

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Ekotoxicita látek užívaných k výrobě pneumatik

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Česeneková

Vedoucí práce: prof. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Ekotoxicita látek užívaných k výrobě pneumatik" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 04. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. za odborné vedení, velmi vstřícný přístup, podporu, pomoc a neocenitelné praktické a teoretické zkušenosti, které mi při tvorbě této diplomové práce předala. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Marii Bazalové za všechny čas a práci, které mi věnovala, a za laskavou pomoc při práci v laboratoři a rady pro tvorbu metodiky. A také panu Ing. Jiřímu Brejchovi ze společnosti Mitas a.s. za přínosné konzultace a poskytnutí zdrojů a surovin použitých při analýzách.

Ekotoxicita látek užívaných při výrobě pneumatik

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na zhodnocení a porovnání rizik spojených s únikem vybraných surovin pro výrobu pneumatik do půdy. Pro testování byly vybrány látky typu 6PPD (antidegradant), práškový ZnO (aktivátor) a retortové saze (plnidla).

Ke zhodnocení fyto toxických účinků čistých látek byl proveden test klíčivosti se semeny ředkve seté (*Raphanus sativus L. var. sativus*) a vodnými výluhy látek o koncentracích 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 % a 0 % (kontrola s demineralizovanou vodou). Žádná ze sledovaných látek identifikována jako prokazatelný inhibitor klíčení.

Pro zhodnocení chronické ekotoxicity látek na lupinu bílou (*Lupinus albus*) a aktivitu vybraných půdních enzymů byly založeny nádobové pokusy. Byly použity 2 půdy (série označené lesní a orná) lišící se svými parametry. Pro každou půdní sérii a každou látku byly vytvořeny varianty o koncentracích 0,1 a 0,01 a 0 % (celkem 2 x 7 variant). Po dobu 3 měsíců byla pravidelně sledována aktivita půdních dehydrogenás, nitrátreduktásy a kyselých fosfatásy. Půdní dehydrogenázy projeví největší citlivost vůči 6PPD o koncentraci 0,1 %, postupně byly také pozorovány negativní účinky produktů degradace 6PPD. U vzorků ZnO byla detekována inhibice i aktivace enzymů. Pozorovaná inhibice u sazí byla pravděpodobně způsobena blokadou volného substrátu navázáním částic. U nitrátreduktásy byla pozorována nejvyšší odezva u ZnO 0,1 %, u níž teoreticky došlo k umělé stabilizaci a nadprůměrné aktivaci enzymu. U série lesní půdy se negativní účinky sazí a 6PPD projeví až během 3. měření, u série orné během celého sledovacího období. Výsledky měření aktivity kyselých fosfatásy svědčí o její rezistenci vůči vybraným kontaminantům.

U série lesní půdy byla přirozeně nižší klíčivost lupiny bílé (*Lupinus albus*). Inhibice byla zaznamenána u variant 6PPD 0,01 % a saze 0,01 %. K poklesu tvorby nadzemní biomasy došlo u obou variant 6PPD a ZnO 0,1%, zatímco saze vyvolaly nadprůměrnou elongaci rostlin. U série orné půdy bylo klíčení zastaveno u varianty 6PPD 0,01 %. Rostliny u vzorků ZnO 0,1 % a saze 0,01 % vykazaly nejnižší nárůst. Pro ověření výsledků byly provedeny dodatečně testy klíčení lupiny bílé na půdních výluzích série orné půdy. Byly detekovány problémy s klíčením semen v obou kontrolních provedeních (demineralizovaná voda a nekontaminovaná půda). Klíčení na půdních výluzích bylo zřetelně inhibováno pouze u vzorků kontaminovaných sazí.

Klíčová slova: ekotoxicita, odpad, výroba pneumatik, gumárenské suroviny

Ecotoxicity of substances using for tyres production

Summary

This diploma thesis is focused on the evaluation and comparison of risks connecting with leakage of chosen rubber tire feedstocks into the soils. Substances chosen for testing were 6PPD (antidegradant), powder ZnO (activator) and furnace carbon black (fillers).

Germination test with *Raphanus sativus L. var. sativus* seeds and leaches with concentration 0.1 %, 1 %, 5 %, 10 % and 0 % (control with demineralised water) was made for evaluation of phytotoxic effects of raw substances. None of substances was provable identified as an inhibitor of germination.

Soil pot experiments were used to evaluate chronic ecotoxicity effects of substances toward *Lupinus albus* as well as soil enzyme activities. Two soil series (termed as forest and arable) with different parameters were used. For each soil series and substance were created variants with concentration 0.1, 0.01 and 0 % (overall 2 x 7 variants). Activities of soil dehydrogenases, nitrate reductase and acid fosfatase were measured periodically during 3 months. Dehydrogenases showed the most significant sensitivity to variant 6PPD 0.1 %, adverse effects of 6PPD degradation products were gradually observed too. Contamination by ZnO induced both inhibition and activation. In case of carbon black, detected inhibition was probably induced by blocking of free substrate by linkage of particles. The most significant response of nitrate reductase was detected at samples of ZnO 0.1 %. We can speculate artificial stabilisation and activation of this enzyme. Negative effects of carbon black and 6PPD were confirmed during whole monitoring of arable soil series, for forest series this effect was determined only in 3rd measurement. Activity of acid phosphatase showed resistant. Naturally lower germination rate of *Lupinus albus* was found for forest soil. In samples 6PPD 0.01 % and carbon black 0.01 % inhibitions of germination were observed. Inhibition of plant growth was found in both variants of 6PPD and in ZnO 0.1 % whereas carbon black induced elongation. In arable soil series germination was determined in variant 6PPD 0.01 % and the lowest growth ratio was detected at ZnO 0.1 % and carbon black 0.01 %. Germination test with *Lupinus albus* with leaches of arable soil samples was made for verification of results. There were detected problems with seed germination at both control samples (demineralised water and uncontaminated soil). Only in case of contamination by carbon black germination inhibition was observed.

Keywords: ecotoxicity, waste, tyres production, rubber tire feedstocks

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce a vědecké hypotézy	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Vulkanizace kaučuku.....	10
3.2 Charakteristika vybraných látek.....	10
3.2.1 6PPD a jeho význam v gumárenské výrobě	10
3.2.2 Oxid zinečnatý a jeho význam.....	16
3.2.3 Retortové saze a jejich význam	23
3.3 Gumárenská výroba jako potencionální zdroj polutantů a xenobiotik	26
3.3.1 Problematika pneumatik	27
3.3.2 Enzymatická aktivita jako indikátor kontaminace půdního prostředí	30
4 Materiál a metody	33
4.1 Testy klíčivosti ve výluzích čistých látek.....	33
4.2 Založení půdních variant.....	34
4.3 Stanovení sušiny vzorků	35
4.4 Stanovení vybraných enzymatických aktivit.....	36
4.4.1 Aktivity dehydrogenás	37
4.4.2 Aktivita nitrátoreduktázy	38
4.4.3 Aktivita kyselé fosfatázy	39
4.5 Testy klíčivosti a růstu na kontaminovaných půdách	39
4.6 Testy klíčivosti na půdních výluzích.....	40
4.7 Zpracování výsledků analýz.....	41
5 Výsledky	42
5.1 Testy klíčivosti na výluzích čistých látek	42

5.2	Analýzy enzymatických aktivit	47
5.2.1	Aktivita dehydrogenás	47
5.2.2	Aktivita nitrátreduktázy	51
5.2.3	Aktivita kyselého fosfatázy.....	55
5.3	Testy klíčivosti na půdách	59
5.4	Testy klíčivosti na půdních výluzích.....	62
6	Diskuze	64
7	Závěr.....	70
8	Seznam literatury	71
9	Samostatné přílohy	84

1 Úvod

Každodenní užívání pneumatik lze bez nadsázky označit za jednu z charakteristik moderní společnosti. V roce 2013 bylo jen v Evropě dle serveru statista.com vyrobeno téměř 4,7 milionu pneumatik a toto tempo produkce je víceméně udržováno od roku 2005, přičemž v celosvětovém měřítku se majoritní výrobci nachází v zejména Japonsku a USA. S rostoucí globalizací, zvyšujícími se požadavky na zajištění zemědělské a průmyslové výroby a také na individuální mobilitu lze předpokládat udržení nebo růst současného trendu jejich produkce.

Pneumatiky však mohou představovat environmentální problém v každé etapě svého životního cyklu, který lze posuzovat od výroby a transportu gumárenských surovin, přes jejich samotné užívání, až po nakládání s pneumatikami s ukončenou životností a s výrobními odpady. Některé látky užívané v gumárenském průmyslu vykazují prokazatelné negativní účinky na lidské zdraví, což řadí gumárenský průmysl mezi riziková odvětví, další suroviny obsahují komponenty a příměsi nebezpečné pro životní prostředí, zejména pro půdní a vodní ekosystémy. Vulkanizací dochází k pevným vazbám těchto látek v matrici pneumatiky, postupnou abrazí však dochází k jejich uvolňování a kontaminaci přírodních matric.

Většina vědeckých prací je zaměřena především na hodnocení jejich toxikologických aspektů, v rámci hodnocení rizikovosti pracovního prostředí, zatímco ekotoxikologická hlediska stojí na pozadí nebo jsou limitována nedostatkem relevantních informací.

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s panem Ing. Jiřím Brejchou, materiálovým vývojářem pražské pobočky společnosti Mitas a.s. Mitas a.s. (člen skupiny Trelleborg), působící v České Republice od 30. let 20. století, je významným evropským výrobcem a distributorem zemědělských, motocyklových a industriálních pneumatik uváděných pod značkami Mitas, Cultor a Continental. Na území republiky se v současnosti nachází 3 výrobní zařízení, a to v Praze, Zlíně a Otrokovicích.

Pro účely této práce byly vybrány gumárenské suroviny typu antidegradant, aktivátor a plniva, které se přidávají do kaučukových směsí a následně podléhají vulkanizaci.

2 Cíl práce a vědecké hypotézy

Cílem této diplomové práce je analyzovat akutní a chronickou ekotoxicitu vybraných látek užívaných při výrobě pneumatik při simulaci jejich úniku do životního prostředí z výrobních zařízení nebo při transportu.

Vědecké hypotézy:

- 1) Při úniku do půd s odlišnými vlastnostmi (půdní druh, obsah organických látek, pH) vykazují látky odlišné ekotoxické účinky.
- 2) Stresové reakce rostlin se druhově liší.

3 Literární rešerše

3.1 Vulkanizace kaučuku

Moderní výrobní proces je několikastupňový a zahrnuje přípravu jednotlivých polotovarů, konfekci, lisování, vulkanizaci a závěrečnou kontrolu kvality (Macín a Zítek, 1985). Prim ve výrobě zastupuje tvorba kaučukové směsi, která je v další etapě podrobena vulkanizaci.

Kaučuk je látka polymerního charakteru s termoplastickými vlastnostmi, která může být původem přírodního (kaučuk obsažený v latexu) nebo syntetického (Ducháček a Hrdlička, 2009; Macín a Zítek, 1985). Mezi nejpoužívanější syntetické kaučuky s všeobecným využitím je řazen butadien-styrenový (SBR), butadienový (BR), karboxylovaný SBR (XSBR) aj., které se vzájemně liší fyzikálně-mechanickými vlastnostmi (Ducháček a Hrdlička, 2009). Přírodní kaučuk je nejdříve nutné upravit tzv. plastikací, při níž dochází intenzivním hnětením ke snížení střední molekulové hmotnosti a tím ke zvýšení zpracovatelnosti. V současné výrobě však dominují kaučuky syntetické, které jsou dodávány již ve zpracovatelné formě (Ducháček a Hrdlička, 2009).

Ke kaučuku je dávkována široká škála funkčních aditiv, zahrnující vulkanizační činidla, urychlovače a aktivátory, retardéry, změkčovadla, plnidla, antidegradanty, pigmenty aj. (Macín a Zítek, 1985) a výsledná směs je následně mícháním homogenizována na požadovanou úroveň (Ducháček a Hrdlička, 2009). Kaučuková směs je vulkanizována a tlakově zpracována ve vulkanizačním lisu (Macín a Zítek, 1985).

Základním principem vulkanizace je realizace chemické reakce, při níž dochází za účasti činidla, nejčastěji elementární síry, a působení zvýšeného tlaku a teploty k transformaci lineárních či rozvětvených vazeb mezi kaučukovými uhlovodíky na struktury síťované, resp. příčné. Síťovaná struktura umožňuje materiál vystavit silným mechanickým deformacím bez ireverzibilních následků. Výsledný produkt se nazývá vulkanizát, který má oproti surovému kaučuku vyšší pevnost, odolnost a nižší rozpustnost (Ducháček a Hrdlička, 2009).

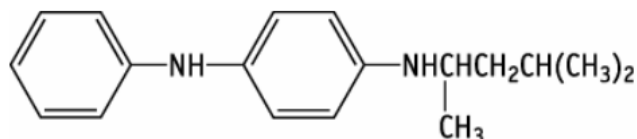
3.2 Charakteristika vybraných látek

3.2.1 6PPD a jeho význam v gumárenské výrobě

6PPD, resp. N-(1, 3-dimethylbutyl)-N'-fenyl-1,4-fenylendiamin (CAS 793-24-8), je komerčně využívaným antidegradantem přidávaným do vulkanizovaných kaučukových

směsí za účelem ochrany materiálu před snižováním kvality působením vnějších vlivů (Černá a kol., 2012). Obecně zabraňuje stárnutí a předčasnému ukončení životnosti pneumatik.

Obr. č. 1: Strukturální vzorec sloučeniny 6PPD, převzato z OECD (2004).

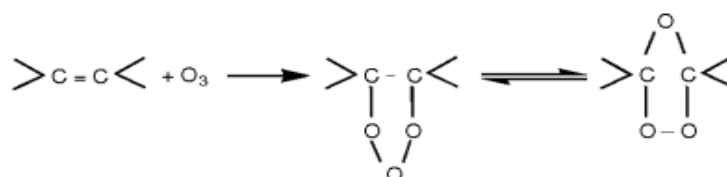


Polymery vybraných kaučuků (zejména přírodních) jsou náchylné k degradacím vlivem absence nasycených vazeb v jejich řetězcích, což způsobuje nižší odolnost vůči zvýšené teplotě, kyslíku, ozonu, UV záření aj. (Narathichat a kol., 2010).

Průměrný obsah antidegradantů v pneumatice činí (<1)1 – 2 % hm. (Councell a kol, 2004; Göran, 2013; Odpadové fórum, 2004). Dle mechanismu účinku je lze obecně dělit na antiozonanty a antioxidanty, 6PPD je řazeno k antidegradantům s kombinovanými účinky (Ducháček a Hrdlička, 2009). Většina antioxidantů používaných v gumárenském průmyslu jsou aminy či jejich deriváty (Narathichat a kol., 2010), za nejúčinnější antiozonanty jsou pak považovány tmavě zbarvené deriváty *p*-fenylendiaminu, tzv. PPDs (Ducháček a Hrdlička, 2009; Taimr a Pospíšil, 1980).

Principem antiozonantů je ochrana kaučuků před negativním vlivem ozonu přítomného v ovzduší a půdě. Ozon je silným oxidantem atakujícím dvojnou vazbu kaučukových uhlovodíků za vzniku ozonidů, sloučenin způsobujících křehnutí materiálu a tvorbu prasklin vedoucích až k jeho mechanické destrukci (Cataldo a kol., 2014; Ducháček a Hrdlička, 2009). Účelem antiozonantů je difundovat k povrchu materiálu a zastoupit dvojnou vazbu v polymerech v reakci s ozonem. V technické literatuře se lze v tomto kontextu setkat s označením ozone scavenger, tzv. „vyčytávač ozonu“ (Cataldo a kol., 2014, Huntink a kol., 2006).

Obr. č. 2: Reakce O₃ s dvojnou vazbou mezi uhlíky vedoucí k tvorbě ozonidu, převzato z Ducháček a Hrdlička (2009).



Antioxidační schopnost 6PPD spočívá v ochraně pryže před negativními účinky působení radikálových forem kyslíku, jejichž vlivem dochází k poškození C-H a C-C vazeb v kaučukových polymerech a následnému spuštění autokatalytické oxidační reakce. Tímto procesem vznikají nestabilní uhlíkové radikály schopné odštěpovat atomy vodíku z dalších molekul a vytvářet tak hydroxoperoxidy a jiné uhlíkaté radikály, čímž dochází k celkové destabilizaci matrice materiálu. Účelem antioxidačních aditiv je blokovat a rozkládat vznikající peroxidové radikály, což vede k terminaci řetězové reakce (Ducháček a Hrdlička, 2009; Narathichat a kol., 2010; Rapta a kol., 2009). 6PPD dále poskytuje ochranu před katalytickou degradací působením mědi a jiných těžkých kovů (OECD, 2004).

3.2.1.1 Složení a vlastnosti 6PPD

6PPD se vyrábí v tekutém nebo pevném skupenství, nejčastěji ve formě hnědofialových pastilek, které jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech typu aceton, benzen aj. (Ducháček a Hrdlička, 2009). Rozpustnost ve vodě je nízká, uvádí se 1 mg/l při 20 °C, teplota tání je stanovena na 50 °C a molární hmotnost činí 268,41-268,5 g/mol (OECD, 2004; Van Vlaardingen a kol., 2003).

Obr. č. 3: Granule 6PPD, zdroj obr.: autorka práce.



Výroba spočívá v reakci 4-aminodifenylaminu s methylisobutylketonem (MIBK) v uzavřeném systému následované katalytickou hydrogenací a odseparováním přebytku methylisobutylketonu. 6PPD vykazuje, v závislosti na parametrech výroby, průměrnou čistotu 98 %, příměsí tvoří N, N-bis-(4-N'-(1',3'-dimethylbutyl) aminofenyl)-N-fenylamin,

N-(4-aminofenyl)-anilin a N-(1'-(2'-methylpropyl)-3',5'-dimethylhexyl)-N'-fenyl-1,4-fenyl diamin (OECD, 2004).

3.2.1.2 Toxicita 6PPD

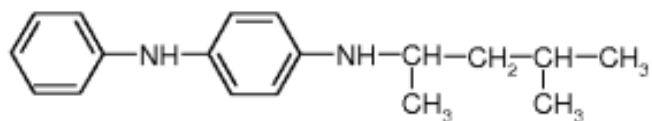
K absorpci 6PPD dochází prostřednictvím gastrointestinálního traktu, pokožky a respirační (BUA, 1998; OECD 2004). K nejčastějším případům expozice dochází skrze tkáň pokožky a plic, což vede ke zvýšené detekci dýchacích a kožních obtíží u pracovníků gumárenských provozů (Hervé-Bazin a kol., 1977; Knejzlík a kol., 2000). Přestože je těkavost a prašnost 6PPD nízká, při vyšších teplotách dochází k navýšení jeho koncentrace v ovzduší (OECD, 2004).

Při orální intoxikaci organismu je akutní toxicita hodnocena jako mírná. U pokusných potkanů byly indikovány příznaky zahrnující snížení aktivity, hypotermie, snížení dechové frekvence (bradypnoe), průjmy a projevy spojené s patologickými lézemi dýchacích a trávicích orgánů. OECD (2004) uvádí průměrnou hodnotu LD_{50} , u samic potkanů na 893 mg/kg živé hmotnosti, resp. v rozmezí 500 – 1000 mg/kg, u samců na 1005 mg/kg, resp. 1000 – 2000 mg/kg. BUA (1998) uvádí souhrnnou hodnotu LD_{50} pro potkany a myši > 2000 mg/kg. Projevy chronické toxicity při opakované perorální aplikaci poukázaly vliv 6PPD na krevní buňky (výskyt anémie a trombocytózy) a na funkce jater (ztučnění, nárůst hmotnosti) (OECD, 2004), dále byl pozorován účinek na funkce ledvin a sleziny (BUA, 1998). Na základě výzkumů 28 – 48 denní expozice byly stanoveny hodnoty NOAEL= 6 mg/kg/den a LOAEL= 25 mg/kg/den. Při expozicích o délce od 13 týdnů do 24 měsíců byly stanoveny hodnoty vyšší (NOAEL= 75 mg/kg/den a LOAEL > 75 mg/kg/den), což detekuje nízkou biodostupnost 6PPD pro exponované organismy (OECD, 2004).

Provedené testy akutní toxicity při dermální aplikaci vykázaly příznaky v podobě nechutenství, snížení aktivity a letargie. U králíků byla stanovena hodnota LD_{50} > 3000 mg/kg živé váhy, přičemž úhyn pokusných zvířat je spojován se sníženým příjmem potravy. OECD (2004) hodnotí 6PPD jako mírně, případně středně dráždivé.

Struktura sloučeniny vykazuje podobnost s dříve hojně využívaným antiozonantem uváděným pod označením IPPD (N-izopropyl-N'-fenyl-p-fenylendiamin). IPPD je sloučenina extrahovatelná vodou a při styku s pokožkou způsobuje u citlivých jedinců silné alergické reakce projevující se zarudnutím kůže a tvorbou puchýřů (Ducháček a Hrdlička, 2009; Hervé-Bazin a kol., 1977).

Obr. č. 4: Struktura IPPD, převzato z Ducháček a Hrdlička, 2009.



Přestože je u 6PPD p-fenylendiamin substituován vyššími alkyly, což snižuje jeho rozpustnost ve vodě (Ducháček a Hrdlička, 2009), byla evidována řada případů pozitivních alergických reakcí u pracovníků, u nichž byla potvrzena také alergie na IPPD a vybrané další antidegradanty (Fontana a kol., 2001; Hervé-Bazin a kol., 1977).

V souvislosti s bezpečností pracovního prostředí byly také prováděny testy na přítomnost 6PPD v organismu pracovníků, které potvrdily nález antidegradantu v moči za standardních pracovních podmínek v koncentraci 0,1– 1,3 $\mu\text{g/l}$ (OECD, 2004), ve zhoršených pracovních - hygienických podmínkách dokonce v rozmezí 9,4– 236,7 $\mu\text{g/l}$ (Pavan a kol., 1987).

U 6PPD nebyly prokázány mutagení (BUA, 1998; Zeiger a kol., 1987), klastrogenní (George a Kuttan, 1996) ani teratogenní účinky (OECD, 2004). V 80. letech bylo 6PPD považováno za potenciální karcinogen (Pavan a kol., 1987), analýzy však jeho karcinogenitu nepotvrdily (BUA, 1998; Nilsson a kol., 2008, OECD, 2004).

3.2.1.3 Ekotoxicita a osud 6PPD v životním prostředí

6PPD svým industriálním charakterem odpovídá definici xenobiotika, jakožto syntetické látky, která se v životním prostředí přirozeně nevyskytuje a organismy vůči ní nemají vyvinuty adaptační mechanismy (Chromá a kol., 2001; Stiborová a kol., 2004). Vzhledem k organické povaze sloučeniny a schopnosti antidegradantu migrovat v matrici materiálu jsou jeho výskyt a chování v životním prostředí předmětem výzkumů.

Obecně jsou xenobiotika typu aromatických aminů, fenolátů, nitroaromátů aj. oxidována v procesu biotransformace za působení enzymů oxygenas (mono- a dioxygenas), často v kooperaci s peroxidasami (Stiborová a kol., 2004). 6PPD je však téměř rezistentní vůči biotransformačním procesům, na druhou stranu rychle podléhá abiotické a biotické degradaci za vzniku N-fenyl-p-benzochinoniminu, 1,3-dimethylbutylaminu a 4-hydroxydifenylaminu. Mezi faktory determinující průběh degradačních procesů patří množství kyslíku, hodnota pH, přítomnost těžkých kovů a teplota (OECD, 2004).

Obr. č. 5: 1,3-dimethylbutylamin a 4-hydroxydifenylamin, převzato z <http://www.chemicalbook.com/> a <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.



Testy abiotické degradace ve vzorcích přírodních vod prokázaly 57% účinnost odstranění po 2 hodinách a až 97% po 22 hodinách testování. Ve vodách o nízkém pH a nízké teplotě činí doba odhadované stability 6PPD týdny, zatímco poločas rozpadu je při 25 °C pouhý den. Akcelerátory procesu jsou ve vodě přítomný kyslík a případná stopová množství těžkých kovů (OECD, 2004; Van Vlaardingen a kol., 2007). 6PPD je dále citlivé na působení slunečního záření a snadno podléhá fotolýze, poločas rozpadu v atmosféře je odhadován na 1 hodinu (BUA, 1998).

