



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**VYUŽITÍ TESTŮ S DESTRUENTY PRO
EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ KVALITY PŮD**

USING TESTS WITH DESTRUENTS FOR ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF SOIL QUALITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petra Rábová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1467/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka: **Bc. Petra Rábová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití testů s destruenty pro ekotoxikologické hodnocení kvality půd

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na kvalitu půd a její hodnocení.
2. Zavedení mikrobiálního testu na stanovení dehydrogenázy.
3. Aplikace ekotoxikologických testů při hodnocení kvality vybraných půd.
4. Diskuze a hodnocení dosažených výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Petra Rábová
student(ka)

doc. MVDr. Helena Zlámalová
Gargošová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Náplní této práce bylo stanovení aktivity dehydrogenázy vzorků matric, které mohou vstupovat do životního prostředí a využití ekotoxikologických testů za účelem posouzení kvality takto ovlivněné půdy. Byly sledovány účinky vzorků kalu, biouhlu, dvou vzorků ze skládky a vzorku sedimentu. V rámci ekotoxikologie byly zařazeny testy na destruentech, tedy testy únikového chování (organismus *Eisenia fetida* a *Folsomia candida*), testy akutní, chronické a reprodukční toxicity (organismus *Eisenia fetida*) a testy inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa*. Výsledky poukazují na to, že testy aktivity dehydrogenázy slouží jako vhodné doplnění ekotoxikologických testů. Poskytují cenné rozšiřující informace o kvalitě půdy a působení vzorku po aplikaci na půdu. Nejméně příznivý vliv na aktivitu enzymu a vitalitu organismů měl vzorek sedimentu, a to jak při stanovení aktivity dehydrogenázy, tak v ekotoxikologických testech. Dále bylo zjištěno, že biouhel jako produkt úpravy čistírenského kalu je pro organismy méně toxický než původní kal.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to determine the dehydrogenase activity of matrix samples that can enter the environment and the use of ecotoxicological tests to assess the quality of the affected soil. The effects of sludge, biochar samples, two landfill samples and a sediment sample were monitored. Ecotoxicology included tests on decomposers - tests of avoidance behavior (*Eisenia fetida* and *Folsomia candida*), acute, chronic and reproductive toxicity tests (*Eisenia fetida*) and *Lactuca sativa* root growth inhibition tests. The results indicate that dehydrogenase activity assays serve as a suitable complement to ecotoxicological tests. They provide valuable additional information on soil quality and sample effect after application to soil. The sediment sample had the least favorable effect on the activity of the enzyme and the vitality of the organisms, both in the determination of dehydrogenase activity and in ecotoxicological tests. Furthermore, it was found that biochar as a product of sewage sludge treatment is less toxic to organisms than the original sludge.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvalita půdy, DHA, ekotoxikologické testy, *Eisenia fetida*, *Folsomia candida*, *Lactuca sativa*

KEYWORDS

Soil quality, DHA, ecotoxicological tests, *Eisenia fetida*, *Folsomia candida*, *Lactuca sativa*

RÁBOVÁ, Petra. *Využití testů s destruenty pro ekotoxikologické hodnocení kvality půd* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123959>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí . Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Tímto bych chtěla poděkovat paní doc. MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph. D za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Veronice Řezáčové Ph.D. za odbornou konzultaci. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, která mi byla oporou po celou dobu studia.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Půda	8
2.1.1	Vývoj půdy, půdotvorné faktory a procesy	8
2.1.2	Složení půdy	8
2.1.3	Půdní vlastnosti	9
2.1.3.1	Vliv fyzikálních vlastností na kvalitu půdy	9
2.1.3.2	Vliv chemických vlastností na kvalitu půdy	9
2.1.3.3	Vliv fyzikálně chemických vlastností na kvalitu půdy	10
2.1.3.4	Vliv biologických vlastností na kvalitu půdy	10
2.1.4	Degradace a kontaminace půdy	11
2.1.4.1	Degradace půdy	11
2.1.4.2	Kontaminace půdy	11
2.1.4.3	Stav půdy v České republice	12
2.2	Biologické metody hodnocení kvality půdy	12
2.2.1	Kvalita půdy	12
2.2.2	Biologické parametry	12
2.2.3	Stanovení enzymových aktivit	13
2.3	Stanovení aktivity dehydrogenázy	14
2.3.1	Princip metody	14
2.3.2	Využití a aplikace této metody	14
2.4	Ekotoxikologie – vybrané metody	16
2.4.1	Terestrické testy ekotoxicity	16
2.4.2	Aplikace ekotoxikologických testů v kombinaci se stanovením enzymatických aktivit	16
3	Experimentální část	18
3.1	Charakteristika vybraných matric	18
3.1.1	Odběr, přeprava a úprava vzorků	18
3.1.2	Vzorek ze skládky	18
3.1.3	Vzorek z ekologicky obhospodařované zahrady	19
3.1.4	Vzorky z ČOV Karlovy Vary	19
3.1.5	Vzorek sedimentu	21
3.1.6	Vybrané vzorky pro analýzu aktivity dehydrogenázy	21
3.1.7	Testované koncentrace	22
3.2	Testy aktivity dehydrogenázy	23
3.2.1	Chemikálie, laboratorní vybavení a přístroje	23
3.2.2	Příprava zásobních a kalibračních roztoků	23
3.2.3	Příprava půdy	24
3.2.4	Stanovení aktivit DHA	24
3.3	Testy na organismech	25
3.3.1	Příprava umělé půdy	25
3.3.2	Testy na organismu <i>Eisenia fetida</i>	27

3.3.2.1	Založení věkově synchronní populace.....	27
3.3.2.2	Test únikového chování na žížalách.....	28
3.3.2.3	Test akutní toxicity na žížalách.....	29
3.3.2.4	Test chronické toxicity a reprodukčního chování na žížalách.....	30
3.3.3	Testy na organismu <i>Folsomia candida</i>	31
3.3.3.1	Založení chovu chvostoskoků.....	31
3.3.3.2	Test únikového chování na chvostoskocích.....	32
3.3.4	Test inhibice kořene salátu <i>Lactuca sativa</i>	33
	Výsledky a diskuze.....	35
3.4	Výsledky předběžných testů.....	35
3.4.1	Koncentrační řady testovaných matric.....	35
3.4.2	Stanovení pH.....	36
	pH umělé půdy.....	36
	pH vzorků.....	36
3.4.3	Stanovení maximální vodní kapacity (WHC _{max}).....	39
3.4.4	Stanovení sušiny vzorku.....	42
3.5	Test aktivity dehydrogenázy.....	44
3.5.1	Kalibrační křivka TPF.....	44
3.5.2	Stanovení aktivity dehydrogenázy.....	45
3.6	Testy na organismu <i>Eisenia fetida</i>.....	51
3.6.1	Test únikového chování na žížalách.....	51
3.6.2	Test akutní toxicity na žížalách.....	53
3.6.3	Test chronické toxicity a reprodukčního chování na žížalách.....	56
3.7	Testy na organismu <i>Folsomia candida</i>.....	58
3.7.1	Test únikového chování na chvostoskocích.....	58
3.8	Test na salátu <i>Lactuca sativa</i>.....	61
4	Závěr.....	63
5	Seznam použité literatury.....	64
6	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	71
7	Přílohy.....	72

1 ÚVOD

Půda je jednou ze složek životního prostředí a její význam je nezastupitelný. V prostředí plní celou řadu funkcí – ekologickou, krajinytvornou a sociální. Slouží jako zásobárna vody a živin, je součástí koloběhu látek, vytváří prostředí k rozkladu škodlivin a funguje také jako filtrační médium. Půda je utvářena dlouhodobě procesem zvětrávání matečné horniny za doprovodu jiných půdotvorných procesů. Zatímco tvorba půdy je proces dlouhodobý, její znehodnocení může být okamžité a mnohdy nenapravitelné a trvalé. Příčinou znehodnocení může být degradace půdy a kontaminace.

Vzhledem k velkému významu a nezastupitelné roli půdy je důležité sledovat a hodnotit její kvalitu. Jednou z možností je využití biologických metod hodnocení kvality půdy. Mezi sledovanými parametry jsou počty mikroorganismů, celková biomasa mikroorganismů, ale také aktivita půdních enzymů. Protože jsou půdní enzymy velmi citlivé na změny půdních vlastností a jsou součástí biologických procesů, které v půdě probíhají, slouží jako vhodný indikátor půdní kvality. Dalšími výhodami testů využívajících enzymatickou aktivitu je snadná opakovatelnost a rychlost provedení.

Stanovení aktivity dehydrogenázy patří mezi stanovení enzymatických aktivit. Tento enzym patří do skupiny oxidoreduktáz, která je jednou z nejpočetnějších skupin enzymů. Aktivita dehydrogenázy je považována za citlivý parametr mikrobiální aktivity a degradace půdy. Autoři mnoha studií využili této metodiky i v kombinaci s jinými metodami pro hodnocení kvality kontaminovaných půd. K hodnocení kvality půdy je možné využít ekotoxikologické testy. Výsledky těchto testů jsou nenahraditelné, protože poskytují informaci o vlivu látek na sledované organismy.

Cílem této práce je provedení vybraného testu enzymatické aktivity a nasazení příslušných testů z oboru ekotoxikologie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Půda

Půda je vrstva na povrchu zemské kůry, skládající se z rozdrobených hornin a zbytků rostlin a živočichů. Proces vývoje půdy je velmi pomalý, vyvíjí se tisíce let [1].

V prostředí plní funkci ekologickou, krajinnotvornou a sociální. Je nezbytná pro zabezpečení trvale udržitelného života a je významnou složkou životního prostředí, sloužící jako zásobárna vody a živin. Podílí se na rozkladu škodlivin, je součástí koloběhu různých látek. Slouží také jako filtrační médium. Díky svým vlastnostem má velmi důležitou roli v lesnictví a zemědělství [1] [2].

2.1.1 Vývoj půdy, půdotvorné faktory a procesy

Tvorba půdy je dlouhodobý proces, založený na zvětrávání matečné horniny. Zvětrávání může být způsobeno různými podněty. Při fyzikálním zvětrávání dochází k rozrušení horniny mechanicky vlivem vody, větru, ledu nebo změn teplot vzduchu. K chemickému zvětrávání dochází působením ve vodě rozpuštěných látek (solí, kyselin). Produktem těchto procesů je půdotvorný substrát. Látky rozpuštěné v substrátu jsou zdrojem živin pro autotrofní organismy. Ty jsou z hlediska dalšího vývoje půdy velmi důležité. Mají schopnost fixovat vzdušný dusík, jsou malé, ale odolné stresovým podmínkám. Kromě toho mají krátký životní cyklus a produkují organickou hmotu, která je zdrojem uhlíku a dusíku.

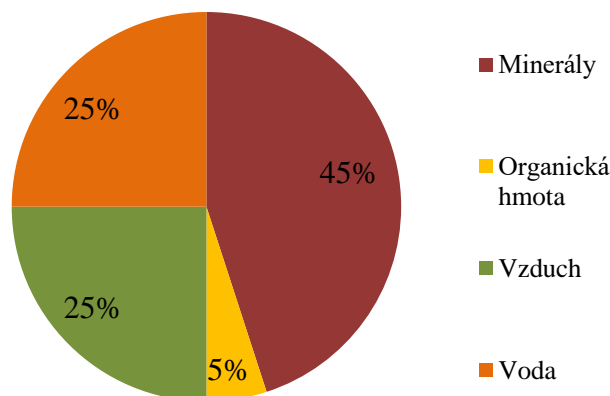
Těla organismů jsou zdrojem potravy pro heterotrofní organismy, které jsou závislé na přítomnosti rostlinných a živočišných zbytků. Přítomnost organismů v půdě je důležitá, protože urychlují proces zvětrávání hornin, vylučují organické kyseliny a produkují oxid uhličitý. Nejdříve probíhají tyto procesy pouze na povrchu půdy, ale poté zasahují hlouběji [3].

Mezi půdotvorné faktory, které se podílejí na tvorbě půdního profilu, patří čas, vegetace, podnebí, půdní organismy a složení matečné horniny. Nejdůležitější z těchto faktorů je podnebí, které ovlivňuje rozvoj vegetace, rychlost zvětrávání a další [3].

Mezi základní skupiny půdotvorných procesů patří akumulace hmoty, translokace hmoty, ztráta hmoty a transformace látek v půdní matici [4].

2.1.2 Složení půdy

Struktura půdy závisí na působení půdotvorných podmínek a zvětrávání. Půda představuje třífázový systém (kapalná, plynná a pevná fáze). Kapalnou fází tvoří půdní voda a půdní roztok. Plynná fáze je tvořena půdním vzduchem. Nejčastěji jsou v půdním vzduchu zastoupeny plyny dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého a vodní páry. Pevná fáze je tvořena organickým a minerálním podílem. Minerální podíl pevné fáze je tvořen zbytky jílových minerálů, hornin a primárních minerálů, které vznikly rozpadem matečné horniny. Organický podíl je rostlinného nebo živočišného původu a je tvořen živou a neživou složkou. *Graf 1* zobrazuje zastoupení půdních složek v půdě [5] [6].



Graf 1: Procentuální zastoupení složek v půdě [7]

2.1.3 Půdní vlastnosti

2.1.3.1 Vliv fyzikálních vlastností na kvalitu půdy

Poznatky o fyzikálních vlastnostech půdy jsou velmi důležité a nezbytné při plánování závlah, hnojení půdy a výsadby různých druhů rostlin. Mezi tyto vlastnosti patří barva půdy, hustota částic v půdě, pórovitost, objemová hustota a obsah vody v půdě. Barva půdy je ukazatelem chemických dějů, které probíhají v půdě (oxidační a redukční reakce), hloubky vodní hladiny a minerálního složení půdy. Hustota částic v půdě je vyjádřena jako poměr hmotnosti a objemu částic. Přítomnost těžkých kovů a oxidů železa může zvýšit hodnotu hustoty, zatímco pevné organické materiály ji mohou snižovat. Pórovitost půdy je udávána jako poměr objemu pórů naplněných vzduchem nebo vodou a celkového objemu půdy. S velkými póry je spojen rychlý pohyb vody půdou. Malé póry mají tendenci vodu v půdě zadržovat [8].

2.1.3.2 Vliv chemických vlastností na kvalitu půdy

Chemické vlastnosti jsou ovlivňovány výskytem různých prvků, které lze klasifikovat podle jejich zastoupení v půdě na makroelementy a mikroelementy. Mezi makroelementy, které tvoří převážnou část půdy, patří kyslík, křemík, hliník, železo, dále minerální živiny – dusík, fosfor, draslík a další vybrané makroelementy vápník, hořčík, síra a sodík. Nejvíce je v půdě zastoupen kyslík. Křemík, hliník a železo jsou obsaženy v primárních a sekundárních minerálech. Mohou se vyskytovat v anorganických i v organických sloučeninách. Jejich rozpustnost závisí na hodnotě pH a redoxním potenciálu [9] [10].

Dusík i fosfor jsou biogenní prvky a v půdě se vyskytují v různých formách. Draslík zajišťuje důležité fyziologické funkce, probíhající v organismech. Jeho nedostatek může u rostlin způsobit narušení enzymatické syntézy některých organických kyselin. Velký význam pro optimalizaci vlastností půdy má vápník. Hořčík ovlivňuje různé metabolické dráhy a aktivuje enzymatické pochody. Oba prvky se v půdě vyskytují převážně společně. Sodík se podobně jako vápník podílí na ovlivňování vlastností půdy. Na rozdíl od vápníku má negativní dopad. Může způsobovat zasolení půd, snadno se vyluhuje a může se kumulovat v podzemních vodách [9].

2.1.3.3 Vliv fyzikálně chemických vlastností na kvalitu půdy

Z fyzikálně chemického hlediska lze půdní vlastnosti rozdělit do čtyř skupin – půdní reakce, půdní sorpce, pufrovitost a oxidačně-redukční reakce. Půdní reakce vyjadřuje poměr koncentrace hydroxylových a vodíkových iontů v půdním roztoku. Půdní aktivní reakce je dána záporným dekadickým logaritmem koncentrace vodíkových iontů. Údaj o hodnotě pH půdy je zcela zásadní, protože pH ovlivňuje řadu procesů, které v půdě probíhají. Přímý vliv mají půdní reakce na biochemické procesy a na příjem živin rostlinami. Půdní reakce nepřímo ovlivňují půdní strukturu, celkový půdní charakter nebo mobilitu prvků přítomných v půdě. V oblasti kyselejší půdní reakce se zvyšuje mobilita rizikových prvků, zejména kadmia, zinku a niklu [9] [10].

Půdní sorpce je schopnost půdy zadržet po kratší nebo delší dobu pevné, plynné či kapalné látky. Sorpce látek v půdě může probíhat mechanicky, fyzikálně, chemicky, biologicky nebo na principu výměny. Pufrovitost půdy je dána odolností půdy ke změnám půdní reakce, která je vyvolána vstupem kyseliny nebo zásady. U každého půdního typu je pufrovitost jiná [10].

Oxidačně-redukční reakce v půdě doprovázejí celou řadu dějů. Oba procesy probíhají současně. Mezi redukční procesy lze zařadit rašelinění, hnití, denitrifikaci, desulfurizaci, produkci methanu, sulfanu nebo vodíku. Mezi oxidační procesy patří například mineralizace, nebo tlení [1].

2.1.3.4 Vliv biologických vlastností na kvalitu půdy

Půda je oživený přírodní útvar, který je složen ze živých a neživých komponentů. Půdní organická hmota je tvořena primární organickou hmotou a humusovými látkami. Základní složkou organické hmoty je uhlík.

Tradičním ukazatelem intenzity rozkladu, který souvisí s kvalitou půdní organické hmoty, je poměr uhlíku a dusíku. Čím menší je poměr, tím kvalitnější je humus. Někdy jsou do půdní organické hmoty zahrnuty půdní organismy.

Pokud do půdy vstoupí organická látka, je transformována jedním ze čtyř základních mechanismů. Může docházet k procesům rašelinění, mineralizaci, humifikaci nebo asimilaci půdní biotou. Při rašelinění dochází k hromadění organických látek za sníženého přístupu vzduchu a přeměnám na jiné látky. Mineralizace je soubor fyzikálních, chemických, biochemických a biologických procesů. Dochází k přeměně složitých organických látek na jednodušší látky anorganické. Při humifikaci dochází k přeměně jednodušších látek na jiné organické látky prostřednictvím složitých procesů biochemické povahy. Humifikace vychází z dekompozice. Klíčovou roli při rozkladu mají půdní enzymy [10].

Z výše uvedeného vyplývá, že organismy mají v procesu pedogeneze nezastupitelný význam. Souhrnný název pro organismy, které žijí v půdě je edafon. Zatímco někteří zástupci edafonu žijí v půdě trvale, jiným půda slouží pouze k určitým účelům nebo v ní stráví jen část svého života. Permanentní (stálí) živočichové žijí v půdě po celý životní cyklus (žížaly, roupice, někteří brouci nebo řada chvostoskoků). Živočichové, kteří po dospělosti půdu opouštějí a opět se do ní vracejí, patří do skupiny periodických půdních živočichů (například škvoři nebo drabčíkovití brouci). Dočasní (temporární) půdní živočichové stráví život v půdě ve stádiu vajíček a larev [11].

Rozmístění půdních organismů je nerovnoměrné. Limitujícími faktory jsou vlhkost, provzdušnění, teplota, dostupnost živin a nedostatek světla. Záleží také na rozmístění půdní

organické hmoty (zdroje uhlíku, energie a živin) a možnostmi pohybu organismu v půdním prostředí. Voda má v půdě nezastupitelnou roli. Je rozpouštědlem živin i transportním médiem a podílí se také na regulaci výkyvů teplot, hodnotě pH, koncentraci živin atd. Vzduch se do půdy dostává póry o velikosti větší než 0,3 mm. Pro organismy je nejdůležitější složkou vzduchu kyslík. Při přemokření půdy může docházet k anoxii, tedy vzniku prostředí s absencí kyslíku. Teplota rovněž ovlivňuje biologickou aktivitu. Rostliny i edafon jsou schopné ovlivnit pH. Například žížaly a některé jiné organismy jsou schopné do půdy vylučovat vápník a tím zvyšovat její pH. Protože jsou tyto organismy velmi citlivé, jedná se o dobré bioindikátory [12].

Organismy lze charakterizovat podle postavení v potravním řetězci a trofické úrovně. První trofickou úroveň tvoří producenti, kteří mohou být autotrofní nebo heterotrofní. Na druhé trofické úrovni jsou konzumenti, jejichž potrava může být živočišného i rostlinného původu. Třetí trofickou úroveň tvoří destruenty.

Podle velikosti jsou organismy rozděleny na mikroedafon, mezoedafon a makroorganismy. Menší zástupci mohou pronikat do menších pórů, které jsou pro větší živočichy nedostupné. Dostatečně velcí živočichové mohou sami vytvářet nové chodby a kanálky. Tito živočichové patří do skupiny půdních aktivních razičů, kterými jsou například žížaly, larvy hmyzu a další. Pasivní živočichové využívají již existující póry, kanálky a chodby (stonožky, některé larvy brouků). Do mikroedafonu patří bakterie, houby, řasy, plísňe a mikrofauna. Mikroedafon tvoří organismy, které nejsou větší než 0,2 mm a jsou zejména rostlinného původu. Mezoedafon je tvořen zástupci chvostoskoků, roztočů, hmyzu, měkkýšů a dalších. Do makroedafonu patří obratlovci (myši, hraboši, krtci a další). Hlavní úloha mezoedafonu a makroedafonu spočívá v mechanickém rozrušování půdy, zvyšování pórovitosti a zanášení organického materiálu do větších hloubek [11] [13] [5].

2.1.4 Degradace a kontaminace půdy

2.1.4.1 Degradace půdy

Pojem degradace půdy je používán pro všechny procesy, které mohou zapříčinit znehodnocení půdy a tím narušit určité půdní vlastnosti a funkce. Degradace může být způsobena jak přírodními, tak antropogenními vlivy. K degradaci může docházet intenzifikací zemědělství, činnostmi vedoucími ke snížení ztrát v zemědělské produkci, větrnou erozí, splachy půdy, acidifikací, zasolováním, ztrátou půdní organické hmoty a dalšími [2] [14] [15].

2.1.4.2 Kontaminace půdy

Ke kontaminaci půdy dochází zejména antropogenní činností. Půdu znečišťují chemické látky antropogenního původu, se kterými se nedokáže půdní systém vypořádat přirozenou cestou. Při kontaminaci dojde k narušení fyzikálně-chemické rovnováhy, změnám v půdním systému a většinou i ke zhoršení kvality půdy. Po vstupu dané látky do půdy se kontaminant stane součástí biologických cyklů, které ovlivňují všechny formy života. Toxické k lidem a k ostatním živým tvorům nemusí být jen původní látky, ale také produkty jejich rozkladu. Rozmanité složení a heterogenní struktura půdy zajišťují vysokou regenerační a samočisticí schopnost půdy. Tato schopnost je dána některými ději, které v půdě probíhají (filtrace, adsorpce, srážení, oxidační a redukční reakce, fixace, mikrobiální činnost). Degradace a kontaminace půdy může být také výsledkem intenzivního využívání půdy zemědělci [16] [17].

2.1.4.3 Stav půdy v České republice

Uvedené informace vychází ze Zprávy o životním prostředí České republiky, kterou každoročně vydává česká informační agentura životního prostředí CENIA.

Na území České republiky je vodní erozí potenciálně ohroženo 56,7 % půdy (zejména svrchní a nejúrodnější část půdy). Jsou to oblasti lemující Moravské úvaly, pahorkatiny a vrchoviny. Větrná eroze ohrožuje 18,4 % zemědělské půdy. Oblasti, které jsou nejvíce zatíženy větrnou erozí, se nacházejí na jižní Moravě a v Polabí. Nejvíce erozních událostí je dlouhodobě evidováno v kraji Vysočina.

Z rizikových prvků představují největší problém pro půdní ekosystém obsahy kadmia a arsenu. V sedimentech byly nejproblematictější obsahy PAH a kadmia [18].

2.2 Biologické metody hodnocení kvality půdy

2.2.1 Kvalita půdy

Kvalita půdy je definována jako schopnost půdy plnit funkce daného ekosystému. Základní aspekty jsou trvalé zajišťování biologické produktivity, udržitelnost životního prostředí a podpora zdraví rostlin a živočichů. Biologickou produktivitou je míněna udržitelná produkce plodin, bioty a odolnost proti erozi. Kvalitní půda je schopná zajišťovat zdraví živočichů a člověka (nutriční hodnotu a zdravotní nezávadnost krmiv a potravin), ale také eliminovat důsledky kontaminantů v půdě. Kvalita půdy musí být definována komplexně, přičemž stav půdního fondu podmiňuje udržitelný život [19].

Hodnocení kvality půdy musí splňovat určitá kritéria. Předně musí být komplexní a musí zahrnovat všechny části půdního systému a nesmí být omezováno pouze na fungování určité části. Parametry hodnocení kvality půdy je možné rozdělit do skupin podle toho, jaké vlastnosti půdy jsou cílem analýzy. Fyzikální rozbor půdy poskytuje informace o zrnitosti půdy, pórovitosti, objemové hmotnosti a dalších. Při chemickém rozboru půdy jde o parametry spojené s chemickými vlastnostmi půdy například výměnná půdní reakce, obsah a kvalita humusu nebo obsahy jednotlivých prvků v půdě. Poslední skupinou je biologický rozbor půdních vlastností [20].

Biologický potenciál půdy charakterizuje schopnost organismů v půdě zajišťovat rostlinám vhodné podmínky k růstu a vývoji. Mezi důležité aktivity patří rozklad organických zbytků, syntéza humusu, tvorba půdní struktury, zpřístupňování živin rostlinám a další. K sledování biologických pochodů v půdě je dnes možné použít více metod. Mezi základní kritéria patří citlivost, malá technická a časová náročnost, snadná porovnatelnost, velká šíře záběru a široký rozsah aplikovatelnosti. Kvůli vlastnostem mikroorganismů je pozorování přímo v terénu téměř nemožné. Pro výzkum je vhodný reprezentativní vzorek půd. Je potřeba, aby bylo se vzorkem zacházeno jako se živým systémem, protože vlivem špatného zacházení může dojít k ovlivnění biologického společenstva. Biologické metody je vhodné doplnit i jinými rozbory (například rozbory chemické nebo rozbory půdních vlastností) [21].

2.2.2 Biologické parametry

Pro správný průběh procesů a koloběhu prvků v půdě jsou důležité půdní mikroorganismy, které podporují vývoj a růst rostlin. Přispívají ke zvyšování dostupnosti živin a napomáhají k udržení dobré půdní struktury. Jsou vhodným indikátorem půdní kvality. Parametry, které se stanovují v půdách, jsou celková biomasa mikroorganismů v půdě a počty mikroorganismů v půdě. Celková biomasa je měřítkem kvantity mikroorganismů a výsledným endpointem je

většinou koncentrace organického uhlíku, který je ve všech živých buňkách a po odumření buňky je rychle degradován. Počet mikroorganismů v půdě je dalším důležitým parametrem. Mezi nejpočetnější a biochemicky neaktivnější skupinu patří bakterie. Za dobrý indikátor kvality půdy je považován výskyt bakterií rodu *Azobacter* [21].

