významné korelace mezi koncentracemi krezotu v půdě během bioremediace a výsledky bioluminiscenčního testu s *V. fischeri*, resp. výsledky biotestu s *S. alba* (podle parametru inhibice růstu nadzemní části), jsou právě tyto 2 biotesty společně s testem mortality s *Folsomia candida* navrhovány pro ekotoxikologické hodnocení půd kontaminovaných krezotem (Molnár et al., 2007). Pro jiné ekotoxikologické hodnocení experimentu kompostování zeminy kontaminované PAU byly vedle testu genotoxicity (SOS chromotest s *E. coli*) použity testy s *V. fischeri*, *S. alba* a *E. fetida*, avšak pouze výsledky bioluminiscenčního testu s *V. fischeri* byly v souladu s poklesem koncentrace PAU v zemině během jednotlivých fází kompostování (Šašek et al., 2003). Kapanen and Itävaara (2001) shrnují možnosti využití různých biotestů právě pro hodnocení procesu kompostování, přesto neexistuje pro toto hodnocení doporučená souhrnná baterie biotestů. Blaise et al. (2004) zdůrazňují opatrný výběr biotestů do testovací baterie pro hodnocení toxicity sedimentů kontaminovaných ropnými látkami včetně sledování jejich následné bioremediace a doporučují možnost využití nově používaného biotestu s *H. incongruens*. Použití biotestu s *H. incongruens* vedle biotestů s *L. sativa* a *D. magna* doporučují v testovací baterii pro hodnocení bioremediace zemin kontaminovaných PAU také další autoři (Hamdi et al., 2006). Výběr korýše *H. incongruens* do testovací baterie je též v souladu s výsledky této disertační práce.

Výběr biotestů pro ekotoxikologické hodnocení bioremediace vody (tabulka 13) lze srovnávat například s výsledky aplikace testů ekotoxicity při hodnocení kontaminace podzemních vod na vybraných lokalitách poblíž Londýna, kdy bioluminiscenční test s *V. fischeri* a test imobilizace *D. magna* jsou na základě získaných výsledků navrhovány jako vhodné biotesty pro stanovování ekotoxicity kontaminovaných podzemních vod (Dewhurst et al., 2005). Možnost využívání právě těchto dvou biotestů pro identifikaci toxicity podzemní vody potvrzují Baun et al. (2000). Biotesty s *V. fischeri*, *D. magna* a *E. fetida* byla srovnávána toxicita kontaminované podzemní vody s toxickým efektem zeminy nad kontaminovanou saturovanou zónou; nebyla nalezena významná závislost mezi zaznamenanou toxicitou

půdy, výluhu a podzemní vody, ani nebyla prokázána souvislost mezi výsledky chemické analýzy půdy, výluhu a podzemní vody (Sheehan et al., 2003). Při hodnocení *in situ* remediací podzemní vody v německém Bitterfeldu výsledky sledování změn koncentrace dominantních kontaminantů v podzemní vodě, kterým byly různé chlorované organické polutanty, nedokázaly vysvětlit toxický vliv na *V. fischeri* (Küster et al., 2004a). Byla potvrzena skutečnost, že pouhé sledování výsledků chemických analýz je nepostačující z celkového pohledu hodnocení úspěšnosti bioremediace bez stanovení přímé toxicity.

Aplikací vhodných testů ekotoxicity ve spojení s chemickou analýzou a dalšími parametry lze vedle zpracování analýzy rizika kontaminované podzemní vody nebo zeminy hodnotit také účinnost bioremediace a přesněji definovat sanační limity (Kycil et al., 2001; Küster et al., 2004a). Lze tak stanovit reálné podmínky pro sanaci i konečné hodnoty sanačních limitů a tím dosáhnout finančních úspor na provedení bioremediace (Matějů et al., 2004). Výsledky této disertační práce potvrzují, že remediací kontaminovaných lokalit nemusí vždy vést k redukci toxického potenciálu a některé vlivy na průběh bioremediace tak mohou být podhodnoceny, pokud není právě stanovována ekotoxicita. V tomto kontextu aplikace vhodných testů ekotoxicity pro hodnocení kontaminovaných lokalit a následné bioremediace ovlivňuje celý proces a filosofii bioremediace, neboť při takovém způsobu hodnocení je základní snahou snižovat toxické vlivy veškerých polutantů v dané lokalitě a nejenom snížení koncentrace specifických polutantů.

8. Závěr

Výsledky této disertační práce prokázaly, že vybrané testy ekotoxicity lze úspěšně použít k hodnocení ekotoxicity kontaminovaných vod a zemin během bioremediace. Výsledky ekotoxikologického hodnocení se odlišovaly v závislosti na testovaném organismu, vybraných sledovaných parametrech a typu testovací metody (kontaktní test nebo test s výluhy). Velmi citlivé a vhodné pro hodnocení ekotoxicity zemin kontaminovaných organickými polutanty se ukázaly být kontaktní testy ekotoxicity.

Na základě výsledků této disertační práce je doporučováno využití bioluminiscenčního testu s *V. fischeri* jako vhodného biotestu pro rychlé předběžné určení toxicity vzorků. Pro ekotoxikologické hodnocení bioremediačních postupů s kontaminovanými zeminami lze zahrnout do souhrnné baterie biotestů vedle biotestu s *V. fischeri* také kontaktní testy ekotoxicity používající některé rostliny (sálat *L. sativa* a ječmen *H. vulgare* nebo „semi-kontaktní“ test s okřehkem *L. minor*) a test s žížalami *E. fetida* nebo s koryši *H. incongruens*. Pro ekotoxikologické hodnocení bioremediačních postupů s kontaminovanými vodami je do testovací baterie biotestů doporučeno zahrnovat biotesty s *V. fischeri*, s koryši *D. magna* a s okřehkem *L. minor*. Vybrané testovací organismy zastupují jednotlivé trofické úrovně a kombinace právě těchto vybraných biotestů je podle získaných výsledků této práce schopna vhodným způsobem sledovat možné ekotoxikologické riziko při bioremediacích.

9. Seznam použité literatury

- Abdul Rida, A.M.M., Bouché, M.B. (1997):** Earthworm toxicology: from acute to chronic tests. *Soil Biol. Biochem.* 29 (3-4): 699-703.
- Adema, D.M.M. (1978):** *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiol.* 59 (2): 125-134.
- Agathos, S.N., Reineke, W. (2003):** Biotechnology for the environment: soil remediation. Vol.3B. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht/ Boston/ London. p.148.
- Ahtainen, J., Valo, R., Jarvinen, M., Joutti, A. (2002):** Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53: 323-329.
- Aichberger, K., Aichberger, H., Todorovic, D., Hasinger, M., Braun, R., Loibner, A.P. (2004):** Disagreement between toxicity reduction and chemical analysis during bioremediation of petrol hydrocarbon contaminated soil. In: *Abstract Book. SETAC EUROPE 14th Annual Meeting*, 18-22. April 2004, Prague, Czech Republic, pp.164-165.
- Algaltokit F™ (1996):** Algaltokit F™, 1996. Freshwater toxicity test with microalgae. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium, 28 p.
- Alexander, M. (1995):** How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29: 2713-2717.
- Alexander, M. (2000):** Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34 : 4259-4265.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G. (2007):** Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ. Int.* 33 (4): 505-513.
- Altenburger, R., Segner, H., Van der Oost, R., (2003):** Biomarkers and PAHs – prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic system. In: Douben, P.E.T. (ed.). PAHs: an ecotoxicological perspective. John Wiley and Sons, Chichester, UK. pp. 297-328.
- Ambrožová, J. (2003):** Presentace výsledků krátkodobého a dlouhodobého testu na hořčici bílé *Sinapis alba*, str. 113-117. In: Kočí, V., Halousková, O. (Ed.). *Ekotoxikologické biotesty 2*, 2.-4.2.2003, Praha, ČR, 142 s.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaji, E. (1975):** Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 75: 4192-4203.
- Arkipchuk, V.V., Romanenko, V.D., Malinovskaya, M.V., Kipnis, L.S., Solomatina, V.D., Krot, Y.G., (2000):** Toxicity assesment of water samples with set of animal and plant bioassays: eperience of the Ukrainian parcipation in the water tox program. *Environ. Toxicol.* 15: 277-286.
- Aruldoss, J.A., Viraraghavan, T. (1998):** Toxicity testing of refinery wastewater using Microtox. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 456-463.
- Ashok, B.T., Saxena, S. (1995):** Biodegradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons - a review. *J. Sci. Ind. Res.* 54 (8): 443-451.
- ASTM (2000):** Guide for conducting static toxicity tests with *Lemna gibba* G3. E 1415- 91. In: *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05 Biological effects and environmental fate; biotechnology; Pesticides. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, USA, pp. 784-793.
- Atlas, R.M. (1981):** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microb. Reviews.* 45 (1): 180-209.
- Atlas, R.M. (1991):** Microbial hyrocarbon degradation- bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52 (2): 149-156.
- Atlas, R.M., Bartha, R. (1992):** Hydrocarbon Biodegradation and Oil-Spill Bioremediation. *Adv. Microbiol. Ecol.* 12: 287-338.
- Autry, A.R., Ellis, G.M. (2006):** Bioremediation: an effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Prog.* 11 (4): 318-323.
- Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., Grimme, L. H. (1997):** Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere.* 35 (12): 2925-2938.
- Bae, J.S., Freeman, H.S. (2007):** Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments.* 73 (1): 81-85.

- Bamforth, S.M., Singleton, I. (2005):** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (7): 723-736.
- Banks, M.K., Schultz, K.E. (2005):** Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water, Air, Soil Poll.* 167 (1-4): 211-219.
- Baun, A., Jensen, S. D., Bjerg, P., B., Christensen, T. H., Nyholm, N. (2000):** Toxicity of organic chemical pollution in ground water down gradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 34 (9): 1647-1652.
- Baun, A., Justesen, K.B., Nyholm, N. (2002):** Algal tests on soil suspensions and elutriates: a comparative evaluation for PAH contaminated soils. *Chemosphere.* 42 (2): 251-258.
- Baun, A., Friis-Nielsen, J., Andersen, T.H., Wollenberger, L., Kusk, K.O. (2004):** Delayed responses of *Daphnia magna* exposed to pulses. In: *Abstract book of SETAC Europe 14th Annual Meeting*, 18-22 April 2004, Prague, Czech Republic, pp. 163. (MOPO18/011).
- Baudgrasset, F., Baudgrasset, S., Safferman, S.I. (1993):** Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere.* 26: 1365-137.
- Beaudin, N., Caron, R.F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L., Ramsay, B. (1996):** Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Sci. Util.* 4 (2): 37-45.
- Belkin, S., Stieber, M., Tiehm, A., Frimmel, F.H., Abeliovich, A., Werner, P., Ulitzur, S. (1994):** Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic-hydrocarbons biodegradation. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9 (4): 303-309.
- Bíbrová, Z. (2004):** Několik poznámek k semichronickému testu s hořčicí bílou *Sinapis alba* In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (Ed.). *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15.-17. září 2004, Chrudim, ČR. str. 92-97.
- Bíbrová, Z. (2005):** Porovnání metodik ekotestu hořčice bílé. In: Ambrožová, J., Tlustá P. (Ed.), *Vodárenská biologie 2005*, 2.-3. února 2005, Praha, ČR, str. 94-97.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G. (1998):** Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere.* 37 (14-15): 2935-2947.
- Bispo, A., Jourdain, M.J., Jauzein, M. (1999):** Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Org. Geochem.* 30: 947-952.
- Blaise, C. (1991):** Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects. *Environ. Toxicol. Water Quant. Int. J.* 6 (2): 145-156.
- Blaise, C. (1998):** Microbiotesting: An expanding field in aquatic toxicology. *Ecotox. Environ. Saf.* 40 : 115- 119.
- Blaise, C. (2000):** Canadian application of microbiotests to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 3-13.
- Blaise, C., Gagné, F., Bombardier, M. (2000a):** Recent developments in microbiotesting and early millennium prospects. *Water Air Soil Poll.* 123: 11-23.
- Blaise, C., Forget, G., Trottier, T., (2000b):** Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Technical Methods.* 15 (4): 352-359.
- Blaise, C., Gagne, F., Chevre, N., Harwood, M., Lee, K., Lappalainen, J., Chial, B., Persoone, G., Doe, K. (2004):** Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. *Environ. Toxicol.* 19: 267-273.
- Blinova, I. (2000):** Comparison of the sensitivity of aquatic test species for toxicity evaluation of various environmental samples. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. p. 217-220.
- Bogolte, B.T., Ehlers, G.A.C., Braun, R., Loibner, A.P. (2007):** Estimation of PAH bioavailability to *Lepidium sativum* using sequential supercritical fluid extraction - a case study with industrial contaminated soils. *Eur. J. Soil Biol.* 43: 242-250.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon. K.R. (2004):** Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2): 371- 382.
- Breedveld, G.D., Karlsen, D.A. (2000):** Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 255-261.