Pro analýzu vlivů na mikrobiální společenstva byly provedeny testy s aktivovaným kalem sledující vliv 3 hodinové expozice na spotřebu kyslíku, z nichž vyplývá hodnota EC₅₀ v rozmezí 420 – 450 mg/l (Nilsson a kol., 2008; OECD, 2004). Tyto testy mají však jen odhadový charakter, neboť 6PPD jako antioxidant reaguje s kyslíkem (BUA, 1998). Testovací organismy kalu dále slouží k hodnocení mikrobiologické degradability, která při 28 denních pokusech vykazovala účinnost pouhých 2 % (OECD, 2004), při 32 denní analýze došlo k mineralizaci pouze 7,2 % vzorku (BUA, 1998; Nilsson a kol., 2008).

Z ekotoxikologického hlediska vykazuje 6PPD značné riziko bioakumulace, stanovené hodnoty logaritmu koeficientu oktanol-voda (log K_{ow}) překračují limitní hranici 3. OECD (2004) uvádí pro log K_{ow} hodnotu 4,68 a Nilsson a kol. (2008) 5,4. Testy na kapru obecném (*Cyprinus carpio*) prokázaly také mírnou bioakumulační schopnost vybraných produktů degradace 6PPD, zejména N-fenyl-p-benzochinonaminu a 1,3-dimethylbutylaminu (OECD, 2004).

V návaznosti na výsledky akutních testů ekotoxicity pro vodní organismy (tab. č. 1) bylo zjištěno, že 6PPD představuje v rámci tří sledovaných trofických úrovní nejvyšší riziko pro ryby. Vzhledem k rychlosti degradace látky ve vodě je však limitována míra její potenciální kumulace ve vodních organismech (Nilsson a kol., 2008; OECD 2004). Dle hodnocení ECHA a REACH (nařízení o registraci, evaluaci a autorizaci chemických látek) nesplňuje 6PPD kritéria pro klasifikaci látky jako tzv. PBT (perzistentní, bioakumulativní a toxická) pouze v oblasti perzistence.

Tab. č. 1: Výsledky testů ekotoxicity 6PPD při expozici variabilních organismů

Exponovaný organismus	LC ₅₀ /EC ₅₀ /NOEC
Slunečnice velkoploutvá (<i>Lepomis macrochirus</i>)	LC ₅₀ 24 hod = 0,65 mg/l (BUA, 1998) LC ₅₀ 96 hod = 0,4 mg/l (Nilsson a kol., 2008)
Pstruh duhový (<i>Salmo gairdneri</i>)	LC ₅₀ 96 hod = 0,14 mg/l (Nilsson a kol., 2008)
Medaka japonská (<i>Oryzias latipes</i>)	LC ₅₀ 96 hod = 0,028 mg/l (OECD, 2004)
Jeleček velkohlavý (<i>Pimephales promelas</i>)	LC ₅₀ 96 hod = 0,45 mg/l (BUA 1998; Van Vlaardingen a kol., 2007) LC ₅₀ 96 hod = 0,15 mg/l (Nilsson a kol., 2008) LC ₅₀ 28 d = 0,15 mg/l (OECD, 2004)
Hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ 48 hod = 0,51 – 0,82 mg/l (Nilsson a kol., 2008) EC ₅₀ 48 hod = 0,23 mg/l (Van Vlaardingen a kol., 2003) NOEC = 0,25 mg/l (Nilsson a kol., 2008)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ 96 hod = 0,6 mg/l (Nilsson a kol., 2008; OECD, 2004) NOEC = 0,2 mg/l (OECD, 2004)

3.2.2 Oxid zinečnatý a jeho význam

Variabilita vlastností oxidu zinečnatého (CAS 1314-13-2) determinuje možnosti jeho aplikace v gumárenské výrobě. Pro zvýšení odolnosti vybraných kaučuků vůči oxidaci podléhajícím kyselinám se dávkuje jako vulkanizační činidlo (nejčastěji ve směsi s oxidem hořečnatým), které participuje na vytváření příčných vazeb mezi řetězci kaučukových uhlovodíků. V současné výrobní technologii figuruje zejména jako aktivátor při vulkanizaci elementární sírou, jehož vlivem dochází k navýšení kvantity příčných vazeb až o 60 %, a tím k úspoře vulkanizačních činidel. Oxid je však nutné převádět na formu rozpustnou v kaučuku přidávkem mastných kyselin (Ducháček a Hrdlička, 2009; ECB, 2008; Fishbein, 1991).

V minulosti byla spotřeba ZnO vyšší, využíval se například jako světlý pigment (tzv. zinková běloba) nebo jako enzymatický jed při stabilizaci přírodních kaučuků, kde paradoxně nahrazoval stabilizátory na bázi amoniaku (Ducháček a Hrdlička, 2009).

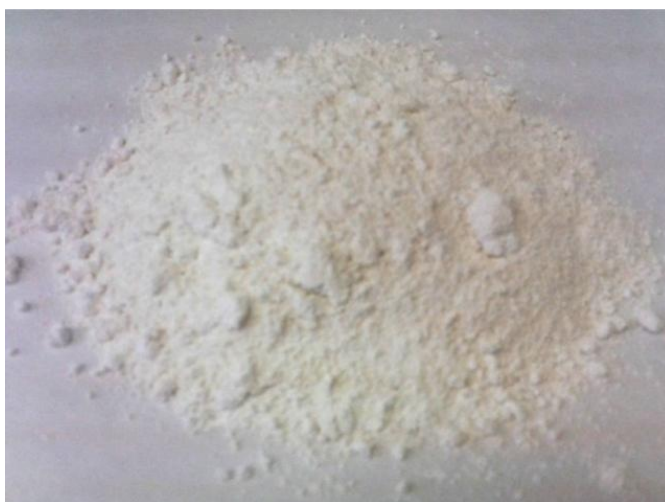
S ohledem na vysokou cenu a také environmentální rizika se v současnosti dávkuje malé množství, průměrně tvoří kolem 1 – 2 % hmotnosti pneumatiky (Moezzi a kol., 2012). Efekty oxidu zinečnatého na konečný produkt zahrnují zvýšení tepelné a

mechanické odolnosti, přilnavosti, snížení negativních vlivů UV záření a zpevnění vazby mezi pryží a ocelovou konstrukcí (ECB, 2008; Moezzi a kol., 2012).

3.2.2.1 Složení a vlastnosti oxidu zinečnatého

Oxid zinečnatý se aplikuje v podobě bílého nebo nažloutlého prášku bez zápachu a chuti, s částicemi o velikosti v rozmezí 0,1 – 10 μm (100 – 10 000 nm) v závislosti na výrobní technologii a požadovaných vlastnostech. Čistota materiálu se pohybuje nad 90 % a jako příměsi figurují olovo, kadmium, železo, minerální oleje a minoritní podíl organických a anorganických částic a kyselin (ECB, 2008; EPA, 1987; Moezzi a kol., 2012).

Obr. č. 6 : Oxid zinečnatý, zdroj obr.: autorka práce.



Kovový zinek se získává buď těžbou, nebo elektrolyticky, a výsledný produkt vzniká jeho oxidací. Dlouhodobě je 50 – 60 % světové produkce oxidu zinečnatého využíváno právě v gumárenském průmyslu (Ducháček a hrdlička, 2009; Moezzi a kol., 2012).

Molární hmotnost ZnO je stanovena na 81,38 g/mol, rozpustnost ve vodě je nízká, < 1,6 mg/l, je však dobře rozpustný v kyselinách, hodnota pH se pohybuje kolem 8. Při působení vysokých teplot zůstává stabilní, jeho teplota tání je vyšší než 1975 $^{\circ}\text{C}$ (ECB, 2008; Moezzi a kol., 2012).

3.2.2.2 Toxicita oxidu zinečnatého a jeho příměsí

Toxické účinky oxidu zinečnatého je nutné posuzovat ze dvou hledisek. První zastupuje samotná jeho prášková forma a druhé frakce uvolnitelné z matrice materiálu v podobě zinečnatých, kademnatých a olovnatých iontů.

Pevný oxid je dle GHS (Globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií) považován za netoxický (Moezzi a kol., 2012; Wang a kol., 2008). Provedené testy neindikovaly mutagenní nebo teratogenní účinky (EPA, 1987; Moezzi a kol., 2012). Oxid zinečnatý také nevykazuje přímou karcinogenitu, některé studie se však věnují jeho nepřímému vlivu na formaci tumorů, při níž může figurovat buď jako inhibitor, nebo akcelerátor růstu nádoru (EPA, 1987; Kasprzak a kol., 1988).

K expozici práškovou formou oxidu zinečnatého dochází nejčastěji inhalací, požitím nebo epitelem pokožky (EPA, 1987). Inhalace pevných částic může vyvolat projevy tzv. zinkové horečky vznikající při inhalaci par a zahrnující zimnici, kašel, horečku, napětí na hrudníku aj. (Moezzi a kol., 2012; Warheit a kol., 2009). V případě velmi malých částic dochází k jejich depozici v plicních sklípcích, kde je jejich další osud ovlivněn rozpustností ve vodě a fyziologickým stavem plic (EPA, 1987).

Při testech na potkanech se projevila schopnost oxidu vyvolat nedědičné chromozomální poškození, při němž dochází k navýšení počtu hyperdiploidních buněk v kostní dřeni při expozičních koncentracích 0,1 a 0,5 mg/m³ (EPA, 1987).

Novější studie věnují pozornost zejména účinkům nanočástic oxidu zinečnatého, jehož světová produkce neustále roste. Oproti klasickému oxidu se odlišují velikostí primárních částic a specifického povrchu, což jsou vlastnosti, které ovlivňují možnosti jejich rozptýlení a účinků (Bhuvaneshwari a kol., 2015; Xia a kol., 2008). Wang a kol. (2008) studoval na myších akutní toxicitu jednorázové orální aplikace částic práškového oxidu o velikosti 20 a 120 nm. U obou velikostních frakcí bylo pozorováno zvýšení viskozity krve způsobené navýšením míry koagulace, což může vést k potencionálnímu riziku srdeční ischemie. LD₅₀ jednorázové expozice u myší bylo stanoveno na 7 950 mg/kg a jako cílové orgány působení částic o velikosti 120 nm byly determinovány žaludek, srdce, játra a slezina. Nanočástice také vykazují značně toxické účinky vůči G⁻ a G⁺ bakteriím, zatímco jejich vliv na T-lymfocyty je minimální (Reddy a kol., 2007). Ve specifických buněčných testech prokázaly také poškození buněk vyvolané oxidačním stresem a záněty (Xia a kol., 2008). Existují však rozdílné názory na příčiny toxicity oxidu zinečnatého, ať již v podobě prášku nebo nanočástic (Chen a kol., 2016). Dle některých

názorů stojí za negativními účinky primárně fyzikální vlastnosti částic (Kumari a kol., 2011), jiní přisuzují vyšší vliv uvolněným zinečnatým kationtům (Chen a kol., 2016), případně kombinaci obou faktorů (Kim a kol., 2016).

Zinek je pro organismy prvkem esenciálním, a to přestože se jedná o těžký kov (Kader a kol., 2015). Je součástí vybraných metalloenzymů (např. proteázy, RNA polymerázy, některých dehydrogenáz), slouží k maximalizaci katalytické funkce vybraných enzymů, hraje důležitou roli v metabolismu proteinů, nukleových kyselin aj. (EPA, 1987). Některé analýzy detekují určitý stupeň ochrany zinku před teratogenními a dalšími účinky kadmia (Chemek a kol., 2016; Moezzi a kol., 2012; Onosaka a Tanaka, 1991).

Perorálně přijatý zinek je absorbován skrze tkáň gastrointestinálního traktu, nejvíce pak ve dvanácterníku. Odhadem 70 – 80 % z celkové dávky je následně exkretováno stolicí, močí a potem. Při akutní expozici dochází k nevolnosti, zvracení, letargii, vysokým teplotám a dalším příznakům, chronické účinky jsou spojeny s detekcí kovové chuti v ústech, vznikem anémie z kompetice s mědí a dlouhodobými gastrointestinálními potížemi (EPA, 1987).

Kromě zinečnatých kationtů představují další separovatelné složky zejména kationty olovnaté a kademnaté.

Olovo je těžký kov vyznačující se specifickou orgánovou toxicitou. Flora a kol. (2012) a Hodgson (2004) uvádí, že 85 – 95 % přijatého olova je deponováno v kostech a zdaleka nejcitlivější odezvu na intoxikaci vykazuje nervový systém. V rámci periferní nervové soustavy způsobuje olovo patologické změny a degeneraci motorických axonů (encefalopatie), v centrální nervové soustavě se pak projevuje asymptomaticky. Při chronické expozici dochází k vyvolání demence a dalších neurologických onemocnění (Landrigan, 1989). Přítomnost olova v organismu dále vyvolává několik typů anémie, při níž dochází k poškození biosyntézy hemu inhibicí cytoplasmatického enzymu ALA-D (typu dehydratázy), mitochondriální ferrohelatázy a hem syntézy a dále k urychlení destrukce erytrocytů (Flora a kol., 2012; Hodgson, 2004; Landrigan, 1989). Zinek však působí antagonisticky vůči olovu tím, že inhibuje jeho absorpci v gastrointestinálním traktu (Cerklewski a Forbes, 1976).

Také kadmium spadá do kategorie toxických těžkých kovů. Dle IARC (1993) je řazeno mezi látky pro člověka prokazatelně karcinogenní (skupina 1), dále se vyznačuje mutagenními (Jin a kol., 2003) a teratogenními účinky (Onosaka a Tanaka, 1991). Při perorálním vstupu dochází ke vstřebání odhadem 7 % celkové dávky tkáněmi

gastrointestinálního traktu (Ninkov a kol., 2016) a následnému transportu krví do specifických orgánů, v nichž se dlouhodobě kumuluje (Chang a kol., 2012; Ninkov a kol., 2016). Cílovými orgány jsou zejména játra, ledviny a v případě inhalace také plíce (Chang a kol., 2012; Hodgson, 2004). Akutní otrava kadmíem se projevuje poškozením střevního epitelu, nevolností, zvracením a bolestí břicha a při inhalaci otokem plic (Hodgson, 2004; Ninkov a kol., 2016). Při dlouhodobé expozici vykazuje hepatotoxicitu a nefrotoxicitu vyvoláním imunosuprese. Jeho přítomnost podmiňuje tvorbu leukocytů, které napadají zdravé buňky organismu a vyvolávají v nich oxidační stres a záněty vedoucí k dysfunkci a následnému selhání jater a zejména ledvin (Chang a kol., 2012; Järup a Åkesson, 2009; Ninkov a kol., 2016). Dále může způsobovat poškození kostí a rozedmu plic (Chang a kol., 2012). Kadmium vykazuje velmi vysoký biokoncentrační faktor (Thompson a kol., 2005), vzhledem k obtížné exkreci z organismu. Chang a kol. (2012) odhaduje jeho poločas života na 15 – 20 let, Hodgson (2004) až na 30 let.

V reakci organismu na přítomnost těžkých kovů (Zn, Cd, Pb aj.) hraje významnou roli nízkomolekulární protein metallothionein. Metallothionein obsahuje speciální komplex složený z cysteinových reziduí thioneinu, dále z histidinu a aromatických kyselin, který je schopen adsorbovat ionty těžkých kovů a snížit tím jejich toxicitu a dostupnost pro organismus (EPA, 1987; Hodgson, 2004; Matyja a kol., 2016; Onosaka a Tanaka, 1991). Takto navázané kovy jsou poté deponovány např. v játrech (EPA, 1987). Přítomnost těžkých kovů vyvolává biosyntézu proteinu v žaludku, ledvinách, játrech a také tenkém střevě (Onosaka a Tanaka, 1991).

3.2.2.3 Ekotoxicita oxidu zinečnatého a jeho příměsí

Výzkum Locka a Janssen (2003) zahrnuje porovnání ekotoxických účinků různých forem zinečnatých sloučenin při sledování populací žížaly hnojní (*Eisenia fetida*), roupice bělavé (*Enchytraeus albidus*) a chvostoskoka (*Folsomia candida*). Z jejich výsledků vyplývá, že oxid zinečnatý dispergovaný v půdním roztoku vykazuje nižší toxické účinky než sloučeniny ve vodě lépe rozpustné (zinečnaté soli). Ovšem v případě, kdy jsou jeho částice volně rozptýleny v půdě a jsou exponovány organismem zkonzumovány, vykazuje toxicitu naopak nejvyšší.

Přestože je oxid zinečnatý ve vodě téměř nerozpustný, působením externích podmínek dochází k uvolňování zinečnatého iontu Zn^{2+} (EPA, 1987). Francis a Dodge (1988) uvádí 100% rozpustnost částic při 40 hodinovém testu za přítomnosti anaerobních, dusík fixujících bakterií rodu *Clostridium sp.* K uvolnění frakcí dochází produkcí

mikrobiálních metabolitů a snížením hodnoty pH. Mobilita a dostupnost Zn^{2+} koreluje s hodnotou pH, tvrdostí vody, teplotou a množstvím rozpuštěného kyslíku (Nikinmaa, 2014; Skidmore, 1964). Vysoké pH vody, případně její vyšší tvrdost, limituje toxicitu zinku (Nikinmaa, 2014; Wik, 2007).

Zinečnatý iont vykázal prokazatelnou toxicitu pro břichatku *Ceriodaphnia dubia* (Wik, 2007), pro nálevníky druhu *Tetrahymena thermophila* (Moezzi a kol., 2012) a další vodní organismy, zejména ryby (McRae a kol., 2016). Při testech akutní toxicity byla pro *Daphnia magna* stanovena LD_{50} 36 hod na 861,06 $\mu\text{g/l}$, pro 96 hod na 67,91 $\mu\text{g/l}$, přičemž vyšší míra tolerance dafnií je dána přítomností zinku v jejich potravě. Obecný odhad hodnoty LD_{50} pro obratlovce se pohybuje v rozmezí 1,5 – 20,1 mg/l , pro bezobratlé 0,50 – 58,1 mg/l (Attar a Maly, 1982). Účinky se projevují kyslíkovým deficitem v důsledku ztlustění lamelárního epitelu žáber (Nikinmaa, 2014), nedostatkem vápníku vlivem kompetice (McRae a kol., 2016) a při dlouhodobém působení úhynem v důsledku oxidačního stresu (Skidmore, 1964; McRae a kol., 2016).

Mezi vizuální projevy fytotoxicity zinečnatého kationtu jsou řazeny chlorózy žilnatiný, červeně nebo žlutě zbarvené olistění a zakrslý vzrůst rostlin vlivem inhibice elongace a buněčného dělení (EPA, 1987). Nadbytek zinku vede k oxidačnímu stresu vznikajícímu generováním volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, které poškozují membránové lipidy, proteiny, pigmenty a nukleové kyseliny, dále ovlivňuje homeostatický systém snížením příjmu a transportu dalších esenciálních živin (Jiang a Wang, 2008).

Těžké kovy představují riziko na několika úrovních. Již ve stopovém množství vyvolávají u individuálních organismů negativní účinky a svou schopností vysoké bioakumulace narušují potravní řetězce. Jejich biodostupnost je limitována zejména hodnotou pH, jehož snížení většinou zvyšuje jejich mobilitu a tím i rizika (Thompson a kol., 2005; Wang a kol., 2016).

Kadmium a olovo patří, na rozdíl od zinku, mezi prvky neesenciální (Mustafa a Komatsu, 2016). Olovo přítomné v rostlinných tkáních ovlivňuje příjem minerálů a vody, čímž limituje růstové schopnosti rostlin, a dále inhibuje aktivitu -SH skupin vybraných enzymů (Jacquart a kol., 2016).

Fytotoxické účinky kadmia jsou determinovány nejen jeho koncentrací v půdě, ale také rostlinným genotypem (Irfana a kol., 2014). Přestože se jedná o prvek nežádoucí, rostliny jej dokáží velmi jednoduše přijímat kořenovým systémem (Laspina a kol., 2005; Lindberg a kol., 2007). Ionty kadmia (Cd^{2+}) transportované do buněk se navazují na membrány a enzymy, přičemž porušují jejich stabilitu a funkci (Irfana a kol., 2014;

Laspina a kol., 2005). Byl prokázán jejich negativní vliv na metabolické procesy, zahrnující zejména fotosyntézu a respiraci, a dále na příjem vody a živin (Irfana a kol., 2014; Romero-Puertas a kol., 2007), přičemž k nejvyšší kompetici dochází s hořčíkem, sodíkem a železem (Lindberg a kol., 2007). Vzhledem k chemické podobnosti s některými nutrienty (Zn, Ca, Fe) může vlivem kadmia docházet k jejich vytěšňování z vybraných proteinů (Mustafa a Komatsu, 2016) a kompetici v příjmu (Wang a kol., 2016). Podobně jako u zinku, dochází i působením kadmia k vyvolání oxidačního stresu tvorbou volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, což vede ke zvýšení propustnosti buněčných membrán, inaktivaci vybraných enzymů a poškození nebo mutaci DNA (Romero-Puertas a kol., 2007). Následkem kontaminace kadmia dochází také k inhibici růstu rostlin (Laspina a kol., 2005; Wang a kol., 2016).

Při testech akutní toxicity Cd^{2+} na populaci *Daphnia magna* byla stanovena LD_{50} 36 hod na 203,80 $\mu g/l$, pro 96 hod na 5 $\mu g/l$ a prahová dávka $< 3,4 mg/l$. Pro obratlovce se hodnota LD_{50} pohybuje v rozmezí 0,11 – 8,4 mg/l , pro bezobratlé 0,07 – 8,4 mg/l (Attar a Maly, 1982). Příjem Cd^{2+} organismem je svázán s transportními mechanismy vápníku a železa (Lindberg a kol., 2007), Pb^{2+} je absorbováno červenými krvinkami (Thompson a kol., 2005). U živočichů dochází k tvorbě komplexů s metalothioneniny a jejich následné depozici zejména v játrech, ledvinách a žaludku (Thompson a kol., 2005).

Tab. č. 2: Porovnání ekotoxicity zinku a kadmia

Exponovaný organismus	LC_{50}
Slunečnice velkoploutvá (<i>Lepomis macrochirus</i>)	LC_{50} 96 hod (Zn^{2+}) = 5,38 mg/l (Mount, 1966) LC_{50} 96 hod (Cd^{2+}) = 1,94 mg/l (Picketing a Henderson, 1966)
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	LC_{50} 96 hod Zn^{2+}) = 7,8 mg/l LC_{50} 96 hod (Cd^{2+}) = 0,24 mg/l (Rehwoldt a kol., 1972)
Jeleček velkohlavý (<i>Pimephales promelas</i>)	LC_{50} 96 hod (Zn^{2+}) = 6,2 – 13,7 mg/l LC_{50} 96 hod (Cd^{2+}) = 0,63 – 1,05 mg/l (Picketing a Henderson, 1966)
Motýlice (<i>Zygoptera sp.</i>)	LC_{50} 96 hod (Zn^{2+}) = 26,2 mg/l LC_{50} 96 hod (Cd^{2+}) = 8,1 mg/l (Rehwoldt a kol., 1973)
<i>Gammarus sp.</i>	LC_{50} 96 hod (Zn^{2+}) = 8,1 mg/l LC_{50} 96 hod (Cd^{2+}) = 0,07 mg/l (Rehwoldt a kol., 1973)

Biochemickou ochranu rostlin před toxicitou těžkých kovů zajišťují zejména fytochelatiny. Jedná se o peptidy bohaté na -SH skupiny a s obecnou strukturou (γ -Glu-Cys)_{n-x} (n = 2–11, X = Gly, Ser, β -Ala, Glu, Gln), vznikající transpeptidázovou reakcí glutathionu v buněčném cytosolu katalyzovanou enzymem fytochelatinsynthasou (Fišer a kol., 2014; Jacquart a kol., 2016; Lindberg a kol., 2007). K aktivaci enzymu dochází v přítomnosti kovových iontů (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} aj.), které jsou následně pomocí thiolových skupin na fytochelatiny navázány a vzniklé komplexy jsou aktivně transportovány do vakuol nebo exkretovány z buněk (Fišer a kol., 2014; Lindberg a kol., 2007).

3.2.3 Retortové saze a jejich význam

Pojem saze (CAS 1333-86-4) představuje obecný název pro skupinu průmyslově vyráběných sloučenin, jež jsou tvořeny téměř sférickými částicemi elementárního uhlíku spojenými do agregátů (IARC, 2010). Jedná se o světově nejpoužívanější nanomateriál s částicemi o velikosti desítek až stovek nanometrů, vyznačující se velkým specifickým povrchem (Ducháček a Hrdlička, 2009; IARC, 2010). Okolo 90 % světové produkce sazí je využíváno v gumárenském průmyslu, z toho 65-70 % zastupuje výroba pneumatik (IARC, 2006; Straif a kol.; 2000).

Na základě principu výroby a použitých vstupních surovin lze rozlišit několik jejich typů (lampové, kanálové, termické aj.), s převažující výrobou ze syntetických kaučuků však 95 % celkové produkce zastupují saze retortové (Ducháček a Hrdlička, 2009; IARC, 2010; Janík, 1999).