2.2.3 Stanovení enzymových aktivit

Aktivity půdních enzymů jsou úzce spjaty s půdním typem, vlastnostmi a podmínkami prostředí a jsou také důležitými indikátory biologických aktivit v půdě a půdní kvality. Jsou součástí procesu rozkladu organické hmoty a obnovení živin v půdě. Souhrn půdních enzymů zobrazuje Tabulka 1 [22].

Půdní enzymy zajišťují tok látek mezi biotickou a abiotickou složkou půdy, mají nezastupitelnou roli při štěpení komplexních látek na látky jednodušší a podílejí se na syntézách látek, které jsou důležité při stavbě buněčného těla. Jsou nezbytné pro mobilizaci živin a mají podstatnou funkci v cyklech uhlíku, fosforu, dusíku i síry. Enzymatické štěpení je rovněž nezbytné i pro degradaci biologicky škodlivých látek [3].

Tabulka 1: Půdní enzymy a jejich hodnocení [23]

Enzym	Enzymatická reakce	Funkce
Dehydrogenáza	elektronový transportní systém	mikrobiální aktivita
β -glukozidáza	hydrolýza celobiózy	koloběh uhlíku
Celulóza	hydrolýza celulózy	koloběh uhlíku
Fenoloxidáza	hydrolýza ligninu	koloběh uhlíku
Ureáza	hydrolýza močoviny	koloběh dusíku
Amidáza	mineralizace dusíkatých sloučenin	koloběh dusíku
Fosfatáza	uvolnění PO_4^{3-}	koloběh fosforu
Arylsulfatáza	uvolnění SO_4^{2-}	koloběh síry

Některé enzymy katalyzují reakce pouze ve vnějším prostředí (extracelulárně), protože štěpí složité látky, které do buňky nemohou vstoupit (například celulózy nebo proteázy). Jiné se nacházejí vně i uvnitř buňky (například ureázy). U enzymů spojených s centrálním buněčným metabolismem (například dehydrogenáza, nitrát reduktáza) se předpokládá, že jsou aktivní pouze uvnitř buněk (intracelulárně). Celková aktivita enzymů v půdě je výsledkem aktivity enzymů extracelulárních i intracelulárních [3].

Půdní enzymy jsou velice citlivé na změny půdních vlastností. Množství enzymů závisí na rychlosti produkce a degradace enzymů [24].

Stabilita půdy je založena na aktivitě půdních enzymů. U různých typů půdy může být rozdílná. Bylo pozorováno, že enzymatická aktivita půdy se snížila po interakci mikroorganismů s herbicidy nebo těžkými kovy. Zkoumání stability půdních enzymů je zásadní pro pochopení změn a pochodů v půdě. Několik studií [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] potvrdilo, že kontaminace má inhibiční účinky na aktivitu enzymů v laboratorních podmínkách i terénním výzkumu. Studie Wanga a kol [32], která byla zaměřena na sledování aktivity enzymů v letním období, předpokládá, že kontaminované půdy mají menší

enzymatickou aktivitu a jsou méně odolné vůči změnám teplot. Četné studie [33] [34] [35] [36] věnovaly pozornost jiným mikrobiálním parametrům (například dekompozice organických látek). Avšak podle Wanga jsou tyto parametry nedostačující a při hodnocení funkční stability půdy je potřeba použít mikrobiální aktivity, které jsou specifitější [32].

2.3 Stanovení aktivity dehydrogenázy

Enzym dehydrogenáza patří mezi oxidoreduktázy, které jsou jednou z nejpočetnějších skupin enzymů. Oxidoreduktázy jsou povahy složených bílkovin a katalyzují intermolekulové oxidačně redukční přeměny. Oxidoredukční děje jsou zprostředkovány přenosem atomů vodíku (dehydrogenázy nebo transdehydrogenázy), elektronů (transelektronázy) nebo vestavěním atomu kyslíku do substrátu (oxygenázy) [37].

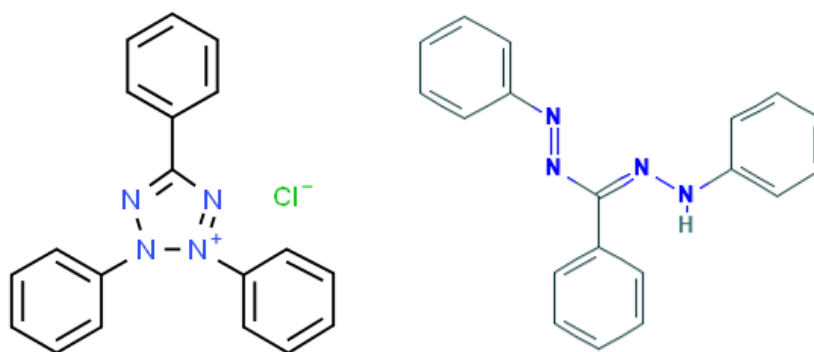
Stanovení aktivity dehydrogenáz v půdě se řídí normovanou metodou ISO 23753-1 [38]. Není použitelné pro půdy podmačené, půdy redukční zóny a půdy s nízkou mikrobiální činností [39].

Přesto může být aktivita dehydrogenázy použita jako citlivý parametr mikrobiální aktivity a degradace půdy. Ve srovnání s jinými ukazateli aktivity je stanovení jednoduché, citlivé a ekonomické [40].

Korelace aktivit tohoto enzymu s mikrobiální aktivitou a půdní respirací souvisí s faktem, že dehydrogenáza je intracelulární enzym, který je přítomen pouze v aktivních organismech [24].

2.3.1 Princip metody

Deriváty tetrazolia se používají k měření životaschopnosti různých rostlinných systémů. Redukcí vznikají nerozpustné barevné produkty. V případě 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridu (TTC) vzniká redukcí červený formazan (TPF – 1,3,5-triphenylformazan). TPF lze stanovit spektrofotometricky po extrakci organickým rozpouštědlem. *Obrázek 1* zobrazuje struktury obou uvedených sloučenin. [41].



Obrázek 1: Vzorec TTC [42] a TPF [43]

2.3.2 Využití a aplikace této metody

Studie Pose-Juan a kol. [44] hodnotila důsledky aplikace tří herbicidů (mesotrion, pethoxamid, triasulfuron) v půdě. Vzorek půdy byl odebrán na zemědělské farmě ve Španělsku. Jedním ze sledovaných parametrů byla změna aktivity dehydrogenázy (DHA) v půdě. Studie zmiňuje, že tento parametr by měl být zahrnut při hodnocení kvality půdy, zejména po aplikaci pesticidů. Opakovaná aplikace výše zmíněných herbicidů měla různé dopady. Bylo zjištěno, že u půd s přidavkem zeleného kompostu vzrostla hodnota DHA. Tyto

půdy jsou obohaceny o mikrobiální populace, což má pozitivní vliv na DHA. Oproti tomu aplikace splaškových vod na půdu měla negativní dopad. Mohlo dojít k různým inhibičním účinkům na mikroorganismy v souvislosti s toxicitou dané matrice [44].

Studie Kaczynski a kol [45] se také zabývala účinky mesotrionu na aktivitu dehydrogenázy. Výsledky prokázaly, že mesotrion působí na aktivitu dehydrogenázy stimulačně. Oproti tomu aplikace mesotrionu ve směsi s jinými herbicidy aktivitu enzymu inhibovala. Byla pozorována pozitivní korelace mezi aktivitou dehydrogenázy, hodnotou pH a obsahem draslíku a sodíku v půdě [45].

Teutscherova a kol [24] využily stanovení DHA k posouzení vlivu aplikace biouhlu na kvalitu půdy. Bylo zjištěno, že enzymy mohou být zachyceny v substrátu biouhlu. Může tedy docházet k bránění enzymatické reakce a tím k poklesu celkové enzymatické aktivity. Pokles aktivity dehydrogenázy může souviset s poklesem aktivity extracelulárních enzymů po aplikaci biouhlu. Snížení aktivity bylo pozorováno i v souvislosti s rostoucím množstvím biouhlu aplikovaného na půdu [24].

Účinky PAH v půdě po aplikaci čistírenských kalů se zabývala studie Feng a kol [46]. Stanovení DHA bylo použito ke sledování činnosti mikrobů a lepší pochopení mechanismů akumulace a odstraňování PAH z půdy a rostlin. Půda byla odebrána v horních 20 cm půdy v lokalitě Jiufeng park (Peking). Kal, který byl aplikován na půdu, pocházel z aerobní kompostárny. Analýza probíhala ve dvou sadách vzorků, z půd neosázených a z půd osázených vegetací. U obou sad byly určeny koncentrace PAH a stanoveny hodnoty DHA. Přítomnost vegetace zvyšovala aktivitu DHA v půdě [46].

Účinkem čistírenských kalů na enzymatickou aktivitu se zabývala také studie Mondal a kol [47]. Výsledkem bylo, že konkrétně v této studii čistírenský kal po aplikaci na půdu zvýšil hodnotu DHA. Studie zmiňuje, že přídavek hnoje a vyváženého množství živin má pozitivní vliv na obsah organických hmot v půdě a tím i na aktivitu dehydrogenázy [47].

Studie Chen a kol [48] se zabývala vlivem povrchově aktivních látek na aktivitu DHA. Výsledky ukázaly, že přídavek APG (alkylpolyglukosid) a NTA (kyselina nitriloctová) může pozitivně ovlivnit DHA. Autoři studie zmiňují, že půda kontaminovaná PAH může velmi často obsahovat také těžké kovy. Bylo prokázáno, že některé povrchově aktivní látky mají pozitivní efekt na fytořemediaci. Mezi enzymy, které se podílejí na rozkladu PAH, patří oxygenáza, lignolytické enzymy a dehydrogenáza. Dehydrogenáza je intracelulární enzym, který katalyzuje rozklad organických kontaminantů a podílí se na detoxikaci xenobiotik. Bylo potvrzeno, že přídavek povrchově aktivní látky zlepšuje aktivitu DHA. Přídavek APG a NTA může ovlivnit DHA přímo nebo prostřednictvím změny v biodostupnosti pyrenu a těžkých kovů (zde olova) [48].

Studie Siggins a kol se zabývala likvidací tzv. šedých vod. Obecně byla hodnota DHA vyšší u půd, kde byla aplikována šedá voda než u půd v kontrole. Byl pozorován také pozitivní vliv na mikrobiální biomasu. Šedá voda může sloužit jako levné hnojivo. Aplikace na písčitou půdu se nedoporučuje [49].

Cílem studie García-Delgado a kol [50], bylo zhodnotit vliv aplikace herbicidů na mikrobiální aktivitu (triasulfuron a prosulfocarb) na půdě neupravené a půdě se zeleným kompostem. Zatímco na půdách bez aplikace zeleného hnojiva došlo ke snížení DHA, na půdách se zeleným hnojivem nebyl pokles DHA pozorován. [50].

Studie Shi a kol [51] se zaměřila na vliv krátkodobé aplikace minerálního fosforu na půdu prostřednictvím hodnocení mikrobiální biomasy a aktivity DHA. Studie prokázala, že aplikace minerálního fosforu má pozitivní vliv na DHA. Ke zvýšení došlo také u mikrobiální biomasy. Autoři studie použily DHA jako indikátor celkové půdní metabolické aktivity. Pozitivní účinek na DHA po aplikaci fosforu podporuje působení fosforu jako regulátoru mikrobiálního metabolismu a tím ovlivňuje proces příjmu dusíku rostlinami [51].

2.4 Ekotoxikologie – vybrané metody

Ekotoxikologie je vědní obor, který se zabývá negativním vlivem toxické látky na biosystémy. Cílem ekotoxikologie je studium a rozšiřování poznatků o působení studovaných látek na živé systémy. V praxi je ekotoxikologie dělena na dílčí oblasti, které vycházejí ze způsobu vstupu látek do prostředí, charakteru příjemce, z chemické podstaty toxické látky a praktických aplikací. Poznatky výzkumů by měly sloužit k zajištění ochrany živých organismů a funkčnosti ekosystémů při používání chemických látek [52].

Obor ekotoxikologie má svůj význam v zapojení do vývoje nástrojů sloužících k hodnocení ekologických nebezpečí a analýzy rizik. Toxicita půdy je jedním z potenciálních faktorů nepříznivých účinků spojených s uvolňováním chemikálií do životního prostředí [53].

2.4.1 Terestrické testy ekotoxicity

Terestrické testy jsou používány k určení možných účinků toxických látek a sledovaných vzorků na půdní ekosystémy. Organismy, využívané při těchto testech půd a sedimentů, jsou především chvostokoci, roupice, žížaly, bakterie a rostliny.

Pro účely práce byly nasazeny testy na destruentech (chvostokoci a žížaly) a na rostlině salátu.

Žížaly jsou hermafroditičtí máloštětinatci a jsou typickými zástupci půdní fauny. Žížaly kromě produkce velkého množství výkalů dokážou tvořit chodby a tím půdu kypřit. Pro ekotoxikologické testy se používají žížaly druhu *Eisenia fetida*.

Chvostokoci jsou organismy, které jsou hojně využívány v terestrických testech. Testy spočívají v hodnocení únikového chování a reprodukční schopnosti chvostokoků *Folsomia candida*. Chvostokoci patří mezi druhově i početně nejdůležitější skupinu v půdní mesofauně. Populace chvostokoků se nacházejí ve svrchních deseti centimetrech půdy. Druhové složení a hustota populace závisí na typu a druhu půdy, vlhkosti a dalších fyzikálních parametrech půdy [54].

2.4.2 Aplikace ekotoxikologických testů v kombinaci se stanovením enzymatických aktivit

Ramadass a kol [55] hodnotili účinky použitého a nepoužitého motorového oleje v půdním systému. Mezi sledovanými endpointy bylo přežití žížal, aktivita dehydrogenázy a ureázy. GC/MS analýza odhalila, že použitý motorový olej obsahoval více aromatických uhlovodíků a těžkých kovů než olej nepoužitý. Při testech byly využity žížaly druhu *E. fetida*. Pro studii byly vybrány pouze plně vyzrálí jedinci o hmotnosti 0,31 - 0,39 gramů. Po očištění deionizovanou vodou a po inkubaci na vlhkém papíře v Petriho miskách byly druhý den umístěni do nádoby s půdou a přidaným olejem. Použitý olej měl obecně horší výsledky u sledovaných parametrů než vzorek nepoužitého oleje [55].

Cílem studie Palanisami a kol [56] bylo hodnocení ekotoxicity zbytkových ropných uhlovodíků v půdě. Pro tyto účely byly využity testy na žížalách, půdní mikrobiální aktivity,

růstu rostlin a dalších. Vzorky byly odebrány z oblastí v Austrálii, které byly zemědělsky sanovány. Žížaly *E. fetida* byly použity jako modelový organismus pro hodnocení půdy. Výsledky testů prokázaly vyšší úmrtnost žížal, která mohla kromě kontaminace uhlovodíky souviset se zasolením půdy. Enzymatická aktivita byla hodnocena na základě stanovení aktivit dehydrogenázy a ureázy. Aktivita DHA byla ve studované půdě vyšší navzdory úmrtnosti žížal [56].

Studie Alvarenga a kol [57] využila stanovení DHA v kombinaci se stanovením dalších enzymatických aktivit, některých fyzikálně chemických vlastností půdy a ekotoxikologických testů k hodnocení účinků odpadu z papírenského průmyslu aplikovaného na půdu sanovanou po těžební činnosti. Ekotoxikologické testy byly nasazeny na výluh z půdy. Z testovacích organismů byly využity zástupci všech trofických úrovní – *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Půda, která byla předmětem studie, byla kyselá a obsahovala rezidua kadmia, zinku a olova. Výsledky ukázaly, že půdní enzymatické aktivity byly po přidavku granulovaného materiálu zvýšené [57].

Gong a kol [58] ve své studii hodnotili kvalitu vermikompostu obohaceném o bambusový biochar. DHA, která je jako intracelulární enzym součástí fosforylačních procesů, se po aplikaci biocharu zvýšila. Stanoveny byly i některé ostatní enzymy například ureáza a celulóza. Přídavek biocharu také zvýšil růst a reprodukci u druhu žížal *E. fetida*, který je používán právě ve vermikompostech [58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Charakteristika vybraných matric

3.1.1 Odběr, přeprava a úprava vzorků

Odběr vzorku zeminy byl proveden rýčem. Čepel rýče byla vždy zabořena na celou hloubku pro vytvoření svislé stěny. Po vytažení rýče byla odebrána půda po celé délce svislé stěny z orníční vrstvy (hloubka 20 - 30 cm). Všechny odebrané dílčí vzorky byly z vybraných míst dané lokality smíseny v jeden o celkovém množství cca 3 kg (viz *Obrázek 2*). Následně byla odstraněna větší fauna, vegetace a kameny. V případě odběru vzorku ze skládky byl odběr přizpůsoben podmínkám viz odstavec 3.1.2. Po provedení kvartace byly vzorky půdy převedeny do plastových přepravních boxů. Před analýzou enzymů a nasazením testů na organismech byly vzorky síťovány přes síto s velikostí ok 2 mm. V laboratoři byly vzorky před i po síťování umístěny do digestoře [21] [59].



Obrázek 2: Odebraný vzorek před kvartací

3.1.2 Vzorek ze skládky

Vzorek byl odebrán na „černé“ skládce (viz *Obrázek 3*). Odběr byl proveden rýčem po odstranění svrchní vrstvy nánosů odpadů. Místa odběru musela být přizpůsobena možnostem odběru. Zde kvartace provedena nebyla. Skládka je na daném místě minimálně dvacet let a je zanesena vrstvou odpadů různého druhu. Proto byl vzorek odebrán z místa, které bylo alespoň trochu dostupné. Vzorky byly odebrány dva, jeden v dolní části skládky (skládka D) a druhý nahore (skládka H).



Obrázek 3: Skládka vybraná k odběru vzorku (zdroj: vlastní)

Oba vzorky se lišily barvou a strukturou (viz *Obrázek 4*). Vzorek z dolní části byl světlejší, zatímco půda z horní části byla tmavší a kypřejší. Také obsahovala biologicky rozložitelný materiál (malé větve, skořápky, úlomky kostí) a zbytky odpadů (sklo, plast a další). Vzorek byl přepraven do laboratoře v plastových boxech.



Obrázek 4: Půda ze skládky (hnědý box – skládka D, bílý box – skládka H) před síťováním (vlevo) a po síťování (vpravo) (zdroj: vlastní)

3.1.3 Vzorek z ekologicky obhospodařované zahrady

Půda byla odebrána ze záhonu, ošetřovaného hnojem a půdou z kompostu viz *Obrázek 5*. Před odběrem byla vytvořena síť 9 vpichů. Z celkového množství dílčích odběrů byl kvartací připraven směsný vzorek k dalšímu zpracování (cca 3 kg) Tato půda byla použita jako půda kontrolní pro vybrané ekotoxikologické testy vzorku ze skládky a rovněž byla použita jako základ pro testy aktivity dehydrogenázy.



Obrázek 5: Záhon vybraný k odběru půdy (vlevo) a půda ze záhonu po síťování (vpravo) (zdroj: vlastní)

3.1.4 Vzorky z ČOV Karlovy Vary

V práci byly hodnoceny dva vzorky. Jedním vzorkem byl čistírenský kal z ČOV Drahovice, Karlovy Vary. Jedná se o granulovaný vzorek kalu, který byl připraven zahuštěním ve flotační nádrži nebo zahušťovací odstředivce. Poté byla u zahuštěného kalu provedena stabilizace ve vyhnívacích nádržích. Následovala homogenizace s kaly, které byly přivezeny z ostatních čistíren v okolí a které nemají zavedené vlastní zařízení na zpracování kalu. Po homogenizaci byl kal opětovně odvodněn na odstředivkách. Nakonec byl zařazen proces sušení horkým vzduchem v nízkoteplotní pásové sušárně. Produktem byl suchý granulát (granulovaný kal), který obsahoval 90 % sušiny.

Druhý vzorek – biouhel byl připraven z výše uvedeného granulovaného kalu ve výzkumném centru AdMaS procesem mikrovlnné pyrolýzy. Pyrolýza byla zahájena při teplotě 18°C. Maximální dosažená teplota byla 231°C. Délka ozařování byla 90 minut. Výkon mikrovlnného záření byl 130 MW/V. *Obrázek 6* zobrazuje vzorek kalu před procesem mletí a po něm.



Obrázek 6: Vzorky z ČOV Drahovice - dole před mletím, nahoře po mletí (vlevo vzorek kalu, vpravo vzorek biouhlu) (zdroj: vlastní)

Oba vzorky byly rozemlety v laboratoři na elektrickém mlýnku za účelem homogenizace (Obrázek 7). Homogenizovaný vzorek kalu a biouhlu byl pro účely testování smíchán ve vybraných poměrech s umělou půdou.



Obrázek 7: Mletí vzorku na elektrickém mlýnku (zdroj: vlastní)

Čistírenský kal je jedním z produktů procesu čištění odpadních vod. Čištění odpadní vody probíhá za účelem odstranění nežádoucích složek a jejich zakoncentrování v kalu a snížení objemu produktu. Je možné a v současné době i doporučované využít kal jako primární surovinu k dalšímu zpracování. Cílem těchto pokročilých úprav je dále snižovat koncentrace toxických prvků či pozměnit jejich fyzikálně chemické vlastnosti a zabránit tak nepříznivým dopadům na životní prostředí. Koncentrace prvků v kalu je odlišná pro různé druhy odpadních vod a závisí na kvalitě odpadní vody na vstupu do čistírny. Při návrhu čistíren odpadních vod a kalové koncovky je důležité k tomuto aspektu přihlížet [60].

Využití a zpracování kalů je ovlivňováno ekonomickými aspekty, udržitelností a vlivem na životní prostředí. Se stále zpřísnujícími se standardy a měnící se legislativou bude docházet i ke změnám řízení zpracování kalů. Politika EU potlačuje ukládání odpadů na skládky a podporuje jejich využití, minimalizaci, recyklaci a zejména se zaměřuje na omezení vzniku odpadů. V ČR je ukládání kalů na skládku zakázáno. Problematiku kalů upravuje vyhláška 437/2016 Sb [60] [61].

Biouhel nebo také biochar je produktem pyrolýzy za nepřístupu nebo úplného vyčerpání kyslíku. Kromě biouhlu vznikají další produkty – syngas a bio-olej, které mohou být dále zpracovány. Výchozím materiálem nemusí být při výrobě biouhlu jen kal z ČOV, ale také slupky, dřevo, skořápky a dalšího organického odpadu. Vzniklý biouhel má potom využití v zemědělství, kdy je do půdy přidáván pro zlepšení některých vlastností půdy [62].

3.1.5 Vzorek sedimentu

Vzorek byl odebrán na Brněnské přehradě u břehu. Přesné místo odběru je uvedeno na mapě v příloze 7 (Obrázek 27). Po transportu vzorku do laboratoře byl vzorek ponechán na filtračním papíře na vzduchu, aby proschnul a bylo možné ho přesítovat (Obrázek 8).



Obrázek 8: Vzorek sedimentu po sítování

Využití sedimentů pro aplikaci na zemědělskou půdu upravuje vyhláška č.257/2009 Sb. Vyhláška upravuje způsob využití sedimentů, limitní hodnoty rizikových prvků a rizikových látek. Dále zmiňuje požadavky na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti sedimentu, postupy rozboru sedimentů, odběru vzorku a další. Pro ekotoxikologické hodnocení sedimentů jsou aplikovány tyto testy – test toxicity půd a půdních materiálů na roupici *Enchytraeus crypticus*, test toxicity půd a půdních materiálů na chvostoskoka *Folsomia candida*, stanovení inhibice nitrifikace v půdách a půdních materiálech a test inhibice růstu vyšších rostlin. Všechny ekotoxikologické testy jsou prováděny ve smíšeném vzorku sedimentu a referenční půdy v poměru 1:3 [63].

3.1.6 Vybrané vzorky pro analýzu aktivity dehydrogenázy

Po ukončení všech testů byla provedena analýza vybraných vzorků půd na aktivitu DHA. Pro tento účel byly odebrány vzorky půdy ze tří různých lokalit, která byla z hlediska stanovení aktivity DHA považována za kvalitativně rozdílná (Obrázek 9) - (viz Přílohy - Obrázek 28, Obrázek 29), konkrétně vinice (Obrázek 28), kruhový objezd (Obrázek 29), železniční přejezd (nedaleko od vinice) a nádraží. Vzorky byly opět do laboratoře přepraveny tak, aby nedošlo k výrazným změnám v povaze vzorku. Půda nebyla před stanovením nijak upravena.



Obrázek 9: Vzorky na stanovení DHA (vzorek č. 1 – vinice, vzorek č. 2 – nádraží, vzorek č. 3 – kruhový objezd, vzorek č. 4 – přejezd)

3.1.7 Testované koncentrace

Testované matrice byly do testu nasazeny v různých koncentračních řadách. Tyto byly připraveny smícháním dané matrice s umělou půdou, popř. půdou ze zahrady v různých poměrech.

V případě kalu a biouhlu bylo přihlédnuto k faktu, že tyto vzorky byly již hodnoceny v předchozích závěrečných pracích na našem ústavu a tudíž bylo možné na základě jejich výsledků zvolit koncentrační řadu bez použití předběžných testů (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Koncentrační řada - kal a biouhel

Koncentrace [%]	1,25	2,5	5	10
Koncentrace [g.kg ⁻¹]	12,5	25	50	100

Jelikož u vzorků ze skládky nebyla známá povaha vzorků, byly tyto vzorky před nasazením testů s delší dobou expozice testovány prostřednictvím akutních testů na žížalách a semenech salátu setého (test únikového chování žížal, test inhibice růstu kořene salátu). Na podkladě těchto výsledků a s ohledem na legislativu týkající se aplikace dané matrice na zemědělskou půdu byla vybrána koncentrační řada (viz Tabulka 3). Barevný sloupec uvádí koncentraci této matrice, která se používá při ekotoxikologických testech vzorků ze skládek.

Tabulka 3: Koncentrační řada - skládka

Koncentrace [%]	5	10	25
Koncentrace [g.kg ⁻¹]	50	100	250

Pro vzorek sedimentu, který byl nasazován do testu jako poslední, byl zvolen obdobný postup jako pro vzorky ze skládky. Pro výslednou koncentrační řadu testu byly vybrány opět tři koncentrace s ohledem na legislativní požadavky (viz Tabulka 4). V tabulce je barevně vyznačen sloupec koncentrace, která je jako v případě matrice ze skládky hodnocena v ekotoxikologických testech sedimentu.

Tabulka 4: Koncentrační řada - sediment

Koncentrace [%]	6,25	12,5	25
Koncentrace [g.kg ⁻¹]	62,5	125	250

3.2 Testy aktivity dehydrogenázy

Stanovení aktivity dehydrogenázy v půdě bylo provedeno podle normy ISO 23753-1 [64]. Princip a postup stanovení je uveden v kapitole 2.3.