- Bulich A.A. (1979):** Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. *Aq. Tox.* 667: 98-106.
- Bulich, A. A., Huynh H., Ulitzur, S., (1996):** The use of luminiscent bacteria for measuring chronic toxicity. In: Ostrander, G. K.,: *Techniques in aquatic toxicology*. Lewis publishers, CRC press, Inc., pp. 25-62.
- Cajthaml, T., Bhatt, M., Šašek, V., Matějů, V. (2002):** Bioremediation of PAH-contaminated soil by composting: a case study. *Folia Microbiol.* 47: 696-70.
- Cajthaml, T., Šašek, V. (2005):** Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 39: 8448-8452.
- Calow, P. (1994):** General principles and overviews. In: Calow, P. (Ed.) *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford, UK. pp. 1- 5.
- Cayuela, M.L., Millner, P., Slovin, J., Roig, A. (2007):** Duckweed (*Lemna gibba*) growth inhibition bioassay for evaluating the toxicity of olive mill wastes before and during composting. *Chemosphere.* 68 (10): 1985-1991.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C. (2005):** Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (7): 1676- 1683.
- Cerniglia, C.E. (1992):** Biodegradadation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351-368.
- Chapman, P.M. (1995):** Ecotoxicology and pollution- key issues. *Mar. Pollut. Bull.* 31 (4-12): 167-177.
- Charrois, J.W.A., McGill, W.B., Froese, K.L. (2001):** Acute ecotoxicity of creosote-contaminated soils to *Eisenia fetida*: a survival-based approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (11): 2594–2603.
- Chial, Z.B., Persoone, G. (2002a):** Cyst-based toxicity tests XII. Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*. Selection of test parameters. *Environ. Toxicol.* 17 (6): 520–527.
- Chial, Z.B., Persoone, G. (2002b):** Cyst-based toxicity tests XIII. Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*. Methodology and precision. *Environ. Toxicol.* 17 (6): 528–532.
- Chial, Z.B., Persoone, G. (2002c):** Cyst-based toxicity tests XIV. Application of the ostracod solid phase microbiotest for toxicity monitoring of river sediments in Flanders (Belgium). *Environ. Toxicol.* 17 (6): 533–537.
- Chial, Z.B., Persoone, G. (2003a):** Cyst-based toxicity tests XV. Application of the ostracod solid phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils. *Environ. Toxicol.* 18 (5): 347–352.
- Chial, Z.B., Persoone, G., Blaise, C. (2003a):** Cyst-based toxicity tests XVI. Sensitivity comparison of the solid phase *Heterocypris incongruens* microbiotest with the *Hyaella azteca* and *Chironomus riparius* contact assays on freshwater sediments from Peninsula Harbour (Ontario, Canada). *Chemosphere.* 52: 95-101.
- Chial, Z.B., Persoone, G., Blaise, C. (2003b):** Cyst-based toxicity tests XVIII. Application of Ostracodtoxkit microbiotest in a bioremediation project of oil-contaminated sediments: sensitivity comparison with *Hyaella azteca* solid-phase assay. *Environ. Toxicol.* 18 (5): 279-283.
- Clément, B., Persoone, G., Janssen, C., Le Du-Delepierre, A. (1996):** Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates: I. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere.* 33 (11): 2303-2320.
- Cleuvers, M., Ratte, H.T. (2002):** Phytotoxicity of coloured substances: is *Lemna* duckweed test an alternative to the algal growth inhibition test? *Chemosphere.* 49 (1): 9-15.
- Colleran, E. (1997):** Uses of bacteria in bioremediation. In: Sheenan, D. (Ed.) *Methods in biotechnology*. Vol 2, Bioremediation protocols. Humana Press, New Jersey. pp. 3-22.
- Crouau, V., Gisclard, C., Perotti, P. (2002):** The use of *Folsomia candida* (*Collembola*, *Isotomidae*) in bioassays of waste. *Appl. Soil Ecol.* 19 (1): 65-70.
- Cuyppers, M.P., Grotenhuis, J.T.C., Rulkens, W.H. (1998):** Characterisation of PAH-contaminated sediments in a remediation perspective, *Wat. Sci. Tech.* 37 (6-7): 157-164.
- ČSN EN (1995):** Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum*. ČSN EN 28692. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO (1997):** Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity. ČSN EN ISO 6341. Český normalizační institut, Praha.

- ČSN EN ISO (1999):** Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - část 2: Obnovovací metoda. ČSN EN ISO 7346-2. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO (2000):** Jakost vod – stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – část 3: metoda s lyofilizovanými bakteriemi. ČSN EN ISO 11348-3. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN (2003):** Charakterizace odpadu – Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním). ČSN EN 12457-4. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO (2007):** Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřešku. ČSN EN ISO 20079. Český normalizační institut, Praha.
- Daphtoxkit F™ (1996):** Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium. 16 p.
- Dawson, J.J.C., Godsiffe, E.J., Thompson, I.P., Ralebitso-Senior, T.K., Killham, K.S., Paton, G.I. (2007):** Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol. Biochem.* 39 (1): 164-177.
- De Coen, M.W., Vangheluwe, M.L. Janssen, C.R. (1998):** The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. III. Rapid toxicity testing of pure chemicals and sediment pore waters using ingestion and digestive enzyme activity. *Chemosphere.* 37: 2677-2694.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., Giesy, J.P. (2000):** Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Eds.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. p. 13- 25.
- DECHEMA (2001):** Methods for toxicological/ecotoxicological Assessment of Soil. 7th Report of the inter-disciplinary DECHEMA committee “Environmental Biotechnology-Soil”. DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. Frankfurt am Main, Germany.
- De Hoogh, C.J., Wagenvoort, A. (2004):** Implementation and operation of the Algae- and Daphnia-toximeter at monitoring station Keizersveer, the Netherlands. In: *Abstract book of SETAC Europe 14th Annual Meeting*, 18-22 April 2004, Prague, Czech Republic, pp. 17-18. (MO4PM/03).
- Demnerová, K., Králová, B., Kaštánek, F., Burkhard, J., Pazlarová, J., McBeth, D. (1994):** Bioremediation of polluted sites in Czech Republic using indigenous bacteria. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 33 (3): 294-295.
- Demnerová (2003):** Bioremediační technologie k odstranění polychlorovaných bifenylyů ze životního prostředí. In: Holoubek, I. (Ed.), Národní inventura POPs v ČR. TOCOEN Report No. 249, Brno, ČR. str. VII 75- 101.
http://recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_VII_Kapitola_16_Biodegradace_PCBs.pdf
- Dewhurst, R.E., Callaghan, A., Connon, R., Crane, M., Mather, J.D., Wood, R. (2005):** Toxicity testing of groundwater quality. *Water Environ. J.* 19 (1): 17-24.
- Diamantino, T.C., Guilhermino, L., Almeida, E., Soares, A.M.V.M. (2000):** Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotox. Environ. Saf.* 45: 253–259.
- Diaz, L.F., de Bertoldi, M., Bidlingmaier, W., Stentiford, E. (2007):** Compost science and technology. Waste management series 8. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 364 p..
- Doherty, F.G., Qureshi, A.A., Razza, J.B. (1999):** Comparison of the *Ceriodaphnia dubia* and Microtox inhibition tests for toxicity assessment of industrial and municipal wastewaters. *Environ. Toxicol.* 14: 375-382.
- Domene, X., Alcañiz, J.M., Andrés, P. (2008):** Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environ Pollut.* 151: 549-558.
- Dorn, P. B., Vipond, T. E., Salanitro, J. P., Wiesniewski, H. L. (1998):** Assessment of the acute toxicity of crude oils using earthworms, Microtox, and plants. *Chemosphere.* 37 (5): 845-860.
- Dorn, P.B., Salanitro, J.P. (2000):** Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere.* 40: 419-426.
- Douben, P.E.T. (2003):** PAHs: an ecotoxicological perspective. Ecological and environmental toxicology series. John Wiley & Sons, Chichester, 297 p.

- Dubova, L., Zarina, D. (2004):** Application of Toxkit microbiotets for toxicity assessment in soil and composts. *Environ. Toxicol.* 19: 274-279.
- Dubourguier, H.C. (2003):** From laboratory to industrial scale: Composting of polluted soils from former coal industry and gas plants: Future research needs. In: Šašek, V., Glaser, J.A., Baveye, P. (Ed): *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London. pp. 267-283.
- Dutka, B.J., Kwan, K.K. (1981):** Comparison of 3 microbial toxicity screening- tests with the microtox test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27 (6): 753-757.
- Eberius, M. (2001a):** Observation parameters in the duckweed growth inhibition test. Frond number - Total Frond Area - Dry weight. <http://www.lemnatec.com>
- Eberius, M. (2001b):** Comparison of the sensitivity algae vs. duckweed- A simulation study. <http://www.lemnatec.com>
- Eberius, M. (2001c):** Using the duckweed growth inhibition test to detect and evaluate soil contamination. <http://www.lemnatec.com/Literatur/LT008.pdf>
- Eichlerová, I., Homolka, L., Benada, O., Kofroňová, O., Hubálek, T., Nerud, F. (2007):** Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere.* 69 (5): 795-802.
- Eisentraeger, A., Rila, J.P., Hund-Rinke, K., Roembke, J. (2004):** Proposal of a testing strategy and assessment criteria for the ecotoxicological assessment of soil or soil materials. *J. Soils Sediments.* 4: 123-128.
- El-Alawi, Y.S., McConkey, B.J. Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (2002):** Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotox. Environ. Safety.* 51: 12-21.
- El Fantroussi, S., Agathos, N.A. (2005):** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 268-275.
- Environment Canada (1999):** Biological test method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*. Method Development and Application Section. Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/25, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P. (2007):** Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Safety.* 67 (2): 190-205.
- Errampalli, D., Trevors, J.T., Lee, H., Leung, K., Cassidy, M., Marwood, T., Shaw, K., Blears, M., Chung, E. (1997):** Bioremediation: A perspective. *J. Soil Contam.* 6: 207-218.
- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Havertand, P.S., Carlson, A.R. (1997):** Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32 (4): 353-357.
- Farré, M., Martínez, E., Hernando, M.-D., Fernández-Alba, A., Fritz, J., Unruh, E., Mihail, O., Sakkas, V., Morbey, A., Albanis, T. (2006):** European ring exercise on water toxicity using different bioluminescence inhibition tests based on *Vibrio fischeri*, in support to the implementation of the water framework directive. *Talanta.* 69 (2): 323-333.
- Feiler, U., Krebs, F., Heininger, P. (2006):** Aquatic plant bioassays used un the assessment of water quality in German rivers. *Hydrobiologia.* 570 (1): 67-71.
- Fenske, C., Daeschlein, G., Günther, M., Knauer, A., Rudolph, P., Schwahn, C., Adrian, V., von Woedtke, T., Roßberg, H., Jülich, W.-D., Kramer, A. (2006):** Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209 (3): 275- 284.
- Fernández, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babin, M., Pro, J., Tarazona, J.V. (2005):** Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotox. Environ. Saf.* 62: 174-184.
- Ferrari, B., Radetski, C.M., Veber, A., Ferard, J., (1999):** Ecotoxicological assesment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (6): 1195-1202.
- Forget, G., Sánchez-Bain, A., Arkhipchuk, V., Beauregard, T., Blaise, C., Castillo, G., Castillo, L.E., Díaz-Baez, M.C., Pica-Granados, Y., Ronco, A., Srivastava, R.C., Dutka, B.J. (2000):** Preliminary data of a single-blind multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. *Environ. Toxicol.* 15 (5): 362-369.
- Gibbs, M.H., Wicker, L.F., Stewart, A.J. (1996):** A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to the earthworm, *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 360-368.