Gumárenské saze slouží jako pigmenty se schopností absorpce UV záření, čímž snižují riziko degradace materiálu, a zejména jako aktivní plniva modifikující mechanické vlastnosti pryže, především její tvrdost, pevnost a rezistenci vůči abrazi. Pevnost je zvyšována fyzikální adsorpcí kaučukových částic na aktivní energetická centra na povrchu sazí (Ducháček a Hrdlička, 2009; Maláč, 2005). Odpadové fórum (2004) uvádí jejich průměrný obsah v pneumatikách v rozmezí 21,5 – 22 % hm., podle Maláče (2005) mohou zastupovat až 30 % hm, IARC (2010a) uvádí 20 – 40 % hm. v závislosti na typu pneumatiky a požadovaných vlastnostech.

3.2.3.1 Složení a vlastnosti retortových sazí

Saze mají podobu černých pevných částic práškového charakteru, které se lisují do peletek nebo granulují a které neobsahují anorganické nečistoty a snadno extrahovatelné

organické látky. Obecně jsou tvořeny z 95 – 99 % elementárním uhlíkem, z 0,1 – 3,5 % kyslíkem a z 0,3 – 0,6 % vodíkem (Ducháček a Hrdlička, 2009). Velikost primárních částic se pohybuje v rozmezí 10 – 400 nm (IARC, 2010).

Na rozdíl od klasických sazí, které vznikají jako nežádoucí odpad při spalování uhlíkatých látek a jejichž složení nelze předem determinovat, vznikají retortové saze v řízeném kontinuálním procesu nedokonalé oxidace reziduálních těžkých olejů s obsahem polyaromatických látek (Ducháček a Hrdlička, 2009; Maláč, 2005; Wang a kol., 2003).

Ve speciálním spalovacím reaktoru, tzv. retortě, dochází při teplotách 1200 (1400) – 1500 (1800) °C k pyrolytické dekompozici vstříkované vstupní suroviny. Vzniklé saze jsou odváděny se spalinami do chladičů, kde dochází k jejich zachycení a zchlazení v proudu vody a následné separaci v cyklonech (Ducháček a Hrdlička, 2009; Maláč, 2005). Během procesu se jednotlivé primární částice shlukují do agregátů, na jejichž povrchu jsou chemicky sorbovány komplexy obsahující kyslík v podobě fenolických, karboxylových, ketonických a dalších funkčních skupin a které mají vliv na reaktivitu, pH, elektrickou vodivost a jiné vlastnosti sazí (Ducháček a Hrdlička, 2009; Herink a kol., 2008).

Obr. č. 7: Retortové saze, zdroj obr.: autorka práce



3.2.3.2 Toxicita sazí

Gumárenské saze jsou dle IARC klasifikovány jako karcinogeny skupiny 2B, látky pro člověka potencionálně karcinogenní (IARC, 2010 a; Rim a kol., 2011; Straif a kol., 2000).

V závislosti na složení výrobních surovin vzniká při jejich dekompozici široká škála polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a jejich derivátů. Aplikací variabilních extrakčních činidel byly v sazích na obecné úrovni detekovány PAH typu pyren, anthracen, benzo[*a*]pyren, chrysen, fluoranthen, naftalen, fenanthren a některé jejich dusíkaté deriváty (IARC, 2010; Medalia a kol., 1983; Wik a Göran, 2005). Vybrané PAH se vyznačují prokazatelnými nebo potenciálními karcinogenními a mutagenními účinky nebo zvyšují karcinogenitu jiných látek (Schippers a kol., 2000), případně mohou být teratogenní (Freitag a kol., 1985). Zatímco US-EPA (2001) klasifikuje benzo[*a*]pyren a chrysen jako látky pro člověka pravděpodobně karcinogenní (skupina 2B), IARC (2010b) řadí benzo[*a*]pyren do kategorie pravděpodobných karcinogenů (skupina 2A) a chrysen mezi možné karcinogeny (skupina 2B). Tyto uhlovodíky jsou však v částicích za normálních podmínek velmi silně adsorbovány, což limituje jejich potenciální zdravotní rizika (Medalia a kol., 1983, Parkes a kol., 1982). Na stranu druhou byl však u pracovníků výroby sazí prokázán výskyt specifických PAH (zejména derivátů pyrenu) v moči (Gardiner a kol., 1992).

Hodnocení rizik expozice sazím je však obecně velmi problematické, neboť diverzita užívaných gumárenských surovin vytváří směsné expoziční podmínky a znemožňuje reálnou identifikaci karcinogenních hrozeb. A další problematiku představuje separace vnějších vlivů, jako např. kuřáctví, věku, životních podmínek aj. (IARC, 1982; Kogevinas a kol., 1998).

Výzkum Parkese a kol. (1982) uvádí, že provedené epidemiologické studie nemohou podat relevantní důkazy vlivu sazí na zvýšení rizika úmrtí na rakovinu. Dle Straifa a kol. (2000) mohou být pouze koncentrované inhalační expozice, k jakým může docházet při navažování a míchání kaučukových směsí, spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny hrtanu. Tsai a kol. (2001) však upozorňuje na rozdíl extrakčních podmínek v laboratorních podmínkách a fyziologickém prostředí plic.

Kogevinas a kol. (1998) a Straif a kol. (2000) se shodují na skutečnosti, že přestože jsou v gumárenském průmyslu evidovány důkazy o zvýšeném riziku rakoviny plic, žaludku a hrtanu, jsou tato data limitována nedostatkem informací o kauzalitě jednotlivých specifických látek.

Bolognesi a Moretto (2014) uvádí, že gumárenské suroviny mohou představovat také genotoxické riziko. V testech na pokusných zvířatech vykazaly složky sazí prokazatelné mutagenní (IARC, 1996) a genotoxické účinky (IARC, 2010a). In vivo testy na potkanech prokázaly narušení fyziologických mechanismů vedoucí k tvorbě reaktivních

forem kyslíku, k oxidaci bází a lámání vláken DNA, dále k peroxidaci lipidů a sekreci zánětlivých mediátorů, které mohou individuálně vyvolávat sekundární genotoxické účinky vedoucí až k formaci tumorů či poškození a zánětům plic (Driscoll a kol., 1997; Elder a kol., 2005, Gallagher a kol., 2003; Gilmour a kol., 2004;). Driscoll a kol. (1996) dále uvádí, že inhalací sazí dochází k mutagenním změnám tkání plicních sklípků, epitelové hyperplazii, při níž dochází k progresivnímu množení buněk.

3.2.3.3 Ekotoxicita a osud sazí v životním prostředí

Obecný problém spojený s využíváním moderních průmyslových nanomateriálů je spojen s nedostatkem znalostí týkajících se jejich účinku a perzistence v životní prostředí. Jejich schopnost agregovat je částečně determinována podmínkami prostředí, což může ovlivňovat jejich toxicitu a biodostupnost (Nikinmaa, 2014). V různých přírodních matricích se jejich chování může značně odlišovat.

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou schopny vysoké kumulace v životním prostředí vlivem jejich nízké rozpustnosti a mobility, rezistence k degradacím a vysoké hodnotě koeficientu K_{ow} (Wilson a Jones, 1993). Stopovým množstvím PAH obsažených v gumárenských sazích je mezi organickými látkami extrahovanými z pneumatik připisována nejvyšší ekotoxicita. Uvolňují se v omezené míře v podmínkách vyššího pH extrakčního činidla (Wik a Göran, 2006). Výluhy s obsahem PAH jsou podezřelé z teratogenních účinků pro drápatku vodní *Xenopus laevis* (Mantecca a kol., 2007) a prokázaným inhibitorem pro *Daphnia magna* (Wik, 2007). Wik a Göran (2005) uvádí, že míra bioakumulace PAH v rybách ve frekventovaných dopravních oblastech může být až pětkrát vyšší, než v referenčních přírodních vodách. PAH přítomné ve vodním prostředí podléhají fotolýze (Tobiszewski a Namiešnik, 2012), nebo se vlivem své hydrofobní povahy váží na částice sedimentů (Tobiszewski a Namiešnik, 2012; Varanasi, 1989). Fyziologie vodních organismů je schopna PAH biotransformovat na aktivní metabolity až s řádově vyššími negativními účinky, což představuje riziko pro organismy na vyšších trofických úrovních, člověka nevyjímaje (Varanasi, 1989).

V případě kontaminace půd dochází k příjmu PAH rostlinami prostřednictvím listů a kořenů, odkud jsou transportovány do dalších orgánů (Edwards, 1983). Podíl takto přijatých uhlovodíků je však nízký, vzhledem k jejich nízké rozpustnosti a stabilitě (Simonich a Hites, 1995). Ve fytomase dochází k akumulaci, metabolickým transformacím a volatilizacím těkavých sloučenin. Vyšší podíl PAH je biodegradován nebo mineralizován

půdní mikroflórou, jejíž skladba a existenční podmínky jsou determinovány kořenovými exudáty, což je základem fytoimediačních zásahů (Yang a kol., 2007).

PAH naakumulované v rostlinné biomase jsou poté zdrojem kontaminace vyšších stupňů potravního řetězce. Vodou lze z povrchu rostlin odstranit méně než 25 % kontaminantů (Edwards, 1983).

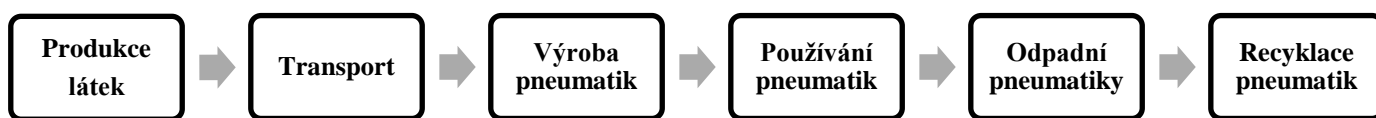
3.3 Gumárenská výroba jako potencionální zdroj polutantů a xenobiotik

3.3.1 Problematika pneumatik

Charakter výroby a variabilita používaných aditiv a látek řadí průmysl výroby pneumatik mezi opodstatněně riziková odvětví. Již od 50. let je světová gumárenská výroba předmětem vědeckého zájmu v důsledku expozicí látkám karcinogenní, genotoxické a jinak negativní povahy (Bolognesi a Moretto, 2014; Hodgson, 2004; Kogevinas a kol., 1998). Od 70. let došlo ke znatelnému zlepšení hygienicko-pracovních podmínek, k navýšení četnosti a efektivity kontrol pracovního prostředí a také ke změnám ve výrobních recepturách, přesto je zájem o zdravotní rizika spojená s gumárenstvím stále velký (Kogevinas a kol., 1998).

Scénáře vstupu vybraných kontaminantů do životního prostředí zahrnují cyklus počínající jejich výrobou, při níž dochází k produkci emisí, pevných odpadů a odpadních vod. Další stupeň představuje transport do podniku výroby pneumatik, přičemž lze v případě úniku předpokládat kontaminaci variabilních matic a ekosystémů.

Obr. č. 8: Potencionální vstupy kontaminantů do životního prostředí



Při výrobě pneumatik se při vytváření směsí pro vulkanizaci tvoří pevné odpady obsahující různorodou směs chemických látek, které je nutno odstraňovat speciálními fyzikálně-chemickými postupy nebo spalováním. Jejich případné uložení na skládku přináší potencionálně vysoké riziko nekontrolovatelného charakteru a neznámého rozsahu, vzhledem k možnosti antagonistických a synergických účinků jednotlivých látek a jejich různé reaktivitě při expozici environmentálním podmínkám. Při zpracování vybraných

látek dochází k produkci odpadních vod, zejména při čištění vulkanizační jednotky (OECD, 2004). Zejména u oxidu zinečnatého a sazí dochází, vlivem jejich prašnosti, také ke kontaminaci ovzduší (IARC, 2010; Moezzi a kol., 2012).

Specifickou problematiku představuje opotřebení pneumatik. Průměrná hmotnost pneumatiky pro osobní auta činí 7 kg, pro lehké nákladní automobily 11 kg, pro zemědělské stroje 100 kg a více, přičemž 75 – 80 % hmotnosti tvoří směs pryže s chemickými aditivy. Na konci své životnosti vykazují pneumatiky průměrný úbytek hmotnosti o 10 – 15 %, k čemuž dochází postupnou abrazí běhounu (Odpadové fórum, 2004).

Pryžový materiál je tvořen širokou škálou chemických sloučenin, z nichž jsou některé snadno extrahovatelné vodou, čímž se stává zdrojem těchto látek v prostředí. Jeho obroušováním vznikají částice (tzv. tire debris) o velikosti $< 1 - 100 \mu\text{m}$, jejichž kvantita se podle Gualtieri a kol. (2005a) pohybuje v rozmezí 24 – 360 mg/km/automobil. Částice o rozměrech nad $10 \mu\text{m}$ se usazují na povrchu vozovek, kde dochází k interakci se srážkovými vodami a transportu výluhů do životního prostředí (Mantecca a kol., 2007). Göran (2013) uvádí hodnotu PEC pro tyto částice v povrchových vodách v rozmezí 0,03 – 56 mg/l a pro sedimenty 0,3 – 155 g/kg sušiny. Obroušováním uvolněné částice o velikosti menší než $10 \mu\text{m}$ přecházejí do atmosféry. Mantecca a kol. (2007) a Gualtieri a kol. (2005b) uvádí, že až 3 – 7 % PM_{10} v urbánních a industriálních oblastech je tvořeno právě těmito částicemi, které tak mohou participovat na zvýšeném riziku kardiovaskulárních onemocnění u dospělých osob, respiračních chorob u dětí a znečištění ovzduší a vod.

Námaha materiálu vede také k uvolňování antidegradantů. Vulkanizací kaučuků dochází k pevnému navázání 20 – 45% aditiv do struktury materiálu, zbylé množství však může být extrahováno vodou nebo organickými rozpouštědly. Při porovnání antidegradantů typu DPPD (diaryl-*p*-fenylendiamin) a 6PPD bylo zjištěno, že výluhy obsahující 6PPD vykazují mnohem nižší fototoxicitu (OECD, 2004; Wik, 2007).

Studie zaměřené na identifikaci anorganických toxických komponentů pneumatik se nejčastěji shodují na roli zinku jako majoritního zdroje toxického působení, a to především pro vodní ekosystémy (Councell a kol., 2004; Mantecca a kol., 2007; Wik, 2007). Pneumatiky obsahují v průměru 100 g oxidu zinečnatého (Moezzi a kol., 2012), přičemž z 1 opotřebeného kusu se potenciálně uvolní až 4,5 g zinku (EPA, 1987). Councell a kol. (2004) uvádí, že obroušování pneumatik představuje, zejména pro povrchové vody v dopravou zatížených oblastech, významnější zdroj zinku než atmosférické depozice. Výsledky analýz upozorňují na uvolnění až 35 % dostupného zinku při 7 denní extrakci

vodou z částic o velikosti $< 100\mu\text{m}$ (ECB, 2008). Existují také analýzy založené na reálných podmínkách sledujících potenciál kontaminace smyvů z parkovišť a komunikací. Greenstein a kol. (2004) simuloval působení srážek na parkoviště o různé intenzitě údržby a užívání. Z výsledků jeho analýz vyplývá, že působením dešťové vody dochází k uvolňování velkého množství zinku, na straně druhé však nevede k extrakci organických látek v takové míře, aby byly zodpovědné za toxický efekt.

Současné tendence environmentální ochrany vytváří tlak na změnu výrobních receptur za použití méně rizikových surovin a také na racionální nakládání s odpadními pneumatikami, neboť pneumatiky s ukončenou životností představují dlouhodobou výzvu v oblasti ochrany životního prostředí. Přestože testy nepotvrdily jejich ekotoxicitu (Odpadové fórum, 2004), existuje řada studií potvrzujících potenciální rizika spojená se schopností vybraných komponentů uvolňovat se také z celistvé pryžové matrice působením vnějších vlivů. Smolders a Degryse (2002) uvádí, že během prvních 12 měsíců expozice odpadních pneumatik externím podmínkám dochází k uvolnění 10 – 40 % přítomného zinku do výluhu, zároveň však dochází k navýšení pH, což limituje jeho případnou mobilitu. Problém také nastává v oblastech, kde jsou odpadní pneumatiky využívány pro konstrukci vodních bariér a umělých korálových útesů (Gualtieri a kol., 2005a).

Diference míry toxických účinků mezi celými pneumatikami, jejich fragmenty a částicemi tkví pouze ve velikosti specifického povrchu, ze kterého se mohou jednotlivé chemické substance uvolňovat těkáním nebo vyluhováním, proto lze předpokládat akutnější účinky kontaminantů uvolněných z částic, než z neporušeného materiálu (Gualtieri a kol., 2005b; Wik a Göran, 2005).

Jednou z možností využití odpadních pneumatik je jejich recyklace za účelem výroby aktivního uhlíku. Aktivní uhlík je vzhledem ke svým sorpčním vlastnostem využíván mimo jiné pro účely úpravy a čištění odpadních a pitných vod. San Miguel a kol. (2002) provedl studii týkající se problematiky přechodu vybraných anorganických prvků (zinku, chromu, kadmia, síry aj.) do recyklátu a jejich zpětného uvolňování do vod. Bylo zjištěno, že při neutrálním pH dochází k značné limitaci dostupnosti většiny analyzovaných prvků, vyjma síry, jejíž hodnoty však nepřekročily hygienické limity nezávadnosti. Podle OECD (2004) může být recyklací teoreticky uvolňováno i 6PPD.

V obecné rovině představují nejvyšší riziko kontaminace neodborná manipulace nebo likvidace vzniklých chemických odpadů a havarijní úniky při jejich transportu.

3.3.2 Enzymatická aktivita jako indikátor kontaminace půdního prostředí

Měření enzymatické aktivity slouží k bioindikaci stavu přítomné mikroflóry, která je schopna reflektovat antropogenní zatížení půd a tím i míru narušení přirozených podmínek (Dick a kol., 2000; Singh a Kumar, 2008). Výstupy analýz představují informace o změně chování způsobené neschopností organismů se na látku adaptovat, nikoli o samotném principu toxického efektu (Moriarty, 1999).

Půdní enzymy jsou biologicky syntetizované proteinové látky (Shukla a Varma, 2011) zastávající důležitou funkci v cyklu živin, procesu dekompozice organické hmoty a udržování biochemické rovnováhy půdního prostředí (Dick a kol., 2000). Extracelulární enzymy, které v půdním roztoku nepodlehnu degradaci nebo denaturaci, vytváří komplexy se substrátem a hydrolyzují nerozpustné nebo makromolekulární látky, čímž zpřístupňují jejich frakce (Burns a Dick, 2002). Extra- nebo intracelulární enzymy jsou produkovány majoritně bakteriemi a houbami, pouze zlomek jich je původem rostlinného nebo živočišného (Singh a Kumar, 2008).

Půdní mikroflóra je citlivá na přítomnost těžkých kovů a vysoké koncentrace stopových prvků. Jejich přídavek vede k narušení schopnosti buněčného růstu, což způsobuje narušení enzymatické aktivity a tím i přirozených biochemických procesů v půdách (Fu a Tabatabai, 1989). Kromě přítomnosti xenobiotik nebo polutantů ovlivňují enzymatickou aktivitu také přirozené půdní vlastnosti, zejména obsah organické hmoty jakožto energetického zdroje (Wolińska a Stępniewska, 2012) a hodnota pH. pH determinuje skladbu a diverzitu mikrobiálních společenstev a také limituje dostupnost živin nebo inhibitorů z půdního roztoku (Dick a kol., 2000)

Mezi nejčastěji analyzované enzymy jsou řazeny dehydrogenázy, fosfatázy, ureázy, celulózy, proteázy, nitrátoreduktázy aj. (Singh a Kumar, 2008).

3.3.2.1 Dehydrogenázy

Obecný název dehydrogenáza zaštiťuje celou škálu intracelulárních enzymů, které jsou součástí buněčných enzymatických systémů, např. citrátového cyklu, respiračního metabolismu aj. (Wolińska a Stępniewska, 2012), a spadají do skupiny oxidoreduktás (Gu a kol., 2009). Tyto enzymy jsou součástí řetězce elektronového transportu, přesouvají vodík z organického substrátu k anorganickému akceptoru, čímž dochází k oxidaci půdní organické hmoty (Matyja a kol., 2016; Shukla a Varma, 2011; Wolińska a Stępniewska,

2012). Zúčastňují se tak respiračního cyklu půdních mikroorganismů (Shukla a Varma, 2011).

Dehydrogenázy jsou přítomny ve všech živých mikrobiálních buňkách, nekumulují se v půdě a vyznačují se vysokou citlivostí vůči změnám v prostředí, proto se měření jejich celkové aktivity (DHA) využívá pro analýzu biologických a chemických parametrů půd a hodnocení ekotoxicity chemických látek (Casida, 1977; Matyja a kol., 2016; Wolińska a Stępniewska, 2012). Velmi často se užívají pro identifikaci půd kontaminovaných těžkými kovy, které jsou schopny navázat se na aminokyseliny a -SH, -COOH, -NH a -NH₂ skupiny přítomné v enzymech, čímž dochází k jejich ireverzibilní inaktivaci (Matyja a kol., 2016; Tan a al., 2016). Dehydrogenázy jsou majoritně produkovány anaerobními mikroorganismy (Wolińska a Stępniewska, 2012).

3.3.2.2 Nitrátoreduktáza

Extracelulární enzym nitrátoreduktáza je nezbytnou součástí koloběhu dusíku. Redoxní centrum je uloženo hluboko ve struktuře proteinu, proto dochází k imobilizaci enzymu do polymerů typu polypyrrol, polyviologen aj., které napomáhají zvýšení jeho elektrické vodivosti (Sachdeva a Hooda, 2016). V podobě nitrátového biosenzoru se katalyticky podílí na první fázi denitrifikace při redukcí dusičnanů na dusitany za přítomnosti odpovídajícího kofaktoru (např. NADH) (Abdelmagid a Tabatabai, 1987; Sachdeva a Hooda, 2016). V kyselých půdách je redukce dusičnanů rychlost limitujícím procesem denitrifikace (Abdelmagid a Tabatabai, 1987; Fu a Tabatabai, 1989).

Nitrátoreduktáza je mikrobiálního původu a vykazuje poměrně nízkou termotoleranci. K její inaktivaci dochází při teplotách nad 40 °C, teplotní hranice je dle Abdelmagida a Tabatabaie (1987) o 15 – 20 °C nižší, než u většiny enzymů. K prokázané inhibici, zejména v kyselých půdách, dochází také působením iontů těžkých kovů. Mezi nejúčinnější inhibitory patří Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ aj. (Fu a Tabatabai, 1989).

3.3.2.3 Kyselá fosfatáza

Fosfatázy tvoří skupiny extracelulárních enzymů katalyzujících hydrolýzu anhydridů a esterů kyseliny fosforečné. Kyselá fosfatáza spadá do podskupiny fosfomonoesteras (Eivazi a Tabatabai, 1977) a tvoří nedílnou součást procesu mineralizace organických substrátů s obsahem fosforu (Gilbert a kol., 1999; Šarapatka, 2003).

Kyselé fosfatázy jsou dominantní v acidifikovaných půdách (Juma a Tabatabai, 1976), jejichž pH se pohybuje v rozmezí 0-7 (Gilbert a kol., 1999).

Fosfatázy jsou produktem bakteriálního, rostlinného i živočišného metabolismu (Šarapatka, 2003). U rostlin je míra produkce enzymů determinována jejich druhem, popř. varetou, a také managementem půd (Bünemann a kol., 2011; Shukla a Varma, 2011). Přirozeně zvýšenou aktivitu lze detekovat zejména v rhizosféře v půdách s nízkým obsahem anorganických forem fosforu (Bünemann a kol., 2011), k útlumu dochází alkalizací nebo přítomností inhibitorů, např. těžkých kovů (Juma a Tabatabai, 1976; Šarapatka, 2003).