3.2.1 Chemikálie, laboratorní vybavení a přístroje

Použité chemikálie

Kyselina chlorovodíková – koncentrace 35 %, LACHEMA – Česká republika

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – CAS 77-86-1, čistota 99 %, PENTA – Česká republika

2,3,5-Triphenyltetrazolium chlorid – CAS 298-96-4, čistota ≥ 98 %, ROTH – Německo

Aceton – CAS 67-64-1, čistota 99 %, PENTA – Česká republika

1,3,5-Triphenyltetrazolium formazan – CAS 531-52-2, čistota ≥ 90 %, SIGMA – USA

Uhlíčan vápenatý – CAS 471-34-1, čistý, Lach-Ner – Česká republika

Použité vybavení a přístroje

Analytické váhy AND GF 300

Spektrofotometr SPECORD 50 PLUS

pH metr inoLab 7110

Inkubátor BINDER

Běžné laboratorní vybavení

3.2.2 Příprava zásobních a kalibračních roztoků

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové

Pro úpravu pH tris pufrového roztoku byl připraven 1M roztok kyseliny chlorovodíkové. K přípravě roztoku byla použita kyselina chlorovodíková o koncentraci 35 %.

Příprava tris pufrového roztoku

Bylo naváženo 12,11 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu. Toto množství bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno použitím 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové dle pH půdy viz Tabulka 5.

Tabulka 5: Úprava pH tris pufrového roztoku podle hodnoty pH půdy

pH půdy	Výsledná hodnota pH
< 6	7,8
6 - 7	7,6
>7	7,4

Po úpravě pH byl roztok doplněn po rysku na 1 000 ml destilovanou vodou. Pro naši analýzu byla vybrána úprava roztoku na pH 7,6.

Příprava roztoku 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloridu (TTC)

Navážka TTC byla rozpuštěna v tris pufrovém roztoku. Koncentrace roztoku závisí na kvalitě analyzované matrice, tedy na obsahu humusu a jílu v půdě. Koncentraci roztoku v závislosti na kvalitě půdy zobrazuje Tabulka 6. Takto připravený roztok může být uchován ve tmě po dobu týdne při teplotě 4°C.

Tabulka 6: Koncentrace roztoku TTC podle kvality půdy

Kvalita půdy	Koncentrace TTC
písčítá, mírně humická, mírně jílovitá	0,1 - 0,5 %
hlinité a humické	0,1 - 1 %
jílovitá a huminová	1 - 2 %

Protože u některých vzorků bylo po promíchání s testovanou matricí v určitém procentuálním zastoupení problematické určit typ půdy, byl pro testy vybrán roztok TTC o koncentraci 1%.

Příprava kalibračních roztoků (1,3,5-Triphenyltetrazolium formazan - TPF)

Nejdříve byl připraven zásobní roztok TPF. Bylo rozpuštěno 1 000 mg TPF v acetonu kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a roztok byl doplněn po rysku acetonem.

Pracovní roztok TPF byl připraven ze zásobního roztoku TPF. Byl napipetován 1 ml zásobního roztoku TPF do 100 ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonem.

Ze zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky TPF o koncentraci 0; 3,3; 6,67; 16,7 a 33 µg/ml do odměrných baněk o objemu 50 ml (*Obrázek 10* – obrázek byl pořízen po provedení kalibrace, aby byl minimalizován možný rozklad roztoků působením světla a doba analýzy nebyla prodlužována). Roztoky jsou citlivé na světlo, takže byly před analýzou uchovány ve tmě.



Obrázek 10: Kalibrační roztoky (zdroj: vlastní)

3.2.3 Příprava půdy

Vzorky půd byly přepravovány a uchovány podle normy ISO 10381-6 [65]. Byla stanovena sušina vzorku podle ISO 11465 [66]. Přesítované vzorky mohou být uchovány při teplotě 4°C po dobu tří měsíců. Norma rovněž uvádí, že vzorky, které jsou skladovány různě dlouhou dobu, mohou mít při stanovení enzymatické aktivity odlišné výsledky [65].

3.2.4 Stanovení aktivit DHA

Navážka přirozeně vlhké půdy (po 5 g) byla převedena do čtyř zkumavek. Ke třem vzorkům bylo přidáno po 5 ml roztoku TTC. K poslednímu vzorku bylo přidáno 5 ml tris pufrového roztoku – slepý roztok. Každá zkumavka byla dobře uzavřena a poté protřepána. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 25°C po dobu 16 hodin. K vytvořenému TPF bylo

přidáno do každé zkumavky po 25 ml acetonu a roztoky byly poté nechány ve tmě po dobu 2 hodin. Po 1 a 2 hodinách byly roztoky protřepány a přes skládaný filtr v polotmě přefiltrovány. Do 1 hodiny byla stanovena absorbance filtrátu při vlnové délce 485 nm proti referenci acetonu (*Obrázek 11*) a prostřednictvím kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty aktivity dehydrogenázy.



Obrázek 11: Zabarvení roztoků po extrakci acetonem – vzorek z dolní skládky (zkumavka č. 5 – blank, zdroj: vlastní)

Koncentrace TPF byla stanovena dle rovnice [1].

$$a = \frac{(\overline{\rho_{CS}} - \overline{\rho_{BS}}) \cdot V \cdot 100}{m \cdot DM \cdot t}, \quad [1]$$

kde $\overline{\rho_{CS}}$ je úplná průměrná koncentrace TPF ve vzorku v $\mu\text{g/ml}$, $\overline{\rho_{BS}}$ průměrná koncentrace TPF slepého vzorku v $\mu\text{g/ml}$, V je objem roztoku (5 ml tris pufrového roztoku nebo TTC a 25 ml extrakčního činidla), m je počáteční hmotnost vzorku půdy v g, DM je obsah sušiny vzorku v % a t je doba inkubace (16 hodin).

3.3 Testy na organismech

3.3.1 Příprava umělé půdy

Podle metodiky OECD bylo připraveno 17,5 kg umělé půdy. Toto množství bylo finální, před úpravou uhličitánem vápenatým. Půda musí obsahovat tyto složky: 20 % kaolínu, 70 % křemenného písku a 10% rašeliny. Složky byly před sítováním vysušeny na vzduchu. Písek a rašelina byly přesáty přes síto (rašelina přes 2 mm síto a alespoň 50 % písku přes 0,2 mm síto). Složky byly za sucha promíseny (*Obrázek 12*). Výsledná hodnota pH by měla být $6 \pm 0,5$. Přestože byly složky smíchány v přesném poměru, výsledná umělá půda neměla vlastnosti požadované dle metodiky. Hodnota pH byla výrazně nižší, než bylo v metodice povoleno. Po provedení mnoha dílčích testů únikového chování žížal s různými přísadami uhličitanu vápenatého a měření hodnoty pH, bylo zjištěno optimální množství uhličitanu pro úpravu půdy. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 3.4 (Tabulka 10).

Následně byla provedena úprava pH přísadkou CaCO_3 (1,5 gramu uhličitanu na 500 gramů půdy). Hodnota pH takto upravené půdy byla 5,56. Dle metodiky je možná úprava uhličitánem v procentuálním množství od 0,3 do 1,0 %. Výše uvedený přísadek představuje 0,3 % a je tedy pro úpravu pH vyhovující. Dávka v tomto poměru byla aplikována na celkové množství umělé půdy. Poté byla půda důkladně promíchána, ovlhčena destilovanou vodou na předem stanovenou hodnotu WHC_{max} . Po finální úpravě pH půdy byl opět proveden kontaktní test se žížalami ve třech opakováních. Jeho výsledky byly příznivé a žížaly

prosperovaly i po dvoutýdenní testovací době, takže upravená půda mohla být použita při testech ekotoxicity [67].



Obrázek 12: Artificiální půda po smísení složek (zdroj: vlastní)

Stanovení maximální vodní kapilární kapacity půdy WHC_{max}

Bylo naváženo 50 g suché artificiální půdy. Navážka půdy byla umístěna do vysušeného válce s fritou, který byl předem zvážen. Válec bylo potřeba poklepat, aby zemina sesedla. Válec se zeminou byl umístěn do nádoby s vodou tak, aby výška hladiny vzorku byla v jedné rovině s výškou vodního sloupce. Válec byl v nádobě ponechán 3 hodiny (Obrázek 13). Poté byl přemístěn na misku s jemným pískem. Miska i válec byly přikryty jemnou tkaninou, aby bylo zamezeno vysoušení vzorku. Po 3 hodinách byl válec se vzorkem zvážen. Následně byl válec vážen vždy po 30 minutách až do konstantní hmotnosti. WHC_{max} byla stanovena dle rovnice [2].

$$WHC = \frac{S - T - D}{D} \quad [2] \quad max$$

kde S je hmotnost válce s nasycenou půdou, T je hmotnost válce a D je hmotnost suché půdy [67].



Obrázek 13: Stanovení maximální vodní kapacity (zdroj: vlastní)

Stanovení pH půdy

Bylo naváženo 5 g půdy. Poté byl připraven 1M roztok chloridu draselného. Do zkumavky byla převedena navážka půdy a poté 25 ml připraveného roztoku. Suspenze byla třepána po dobu 5 minut. Následně byl roztok ponechán nejméně 2 hodiny v klidu a bylo stanoveno pH (viz Obrázek 14) [67].



Obrázek 14: Měření pH metrem (zdroj: vlastní)

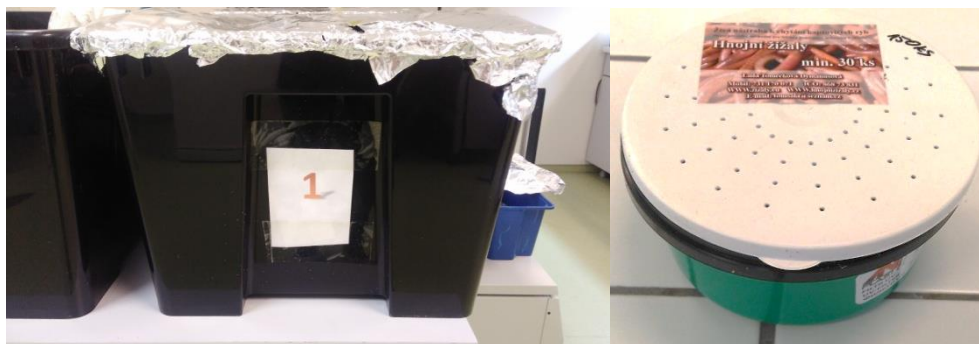
Stanovení sušiny

Nejprve byla stanovena hmotnost předem vysušené vysoušečky i s víčkem. Vysoušečka byla před vážením sušena při teplotě 105°C, poté byla přemístěna do exsíkátoru, kde byla ponechána nejméně 45 minut. Na takto připravenou vysoušečku bylo naváženo 30 gramů půdy. Po uzavření víčkem byla zvážena na analytických vahách a hmotnost byla zaznamenána. V sušárně byla sušena do konstantní hmotnosti při teplotě 105°C po dobu nejméně 16 hodin. Za stejných podmínek bylo sušeno i víčko příslušné vysoušečky. Po ukončení sušení byly vysoušečky uzavřeny víčkem a byly přemístěny do exsíkátoru, kde po dobu nejméně 45 minut chladly. Po vyjmutí byly okamžitě zváženy a hmotnost byla zaznamenána pro následný výpočet sušiny.

3.3.2 Testy na organismu *Eisenia fetida*

3.3.2.1 Založení věkově synchronní populace

Nejdříve byla připravena půda pro založení chovu žížal. Byl navážen zahradnický substrát, hnůj a rašelina v poměru 1:0,8:0,2 kg. Složky byly za sucha dobře promíseny a poté byla směs ovlhčena destilovanou vodou. Optimální vlhkost byla určena tzv. pěstní zkouškou, kdy po stlačení půdy v pěsti došlo k tvorbě malých kapiček, ale nedocházelo k vytékání vody. Před založením chovu bylo do testovací nádoby odebráno množství půdy pro kontrolní test. Do připraveného substrátu bylo umístěno 5 žížal. Pokud nedošlo k jejich úhynu a žížaly neměly tendenci z prostředí unikat, byla půda považována za vhodnou pro založení chovu. Do plastového boxu se substrátem bylo z jiných chovů umístěno minimálně 50 dospělých i juvenilních žížal. Půda v boxu byla přikryta navlhčeným filtračním papírem a celý box byl překryt alobalem (viz Obrázek 15). Každý týden bylo nutné kontrolovat vlhkost substrátu, ručně substrát prokypřit a přidat hnůj jako zdroj potravy. Po 4 týdnech, kdy žížaly nakladly kokony, byly žížaly odstraněny z důvodu založení věkově synchronní populace. Nová populace byla po dvou měsících vhodná k použití v testech [68].



Obrázek 15: Boxy pro založení chovu žížal a přepravní box (zdroj: vlastní)

3.3.2.2 Test únikového chování na žížalách

Tento dvoukomorový test byl koncipován dle normy ISO 17512-1:2008. Jedná se o rychlý screeningový test na žížalách *E. fetida*. Probíhá v nádobách, které obsahují dvě složky – testovanou a kontrolní půdu. Žížalám je umožněn volný přechod mezi těmito půdami na základě jejich volby lepšího prostředí. Výsledky slouží k hodnocení působení testované látky na vybraný organismus. Doba trvání testu je 48 hodin. Mezi hodnocené parametry patří mortalita a únikovost [69].

Postup testu

Nejdříve byli z chovu vybráni jedinci, kteří splňovali potřebná kritéria. Stáří jedinců se pohybovalo v intervalu 2 až 12 měsíců. Žížaly musely mít vyvinutý opasek a jejich hmotnost byla od 250 do 600 g (Obrázek 17). Jedinci byli opatrně opláchnuti na Petriho misce destilovanou vodou a poté jemně osušeni na filtračním papíře. Na jednu testovací nádobu bylo potřeba 10 kusů žížal.

Test byl nasazen do plastových nádob tvaru obdélníku, které byly rozděleny přepážkou. Na jednu nádobu bylo umístěno 250 g půdy kontrolní a na druhou 250 g půdy testované v koncentracích 1,25; 2,5; 5 a 10 % (12,5; 25; 50 a 100 g.kg⁻¹). Půda byla ovhčena na předem stanovenou hodnotu WHC_{max}. Po vyjmutí přepážky byly do vzniklé rýhy umístěny žížaly v daném počtu. Každá krabička byla obalena potravinovou fólií, ve které byly vytvořeny malé otvory pro cirkulaci vzduchu (Obrázek 16). Krabičky byly umístěny do komory s konstantním osvětlením o intenzitě 400 až 800 luxů a teplotou 20°C. Osvětlení nutilo žížaly nevylézat na povrch a držet se ve spodních vrstvách půdy. Během trvání testu nebyly žížaly krmeny.



Obrázek 16: Nasazení únikového testu na žížalách (zdroj: vlastní)

Po uplynutí 48 hodin byly obě části lopatkou vyjmuty na ták, kde bylo spočítáno množství žížal v obou půdách. Pokud byl nějaký jedinec v rýze mezi půdami, byl započítán do té poloviny, kde se nacházela jeho přední část. Dalším hodnoceným parametrem byla mortalita (pokud nastal takový případ). Únikovost NR v % byla vypočítána dle rovnice [3]. Pokud byla únikovost vyšší než 80 %, byla koncentrace vzorku hodnocena jako toxická.

$$NR = \frac{C - T}{N} \cdot 100, \quad [3]$$

kde C je počet žížal v kontrole, T je počet žížal v testované půdě a N je celkový počet žížal na krabičku.



Obrázek 17: Vážení žížaly před nasazením do testu (zdroj: vlastní)

3.3.2.3 Test akutní toxicity na žížalách

Akutní toxicita byla hodnocena dle metodiky OECD 207. Test trvá 14 dní. Žížaly jsou po tuto dobu vystaveny různým koncentracím kontaminantu. Zároveň je nasazen test s kontrolní půdou. V polovině testu (7 den) a na jeho konci je hodnocena mortalita [70].

Postup testu

Žížaly byly vybírány podle stejných kritérií, jako v případě testu únikového chování. Stejně jako při testu únikového chování byli nejdříve vybráni jedinci, kteří splňovali tato kritéria (stáří jedinců v intervalu 2 – 12 měsíců, vyvinutý opasek, hmotnost od 250 do 600 g). Jedinci byli opatrně opláchnuti na Petriho misce destilovanou vodou a poté jemně osušeni na filtračním papíře. Na jednu testovací krabičku bylo potřeba 5 žížal.

Do krabiček bylo naváženo po 250 g půdy, ovlhčené na předem stanovenou hodnotu WHC_{max} . Na povrch půdy bylo umístěno 5 předem zvážených jedinců *Obrázek 18*. Hmotnost žížal byla zaznamenána pro každou testovací nádobu a pro každé opakování. Krabičky bylo potřeba uzavřít potravinovou fólií a udělat do ní otvory pro cirkulaci vzduchu. Poté byly umístěny pod konstantní osvětlení intenzity 400 až 800 luxů se zajištěním teploty 20°C.



Obrázek 18: Nasazení testu akutní toxicity (zdroj: vlastní)

Po 7 a 14 dnech byla vyhodnocena změna hmotnosti a mortalita žížal (pro všechny koncentrace a kontrolu), přičemž za mrtvé byly považovány ty žížaly, které nereagovaly na impulsy na přední části těla. Test je platný, pokud úmrtnost v kontrole nepřesáhne 10 % a hmotnost žížal v kontrole neklesne pod 20 %.

3.3.2.4 Test chronické toxicity a reprodukčního chování na žížalách

Výhodou tohoto testu je posouzení dlouhodobého účinku na organismus a na jeho reprodukční schopnost. Test byl aplikován dle normy ISO 11268-2. Podmínky testu jsou obdobné jako u testu akutní toxicity s tím rozdílem, že tento test trvá 56 dní. Hodnotí se mortalita a reprodukční chování [59].

Postup testu

Žížaly byly vybírány podle stejných kritérií, jako v případě testu akutní toxicity s tím rozdílem, že pro tento test musely mít žížaly vyvinutý opasek. Na jednu testovací krabičku bylo potřeba 5 žížal.

Do krabiček bylo naváženo po 250 g půdy, ovlhčené na předem stanovenou hodnotu WHC_{max} . Na povrch půdy bylo umístěno 5 předem zvážených jedinců. Hmotnost žížal byla zaznamenána kvůli vyhodnocení testu. Krabičky bylo potřeba přikrýt potravinovou fólií a udělat do ní otvory pro cirkulaci vzduchu. Poté byly umístěny pod konstantní osvětlení intenzity 400 až 800 luxů se zajištěním teploty 20°C (Obrázek 19). Každý týden bylo nutné populaci přikrmovat koňským hnojem a půdu v krabičce navlhčit. Hnůj bylo potřeba nadrtit a do testu navlhčit (Obrázek 20), tak aby výsledná WHC_{max} půdy nebyla překročena. Na žížalu bylo přidáno jednou týdně 0,5 gramů hnoje, tedy 2,5 gramu na jednu krabičku.



Obrázek 19: Nasazení testu reprodukce (zdroj: vlastní)



Obrázek 20: Granulované hnojivo (nalevo před drcením, napravo po drcení – zdroj: vlastní)

Po 28 dnech byla hodnocena mortalita. Obsahy nádob byly opatrně převedeny na tác, živé žížaly byly omyty, osušeny a zváženy a veškerý materiál byl velice opatrně přebrán (kokony jsou náchylné na poškození). Byl zaznamenán počet kokonů. Poté byl obsah do krabiček vrácen, aby mohl test pokračovat. Po uplynutí dalších 28 dnů byl postup zopakován. Byl zaznamenán počet juvenilů (Obrázek 21). Podle rovnice [4] byla vypočtena mortalita.

$$M = \frac{(K - T)}{K} \cdot 100 \quad [4],$$

kde M je mortalita v %, K je počet živých jedinců v kontrole, T je počet živých jedinců v testované půdě. Obdobně byly vyhodnoceny změny v hmotnosti.



Obrázek 21: Počítání juvenilních jedinců (zdroj: vlastní)

3.3.3 Testy na organismu *Folsomia candida*

3.3.3.1 Založení chovu chvostoskoků

Kultura chvostoskoků se chová v plastových nádobách nebo na Petriho miskách viz Obrázek 22. Chovný substrát byl připraven ze sádry a aktivního uhlí v hmotnostním poměru 9:1. Po smísení obou složek byl substrát navrstven do plastové krabičky ve výšce kolem 1 cm. Poté byl substrát opatrně vlhčen až do úplné saturace. Dobře navlhčený substrát je černý a lehce matný. Po pokapání vodou se tato vlhkost pomalu zasakuje. Poté bylo potřeba, aby připravený substrát zaschnul. Ostrým předmětem byla na povrch substrátu vytvořena mřížka pro naklazení vajíček. Doprostřed misky byla nasypána trocha sušených kvasnic a ty byly ovlhčeny destilovanou vodou. Na takto připravený substrát byli pomocí odsávačky umístěni chvostoskoci. Miska byla po uzavření víkem umístěna do inkubátoru a uchována při teplotě 20°C. Chov bylo potřeba minimálně dvakrát týdně větrat, doplnit kvasnice, ovlhčené destilovanou vodou. Do testů se využívají juvenilní jedinci staří 10 až 12 dní [68].



Obrázek 22: Založení chovu chvostoskoků (vlevo) a inkubátory (zdroj: vlastní)

3.3.3.2 Test únikového chování na chvostoskocích

Test byl nasazen dle normy ISO 17512-2:2011. Test je časově nenáročný. Doba trvání testu je 24 hodin [71].

Postup testu

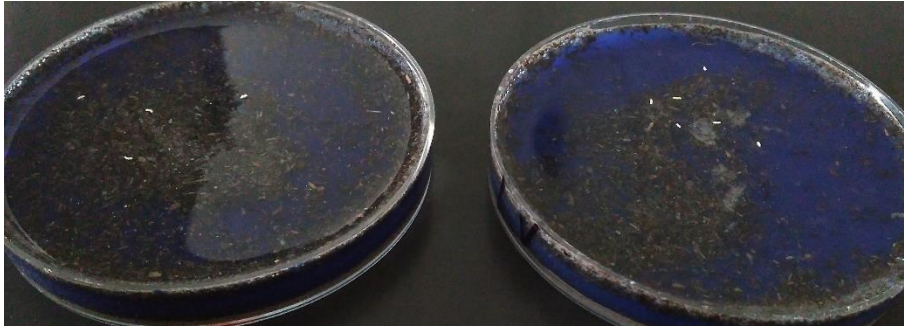
Do testu byli použiti jedinci *F. candida* stáří 10 až 12 dní. Na každou Petriho misku bylo nasazeno 10 jedinců.

Bylo naváženo 15 g kontrolní půdy a 15 g půdy testované (Obrázek 23). Půda byla ovlhčena destilovanou vodou na příslušnou WHC_{max} . Mezi oběma půdami byla pomocí přepážky vytvořena rýha, do které byli umístěni chvostoskoci. Misky byly inkubovány ve tmě a při teplotě 20°C.

Po 24 hodinách byl vyhodnocen vliv testované půdy. Půda byla opatrně přemístěna do misek (kontrolní půda zvlášť). Po přemístění byla do misky nalita voda tak, aby chvostoskoci vyplavali na povrch a byl určen počet chvostoskoků v obou půdách (kontrolní i testované). Lépe je test vyhodnocován ve tmě, protože chvostoskoci jsou na světlo velmi citlivé organismy. Pro lepší identifikaci bylo možné přidat do misky pár kapek inkoustu (Obrázek 24). Míra únikovosti chvostoskoků byla vypočítána stejně jako v případě únikovosti žížal.



Obrázek 23: Miska s půdou připravená do testu (nalevo půda uměle vytvořená, napravo půda testovaná – zdroj: vlastní)



Obrázek 24: Vyhodnocení testu únikového chování – sčítání chvostoskoků (zdroj: vlastní)

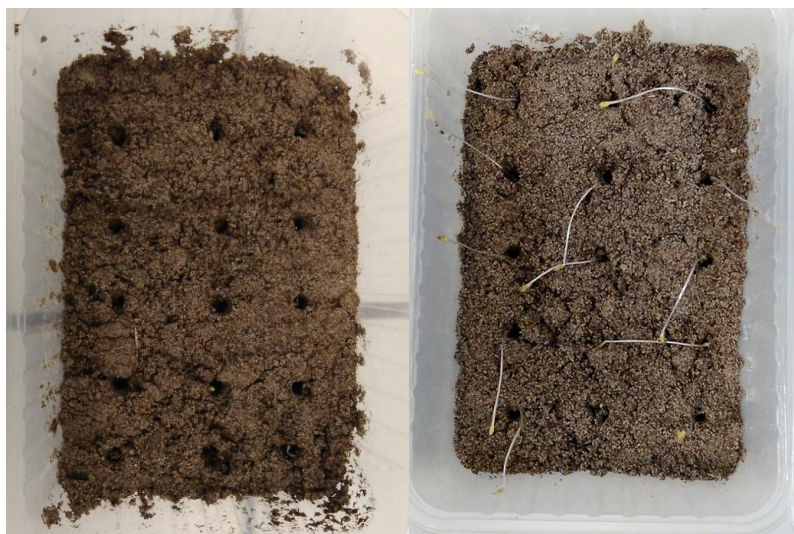
3.3.4 Test inhibice kořene salátu *Lactuca sativa*

Test byl nasazen podle normy ISO 11269. Podstatou testu je hodnocení inhibice růstu kořene salátu *L. sativa*. Do testu jsou použita naklíčená semínka salátu a vyhodnocení testu probíhá po uplynutí inkubační doby 120 hodin [72].

Postup testu:

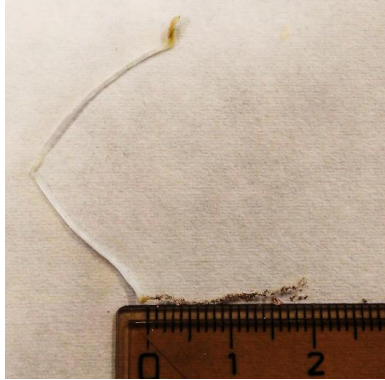
Před zahájením testu bylo nutné nechat semínka salátu naklíčit. Na dno Petriho misky byl vložen filtrační papír, který byl ovlhčen vodou tak, aby v misce nestála voda. Na misku byla rovnoměrně rozprostřena semínka salátu a miska byla překryta víčkem. Po uplynutí 24 až 48 hodin dle potřeby byly vhodně naklíčená semínka (kořínek nebyl delší než 2 mm) vybrány pro nasazení do testu.

Do plastových krabiček bylo naváženo vždy 250 g půdy. Test byl nasazen pro tyto koncentrace – 0; 1,25; 2,5; 5 a 10 % (0; 12,5; 25; 50 a 100 g.kg⁻¹). Testovány byly vzorky kalu, biouhlu, vzorky ze skládky i sedimentu. Půda byla po navlhčení na příslušnou WHC_{max} uhlazena tak, aby bylo možné na jejím povrchu vytvořit síť rovnoměrně rozložených jamek (3x5 bodů). Do vytvořených jamek bylo pomocí pinzety přeneseno 15 předklíčených semínek salátu vždy tak, aby byly sazeny kořínkem dolů a jemně přitlačeny k substrátu (Obrázek 25). Semínka nebyla půdou zakryta. Misky byly překryty fólií a umístěny do termostatu na dobu 120 ± 2 hodin při teplotě 24°C.