- Girotti, S., Ferri, E.N., Fumo, M.G., Maiolini, E. (2008):** Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*. In press.
- Gong, P., Wilke B.M., Strozzi, E., Fleischmann, S. (2001):** Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecological assessment of soils. *Chemosphere*. 44: 491- 500.
- Gorsuch, J.W., Oringle, R.O., Robillard, K.A. (1990):** Chemical effects on the germination and early growth of terrestrial plants. In W. Wang, J.W. Gorsuch and W.R. Lower, eds., *Plants for Toxicity Assessment*. STP 1091. ASTM, Philadelphia, PA, pp. 49–58.
- Gotzl, A., Malissa, H., Riepe, W. (1999):** A rapid toxicological test method with luminous bacteria for laboratory and on-site assessment of wastes and contaminated soils. *Field Anal. Chem. Technol.* 3 (6): 329-337.
- Greenberg, B.M., Huang, X.D., Dixon, D.G. (1992):** Applications of the higher aquatic plant *Lemna gibba* for ecotoxicological risk assessment. *J. Aquat. Ecosyst. Health*. 1: 147-155.
- Guerin, T.F. (1999):** Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *J. Hazard. Mater.* B65: 305-315.
- Gunderson, C.A., Kostuk, J.M., Gibbs, M.H., Napolitano, G.E., Wicker, L.F., Richmond, J.E., Stewart, A.J. (1997):** Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosive-contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (12): 2529–2537.
- Guzzella, L. (1998):** Comparison of test procedure for sediment toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*. 37 (14-15): 2895-2909.
- Hale, F.W., Battersby, N.S. (2005):** Case study: whole effluent assessment using a combined biodegradation and toxicity approach. In: *Environmental Toxicity Testing*. Thompson, K. C., Wadhia, K., Loibner, A. P. (ed.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 310-336.
- Hamdi, H., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N. (2006):** Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere*. 65 (7): 1153-1162.
- Hanson, M.L., Solomon, K.R. (2002):** New technique for estimating thresholds of toxicity in ecological risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 36 (15): 3257-3264.
- Harvey, R. G. (1997):** Polycyclic aromatic hydrocarbons. Wiley-VCH, New York. 667 p.
- Heinlaan, M., Kahru, A., Kasemets, K., Kurvet, I., Waterlot, C., Sepp, K., Dubourguier, H.C., Douay, F. (2007):** Fast screening of soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests. *ATLA*. 35: 101-110.
- Helma, C., Eckl, P., Gottmann, E., Kassie, F., Rodinger, W., Steinkeller, H., Windpassinger, C., Schulte-Herman, R., Knassmuller, S., (1998):** Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environ. Sci. Technol.* 32 (12): 1799-1805.
- Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E. (1999):** Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* 30: 963-969.
- Hernando, M.D., Malato, O., Farré, M., Fernandez-Alba, A.R., Barceló, D. (2006):** Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. *Talanta*. 69 (2): 370-376.
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernandez-Alba, A.R. (2007):** Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*. 68 (4): 724-730.
- Hirmann, D., Rost, Braun, R., H. Loibner, A.P. (2002):** Toxicity of PAH- Is the bioluminescence test an appropriate measure?. In: Abstract book of SETAC Europe 12th Annual Meeting. 12-16 May 2002, Vienna, Austria, SETAC, 2002, p. 223.
- Hirmann, D., Loibner, A.P., Braun, R., Szolar, O.H.J. (2007):** Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*. 67 (6): 1236-1242.
- Holoubek, I. (1999):** Persistent bioaccumulative and toxic chemicals in Central and Eastern Europe: Levels and risks. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29: 179-185.
- Hubálek, T., Kováčová, N., Vandrovcová, M. (2004):** Využití okřehku *Lemna minor* v ekotoxikologii. In: Kočí, V., Halousková, O. (Ed.). *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15-17. září 2004, Chrudim, ČR, str. 60-64.

- Hubálek, T., Vosáhlová, S., Matějů, V., Kováčová, N., Novotný, Č. (2007):** Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation - a case study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52 (1): 1–7.
- Hue, N.V., Liu, J. (1995):** Predicting compost stability. *Compost Sci. Util.* 3: 8–15.
- Hund, K., Traunspurger, W. (1994):** Ecotox - evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere.* 29 (2): 371-390.
- Hund-Rinke, K., Wiechering, H. (2001):** Earthworm avoidance test for soil assessments. *J. Soils Sediments.* 1 (1): 15–20.
- Innemanová, P., Havlík, T. (2000):** Představení metodické příručky „Indikace přirozené biodegradační kapacity horninového prostředí“. In: Halousková, O. (Ed.). Biodegradace IV, Seč, 8.-9.3.2000, ČR. str. 69-72.
- Inouye, L.S., Jones, R.P., Bednar, A.J. (2006):** Tungsten effects on survival, growth, and reproduction in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (3): 763–768.
- Iranzo, M., Sainz-Pardo, I., Boluda, R., Sánchez, J., Mormeneo, S. (2001):** The use of microorganisms in environmental remediation. *Annals of Microbiology.* 51 (2): 135-143.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. (2003):** Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere.* 52 (1): 85-94.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, Ph., Bintein, S., Esserméant, L., Féraud, J.F., Galloti – Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiébaud H., Tomassone, R., Vindimian, E., (2001):** Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere.* 45 (4-5): 659- 669.
- ISO (1993a):** Soil quality- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. ISO 11268-1. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO (1993b):** Soil quality- Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. ISO 11269-1. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1993c)** Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis: Gravimetric method. ISO 11465. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1995):** Soil quality- determination of the effects of pollutants on soil flora, Effects of chemicals on emergence and growth of higher plants. ISO 11269-2. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1996):** Water quality- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Cestacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1998a):** Soil quality- Effects of soil pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1998b):** Soil quality- Determination of the water- retention characteristic - Laboratory methods. ISO 11274. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1998c):** Water quality- Determination of inhibitory effect of wates samples on the light emission on *Vibrio fischeri* (luminiscent bacteria test)- part 3: method using freeze-dried bacteria. ISO 11348-3. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1998d):** Soil quality - Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons - Method using high-performance liquid chromatography. ISO 13877. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (2005):** Soil quality- Determination of the effects of pollutants on soil flora- Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.). ISO 17126. The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/CD (2005):** Water quality- Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminiscent bacteria test). ISO/CD 21338. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/FDIS (2005):** Water quality- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed *Lemna minor*- Duckweed growth inhibition test. ISO/FDIS 20079 (draft). The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- Jager, T., Baerselman, R., Dijkman, E., De Groot, A.C., Hogendoorn, E.A., De Jong, A., Kruitbosch, J.A.W., Peijnenburg, W.J.G.M. (2003):** Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, *Oligochaeta*) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- Janssen, C.R., Persoone, G. (1993):** Rapid toxicity screening tests for aquatic biota 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 711-717.
- Janssen, C.R. (1998):** Alternative assays for routine toxicity assessments: A review. In: Schüürmann, G., Markert, B.A. (Eds.), *Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects*. Wiley and Sons, London, UK, pp. 813-831.
- Janssen, C.R., Vanghluwe, M., Van Sprang P. (2000):** A brief review and critical evaluation of the status of microbiotests. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp.27-37.
- Janssen, C.R. (2005):** Ecotoxicological research: linking fundamental science with environmental risk assessment and management. In: *Summer school of environmental chemistry and ecotoxicology*. 9.-16.7.2005, Brno, ČR.
- Jarvis, A.S., McFarland, V.A., Honeycutt, M.E. (1998):** Assessment of the effectiveness of composting for the reduction of toxicity and mutagenicity of explosive-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Saf.* 39: 131-135.
- Jenner, H.A., Janssen-Mommen, J. P. M. (1993):** Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 3- 11.
- Jennings, V.L., Rayner-Brandes, M.H., Bird, D.J. (2001):** Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water. Res.* 35 (14): 3448-3456.
- Jirků, V. (1997):** Problematika biologických dekontaminací. Sborník VŠCHT, Praha, str. 163-164.
- Johnson, B.T. (1998):** Microtox® toxicity test system - New developments and applications. In: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C. (Ed.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC, New York, NY, USA, pp. 201–218.
- Johnson, D.L., Jones, K.C., Langdon, C.J., Pierce, T.G., Semple, K.T. (2002):** Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1363-1370.
- Johnson, I. (2000):** Criteria-based procedure for selecting test methods for effluent testing and its application to Toxkit microbiotests. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 73–94.
- Jos, A., Repetto, G., Ríos, J.C., del Peso, A., Salguero, M, Hazen, M.J., Molero, M.I., Fernández-Freire, P., Pérez-Martín, J.M., Labrador, V., Cameán, A. (2005):** Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquat Toxicol.* 71: 183-192
- Joutti, A., Schultz, E., Tuukkanen, E., Vaajasaari, K. (2000):** Industrial waste leachate toxicity detection with microbiotests and biochemical tests. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 347-355.
- Juvonen, R., Martikainen, E., Schultz, E., Joutti, A., Ahtiainen, J., Lehtokari, M. (2000):** A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 47: 156-166.
- Kafka, Z., Punčochářová, J. (1999):** Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí. *Chem. Listy.* 93: 604-606.
- Kahru, A. (1993):** In vitro toxicity testing using marine luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum*: the BioTox™ test. *ATLA.* 21: 210–215.
- Kahru, A., Borchardt, B. (1994):** Toxicity of 39 MEIC chemicals to bioluminescent photobacteria (the Biotox™ test): Correlation with other test systems. *ATLA* 22: 147–160.
- Kahru, A., Pöllumaa, L., Blinova, I., Reiman, R., Ratsep, A. (1998):** Chemical versus toxicological analysis in characterization of phenolic pollution: a test battery approach. *Toxicol. Lett.* 95 (1): 236 (supl.1).

- Kahru, A., Pöllumaa, L., Reiman, R., Rätsep, A. (2000):** Microbiotests for the evaluation of the pollution from the oil-shale industry. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 357-365.
- Kahru, A., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kurvet, I., Reiman, R., Pöllumaa, L. (2002):** Water- and solvent-extractable toxicity and mutagenicity of PAH-polluted soils before and after remediation. In: *Book of Abstracts, SECOTOX 2002- Trends and advances in environmental chemistry and ecotoxicology*, 14.-16.10.2002, Brno, Czech Republic. pp. 131-134.
- Kahru, A., Pöllumaa, L. (2006):** Environmental hazard of the waste streams of the Estonian oil-shale industry: an ecotoxicological review. *Oil Shale*. 23 (1): 53-93.
- Kaiser, K., Palabrica, V. (1991):** *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollut. Res. J. Can.* 26 (3): 361-431.
- Kaiser, K.L.E. (1998):** Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environ. Health Persp.* 106 (Suppl. 2): 583-590.
- Kanally, R.A., Harayama, S. (2000):** Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182 (8): 2059-2067.
- Kapanen, A., Itavaara, M. (2004):** Effect of compost maturity on applicability of biotest. In: Abstract book of SETAC Europe 14th Annual Meeting. 18-22 April 2004, Prague, Czech Republic. pp.184. (TUPO3/018).
- Kapanen, A., Itavaara, M., (2001):** Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 1-16.
- Kapustka, L.A., Reporter, M. (1995):** Terrestrial primary producers. In: Calow, P. (Ed.) *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. 1. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK. pp. 278-298.
- Kapustka, L.A. (1997):** Selection of phytotoxicity tests for use in ecological risk assessments. In: Wang, W., Gorusch, J.W., Hughes, D. (Ed.) *Plants for environmental studies*. New York: CRC Press. pp.516-548.
- Keddy, C.J., Greene, J.G., Bonnell, M.A. (1995):** Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30: 221-251.
- Kirchmann, H., Ewnetu, W. (1998):** Biodegradation of petroleum-based oil wastes through composting. *Biodegradation*. 9: 151-156.
- Knoke, K.L., Marwood, T.M., Cassidy, M.B., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T. (1999):** A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. *Water, Air, Soil Pollut.* 110: 157-169.
- Kočí, V., Rakovický, T., Švagr, A. (2001a):** Testy akutní a semichronické toxicity. VŠCHT, Ústav chemie ochrany životního prostředí, Praha, 7s.
- Kočí, V., Rakovický, T., Švagr, A. (2001b):** Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*. <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm>
- Kočí, V. (2002):** Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. Sborník konference Ekotoxikologické Biotesty. 1: 3-7.
- Kočí, V., Ocelka, T., Dragoun, D., Vít, M., Grabic, R., Šváb, M. (2007):** Concentration of Organochlorine Pollutants in Surface Waters of the Central European Biosphere Reserve Křivoklátsko. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 14 (2): 94-101.
- Kočí, V., Kulovaná, M., Vosáhlavá, S. (2008):** Srovnání citlivosti akvatických a terestrických testů toxicity při testování ekotoxicity odpadů a kontaminovaných zemín. In: Odpadové fórum 2008. 16.-18.4.2008, Milovy- Sněžné n.M. str. 4189- 4197.
- Koivisto, S. (1995):** Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ. Pollut.* 90: 263-267.
- Kubal, M., Burkhard, J., Březina, M. (2002):** Dekontaminační technologie. VŠCHT, Praha. <http://www.vscht.cz/uchop/CDmartin/8-nejcasteji/3-1.html>
- Kula, H., Larink, O. (1997):** Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil. Biol. Biochem.* 29 (3-4): 635-639.
- Kula, H., Larink, O. (1998):** Tests on the earthworms *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*. In: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. Ed. Lokke, H., van Gestel, C.A.M., 1998 John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 95-112.
- Kulovaná, M., Hudáková, V., Hoch, K., Kočí, V., Vosáhlavá, S. (2006):** Analytické problémy při hodnocení odpadů- výzkum pro hospodaření s odpady v rámci ochrany životního prostředí a udržitelného rozvoje. In: *Odpadové fórum 2006*, 24.-27.4.2006, Milovy, ČR, str. 3157-3163.