4 Materiál a metody

4.1 Testy klíčivosti ve výluzích čistých látek

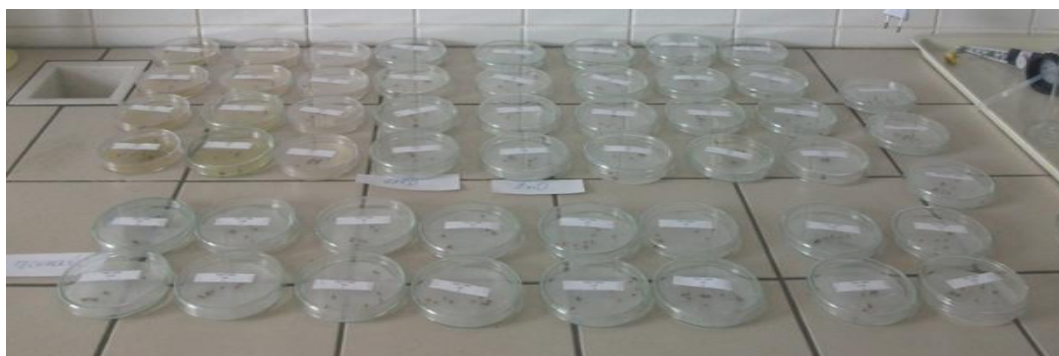
Význam testů klíčivosti semen vyšších rostlin spočívá ve zhodnocení míry negativních účinků vodných výluhů vybraných látek na schopnost semen vyklíčit a na první fáze růstu kořene a rostliny. Pro tuto analýzu byly zvoleny vodné výluhy o 4 koncentracích výchozích látek - 10%, 5%, 1% a 0,1% a varianta kontrolní s demineralizovanou vodou. Látky byly extrahovány po dobu 6 dní při laboratorní teplotě 25 °C ve 100 ml demineralizované vody. Pro každou koncentraci analyzované látky byla vytvořena 4 opakování a pro celou sérii 3 kontrolní vzorky, analýza zahrnovala celkem 51 vzorků.

Tab. č. 3: Navážky látek (g) pro testy klíčivosti

Koncentrace	ZnO	6PPD	Saze (technický uhlík)
10%	10,002	10,002	10,005
5%	5,003	5,005	5,005
1%	1,004	1,000	1,003
0,1%	0,101	0,100	0,100

Na dno Petriho misek byl vložen filtrační papír a na něj bylo umístěno 10 semen ředkve (*Raphanus sativus L. var. sativus*). Pipetou bylo přidáno 10 ml příslušného výluhu a do kontrolních variant 10 ml demineralizované vody. Misky byly přikryty víčkem a ponechány 48hodinové expozici při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách byla provedena první kontrola, po dalších 24 hodinách závěrečné hodnocení.

Obr. č. 9: Provedení testu klíčivosti semen ředkve (*Raphanus sativus L. var. sativus*) na výluzích čistých látek



4.2 Založení půdních variant

Nádobový pokus byl založen pro provedení dlouhodobých terestrických testů vlivu vybraných látek na přítomnou mikroflóru a adaptabilitu vyšších rostlin. Pro účely této práce byly použity dva odlišné typy půd: půda lesní z lokality Přední Zborovice (okres Strakonice) a půda orná z lokality Mělník (okres Mělník), vyznačující se odlišnými fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými parametry.

Tab. č. 4: Základní charakteristiky pokusných zemin (obsah přijatelných prvků stanoven metodou Mehlich III)

Půdní série	Lokalita	pH _{KCl}	C _{org.} (%)	P	K	Mg
				mg.kg ⁻¹		
Lesní	Přední Zborovice	3,08	3,6	59	88	129
Orná	Mělník	5,76	1,2	33	235	133

Variety série s lesní půdou byly založeny dne 7. 6. 2016, varianty s půdou ornou dne 21. 6. 2016. Do označených plastových nádob vystlaných filtračním papírem bylo naváženo 1,5 kg nepřesáté zeminy, která byla zbavena velkých rostlinných zbytků a anorganických příměsí a kontaminována příslušným množstvím analyzované látky. Celkem bylo pro každou půdu vytvořeno 7 variant o koncentracích 0,1 %, 0,01 % a 0 % dle tabulek č. 5 a 6. Vzorokly byly pravidelně zavlažovány 100 ml demineralizované vody a ponechány inkubaci při 25 °C v pokusných sklenicích České zemědělské univerzity v Praze.

Tab. č. 5: Znázornění pokusu u půdní série s označením: Lesní

Varianta	Navážka půdy (g)	Navážka látky (g)
6PPD 0,1 %	1 500,3	1,505
6PPD 0,01 %	1 500,5	0,151
ZnO 0,1 %	1 500,8	1,502
ZnO 0,01 %	1 501,0	0,152
Saze 0,1 %	1 502,0	1,506
Saze 0,01 %	1 502,0	0,150
Kontrola	1 500,3	0

Tab. č. 6: Znázornění pokusu u půdní série s označením: Orná

Varianta	Navážka půdy (g)	Navážka látky (g)
6PPD 0,1 %	1 500,8	1,502
6PPD 0,01 %	1 501,2	0,151
ZnO 0,1 %	1500,9	1,504
ZnO 0,01 %	1 500,6	0,151
Saze 0,1 %	1 501,6	1,503
Saze 0,01 %	1 500,9	0,150
Kontrola	1 500,3	0

Obr. č. 10: Nádobový pokus s variantami série lesní půda



4.3 Stanovení sušiny vzorků

Sušina vzorků byla stanovena pro aplikaci ve výpočtech aktivit jednotlivých sledovaných enzymů. Stanovení bylo provedeno dle metodiky uvedené v Jednotném pracovním postupu ÚKZÚK č. 30020.1 Stanovení vlhkosti gravimetricky.

Do předem zvážených kádínek bylo naváženo 20,00 g přirozeně vlhkých půdních vzorků, které byly následně vysušeny při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly vzorky opětovně zváženy a obsah sušiny v % byl stanoven dle vzorce:

$$\%DM = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

kde:

$\% DM$ obsah sušiny v %;

m_1 navážka vzorku půdy před vysušením v g;

m_2 navážka vzorku půdy po vysušení v g.

Tab. č. 7: Výsledky stanovení % sušiny u půdních variant

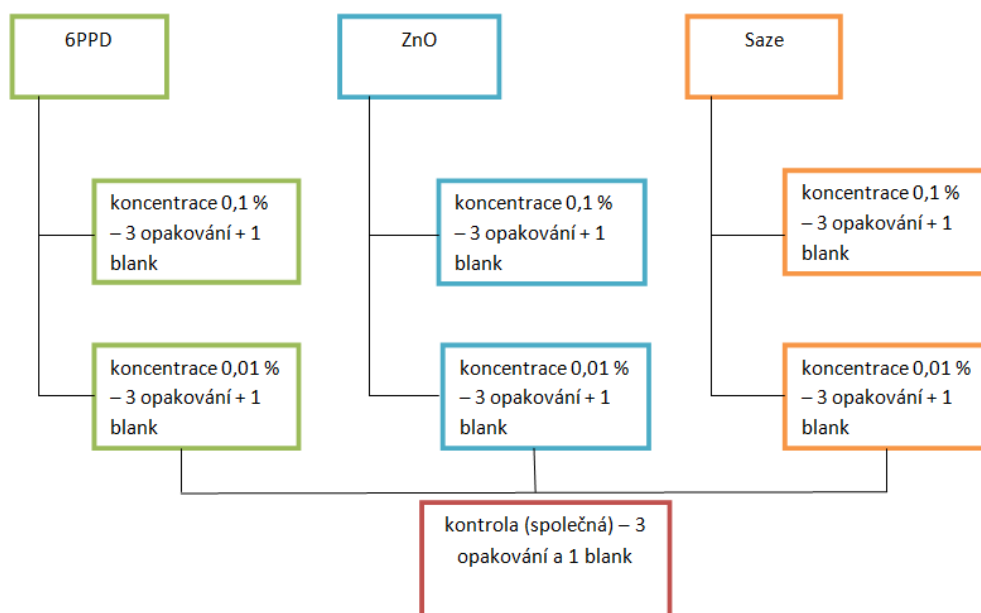
Varianta Lesní p.	% sušiny	Varianta Orná p.	% sušiny
Kontrola	97,411	Kontrola	89,591
6PPD 0,1 %	98,115	6PPD 0,1 %	89,234
6PPD 0,01 %	97,663	6PPD 0,01 %	88,480
ZnO 0,1 %	98,623	ZnO 0,1 %	89,926
ZnO 0,01 %	98,154	ZnO 0,01 %	88,739
Saze 0,1 %	97,759	Saze 0,1 %	88,867
Saze 0,01 %	98,497	Saze 0,01 %	89,182

4.4 Stanovení vybraných enzymatických aktivit

Schéma odběru vzorků pro stanovení vybraných enzymatických aktivit je uvedeno na obr. č. 11. Čerstvě odebrané půdní vzorky byly prosety přes síto s průměrem ok 2 mm a případné rostlinné zbytky byly ručně odstraněny. Proseté vzorky byly před navažováním k analýzám uloženy v plastové uzavíratelné vzorkovnici.

Stanovení enzymatické aktivity bylo prováděno vždy po měsíci inkubace půdní vzorků a celkem byly provedeny 3 série stanovení. Pro každé stanovení byla vytvořena série 28 vzorků.

Obr. č. 11: Obecné schéma enzymatických pokusů



4.4.1 Aktivity dehydrogenás

Pro stanovení aktuální aktivity dehydrogenás byla použita metodika uvedená v normě ČSN EN ISO 23753-1 (Kvalita půdy– Stanovení aktivity dehydrogenázy v půdě – Část 1: Metoda používající trifenyltetrazolium chlorid (TTC)) s upravenou dobou inkubace. Vzorky půd s přídavkem 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu byly inkubovány po dobu 20 hodin a vyprodukovaný trifenylformazan (TPF) byl následně stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 485 nm.

Do označených 100 ml Erlenmayerových baněk bylo naváženo 5,00 g čerstvě odebraného půdního vzorku. Ke kontrolním vzorkům bylo automatickou pipetou přidáno 5 ml tris pufru o $c = 0,1$ mol/l (roztoku tri(hydroxymethyl)aminomethanu) o pH 7,8 a k ostatním vzorkům bylo pipetováno 5 ml substrátového roztoku (1,5% roztok TTC v tris pufru pro jílovité a humózní půdy). Baňky byly uzavřeny zátkou, obsah byl ručně jemným krouživým pohybem promíchán a vzorky se ponechaly inkubaci v termostatu při teplotě 25 °C. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 25 ml acetonu pro extrakci vzniklého trifenylformazanu, vzorky byly jemně promíchány, uzavřeny a uloženy na 2 hodiny do tmy. Po hodině byly vzorky opět ručně promíchány a další hodině v pološeru přefiltrovány přes francouzský skládaný filtr. Obsah TPF ve filtrátu byl stanoven proti blanku s acetonem na přístroji PerkinElmer Lambda 25.

Výsledná aktivita dehydrogenás byla vypočtena dle vzorce:

$$a = \frac{(\rho_{cs} - \rho_{bs}) \times V \times 100}{m \times DM \times t}$$

kde:

- a aktivita dehydrogenás v mg TPF/kg suché půdy/hod;
- ρ_{cs} průměrná koncentrace TPF ve vzorku v $\mu\text{g/ml}$;
- ρ_{bs} koncentrace TPF v kontrolním vzorku v $\mu\text{g/ml}$;
- V objem vzorku v ml;
- m průměrná navážka vzorku v g;
- DM sušina vzorků v %;
- t délka inkubace v hod.

4.4.2 Aktivita nitrátreduktázy

Aktivita nitrátreduktázy byla stanovena dle metodiky Abdelmagid a Tabatabai (1987). Vzorky byly inkubovány po dobu 24 hodin se substrátovým roztokem KNO_3 a přídavkem 2,4-dinitrofenolu (DNP), který slouží k blokaci energie potřebné pro nástup druhé fáze denitrifikace, redukce dusitanů (Abdelmagid a Tabatabai, 1987). Výsledný obsah dusitanů byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm.

Do polykarbonátových centrifugačních zkumavek bylo naváženo 5,00 g čerstvě odebrané proseté půdy. Ke vzorkům byly automatickou pipetou postupně přidány 4 ml roztoku 2,4-dinitrofenolu o $c = 0,9$ mmol/l, 1 ml roztoku KNO_3 o $c = 25$ mmol/l a 5 ml demineralizované vody. Zkumavky byly uzavřeny šroubovacím uzávěrem a obsah byl ručně promíchán. Kontrolní vzorky byly vloženy do mrazicího boxu, kde byly ponechány při teplotě -20 °C, ostatní vzorky byly inkubovány v termostatu při 25 °C, obojí po dobu 24 hodin. Po inkubaci a roztátí kontrolních vzorků při laboratorní teplotě bylo ke vzorkům ve zkumavkách pipetováno 10 ml roztoku KCl o $c = 4$ mol/l, suspenze byla ručně promíchána a ihned filtrován přes skládaný filtr.

Pro spektrofotometrické stanovení se do 20 ml zkumavek převedlo 5 ml filtrátu, k němuž byly přidány 3 ml NH_4Cl pufru o pH 8,5 a $c = 0,19$ mmol/l a 2 ml barevného činidla (roztoku sulfanilamidu a N-(1-naftyl)ethylenamin hydrochloridu s přídavkem kyseliny trihydrogenfosforečné). Zkumavky byly uzavřeny parafilmem, obsah ručně promíchá a ponechán reagovat 15 minut při laboratorní teplotě. Obsah dusitanů byl stanoven proti blanku s demineralizovanou vodou na přístroji PerkinElmer Lambda 25.

Vzorec pro výpočet aktivity nitrátreduktázy:

$$ANR = \frac{(S - C) \times 20 \times 100}{m \times 5 \times DM}$$

kde:

ANR aktivita nitrátreduktázy v $\mu\text{g N/g}$ sušiny/24 hod;

S průměrný obsah dusitanů ve vzorku v $\mu\text{g N}$;

C obsah dusitanů v kontrolním vzorku v $\mu\text{g N}$;

20 objem extraktu v ml;

m navážka půdního vzorku v g;

5 alikvotní podíl filtrátu v ml;

DM sušina půdních vzorků v %.

4.4.3 Aktivita kyselých fosfatáz

Stanovení aktivity kyselých fosfatáz bylo provedeno dle metodiky Bremner a Tabatabai (1969). Půdní vzorky s přidavkem *p*-nitrofenylfosfátu byly inkubovány při 25 °C a výsledný obsah *p*-nitrofenolu byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 400 nm.

Do 100 ml Erlenmayerových baněk byly naváženy 2,00 g čerstvě odebraného přesátého půdního vzorku, přidány 2 ml destilované vody a 8 ml tris pufru o $c = 0,1$ mol/l a pH 6,05. Zvlhčené vzorky byly ponechány 5 minut při laboratorní teplotě a následně k nim byly automatickou pipetou přidány 2 ml roztoku *p*-nitrofenylfosfátu o $c = 0,0115$ mol/l, vyjma kontrolních vzorků. Po promíchání krouživým pohybem byly baňky uzavřeny a vzorky uloženy na 2 hodiny do termostatu s předem nastavenou teplotou na 25 °C. Po inkubaci byly pipetovány 2 ml CaCl₂ o $c = 0,5$ mol/l a 8 ml NaOH o $c = 0,5$ mol/l. Ke kontrolním vzorkům byly dodatečně přidány 2 ml *p*-nitrofenylfosfátu. Výsledné suspenze byly následně filtrovány přes skládané filtry a pro analýzu byly filtráty zředěny 20krát, tj. do 20 ml zkumavek byl pipetován 1 ml filtrátu a doplněn 19 ml roztoku NaOH o $c = 0,01$ mol/l.

Obsah *p*-nitrofenolu byl stanoven proti blanku s demineralizovanou vodou na přístroji PerkinElmer Lambda 25. Aktivita kyselých fosfatáz byla vypočtena pomocí vzorce:

$$AKF = \frac{(S - C) \times 20 \times 22 \times 1000}{m \times t}$$

kde:

AKF aktivita kyselých fosfatáz v $\mu\text{mol } p\text{-nitrofenolu/g/hod}$;

S průměrný obsah *p*-nitrofenolu ve vzorku v $\mu\text{mol/ml}$;

C obsah *p*-nitrofenolu v kontrolním vzorku v $\mu\text{mol/ml}$;

20 ředící faktor filtrátu;

22 objem extraktu v ml;

m průměrná navážka půdního vzorku v g;

t délka inkubace v hod.

4.5 Testy klíčivosti a růstu na kontaminovaných půdách

Půdní vzorky nádobového pokusu byly po 4 měsících inkubace použity pro testování účinků chronické expozice kontaminantům na vyšší rostliny ve srovnání s účinky akutními. Do každé varianty bylo zasazeno 15 semen lupiny bílé (*Lupinus albus*), která byla vybrána pro své adaptabilní schopnosti vůči nízkému pH. Semena byla zapravena do

půdy a pravidelně zavlažována 100 ml demineralizované vody. Vzorky byly ponechány v pokusných sklenících České zemědělské univerzity v Praze při kontrolované teplotě 25 °C.

Schopnost semen vyklíčit a stav nadzemní biomasy byl pravidelně monitorován po dobu 1 měsíce, poté bylo provedeno závěrečné hodnocení.

4.6 Testy klíčivosti na půdních výluzích

Vzhledem k povaze výsledků klíčivosti na kontaminovaných půdách byl test klíčivosti proveden pouze u půdního výluhu série půdy orné (Mělník). Varianty půdy lesní (Přední Zborovice) byly pro své velmi nízké pH z tohoto stanovení vyloučeny.

Pro vytvoření půdních výluhů bylo do uzavíratelných plastových nádob naváženo po 10,00 g čerstvě odebrané přeseťé půdy, k níž bylo přidáno 100 ml demineralizované vody. Obsah byl poté homogenizován na třepačce po dobu 1 hod a vzniklá suspenze přefiltrována přes skládaný filtr.

Na dno plastových misek byl vložen filtrační papír, na nějž bylo uloženo 6 semen lupiny bílé (*Lupinus albus*), které byly zality 10 ml příslušného výluhu, v případě kontrolních vzorků 10 ml demineralizované vody. Celkem bylo vytvořeno 7 variant s půdními výluhy a 1 varianta s demineralizovanou vodou, pro každé stanovení byla provedena 4 opakování. Misky byly uzavřeny víčkem a ponechány 5 dní při laboratorní teplotě. Po 3 dnech byl proveden kontrolní odpočet, po 5 dnech závěrečné hodnocení.

Obr. č. 12: Provedení testu klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) na půdních výluzích



4.7 Zpracování výsledků analýz

Pro získání grafických výstupů a výpočtů byla získaná data zpracována v programu MS Excel a pro statistické porovnání (zjištění závislosti proměnných, porovnání souborů dat v čase) v programu Statistica12 od společnosti StatSoft.

5 Výsledky

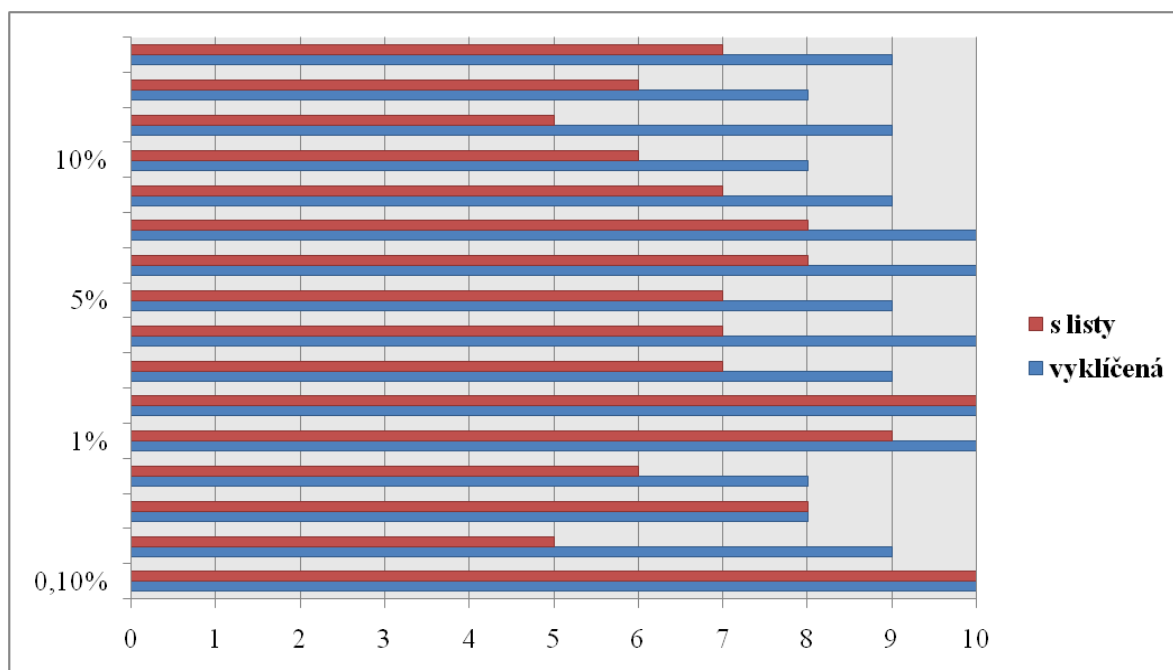
5.1 Testy klíčivosti na výluzích čistých látek

Při prvním kontrolním odečtu po 24 hodinách od založení testu byly zjištěny problémy s klíčením semen ředkve seté (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) u kontrolních variant s demineralizovanou vodou, ze tří opakování klíčila semena pouze v jednom. Naopak ve všech sledovaných koncentracích 6PPD začala semena klíčit bez obtíží, stejně jako u koncentrací 0,1 % a 1 % oxidu zinečnatého a sazí. U vzorku výluhů sazí a ZnO o koncentraci 5 % a 10 % došlo pouze k mírné inhibici.

Po 48 hodinách vykázaly kontrolní vzorky klíčivost srovnatelnou se vzorky analyzovaných výluhů. V demineralizované vodě vyklíčilo v průměru 9 rostlin, avšak pouze u 5 z nich se vytvořily listy.

U 6PPD nebyly identifikovány inhibiční účinky na klíčení semen u žádné z testovaných koncentrací. U variant 0,1 % a 10 % vyklíčilo v průměru 9 semen, u koncentrací 1 % a 5 % byla klíčivost 100%. U antidegradantu byl ve srovnání s kontrolní variantou stanoven vyšší průměrný počet rostlin opatřených listy (graf č. 1), které však byly ve všech opakování drobné a se zvyšující se koncentrací se zvyšovala také míra jejich fyziologického poškození.

Graf č. 1: Výsledky testu klíčivosti semen ředkve seté (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) ve výluzích 6PPD



U koncentrací vyšších než 0,1 % byl sledován výskyt stupňujících se nekrotických kořenových pletiv (obr. č. 13). Rostliny u koncentrace 1 % tvořily drobné listy bez zjevného poškození, u koncentrací 5 % a 10 % došlo k celkovému zakrnění klíčících rostlin a výskytu výrazných listových chloróz a nekrotických okrajů listové čepele (obr. č. 14).