Obrázek 25: Nasazení testu inhibice růstu (před a po ukončení testu) (zdroj: vlastní)

Po uplynutí doby byla semínka lžičkou vyndána ven z krabičky, aby nedošlo k přetržení kořínku. U každého semínka byla změřena délka kořínku salátu (Obrázek 26) a byla spočítána inhibice růstu kořene. Test je platný, pokud je průměrná délka kořene v kontrole minimálně 15 mm.



Obrázek 26: Měření délky kořínku (zdroj: vlastní)

VÝSLEDKY A DISKUZE

3.4 Výsledky předběžných testů

Před samotnou analýzou a nasazením testů musely proběhnout přípravné testy. Bylo nutné určit koncentrační řady pro jednotlivé typy vzorků, upravit uměle vytvořenou půdu tak, aby vyhovovala nejen požadavkům normy, ale i samotným organismům, použitým v testu.

Pro nasazení a vyhodnocení ekotoxikologických testů bylo potřeba stanovit pH jednotlivých vzorků a jejich směsí s uměle vytvořenou půdou a dále určit WHC_{max} také pro každý vzorek i směs, aby byla půda do testů správně ovlhčena.

Pro testy aktivity dehydrogenázy bylo důležité stanovit pH vzorků i jednotlivých koncentrací vzorků. Dále byla stanovena sušina vzorků i jejich směsí, protože tento údaj byl potřebný k výpočtu výsledků stanovení aktivity DHA.

3.4.1 Koncentrační řady testovaných matric

Na základě výsledků předchozích prací vedených na UCHTOŽP byly vybrány koncentrační řady pro testování **vzorku kalu a biouhlu** (Tabulka 7).

Pro **vzorky ze skládky** byly nejdříve zavedeny předběžné testy (test únikového chování žížal a test inhibice růstu kořene salátu). Byly zvoleny tři koncentrace (Tabulka 8), z nichž koncentrace 10 % (100 g.kg^{-1}) je legislativou určena pro hodnocení ekotoxicity odpadů dle legislativních požadavků.

U **vzorků sedimentu** byly rovněž zvoleny tři koncentrace obdobně jako u vzorků ze skládky (Tabulka 9). Podobně jako u vzorku ze skládky i v případě sedimentu bylo vymezeno množství, které lze aplikovat na zemědělskou půdu. V tomto případě se jedná o koncentraci 25 % (250 g.kg^{-1}).

Vybrané koncentrace byly aplikovány pro testy ekotoxikologické i pro testy aktivity dehydrogenázy. Při ekotoxikologických testech byla jako základ použita připravená uměle vytvořená půda. Při testech enzymatické aktivity byla použita jako základ půda z ekologicky obhospodařované zahrady.

Tabulka 7: Vybrané koncentrace pro vzorky kalu a biouhlu

Koncentrace [%]	1,25	2,5	5	10
Koncentrace [g.kg^{-1}]	12,5	25	50	100

Tabulka 8: Vybrané koncentrace pro vzorky ze skládky

Koncentrace [%]	5	10	25
Koncentrace [g.kg^{-1}]	50	100	250

Tabulka 9: Vybrané koncentrace pro vzorek sedimentu

Koncentrace [%]	6,25	12,5	25
Koncentrace [g.kg^{-1}]	62,5	125	250

3.4.2 Stanovení pH

pH umělé půdy

Před nasazením testů bylo důležité upravit hodnotu pH umělé půdy. Po přidání vybraných dávek uhličitanu vápenatého byla pro každý přírůstek stanovena hodnota pH (Tabulka 10).

Na základě těchto výsledků bylo vyhodnoceno, že nejvhodnější je přírůstek 1,5 g na 500 g půdy. Tato dávka byla přepočtena na celou hmotnost umělé půdy a aplikována.

Tabulka 10: Hodnoty pH umělé půdy po vybrané přírůstku uhličitanu vápenatého

Přírůstek CaCO ₃ [g]	0	0,5	1,5	2	1,5 (po ustálení)
Hodnota pH	3,56	3,98	5,56	6,41	5,69

Po promíchání a ustálení pH byla před nasazením opět ověřena hodnota pH a jeho homogenita v celém objemu. Vzorek byl odebrán ze tří míst boxu s umělou půdou (výsledky viz Tabulka 11).

Tabulka 11: Hodnoty pH z vybraných míst po ustálení

Vzorek	1	2	3
Hodnota pH	5,79	5,64	5,62

Na základě výsledků rozboru byla půda ještě promíchána a následně využita pro nasazení ekotoxikologických testů.

V průběhu testování byla připravena další umělá půda, která byla smíchána s původní půdou. Výsledná hodnota pH celku 4,95 je opět v rozmezí hodnot požadovaných metodikou testu. Tato půda byla použita při ekotoxikologických testech na sedimentu a dále při testech na chvostoskocích.

pH vzorků

Vzhledem k požadavkům metodiky ekotoxikologických testů a testů enzymatické aktivity byly u jednotlivých vzorků stanoveny hodnoty pH (Tabulka 12). Tyto hodnoty byly rovněž stanoveny u jednotlivých koncentračních řad jednotlivých matic.

Tabulka 12: Hodnoty pH vzorků

Vzorek	Půda ze zahrady	Skládka H	Skládka D	Kal	Biouhel	Sediment
Hodnota pH	7,29	7,14	7,08	7,03	6,75	7,99

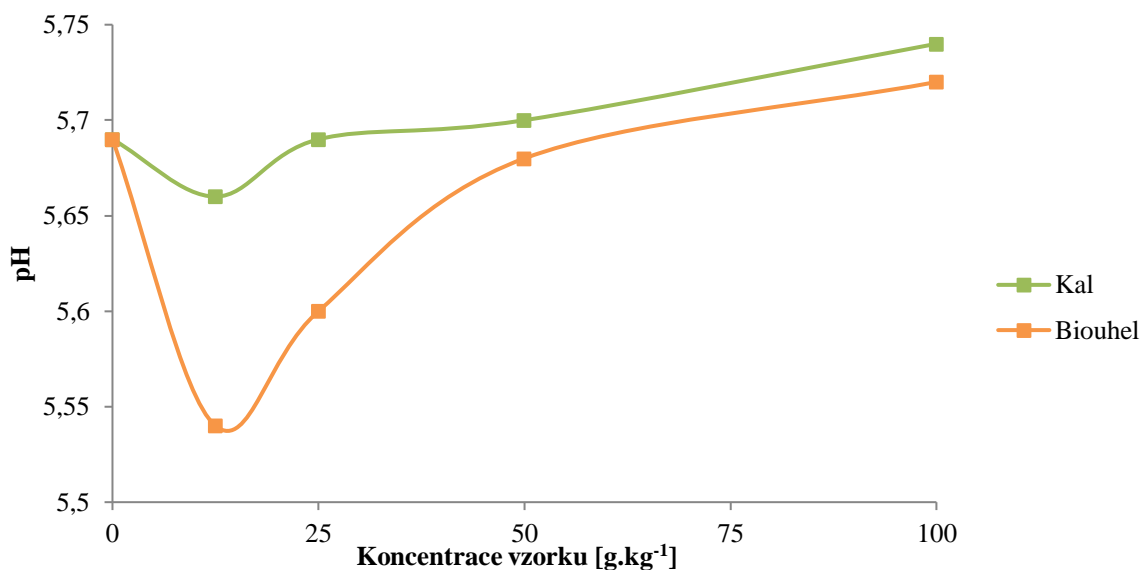
V případě vzorku kalu bylo pozorováno, že hodnota pH byla u koncentrace 1,25 % (12,5 g.kg⁻¹) nižší než u samotné umělé půdy, poté se hodnota pH s narůstajícím podílem vzorku zvyšovala (Tabulka 13). U vzorku biouhlu docházelo také k růstu pH přímo úměrně s rostoucí koncentrací vzorku (Tabulka 14). Grafické porovnání obou vzorků je zobrazeno níže (*Graf 2*). Lze předpokládat, že ve vyšších koncentracích vzorku, než jaké byly aplikovány, by měly oba vzorky schopnost nadále zvyšovat hodnotu pH půdy. Při aplikaci kalu a biouhlu na půdu by se mělo s tímto aspektem počítat.

Tabulka 13: Hodnoty pH pro připravené koncentrace - vzorek kal (ekotoxikologické testy)

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	12,5	25	50	100	čistý vzorek
Hodnota pH	5,69	5,66	5,69	5,7	5,74	7,03

Tabulka 14: Hodnoty pH pro připravené koncentrace – vzorek biouhel (ekotoxikologické testy)

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	12,5	25	50	100	čistý vzorek
Hodnota pH	5,69	5,54	5,6	5,68	5,72	6,75



Graf 2: Závislost pH na koncentraci vzorku - kal a biouhel

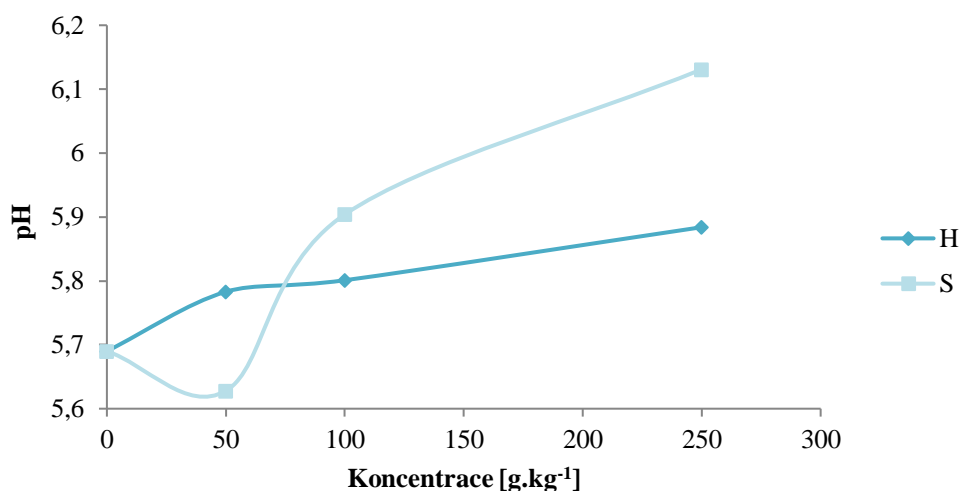
Hodnoty pH u vzorků ze zahrady a ze skládky lze mezi sebou porovnat. Vzhledem k tomu, že půda byla odebrána v jedné lokalitě na místech nedaleko od sebe, lze posoudit případný vliv odpadu ze skládky na hodnotu pH půdy. Tabulka 12 zobrazuje jednotlivé hodnoty pH. Rozbor ukázal, že hodnoty pH se od sebe významně neliší. Půda ze zahrady měla hodnotu pH z těchto tří vzorků nejvyšší. Vzorek půdy z dolní části (skládka D), kde zřejmě dochází také k výluhu a koncentrování látek z celé skládky, měl nepatrně nižší hodnotu pH než vzorek z horní části (skládka H). Předpoklad byl, že rozdíl pH bude vzhledem k povaze odpadu znatelnější, než ve skutečnosti ukázal rozbor. Hodnoty pH pro jednotlivé koncentrace matric jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 15, Tabulka 16). Grafické porovnání hodnot pH pro jednotlivé koncentrace obou vzorků ze skládky jsou zobrazeny v grafu (Graf 3).

Tabulka 15: Hodnoty pH pro testované koncentrace – vzorek z horní části skládky (H) (ekotoxikologické testy)

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	50	100	250	čistý vzorek
Hodnota pH	5,69	5,78	5,80	5,88	7,14

Tabulka 16: Hodnoty pH pro testované koncentrace – vzorek z dolní části skládky (D)
(ekotoxikologické testy)

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	50	100	250	čistý vzorek
Hodnota pH	5,69	5,63	5,90	6,13	7,08

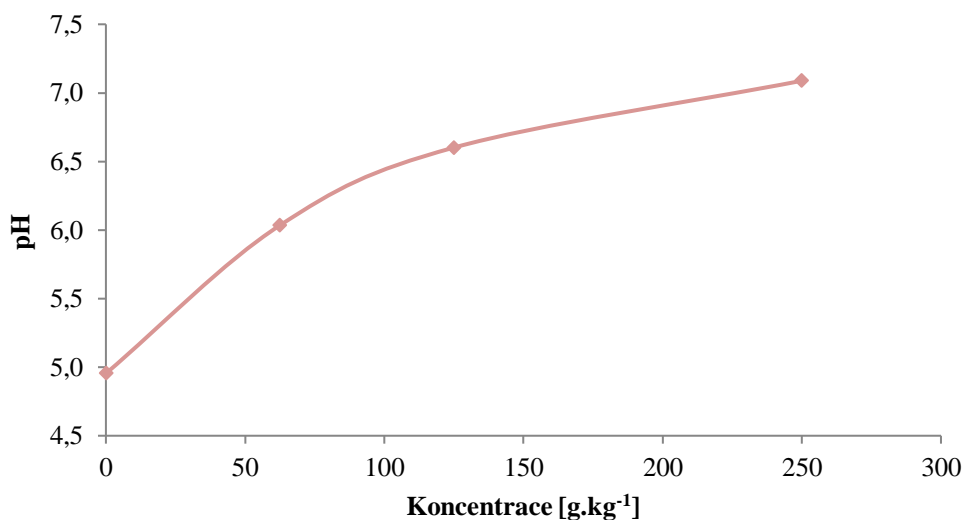


Graf 3: Závislost pH na koncentraci vzorku – horní a dolní skládka

Hodnota pH pro vzorek sedimentu byla 7,99, přičemž sediment měl ze všech vzorků hodnotu pH nejvyšší (viz Tabulka 12). Jak bylo dříve uvedeno (3.4.2), byla pro testování sedimentu použita nově připravená umělá půda o pH 4,95. S rostoucí koncentrací sedimentu v této umělé půdě rostla i hodnota pH (Tabulka 17, Graf 4).

Tabulka 17: Hodnoty pH pro připravené koncentrace - vzorek sediment (ekotoxikologické testy)

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	62,5	125	250	čistý vzorek
Hodnota pH	4,95	6,03	6,60	7,09	7,99



Graf 4: Závislost pH na koncentraci vzorku – sediment

3.4.3 Stanovení maximální vodní kapacity (WHC_{max})

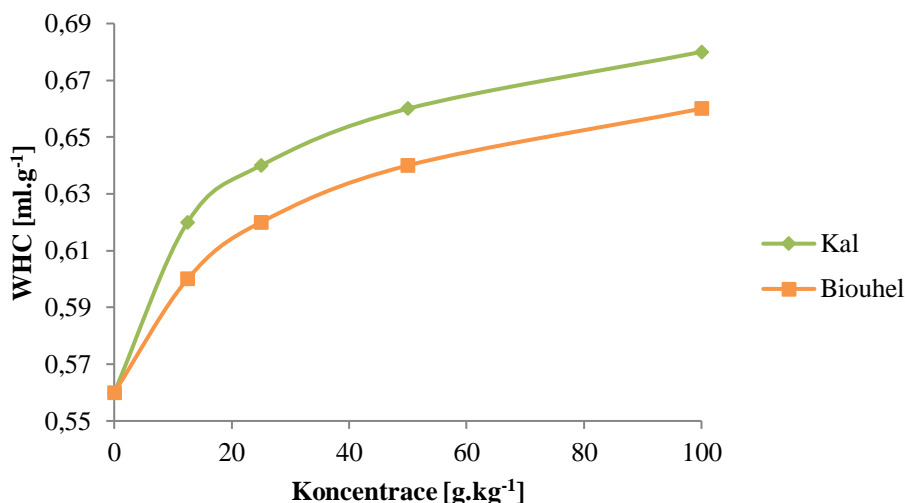
Před samotným nasazením ekotoxikologických testů byla stanovena maximální vodní kapacita WHC_{max} , aby byla půda do testu správně ovlhčena. U obou vzorků (u kalu i biouhlu) bylo patrné, že různé přídatky vzorků mají pozitivní vliv na schopnost zadržení vody v půdě. S rostoucí koncentrací rostla hodnota WHC_{max} (Tabulka 18, Tabulka 19). Při srovnání hodnot obou vzorků je vidět, že kal má v tomto případě lepší výsledky (Graf 5).

Tabulka 18: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity – vzorek kalu

Koncentrace [$g.kg^{-1}$]	WHC [$ml.g^{-1}$]
0	0,56
12,5	0,62
25	0,64
50	0,66
100	0,68

Tabulka 19: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity – vzorek biouhlu

Koncentrace [$g.kg^{-1}$]	WHC [$ml.g^{-1}$]
0	0,56
12,5	0,6
25	0,62
50	0,64
100	0,66



Graf 5: Závislost maximální vodní kapacity na koncentraci vzorku

U vzorku ze zahrady a ze skládky byla také stanovena WHC_{max} . Zatímco vzorek ze zahrady (Z) měl stejnou hodnotu WHC_{max} jako vzorek z dolní skládky (skládky D), horní skládka (skládky H) měla významně vyšší hodnotu WHC_{max} . Tabulka 20 zobrazuje stanovené hodnoty maximální vodní kapacity pro jednotlivé vzorky. Graf 6 zobrazuje změnu maximální vodní kapacity v závislosti na různých přídatcích vzorků. Zatímco vzorek ze skládky H zvyšoval WHC_{max} (Tabulka 21), přídatky vzorku ze skládky D maximální vodní kapacitu snížily (Tabulka 22).

Tabulka 20: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity - vzorek půdy ze zahrady a skládky

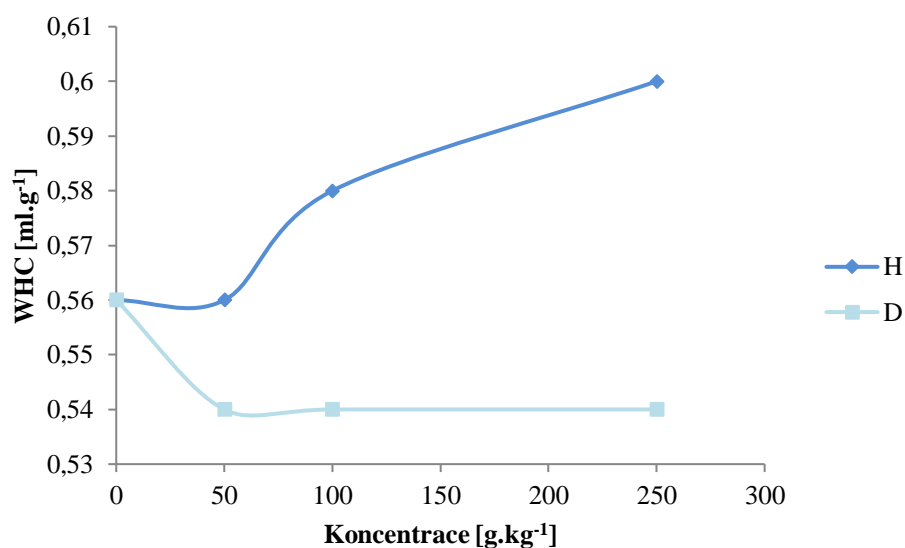
Typ vzorku	WHC [ml.g^{-1}]
Z	0,62
H	0,86
S	0,62

Tabulka 21: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity – vzorek skládka H

Koncentrace [g.kg^{-1}]	WHC [ml.g^{-1}]
0	0,56
50	0,56
100	0,58
250	0,60

Tabulka 22: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity – vzorek skládka D

Koncentrace [g.kg^{-1}]	WHC [ml.g^{-1}]
0	0,56
50	0,54
100	0,54
250	0,54



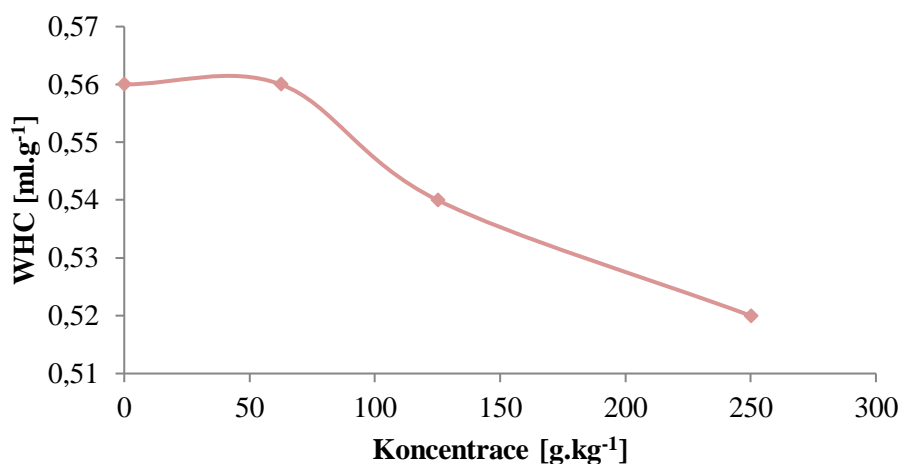
Graf 6: Závislost maximální vodní kapacity na koncentraci vzorku skládky

U vzorku sedimentu bylo zjištěno, že WHC_{max} je nejnižší ze všech analyzovaných vzorků. S rostoucí koncentrací přidaného vzorku docházelo ke snížení WHC_{max} (Tabulka 23, Graf 7). Z výše uvedených skutečností vyplývá, že testovaný sediment nemá velkou schopnost zadržovat vodu. Dle vyhlášky č. 257/2009 je možné aplikovat sediment na zemědělskou půdu pouze v případech, kdy mimo jiné nedojde ke zhoršení vodního režimu půdy [63]. V koncentraci 125 a 250 g.kg^{-1} byla maximální vodní kapacita půdy nižší než u půdy bez

vzorku. Je tedy možné, že po aplikaci na zemědělskou půdu dojde ke zhoršení vodního režimu půdy.

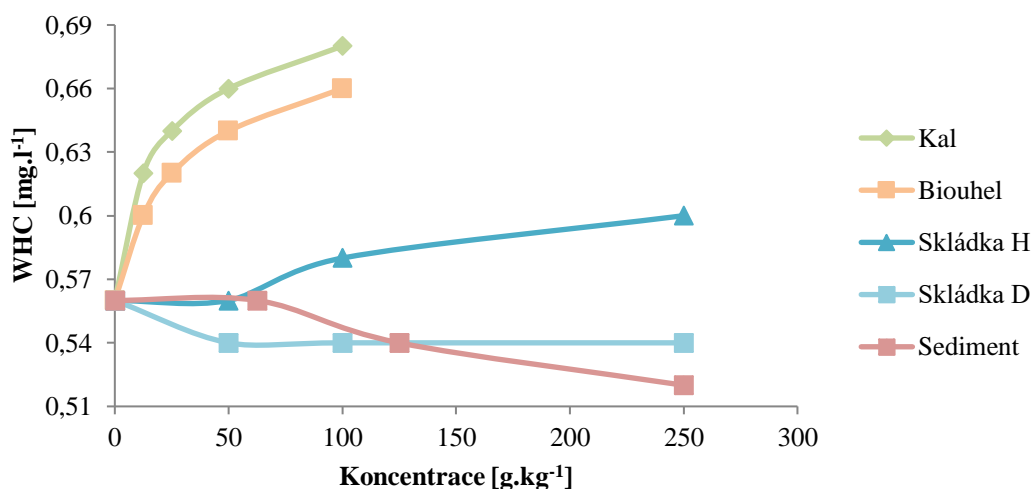
Tabulka 23: Výsledky stanovení maximální vodní kapacity – vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	WHC [ml.g ⁻¹]
0	0,56
62,5	0,56
125	0,54
250	0,52



Graf 7: Závislost maximální vodní kapacity na koncentraci vzorku sedimentu

V porovnání s ostatními vzorky je patrné, že kal i biouhel mají větší schopnost zadržovat vodu než ostatní vzorky. Opakem je vzorek sedimentu, který u artificiální půdy snižoval hodnotu WHC_{max} . Graf 8 zobrazuje porovnání všech hodnot WHC_{max} pro všechny použité vzorky.



Graf 8: Grafické porovnání hodnot WHC_{max} pro různé koncentrace analyzovaných vzorků

3.4.4 Stanovení sušiny vzorku

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.1.3, pro testy stanovení aktivity DHA byla jako kontrolní půda zvolena půda ze zahrady (Z), u které se předpokládalo MO oživení. Pro následný výpočet aktivity dehydrogenázy jednotlivých vzorků bylo potřeba stanovit pro každou směs půdy se vzorkem hodnotu sušiny v procentech.

V případě kalu je vidět, že jeho přidavek do půdy zvýšil procentuální hodnotu sušiny (Tabulka 24). Čistý kal měl obsah sušiny 92,65 %. Splňuje tedy deklarované vlastnosti od výrobce. Sušený kal měl mít obsah sušiny nejméně 90 %. Při stanovení pH bylo zjištěno, že půdní reakce není předvídatelná a že různé přídavky vzorku mohou pozměnit hodnotu pH.

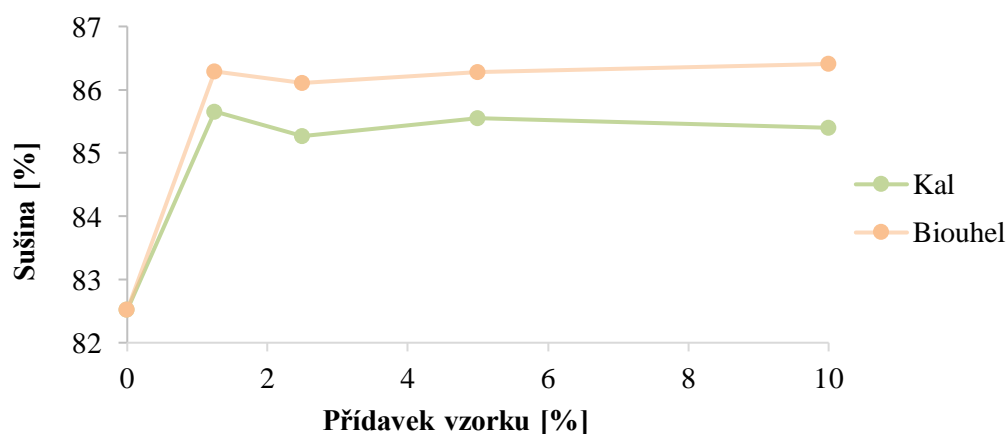
Tabulka 24: Stanovení sušiny – vzorek kal

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Sušina [%]	pH	Přídavek vzorku [%]
0,0	82,52	7,02	0,00 %
12,5	85,66	6,69	1,25 %
25,0	85,27	6,70	2,50 %
50,0	85,55	7,01	5,00 %
100,0	85,40	7,73	10,00 %
čistý vzorek	92,65	7,03	100,00 %

U vzorku biouhlu byla situace obdobná jako tomu bylo u kalu. Biouhel obsahoval podle předpokladu větší procento sušiny než kal, protože byl podroben dalším úpravám. Ve většině případů vzorek biouhlu moc nezměnil pH půdy ze zahrady, přestože pH čistého vzorku je menší než pH základní půdy. (Tabulka 25). Graf 9 zobrazuje porovnání sušiny obou vzorků kalu a biouhlu.