- Kummerová M., Slovák L., Holoubek I. (1995):** Phytotoxicity studies of benzo[a]pyrene with *Lactuca sativa*. *Toxicol. Environ. Chem.* 51: 197-203.
- Kummerová M., Kmentová, E. (2004):** Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere.* 56: 387-393.
- Küster, E., Dorusch, F., Vogt, C., Weiss, H., Altenburger, R. (2004a):** On line biomonitors used as a tool for toxicity reduction evaluation of in situ groundwater remediation techniques. *Biosens. Bioelectron.* 19 (12): 1711-1722.
- Küster, E., Duquesne, S., Altenburger, R. (2004b):** A Daphnia on line biomonitor used as a tool for toxicity reduction evaluation (TRE) in groundwater remediation and for effect analysis of pesticides. In: *Abstract book of SETAC Europe 14th Annual Meeting*, 18-22 April 2004, Prague, Czech Republic, pp. 58. (TU3AM1/02).
- Kwan, K.K., Dutka, B.J. (1990):** Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Tox. Assess. Int. J.* 5: 395-404.
- Kyčt, R., Vosáhllová, S., Matějů, (2001):** Nové možnosti využití testů ekotoxicity. *Ekoanalytika, testy toxicity 2001*, 12-13.6 2001, str. 163-175.
- Kyčt, R., Matějů, V., Vosáhllová, S. (2004):** Sledování změn ekotoxicity v průběhu biodegradace zemin, test na žížalách In: Kočí V., Halousková O. (Ed.), *Ekotoxikologické biotesty 4*, 18.-19. září 2002, Seč, ČR, str.8-24.
- Kyčt, R., Matějů, V., Kyslíková, E., Vítovcová, L. (2005):** Řízení procesu biodegradace a hodnocení vyčištěných materiálů. In: Burkhard, J. and Pecinová, A. (Edit.) *Sanační technologie VIII*, 25.-26.5.2005, Uherské Hradiště, ČR, str. 99-105.
- Lanno, R.P., McCarty L.S. (1997):** Earthworm bioassays: adopting techniques from aquatic toxicity testing. *Soil Biol. Biochem.* 29 (314): 693-697.
- Lanno, R., Wells, J. Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004):** The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox. Environ. Saf.* 57: 39-47.
- Lappalainen, J., Juvonen, R., Vaajasaari, K., Karp, M. (1999):** A new flash method for measuring the toxicity of solid and coloured samples. *Chemosphere.* 38 (5): 1069 – 1083.
- Leduc, F., Whalen, J.K., Sunahara, G.I. (2008):** Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69:219-226.
- Lee, K., Wohlgeschaffen, G., Tremblay, G.H., Johnson, B.T., Sergy, G.A., Prince, R.C., Guénette, C.C., Owens, E.H. (2003):** Toxicity evaluation with the Microtox test to assess the impact of in-situ oiled shoreline treatment options: Natural attenuation and sediment relocation. *Spill Sci. Technol. Bull.* 8: 273-284.
- Leipe, T., Kersten, M., Heise, S., Pohl, C., Witt, G., Liehr, G., Zettler, M.L., Tauber, F. (2005):** Ecotoxicity assessment of natural attenuation effects at a historical dumping site in the western Baltic Sea. *Mar. Poll. Bull.* 50: 446-459.
- Leitgib, L., Kálmán, J., Gruiz, K. (2007):** Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere.* 66 (3): 428-434.
- Lerche, D., Van De Plassche, E., Schwegler, A., Balk, F. (2002):** Selecting chemical substances for the UN-ECE POP Protocol. *Chemosphere.* 47: 617-630.
- Lewis, M.A. (1995):** Use of fresh-water plants for phytotoxicity testing - a review. *Environ. Poll.* 87 (3): 319-336.
- Liebeg, E.W., Cutright, T.J. (1999):** The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 44: 55-64.
- Loibner, A.P., Szolar, O.H.J., Braun, R., Hirmann, D. (2004):** Toxicity testing of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons using LUMISTOX®. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 557-564.
- Lokke, H., van Gestel, C.A.M. (1998):** Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 281 p.
- Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A. (2005a):** Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ. Poll.* 138 (1): 121-131.
- Loureiro, S., Ferreira, A.L.G., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A. (2005b):** Evaluation of the toxicity of two soils from Jales Mine (Portugal) using aquatic bioassays. *Chemosphere.* 61 (2): 168-177.
- Lowe, C.N., Butt, K.R. (2007):** Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *Eur. J. Soil Biol.* 43: S281-S288.
- Lukavský, J. (1992):** The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water miniaturized growth bioassay. *Water Res.* 26 (10): 1409-1413.

- Lynch, J.M., Moffat, A.J. (2005):** Bioremediation - prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann. Appl. Biol.* 146: 217-221.
- Macken A, Giltrap M, Foley B, McGovern E, McHugh B, Davoren, M. (2008):** A model compound study: The ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environ Pollut.* In Press
- Mackenzie, S. M, Waite, S., Metcalfe, D. J., Joyce, C. B. (2003):** Landfill leachate ecotoxicity experiments using *Lemna minor*. *Water, Air, Soil Poll. Focus.* 3: 171-179.
- Maila, M.P., Cloete, T.E. (2002):** Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Inter. Biodeter. Biodeg.* 50: 107-113.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B. (2000):** Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)- effect on plants. *Environ. Technol.* 21: 1099- 1110.
- Mark, U., Solbé, J. (1998):** Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database, V – The relevance of *Daphnia magna* as representative test species. *Chemosphere.* 36: 155 -166.
- Maršálek, B., Rojíčková-Padrťová, R. (2000):** Selection of a battery of microbiotest for various purposes- the Czech experience. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 95-101.
- Maršálek, B. (2002):** Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. In: Kočí V., Halousková O. (Ed.). *Ekotoxikologické biotesty 1*, 18.-19.září 2002, Seč, ČR, str. 8-24.
- Maršálek, B. (2004):** Aktuální trendy v ekotoxikologii vodních ekosystémů, In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (Ed.), *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15. -17.září 2004, Chrudim, ČR, str. 5-7.
- Marwood, T.M., Knoke, K., Yau, K., Lee, H., Trevors, J. T., Suchorski-Tremblay, A., Flemming, C.A., Hodge, V., Liu, D.L., Seech, A.G. (1998):** Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 13: 117-126.
- Matějů, V. Kyclt, R. (2000):** Přirozená biologická atenuace kontaminovaného horninového prostředí. In: Halousková, O. (Ed.). *Biodegradace IV*, Seč, 8.-9.3.2000, ČR. str. 65-68.
- Matějů, V. (2003):** Bioremediation in the Czech Republic, In: Šašek, V., Glaser, J.A. and Baveye, P. (Eds.) *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solutions.* NATO science series, IV. Earth and environmental sciences, Vol. 19, pp. 405-412.
- Matějů, V., Vosáhlová, S., Kyclt, R., Vítovcová, L. (2004):** Aplikace výsledků ekotoxikologických testů při zpracování rizika pro životné prostředí. In: Kočí, V., Halousková, O. (Ed.). *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15-17. září 2004, Chrudim, ČR, str. 144-154.
- Matějů, V., Vosáhlová, S., Kyclt, R. (2005a):** Stanovení ekotoxicity. *Odpadové fórum.* 4: 18-19.
- Matějů, V. Kyclt, R., Dosoudil, P., Černý, I. (2005b):** Praktické zkušenosti podporou účinnosti sanačního čerpání povrchově aktivní látkou. In: Burkhard, J. and Pecinová, A. (Edit.) *Sanační technologie VIII*, 25.-26.5.2005, Uherské Hradiště, ČR., str. 92-98.
- Maxam, G., Rila, J.P., Dott, W., Eisentraeger, A. (2000):** Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. *Ecotox. Environ. Saf.* 45: 240-246.
- Mitchell, J.A.K., Burgess, J.E., Stuetz, R.M. (2002):** Developments in ecotoxicity testing. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1 (2): 169-198.
- Mkandawire, M., Dudel, E.G. (2005):** Assignment of *Lemna gibba* L. (duckweed) bioassay for *in situ* ecotoxicity assessment. *Aquat. Ecol.* 39 (2): 151-165.
- Mohan, S.V., Kisa, T., Okhuma, T., Kanaly, R., Yoshihisa, S.(2006):** Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5 (4): 347-374.
- Molina-Barahona, L., Vega-Loyo, L., Guerrero, M., Ramirez, S., Romero, I., Vega-Jarquin, C., Albores, A. (2005):** Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environ. Toxicol.* 20: 100-109.
- Molnár, M., Gruiz, K., Halász, M. (2007):** Integrated methodology to evaluate bioremediation potential of creosote-contaminated soils. *Periodica Polytechnica: Chemical Engineering.* 51 (1): 32.
- Motejlová, H. (2008):** Srovnání akvatických testů toxicity s vyššími rostlinami. Diplomová práce. VŠCHT v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí. 70 s.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Pritchard, P.H. (1989):** Creosote-contaminated sites, their potential for bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 23 (10): 1197-1201.