Obr. č. 13: Příklad počátečních nekrotických kořenů u výluhu 6PPD o koncentraci 1 %

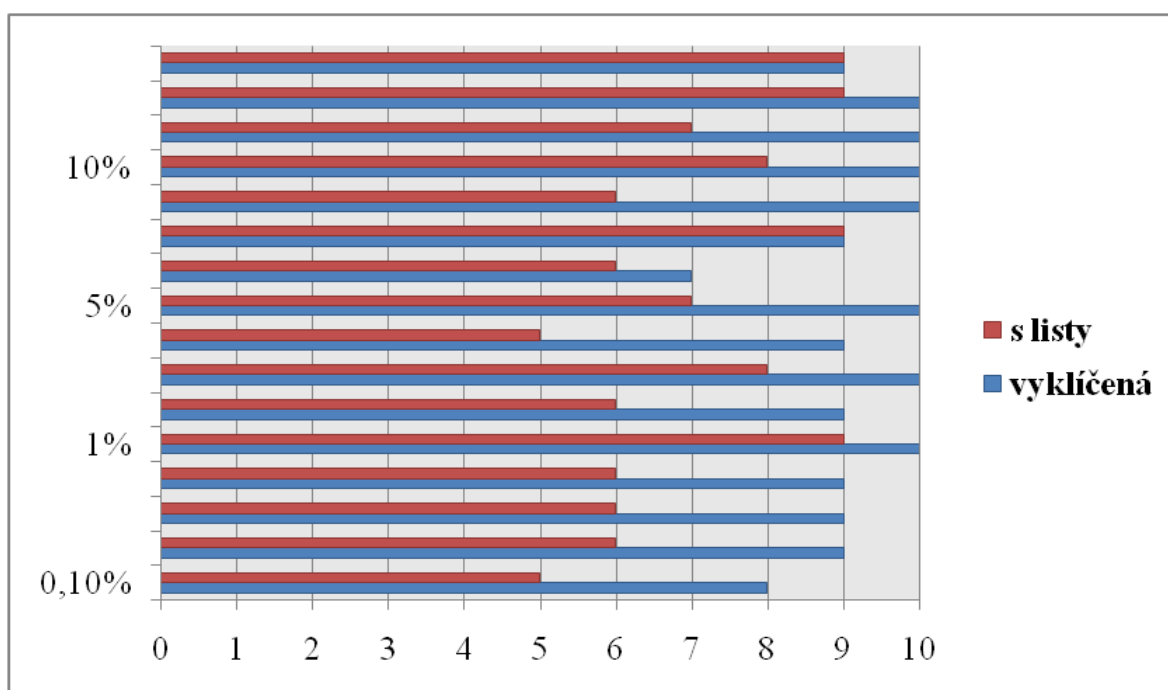


Obr. č. 14: Listové chlorózy a nekrotické tkáně u výluhu 6PPD o koncentraci 5 %



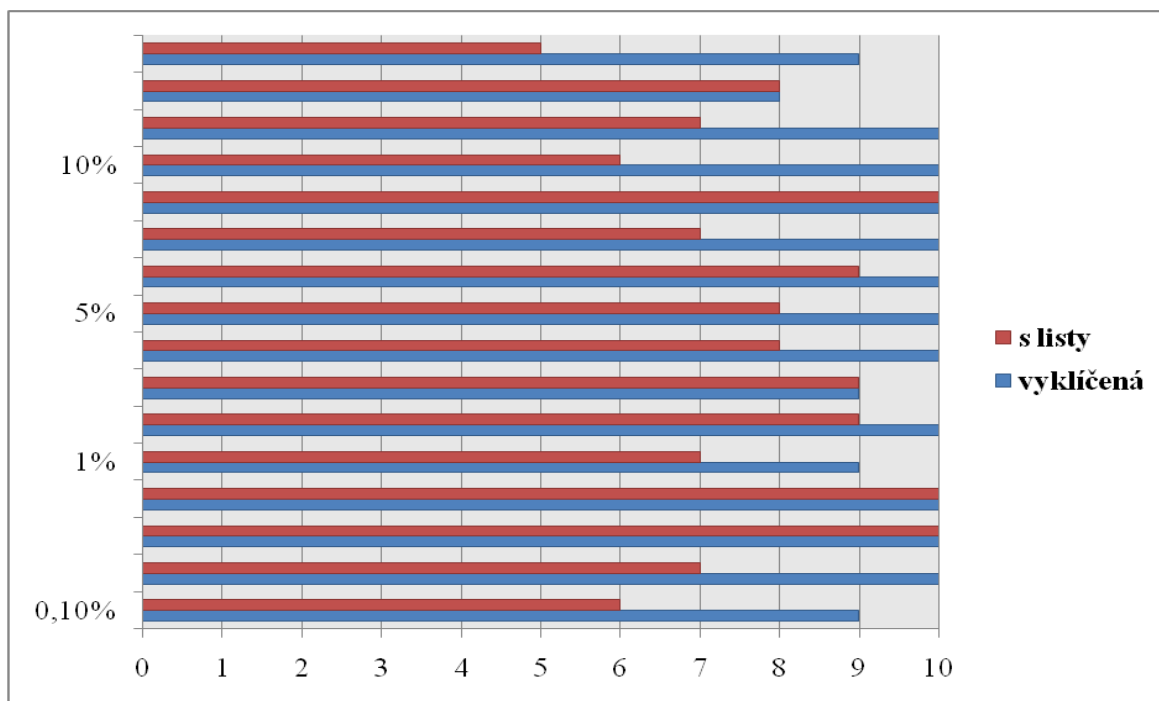
Série vzorků obsahujících výluhy oxidu zinečnatého vykázaly vysoký průměr počtu vyklíčených a olistěných rostlin. U koncentrací 0,1 % a 5 % došlo k vyklíčení v průměru 9 semen, u koncentrací 1 % a 10 % byla zaznamenána 100% klíčivost. Bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací se zvyšovala také schopnost klíčků tvořit listy. Ve výluhu o koncentraci 0,1 % bylo v průměru 6, u koncentrací 1 % a 5 % shodně 7 a v 10% výluhu 8 olistěných rostlin. Klíčící rostliny byly většinou zelené a bez zjevných známek nekróz, chloróz či deformací.

Graf č. 2.: Výsledky testu klíčivosti semen ředkve seté (*Raphanus sativus L. var. sativus*) u výluhů ZnO



U sazí (technického uhlíku) nebyly na konci testu prokázány žádné inhibiční účinky na klíčivost semen ředkve seté (*Raphanus sativus L. var. sativus*), u vzorků o koncentraci 1 % došlo k nadprůměrné elongaci kořenů (nejdelší měřil 19 cm, obr. č. 15). U výluhů o koncentracích 0,1 %, 1 % a 5 % vyklíčilo průměrně 10 semen, u koncentrace 10% došlo k poklesu na 9 semen. V sériích o koncentraci 0,1 % a 1 % bylo detekováno v průměru 8 zeleně olistěných rostlin, u koncentrace 5 % 9 a u varianty s 10% výluhem došlo ke snížení v průměru na 7 rostlin tvořících listy. U vybraných opakování 10% koncentrace došlo k mírnému útlumu tvorby listové biomasy a počátkům chloróz, obecně lze však rostliny v celé sérii hodnotit jako zdravě vypadající.

Graf č. 3.: Výsledky testu klíčivosti semen ředkve seté (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) u výluhů sazí

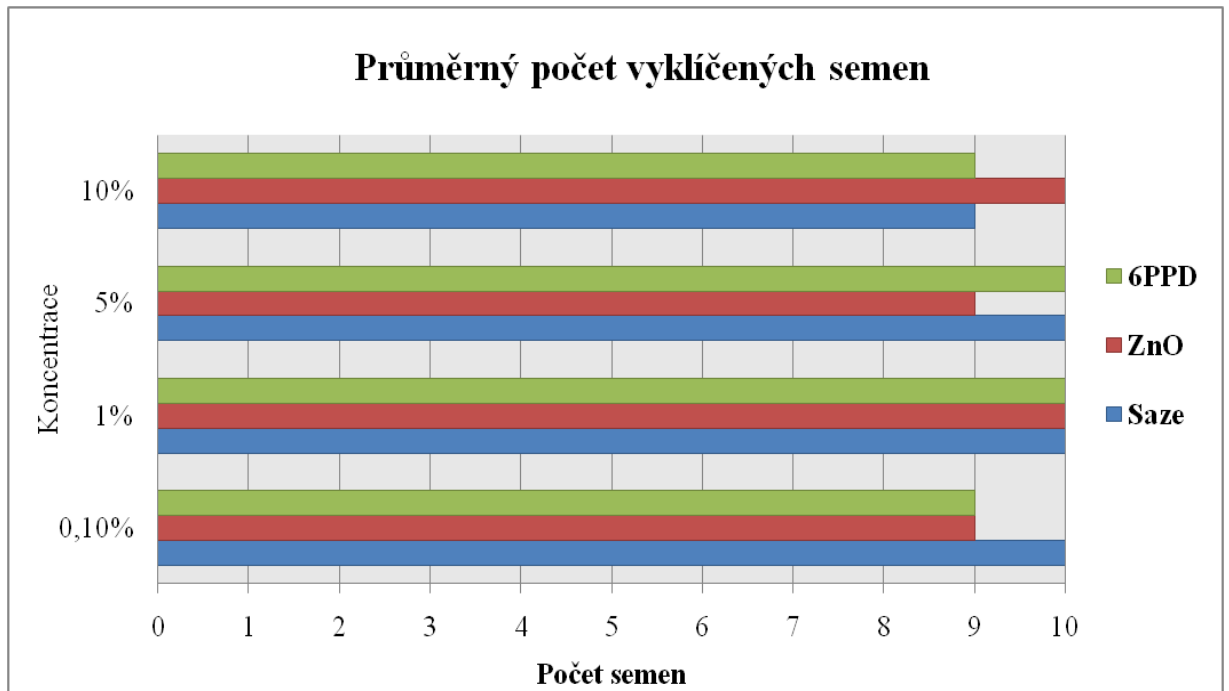


Obr. č. 15: Nadprůměrný nárůst kořenů u vzorku 1% výluhu sazí

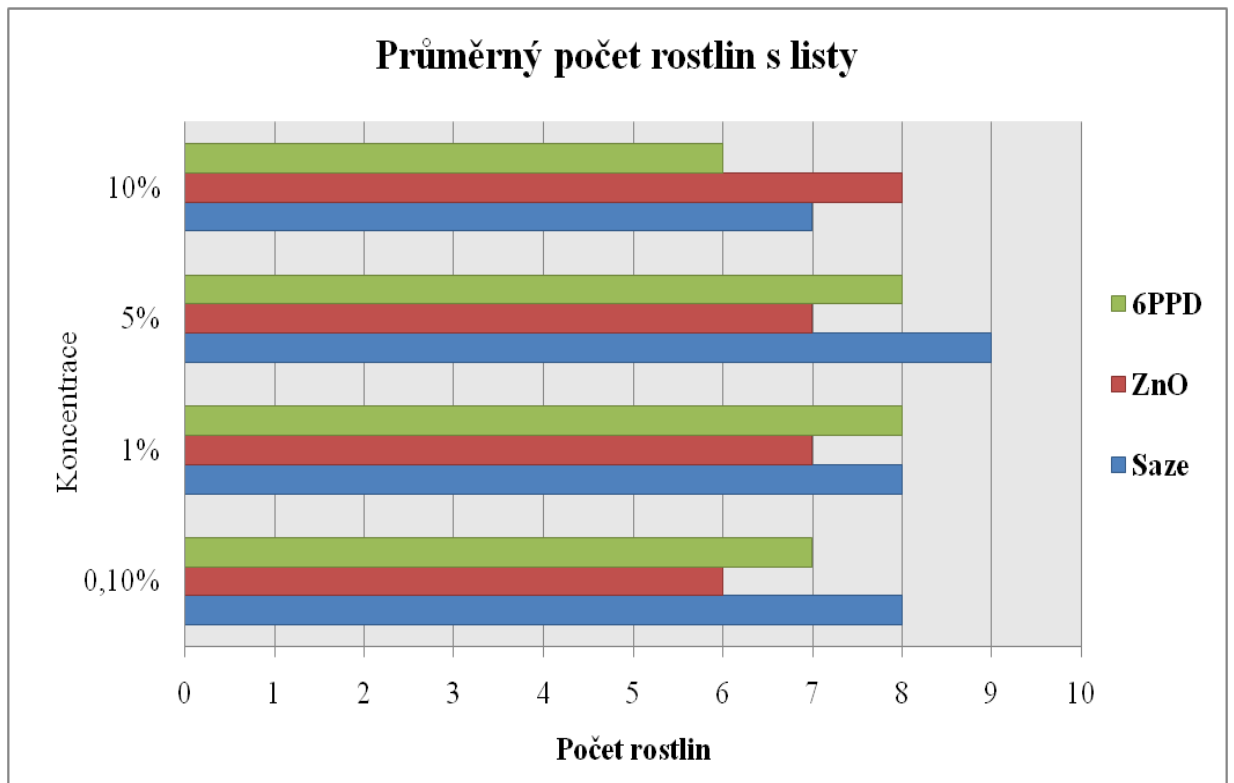


Souhrnné výsledky testu klíčivosti na výluzích čistých látek jsou znázorněny v grafech č. 4 a 5. Na základě statistického hodnocení výsledků vyplývá, že nebyla zjištěna lineární závislost mezi počtem nevyklíčených semen a koncentrací analyzované látky ve výluhu ($R^2_{6PPD} = 0,096$; $R^2_{ZnO} = 0,0927$, $R^2_{saze} = 0,0449$).

Graf č. 4.: Shrnutí průměrných výsledků testu klíčivosti semen ředkve seté (*Raphanus sativus L. var. sativus*)



Graf č. 5: Průměrný počet vyklíčených rostlin s listy



5.2 Analýzy enzymatických aktivit

5.2.1 Aktivita dehydrogenás

Souhrnné výsledky monitorující vývoj aktivity dehydrogenás v sérii vzorků lesní půdy jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10 a znázorněny v grafu č. 6.

V prvním stanovení byla pro vzorky lesní půdy (lokalita Přední Zborovice) stanovena referenční hodnota aktivity dehydrogenás na 0,10631 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹. K nejvyšší detekované inhibici enzymů došlo u variant obsahujících 0,1% koncentrace 6PPD a sazí, tj. -149,41 % v případě antidegradantu a - 68,90 % v případě sazí. Také nižší koncentrace 6PPD snížila enzymatickou aktivitu na 32,94 % oproti kontrolní variantě, podobně jako varianta ZnO 0,01 % (na 40,31 %). Méně než o polovinu byla aktivita inhibována u varianty saze 0,01 % (na 62,77 %). Naopak v případě varianty ZnO 0,1 % došlo ve srovnání s referenční hodnotou k nárůstu aktivity na 112, 25 % (0,11933 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹). V rámci stanovení muselo být vyjmuta 1 opakování varianty 6PPD 0,1 % z důvodu silného zabarvení laboratorního vzorku.

V druhém hodnocení bylo detekováno mírné snížení enzymatické aktivity u kontrolní varianty (0,09208 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹). V sérii byla nejvyšší inhibice opětovně naměřena u vzorku 6PPD 0,1 % (24,44 % oproti referenční hodnotě), druhá nejvyšší u vzorku ZnO 0,1 % (na 32,54 %), což lze považovat, ve srovnání s prvním měřením, za velmi významný pokles. U 0,01% koncentrací variant sazí a ZnO došlo ve srovnání s první analýzou k mírnému nárůstu aktivit. Ke zřetelnému zvýšení enzymatické aktivity došlo u varianty 6PPD 0,01 %, která dosahovala produkci 0,08202 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹ 89,07 % aktivity referenční (kontrolní) varianty. V této sérii stanovení byla vyjmuta 2 opakování u varianty 6PPD 0,1 % a 1 opakování varianty 6PPD 0,01 % z důvodu silného zabarvení vzorků.

Ve třetím měření nedošlo u kontrolní varianty k detekci změn. Ve srovnání s aktivitou vykázanou ve 2. stanovení došlo k jejímu významnému poklesu u varianty 6PPD 0,01 %, která byla stanovena na -6,37 % aktivity kontrolní varianty. K mírnému poklesu došlo také u varianty 6PPD 0,1 % (0,01098 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹, tj. na 11,92 %). Po poklesu se opětovně zvýšila enzymatická činnost u vzorku ZnO 0,1 %, z 0,02996 na 0,12222 mg TPF. kg⁻¹. h⁻¹, tj. na 132,73 %. Nejvyšší nárůst byl naměřen u varianty saze 0,1 %, který se 149,77 % převyšoval aktivitu u varianty kontrolní. Mezi vzorkem saze 0,01 % a kontrolou byl naměřen jen mírný rozdíl (96,56 %). Ze stanovení bylo opětovně vyjmuta 1 opakování varianty 6PPD 0,1 % z důvodu silného zabarvení vzorku.

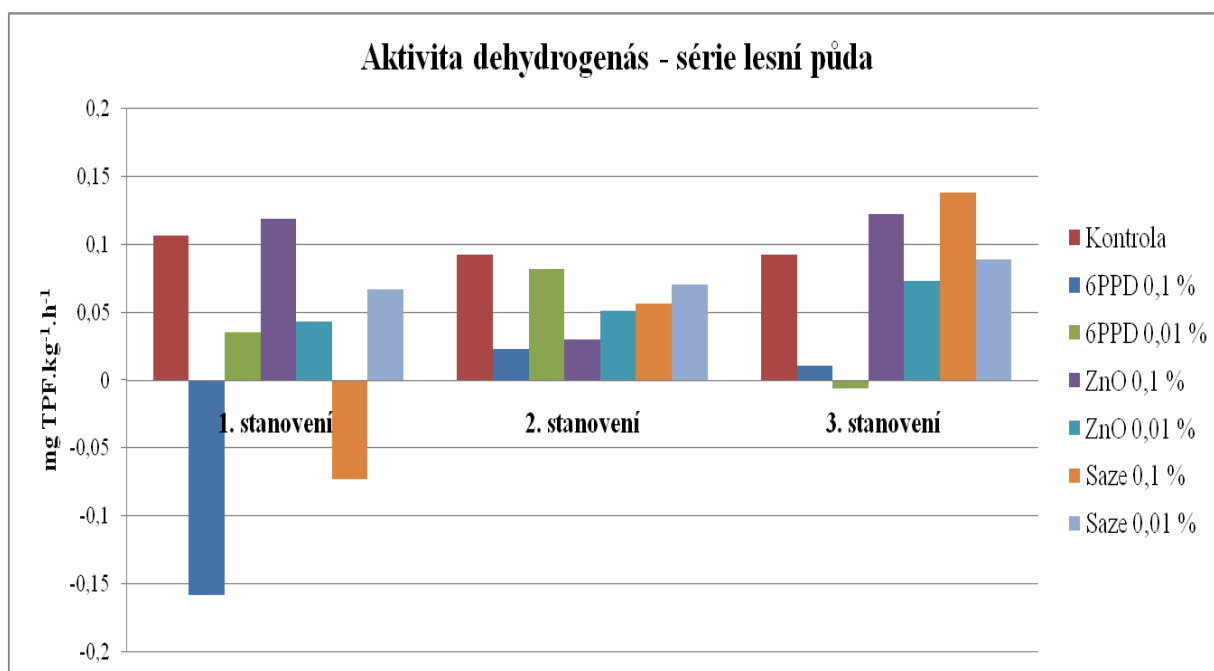
Tab. č. 8: Výsledky série stanovení aktivity dehydrogenás u variant lesní půdy

Lesní půda	Aktivita dehydrogenás mg TPF. kg ⁻¹ .h ⁻¹		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 20 h			
Kontrola	0,10631	0,09208	0,09208
6PPD 0,1 %	-0,15884	0,0225	0,01098
6PPD 0,01 %	0,03502	0,08202	-0,00587
ZnO 0,1 %	0,11933	0,02996	0,12222
ZnO 0,01 %	0,04285	0,05147	0,073
Saze 0,1 %	-0,07325	0,05622	0,13791
Saze 0,01 %	0,06673	0,07005	0,08891

Tab. č. 9: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Lesní půda	Aktivita dehydrogenás v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola = 100 %			
6PPD 0,1 %	-149,41	24,44	11,92
6PPD 0,01 %	32,94	89,07	-6,37
ZnO 0,1 %	112,25	32,54	132,73
ZnO 0,01 %	40,31	55,90	79,28
Saze 0,1 %	-68,90	61,06	149,77
Saze 0,01 %	62,77	76,08	96,56

Graf č. 6: Vývoj aktivity dehydrogenás u vzorků série lesní půdy



Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky 1. a 2. stanovení ($p=0,3128 > \alpha=0,05$), ani mezi hodnotami 2. a 3. stanovení ($p=0,5 > \alpha=0,05$).

U kontrolní varianty série orné půdy (lokalita Mělník) byla při všech stanovení naměřena mírně vyšší aktivita ve srovnání s kontrolní variantou série půdy lesní. Pro první stanovení byla referenční hodnota stanovena na $0,12765 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a k nejvyšší inhibici došlo opět u vzorku 6PPD 0,1 % (- 152,62 %). Druhá nejnižší enzymatická aktivita byla naměřena u vzorku saze 0,1 %, kde došlo ke snížení produkce trifenylformazanu na $0,0579 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (tj. na 45,36 %), útlum u ostatních kontaminovaných variant nebyl ve srovnání s prvním stanovením u série vzorků lesní půdy tak výrazný (tab. č. 10 a 11 a graf č. 7). K nejnižší inhibici došlo u varianty 6PPD 0,01 % (na 85,19 %) a ZnO 0,01 % (na 72,54 %).

Pro druhé stanovení byla vypočtena hodnota referenční aktivity na $0,12353 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. V tomto případě došlo k nejvyšší inhibici enzymatické aktivity u vzorku saze 0,1%, na 39,90 % ($0,04929 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). U variant 6PPD 0,1 % a saze 0,01 % byly naměřeny srovnatelné hodnoty, pokles se pohyboval v rozmezí 65–70 %. U varianty 6PPD 0,1 % došlo mezi stanoveními k výraznému nárůstu činnosti enzymů (na 65,89 %) a koncentrace 0,01 % vyvolala nadprůměrnou enzymatickou aktivitu, která dosáhla 108,66 % aktivity referenční. U vzorků kontaminovaných oxidem zinečnatým došlo mezi stanoveními k mírnému poklesu, u koncentrace 0,1 % na 48,80 % a u 0,01 % na 69,14 %.

Ve třetím stanovení činila referenční hodnota $0,18782 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, což lze hodnotit jako mírný nárůst oproti hodnotě předchozí. K nejvyššímu útlumu došlo u variant ZnO 0,01 %, u které bylo naměřeno pouze 61,56 % ve srovnání s aktivitou kontroly, a u vzorku saze 0,1 % (67,19 %). Varianta ZnO 0,1 % dosáhla 82,02 % s produkcí $0,15416 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Varianty 6PPD 0,01 % a saze 0,01 % dosáhly podobných hodnot (95–99%). V případě varianty 6PPD 0,1 % postupně došlo, po počáteční významné inhibici, k výraznému nárůstu enzymatické aktivity, která produkcí $0,32056 \text{ mg TPF} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ převýšila více než 1,5krát aktivitu ve vzorku kontrolním (170,67 %). Ze stanovení bylo vyloučeno po 1 opakování vzorků 6PPD 0,1 % a 0,01 % z důvodu výrazného zbarvení.

V rámci statistického hodnocení nebyl prokázán významný rozdíl mezi výsledky 1. a 2. stanovení ($p=0,3975 > \alpha=0,05$). Mezi výsledky 2. a 3. analýzy byl však statisticky významný rozdíl detekován ($p=0,01172 < \alpha=0,05$).

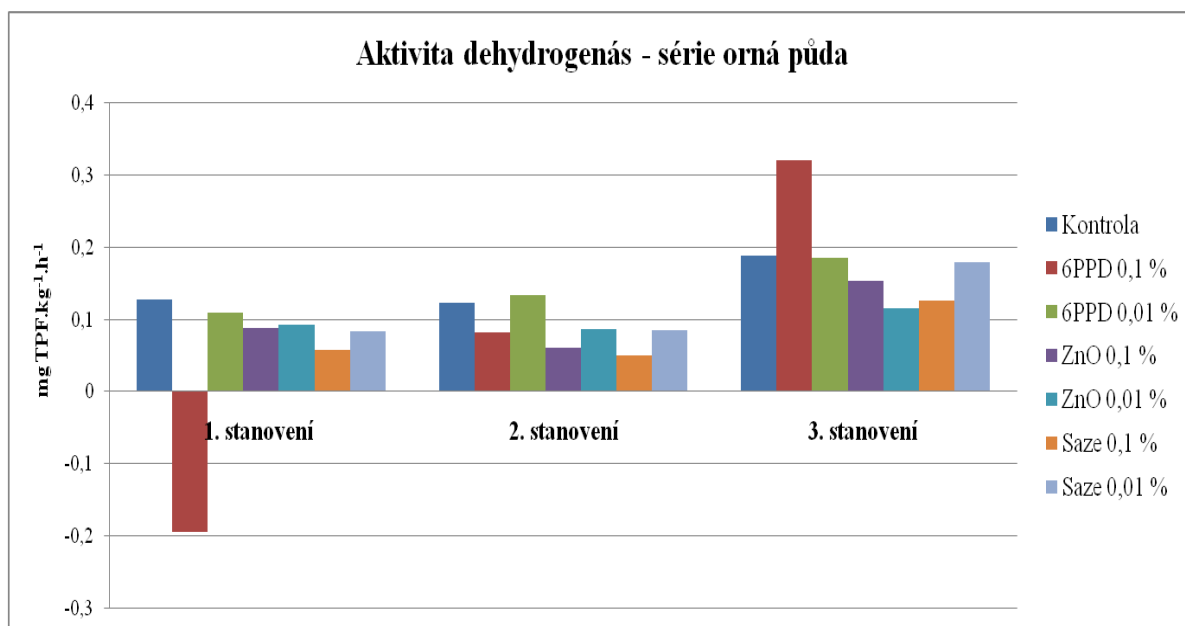
Tab. č. 10: Výsledky série stanovení aktivity dehydrogenás u variant orné půdy

Orná půda	Aktivita dehydrogenás mg TPF. kg ⁻¹ .h ⁻¹		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 20 h			
Kontrola	0,12765	0,12353	0,18782
6PPD 0,1 %	-0,19482	0,08139	0,32056
6PPD 0,01 %	0,10874	0,13423	0,18553
ZnO 0,1 %	0,08741	0,06028	0,15416
ZnO 0,01 %	0,0926	0,08604	0,11562
Saze 0,1 %	0,0579	0,04929	0,12619
Saze 0,01 %	0,08346	0,08541	0,17883

Tab. č. 11: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Orná půda	Aktivita dehydrogenás v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola = 100 %			
6PPD 0,1 %	-152,62	65,89	170,67
6PPD 0,01 %	85,19	108,66	98,78
ZnO 0,1 %	68,48	48,80	82,08
ZnO 0,01 %	72,54	69,65	61,56
Saze 0,1 %	45,36	39,90	67,19
Saze 0,01 %	65,38	69,14	95,21

Graf č. 7: Vývoj aktivity dehydrogenás u vzorků série orné půdy



5.2.2 Aktivita nitrátreduktázy

V prvním stanovení aktivity nitrátreduktázy u vzorků série lesní půda byla u kontrolní varianty naměřena referenční hodnota $0,00115 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} . Vyjma vzorku saze 0,01 %, kde došlo ke statisticky zanedbatelné inhibici (na 99,13 %), došlo u všech variant k významné nadprodukci dusíku. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny u varianty ZnO 0,1 %, která dosáhla $0,01006 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} (tj. 874,78 %), poté u vzorku ZnO 0,01 % (nárůst na 467,83 %) a saze 0,1 % (448,70 %). 6PPD o koncentraci 0,1 % navýšilo enzymatickou aktivitu na 290,43 %, která byla nižší ve srovnání s variantou 6PPD 0,01 % (334,78 %).