Tabulka 25: Stanovení sušiny – vzorek biouhel

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Sušina [%]	pH	Přídavek vzorku [%]
0,0	82,52	7,02	0,00 %
12,5	86,29	6,86	1,25 %
25,0	86,11	7,14	2,50 %
50,0	86,28	7,27	5,00 %
100,0	86,41	7,23	10,00 %
čistý vzorek	96,59	6,75	100,00 %



Graf 9: Závislost sušiny vzorku na procentuálním přídavku vzorku kalu a biouhlu

V případě vzorků ze skládky bylo pozorováno, že jednotlivé přídavky zvyšují procentuální hodnotu sušiny. Zajímavé je, že oba vzorky ze skládky (H i D) mají vyšší procento sušiny v čisté formě než kal a biouhel, které prošly úpravami. Vzorky ze skládky byly přitom jen sítovány přes síto a ponechány v laboratoři. Nebyly podrobeny žádným jiným mechanickým nebo dokonce termickým úpravám.

U čistého vzorku ze skládky H dosahovala hodnota sušiny 97 %. Jednotlivé přídavky vždy zvýšily procento sušiny. pH se s různou koncentrací vzorku měnilo, avšak změna pH byla nepatrná (Tabulka 26).

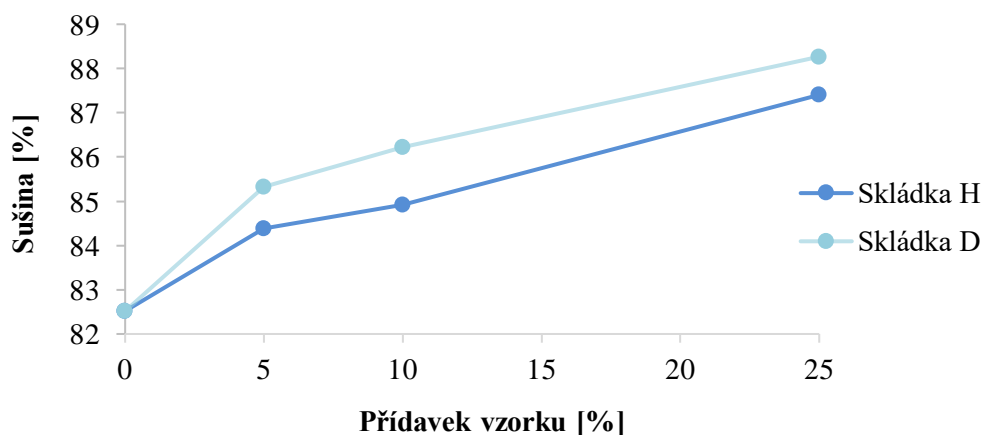
Tabulka 26: Stanovení sušiny – vzorek skládka H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Sušina [%]	pH	Přídavek vzorku [%]
0,0	82,52	7,02	0,00
50,0	84,39	7,22	5,00
100,0	84,92	6,78	10,00
250,0	87,40	7,16	25,00
čistý vzorek	97,00	7,14	100,00

Vzorek ze skládky D měl hned po vzorku sedimentu v čistém stavu největší podíl sušiny. Sušina čistého vzorku byla nad 98 %. Tak jako u předchozích vzorků ovlivnily jednotlivé přídavky vzorku procento sušiny. S rostoucí koncentrací docházelo k nárůstu procentuální hodnoty sušiny. Přestože pH původní půdy se od pH vzorku příliš neliší, došlo k mírnému nárůstu pH (Tabulka 27). Graf 10 zobrazuje porovnání výsledku stanovení sušiny vzorků ze skládky H a D.

Tabulka 27: Stanovení sušiny – vzorek skládka D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Sušina [%]	pH	Přídavek vzorku [%]
0	82,52	7,02	0 %
50	85,33	7,26	5 %
100	86,22	7,25	10 %
250	88,27	7,22	25 %
čistý vzorek	98,05	7,08	100 %

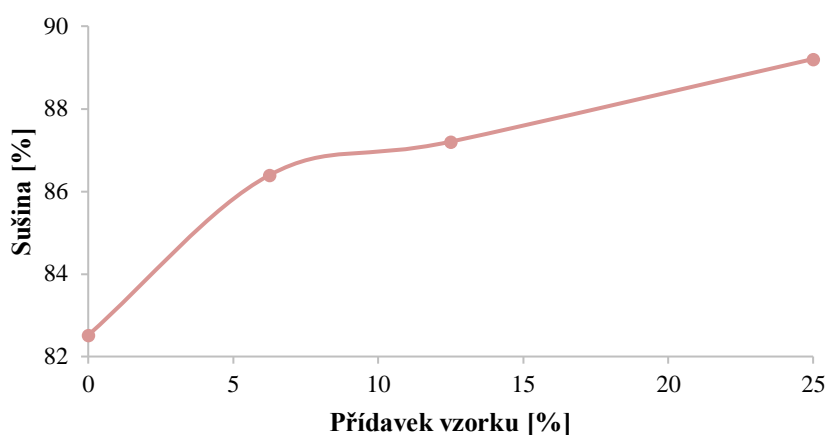


Graf 10: Závislost sušiny vzorku na procentuálním přídavku vzorku ze skládky H a D

Sediment byl tak jako vzorky půdy ze zahrady a vzorky ze skládky přesítován přes síto a ponechán v laboratoři volně. V případě stanovení WHC_{max} bylo pozorováno, že čím větší koncentrace vzorku byla přidána do půdy, tím byla menší WHC_{max} , naopak v jednotlivých koncentracích docházelo ke zvýšení sušiny (Tabulka 28, Graf 11).

Tabulka 28: Stanovení sušiny – vzorek sedimentu

Koncentrace [$g \cdot kg^{-1}$]	Sušina [%]	pH	Přídavek vzorku [%]
0,0	82,52	7,02	0,00
62,5	86,39	7,57	6,25
125,0	87,20	7,55	12,50
250,0	89,21	7,77	25,00
čistý vzorek	98,42	7,98	100,00

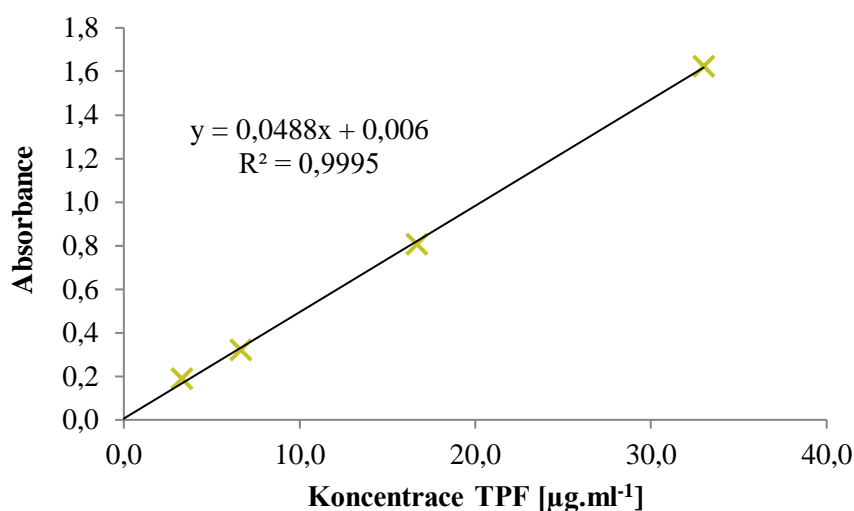


Graf 11: Závislost sušiny vzorku na procentuálním přídavku vzorku sedimentu

3.5 Test aktivity dehydrogenázy

3.5.1 Kalibrační křivka TPF

Na základě normy byly připraveny koncentrace kalibračních roztoků. Absorbance roztoků byla změřena při vlnové délce 485 nm co nejdříve po jejich přípravě. Roztoky byly před měřením dány do tmavého prostředí, aby nedocházelo k rozkladu připravených roztoků na světlo. Graf 12 zobrazuje kalibrační přímku TPF.



Graf 12: Kalibrační přímka TPF

3.5.2 Stanovení aktivity dehydrogenázy

Tento test byl aplikován na všechny vybrané vzorky ve všech koncentracích. Výsledky byly vždy vztaženy na sušinu v procentech a pro každou směs byla rovněž stanovena hodnota pH (viz stanovení sušiny v kapitole 3.4.4). Jako základ (kontrola a půda pro přípravu koncentračních řad vzorků) byla vybrána půda z ekologicky obhospodařované zahrady (Z). Předpokladem bylo, že některé vzorky mohou obsahovat například těžké kovy nebo jiné nežádoucí látky, takže přidavkem vzorku do půdy dojde ke snížení enzymatické aktivity. Z našich výsledků však vyplynulo, že přidavek vzorku většinou enzymatickou aktivitu spíše zvyšoval. Půda ze zahrady (Z) je spíše světlá a jílovitá, po dešti rychle vysychá, na povrchu vytváří krustu, která praská.

Pro každou koncentraci bylo provedeno testování ve třech opakováních. V některých případech se podařilo docílit relativně přesného stanovení, kdy jednotlivé hodnoty absorbanze byly blízké, v jiných se naopak více lišily. V normě [64] je uvedeno, že stanovení aktivity je aplikováno na čerstvou přirozeně vlhkou půdu. V našem případě jsme volili postup, kdy jsme do přirozeně vlhké půdy přidávali dané množství vzorku a tato směs byla pak co nejlépe promísena. Při testech DHA bylo zjištěno, že přesítovaná a na vzduchu vysušená půda může po ovlhčení opětovně zvýšit DHA. Může tedy dojít ke zlepšení nebo obnovení mikrobiálního oživení půdy.

U vzorku kalu došlo po jeho přidání k půdě ke zvýšení enzymatické aktivity (Tabulka 29). Studie Obbard [73] uvádí, že některé vzorky kalu mohou mít pozitivní vliv na aktivitu dehydrogenázy. To potvrzují i studie Mondala [47] a Alvarenga [57]. V mnoha případech mohou i přes možnou toxicitu poskytovat dobrý substrát pro mikroorganismy a tím navýšit aktivitu dehydrogenázy v půdě. Čistý vzorek kalu má DHA nižší (0,482) než samotná půda ze zahrady (Z) (0,577) a přesto aktivitu DHA po přidavcích do půdy navyšoval.

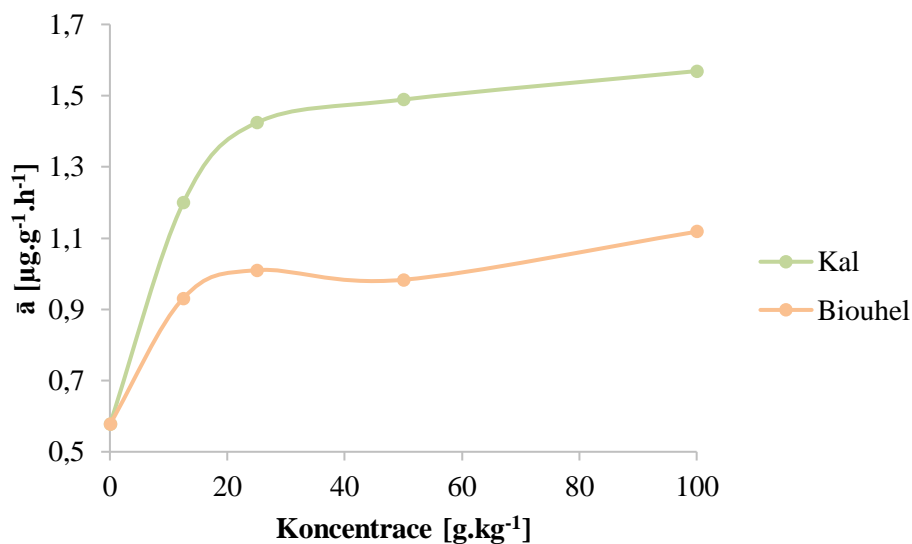
Tabulka 29: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek kal

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	82,52		0,577
	1		0,362	
	2		0,687	
	3		0,683	
12,5	blank	85,66		1,199
	1		1,252	
	2		1,431	
	3		1,199	
25	blank	85,27		1,424
	1		1,424	
	2		1,455	
	3		1,392	
50	blank	85,55		1,489
	1		1,517	
	2		1,495	
	3		1,454	
100	blank	85,40		1,569
	1		1,424	
	2		1,597	
	3		1,685	
čistý vzorek	blank	92,65		0,482
	1		0,557	
	2		0,552	
	3		0,337	

Zatímco u vzorku kalu se aktivita dehydrogenázy s nárůstem množství přidaného vzorku zvyšovala, v případě biouhlu tento trend pozorován nebyl, přestože samotný biouhel měl relativně vysokou hodnotu DHA (Tabulka 30). To může být následkem záchyty enzymu v substrátu biouhlu, což zmiňuje i studie Teutscherové [24]. Přes nepravidelný průběh dochází k pozvolnému nárůstu DHA a bylo by určitě zajímavé, jak by se DHA vyvíjela ve vyšších koncentracích vzorku. *Graf 13* zobrazuje porovnání výsledků obou vzorků.

Tabulka 30: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek biouhel

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	82,52		0,577
	1		0,362	
	2		0,687	
	3		0,683	
12,5	blank	86,29		0,931
	1		0,908	
	2		1,091	
	3		0,931	
25	blank	86,11		1,010
	1		1,123	
	2		1,074	
	3		0,834	
50	blank	86,28		0,983
	1		0,904	
	2		0,990	
	3		1,055	
100	blank	86,41		1,118
	1		1,024	
	2		1,183	
	3		1,145	
čistý vzorek	blank	96,59		2,118
	1		1,495	
	2		2,554	
	3		2,305	



Graf 13: Graf závislosti aktivity dehydrogenázy na koncentraci vzorku kalu a biouhlu

Vzorek ze skládky H navyšoval aktivitu DHA původní půdy (Tabulka 31). Vzhledem ke kyprosti půdy a obsahu biologicky rozložitelného odpadu byl tento fakt předpokládán. Některé studie [44] [46] zmiňují, že aktivitu dehydrogenázy může pozitivně ovlivnit aplikace zeleného hnojiva, hnoje nebo přítomnost vegetace. V tomto případě nejspíš bioodpad navršený na skládku přispěl ke zvýšení aktivity mikroorganismů a tím i k podpoře rozkladu škodlivin. Přídavek vzorku rovněž zvyšoval obsah sušiny. DHA byla v čistém vzorku nejvyšší v porovnání s ostatními testovanými koncentracemi. Lze předpokládat, že po ovlhčení by se její hodnota ještě zvýšila.

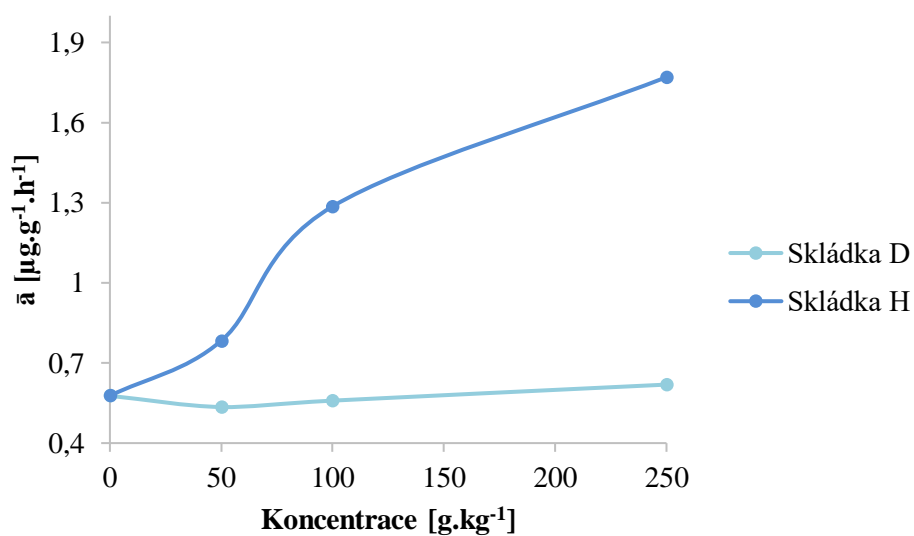
Tabulka 31: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek skládka H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	82,52		0,577
	1		0,362	
	2		0,687	
	3		0,683	
50	blank	84,39		0,783
	1		0,792	
	2		1,077	
	3		0,783	
100	blank	84,92		1,286
	1		1,266	
	2		1,344	
	3		1,248	
250	blank	87,40		1,770
	1		1,789	
	2		1,762	
	3		1,758	
čistý vzorek	blank	97,00		3,723
	1		3,514	
	2		3,735	
	3		3,918	

U vzorku ze skládky D došlo k počátečnímu poklesu aktivity DHA (Tabulka 32). Při vyšších koncentracích aktivita DHA opět rostla. Zajímavé bylo, že rovněž docházelo k nárůstu aktivity DHA se zvyšujícím se podílem vzorku, stejně jako u vzorku ze skládky D. Také v tomto případě byla aktivita DHA čistého vzorku v porovnání s ostatními vzorky vyšší. *Graf 14* zobrazuje porovnání výsledků testů obou skládek H a D.

Tabulka 32: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek dolní skládky

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	82,52		0,577
	1		0,362	
	2		0,687	
	3		0,683	
50	blank	85,33		0,535
	1		0,615	
	2		0,846	
	3		0,535	
100	blank	86,22		0,559
	1		0,624	
	2		0,595	
	3		0,459	
250	blank	88,27		0,619
	1		0,723	
	2		0,597	
	3		0,538	
čistý vzorek	blank	98,05		1,137
	1		1,481	
	2		1,358	
	3		0,571	

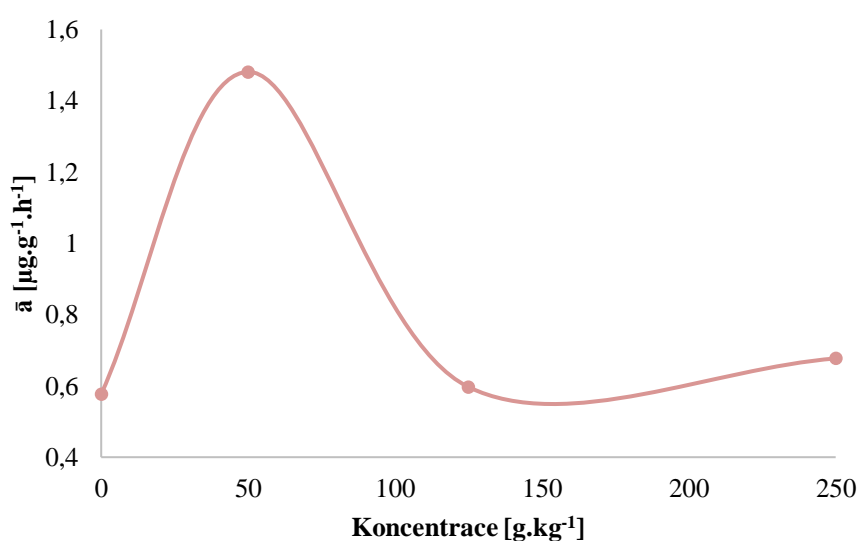


Graf 14: Graf závislosti aktivity dehydrogenázy na koncentraci vzorků ze skládky H a D

Vzorek sedimentu vykazoval při testech DHA nejhorší výsledky ze všech vzorků testovaných matric. Nejmenší koncentrace vzorku sice zvýšila DHA, ale poté došlo k výraznému poklesu, zejména v koncentraci 125 g.kg⁻¹. Čistý vzorek sedimentu měl nejnižší hodnotu aktivity DHA ze všech testovaných vzorků i jejich směsí (Tabulka 33, Graf 15). Z hlediska vlivu na aktivitu dehydrogenázy lze vzorek sedimentu považovat za nejméně vhodný.

Tabulka 33: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	82,52		0,577
	1		0,362	
	2		0,687	
	3		0,683	
62,5	blank	86,39		1,481
	1		0,722	
	2		1,025	
	3		1,481	
125	blank	87,20		0,597
	1		0,556	
	2		0,568	
	3		0,665	
250	blank	89,21		0,677
	1		0,642	
	2		0,768	
	3		0,621	
čistý vzorek	blank	98,42		0,211
	1		0,167	
	2		0,261	
	3		0,204	



Graf 15: Graf závislosti aktivity dehydrogenázy na koncentraci vzorku sedimentu

Při stanovení aktivity DHA u vybraných vzorků bylo zjištěno, že vzorek z vinice (č. 1) má největší hodnotu DHA ze všech směsí i vzorků (Tabulka 34). Oproti tomu vzorek č. 3 (kruhový objezd) měl aktivitu DHA výrazně nižší. Obsahoval hodně kamínků, šterku a pevných částic, což patrně kromě případné kontaminace, také přispělo k výrazným rozdílům ve stanovených aktivitách příslušných vzorků. Vzorek od přejezdu (č. 4) navzdory očekávání nevykazoval výrazně nízké aktivity DHA. Je zřejmé, že v důsledku elektrifikace této konkrétní tratě došlo k omezení dopravy lokomotiv s dieslovým motorem, což může být příčinou toho, že aktivita DHA není v porovnání se vzorkem odebraným u kruhového objezdu tak nízká.

Tabulka 34: Výsledky aktivity DHA pro vybrané vzorky

Číslo vzorku	Opakování	Sušina [%]	a [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	\bar{a} [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]
1	blank	79,08		6,925
	1		6,250	
	2		7,491	
	3		7,033	
3	blank	90,47		0,307
	1		1,495	
	2		0,808	
	3		0,307	
4	blank	80,72		2,661
	1		2,101	
	2		2,613	
	3		3,268	

Celkové výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy jsou uvedeny v příloze 7 - Tabulka 68, Tabulka 69, Tabulka 70, Tabulka 71, Tabulka 72 a Tabulka 73.

3.6 Testy na organismu *Eisenia fetida*

3.6.1 Test únikového chování na žížalách

Test únikového chování žížal byl aplikován na všechny vzorky v předem určených koncentracích. Pokud byl NR vyšší než 80 %, byla koncentrace vzorku brána jako toxická.

U vzorku kalu bylo pozorováno, že s rostoucí koncentrací rostla únikovost (NR) žížal. V koncentraci 5 a 10 % (tedy 50 a 100 g.kg⁻¹) byla dokonce míra únikovosti vyšší než 80 % (Tabulka 35). Kromě nejnižší koncentrace preferovaly žížaly vždy lepší prostředí umělé půdy (kontrola). Také bylo pozorováno, že po uplynutí testu v koncentraci 5 a 10 % (50 a 100 g.kg⁻¹) byla na povrchu půdy znatelná vrstva plísňe. V tabulce je uveden průměrný počet žížal v kontrole (K), průměrný počet žížal ve vzorku (V) a míra únikovosti NR.

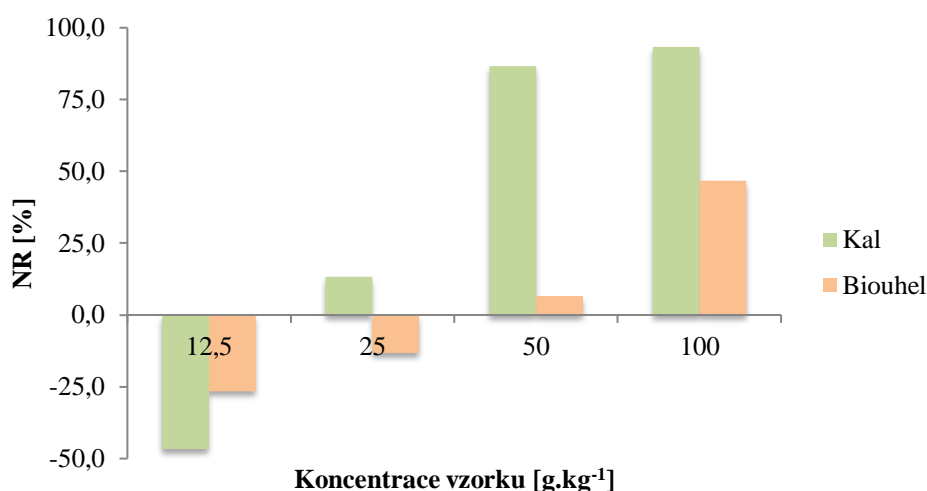
Tabulka 35: Výsledky testu únikového chování žížal – vzorek kalu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	12,5	25	50	100
K	2,7	5,7	9,3	9,7
V	7,3	4,3	0,7	0,3
NR (%)	-46,7	13,3	86,7	93,3

V případě vzorku biouhlu byl trend podobný, také docházelo k růstu míry únikovosti, avšak pro žádný poměr umělé půdy ke vzorku nebyla míra únikovosti vyšší než 80 % (Tabulka 36). Také v porovnání s kalem nedocházelo ani ve vyšších koncentracích k tvorbě plísňe, což podporuje předpoklad, že i v případě nízkoteplotní pyrolýzy dochází k eliminaci látek a organismů, které by mohly negativně ovlivnit vlastnosti vzorku a po aplikaci na půdu její kvalitu. Přesto však docházelo ke kladné míře únikovosti (vyšší koncentrace vzorku 50 a 100 g.kg⁻¹) V porovnání se vzorkem kalu má vzorek biouhlu lepší výsledky (Graf 16).

Tabulka 36: Výsledky testu únikového chování žížal – vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	12,5	25	50	100
K	3,7	4,3	5,3	7,3
V	6,3	5,7	4,7	2,7
NR (%)	-26,7	-13,3	6,7	46,7



Graf 16: Grafické porovnání únikového chování žížal pro vzorky kalu a biouhlu

Vzorky ze skládky byly také podrobeny testu únikového chování žížal. Protože půda z ekologicky obhospodařované zahrady (Z) byla odebrána ze stejné lokality a hodnoty pH se významně nelišily, byla použita v testech únikovosti jako půda kontrolní (na místo půdy umělé). Tento postup je normou povolen. Výsledky potvrdily odhad, že vzorek ze skládky D je pro žížaly méně vhodným prostředím než vzorek ze skládky H. Zatímco vzorek ze skládky H byl žížalami dokonce preferován, u druhého vzorku došlo k únikovosti, i když výrazně nižší, než bylo předpokládáno (Tabulka 37). Vzorek skládky H žížalám zřejmě vyhovoval, protože v tomto místě bylo velké množství biologicky rozložitelného odpadu a půda byla znatelně tmavší a kypřejší než půda ze zahrady. V dalších testech byla jako kontrolní půda již použita půda umělá.

Tabulka 37: Výsledky testu únikového chování žížal – vzorek skládky

Vzorek	H	D
K	2,7	6,0
V	7,3	4,0
NR (%)	-46,7	20,0
Hodnota pH	7,14	7,08

U vzorku sedimentů bylo pozorováno, že v koncentracích 62,5 a 250 g.kg⁻¹ docházelo ke kladné míře únikovosti (Tabulka 38). Pouze koncentrace 125 g.kg⁻¹ byla žížalami preferována. Koncentrace nebyla pro žížaly nepříznivá a zároveň poskytovala dostatek živiny.