- Mueller, J.G., Middaugh, D.P., Lantz, S.E., Chapman, P.J. (1991):** Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (5): 1277-1285.
- MŽP (2001):** Vyhláška č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. MŽP a MZd ČR.
- MŽP (2007):** Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. *Věstník MŽP.* XVII (4): 5-14.
- Neuhauser, E.F., Callahan, C.A. (1990):** Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals. *Soil Biol. Biochem.* 22: 175-179.
- Newman, M.C., Unger, M.A. (2003):** Fundamentals of ecotoxicology. Lewis Publishers, Inc., CRC Press, Boca Raton, 458 p.
- Nohava, M., Vogel, W.R., Gaugitsch, H. (1995):** Evaluation of the luminiscent bacteria bioassay for the estimation of the toxicological potential of effluent water samples - comparison with data from chemical analysis. *Environ Int.* 21 (1): 33-37.
- Nováček, O. (2007):** Vliv environmentálních faktorů na složení společenstev lasturnatek (Ostracoda) se zaměřením na pramenišní biotopy. Bakalářská práce. Ústav botaniky a zoologie, PŘF MU, Brno. 44 s.
- Novotný, Č., Dias, N., Kapanen, A., Malachová, K., Vandrovcová, M., Itävaara, M., Lima, N. (2006):** Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere.* 63 (9): 1436-1442.
- OECD (1984):** OECD Guideline for testing of chemicals: Earthworm acute toxicity test. Guideline 207. OECD, Paris, France.
- OECD (2004a):** OECD Guideline for testing of chemicals: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*) Earthworm, acute toxicity tests. Guideline 222. OECD, Paris, France.
- OECD (2004b):** OECD Guidelines for the testing of chemicals: *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Guideline 202. OECD, Paris, France.
- OECD (2006a):** OECD Guidelines for testing of chemicals. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Guideline 208. OECD, Paris, France.
- OECD (2006b):** OECD Guidelines for testing of chemicals. Terrestrial plant test: vegetative vigour test. Guideline 227. OECD Paris, France.
- OECD (2006c):** OECD Guidelines for testing of chemicals: *Lemna* sp. Growth inhibition test. OECD/OCDE guideline 221. OECD Paris, France.
- Olajire, A.A., Altenburger, R., Küster, E., Brack, W. (2005):** Chemical and ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated sediments of the Niger Delta, Southern Nigeria. *Sci. Total Environ.* 340 (1-3): 123-136.
- Oleszczuk, P. (2008a):** Heterocypris incongruens as a tool in estimation of sewage sludges toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (4): 864- 872.
- Oleszczuk, P. (2008b):** The toxicity of composts from sewage sludges evaluated by the direct contact tests phytotoxkit and ostracodtoxkit. *Waste Manage.* In Press.
- Ostracodtoxkit (2001):** Chronic "direct contact" toxicity test for freshwater sediments. Standard Operational Procedure, Creasel, Deinze, Belgium, p. 18.
- Paoletti, M.G. (1999):** The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 74: 137-155.
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A. M., Poulsen, V., Jourdain, M. J., Ferard, J. F., Grand, C., Bispo, A. (2006):** Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* 363 (1-3): 114-125.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. (2006):** A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.* 32 (2): 265-268.
- Persoone, G., Janssen, C.R. (1993):** Freshwater invertebrate toxicity tests. In: Calow, P. (Ed.), *Handbook of ecotoxicology.* Blackwell. Publ., UK. pp. 51-66.
- Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (1994):** Cyst-based toxicity tests X: Comparison of the sensitivity of the acute *Daphnia magna* test and two crustacean microbioassays for chemicals and wastes. *Chemosphere.* 29 (12): 2701-2710.
- Persoone, G., Vangheluwe, M. (2000):** Toxicity determination of the sediments of the river Seine in France by application of a battery of microbioassays. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbioassays for routine toxicity screening and biomonitoring.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 427-439.

- Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadrianas, L., Nalez-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., Kolar, B. (2003): A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ. Toxicol.* 18 (6): 395-402.
- Phillips, T.M., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T. (2000a): Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2): 132-139.
- Phillips, T.M., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T. (2000b): Bioremediation in field box plots of a soil contaminated with wood-preservatives: a comparison of treatment conditions using toxicity testing as a monitoring technique. *Water, Air, Soil Pollut.* 121: 173-187.
- Piña, B., Casado, M., Quirós, L. (2007): Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trends Anal. Chem.* 26 (11): 1145-1154.
- Plaza, G., Nalez-Jawecki, G., Ulfing, K., Brigmon, R.L. (2005): The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere.* 59 (2): 289-296.
- Pöllumaa, L., Kahru, A., Eisenträger, A., Reiman, R., Maloveryan, A., Rätsep, A. (2000): Toxicological investigation of soil with the solid-phase flash assay: comparison with other ecotoxicological tests. *ATLA.* 28: 461-472.
- Potter, C.L., Glaser, J.A., Chang, L.W., Meier, J.R., Dosani, M.A., Herrmann, R.F. (1999): Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. *Environ. Sci. Technol.* 33: 1717-1725.
- Pro, J., Ortiz, J.A., Boleas, S., Fernandez, C., Carbonell, G., Tarazona, J.V. (2003): Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 70 (2): 290-295.
- Radix, P., Léonard, M., Papantoniou, C., Roman, G., Saouter, E., Gallotti-Schmitt, S., Thiébaud, H., Vasseur, P. (2000): Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 47: 186-194.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S. (1995): Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, Taylor and Francis, Washington, DC, USA, pp. 3-66.
- Repetto, G., Jos, A., Hazen, M.J., Molero, M.L., del Peso, A., Salguero, M., del Castillo, P., Rodriguez-Vicente, M.C., Repetto, M. (2001): A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicol. in Vitro.* 15 (4-5): 503-509.
- Ribo J. M. (1997): Interlaboratory comparison of studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12 (4): 283-294.
- Rila, J.P., Eisentraeger, A. (2003): Application of bioassays for risk characterisation and remediation control of soils polluted with nitroaromatics and PAHs. *Water, Air, Soil Pollut.* 148 (1-4): 223-242.
- Ritter, W.F., Scarborough, R.W. (1995): A review of bioremediation of contaminated soils and groundwater. *J. Environ. Sci. Health. Part A.* 30 (2): 333-357.
- Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Caumartin, J., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Weeks, J.M., Sunahara, G.I. (2000): Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (7): 1764-1773.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B., Holoubek, I. (1998): Evaluation of alternative and standard toxicity assay for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere.* 37 (3): 495-507.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B. (1999): Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere.* 38: 3329 - 3338
- Römbke, J. (2003): Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: a review. *Pedobiologia.* 47 (5-6): 607-616.
- Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J. (1999): Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonisation of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol.* 7: 414-420.
- Rundgren, S., van Gestel, C.A.M. (1998): Comparison of species sensitivity. In: Lokke, H., van Gestel, C.A.M. (Ed.), *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*. John Wiley & Sons, Chichester, p. 41-55.
- Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Rice-Jackson, L.M., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Vipond, T.E., Western, M.M., Wisniewski, H.L. (1997): Crude oil hydrocarbon biodegradation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Tech.* 31: 1769-1776.

- Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K. (2002):** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20 (6): 243-248.
- Sánchez-Bayo, F. (2006):** Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values for crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. *Environ. Poll.* 139: 385-420.
- Saterbak, A., Toy, R.J., Wong, D.C.L., McMain, B.C., Williams, M.P., Dorn, P.B., Brzuzy, L.P., Chai, E.Y., Salanitro, J.P. (1999):** Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (7): 1591-1607.
- Saterbak, A., Toy, R.J., Mcmain, B.J., Williams, M.P., Dorn, P.B. (2000):** Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (11): 2643-2652.
- Sayles, G.D., Acheson, C.M., Kupferle, M.J., Shan, Y., Zhou, Q., Meier, J.R., Chány, L., Brenner, R.C. (1999):** Land treatment of PAH-contaminated soil: performance measured by chemical and toxicity assays. *Environ. Sci. Tech.* 33 (23): 4310-4317.
- Schultz, E., Joutti, A. (2007):** Arsenic ecotoxicity in soils. Geological Survey of Finland, Finnish Environment Institute. Espoo. 53 p. <http://www.gsf.fi/projects/ramas/reports/ECOTOXICOLOGY.pdf>
- Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R. (2001):** Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Poll.* 112: 269-283.
- Sharma, K.P., Sharma, S., Sharma, S., Singh, P.K., Kumar, S., Grover, R., Sharma, P.K. (2007):** A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. *Chemosphere.* 69 (1): 48-54.
- Sheehan, P., Dewhurst, R.E., James, S., Callaghan, A., Connon, R., Crane, M. (2003):** Is there a relationship between soil and groundwater toxicity? *Environ. Geochem. Health.* 25: 9-16.
- Sherry, J., Scott, B., Dutka, B. (1997):** Use of various acute, sublethal and early life-stage tests to evaluate the toxicity of refinery effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (11): 2249-2257.
- Shin, K.H., Kim, K.W. (2001):** Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia foetida*). *Environ. Monit. Assess.* 70: 93-103.
- Slooff, W., Canton, J.H., Hermens, J. (1983):** Comparison of the susceptibility of 22 fresh water species to 15 chemical compounds. I. (sub)acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 4 (2): 113-128.
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J. (2006):** Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141: 519-525.
- Snell, T.W., Janssen, C. (1995):** Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia.* 313: 231-247.
- Soldán, P., Gálková, H. (2004):** *Vibrio fischeri* - různé původ = různé výsledky. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P.(Ed). *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15.-17. září 2004, Chrudim, ČR. str. 53-59.
- Song, Z. H., Huang, G. L. (2005):** Toxic effects of pentachlorophenol on *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74 (6): 1166-1172.
- Steinberg, S.M., Poziomek, E.J., Engleman, W.H. (1995):** A review of the environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere.* 30 (11): 2155-2197.
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J. (2003):** Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere.* 53: 993-1003.
- Symons, B.D., Sims, R.C. (1988):** Assessing detoxification of a complex hazardous waste using the Microtox™ bioassay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 497-505.
- Šašek, V., Bhatt, M., Cajthaml, T., Malachová, K., Lednická, D. (2003):** Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 336-342.
- Tabak, H.H., Lazorchak, J.M., Lei, L., Khodadouat, A.P., Antia, J.E., Bagchi, R., Suidan, M.T. (2003):** Studies on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments: bioavailability, biodegradability, and toxicity issues. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (22): 473-482.
- Tan, E.L., Ho, C.H., Griest, W.H., Tyndall, R.L. (1992):** Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J. Toxicol. Environ. Health.* 36 (3): 165-175.
- Taraldsen, J.E., Norberg-King, T.J. (1990):** New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor* L.). *Environ. Technol. Chem.* 9 (6): 761-767.
- Thompson, K.C., Wadhia, K., Loibner, A.P. (2005):** Environmental toxicity testing. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Great Britain. 388.p.

- US EPA (1996):** OPPTS 850.4400 Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. p 8
- Vaal, M.A., Folkerts, A.J. (2000):** Suitability of microscale ecotoxicity tests for environmental monitoring. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 253-260.
- Vallack, H.W., Bakker, D.J., Brandt, I., Brostrom-Lunden, E., Brouwer A., Bull K.R., Gough C., Guardans R., Holoubek I., Jansson B., Koch R., Kuylenstierna J., Lecloux A., Mackay D., McCutcheon P., Mocarelli P., Taalman R.D.F. (1998):** Controlling persistent organic pollutants – what next?. *Environ Toxicol Pharm.* 6: 143-175.
- Van Gestel, C.A.M., Van Dis, W.A., Van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M. (1989):** Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia foetida andrei* using copper, pentachlorophenol and 2,4-dichloroaniline. *Ecotox. Environ. Saf.* 18: 305-312.
- Van Gestel, C.A.M., Dirven-Van Breemen, E.M., Baerselman, R. (1992):** Influence of environmental conditions on the growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei* in an artificial soil substrate. *Pedobiologia.* 36: 109–120.
- Van Gestel, C.A.M., van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., van der Hoek, E.E., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G.N.M. (2001):** The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1438-1449.
- Vangheluwe, M.L., Janssen, C.R., Van Sprang, P.A. (2000):** Selection of bioassays for sediment toxicity screening. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Ed.). *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 449-458.
- van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M. (1995):** Soil invertebrates and micro-organisms. In: Calow, P. (Ed.) *Handbook of Ecotoxicology*. Volume 1, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK. p. 251-277.
- Versteeg, D.J., Stalmans, M., Dyer, S.D., Janssen, C. (1997):** *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere.* 34: 869-892.
- Veselá, Š. (2004):** Co víme (a nevíme) o perloočkách- perločky v ekotoxikologii. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P.(Ed). *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15.-17. září 2004, Chrudim, ČR. str. 18-25.
- Visick, K.L., McFall-Ngai, M.J. (2000):** An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri-Eupymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* 182: 1779-1787.
- Voicu, A., Dobrota, S., Stefanescu, M., Lazaroaie, M., Lazar, I., Petrisor, I.G. (2003):** Stimulation of environmental-polluting oil residues degradation by microbial associations. In: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T., Dragun, J. (Ed.), *Contaminated Soils. Volume 8*, Ed. Amherst Publishing, Amherst, MA. pp.335-342.
- Vosáhlová, S., Matějů, V., Vítovcová, L., Kyclet, R. (2004):** Porovnání kvality luminiscenčních bakterií *Vibrio fischeri* od různých dodavatelů. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (Ed.), *Ekotoxikologické biotesty 4*, 15. -17. září 2004, Chrudim, ČR, str. 196-201.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. (2003):** Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis, London, UK. p.309.
- Wang, W. (1986):** Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environ. Pollut.* 11: 1-14.
- Wang, W. (1987):** Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 409-414.
- Wang, W. (1990):** Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* 52 (1): 7-22.
- Wang, X., Yu, X., Bartha, R. (1990):** Effects of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1086-1089.
- Wang, W. (1991):** Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air, Soil Poll.* 59: 381-400.
- Wang, W., Freemark, K. (1995):** The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotox. Environ. Saf.* 30: 289-301.
- Watanabe, K. (2001):** Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin.Biotechnol.* 12: 237-241.
- Wharfe, J. (2005):** Historical perspective and overview. In: Thompson, K. C., Wadhia, K., Loibner, A. P. (Ed.), *Environmental Toxicity Testing*. Blackwell Publishing Ltd , Oxford, UK. pp. 1-32.