Ve druhém kole hodnocení došlo u kontrolní varianty k mírnému nárůstu enzymatické aktivity na $0,00140 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} . U všech sledovaných variant, vyjma 6PPD a saze o koncentraci 0,01 %, byla postupně snížena produkce dusíku, která však zůstala významně nad produkcí stanovené u kontrolního vzorku. U 6PPD 0,01 % došlo k navýšení na 350,71 % a u saze 0,01 % na 197,14 % referenční hodnoty. Nejvyšší aktivita byla opětovně naměřena u varianty ZnO 0,1 % ($0,00933 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} , tj. 666,43 %). Ze stanovení bylo vyjmuto 1 opakování varianty ZnO 0,01 % pro nestandardně nízkou hodnotu.

Také při třetím stanovení byla navýšena enzymatická aktivita u kontrolního vzorku na $0,00487 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} . Ve srovnání s touto hodnotou došlo u vzorků kontaminovaných saze k významným inhibicím. U vzorku saze 0,1 % byla aktivita snížena na -13,96 %, u saze 0,01 % na -2,88 % referenční hodnoty. K dalšímu výraznému snížení produkce dusíku došlo u varianty 6PPD 0,01 %, která klesla na $0,00071 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} (tj. 14,58 %), zatímco koncentrace 0,1% vykazala opětovně vysokou nadprodukci ($0,00829 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} , tj. 170,23 %). K nejvyšší enzymatické aktivitě došlo u vzorku ZnO 0,1 % (293,22 %), zatímco se snížením koncentrace kontaminantu na koncentraci 0,01 % došlo k významné inhibici (na 3,90 %).

U série vzorků lesní půdy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ani ve výsledcích 1. a 2. stanovení ($p= 0,931726 > \alpha= 0,05$), ani 2. a 3. stanovení ($p= 0,860434 > \alpha= 0,05$). Výsledky průběžného hodnocení aktivity nitrátreduktázy u vzorků lesní půdy jsou uvedeny v tabulkách č. 12 a 13 a znázorněny v grafu č. 8.

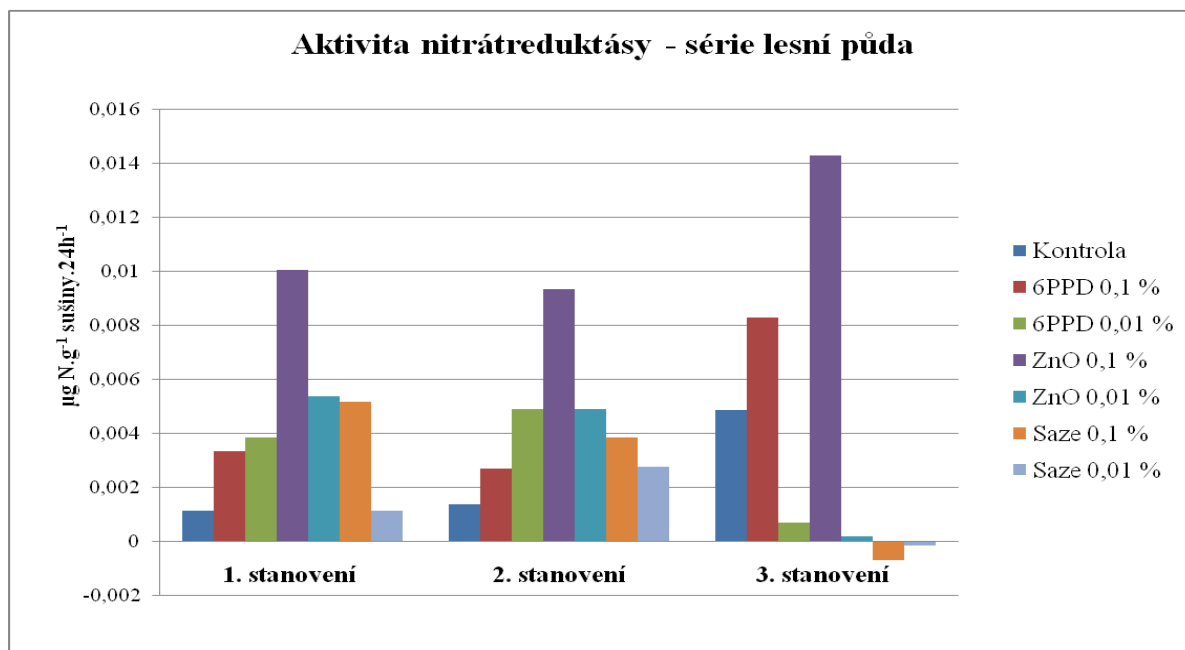
Tab. č. 12: Výsledky série stanovení aktivity nitrátreduktázy u variant lesní půdy

Lesní půda	Aktivita nitrátreduktázy $\mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24h^{-1}		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 24 h			
Kontrola	0,00115	0,0014	0,00487
6PPD 0,1 %	0,00334	0,00269	0,00829
6PPD 0,01 %	0,00385	0,00491	0,00071
ZnO 0,1 %	0,01006	0,00933	0,01428
ZnO 0,01 %	0,00538	0,00489	0,00019
Saze 0,1 %	0,00516	0,00385	-0,00068
Saze 0,01 %	0,00114	0,00276	-0,00014

Tab. č. 13: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Lesní půda	Aktivita nitrátreduktázy v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola = 100 %			
6PPD 0,1 %	290,43	192,14	170,23
6PPD 0,01 %	334,78	350,71	14,58
ZnO 0,1 %	874,78	666,43	293,22
ZnO 0,01 %	467,83	349,29	3,90
Saze 0,1 %	448,70	275,00	-13,96
Saze 0,01 %	99,13	197,14	-2,88

Graf č. 8: Vývoj aktivity nitrátreduktázy u vzorků série lesní půdy



U všech variant série orné půdy byla ve srovnání s půdou lesní stanovena aktivita řádově vyšší. V prvním hodnocení byla stanovena referenční hodnota aktivity nitrátreduktázy na $0,05787 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} . Ve srovnání s touto hodnotou došlo k nejvyšší inhibici u vzorku saze 0,1 %, která vykazala produkci $0,01116 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} (19,29 %). Na rozdíl od série lesní došlo u variant kontaminovaných 6PPD k inhibici, v případě koncentrace 0,1 % na 40,44 %, u koncentrace 0,01 % na 46,40 %. Na stranu druhou, stejně jako v sérii lesní půda byla nejvyšší produkce dusíku stanovena u variant ZnO 0,1 % a 0,01 % (173,41 % a 117,76 % oproti referenční hodnotě). Mírné zvýšení enzymatické aktivity bylo také stanoveno u varianty saze 0,01 % (109,59 %).

Při druhém stanovení byl detekován pokles enzymatické aktivity kontrolní varianty na $0,04063 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} . Stejně jako v prvním kole byla nejvyšší inhibice stanovena u vzorku saze 0,1 %, tentokrát na 34,33 %. Nižší koncentrace sazí vykazala mírné snížení produkce dusíku, která klesla na 79,03 % oproti referenční hodnotě. Mezi stanoveními došlo k mírnému navýšení u vzorků kontaminovaných 6PPD, u varianty 0,1 % na 50,08 % a u 0,1% na 47,48 % v porovnání s variantou kontrolní. Zatímco nejvyšší aktivita byla opětovně stanovena u vzorku ZnO 0,1%, která více než dvojnásobně převyšovala aktivitu referenční (213,71 %), u koncentrace 0,01 % došlo mezi stanoveními k projevům inhibičních účinků (63,23 %, tj. $0,02569 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1}).

Pro závěrečnou sérii hodnocení byla stanovena referenční aktivita nitrátreduktázy na $0,03715 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1} , což indikuje mírný pokles přirozené enzymatické činnosti. V tomto kole byla nejvyšší inhibice opět zjištěna u varianty saze 0,1 % (na 37,55 %, tj. $0,01395 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1}), naopak u vzorku saze 0,01 % došlo po předchozím poklesu k vyrovnání s variantou kontrolní (na 101,91 %). U obou variant s příměsí oxidu zinečnatého bylo zjištěno převýšení referenční hodnoty, v případě koncentrace 0,1 % téměř pětinásobné (na 497,85 %, tj. $0,18495 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1}), u vzorku ZnO 0,01 % na téměř 1,5 násobek (142,45 %, tj. $0,05292 \mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h^{-1}). U vzorků 6PPD došlo k zaznamenání opětovného útlumu inhibičních účinků, u koncentrace 0,1 % vrostla naměřená aktivita na 82,77 % a u 0,01 % na 74,97 %.

Zatímco mezi výsledky 1. a 2. stanovení u série vzorků orné půdy byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p= 0,039451 < \alpha= 0,05$), mezi 2. a 3. stanovením takový vztah detekován nebyl ($p= 0,170853 > \alpha= 0,05$). Výsledky průběžného hodnocení aktivity nitrátreduktázy u vzorků série orné půdy jsou uvedeny v tabulkách č. 14 a 15 a znázorněny v grafu č. 9.

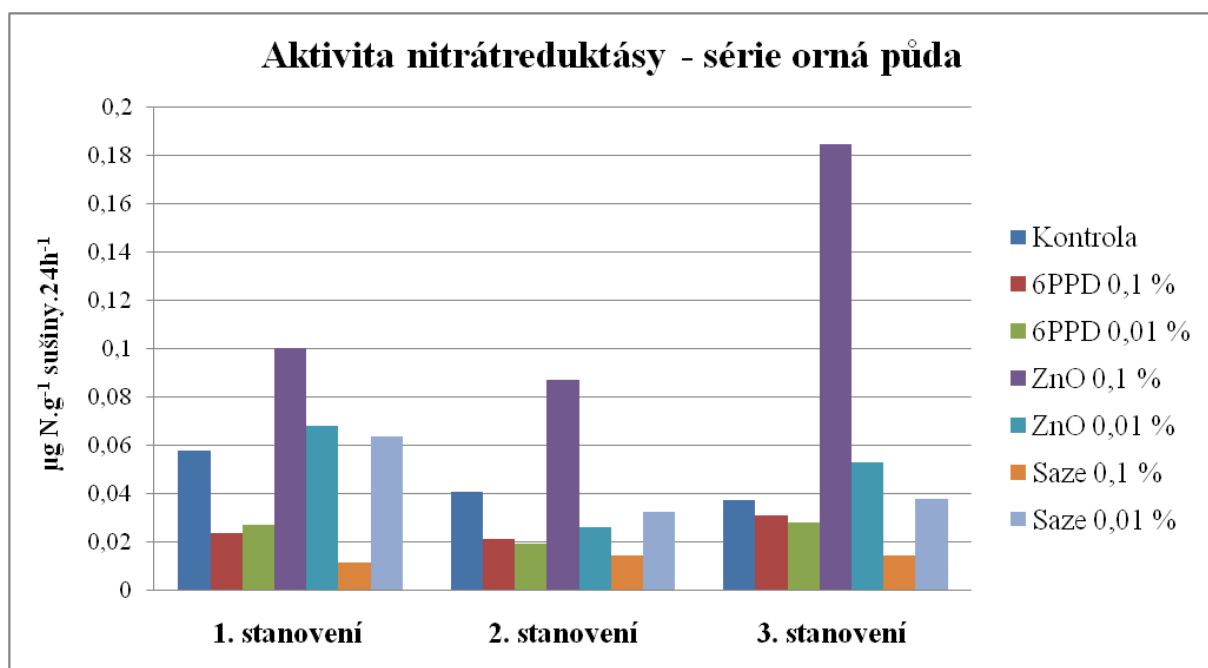
Tab. č. 14: Výsledky série stanovení aktivity nitrátreduktázy u variant orné půdy

Orná půda	Aktivita nitrátreduktázy $\mu\text{g N. g}^{-1}$ sušiny. 24 h ⁻¹		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 24 h			
Kontrola	0,05787	0,04063	0,03715
6PPD 0,1 %	0,0234	0,02116	0,03075
6PPD 0,01 %	0,02685	0,01917	0,02785
ZnO 0,1 %	0,10035	0,08683	0,18495
ZnO 0,01 %	0,06815	0,02569	0,05292
Saze 0,1 %	0,01116	0,01395	0,01395
Saze 0,01 %	0,06342	0,03211	0,03786

Tab. č. 15: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Orná půda	Aktivita nitrátreduktázy v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola =100 %			
6PPD 0,1 %	40,44	52,08	82,77
6PPD 0,01 %	46,40	47,18	74,97
ZnO 0,1 %	173,41	213,71	497,85
ZnO 0,01 %	117,76	63,23	142,45
Saze 0,1 %	19,29	34,33	37,55
Saze 0,01 %	109,59	79,03	101,91

Graf č. 9: Vývoj aktivity nitrátreduktázy u vzorků série orné půdy



5.2.3 Aktivita kyselých fosfatásy

Aktivita kyselých fosfatásy byla hodnocena na základě produkce *p*-nitrofenolu (PNP). V první sérii stanovení (série vzorků lesní půdy) byla naměřena kontrolní aktivita v přepočtu 4048 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. U žádné z kontaminovaných variant nedošlo v tomto případě k detekci inhibičních účinků. Nejnižší aktivita kyselých fosfatásy byla stanovena u varianty 6PPD 0,01 %, která dosáhla 102,72 % a dále u varianty saze 0,1 % (106,25 %). Nejvyšší nadprodukce PNP byla pozorována u obou sledovaných koncentrací oxidu zinečnatého. Ve vzorku ZnO 0,1 % došlo k nárůstu na 115,22 % (tj. 4664 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$), u varianty s 0,01% koncentrací na 120,92 % (tj. 4895 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$).

Při druhém stanovení bylo zaznamenáno významné snížení přirozené enzymatické aktivity u všech vzorků (kontroly i kontaminovaných variant). Referenční hodnota klesla na 2200 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$, pod níž ani v tomto stanovení neklesl žádný z výsledků. Nejvyšší produkce PNP byla tentokrát detekována u vzorku saze 0,1 %, tj. 2695 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$ (122,50 %), ostatní varianty vykázaly srovnatelné výsledky v rozmezí 104 – 110 %. Nejnižší produkce byla stanovena u vzorku saze 0,01 % (103,00%), což poukazuje na mírný pokles ve srovnání s prvním stanovením.

Referenční hodnota pro třetí kolo stanovení vzrostla na 2585 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. V této sérii analýz se poprvé prokázaly inhibiční účinky jednotlivých kontaminantů. K největšímu měřitelnému poklesu došlo u vzorků 6PPD, u nichž enzymatická aktivita koncentrace 0,1 % poklesla na 76,17 % a varianty 0,01 % na 79,15 % ve srovnání s kontrolou. Po předchozí aktivaci došlo také u vzorků ZnO k detekci poklesu, u varianty 0,1 % na 2233 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$ (86,38 %), u 0,01 % na 2079 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$ (80,43%), což je srovnatelné s účinky sazí o koncentraci 0,01 % (inhibice na 85,53 %). Nadprodukce PNP byla stanovena pouze u vzorku saze 0,1 % (2717 $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$, tj. 105,11 %).

Zatímco mezi výsledky 1. a 2. stanovení byl stanoven statisticky významný rozdíl ($p=0,000002 < \alpha=0,05$), mezi výsledky 2. a 3. stanovení nikoli ($p=0,305552 > \alpha=0,05$). Souhrn naměřených dat ze série vzorků lesní půdy je uveden v tabulkách č. 16 a 17 a znázorněn na grafu č. 10.

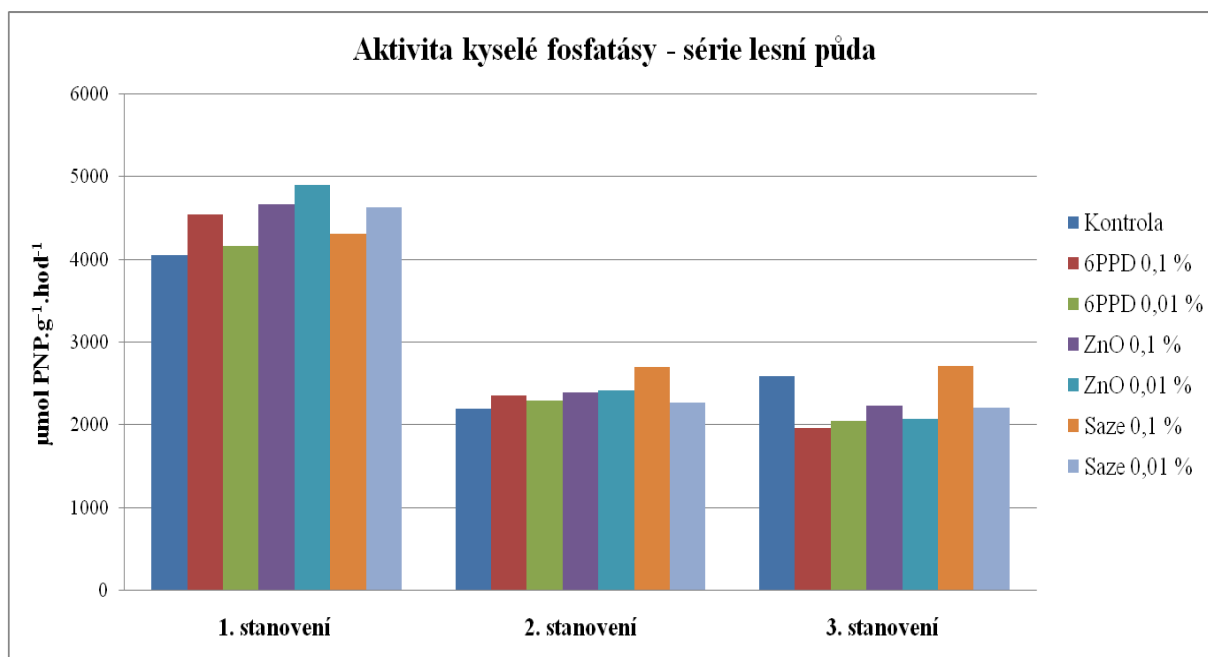
Tab. č. 16: Výsledky série stanovení aktivity kyselé fosfatázy u variant lesní půdy

Lesní půda	Aktivita kyselé fosfatázy $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 24 h			
Kontrola	4048	2200	2585
6PPD 0,1 %	4543	2354	1969
6PPD 0,01 %	4158	2299	2046
ZnO 0,1 %	4664	2387	2233
ZnO 0,01 %	4895	2420	2079
Saze 0,1 %	4301	2695	2717
Saze 0,01 %	4620	2266	2211

Tab. č. 17: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Lesní půda	Aktivita kyselé fosfatázy v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola = 100 %			
6PPD 0,1 %	112,23	107,00	76,17
6PPD 0,01 %	102,72	104,50	79,15
ZnO 0,1 %	115,22	108,50	86,38
ZnO 0,01 %	120,92	110,00	80,43
Saze 0,1 %	106,25	122,50	105,11
Saze 0,01 %	114,13	103,00	85,53

Graf č. 10: Vývoj aktivity kyselé fosfatázy u vzorků série lesní půdy



U kontrolních vzorků série orné půdy byla zjištěna nižší přirozená aktivita kyselých fosfatásy, referenční hodnota prvního stanovení činila $4015 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. Na rozdíl od série lesní půdy byla zjištěna inhibice již po prvním měsíci inkubace u všech kontaminovaných variant. K nejvyšší odezvě došlo u vzorků kontaminovaných oxidem zinečnatým, u varianty ZnO 0,1 % klesla aktivita na 71,51 % ($2871 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$), u ZnO 0,01 % na 80,55 % ($3234 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$). Velmi nízký pokles byl stanoven také u variant 6PPD 0,1 % (87,12 %) a 6PPD 0,01 % (90,14 %). Výsledky u variant saze 0,1 % a 0,01 % byly téměř shodné s referenční hodnotou.

Stejně jako u předchozí série, klesla i při druhém stanovení aktivita u kontrolního vzorku (na $1254 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$). Téměř shodnou aktivitu vykázaly také varianty saze 0,01 % (100,88 %) a saze 0,1 % (102,63 %). Inhibice enzymatické činnosti přetrvávala u vzorků 6PPD 0,1 % (nárůst na 95,61 %) a ZnO 0,1 % (nárůst na 81,58 % referenční hodnoty). U variant 6PPD 0,01 % a ZnO 0,01 % došlo naopak k nadprodukci PNP, výsledné aktivity vykázaly nárůst na 115,79 % (u 6PPD 0,01 %) a na 132,46 % (u ZnO 0,01 %).

Ve třetím kole stanovení byla detekována inhibice u všech vzorků, vyjma varianty ZnO 0,01 %, jejíž aktivita dosahovala 118,18 % hodnoty stanovené u kontrolní varianty (tj. $1452 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$). Vyšší koncentrace ZnO a 6PPD vykázaly nejvyšší útlum enzymatické aktivity (na 72,73 % u ZnO 0,1% a na 79,55 % u 6PPD). Po vyrovnaném výsledku předchozího stanovení došlo k poklesu také u variant saze 0,1 % (na $1188 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$, tj. 81,82 %) a saze 0,01 % (na $1353 \mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$, tj. 93,18 %). Vzorek 6PPD 0,01 % vykázal shodný trend jako v sérii lesní půdy. Zatímco ve druhém stanovení u něj byla naměřena nadprodukce PNP, po dalším měsíci inkubace došlo k poklesu na 91,67 % aktivity kontrolní varianty.

Mezi výsledky 1. a 2. stanovení byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,000011 < \alpha=0,05$), mezi výsledky 2. a 3. kola nikoli ($p=0,724009 > \alpha=0,05$). Souhrn výsledků dlouhodobého měření aktivity kyselých fosfatásy u vzorků série orná půda je uveden v tabulkách č. 18 a 19 a znázorněn v grafu č. 10.