Tabulka 38: Výsledky testu únikového chování žížal – vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	62,5	125	250
K	6,0	4,7	7,3
V	4,0	5,3	2,7
NR (%)	20,0	-6,7	46,7
Hodnota pH	6,03	6,60	7,09

3.6.2 Test akutní toxicity na žížalách

Při výpočtech inhibice hmotnosti žížal byl při testech akutní i chronické toxicity použit stejný postup. Jako počáteční hmotnost byla brána hmotnost testovacích jedinců nasazených před započítáním testu do určené koncentrace. Kontrola byla brána v obou případech pro hodnocení platnosti testu a správného postupu práce.

Vzorek kalu nezpůsobil po uplynutí 7 ani 14 dnů úmrtí žížal. Mortalita (M) byla nulová. Na změně hmotnosti (I) se projevil kladný vliv kalu. Žížaly zvyšovaly svoji hmotnost přímo úměrně s rostoucí koncentrací vzorku (Tabulka 39). Jelikož v akutním testu nejsou žížaly krmeny jiným zdrojem potravy, představoval kal pravděpodobně vhodný zdroj potravy. Ani v jedné koncentraci nedošlo k úbytku hmotnosti. Vypočtená hodnota inhibice hmotnosti byla záporná.

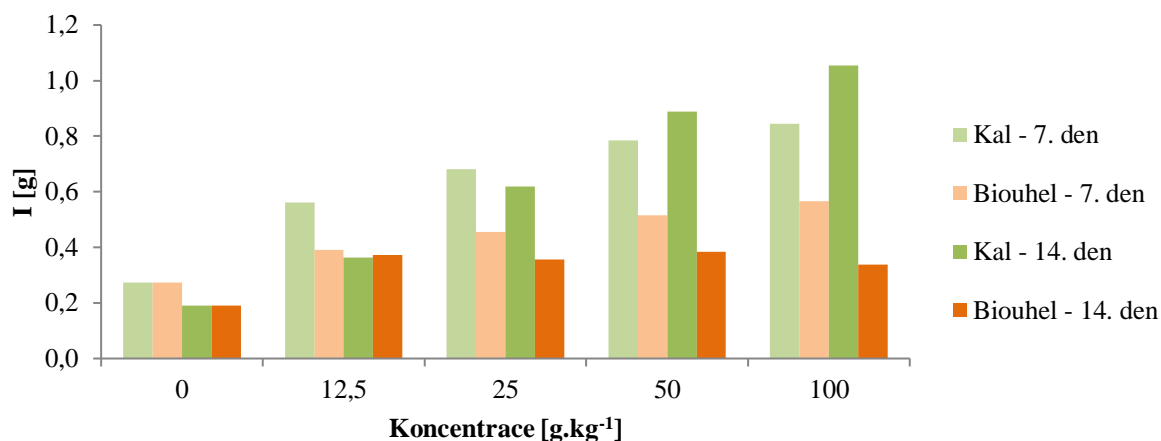
Tabulka 39: Výsledky testu akutní toxicity – kal

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₇	I ₇ [g]	I ₇ [%]	M ₁₄	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0	0	0,273	-10,5	0	0,191	-7,4
12,5	0	0,561	-24,7	0	0,364	-16,0
25	0	0,682	-36,7	0	0,618	-33,3
50	0	0,784	-39,9	0	0,889	-45,2
100	0	0,845	-40,6	0	1,054	-50,6

U vzorku biouhlu byl trend obdobný, i když nedocházelo k tak velkému nárůstu hmotnosti jako v předchozím případě u vzorku kalu. Ve všech koncentracích však nedošlo k ztrátě na hmotnosti a hodnota vypočtené inhibice byla tudíž záporná (Tabulka 40). *Graf 17* zobrazuje porovnání výsledků obou vzorků po 7 dnech a po 14 dnech.

Tabulka 40: Výsledky testu akutní toxicity – biouhel

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₇	I ₇ [g]	I ₇ [%]	M ₁₄	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0	0	0,273	-10,5	0	0,191	-7,4
12,5	0	0,390	-19,6	0	0,372	-18,7
25	0	0,455	-25,5	0	0,356	-19,9
50	0	0,515	-27,1	0	0,384	-20,2
100	0	0,567	-28,7	0	0,338	-17,1



Graf 17: Grafické porovnání výsledků testu akutní toxicity – kal a biouhel

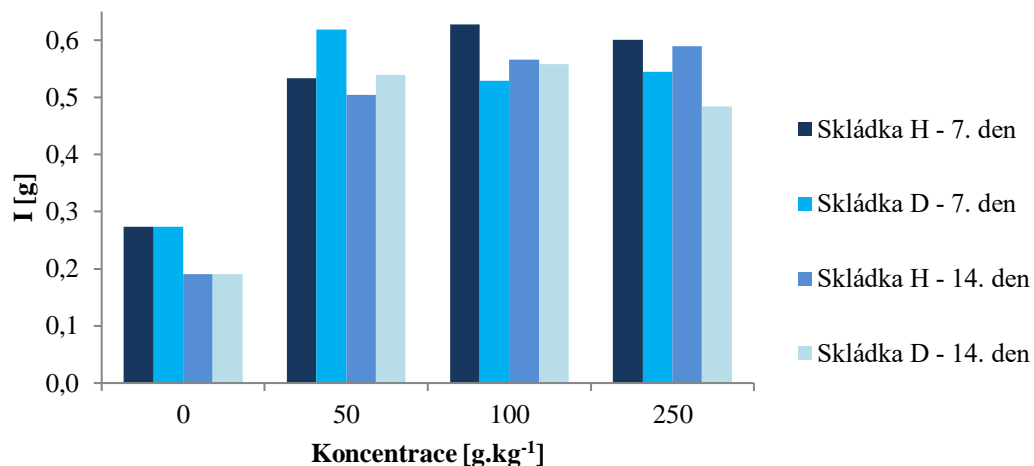
Vzorky ze skládky opět nezpůsobovaly úbytek hmotnosti. Mortalita byla v obou případech nulová. Žížaly pravděpodobně také přijímaly živiny ze vzorku. U vzorku skládky H byl po 7 dnech zaznamenán ve všech koncentracích stejný vliv na hmotnost testovacích jedinců. Poskytoval lepší výsledky než v kontrole (Tabulka 41). U všech testovaných koncentrací byl pozorován kladný vliv na hmotnosti žížal ve srovnání se skupinou kontrolních jedinců, kde přírůstky hmotnosti byly nižší. Pozitivní vliv byl zaznamenán i u vzorku ze skládky D (Tabulka 42). Graf 18 poskytuje porovnání výsledků testů akutní toxicity pro oba vzorky ze skládky.

Tabulka 41: Výsledky testu akutní toxicity – skládka H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₇	I ₇ [g]	I ₇ [%]	M ₁₄	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0	0	0,273	-10,5	0	0,191	-7,4
50	0	0,533	-31,6	0	0,504	-29,9
100	0	0,628	-31,5	0	0,566	-28,4
250	0	0,601	-31,1	0	0,590	-30,6

Tabulka 42: Výsledky testu akutní toxicity – skládka D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₇	I ₇ [g]	I ₇ [%]	M ₁₄	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0	0	0,273	-10,5	0	0,191	-7,4
50	0	0,619	-28,3	0	0,539	-24,6
100	0	0,529	-25,6	0	0,558	-27,0
250	0	0,545	-30,4	0	0,484	-27,0

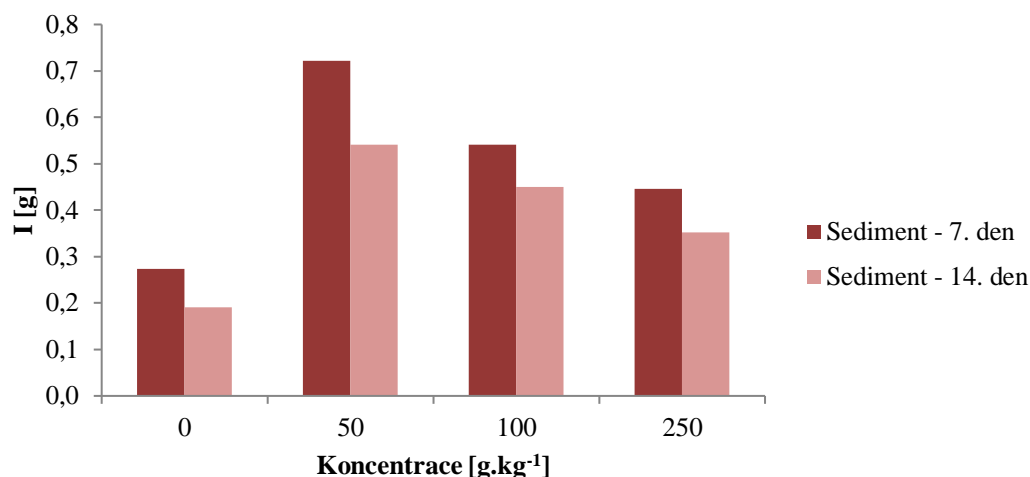


Graf 18: Grafické porovnání výsledků testu akutní toxicity – skládka H a D

Vzorek sedimentu měl ve všech koncentracích v porovnání s kontrolou také kladný vliv na změnu hmotnosti, ale u tohoto vzorku je patrné, že s rostoucí koncentrací sedimentu byl přírůstek hmotnosti nižší. Mortalita byla opět nulová ve všech koncentracích (Tabulka 43). Graf 19 zobrazuje výsledky testů akutní toxicity pro vzorek sedimentu.

Tabulka 43: Výsledky testu akutní toxicity - sediment

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₇	I ₇ [g]	I ₇ [%]	M ₁₄	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0	0	0,273	-10,5	0	0,191	-7,4
50	0	0,722	-44,0	0	0,541	-33,0
100	0	0,541	-35,2	0	0,450	-29,3
250	0	0,446	-31,7	0	0,352	-25,0



Graf 19: Grafické znázornění výsledků testu akutní toxicity – sediment

Podrobné výsledky testu akutní toxicity jsou uvedeny v příloze 7 - Tabulka 58, Tabulka 59, Tabulka 60, Tabulka 61, Tabulka 62.

3.6.3 Test chronické toxicity a reprodukčního chování na žížalách

Test chronické toxicity trval 28 dní. Po tuto dobu i nadále v průběhu testu reprodukční toxicity (celkem 56 dní) byly žížaly přikrmovány namletým hnojem a substrát byl minimálně dvakrát do týdne ovlhčen destilovanou vodou, aby byl doplněn úbytek vody.

Do testu mají být nasazeny žížaly s hmotností 200 až 600 gramů a s vyvinutým opaskem viz kapitola 3.3.2.4. Vzhledem k vysoké spotřebě žížal a nedostatku žížal s plně vyvinutým opaskem byly do testu nasazovány i žížaly, u kterých byl vývin opasku již patrný.

Výsledky testu reprodukční toxicity jsou tedy pouze orientační. Ve výsledcích je udávána jako průměr počtu uhynulých jedinců ze všech opakování na danou koncentraci. V tabulkách jsou uvedeny sledované parametry vždy ve zkratkách (mortalita M, počet kokonů K, inhibice hmotnosti I a počet juvenilů J).

Výsledky chronické toxicity vzorku kalu (Tabulka 44) ukázaly, že kromě koncentrace 100 g.kg⁻¹ nebyl pozorován větší úhyn organismů. V této koncentraci nebyl přírůstek hmotnosti testovacích organismů v procentech v porovnání s nižšími koncentracemi záporný. Počet kokonů v této koncentraci byl nulový. Po uplynutí 56 dnů testu reprodukční toxicity je patrné, že nejvyšší koncentrace 100 g.kg⁻¹ způsobila inhibici hmotnosti žížal, nulovou reprodukci a mortalitu (průměrná dva jedinci na opakování). Mortalita byla pozorována také v koncentraci 50 g.kg⁻¹, kde dosáhla hodnoty 0,3 uhynulého jedince na opakování. V tomto případě je předpokládáno, že se jednalo spíše o přirozenou mortalitu, nikoliv o vliv testované matrice. V případě nejnižší testované koncentrace můžeme konstatovat, že ačkoliv docházelo k úbytku hmotnosti testovacích organismů, v porovnání s kontrolou vyšel vzorek na počet juvenilů v koncentraci 12,5 g.kg⁻¹ dokonce lépe.

Tabulka 44: Výsledky testu chronické a reprodukční toxicity pro vzorek kalu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₂₈	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	K	M ₅₆	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	J
0	0	0,445	-17,1	1	0	0,882	-34,0	12,7
12,5	0	0,431	-19,0	4	0	0,238	-10,5	14
25	0	0,581	-31,3	4,7	0	0,407	-21,9	6,7
50	0	0,834	-42,4	2,7	0,3	0,526	-26,8	0,3
100	0	0,652	-31,3	0	2	-0,784	37,6	0

V rámci testování vzorku biouhlu bylo pozorováno, že v porovnání se vzorkem kalu byly výsledky lepší. K úhynu došlo jen v nejvyšší koncentraci (chronická i reprodukční toxicita). Počet uhynulých jedinců byl v porovnání s kalem nižší (Tabulka 45). Sice ve dvou nejvyšších koncentracích nebyly nalezeni žádní juvenilní jedinci, lze ale i tak konstatovat, že biouhel vyšel v tomto testu lépe než kal. Tento fakt potvrzuje studie Gongga [74], která zmiňuje pozitivní vliv biouhlu (i když vyrobeného z bambusu a ne z čistírenského kalu) na reprodukci žížal.

Tabulka 45: Výsledky testu chronické a reprodukční toxicity pro vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₂₈	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	K	M ₅₆	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	J
0	0	0,445	-17,1	1	0	0,882	-34,0	12,7
12,5	0,3	0,207	-10,4	10,3	0	0,025	-1,3	16
25	0	0,818	-45,8	9,7	0	0,379	-21,2	25
50	0	0,545	-28,7	3,3	0	0,109	-5,8	0
100	0,3	0,348	-17,6	1,7	1	-0,276	14,0	0

Vzorky ze skládky měly v testu chronické toxicity pozitivní vliv na změnu hmotnosti. K malému úhynu došlo u vzorku ze skládky H pouze v koncentraci 100 g.kg⁻¹ a u vzorku ze skládky D pak v nejvyšší koncentraci. Po uplynutí 56 dnů byl hodnocen počet juvenilů a mortalita. Překvapením bylo, že z tohoto testu vyšel ve výsledku lépe vzorek ze skládky D, který v jiných ekotoxikologických testech a testech enzymatické aktivity poskytoval vždy horší výsledky než vzorek ze skládky H. Koncentrace určená k aplikaci na zemědělskou půdu, tedy 100 g.kg⁻¹ neposkytovala u vzorku ze skládky H moc dobré výsledky. Oproti tomu skládka D v této koncentraci nezpůsobila úhyn žížal, ale také nebyla pozorována kladná reprodukce. Tabulka 46 uvádí výsledky vzorku ze skládky H. Tabulka 47 uvádí výsledky vzorku ze skládky D.

Tabulka 46: Výsledky testu chronické a reprodukční toxicity pro vzorek skládky H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₂₈	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	K	M ₅₆	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	J
0	0	0,445	-17,1	1	0	0,882	-34,0	12,7
50	0	0,863	-51,2	0,7	0	0,475	-28,2	1,7
100	0,3	0,585	-29,4	1	0,3	0,149	-7,5	1,7
250	0	0,690	-35,7	0,3	0,7	-0,079	4,1	0

Tabulka 47: Výsledky testu chronické a reprodukční toxicity pro vzorek skládky D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₂₈	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	K	M ₅₆	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	J
0	0	0,445	-17,1	1	0	0,882	-34,0	12,7
50	0	0,659	-30,1	0,7	0	0,297	-13,6	2
100	0	0,665	-32,2	0	0	0,352	-17,0	0
250	0,3	0,393	-21,9	0	0,7	-0,122	6,8	0

Test na sedimentu byl nasazen jako poslední. Musel být ukončen předčasně po uplynutí 35 dnů testu. Po ukončení testu bylo pozorováno, že dochází k nárůstu hmotnosti ve všech koncentracích (Tabulka 48). Také byly nalezeny kokony. Je tedy možné, že by došlo ke kladné reprodukci, kdyby byl test ukončen v řádném termínu. Koncentrace 250 g.kg⁻¹ určená k aplikaci na pole nakonec nevykazovala špatné výsledky, ale rozhodující by vzhledem k ne moc pozitivním výsledkům ostatních testů byly výsledky reprodukčního testu.

Tabulka 48: Výsledky testu chronické a reprodukční toxicity pro vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	M ₂₈	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	K	M ₃₅	I ₃₅ [g]	I ₃₅ [%]	J
0	0	0,445	-17,1	1	0	0,882	-34,0	12,7
62,5	0	0,651	-39,7	3,3	0,7	0,701	-42,7	0
125	0	0,842	-54,8	3,3	0	0,929	-60,5	0
250	0,3	0,651	-46,3	0,3	0	0,821	-58,4	0

Podrobné výsledky testu chronické toxicity jsou uvedeny v příloze 7 - Tabulka 63, Tabulka 64, Tabulka 65, Tabulka 66 a Tabulka 67.

3.7 Testy na organismu *Folsomia candida*

3.7.1 Test únikového chování na chvostokocích

Testy únikového chování na organismu *F. candida* byly porovnány s výsledky testu získaných na *E. fetida*. V případě vzorku kalu byly výsledky podobné. Koncentrace, kdy docházelo k více jak 50% únikovosti, jsou 50 a 100 %, tedy 50 a 100 g.kg⁻¹ (Tabulka 49). U chvostokoků je pozorovatelný nárůst míry únikovosti s rostoucí koncentrací (*Graf 20*). V tabulce je vždy uveden průměrný počet chvostokoků v kontrole (K), průměrný počet chvostokoků ve vzorku (V) a míra únikovosti NR.

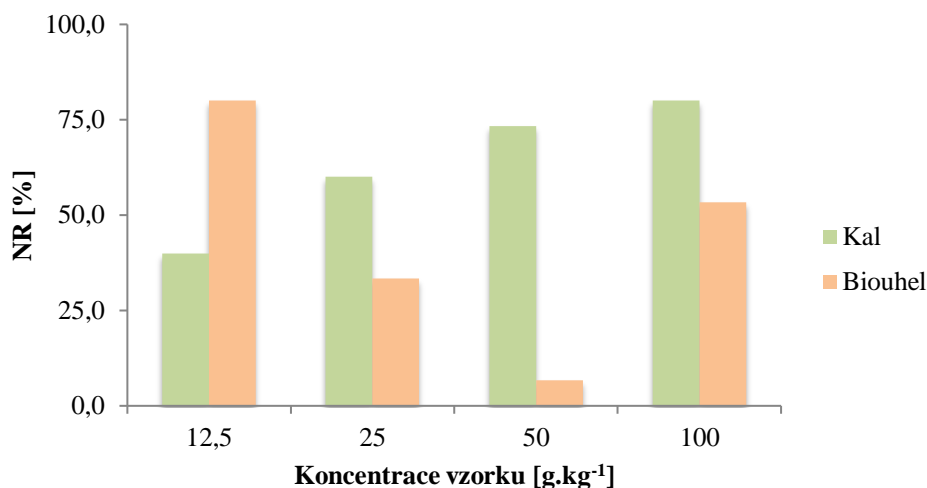
Tabulka 49: Výsledky testu únikového chování na chvostokocích – vzorek kal

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	12,5	25	50	100
K	7,0	8,0	8,7	9,0
V	3,0	2,0	1,3	1,0
NR (%)	40,0	60,0	73,3	80,0
Hodnota pH	5,66	5,74	5,73	5,62

V případě biouhlu došlo k únikovosti nad 50 % v koncentraci 12,5 a 100 g.kg⁻¹ (Tabulka 50, *Graf 20*). V porovnání se žížalami lze konstatovat, že chvostokoci byli k této matrici citlivější, protože u žížal nedošlo v žádné koncentraci k tak vysoké míře únikovosti.

Tabulka 50: Výsledky testu únikového chování na chvostoskocích – vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	12,5	25	50	100
K	9,0	6,7	5,3	7,7
V	1,0	3,3	4,7	2,3
NR (%)	80,0	33,3	6,7	53,3
Hodnota pH	5,54	5,6	5,68	5,72



Graf 20: Výsledky testu únikového chování chvostoskoků – vzorek kalu a biouhlu

Vzorek skládky H nevykazoval vysokou míru únikovosti (Tabulka 51, Graf 21). Naopak v koncentraci 100 g.kg⁻¹ došlo k záporné míře únikovosti. Vzorek s vyšším podílem matrice byl organismy preferován.

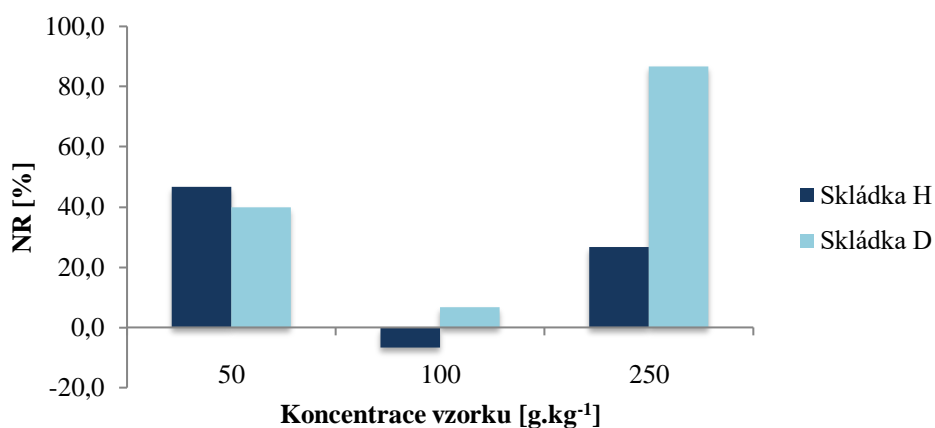
Tabulka 51: Výsledky testu únikového chování na chvostoskocích – vzorek skládka H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	50	100	250
K	7,3	4,7	6,3
V	2,7	5,3	3,7
NR (%)	46,7	-6,7	26,7
Hodnota pH	5,78	5,8	5,88

U vzorku ze skládky D byl pozorován obdobný trend jako u vzorku ze skládky H. Nejvyšší míra únikovosti byla pozorována u koncentrace 250 g.kg⁻¹. Naopak u koncentrace 100 g.kg⁻¹ byl vliv vzorku na únik organismů nejmenší (Tabulka 52, Graf 21). Rovněž u žižal docházelo k únikovosti z testované matrice, ale míra únikovosti nepřesáhla hodnotu 50 %.

Tabulka 52: Výsledky testu únikového chování na chvostoskocích – vzorek skládka D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	50	100	250
K	7,0	5,3	9,3
V	3,0	4,7	0,7
NR (%)	40,0	6,7	86,7
Hodnota pH	5,63	5,9	6,13

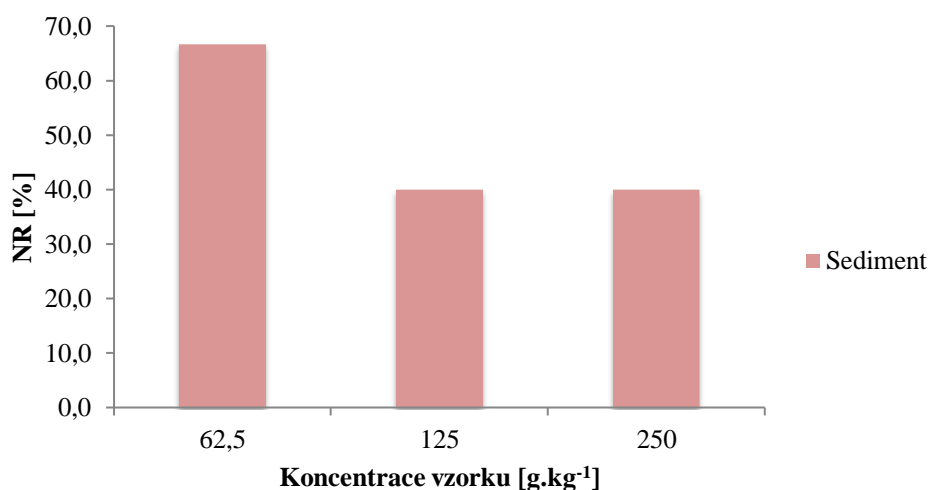


Graf 21: Výsledky testu únikového chování chvostoskoků – vzorek skládka H a D

Vzorek sedimentu vykazoval nejhorší výsledek v nejnižší zvolené koncentraci (Tabulka 53, Graf 22), tedy 62,5 g.kg⁻¹. Zatímco u žížal nedošlo v žádné koncentraci k překročení ani 50% míry únikovosti, zde byla tato hranice překročena právě u nejmenší koncentrace.

Tabulka 53: Výsledky testu únikového chování na chvostoskocích – vzorek sediment

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	62,5	125	250
K	8,3	7,0	7,0
V	1,7	3,0	3,0
NR (%)	66,7	40,0	40,0
Hodnota pH	5,54	5,6	5,68



Graf 22: Výsledky testu únikového chování chvostoskoků – vzorek sedimentu

Výsledky obou testů dokazují, že každý organismus reaguje jinak na zvolené koncentrace vzorku. Zároveň ne vždy musí s rostoucí koncentrací docházet k růstu negativního vlivu na organismus. Nízké koncentrace vzorku mohou být v některých případech horší než ty vyšší.

3.8 Test na salátu *Lactuca sativa*

Na základě měření délky kořínků salátu *Lactuca sativa* byla vyhodnocena procentuální inhibice růstu pro vzorky kalu, biouhlu, obou vzorků ze skládky, vzorku ze zahrady a vzorku sedimentu. Kořínky dosahovaly délky nad 15 mm v kontrole.

U vzorku kalu bylo pozorováno, že ve dvou nejnižších koncentracích byla hodnota inhibice záporná, tedy vlivem přídatku kalu docházelo ke stimulaci růstu. V dalších dvou koncentracích už je výsledek jiný. Koncentrace 5 a 10 % (50 a 100 g.kg⁻¹) působí inhibičně, přičemž koncentrace 100 g.kg⁻¹ způsobuje více jak 50 % inhibici růstu (72 %). Obecně docházelo se zvyšující se koncentrací kalu ke zvýšení inhibice růstu (Tabulka 54).