- Wickliff, C., Fletcher, J. (1991):** The use of plant tissue cultures as a means of assaying phytotoxicity and biological fate. In: Gorsuch, J.W., Lower, W.R., Wang, W., Lewis, M.A. (Ed.), *Plants for Toxicity Assessment*. Vol II, ASTM STP 1115, ASTM, Philadelphia, PA. pp. 250-257.
- Wik, A., Dave, G. (2006):** Acute toxicity of leachates of tire wear material to *Daphnia magna*-variability and toxic components. *Chemosphere*. 64: 1774-1784.
- Willemsen, A., Vaal, M.A., de Zwart, D. (1995):** Microbiotests as tools for environmental monitoring. National Institute of Public Health and Environmental Planning (RIVM), The Netherlands, report No. 9 (607042005), p. 39. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/607042005.pdf>
- Wilson, S.C., Jones, K.C. (1993):** Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut.* 81 (3): 229-249.
- Wu, L., Ma, L.Q., Martinez, G.A. (2000):** Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *J. Environ. Qual.* 29: 424-429.
- Wu, Y., Lin, Ch., Yuan, L. (2007):** Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. *Ecological Indicators*. 7 (4): 768-775.
- Ziehl, T.A., Schmitt, A. (2000):** Sediment duality assessment of flowing waters in South-West Germany using acute and chronic bioassays. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 3: 347-357.
- Zurita, J.L., Repetto, G., Jos, A., del Peso, A., Salguero, M., López-Artíguez, M., Olano, D., Cameán, A. (2005):** Ecotoxicological evaluation of diethanolamine using a battery of microbiotests. *Toxicol. in Vitro*. 19 (7): 879-886.

10. Seznam zkratek

<i>A. sativa</i>	oves <i>Avena sativa</i>
ASTM	standardizované normy v USA (American Standards™)
ATP	adenosin trifosfát
AV ČR	Akademie věd ČR
BTEX	benzen, toluen, etylbenzen a xylen (3 izomery xylenů)
<i>C. dubia</i>	korýš <i>Ceriodaphnia dubia</i>
CIU	chlorované uhlovodíky
C:N	poměr množství živin (uhlíku a dusíku)
C:N:P	poměr množství živin (uhlík, dusík, fosfor)
ČR	Česká republika
ČSN	Česká technická norma
ČSN EN	česká verze evropské normy
ČSN EN ISO	česká verze evropské normy
ČSN ISO	česká verze evropské normy
DCE	dichloretylen
DCP	dichlorfenol
<i>D. magna</i>	korýš <i>Daphnia magna</i>
DIN	německá technická norma (něm. Deutsches Institut für Normung e.V.)
<i>D. squalens</i>	houba bílé hniloby <i>Dichomitus squalens</i>
EC _x	účinná koncentrace (z angl. effective concentration) - koncentrace způsobující sledovaný efekt u x % zkoušených organismů
EC ₅₀	koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50% inhibici ve srovnání s kontrolou v podmínkách určených jednotlivými metodikami testů (MŽP, 2007)
EEA	Evropská agentura pro životního prostředí (European Environment Agency)
<i>E. fetida</i>	žížala <i>Eisenia fetida</i>
EN	Evropská norma EU
EU	Evropská unie
FMN	flavinmononukleotid
FMNH ₂	redukovaná forma flavinmononukleotidu
<i>H. azteca</i>	korýš <i>Hyalella azteca</i>
<i>H. incongruens</i>	korýš <i>Heterocypris incongruens</i>
HPLC	kapalinová chromatografie (angl. high-priced liquid chromatography)
<i>H. vulgare</i>	ječmen <i>Hordeum vulgare</i>

IC ₅₀	koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50 % inhibici hustoty buněk řas, růstové rychlosti řas nebo růstu kořene semen <i>S. alba</i> ve srovnání s kontrolou v podmínkách určených jednotlivými metodikami testů v ml.l ⁻¹ (MŽP, 2007)
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organisation for Standardisation)
KTJ	kolonie tvořící jednotku (angl. CFU colony-forming unit)
<i>L. minor</i>	okřehek <i>Lemna minor</i>
<i>L. sativa</i>	salát <i>Lactuca sativa</i>
<i>L. sativum</i>	řeřicha <i>Lepidum sativum</i>
LC ₅₀	koncentrace vodného výluhu odpadu, při které uhynie 50 % zkušebních organismů v podmínkách určených jednotlivými metodikami zkoušek v ml.l ⁻¹ (MŽP, 2007)
LD ₅₀	dávka způsobující 50% mortalitu
LID	nejnižší neúčinné zředění (tj. číselná hodnota zředění odpadních vod, při němž nejsou pozorovány žádné účinky) (angl. lowest ineffective dilution)
LOEC	nejnižší koncentrace testovaného vzorku vykazující sledovaný účinek (angl. lowest observed effect concentration)
MBÚ	Mikrobiologický ústav AV ČR
MPO ČR	Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR
MZd ČR	Ministerstvo zdravotnictví ČR
MŽP	Ministerstvo životního prostředí ČR
NEL	Nepolární extrahovatelné látky
NOEC	nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které ještě není pozorován žádný účinek (angl. no- observed effect concentration)
OECD	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Cooperation and Development)
OG	barvivo Orange G
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky (angl. PAH - polycyclic aromatic hydrocarbons)
PCB	polychlorované bifenyly
<i>P. miliaceum</i>	proso <i>Panicum miliaceum</i>
PNEC	předpokládaná koncentrace, která nezpůsobuje žádný efekt
POPs	persistentní organické polutanty (angl. persistent organic pollutants)
RBBR	barvivo Remazol Brilliant Blue R
<i>S. alba</i>	hořčice <i>Sinapis alba</i>
SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry

SD	směrodatná odchylka (angl. standard deviation)
<i>T. aestivum</i>	pšenice <i>Triticum aestivum</i>
TCE	trichloretylen
TNT	2,4,6- trinitrotoluen
TNV	technická norma vodního hospodářství
<i>T. platyurus</i>	koryš <i>Thamnocephalus platyurus</i>
TPH	ropné látky (angl. total petroleum hydrocarbon)
<i>T. pretense</i>	jetel <i>Triforium pretense</i>
<i>T. thermophila</i>	prvok <i>Tetrahymena thermophila</i>
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (Helmholtz Centre for Environmental Research), Lipsko, Německo
US EPA	Agentura životního prostředí v USA (U.S. Environmental Protection Agency)
VC	vinylchlorid
<i>V. fischeri</i>	bakterie <i>Vibrio fischeri</i>
VOC	těkavé organické látky (angl. volatile organic compounds)
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
VKP _{max}	maximální vodní kapacita (angl. WHC _{max} - maximum water-holding capacity)
ŽP	životní prostředí

11. Seznam tabulek a obrázků

Tabulka 1	<i>Ředění výluhu v testu se <i>S. alba</i></i>	33
Tabulka 2	<i>Vybrané parametry kontaminované zeminy během bioremediace</i>	52
Tabulka 3	<i>Koncentrace PAU v kontaminované zemině před kompostováním</i>	54
Tabulka 4	<i>Koncentrace BTEX a chlorovaných látek v podzemní vodě na počátku sledování ekotoxicity</i>	57
Tabulka 5	<i>Protokol testu ekotoxicity - inhibice bioluminiscence bakterie <i>V. fischeri</i></i>	59
Tabulka 6	<i>Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu kořene hořčice <i>S. alba</i></i>	60
Tabulka 7	<i>Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu okřehku <i>L. minor</i></i>	61
Tabulka 8	<i>Protokol testu ekotoxicity - imobilizace koryše <i>D. magna</i></i>	63
Tabulka 9	<i>Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu a mortalita žížal <i>E. fetida</i></i>	63
Tabulka 10	<i>Protokol testu ekotoxicity - inhibice růstu a mortalita koryše <i>H. incongruens</i></i>	64
Tabulka 11	<i>Ekotoxikologické hodnocení metody kompostování- souhrn výsledků jednotlivých biotestů</i>	74
Tabulka 12	<i>Biotest s <i>E. fetida</i> při hodnocení kompostování kontaminované zeminy</i>	83
Tabulka 13	<i>Baterie testů ekotoxicity pro testování kontaminovaných vod a výluhů při bioremediacích</i>	111
Tabulka 14	<i>Baterie testů ekotoxicity pro testování kontaminovaných zemín při bioremediacích</i>	112

Obrázek 1	<i>Ekotoxikologie jako multidisciplinární přístup</i>	4
Obrázek 2	<i>16 prioritních PAU (podle US EPA)</i>	16
Obrázek 3	<i>Charakteristický průběh ekotoxicity (inhibice růstu okřehku <i>L. minor</i> při použití různých koncentrací referenční látky 3,5-dichlorfenolu)</i>	27
Obrázek 4	<i>Příklad postupového diagramu testů ekotoxicity</i>	28
Obrázek 5	<i>Bakterie <i>V. fischeri</i> (A), bioluminiscence <i>V. fischeri</i> (B) a luminometr LUMIStox300 (c)</i>	29
Obrázek 6	<i>Hořčice bílá <i>S. alba</i> (A - semena; B - vyklíčená rostlinka s hypokotylem; C – dospělá rostlina)</i>	32
Obrázek 7	<i>Kontaktní test ekotoxicity s rostlinami</i>	35
Obrázek 8	<i>Okřehek menší <i>Lemna minor</i></i>	37
Obrázek 9	<i>Kultivační zařízení testu s okřehkem <i>L. minor</i> (A - pracoviště MBÚ AV ČR, Praha, ČR; B - pracoviště UFZ, Lipsko, Německo)</i>	38
Obrázek 10	<i>Výsledky testu s okřehkem <i>L. minor</i> pro různé koncentrace referenční látky 3,5-dichlorfenolu (A - počátek testu; B - G po 7 dnech testu)</i>	41
Obrázek 11	<i><i>Daphnia magna</i> (A, C) a její zimní vajíčko- ehipium (B)</i>	42
Obrázek 12	<i>Korýš <i>Heterocypris incongruens</i></i>	45
Obrázek 13	<i>Biotest s korýšem <i>H. incongruens</i> – OstracodToxkit™</i>	46
Obrázek 14	<i>Žížaly <i>E. fetida</i> (A), nádoby pro chov žížal (B), sklenice pro testování (C)</i>	48
Obrázek 15	<i>Kontaminace území jako následek impregnace dřeva</i>	53
Obrázek 16	<i>Kompostovací jednotka (A, B) a zajištění aerace této jednotky (C)</i>	53
Obrázek 17	<i>Průběh první fáze kompostování kontaminované zeminy</i>	54
Obrázek 18	<i>Pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování</i>	55
Obrázek 19	<i>Růst okřehku <i>L. minor</i> v kontaminované podzemní vodě (A- kontrolní vzorek; B- podzemní voda z vrtu HP-72; C- podzemní voda z vrtu HP-81)</i>	57
Obrázek 20	<i>Využití biotestu s <i>L. minor</i> při hodnocení biodegradace barviv- růst <i>L. minor</i> v přítomnosti různých koncentrací barviva RBBR</i>	58
Obrázek 21	<i>Inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> bioremediace kontaminované zeminy</i>	65
Obrázek 22	<i>Grafické srovnání výsledků inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> a poklesu koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy</i>	66
Obrázek 23	<i>Inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> a koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy</i>	66
Obrázek 24	<i>Inhibice růstu kořene rostlin během bioremediace kontaminované zeminy- test s výluhy</i>	67
Obrázek 25	<i>Inhibice růstu kořene <i>S. alba</i> ve vztahu k poklesu koncentrace NEL ve výluhu během bioremediace kontaminované zeminy</i>	68
Obrázek 26	<i>Inhibice růstu kořene rostlin během bioremediace kontaminované zeminy- kontaktní test</i>	69