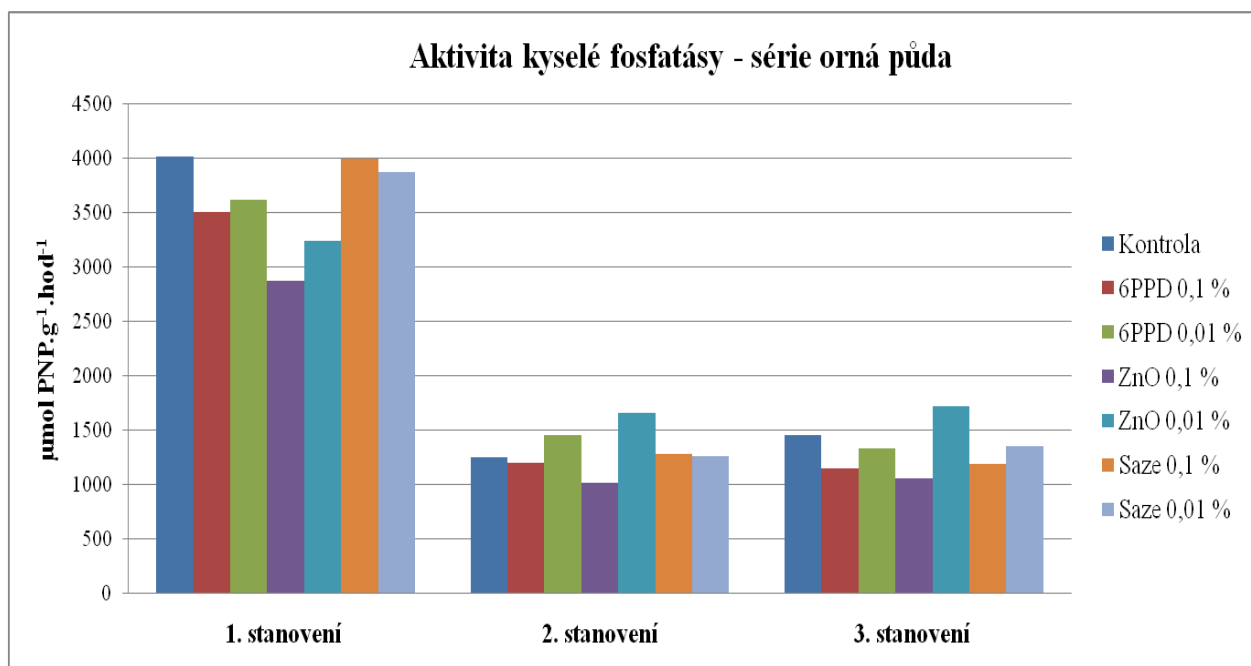
Tab. č. 18: Výsledky série stanovení aktivity kyselé fosfatázy u variant orné půdy

Orná půda	Aktivita kyselé fosfatázy $\mu\text{mol PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
inkubace: 24 h			
Kontrola	4015	1254	1452
6PPD 0,1 %	3498	1199	1155
6PPD 0,01 %	3619	1452	1331
ZnO 0,1 %	2871	1023	1056
ZnO 0,01 %	3234	1661	1716
Saze 0,1 %	3993	1287	1188
Saze 0,01 %	3872	1265	1353

Tab. č. 19: Porovnání výsledků stanovení ve srovnání s kontrolní půdní variantou

Orná půda	Aktivita kyselé fosfatázy v porovnání vůči kontrolní variantě (%)		
	1. stanovení	2. stanovení	3. stanovení
kontrola = 100 %			
6PPD 0,1 %	87,12	95,61	79,55
6PPD 0,01 %	90,14	115,79	91,67
ZnO 0,1 %	71,51	81,58	72,73
ZnO 0,01 %	80,55	132,46	118,18
Saze 0,1 %	99,45	102,63	81,82
Saze 0,01 %	96,44	100,88	93,18

Graf č. 10: Vývoj aktivity kyselé fosfatázy u vzorků série orné půdy



5.3 Testy klíčivosti na půdách

Pro tento test byly použity půdní varianty založené v nádobovém pokusu, které byly ponechány 4 měsíční inkubaci. V průběhu pokusu byly zaznamenány problémy s klíčením rostlin u všech variant série lesní půdy, pravděpodobně vlivem velmi nízkého pH (3,08).

V kontrolní variantě lesní půdy vyklíčila pouze 3 semena lupiny bílé (*Lupinus albus*), což při maximu 15 semen činí 20 %. Srovnatelná klíčivost byla stanovena u variant 6PPD 0,1 %, ZnO 0,01% a sazí 0,1 %. Na vzorku s nižší koncentrací oxidu zinečnatého, tj. 0,01 %, vyklíčilo 13,33 % semen (2 semena) a nejnižší klíčivost byla zaznamenána u variant 6PPD 0,01 % a saze 0,01 % (6,67 %, tj. 1 semeno).

Pro hodnocení průměrné délky nadzemní biomasy byla u kontrolní varianty naměřena referenční délka 11,30 cm. U obou sledovaných koncentrací sazí byl sledován nárůst průměrné délky oproti kontrole v průměru o 9,6 %. K nejvyššímu nárůstu došlo u jediné vyklíčené rostliny na půdě s 0,01 % koncentrací sazí (12,40 cm). Naopak k největší inhibici tvorby nadzemní biomasy došlo u varianty 6PPD 0,01% , 40,71 % oproti kontrole. U vzorků 6PPD 0,1% a ZnO 0,1 % dosahovala průměrná délka rostlin mírně nad polovinu referenční hodnoty (tj. 55,49 % a 53,1 %). Rostliny na variantě ZnO 0,01 % dosáhly v průměru 93,8 % referenční hodnoty, tj. 10,60 cm. Výsledky testu klíčivosti v sérii lesní půdy jsou uvedeny v tab. č. 20.

Tab. č. 20: Souhrnné výsledky testu klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) na variantách série lesní půda, 100 % = 15 semen

Lesní půda	vyklíčené rostliny	% vyklíčených	průměrná délka nadzemní biomasy (cm)
Kontrola	3	20,00	11,30
6PPD 0,1 %	3	20,00	6,27
6PPD 0,01 %	1	6,67	4,60
ZnO 0,1 %	2	13,33	6,00
ZnO 0,01 %	3	20,00	10,60
Saze 0,1 %	3	20,00	12,37
Saze 0,01 %	1	6,67	12,40

Na nekontaminované (kontrolní) variantě série orné půdy vyklíčilo celkem 5 semen, tj. 33,33 %, což činí maximum pro celou sérii. Celkově 4 semena (26,67 %) se

ujala u variant 6PPD 0,1 % a sazí 0,01 %. U varianty 6PPD 0,01% nevyklíčilo žádné semeno a u obou hodnocených koncentrací oxidu zinečnatého 2 (13,33 %).

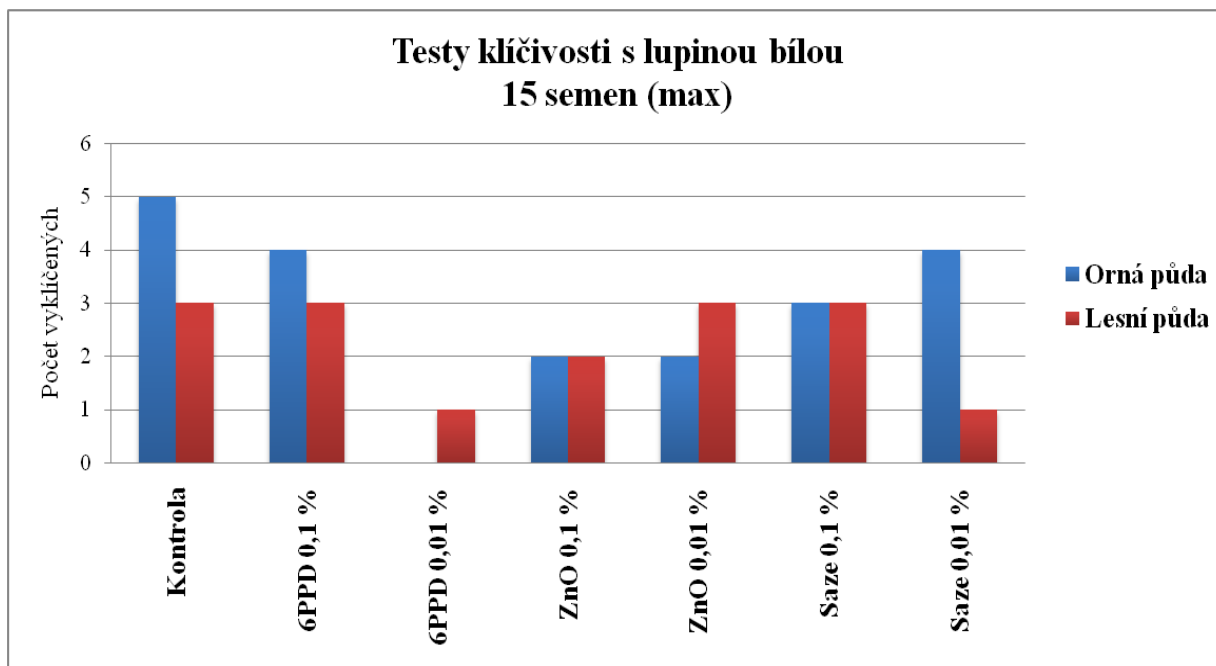
Pro tuto sérii byla referenční průměrná délka nadzemní biomasy rostlin stanovena na 12,55 cm. U variant 6PPD 0,1 % a saze 0,1 % došlo k jejímu převýšení, v prvním případě o 16,57 % a ve druhém o 52,99 %. Nejnižší nárůst byl stanoven u varianty ZnO 0,1 %, u níž dosáhl v průměru 5,25 cm (41,83 %). Výsledky testu klíčivosti půd série orné jsou uvedeny v tabulce č. 21.

Tab. č. 21: Souhrnné výsledky testu klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) na variantách série orná půda, 100 % = 15 semen

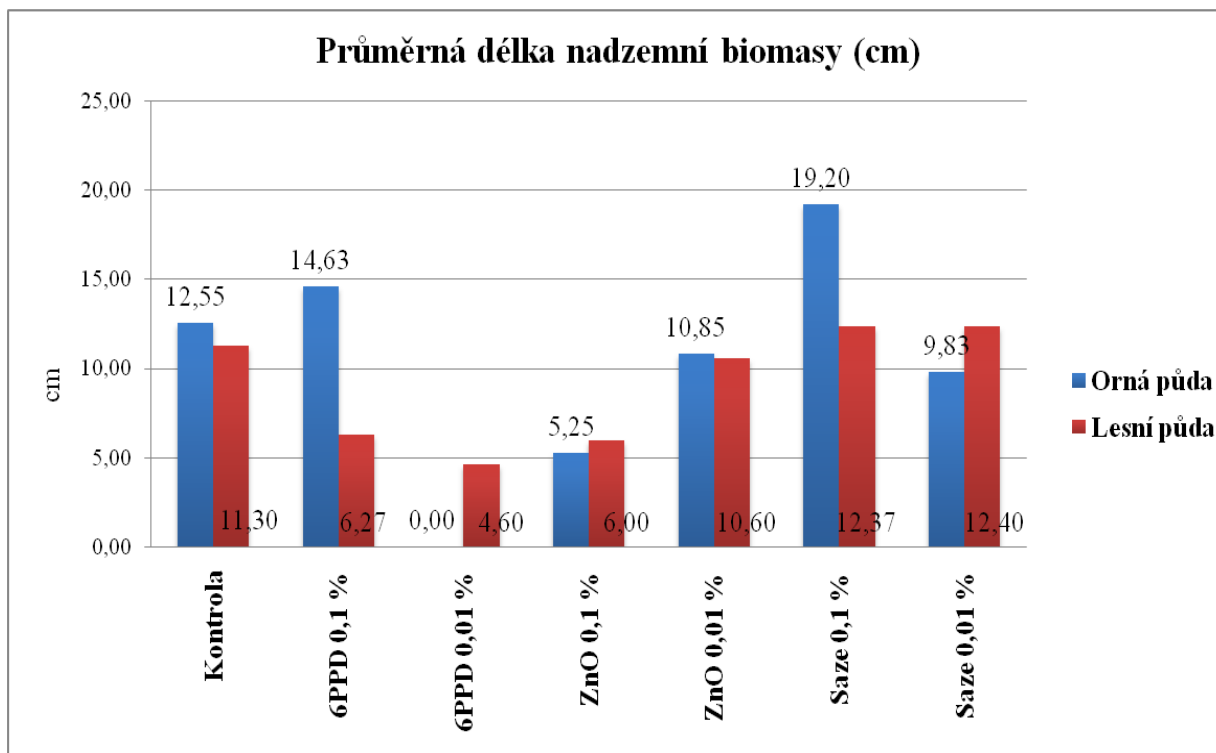
Orná půda	vyklíčené rostliny	% vyklíčených	průměrná délka nadzemní biomasy (cm)
Kontrola	5	33,33	12,55
6PPD 0,1 %	4	26,67	14,63
6PPD 0,01 %	0	0,00	0,00
ZnO 0,1 %	2	13,33	5,25
ZnO 0,01 %	2	13,33	10,85
Saze 0,1 %	3	20,00	19,20
Saze 0,01 %	4	26,67	9,83

Při porovnání obou sérií (grafy č. 11 a 12) lze konstatovat, že vyšší průměrné klíčivosti dosáhly vzorky série orné půdy, vyznačující se vyšším pH (5,76). U obou sérií byl shodně zaznamenán problém s klíčením a následnou tvorbou nadzemní biomasy u variant 6PPD 0,01 %. Vzešlé rostliny byly malého vzrůstu, ovšem bez dalších zjevných stresových projevů. Shodná klíčivost mezi sériemi byla stanovena u vzorků ZnO 0,1 % a saze 0,1 %, přestože v případě orné půdy byl u sazí zaznamenán vysoce nadprůměrný nárůst biomasy. Vyšší koncentrace oxidu zinečnatého působila na rostliny u obou stanovení výrazně inhibičně.

Graf č. 11: Porovnání klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) mezi variantami série lesní a orné půdy



Graf č. 12: Porovnání průměrné délky nadzemní biomasy rostlin lupiny bílé (*Lupinus albus*) mezi variantami série lesní a orné půdy



Obr. č. 16: Nárůst rostlin lupiny bílé (*Lupinus albus*) v testu klíčivosti na půdách



5.4 Testy klíčivosti na půdních výluzích

Test klíčivosti na půdních výluzích byl proveden pouze u vzorků série orná půda. V průběhu filtrace vykázal výluh vzorku saze 0,1 % nestandardní zbarvení (viz obr. č. 16).

Obr. č. 16: Atypické zbarvení půdního výluhu vzorku saze 0,1 % (vz. č. 6)



Vzhledem k nulové klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) ve výluhu kontrolní půdy a k nízké klíčivosti u variant s demineralizovanou vodou (3/24) byl za referenční hodnotu pro závěrečné hodnocení zvolen celkový počet semen ve všech 4 opakování, tj. 24.

Nejvyšší počet vyklíčených semen byl stanoven u varianty 6PPD 0,01 % (5 semen, tj. 20,83 %). Klíčící rostliny nevykazovaly žádné fyziologické projevy stresu. Ve výluhu o

koncentraci 0,1 % vyklíčila celkem 4 semena (tj. 16,67 %), která byla ve srovnání s předchozí variantou menší (viz obr. č. 17). U obou výluhů s obsahem oxidu zinečnatého vyklíčila shodně 4 semena, u varianty s koncentrací 0,1 % byl na jedné straně pozorován nejvyšší nárůst, na straně druhé se však u klíčících rostlin objevily nekrózy kořenových špiček. Při porovnání jednotlivých kontaminantů vykázaly nejnižší klíčivost výluhy obsahující saze. Ve variantě 0,1 % (nestandardně zbarvený výluh) vyklíčila pouze 2 semena (tj. 8,33 %) a nalezené rostliny byly zakrnělé. U varianty 0,01 % byla zaznamenána 100 % inhibice klíčení.

Ze statistického šetření vyplývá, že neexistuje lineární závislost mezi koncentrací kontaminantu v půdním výluhu a počtem nevyklíčených semen. V případě 6PPD činí hodnota $R^2=0,125$, u ZnO $R^2=0,000$ a sazí $R^2=0,577$.

Přehled výsledků testu klíčivosti na půdních výluzích je uveden v tab. č. 22.

Tab. č. 22: Výsledky testu klíčivosti semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) na půdních výluzích

Varianty	3. den	%	5. den	%
kontrolní půda	0	0	0	0
6PPD 0,1 %	4	16,67	4	16,67
6PPD 0,01 %	5	20,83	5	20,83
ZnO 0,1 %	4	16,67	4	16,67
ZnO 0,01 %	4	16,67	4	16,67
Saze 0,1 %	2	8,33	2	8,33
Saze 0,01 %	0	0	0	0
kontrola (H ₂ O)	1	4,17	3	12,5

Obr. č. 17: Porovnání vzhledu klíčících semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) u variant 6PPD 0,01 % a 0,1 %



6 Diskuze

Problematika potenciální kontaminace půd gumárenskými surovinami dozajista zasluhuje vyšší pozornost. Existující environmentální studie zaměřují pozornost zejména na účinky individuálních látek na organismy vyšších trofických úrovní, případně studují rizika spojená s jejich uvolňováním z vulkanizované pryže, ovšem pouze zlomek se jich věnuje jejich vlivu na půdní mikroflóru a vegetaci (Jackdale a kol., 2015).

Na základě testování výluhů čistých látek lze usuzovat, že žádná z vybraných gumárenských surovin nemá v surovém stavu prokazatelné inhibiční účinky na klíčivost semen ani na tvorbu nadzemní biomasy ředkve seté (*Raphanus sativus L. var. sativus*) ($R^2_{6PPD} = 0,096$; $R^2_{ZnO} = 0,0927$, $R^2_{saze} = 0,0449$). Limitujícím faktorem pro toho stanovení je velmi nízká rozpustnost těchto látek ve vodě. 6PPD a saze jsou svým charakterem obecně vůči polárním rozpouštědlům odolné a deklarovaná rozpustnost oxidu zinečnatého je nižší, než 1,6 mg/l (ECB, 2008). Z tohoto důvodu byla extrakce prováděna po dobu 6 dnů. V závěru pokusu byly klíčící rostliny hodnoceny jako zdravé, bez zjevných projevů stresových reakcí.

Pouze u vzorků inkubovaných na výluzích 6PPD byl při vysokých koncentracích zaznamenán negativní vliv antidegradantu na fyziologické funkce projevující se nekrózami pletiv a chlorózami listů. Prokazatelně inhibiční efekt nebyl stanoven ani po dlouhodobé inkubaci půdních vzorků při hodnocení klíčivosti semen na půdních výluzích (série orné půdy), ovšem sledovaná semena lupiny bílé (*Lupinus albus*) ve variantě 0,1 % byla oproti variantě 0,01 % zakrnělá. Tyto výsledky však nekorelují s výsledky nádobového pokusu, při němž došlo u vyšší koncentrace v sérii orné půdy ke stimulaci nárůstu biomasy (průměrně o 2,08 cm oproti kontrole), zatímco u nižší koncentrace ke klíčení nedošlo. U série lesní půdy byl pozorován jev podobný, koncentrace 0,01 % 6PPD vykazala oproti 0,1 % negativnější účinky.

Nejcitlivější odezva na přítomnost 6PPD v půdě byla detekována při měření enzymatické aktivity přítomné mikroflóry, zejména v případě dehydrogenás a nitrátoreduktásy. Dehydrogenásy, jakožto intracelulární enzymy, nepřímo kvantifikují živou mikrobiální složku půdy (Wolińska a Stępniewska, 2012). Kontaminace lesní série granulemi 6PPD vedla k vysoké míře dlouhodobé inhibice jejich aktivity. Antidegradant podléhá jen v omezené míře mineralizaci, pravidelná závlaha, velmi nízké pH a přítomná mikroflóra mohly urychlit degradaci mateční látky na toxické produkty typu

N-fenyl-p-benzochinonimin, 1,3-dimethylbutylamin a 4-hydroxydifenylamin a jejich analogy, které se vyznačují vyšší rozpustností, a tím i snazší distribucí v půdní matrici (OECD, 2004). Další hypotetickou možností je silné navázání 6PPD na půdní organickou hmotu ($K_{oc} = 69\ 700$) a projevení jeho antioxidačních vlastností, které vedly k blokaci substrátu pro mikrobiální respiraci a následnému úhynu mikroorganismů (Matyja a kol., 2016; OECD, 2004). U série orné půdy byla tato inhibice detekována pouze po prvním měsíci inkubace, v delším časovém období došlo k vyrovnání a až nadprůměrné aktivaci enzymu.

Podobný průběh mělo hodnocení aktivity nitrátreduktázy u stejné půdní série, při němž byl pozorován postupný pokles inhibičního efektu 6PPD a jeho produktů. U série vzorků s lesní půdou byl v každé fázi pokusu detekován významně aktivační vliv vysoké koncentrace. Inhibice detekovaná u variant lesní série byla pravděpodobně také projevem navázání 6PPD na organický substrát a jeho znehodnocení pro přítomné denitrifikační bakterie, což vedlo k nedostatku elektronů pro redukci oxidovaných forem dusíku.

V rámci sledování enzymatické aktivity dehydrogenás a nitrátreduktázy lze usuzovat, že z hlediska dlouhodobé expozice půd 6PPD představuje jeho nižší koncentrace bezprostřednější environmentální riziko.

V případě oxidu zinečnatého lze provést porovnání s výsledky studie, kterou provedli Lin a Xing (2007) a ve které byly sledovány fyto toxické účinky nanočástic oxidu zinečnatého ve vodném výluhu na semena brukve řepky (*Brassica napus*), jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) a ředkve seté (*Raphanus sativus*). Zatímco v námi provedeném testu s práškovým oxidem zinečnatým nebyla pozorována inhibice klíčení semen ředkve u žádné ze zvolených koncentrací ZnO (průměrná 90 – 100% klíčivost), z výsledků jejich analýz vyplývá, že působením uvolněného zinku z nanočástic došlo k terminaci kořenového prodlužování. Inhibiční koncentrace (IC_{50}) byla u ředkve stanovena na hodnotu 5 mg/100 ml, tj. 0,005 g/100 ml, u jílku a brukve na 2 mg/100 ml. Pokhrel a Dubey (2013) ve své práci porovnávají účinky nanočástic ZnO s rozpustnější formou $ZnSO_4$ na semenech hlávkového zelí (*Brassica oleracea var. capitata*) a kukuřice seté (*Zea mays*) pro koncentrace v rozmezí 0,01 – 1000 $\mu g/ml$. Z jejich hodnocení vyplývá, že pouze u zelí došlo k pozorované inhibici klíčení, která však byla prokazatelně nižší, než u vzorků ošetřených $ZnSO_4$. V námi provedeném testu s půdním výluhem opět nebyly pozorovány inhibiční účinky ZnO na klíčivost, u vyšší koncentrace byla však zaznamenána počáteční nektróza kořenů.

U nádobového pokusu s klíčením lupiny bílé (*Lupinus albus*) na kontrolních a kontaminovaných půdách po 4 měsíční expozici nedošlo k detekci výrazných stresových reakcí. V rámci tohoto stanovení nelze pominout vliv přirozených faktorů, zejména velmi nízké hodnoty pH u série lesní půda (3,08). Ovečka a Takáč (2014) tvrdí, že při $\text{pH} < 5$ dochází k přirozené redukci růstu rostlin způsobené alokací zdrojů pro zvýšení pH v rhizosféře. Pro udržení pufrčních schopností jsou klíčovými faktory obsah půdní organické hmoty, dostupnost Fe a P a formy N v rhizosféře. Pravděpodobně z tohoto důvodu byla u kontrolní varianty série lesní půda zaznamenána tak nízká klíčivost. Získaná data lze tedy považovat za výsledek interakce přirozených půdních vlastností a vlastních kontaminantů.

Stres vyvolaný kontaminanty se projevil buď inhibicí klíčení, nebo snížením schopnosti rostlin tvořit nadzemní biomasu. Právě redukce růstu je jedním ze zjevných fyziologických projevů expozice těžkým kovům. Kovové ionty snižují schopnost kořenů přijímat vodu a také míru respirace a fotosyntézy (Ovečka a Takáč, 2014). Konkrétně u kontaminace ZnO byl prokázán vztah mezi jeho koncentrací a množstvím rostlinné biomasy (Bandyopadhyaya a kol., 2015). Bandyopadhyaya a kol. (2015) využili ke svému testování semena vojtěškovitých rostlin a půdu charakterem jílovitá až písčitojílovitá s $\text{pH } 7,8 \pm 0,1$. Nanočástice oxidu zinečnatého prokázaly inhibiční vliv až při koncentraci 0,75 g/kg (pokles na 23 % oproti kontrolní variantě). Pro porovnání, u ZnCl_2 došlo při stejné koncentraci k inhibici o 80 %. Naopak v pokusech, které provedli Kim a kol. (2011) na okurce seté (*Cucumis sativa*) nebyl prokázán vliv nanočástic ZnO na tvorbu rostlinné biomasy pravděpodobně z důvodu imobilizace částic v půdě. Také v našem nádobovém pokusu byl tento vztah indikován. U obou půdních sérií byl zaznamenán pokles na 50 – 60 % průměrné délky nadzemní biomasy u varianty ZnO 0,1 % oproti variantě ZnO 0,01 % a na cca 50 % oproti rostlinám v půdách kontrolních.

Lze usuzovat, že fytoxicita a biodostupnost oxidu zinečnatého koreluje s rozpustností, velikostí a mírou agregace jeho částic. Případný příjem a bioakumulace práškového nebo nano-ZnO v rostlinné biomase je dle Kima a kol. (2011) snižován částečným ulpíváním částic na povrchu kořenů a výsledná stresová odpověď je determinována také rostlinným druhem a půdními faktory (Bandyopadhyaya a kol., 2015), mobilita uvolněného Zn^{2+} je pak determinována zejména hodnotou pH půdy (Skidmore, 1964).

Přestože se ve výrobní praxi oxid zinečnatý dává pro stabilizaci přírodních kaučuků jako enzymatický jed (Ducháček a Hrdlička, 2009), který působením zinku

inaktivuje enzymy navázáním se na jejich thiolové, karboxylové, amidické aj. funkční skupiny (Matyja a kol., 2016), inhibice dehydrogenás indukovaná jeho přítomností nebyla příliš vysoká, v některých případech vyvolal paradoxně aktivaci.