Tabulka 54: Výsledky testu inhibice pro vzorek kalu

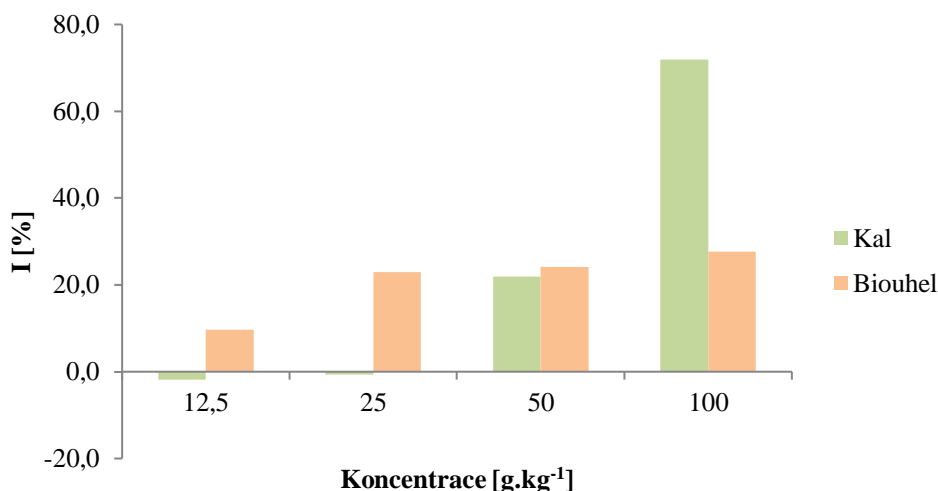
Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	12,5	25	50	100
L [mm]	16,4	16,7	16,5	12,8	4,6
I [%]	0,0	-1,8	-0,6	22,0	72,0

Vzorek biouhlu vykazoval podobné výsledky. Podobně jako při dalších ekotoxikologických testech bylo pozorováno, že biouhel je v nejvyšší koncentraci méně toxický pro vybrané organismy než kal. Při žádné koncentraci nedošlo k inhibici růstu nad hodnotu 50 %. Oproti vzorku kalu ale nedošlo ani ke stimulaci růstu kořínku v nejnižších koncentracích (Tabulka 55).

Tabulka 55: Výsledky testu inhibice pro vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	12,5	25	50	100
L [mm]	16,6	15	12,8	12,6	12
I [%]	0,0	9,6	22,9	24,1	27,7

Při porovnání výsledku obou testů je patrné, že biouhel je v testech inhibice růstu kořene na rostlině *L. sativa* více toxický v koncentracích 12,5; 25 a 50 g.kg⁻¹ než vzorek kalu (Graf 23). V nejvyšší koncentraci vzorek kalu z hlediska toxicity významně převyšoval vzorek biouhlu.



Graf 23: Grafické porovnání inhibice růstu pro vzorky kalu a biouhlu

U vzorků ze skládky a ze zahrady bylo prokázáno, že půda z ekologicky obhospodařované zahrady má na testovací organismus pozitivní vliv a stimuluje růst kořínků. Méně stimulačně působí vzorek ze skládky H, avšak v porovnání s kontrolou nedochází k inhibici růstu. Nejhorší výsledek poskytoval vzorek ze skládky D (Tabulka 56).

Všechna opakování (tři opakování) byla nasazena na 100% koncentrace vzorku (tedy vzorky bez přídavku umělé půdy). Tento postup byl aplikován záměrně, testy *L. sativa* byly prováděny nejdříve ze všech testů a měly poskytnout orientační informace o povaze vzorku před nasazením chronických testů.

Tabulka 56: Výsledky testu inhibice pro vzorek ze zahrady (Z) a skládky (H, D)

Typ vzorku	0	Z	H	D
L [mm]	16,6	19,7	17,4	11,2
I [%]	0,0	-18,7	-4,8	32,5

V případě testu sedimentu docházelo k navýšení inhibice růstu kořínků s rostoucí koncentrací (Tabulka 57). V žádné koncentraci nedošlo k více jak 50 % inhibici. V porovnání s testem únikového chování, kdy koncentrace 125 g.kg⁻¹ nevedla k únikovému chování žížal, měla v testu na semenech salátu inhibiční účinek.

Tabulka 57: Výsledky testu inhibice pro vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	0	62,5	125	250
L [mm]	16,6	14,6	12,0	11,4
I [%]	0,0	12,0	27,7	31,3

4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo posouzení možnosti využití testu aktivity dehydrogenázy jako vhodného ukazatele při hodnocení kvality půdy po přídavicích různých typů matric. Test byl nasazen v kombinaci s ekotoxikologickými testy. K tomuto účelu byly vybrány vzorky kalu, produktu jeho zpracování – biouhlu, dva vzorky ze skládky a vzorek sedimentu.

Pro doplnění testu aktivity dehydrogenázy byly vybrány testy na destruentech (testy únikového chování, test akutní, chronické a reprodukční toxicity) a test inhibice růstu kořene. Při stanovení maximální vodní kapacity bylo zjištěno, že přídavky vzorku většinou zvyšovaly maximální vodní kapacitu WHC_{max} . Sušina po přídavku vzorku vždy rostla.

Ze stanovení aktivity dehydrogenázy vyplynulo, že po přidání vzorku do půdy byla enzymová aktivita zpravidla vyšší než u původní půdy. Jedinou výjimkou byl vzorek sedimentu, který aktivitu dehydrogenázy snižoval. Dále bylo zjištěno, že vzorky, které samy o sobě nemusí být bohaté na mikrobiální oživení, mohou po smísení s půdou tvořit vhodný substrát a tím navýšit aktivitu DHA. Rovněž po ovlhčení vzorku docházelo k oživení mikrobiální kultury a k nárůstu DHA. V porovnání s ekotoxikologií je tato metodika méně náročná na čas i prostor.

Ekotoxikologické testy prokázaly, že různé organismy reagují odlišně na přídavky vzorků. To potvrzuje fakt, že objektivní hodnocení matric vstupujících do ekosystému by mělo zahrnovat nejenom různé metody analýzy, ale v rámci ekotoxikologie pak využití testů s organismy na různých trofických úrovních. Také z výsledků ekotoxikologických testů vyplynulo, že ne vždy se s rostoucí koncentrací vzorku zvyšuje negativní dopad vzorku (může být zdrojem potravy).

Obecně lze konstatovat, že ze všech vzorků poskytoval nejhorší výsledky sediment. Na základě endpointů všech aplikovaných testů byl vyhodnocen jako nevhodný a po aplikaci na půdu by mohl mít za následek úhyn organismů a zhoršení některých vlastností půdy (například vodní režim půdy). Biouhel jako produkt zpracování kalu vykazuje v hodnocení lepší výsledky než kal samotný. Pouze u stanovení aktivity dehydrogenázy byly výsledky biouhlu individuální. U výsledků vzorků ze skládky nelze učinit jednotný závěr. V podstatě lze říci, že vzorek ze skládky H (vzorek odebraný v horní části) vykazoval nižší ekotoxicitu než vzorek, který byl odebrán dole (skládky D). Skládka se nachází v kopci, takže v dolní části skládky pravděpodobně dochází ke koncentrování škodlivin. Test aktivity dehydrogenázy byl využit i pro hodnocení vzorku půd. Z výsledků vyplynulo, že aktivita DHA půdy z vinice byla větší než u vzorků odebraných u tratě a silnice. Což potvrzuje předpoklad, že u produkčních a vhodně ošetřovaných půd je enzymatická aktivita vysoká. Pokles aktivity DHA v okolí dopravních cest mohl být způsoben následkem kontaminace půdy fungováním dopravy.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX. *Půdoznalství*. Vyd. 3., přeprac. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. ISBN 978-80-7375-445-7.
- [2] VOLTR, Václav. *Hodnocení půdy v podmínkách ochrany životního prostředí*. Praha: Ústav zemědělské ekonomiky a informací, 2011. ISBN 978-80-86671-86-4.
- [3] ŠANTRŮČKOVÁ, Hana, Eva KAŠTOVSKÁ, Jiří BÁRTA, Ladislav MIKO a Karel TAJOVSKÝ. *Ekologie půdy*. Vydání první. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2018. ISBN 978-80-7394-695-1.
- [4] VOPRAVIL, Jan. *Půda a její hodnocení v ČR*. 2. vyd. Praha: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, 2010. ISBN 978-80-87361-05-4.
- [5] BRTNICKÝ, Martin. *Půdoznalství v kostce*. Vydání: první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-283-0.
- [6] ŠARAPATKA, Bořivoj a Jiří URBAN. *Ekologické zemědělství v praxi*. 1. vyd. Šumperk: PRO-BIO, 2006. ISBN 978-80-903583-0-0.
- [7] KALEV, Stefan a Gurpal TOOR. The Composition of Soils and Sediments. *Green Chemistry* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2018, s. 339-357 [cit. 2019-11-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-809270-5.00014-5. ISBN 9780128092705. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128092705000145>
- [8] SHUKLA, Manoj. *Soil physics: an introduction*. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4398-8842-1.
- [9] ŠARAPATKA, Bořivoj. *Pedologie a ochrana půdy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3736-1.
- [10] REJŠEK, Klement a Radim VÁCHA. *Nauka o půdě*. První vydání. Olomouc: Agriprint, s.r.o., 2018. ISBN 978-80-87091-82-1.
- [11] ŠIMEK, Miloslav. *Živá půda*. První vydání. Praha: Academia, 2019. ISBN 978-80-200-2976-8.
- [12] PAVLŮ, Lenka. *Základy pedologie a ochrany půdy*. První vydání. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2019. ISBN 978-80-213-2952-2.
- [13] PLASTER, Edward. *Soil science & management*. 6th ed. Clifton Park: Delmar Cengage Learning, 2014. ISBN 978-0-8400-2438-1.
- [14] ŠARAPATKA, Bořivoj. *Pedologie a ochrana půdy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3736-1.
- [15] PRAX, Alois a Eduard POKORNÝ. *Klasifikace a ochrana půd*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1996. ISBN 80-7157-186-5.
- [16] VOPRAVIL, Jan. *Vzdělávací modul Ochrana životního prostředí v oblasti půdy*. Vyd. 1. Náměšť nad Oslavou: ZERA - Zemědělská a ekologická regionální agentura, 2012. ISBN 978-80-87226-15-5.
- [17] BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Pavel KOTRBA. *Základy biologie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-587-0.

- [18] *Zpráva o životním prostředí České republiky*. Praha: CENIA, česká informační agentura životního prostředí, 2018.
- [19] *PLANETA*. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2004, , 84 s. ISSN 1213-3393. Dostupné také z: <https://www.mzp.cz/web/edice.nsf>
- [20] POKORNÝ, Eduard, Bořivoj ŠARAPATKA a Květuše HEJÁTKOVÁ. *Hodnocení kvality půdy v ekologicky hospodařícím podniku: metodická pomůcka*. Vyd. 1. Náměšť nad Oslavou: ZERA - Zemědělská a ekologická regionální agentura, 2007. ISBN 80-903548-5-8.
- [21] MIKANOVÁ, Olga, Tomáš ŠIMON a Dana CERHANOVÁ. *Hodnocení kvality půdy biologickými metodami: metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. ISBN 978-80-7427-044-4.
- [22] GUANGMING, Liu, Zhang XUECHEN, Wang XIUPING, Shao HONGBO, Yang JINGSONG a Wang XIANGPING. Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [online]. 2017, **237**, 274-279 [cit. 2019-11-13]. DOI: 10.1016/j.agee.2017.01.004. ISSN 01678809. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880917300051>
- [23] POSPÍŠILOVÁ, Lubica, Vítězslav VLČEK, Vítězslav HYBLER, Magdalena HÁBOVÁ a Jiří JANDÁK. *Standardní analytické metody a kritéria hodnocení fyzikálních, agrochemických, biologických a hygienických parametrů půd: Standard analytical methods and evaluation criteria of soil physical, agrochemical, biological, and hygienic parameters : monografie*. Vydání první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2016. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7509-438-4.
- [24] TEUTSCHEROVA, Nikola, Bohdan LOJKA, Jakub HOUŠKA, Alberto MASAGUER, Marta BENITO a Eduardo VAZQUEZ. Application of holm oak biochar alters dynamics of enzymatic and microbial activity in two contrasting Mediterranean soils. *European Journal of Soil Biology* [online]. 2018, **88**, 15-26 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2018.06.002. ISSN 11645563. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S116455631830030X>
- [25] SPEIR, T.W, H.A KETTLES, A PARSHOTAM, P.L SEARLE a L.N.C VLAAR. Simple kinetic approach to determine the toxicity of AS[V] to soil biological properties. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 1999, **31**(5), 705-713 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/S0038-0717(98)00169-2. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071798001692>
- [26] WANG, Ziquan, Xiangping TAN, Guannan LU, Yanju LIU, Ravi NAIDU a Wenxiang HE. Soil properties influence kinetics of soil acid phosphatase in response to arsenic toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **147**, 266-274 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.050. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014765131730547X>
- [27] WANG, Ziquan, Haixia TIAN, Guannan LU, Yiming ZHAO, Rui YANG, Mallavarapu MEGHARAJ a Wenxiang HE. Catalytic efficiency is a better predictor of arsenic

- toxicity to soil alkaline phosphatase. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **148**, 721-728 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.040. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651317307911>
- [28] GHOSH, A.K., P. BHATTACHARYYA a R. PAL. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International* [online]. 2004, **30**(4), 491-499 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/j.envint.2003.10.002. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412003002022>
- [29] BHATTACHARYYA, Pradip, Subhasish TRIPATHY, Kangjoo KIM a Seok-Hwi KIM. Arsenic fractions and enzyme activities in arsenic-contaminated soils by groundwater irrigation in West Bengal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2008, **71**(1), 149-156 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.015. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651307001923>
- [30] DAS, Suwendu, Jiin-Shuh JEAN, Sandeep KAR a Sukalyan CHAKRABORTY. Effect of arsenic contamination on bacterial and fungal biomass and enzyme activities in tropical arsenic-contaminated soils. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2013, **49**(6), 757-765 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1007/s00374-012-0769-z. ISSN 0178-2762. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-012-0769-z>
- [31] LIN, Lina, Zhongyang LI, Xuewei LIU, Weiwen QIU a Zhengguo SONG. Effects of Fe-Mn modified biochar composite treatment on the properties of As-polluted paddy soil. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **244**, 600-607 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.011. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749118321286>
- [32] WANG, Ziquan, Haixia TIAN, Xiangping TAN, Fang WANG, Hanzhong JIA, Mallavarapu MEGHARAJ a Wenxiang HE. Long-term As contamination alters soil enzyme functional stability in response to additional heat disturbance. *Chemosphere* [online]. 2019, **229**, 471-480 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.055. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653519309518>
- [33] GRIFFITHS, B., K. RITZ, R. BARDGETT et al. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* [online]. 2000, **90**(2), 279-294 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2000.900208.x. ISSN 0030-1299. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0706.2000.900208.x>
- [34] HARTMANN, Martin, Pascal NIKLAUS, Stephan ZIMMERMANN et al. Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *The ISME Journal* [online]. 2014, **8**(1), 226-244 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1038/ismej.2013.141. ISSN 1751-7362. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ismej2013141>
- [35] FRENK, Sammy, Yitzhak HADAR, Dror MINZ a Harold DRAKE. Quality of Irrigation Water Affects Soil Functionality and Bacterial Community Stability in Response to Heat Disturbance. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2018, **84**(4), 02087-17 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1128/AEM.02087-17. ISSN 0099-2240. Dostupné z:

<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02087-17>

- [36] SUN, Qiqi, Rui WANG, Ying WANG, Lanlan DU, Man ZHAO, Xin GAO, Yaxian HU a Shengli GUO. Temperature sensitivity of soil respiration to nitrogen and phosphorous fertilization: Does soil initial fertility matter?. *Geoderma* [online]. 2018, **325**, 172-182 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.04.001. ISSN 00167061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001670611630951X>
- [37] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-330-4.
- [38] *Soil quality - Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)*. 1st ed. Brusel: CEN, 2011.
- [39] RŮŽEK, Lubomír a Karel VOŘÍŠEK. *Pedobiologie a mikrobiologie: vybrané kapitoly*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, 2010. ISBN 9788021321267.
- [40] GARCIA, C., T. HERNANDEZ a F. COSTA. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* [online]. 2008, **28**(1-2), 123-134 [cit. 2019-11-13]. DOI: 10.1080/00103629709369777. ISSN 0010-3624. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00103629709369777>
- [41] ULANOV, Alexander a Jack WIDHOLM. Metabolic profiling to determine the cause of the increased triphenyltetrazolium chloride reduction in mannitol-treated maize callus. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2010, **167**(17), 1423-1431 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.05.007. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161710002324>
- [42] *ChemSpider* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019 [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/>
- [43] *PubChem* [online]. Bethesda, USA: National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2019-11-30]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [44] POSE-JUAN, Eva, Jesús MARÍN-BENITO, María SÁNCHEZ-MARTÍN a M. RODRÍGUEZ-CRUZ. Dissipation of herbicides after repeated application in soils amended with green compost and sewage sludge. *Journal of Environmental Management* [online]. 2018, **223**, 1068-1077 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.026. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479718307783>
- [45] KACZYNSKI, Piotr, Bożena LOZOWICKA, Izabela HRYNKO a Elżbieta WOLEJKO. Behaviour of mesotrione in maize and soil system and its influence on soil dehydrogenase activity. *Science of The Total Environment* [online]. 2016, **571**, 1079-1088 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.100. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716315467>
- [46] FENG, Lijuan, Liqiu ZHANG a Li FENG. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil amended with sewage sludge compost. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2014, **95**, 200-207 [cit. 2019-11-07]. DOI:

- 10.1016/j.ibiod.2014.04.012. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830514001085>
- [47] MONDAL, Surajit, R.D. SINGH, A.K. PATRA a B.S. DWIVEDI. Changes in soil quality in response to short-term application of municipal sewage sludge in a typical haplustept under cowpea-wheat cropping system. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* [online]. 2015, **4**, 37-41 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.enmm.2014.12.001. ISSN 22151532. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215153214000282>
- [48] CHEN, Tingru, Xiaoyan LIU, Xinying ZHANG, Xiao CHEN, Kaiyun TAO a Xiaoxin HU. Effect of alkyl polyglucoside and nitrilotriacetic acid combined application on lead/pyrene bioavailability and dehydrogenase activity in co-contaminated soils. *Chemosphere* [online]. 2016, **154**, 515-520 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.127. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516304519>
- [49] SIGGINS, Alma, Vanessa BURTON, Craig ROSS, Hamish LOWE a Jacqui HORSWELL. Effects of long-term greywater disposal on soil: A case study. *Science of The Total Environment* [online]. 2016, **557-558**, 627-635 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.084. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716305083>
- [50] GARCÍA-DELGADO, C., V. BARBA, J.M. MARÍN-BENITO, J.M. IGUAL, M.J. SÁNCHEZ-MARTÍN a M.S. RODRÍGUEZ-CRUZ. Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community. *Applied Soil Ecology* [online]. 2018, **127**, 30-40 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.apsoil.2018.03.004. ISSN 09291393. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139317313860>
- [51] SHI, Yichao, Noura ZIADI, Chantal HAMEL et al. Soil microbial biomass, activity and community structure as affected by mineral phosphorus fertilization in grasslands. *Applied Soil Ecology* [online]. 2020, **146** [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.apsoil.2019.103391. ISSN 09291393. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139319306742>
- [52] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitring*. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 9788090378797.
- [53] STEGMANN, R. *Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 3-540-41736-2.
- [54] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŤOVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [55] RAMADASS, Kavitha, Mallavarapu MEGHARAJ, Kadiyala VENKATESWARLU a Ravi NAIDU. Ecological implications of motor oil pollution: Earthworm survival and soil health. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2015, **85**, 72-81 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.02.026. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071715000711>

- [56] THAVAMANI, Palanisami, Euan SMITH, Ramadass KAVITHA, Grant MATHIESON, Mallavarapu MEGHARAJ, Prashant SRIVASTAVA a Ravi NAIDU. Risk based land management requires focus beyond the target contaminants—A case study involving weathered hydrocarbon contaminated soils. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2015, **4**, 98-109 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.eti.2015.04.005. ISSN 23521864. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186415000176>
- [57] ALVARENGA, Paula, Débora RODRIGUES, Clarisse MOURINHA, Patrícia PALMA, Amarilis DE VARENNES, Nuno CRUZ, Luís TARELHO a Sónia RODRIGUES. Use of wastes from the pulp and paper industry for the remediation of soils degraded by mining activities: Chemical, biochemical and ecotoxicological effects. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **686**, 1152-1163 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.038. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719325987>
- [58] GONG, Xiaoqiang, Linlin CAI, Suyan LI, Scott CHANG, Xiangyang SUN a Zhengfeng AN. Bamboo biochar amendment improves the growth and reproduction of *Eisenia fetida* and the quality of green waste vermicompost. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **156**, 197-204 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.023. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014765131830201X>
- [59] *ISO 11268-2:2012 Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction of Eisenia fetida/Eisenia andrei*. 2 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2012.
- [60] *Ministerstvo životního prostředí* [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí, © 2008–2020 [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: www.mzp.cz
- [61] *VYHLÁŠKA 437/2016 Sb.*: Vyhláška o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o *podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb.*, o *podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb.*, o *podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb.*, o *podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady)*. In: . Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2016. Dostupné také z: www.mzp.cz
- [62] *CARLILE, W.R., Michael RAVIV a M. PRASAD. Organic Soilless Media Components. Soilless Culture* [online]. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier, 2019, s. 303-378 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63696-6.00008-6. ISBN 9780444636966. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636966000086>
- [63] *VYHLÁŠKA č. 257/2009 Sb.*: Vyhláška o používání sedimentů na zemědělské půdě. In: . Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2009. Dostupné také z: www.mzp.cz
- [64] *ISO 23753-1:2005 Soil quality — Determination of dehydrogenases activity in soils — Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)*. 1 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2005.

- [65] *ISO 10381-6:2009 Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*. 2 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2009.
- [66] *ČSN ISO 11465: Kvalita půdy - Stanovení hmotnostního podílu sušiny a hmotnostní vlhkosti půdy - Gravimetrická metoda. Cor.1:1994*. Praha: Český normalizační institut, 1993.
- [67] *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)* [online]. OECD, 2016 [cit. 2020-01-29]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. DOI: 10.1787/9789264264496-en. ISBN 9789264264496. Dostupné z: www.oecd-ilibrary.org
- [68] *HOFMAN, Jakub a Jana VAŠÍČKOVÁ. Laboratorní praktikum z půdní ekotoxikologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2012.
- [69] *ISO 17512-1:2008 Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. 1 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2008.
- [70] *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests* [online]. OECD, 1984 [cit. 2020-01-29]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. DOI: 10.1787/9789264070042-en. ISBN 9789264070042. Dostupné z: www.oecd-ilibrary.org
- [71] *ISO 17512-2:2011 Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 2: Test with collembolans (Folsomia candida)*. 1 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2011.
- [72] *ISO 11269-1:2012: Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth*. 2 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2012.
- [73] *OBARD, J.P., D. SAUERBECK a K.C. JONES. Dehydrogenase activity of the microbial biomass in soils from a field experiment amended with heavy metal contaminated sewage sludges*. Science of The Total Environment [online]. 1994, **142**(3), 157-162 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/0048-9697(94)90323-9. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0048969794903239>
- [74] *GONG, Ping. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions*. Soil Biology and Biochemistry [online]. 1997, **29**(2), 211-214 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00290-8. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002908>

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AChE	acetylcholinesteráza
APG	alkylpolyglukosid
BFA	schopnost tvorby biofilmu
CAP	chlorantraniliprol
CAT	kataláza
DHA	dehydrogenázová aktivita
GC/MS	kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrie
GST	glutathion S-transferáza
MBC	mikrobiální uhlík z biomasy
NTA	kyselina nitriloctová
PAH	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PCZ	propikonazol
Skládka H	vzorek odebraný v horní části skládky
Skládka D	vzorek odebraný v dolní části skládky
TPF	1 3 5-triphenylformazan
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid
WHC _{max}	maximální vodní kapilární kapacita půdy

7 PŘÍLOHY

Příloha 1. – Výsledky testů akutní toxicity

Příloha 2. – Výsledky testů chronické a reprodukční toxicity

Příloha 3. – Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy

Příloha 4. – Místa odběru vzorků

Příloha 1. – Výsledky testů akutní toxicity

Tabulka 58: Celkové výsledky testu akutní toxicity pro vzorek kalu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost před testem [g]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₇ [g]	I ₇ [%]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]	
0										
1	2,672	2,922	0	0,250	-9,4	2,808	0	0,136	-5,1	
2	2,654	2,87	0	0,216	-8,1	2,849	0	0,195	-7,3	
3	2,459	2,813	0	0,354	-14,4	2,701	0	0,242	-9,8	
Průměr	2,595	2,868	0	0,273	-10,5	2,786	0	0,191	-7,4	
12,5										
1	2,140	2,58	0	0,440	-20,6	2,403	0	0,263	-12,3	
2	2,344	3,021	0	0,677	-28,9	2,778	0	0,434	-18,5	
3	2,332	2,897	0	0,565	-24,2	2,728	0	0,396	-17,0	
Průměr	2,272	2,833	0	0,561	-24,7	2,636	0	0,364	-16,0	
25										
1	1,686	2,331	0	0,645	-38,3	2,246	0	0,560	-33,2	
2	1,866	2,482	0	0,616	-33,0	2,407	0	0,541	-29,0	
3	2,018	2,802	0	0,784	-38,9	2,770	0	0,752	-37,3	
Průměr	1,857	2,538	0	0,682	-36,7	2,474	0	0,618	-33,3	
50										
1	1,987	2,688	0	0,701	-35,3	2,738	0	0,751	-37,8	
2	2,058	2,913	0	0,855	-41,5	3,084	0	1,026	-49,9	
3	1,852	2,649	0	0,797	-43,0	2,741	0	0,889	-48,0	
Průměr	1,966	2,750	0	0,784	-39,9	2,854	0	0,889	-45,2	
100										
1	2,040	3,042	0	1,002	-49,1	3,203	0	1,163	-57,0	
2	1,924	2,585	0	0,661	-34,4	2,890	0	0,966	-50,2	
3	2,288	3,161	0	0,873	-38,2	3,322	0	1,034	-45,2	
Průměr	2,084	2,929	0	0,845	-40,6	3,138	0	1,054	-50,6	

Tabulka 59: Celkové výsledky testu akutní toxicity pro vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal před testem [g]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₇ [g]	I ₇ [%]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]	
0										
1	2,672	2,922	0	0,250	-9,4	2,808	0	0,136	-5,1	
2	2,654	2,87	0	0,216	-8,1	2,849	0	0,195	-7,3	
3	2,459	2,813	0	0,354	-14,4	2,701	0	0,242	-9,8	
Průměr	2,595	2,868	0	0,273	-10,5	2,786	0	0,191	-7,4	
12,5										
1	2,440	2,885	0	0,445	-18,2	2,824	0	0,384	-15,7	
2	1,464	1,783	0	0,319	-21,8	1,850	0	0,386	-26,4	
3	2,066	2,473	0	0,407	-19,7	2,411	0	0,345	-16,7	
Průměr	1,990	2,380	0	0,390	-19,6	2,362	0	0,372	-18,7	
25										
1	1,976	2,409	0	0,433	-21,9	2,338	0	0,362	-18,3	
2	1,692	2,084	0	0,392	-23,2	1,976	0	0,284	-16,8	
3	1,688	2,227	0	0,539	-31,9	2,110	0	0,422	-25,0	
Průměr	1,785	2,240	0	0,455	-25,5	2,141	0	0,356	-19,9	
50										
1	1,371	1,681	0	0,310	-22,6	1,664	0	0,293	-21,4	
2	2,330	3,011	0	0,681	-29,2	2,791	0	0,461	-19,8	
3	2,000	2,555	0	0,555	-27,8	2,399	0	0,399	-20,0	
Průměr	1,900	2,416	0	0,515	-27,1	2,285	0	0,384	-20,2	
100										
1	2,019	2,594	0	0,575	-28,5	2,189	0	0,170	-8,4	
2	2,320	2,999	0	0,679	-29,3	2,733	0	0,413	-17,8	
3	1,590	2,036	0	0,446	-28,1	2,022	0	0,432	-27,2	
Průměr	1,976	2,543	0	0,567	-28,7	2,315	0	0,338	-17,1	