Obrázek 27	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během bioremediace kontaminované zeminy</i>	70
Obrázek 28	<i>Mortalita <i>H. incongruens</i> během bioremediace kontaminované zeminy</i>	71
Obrázek 29	<i>Mortalita a inhibice růstu <i>E. fetida</i> během bioremediace kontaminované zeminy</i>	72
Obrázek 30	<i>Hodnoty inhibice růstu <i>L. minor</i> ve vztahu k hodnotám inhibice růstu <i>E. fetida</i> během bioremediace kontaminované zeminy</i>	73
Obrázek 31	<i>Hodnoty inhibice růstu kořene <i>H. vulgare</i> ve vztahu k hodnotám inhibice růstu kořene <i>S. alba</i> v kontaktním testu během bioremediace kontaminované zeminy</i>	73
Obrázek 32	<i>Inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> a pokles PAU během kompostování kontaminované zeminy</i>	75
Obrázek 33	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během kompostování kontaminované zeminy</i>	76
Obrázek 34	<i>Vzorek kontaminované zeminy před kompostováním - test s <i>L. minor</i> (A - na počátku testu; B - po 7 dnech testu)</i>	77
Obrázek 35	<i>Vzorek zeminy po kompostování - test s <i>L. minor</i> (A - na počátku testu; B - po 7 dnech testu)</i>	77
Obrázek 36	<i>Mortalita <i>H. incongruens</i> a pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování kontaminované zeminy</i>	78
Obrázek 37	<i>Mortalita žížal <i>E. fetida</i> v různých částech kompostování jednotky a pokles koncentrace PAU v zemině během kompostování kontaminované zeminy</i>	79
Obrázek 38	<i>Výsledky biotestu s <i>V. fischeri</i> ve vztahu k výsledkům biotestu s <i>L. minor</i> při ekotoxikologickém hodnocení kompostování kontaminované zeminy</i>	80
Obrázek 39	<i>Výsledky biotestu s <i>V. fischeri</i> ve vztahu k výsledkům biotestu s <i>E. fetida</i> při ekotoxikologickém hodnocení kompostování kontaminované zeminy</i>	80
Obrázek 40	<i>Inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> během remediac podzemní vody</i>	81
Obrázek 41	<i>Imobilizace <i>D. magna</i> během remediac podzemní vody</i>	82
Obrázek 42	<i>Inhibice růstu kořene <i>S. alba</i> během remediac podzemní vody</i>	82
Obrázek 43	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během remediac podzemní vody (vrt HP-72)</i>	84
Obrázek 44	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během remediac podzemní vody (vrt HP-81)</i>	84
Obrázek 45	<i>Růst okřehku <i>L. minor</i> při různém ředění podzemní vody (vrt HP-81)</i>	85
Obrázek 46	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během remediac podzemní vody (vrt HP-88)</i>	85
Obrázek 47	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během remediac podzemní vody (vrt HP-83)</i>	86
Obrázek 48	<i>Inhibice růstu <i>L. minor</i> během remediac podzemní vody (vrt HP-92)</i>	86
Obrázek 49	<i>Souvislost výsledků biotestu s <i>V. fischeri</i> a biotestu s <i>D. magna</i> při ekotoxikologickém hodnocení remediac podzemní vody (vrt HP-81)</i>	87

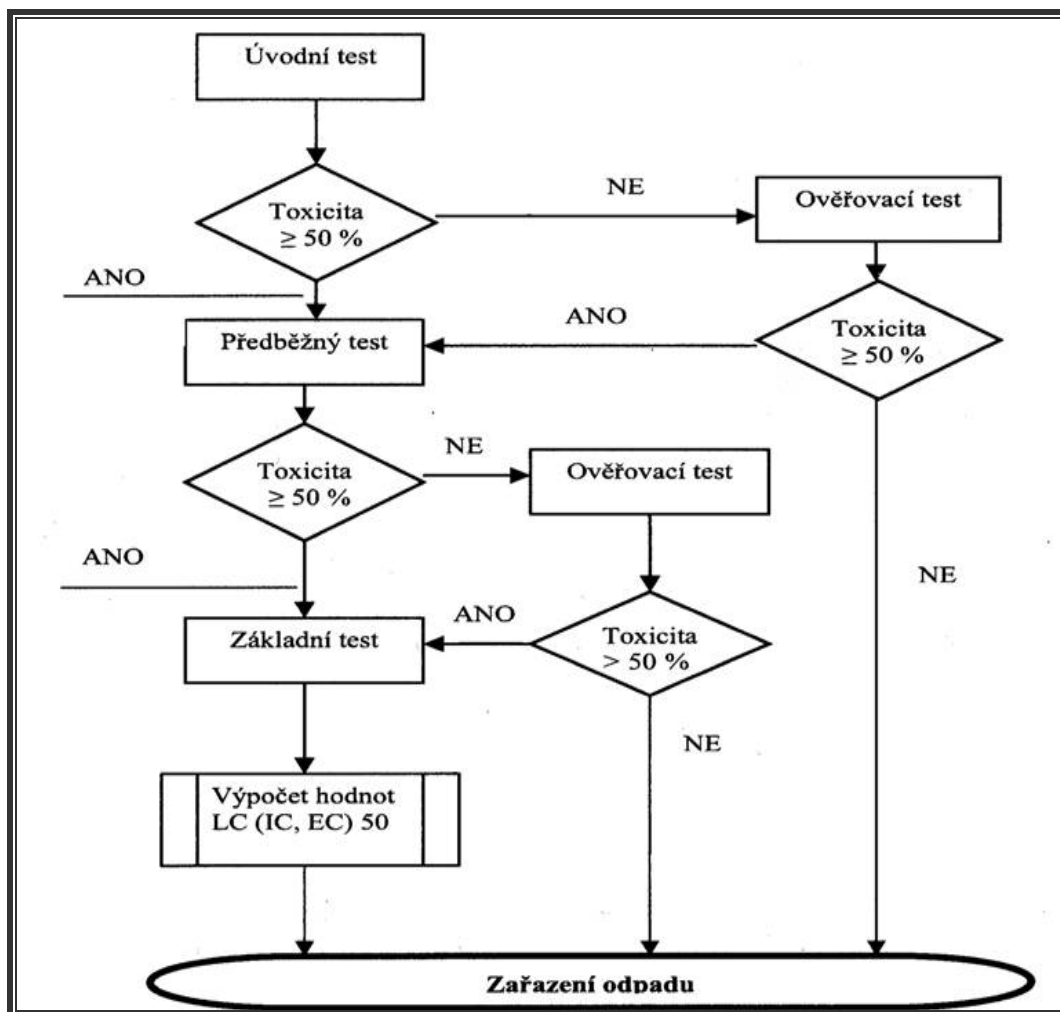
Obrázek 50	<i>Souvislost výsledků biotestu s <i>V. fischeri</i> a biotestu s <i>L. minor</i> ekotoxikologickém hodnocení remediace podzemní vody (vrt HP-81)</i>	87
Obrázek 51	<i>Hodnocení toxicity barviv Orange G a RBBR během jejich biodegradace- biotest s <i>L. minor</i></i>	88
Obrázek 52	<i>Závislost inhibice bioluminiscence <i>V. fischeri</i> a koncentrace 16 PAU v zemině i ve výluhu během bioremediace</i>	91
Obrázek 53	<i>Klíčivost <i>L. sativum</i> v zeminách kontaminovaných různými koncentracemi PAU; bez přítomnosti surfaktantu (A); s přítomností surfaktantu (B)</i>	94
Obrázek 54	<i>Využití modifikace biotestu s <i>L. minor</i> na stanovení ekotoxicity zeminy kontaminované arzenem</i>	97
Obrázek 55	<i>Závislost mezi koncentrací benz(a)antracenu v čistírenském kalu a výsledky biotestu s <i>H. incongruens</i> (A- hodnoceno podle parametru mortality; B- hodnoceno podle parametru inhibice růstu <i>H. incongruens</i>)</i>	102
Obrázek 56	<i>Závislost mezi celkovým přírůstkem biomasy <i>E. fetida</i> a koncentrací fénantrenu v zemině</i>	105
Obrázek 57	<i>Závislost mezi celkovým přírůstkem biomasy <i>E. fetida</i> a koncentrací nafty v zemině</i>	106

12. Přílohy

Příloha 1 Převedení dat v procentech na probity

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

Příloha 2 Postupový diagram testů ekotoxicity při hodnocení odpadů (MŽP, 2007)



Příloha 3 Příprava Steinbergova media pro test s okřehkem *L. minor*

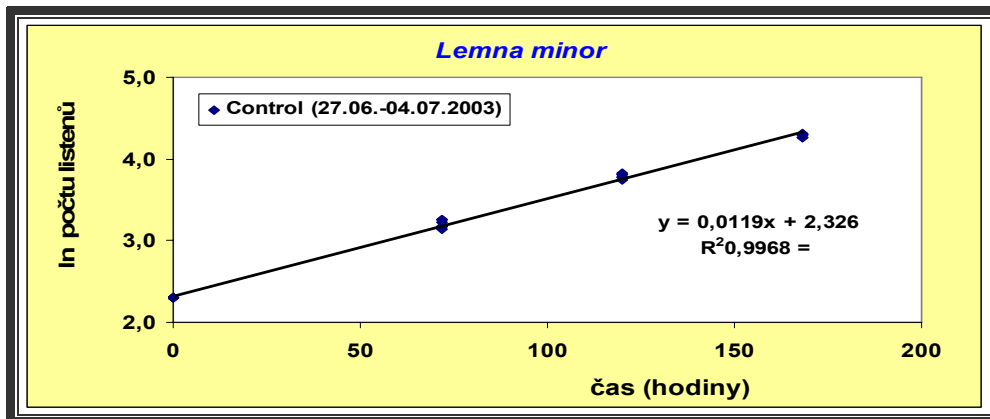
Složení zásobních roztoků živin - Steinbergovo medium (ISO/FDIS, 2005)

Makroelementy		g.l⁻¹
roztok č.1	KNO ₃	17,5
	KH ₂ PO ₄	4,5
	K ₂ HPO ₄	0,63
roztok č.2	MgSO ₄ *7H ₂ O	5
roztok č.3	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	14,75
Mikroelementy		mg.l⁻¹
roztok č.4	H ₃ BO ₃	120
roztok č.5	ZnSO ₄ *7H ₂ O	180
roztok č.6	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	44
roztok č.7	MnCl ₂ *4H ₂ O	180
roztok č.8	FeCl ₃ *6H ₂ O	760
roztok č.9	Titriplex III (EDTA)	1500

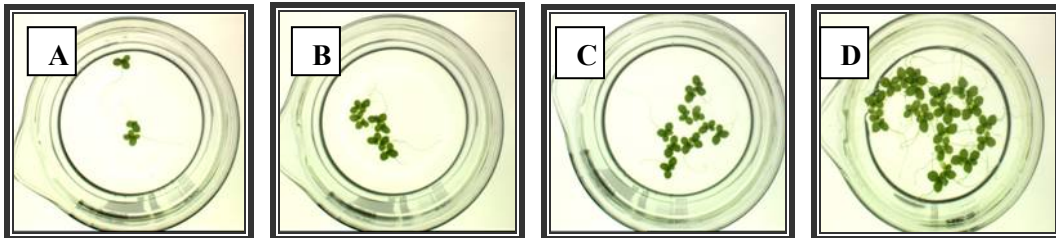
Příprava 1 l živného roztoku - Steinbergovo medium (ISO/FDIS, 2005)

roztok č. 1	20 ml
roztok č. 2	20 ml
roztok č. 3	20 ml
roztok č. 4	1 ml
roztok č. 5	1 ml
roztok č. 6	1 ml
roztok č. 7	1 ml
roztok č. 8	1 ml
roztok č. 9	1 ml
destilovaná voda	934 ml (doplnění do 1 l)

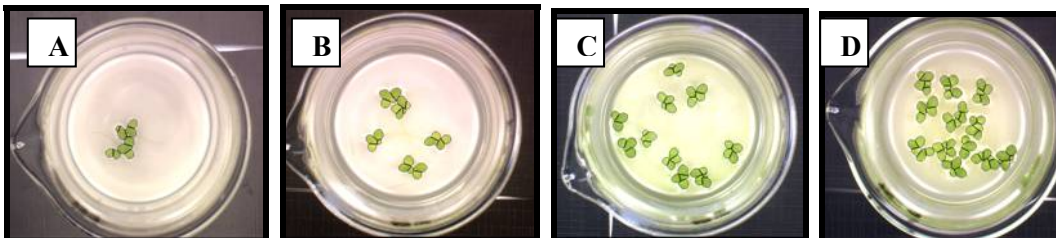
Příloha 4 Růst okřehku L. minor v kontrolním vzorku



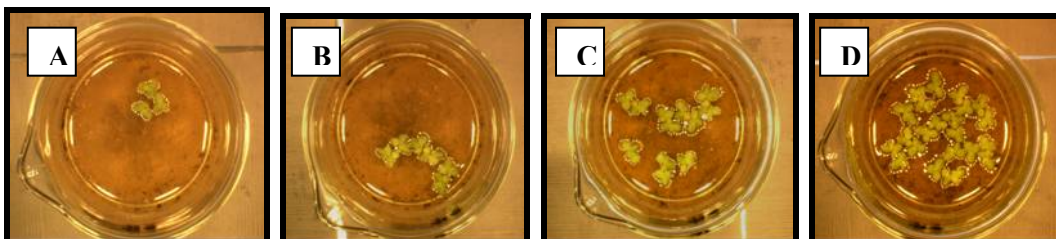
Kontrolní vzorek I (medium)



Kontrolní vzorek II (písek + medium)



Kontrolní vzorek III (referenční zemina + medium)



Pozn. A - počátek testu; B - po 2 dnech; C - po 5 dnech; D - po 7 dnech testu

Příloha 5 Vybrané parametry kontaminované zeminy před zahájením bioremediace

Sušina	86,6	%
VPK _{max}	34,8	%
pH	7,9	
NH ₄ ⁺ -N	45,1	µg. g ⁻¹
PO ₄ ³⁻ -P	1,3	µg. g ⁻¹
NEL v zemině	6380	µg. g ⁻¹
NEL ve výluhu	900	µg. l ⁻¹
Cd	0,8	µg. g ⁻¹
Pb	24,5	µg. g ⁻¹
Hg	0,2	µg. g ⁻¹
Cu	31,5	µg. g ⁻¹
Cr	36,5	µg. g ⁻¹
Ni	24	µg. g ⁻¹
Zn	175	µg. g ⁻¹

Příloha 6 Vybrané parametry kontaminované zeminy před zahájením kompostování

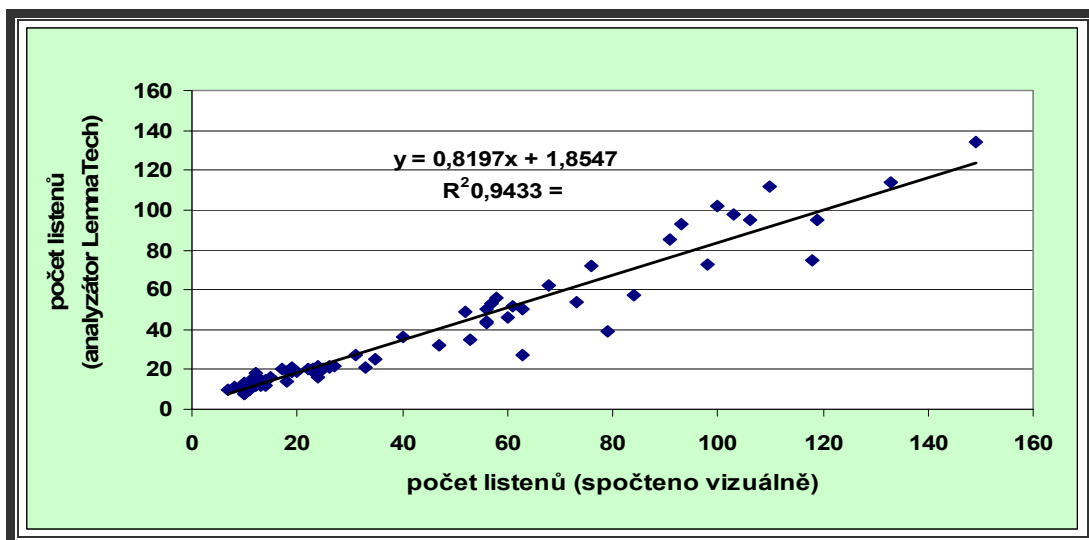
písek	83,9 %
silt (jemný písek)	5,0 %
jíl	11,0 %
sušina	98,1 %
organický C	0,7 %
N (Kjeldahlův)	182 µg.g ⁻¹
N celkový	< 0,05 %
P	373 µg.g ⁻¹
Fe	16100 µg.g ⁻¹
Mn	161 µg.g ⁻¹
Pb	6,4 µg.g ⁻¹
Zn	18,3 µg.g ⁻¹
Cu	9,1 µg.g ⁻¹
Cd	<0,4 µg.g ⁻¹
Cr	16 µg.g ⁻¹
Al	7930 µg.g ⁻¹
Hg	0,047 µg.g ⁻¹

Příloha 7 Vybrané parametry kontaminované podzemní vody před zahájením sledování remediace testy ekotoxicity (výsledky poskytnuty společností ENVISAN-GEM, a.s.)

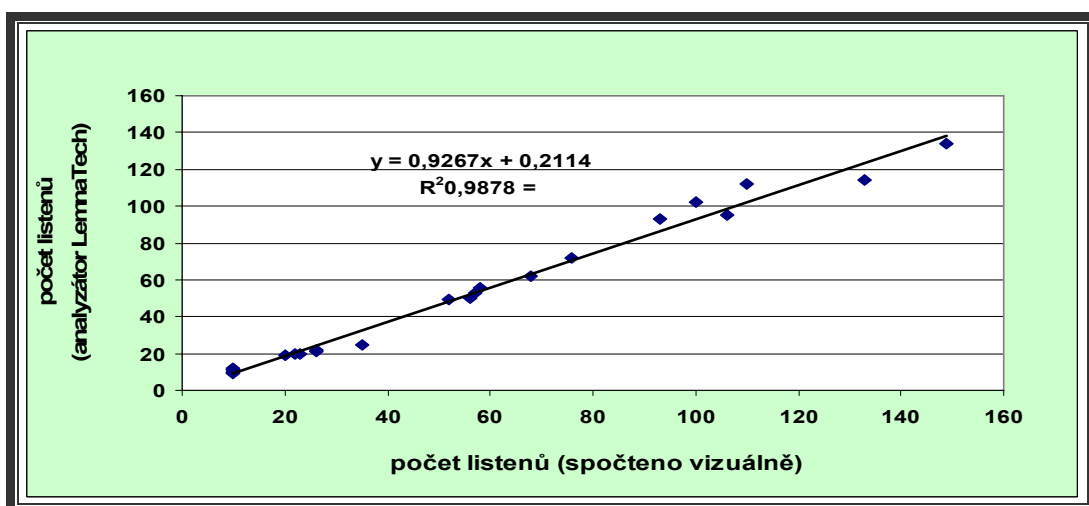
místo odběru	datum odběru	vinylchlorid ug/l	1,1-dichlor-eten ug/l	trans 1,2-dichlor-eten ug/l	cis 1,2-dichlor-etylen ug/l	trichlor-etylen ug/l	tetra-chlor-etylen ug/l	chloro-form ug/l	tetra-chlor-metan ug/l
HP-88	05.12.01	<1,0	<1,0	2,3	220	370	65	3,8	<1,0
HP-72	05.12.01	<1,0	2	5,2	34	43	48	53	<1,0
HP-81	19.12.01	170	19	21	2000	25000	17000	110	190
místo odběru	datum odběru	dichlor-metan ug/l	1,1-dichlor-etan ug/l	1,2-dichlor-eten ug/l	1,1,1-trichlor-etan ug/l	1,1,2-trichlor-etan ug/l	1,1,1,2-tetra-chlor-etan ug/l	1,1,2,2-tetra-chlor-etan ug/l	suma CIU ug/l
HP-88	05.12.01	<1,0	<1,0	<1,0	<0,5	3,6	<0,5	2,5	667,2
HP-72	05.12.01	<1,0	<1,0	<1,0	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	185,2
HP-81	19.12.01	<1,0	<1,0	190	<0,5	100	32	140	44 972
místo odběru	datum odběru	chlor-benzen ug/l	1,2-dichlor-benzen ug/l	1,3- a 1,4-dichlor-benzen ug/l	trichlor-benzen ug/l				
HP-88	05.12.01	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5				
HP-72	05.12.01	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5				
HP-81	19.12.01	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5				
místo odběru	datum odběru	benzen ug/l	toluen ug/l	etyl-benzen ug/l	xyleny ug/l	styren ug/l	suma BTEX ug/l		
HP-88	05.12.01	<0,5	1,5	<0,5	1,1	<0,5	2,6		
HP-72	05.12.01	11	<0,5	1,7	<0,5	<0,5	12,7		
HP-81	19.12.01	61	19	18	7,5	<0,5	105,5		

Příloha 8 *Využití analyzátoru Scanalyzer pro vyhodnocování biotestu s *L. minor**

Srovnání výsledků parametru počet listenů v biotestu s *L. minor* při klasickém vizuálním hodnocení a analyzátořem Scanalyzer (LemnaTec)- různé vzorky zemin

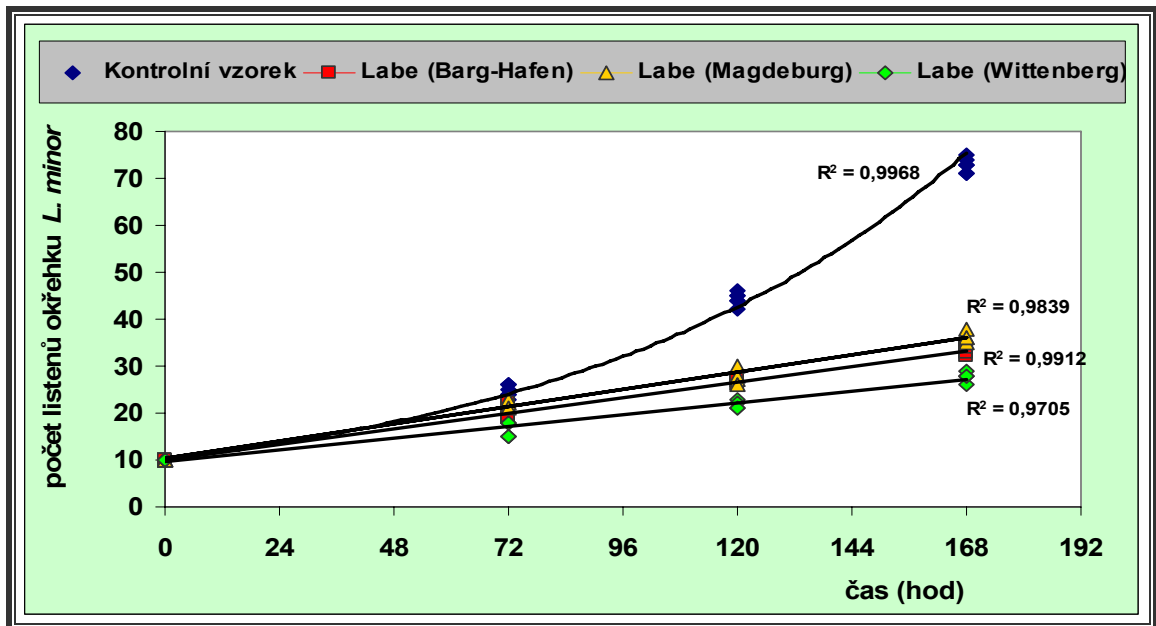


Srovnání výsledků parametru počet listenů v biotestu s *L. minor* při klasickém vizuálním hodnocení a analyzátořem Scanalyzer (LemnaTec)- vzorky vody (referenční látka)



Příloha 9 Využití semi-kontaktní varianty biotestu s L. minor pro hodnocení sedimentů

Sediment I - řeka Labe z lokality Magdeburk (Německo)



Sediment II - řeka Sála z lokality Calbe (Německo)