Tabulka 60: Celkové výsledky testu akutní toxicity pro vzorek horní skládky

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal před testem [g]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₇ [g]	I ₇ [%]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0									
1	2,672	2,922	0	0,250	-9,4	2,808	0	0,136	-5,1
2	2,654	2,87	0	0,216	-8,1	2,849	0	0,195	-7,3
3	2,459	2,813	0	0,354	-14,4	2,701	0	0,242	-9,8
Průměr	2,595	2,868	0	0,273	-10,5	2,786	0	0,191	-7,4
50									
1	1,756	2,291	0	0,535	-30,5	2,249	0	0,493	-28,1
2	1,691	2,253	0	0,562	-33,2	2,302	0	0,611	-36,1
3	1,607	2,108	0	0,501	-31,2	2,016	0	0,409	-25,5
Průměr	1,685	2,217	0	0,533	-31,6	2,189	0	0,504	-29,9
100									
1	2,182	2,911	0	0,729	-33,4	2,751	0	0,569	-26,1
2	1,875	2,47	0	0,595	-31,7	2,395	0	0,520	-27,7
3	1,916	2,475	0	0,559	-29,2	2,526	0	0,610	-31,8
Průměr	1,991	2,619	0	0,628	-31,5	2,557	0	0,566	-28,4
250									
1	1,744	2,376	0	0,632	-36,2	2,345	0	0,601	-34,5
2	2,112	2,75	0	0,638	-30,2	2,770	0	0,658	-31,2
3	1,936	2,469	0	0,533	-27,5	2,448	0	0,512	-26,4
Průměr	1,931	2,532	0	0,601	-31,1	2,521	0	0,590	-30,6

Tabulka 61: Celkové výsledky testu akutní toxicity pro vzorek dolní skládky

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal před testem [g]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₇ [g]	I ₇ [%]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0									
1	2,672	2,922	0	0,250	-9,4	2,808	0	0,136	-5,1
2	2,654	2,87	0	0,216	-8,1	2,849	0	0,195	-7,3
3	2,459	2,813	0	0,354	-14,4	2,701	0	0,242	-9,8
Průměr	2,595	2,868	0	0,273	-10,5	2,786	0	0,191	-7,4
50									
1	2,348	3,074	0	0,726	-30,9	2,924	0	0,576	-24,5
2	2,067	2,641	0	0,574	-27,8	2,605	0	0,538	-26,0
3	2,151	2,709	0	0,558	-25,9	2,654	0	0,503	-23,4
Průměr	2,189	2,808	0	0,619	-28,3	2,728	0	0,539	-24,6
100									
1	2,174	2,625	0	0,451	-20,7	2,730	0	0,556	-25,6
2	2,286	2,993	0	0,707	-30,9	2,952	0	0,666	-29,1
3	1,743	2,173	0	0,430	-24,7	2,196	0	0,453	-26,0
Průměr	2,068	2,597	0	0,529	-25,6	2,626	0	0,558	-27,0
250									
1	1,794	2,636	0	0,842	-46,9	2,300	0	0,506	-28,2
2	2,036	2,367	0	0,331	-16,3	2,657	0	0,621	-30,5
3	1,552	2,014	0	0,462	-29,8	1,876	0	0,324	-20,9
Průměr	1,794	2,339	0	0,545	-30,4	2,278	0	0,484	-27,0

Tabulka 62: Celkové výsledky testu akutní toxicity pro vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal před testem [g]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₇ [g]	I ₇ [%]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₁₄ [g]	I ₁₄ [%]
0									
1	2,672	2,922	0	0,250	-9,4	2,808	0	0,136	-5,1
2	2,654	2,870	0	0,216	-8,1	2,849	0	0,195	-7,3
3	2,459	2,813	0	0,354	-14,4	2,701	0	0,242	-9,8
Průměr	2,595	2,868	0	0,273	-10,5	2,786	0	0,191	-7,4
62,5									
1	1,781	2,548	0	0,767	-43,1	2,272	0	0,491	-27,6
2	1,484	2,122	0	0,638	-43,0	2,023	0	0,539	-36,3
3	1,656	2,418	0	0,762	-46,0	2,248	0	0,592	-35,7
Průměr	1,640	2,363	0	0,722	-44,0	2,181	0	0,541	-33,0
125									
1	1,589	2,084	0	0,495	-31,2	1,973	0	0,384	-24,2
2	1,256	1,721	0	0,465	-37,0	1,701	0	0,445	-35,4
3	1,764	2,428	0	0,664	-37,6	2,286	0	0,522	-29,6
Průměr	1,536	2,078	0	0,541	-35,2	1,987	0	0,450	-29,3
250									
1	1,432	1,601	0	0,169	-11,8	1,563	0	0,131	-9,1
2	1,332	1,900	0	0,568	-42,6	1,899	0	0,567	-42,6
3	1,456	2,058	0	0,602	-41,3	1,813	0	0,357	-24,5
Průměr	1,407	1,853	0	0,446	-31,7	1,758	0	0,352	-25,0

Příloha 2. – Výsledky testů chronické a reprodukční toxicity

Tabulka 63: Výsledku testu chronické a reprodukční toxicity – vzorek kalu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	Počet kokonů	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	Počet juvenilů
0										
1	2,989	0	0,317	-11,9	1	3,465	0	0,793	-29,7	15
2	3,220	0	0,566	-21,3	1	3,669	0	1,015	-38,2	13
3	2,911	0	0,452	-18,4	1	3,296	0	0,837	-34,0	10
Průměr	3,040	0	0,445	-17,1	1	3,477	0	0,882	-34,0	12,7
12,5										
1	2,651	0	0,511	-23,9	3	2,459	0	0,319	-14,9	10
2	2,736	0	0,392	-16,7	6	2,383	0	0,039	-1,7	18
3	2,723	0	0,391	-16,8	3	2,688	0	0,356	-15,3	14
Průměr	2,703	0	0,431	-19,0	4	2,510	0	0,238	-10,5	14
25										
1	2,174	0	0,488	-28,9	3	1,870	0	0,184	-10,9	5
2	2,230	0	0,364	-19,5	8	2,221	0	0,355	-19,0	10
3	2,908	0	0,890	-44,1	3	2,700	0	0,682	-33,8	5
Průměr	2,437	0	0,581	-31,3	4,7	2,264	0	0,407	-21,9	6,7
50										
1	2,976	0	0,989	-49,8	3	2,543	0	0,556	-28,0	1
2	3,116	0	1,058	-51,4	2	2,799	0	0,741	-36,0	0
3	2,308	0	0,456	-24,6	3	2,133	1	0,281	-15,2	0
Průměr	2,800	0	0,834	-42,4	2,7	2,492	0,3	0,526	-26,8	0,3
100										
1	2,833	0	0,793	-38,9	0	1,207	2	-0,833	40,8	0
2	2,173	0	0,249	-12,9	0	0,934	2	-0,990	51,5	0
3	3,201	0	0,913	-39,9	0	1,760	2	-0,528	23,1	0
Průměr	2,736	0	0,652	-31,3	0	1,300	2	-0,784	37,6	0

Tabulka 64: Výsledku testu chronické a reprodukční toxicity – vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížel [g]	Mortalita	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	Počet kokonů	Hmotnost žížel [g]	Mortalita	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	Počet juvenilů
0										
1	2,989	0	0,317	-11,9	1	3,465	0	0,793	-29,7	15
2	3,220	0	0,566	-21,3	1	3,669	0	1,015	-38,2	13
3	2,911	0	0,452	-18,4	1	3,296	0	0,837	-34,0	10
Průměr	3,040	0	0,445	-17,1	1	3,477	0	0,882	-34,0	12,7
12,5										
1	1,603	1	-0,837	34,3	10	1,384	0	-1,056	43,3	14
2	2,438	0	0,974	-66,5	8	2,121	0	0,657	-44,9	18
3	2,549	0	0,483	-23,4	13	2,540	0	0,474	-22,9	16
Průměr	2,197	0,3	0,207	-10,4	10,3	2,015	0,0	0,025	-1,3	16
25										
1	2,845	0	0,869	-44,0	11	2,224	0	0,248	-12,6	27
2	2,350	0	0,658	-38,9	8	2,065	0	0,373	-22,0	21
3	2,616	0	0,928	-55,0	10	2,203	0	0,515	-30,5	27
Průměr	2,604	0	0,818	-45,8	9,7	2,164	0	0,379	-21,2	25
50										
1	1,990	0	0,619	-45,1	2	1,795	0	0,424	-30,9	0
2	2,721	0	0,391	-16,8	8	2,234	0	-0,096	4,1	0
3	2,625	0	0,625	-31,3	0	2,000	0	0,000	0,0	0
Průměr	2,445	0	0,545	-28,7	3,3	2,010	0	0,109	-5,8	0
100										
1	1,743	1	-0,276	13,7	1	1,519	1	-0,500	24,8	0
2	2,847	0	0,527	-22,7	3	1,940	1	-0,380	16,4	0
3	2,383	0	0,793	-49,9	1	1,641	1	0,051	-3,2	0
Průměr	2,324	0,3	0,348	-17,6	1,7	1,700	1	-0,276	14,0	0

Tabulka 65: Výsledku testu chronické a reprodukční toxicity – vzorek skládky H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	Počet kokonů	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	Počet juvenilů
0										
1	2,989	0	0,317	-11,9	1	3,465	0	0,793	-29,7	15
2	3,220	0	0,566	-21,3	1	3,669	0	1,015	-38,2	13
3	2,911	0	0,452	-18,4	1	3,296	0	0,837	-34,0	10
Průměr	3,040	0	0,445	-17,1	1	3,477	0	0,882	-34,0	12,7
50										
1	2,599	0	0,843	-48,0	0	2,207	0	0,451	-25,7	2
2	2,544	0	0,853	-50,4	2	2,250	0	0,559	-33,1	3
3	2,500	0	0,893	-55,6	0	2,022	0	0,415	-25,8	0
Průměr	2,548	0	0,863	-51,2	0,7	2,160	0	0,475	-28,2	1,7
100										
1	2,975	0	0,793	-36,3	2	2,435	0	0,253	-11,6	2
2	2,596	0	0,721	-38,5	1	2,267	0	0,392	-20,9	3
3	2,156	1	0,240	-12,5	0	1,719	1	-0,197	10,3	0
Průměr	2,576	0,3	0,585	-29,4	1	2,140	0,3	0,149	-7,5	1,7
250										
1	2,490	0	0,746	-42,8	0	1,511	1	-0,233	13,4	0
2	2,900	0	0,788	-37,3	0	2,041	1	-0,071	3,4	0
3	2,471	0	0,535	-27,6	1	2,003	0	0,067	-3,5	0
Průměr	2,620	0	0,690	-35,7	0,3	1,852	0,7	-0,079	4,1	0

Tabulka 66: Výsledku testu chronické a reprodukční toxicity – vzorek skládky D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	Počet kokonů	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₅₆ [g]	I ₅₆ [%]	Počet juvenilů
0										
1	2,989	0	0,317	-11,9	1	3,465	0	0,793	-29,7	15
2	3,220	0	0,566	-21,3	1	3,669	0	1,015	-38,2	13
3	2,911	0	0,452	-18,4	1	3,296	0	0,837	-34,0	10
Průměr	3,040	0	0,445	-17,1	1	3,477	0	0,882	-34,0	12,7
50										
1	2,990	0	0,642	-27,3	2	2,593	0	0,245	-10,4	6
2	2,818	0	0,751	-36,3	0	2,477	0	0,410	-19,8	0
3	2,734	0	0,583	-27,1	0	2,388	0	0,237	-11,0	0
Průměr	2,847	0	0,659	-30,1	0,7	2,486	0	0,297	-13,6	2
100										
1	2,708	0	0,534	-24,6	0	2,426	0	0,252	-11,6	0
2	3,039	0	0,753	-32,9	0	2,483	0	0,197	-8,6	0
3	2,452	0	0,709	-40,7	0	2,350	0	0,607	-34,8	0
Průměr	2,733	0	0,665	-32,2	0	2,420	0	0,352	-17,0	0
250										
1	2,375	0	0,581	-32,4	0	1,997	0	0,203	-11,3	0
2	2,424	0	0,388	-19,1	0	2,033	0	-0,003	0,1	0
3	1,763	1	0,211	-13,6	0	0,985	2	-0,567	36,5	0
Průměr	2,187	0,3	0,393	-21,9	0	1,672	0,7	-0,122	6,8	0

Tabulka 67: Výsledku testu chronické a reprodukční toxicity – vzorek sedimentu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₂₈ [g]	I ₂₈ [%]	Počet kokonů	Hmotnost žížal [g]	Mortalita	I ₃₅ [g]	I ₃₅ [%]	Počet juvenilů
0										
1	2,989	0	0,317	-11,9	1	3,465	0	0,793	-29,7	15
2	3,220	0	0,566	-21,3	1	3,669	0	1,015	-38,2	13
3	2,911	0	0,452	-18,4	1	3,296	0	0,837	-34,0	10
Průměr	3,040	0	0,445	-17,1	1	3,477	0	0,882	-34,0	12,7
62,5										
1	1,861	0	0,080	-4,5	3	1,545	2	-0,236	13,3	0
2	2,279	0	0,795	-53,6	3	2,760	0	1,276	-86,0	0
3	2,733	0	1,077	-65,0	4	2,719	0	1,063	-64,2	0
Průměr	2,291	0	0,651	-39,7	3,3	2,341	0,7	0,701	-42,7	0
125										
1	2,325	0	0,736	-46,3	3	2,228	0	0,639	-40,2	0
2	2,233	0	0,977	-77,8	3	2,461	0	1,205	-95,9	0
3	2,578	0	0,814	-46,1	4	2,708	0	0,944	-53,5	0
Průměr	2,379	0	0,842	-54,8	3,3	2,466	0	0,929	-60,5	0
250										
1	2,025	0	0,593	-41,4	1	2,338	0	0,906	-63,3	0
2	2,087	0	0,755	-56,7	0	2,224	0	0,892	-67,0	0
3	2,060	1	0,604	-41,5	0	2,121	0	0,665	-45,7	0
Průměr	2,057	0,3	0,651	-46,3	0,3	2,228	0	0,821	-58,4	0

Příloha 3. – Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy

Tabulka 68: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek kalu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	0,0222	0,3320	82,52		0,577
	1	0,0611	1,1291		0,362	
	2	0,096	1,8443		0,687	
	3	0,0955	1,8340		0,683	
12,5	blank	0,0306	0,5041	85,66		1,199
	1	0,1702	3,3648		1,252	
	2	0,1901	3,7725		1,431	
	3	0,1642	3,2418		1,199	
25	blank	0,0503	0,9078	85,27		1,424
	1	0,2083	4,1455		1,424	
	2	0,2117	4,2152		1,455	
	3	0,2048	4,0738		1,392	
50	blank	0,0678	1,2664	85,55		1,489
	1	0,2367	4,7275		1,517	
	2	0,2342	4,6762		1,495	
	3	0,2297	4,5840		1,454	
100	blank	0,1160	2,2541	85,40		1,569
	1	0,2742	5,4959		1,424	
	2	0,2935	5,8914		1,597	
	3	0,3033	6,0922		1,685	
čistý vzorek	blank	0,9062	18,4467	92,65		0,482
	1	0,9733	19,8217		0,557	
	2	0,9728	19,8115		0,552	
	3	0,9468	19,2787		0,337	

Tabulka 69: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek biouhlu

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	0,0222	0,3320	82,52		0,577
	1	0,0611	1,1291		0,362	
	2	0,0960	1,8443		0,687	
	3	0,0955	1,8340		0,683	
12,5	blank	0,0493	0,8873	86,29		0,931
	1	0,1513	2,9775		0,908	
	2	0,1718	3,3975		1,091	
	3	0,1539	3,0307		0,931	
25	blank	0,0717	1,3463	86,11		1,010
	1	0,1975	3,9242		1,123	
	2	0,1921	3,8135		1,074	
	3	0,1652	3,2623		0,834	
50	blank	0,1297	2,5348	86,28		0,983
	1	0,2312	4,6148		0,904	
	2	0,2409	4,8135		0,990	
	3	0,2481	4,9611		1,055	
100	blank	0,1103	2,1373	86,41		1,118
	1	0,2255	4,4980		1,024	
	2	0,2433	4,8627		1,183	
	3	0,2391	4,7766		1,145	
čistý vzorek	blank	1,4058	28,6844	96,59		2,118
	1	1,5937	32,5348		1,495	
	2	1,7268	35,2623		2,554	
	3	1,6955	34,6209		2,305	

Tabulka 70: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek skládka H

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	0,0222	0,3320	82,52		0,577
	1	0,0611	1,1291		0,362	
	2	0,096	1,8443		0,687	
	3	0,0955	1,8340		0,683	
50	blank	0,0296	0,4836	84,39		0,783
	1	0,1166	2,2664		0,792	
	2	0,1479	2,9078		1,077	
	3	0,1156	2,2459		0,783	
100	blank	0,0493	0,8873	84,92		1,286
	1	0,1892	3,7541		1,266	
	2	0,1978	3,9303		1,344	
	3	0,1872	3,7131		1,248	
250	blank	0,0461	0,8217	87,40		1,770
	1	0,2496	4,9918		1,789	
	2	0,2465	4,9283		1,762	
	3	0,2461	4,9201		1,758	
čistý vzorek	blank	0,1099	2,1291	97,00		3,723
	1	0,5535	11,2193		3,514	
	2	0,5814	11,7910		3,735	
	3	0,6045	12,2643		3,918	

Tabulka 71: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek skládka D

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	ā [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	0,0222	0,3320	82,52		0,577
	1	0,0611	1,1291		0,362	
	2	0,096	1,8443		0,687	
	3	0,0955	1,8340		0,683	
50	blank	0,0208	0,3033	85,33		0,535
	1	0,0891	1,7029		0,615	
	2	0,1147	2,2275		0,846	
	3	0,0802	1,5205		0,535	
100	blank	0,0266	0,4221	86,22		0,559
	1	0,0966	1,8566		0,624	
	2	0,0934	1,7910		0,595	
	3	0,0781	1,4775		0,459	
250	blank	0,0351	0,5963	88,27		0,619
	1	0,1181	2,2971		0,723	
	2	0,1037	2,0020		0,597	
	3	0,0969	1,8627		0,538	
čistý vzorek	blank	0,0771	1,4570	98,05		1,137
	1	0,2661	5,3299		1,481	
	2	0,2504	5,0082		1,358	
	3	0,1499	2,9488		0,571	

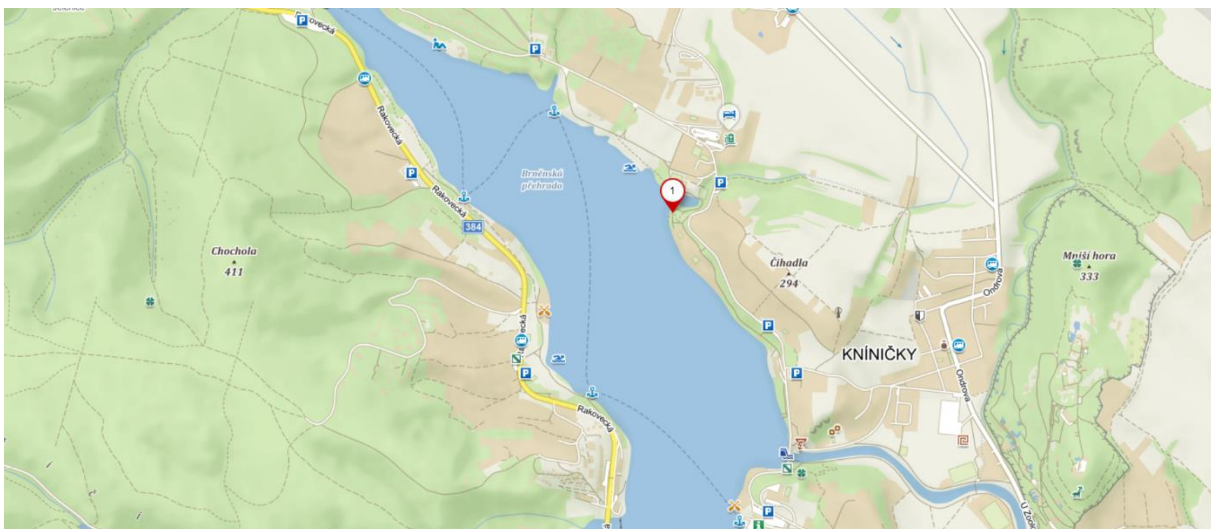
Tabulka 72: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy – vzorek sediment

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	ā [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
0	blank	0,0222	0,3320	82,52		0,577
	1	0,0611	1,1291		0,362	
	2	0,096	1,8443		0,687	
	3	0,0955	1,8340		0,683	
62,5	blank	0,0341	0,5758	86,39		1,481
	1	0,1153	2,2398		0,722	
	2	0,1493	2,9365		1,025	
	3	0,2006	3,9877		1,481	
125	blank	0,0503	0,9078	87,20		0,597
	1	0,1134	2,2008		0,556	
	2	0,1148	2,2295		0,568	
	3	0,1258	2,4549		0,665	
250	blank	0,0451	0,8012	89,21		0,677
	1	0,1196	2,3279		0,642	
	2	0,1343	2,6291		0,768	
	3	0,1172	2,2787		0,621	
čistý vzorek	blank	0,0592	1,0902	98,42		0,211
	1	0,0806	1,5287		0,167	
	2	0,0926	1,7746		0,261	
	3	0,0853	1,6250		0,204	

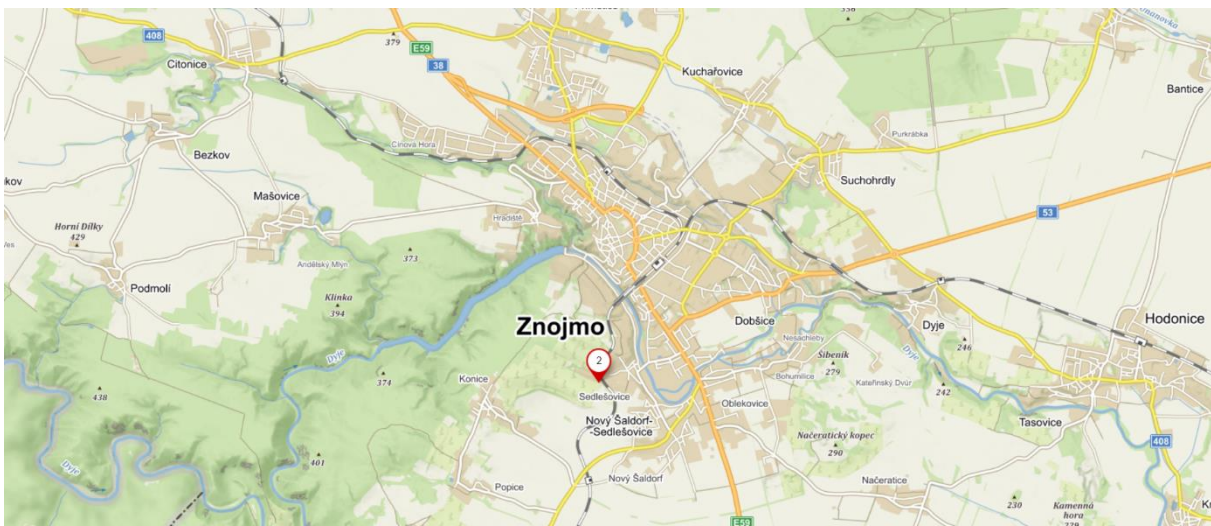
Tabulka 73: Výsledky stanovení aktivity dehydrogenázy

Koncentrace [g.kg ⁻¹]	Opakování	A	q	Sušina [%]	a [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]	\bar{a} [μg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
1	blank	0,0337	0,5676	79,08		6,925
	1	0,6769	13,7480		6,250	
	2	0,8046	16,3648		7,491	
	3	0,7575	15,3996		7,033	
3	blank	0,0659	1,2275	90,47		0,307
	1	0,2419	4,8340		1,495	
	2	0,1610	3,1762		0,808	
	3	0,1021	1,9693		0,307	
4	blank	0,0239	0,3668	80,72		2,661
	1	0,2446	4,8893		2,101	
	2	0,2984	5,9918		2,613	
	3	0,3672	7,4016		3,268	

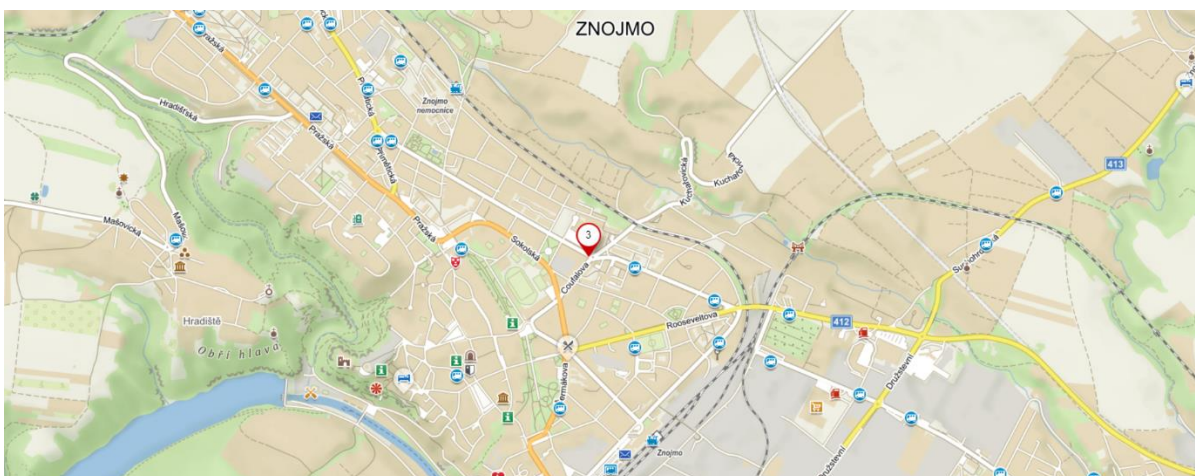
Příloha 4. – Místa odběru vzorků



Obrázek 27: Místo odběru vzorku sedimentu



Obrázek 28: Místo odběru vzorku z vinice



Obrázek 29: Místo odběru vzorku – kruhový objezd