Výzkumy Sachdeva a Hooda (2016) mohou objasnit průběh aktivity nitrátreduktázy našich pokusů u obou sledovaných půdních variant. Sachdeva a Hooda (2016) se ve svých pracích věnují využití nanomateriálů na bázi kovů a oxidů kovů k umělé stabilizaci nitrátreduktázy. Pro zvýšení funkčnosti a ochrany vytváří nitrátreduktáza spojením s různými polymery biosenzory. Síla těchto interakcí je různá, příliš slabé vazby (např. na bázi adsorpce) mohou vést k exkreci imobilizovaného proteinu nebo k jeho denaturaci, naopak příliš silné vazby pak snižují potenciální aktivitu enzymu. Při porovnávání různých typů nanočástic došli k závěru, že vlivem přítomnosti neshodných atomů na strukturách částic kovových oxidů (mimo jiné i ZnO) může u těchto biosenzorů dojít k vysokému navýšení jejich reaktivity. Také při našem hodnocení byla u vyšší koncentrace stanovena aktivita až několikanásobně vyšší, než aktivita nekontaminovaných vzorků.

U variant s nižší koncentrací ZnO došlo k víceméně postupnému snižování enzymatické aktivity, což bylo pravděpodobně způsobeno narušováním a rozpouštěním částic, u varianty lesní umocněno extrémně nízkým pH, případně vyčerpáním zinečnatých iontů, které jsou v určité míře esenciální pro funkci enzymu (EPA, 1987). Odčerpání Zn^{2+} vyvolalo snížení aktivity, která však u většiny variant přesahovala hodnoty naměřené u nekontaminovaných půd.

V případě hodnocení chování a efektu retortových sazí lze provést nepřímé srovnání s výsledky studií porovnávajících vliv různých průmyslových nanomateriálů na bázi uhlíku (CBENMs) na rostliny, přičemž většina těchto materiálů se od gumárenských plnidel liší pouze svými tvarovými vlastnostmi (např. MWCNT - multi-walled carbon nanotube, SWCNT- single walled carbon nanotube, aj.). Smirnova a kol., (2012) provedli výluhovou studii klíčení na vičenci písečném (*Onobrychis arenaria*), při které byla pozorována stimulace růstu kořenů a stonků. Také Miralles a kol. (2012) zaznamenali při inkubaci na agaru u vojtěškovitých a pšenice zvýšenou elongaci kořenů a navýšení klíčivosti. Autoři dále uvádí, že došlo k adsorpci částic na povrch kořenů bez významného příjmu nebo translokace rostlinou. U kukuřice seté (*Zea mays*) byl pozorován u nízkých koncentrací (do 20 mg/l) pozitivní vliv na klíčení a růst rostlin a také na metabolismus Fe a Ca, zatímco u koncentrovanějších výluhů MWCNT došlo k inhibici (Tiwari a kol., 2014). Také v našem pokusu byl pozorován stimulační vliv nízké koncentrace (1 %, tj. 1g/100ml)

na prodlužování kořenů, zatímco u koncentrace 10% (tj. 10 g/100 ml) byl indikován vliv mírně negativní.

V rámci simulace kontaminace půd sazeňmi došlo u vyšší koncentrace k nadprůměrnému nárůstu biomasy lupiny bílé (*Lupinus albus*) ve srovnání s kontrolními variantami. Tento jev byl pozorován u obou půdních sérií, ačkoliv u série orné půdy byl rozdíl významnější (152,99 % oproti referenčnímu vzorku). Lze se domnívat, že byl pozorován shodný jev jako v případě výluhů čistých látek s tím rozdílem, že testovací organismy byly v menším kontaktu s kontaminantem, který byl v půdě dispergován, vlivem čehož nedošlo k projevům negativních účinků vyšší dávky sazí. Další možností je vysoká míra agregace částic, neumožňující jejich průchod póry buněčných stěn, které dle Hatami a kol. (2016) dosahují v průměru < 20 nm. Naopak při hodnocení testů klíčivosti na půdních výlužích v rámci simulace následků dlouhodobé kontaminace došlo k detekci jejich negativních účinků, což může hypoteticky indikovat buď odlišnou reakci použitých rostlin (*Raphanus sativus* L. var. *sativus* x *Lupinus albus*), nebo změnu přirozených chemicko-biologických parametrů testované půdy uvolňováním látek z narušených částic. Obaly jednotlivých částic jsou tvořeny kyslíkatými látkami a s jejich zvyšující se koncentrací se snižuje pH sazí (Ducháček a Hrdlička, 2009).

O možném vlivu funkčních skupin tvořících obaly sazí lze uvažovat také při hodnocení výsledků enzymatických testů. Teoreticky mohlo dojít k navázání sazí na organický substrát a tím jeho zneprístupnění pro oxidaci, což vyvolalo pozorovatelnou inhibici aktivity dehydrogenás. Narušováním povrchu částic působením pH a mikroorganismů mohlo postupně dojít k uvolňování elementárního uhlíku, který mohl zčásti tento substrát substituovat, což ve výsledku vedlo k opětovné obnově mikrobiálního společenstva. Také nitrátreduktáza vykazovala vysokou citlivost vůči kontaminaci sazeňmi. Zatímco v sérii orné půdy přetrvával v průběhu 3 měsíců značně negativní účinek vysoké koncentrace a relativní rezistence vůči koncentraci nižší, v prostředí s nižším pH došlo teoreticky opět k narušení částic provázené postupnou inaktivací enzymů.

Enzymatická aktivita zastává nezastupitelnou roli v degračních procesech v půdě. Půdní organická hmota je komplex, který podléhá syntézám a degradacím, a vyváženost těchto procesů determinuje množství dostupného organického uhlíku, přispívá k půdní agregaci, optimální vodní retenci, dostupnosti živin a ovlivňuje diverzitu mikrobiálních společenstev (Burns a kol., 2013). V rámci hodnocení výsledků enzymatických testů je však nutné přihlídnout také k přirozeným půdním faktorům, které mají vliv na aktivitu proteinových látek. Jedním z nich je hodnota pH, která mimo jiné ovlivňuje koncentraci

inhibitorů nebo aktivátorů v půdním roztoku a také efektivní koncentraci zpracovávaného substrátu (Dick a kol., 2000).

Byla pozorována korelace mezi aktivitou dehydrogenás a pH. Levyk a kol. (2007) uvádí, že při pH v rozmezí 1,5 – 4,5 dochází k potlačení potenciální enzymatické aktivity, podle výzkumu Wolińska a Stępniewska (2012) dochází ke stejnému jevu i při pH_{KCl} 4,1. Na stranu druhou však Ghaly a Mahmoud (2006) nestanovili pokles koncentrace substrátu specifického pro dehydrogenázy při pH nižším než 6,5. V případě našich pokusů byl sledován pouze mírný rozdíl mezi aktivitami dehydrogenás v kontrolních půdních vzorcích, na stranu druhou byla však vyšší míra pozorována u série orné půda, vyznačující se vyšším pH. Koper a kol. (2008) také zmiňuje pozitivní korelaci mezi aktivitou dehydrogenás a obsahem organického uhlíku.

Při průběžném hodnocení enzymatické aktivity byly obecně nejcitlivější odezvy zaznamenány u dehydrogenás a nitrátreduktázy, zatímco kyselá fosfatáza projevila značnou rezistenci vůči přítomnosti kontaminantů.

7 Závěr

- Byly zhodnoceny účinky antidegradantu 6PPD, práškového oxidu zinečnatého a sazí na půdní mikroflóru dvou rozdílných půdních vzorků a na adaptační schopnosti dvou rozdílných druhů vyšších rostlin.
- Při úniku do půd s odlišnými vlastnostmi vykázaly látky odlišné ekotoxické účinky. Sledované stresové reakce rostlin se druhově lišily.
- Vodné výluhy čistých látek neprokázaly inhibiční účinky na semena ředkve seté (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). Pouze u výluhů antidegradantu 6PPD byl pozorován s rostoucí koncentrací zvyšující se výskyt nekrotizace a chlorózy. U nízké koncentrace sazí (1 %) byl pozorován pozitivní vliv na prodlužovací růst kořenů.
- Projevy ekotoxicity antidegradantu 6PPD a jeho degradačních produktů byly významnější u půd s velmi nízkým pH (3,08), což indikuje vliv pH na míru jeho degradability a ekotoxických účinků.
- Působením abiotických a biotických faktorů došlo ve sledovaných půdách k uvolnění Zn^{2+} z částic práškového ZnO, což se projevilo snížením tvorby nadzemní biomasy u lupiny bílé (*Lupinus albus*) ve variantách s vyšší koncentrací kontaminantu.
- Částice ZnO v půdních vzorcích o koncentraci 0,1 % mohly uměle vyvolat stabilizaci a tím i nadprůměrnou aktivaci enzymu nitrátoreduktázy. Na základě stanovení aktivity dehydrogenázy nelze potvrdit, že by působil ZnO jako enzymatický jed.
- Při akutní expozici sazím došlo k elongaci kořenů u klíčících semen ředkve seté a po chronické expozici půd také ke stimulaci růstu nadzemní biomasy u lupiny bílé. Na stranu druhou byla však zaznamenána inhibice klíčení lupiny na půdním výluhu.
- V průběhu inkubace došlo u sazí pravděpodobně k narušení struktury částic a uvolňování funkčních látek. Tyto látky negativně mohly negativně ovlivnit přirozené parametry půd, což se projevilo inhibicí aktivity vybraných enzymů. Zároveň mohlo dojít k uvolnění elementárního uhlíku, který se stal energetickým zdrojem pro přítomnou mikroflóru.
- Výraznější nebo dříve se prokazující odezvy byly detekovány u lesní půdní série.
- Zatímco dehydrogenáza a nitrátoreduktáza prokázaly vysokou citlivost vůči přítomnosti kontaminantů v půdě, aktivita kyselých fosfatáz nevykázala v rámci 3měsíčního hodnocení významné rozdíly.

8 Seznam literatury

Abdelmagid, H. M., Tabatabai, M. A. 1987. Nitrate Reductase Activity of Soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 19. 421-427.

Attar, E., Maly, E. 1982. Acute Toxicity of Cadmium, Zinc, and Cadmium-Zinc Mixtures to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 11. 291-296.

Bandyopadhyaya, S., Plascencia-Villac, G., Mukherjee, A., Ricob, C. M., José-Yacamán, M. Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. 2015. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science of the Total Environment*. 515–516. 60–69.

Bhuvaneshwari, M., Iswarya, V., Nagarajan, R., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. 2016. Acute toxicity and accumulation of ZnO NPs in *Ceriodaphnia dubia*: Relative contributions of dissolved ions and particles. *Aquatic Toxicology*. 177. 494-502.

Bolognesi, C., Moretto, A. 2014. Genotoxic risk in rubber manufacturing industry: A systematic review. *Toxicology Letters*. 230. 345-355.

Bremner, J. M., Tabatabai, M. A. 1969. Use of p-nitrophenyl Phosphate for Assay of Soil Phosphatase Activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1. 301-307.

BUA. Beratergremium fuer umweltrelevante Altstoffe. 1998. 208. 78 p.

Bünemann, E. K., Prusisz, B., Ehlers, K. 2011. Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. In: Bunemann, E. K., Oberson, A., Frossard, E. (eds.). *Phosphorus in Action*. 26. Springer Berlin Heidelberg. p. 37-57.

ISBN: 978-3-642-15271-9.

Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., Zoppini, A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*. 58. 216-234.

Burns, R. G., Dick, R. P. (Eds.) 2002. *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. CRC press, New York. 614 p. ISBN: 0824706145.

- Casida, L. E. 1977. Microbial Metabolic Activity in Soil as Measured by Dehydrogenase Determination. *Applied and Environmental Microbiology*. 34 (6). 630-636.
- Cataldo, F., Faucette, B., Huang, S., Ebenezer, W. 2014. On the early reaction stages of ozone with N,N'-substituted p-phenylenediamines (6PPD, 77PD) and N,N',N''-substituted-1,3,5-triazine "Durazone®": An electron spin resonance (ESR) and electronic absorption spectroscopy study. *Polymer Degradation and Stability*. 111. 223-231.
- Cerklewski, F. L., Forbes, R. M. 1976. Influence of Dietary Zinc on Lead Toxicity in the Rat. *The Journal of Nutrition*. 106 (5). 689-696.
- Chang, Y.-F., Wen, J-F., Cai, J.-F., Xiao-ying, W., Yang, L., Guo, Y.-D. 2012. An investigation and pathological analysis of two fatal cases of cadmium poisoning. *Forensic Science International*. 220 (1-3). 5-8.
- Chemek, M., Mimouna, S. B., Boughammoura, S., Delbés, G., Messaoudi, I. 2016. Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reproductive Toxicology*. 63. 151-160.
- Chen, X., O'Halloran, J., Jansen, A. K. 2016. The toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* (*L.*) is predominantly caused by dissolved Zn. *Aquatic Toxicology*. 174. 46-53.
- Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M. 2001. Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické listy*. 95. 212-222.
- Council, B. T., Duckenfield, K. U., Landa, E. R., Callender, E. 2004. Tire-Wear Particles as a Source of Zinc to the Environment. *Environmental Science and Technology*. 38 (15). 4206-4214.
- Černá, A., Cibulková, Z., Šimon, P., Uhlár, J., Lehocký, P. 2012. DSC study of selected antioxidants and their binary mixtures in styrene-butadiene rubber. *Polymer Degradation and Stability*. 97. 1742-1729.
- Dick, W. A., Cheng, L., Wang, P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*. 32. 1915-1919.

- Driscoll, K. E., Deyo, L. C., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D. G., Bertram, T. A. 1997. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis*. 18 (2). 423-430.
- Ducháček, V., Hrdlička, Z. 2009. *Gumárenské suroviny a jejich zpracování*. 4th ed. Praha: VŠCHT Praha. 200 s. ISBN 978-80-7080-713-2.
- ECB (European Chemical Bureau). 2008. European Union Risk Assessment Report. Zinc oxide. 43. 138 p.
- Edwards, N. T. 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment – a review. *Journal of Environmental Quality*. 12. 427-441.
- Eivazi, F., Tabatabai, M. A. 1977. Phosphatases in Soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 9. 167-172.
- Elder, A., Gelein, R., Finkelstein, J. N., Driscoll, K. E., Harkema, J., Oberdörster, G. 2005. Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology. *Toxicological Sciences*. 88. 614-629.
- EPA. U. S. Environmental Protection Agency. Summary Review of the Health Effects Associated With Zinc and Zinc Oxide: Health Issue Assessment. 1987 [online]. 43 p. [cit. 2017-01-20]. Dostupné z <www.nepis.epa.gov/>.
- Fishbein, L. 1991. Chemicals used in the rubber industry. *The Science of the Total Environment*. 101. 33 – 43.
- Fišer, J., Nováková, M., Macek, T. 2014. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. *Chemické Listy*. 108. 566-571.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*. 5 (2). 47-58.
- Fontana, L., Gaudez, C., Garde, G., Catilina, P. 2001. Patch tests with antioxidants. *Allergy. European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 56 (9). 923-924.
- Francis, A. J., Dodge, C. J. 1988. Anaerobic Microbial Dissolution of Transition and Heavy Metal Oxides. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (4). 1009-1014.
- Freitag, D., Ballhorn, L., Geyer, H., Korte, F., 1985. Environmental hazard profile of organic chemicals. *Chemosphere*. 14. 1589-1616.

- Fu, M. H., Tabatabai, M. A. 1989. Nitrate reductase activity in soils: Effects of trace elements. *Soil Biology and Biochemistry*. 21 (7). 943-946.
- Gallagher, J., Sams, R. 2nd, Inmon, J., Gelein, R., Elder, A., Oberdörster, G., Prahalad, A. K. 2003. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 190 (3). 224-31.
- Gardiner, K., Calvert, I. A., van Tongeren, M. J. A., Harrington, J. M. 1996. Occupational Exposure to Carbon Black in its Manufacture: Data from 1987 to 1992. *Annals of Occupational Hygiene*. 40 (1). 65-77.
- George, J., Kuttan, R. 1996. Lack of induction of schromosome aberrations and micronuclei by N-(1,3-dimethylbutyl)-N-phenylparaphenylenediamine in mouse bone marrow cells. *Mutation Research*. 370. 191-194.
- Ghaly, A., Mahmoud, N. 2006. Optimum Conditions For Measuring Dehydrogenase Activity of *Aspergillus niger* Using TTC. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2. 186-194.
- Gilbert, G. A., Knight, J. D., Vance, C. P., Allan, D. L. 1999. Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant, Cell and Environment*. 22 (7). 801-810.
- Gilmour, P. S., Ziesenis, A., Morrison, E. R., Vickers, M. A., Drost, E. M., Ford, I., Karg, E., Mossa, C., Schroepel, A., Ferron, G. A., Heyder, J., Graves, M., MacNee, W., Donaldson, K. 2004. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195. 35-44.
- Göran, D. 2013. Ecotoxicological Risk Assessment and Management of Tire Wear Particles. In: Féraud, J.-F., Blaise, C. (eds.). *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands. p. 363-376. ISBN: 978-94-007-5704-2.
- Greenstein, D., Tiefenthaler, L., Bay, S. 2004. Toxicity of Parking Lot Runoff After Application of Simulated Rainfall. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 47. 199-206.
- Gualtieri, M., Andrioletti, M., Vismara, C., Milani, M., Camatini, M. 2005 a. Toxicity of tire debris leachates. *Environment International*. 31 (5). 723-730.

- Gualtieri, M., Andrioletti, M., Mantecca, P., Vismara, C., Camatini, M. 2005 b. Impact of tire debris on in vitro and in vivo systems. *Particle and Fibre Toxicology*. 2 (1). 1-14.
- Hervé-Bazin, B., Gradiski, D., Duprat, P., Marignac, B., Fousereau, J., Chevalier, C., Bieber, P. 1977. Occupational eczema from N-isopropyl-N'-phenylparaphenylenediamine (IPPD) and N-dimethyl-1,3-butyl-N'-phenylparaphenylenediamine (DMPPD) in tyres. *Contact Dermatitis*. 3. 1-15.
- Hodgson, E. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*, 3rd ed. John Wiley and sons, Inc., New Jersey. 557 p. ISBN 0-471-26508-X.
- Holst, O., Stenberg, B., Christiansso, M. 1998. Biotechnological possibilities for waste tyre-rubber treatment. *Biodegradation*. 9 (3). 301-310.
- Huntink, N. M., Datta, N., Talma, A., Noordermeer, M. W. 2006. Ozonolysis of Model Olefins -Efficiency of Antiozonants. *Journal of Applied Polymer Science*. 100. 853-866.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. 1982. The Rubber Industry. 28. 488 p.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 1996. Printing processes and Printing Inks, Carbon Black and some Nitro Coumpounds. 65. 594 p.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2010a. Carbon Black, Titanium Dioxide and Talc. 93. 466 p.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2010b. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. 92. 868 p.
- Irfan, M., Ahmad, A., Hayat, S. 2014. Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of *Brassica juncea*. *Saudi Journal of Biological Science*. 21. 125-131.

- Jacquart, A., Bryaner, R., El Hage Chanine, J.-M., Ha-Duong, N.-T. 2016. Cd²⁺ and Pb²⁺ complexation by glutathione and the phytochelatins. *Chemico-Biological Interactions*. 1-9.
- Jagdale, S. C., Rajkumar, K., Chavan, R. P., Shinde, D. N., Patil, C. L. 2015. Environmental concern of pollution in rubber industry. *IJRET: Internatinal Journal of Research in Engineering and Technology*. 4 (11). 187-191.
- Janík, M. 1999. Výroba průmyslových sazí z dehtárenských surovin v Československu. *Chemické Listy*. 93. 794-799.
- Järup, L., Åkesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238. 201-208.
- Jiang, X., Wang, Ch. 2008. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis* under zinc pollution. *Journal of Plant Physiology*. 165. 697-704.
- Jin, Y. H., Clark, A. B., Slebos, R. J., Al-Refai, H., Taylor, J. A., Kunkel, T. A., Resnick, M. A., Gordenin, D. A. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics*. 34. 326-329.
- Kader, M., Lamb, D. T., Correll, R., Megharaj, M., Naidu, R. 2015. Pore-water chemistry explains zinc phytotoxicity in soil. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 122. 252-259.
- Kasprzak, K. S., Kovatch, R. M., Poirier, L. A. 1988. Inhibitory effect of zinc on nickel subsulfide carcinogenesis in Fischer rats. *Toxicology*. 52 (3). 253-262.
- Kim, S., Chae, Y., Kang, Y., An, Y.-J., Yoon, Y. 2016. Assessing the toxicity and the dissolution rate of zinc oxide nanoparticles using a dual-color *Escherichia coli* whole-cell bioreporter. *Chemosphere*. 163. 429-437.
- Kim, S., Kim, J., Lee, I. 2011. Effects of Zn and ZnO nanoparticles and Zn²⁺ on soil enzyme activity and bioaccumulation of Zn in *Cucumis sativus*. *Chemistry and Ecology*. 27 (1). 49-55.
- Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. 2000. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*. 94. 913-918.

- Kogevinas, M., Sala, M., Boffetta, P., Kazerouni, N., Kromhout, H., Hoar-Zahm, S. 1998. Cancer risk in the rubber industry: a review of the recent epidemiological evidence. *Occupational and Environmental Medicine*. 55. 1-12.
- Koper, J., Piotrowska, A., Siwik-Ziomek, A. 2008. Dehydrogenase and Inwertase Activities In a Rusty Soil In The Neighborhood of The Włocławek Nitrogen Plant “Anwill”. *Proceedings of ECOpole*. 2. 197-202.
- Kumari, M., Khan, S. S., Pakrashi, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2011. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*. 190. 613-621.
- Landrigan, P. J. 1989. Toxicity of lead at low dose. *British Journal of Industrial Medicine*, 46 (9). 593-596.
- Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L., Behavides, M. P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*. 169. 323-330.
- Levyk, V., Maryskevych, O., Brzezińska, M., Włodarczyk, T. 2007. Dehydrogenase Activity of Technogenic Soils of Former Sulphur Mines (Yvaoriv and Nemyriv, Ukraine). *International Agrophysics*. 21. 255-260.
- Lin, D., Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150 (2). 243-250.
- Lindberg, S., Landberg, T., Greger, M. 2007. Cadmium uptake and interaction with phytochelatins in wheat protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45. 47-53.
- Lock, K., Janssen, C. R. 2003. Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*. 53. 851-856.
- Macín, J., Zítek, P. 1985. *Pneumatiky*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. 429 s.
- Maláč, J. 2005. *Gumárenská technologie*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 156 s.

- Mantecca, P., Gualtieri, M., Andrioletti, M., Bacchetta, R., Vismara, C., Vailati, G., Camatini, M. 2007. Tire debris organic extract affects *Xenopus* development. *Environment International*. 33. 642–648.
- Matyja, K., Małachowska-Jutcz, A., Mazur, A. K., Grabas, K. 2016. Assessment of toxicity using dehydrogenases activity and mathematical modeling. *Ecotoxicology*. 25. 924-939.
- McRaw, N., Gaw, S., Glover, Ch. N. 2016. Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 179. 184-190.
- Medalia, A. I., Rivin, D., Sanders, D. R. 1983. A comparison of carbon black with soot. *The Science of the Total Environment*. 31. 1-22.
- Miralles, P., Johnson, E., Church, T. L., Harris, A. T. 2012. Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: toxicology and uptake. *Journal of the Royal Society Interface*. 9 (77). 3514-3527.
- Moezzi, A., McDonagh, A. M., Cortie, M. 2012. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal*. 185-186. 1-22.
- Moriarty, F. 1999. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, Great Britain. 347 p. ISBN 0-12-506763-1.
- Mount, D. I. 1966. The effect of total hardness and pH on acute toxicity of zinc to fish. *International Journal of Air and Water Pollution*. 10. 49-56.
- Mustafa, G., Komatsu, S. 2016. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1864. 932-944.
- Narathichat, M., Sahakaro, K., Nakason, C. 2010. Assessment Degradation of Natural Rubber by Moving Die Processability Test and FTIR Spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*. 115. 1702–1709
- Nikinmaa, M. 2014. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier. 240 p. ISBN: 978-0-12-411574-3.
- Nilsson, N. H., Malmgren-Hansen, B., Thomsen, U. S., Teknologisk Institut. 2008. Mapping, emissions and environmental and health assessment of chemical

substances in artificial turf. Copenhagen, Denmark: Danish Environmental Protection Agency. Survey of Chemical Substances in Consumer Products. 100 p. 102.

Ninkov, M., Aleksandrov, A. P, Mirkov, I., Demenesku, J., Mileusnic, D., Stojanov, S. J., Golic, N., Tolinacki, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brcekif, I., Kataranovski, M. 2016. Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 96. 11-23.

Odpadové fórum, 2004. Pneumatiky. 1. 10-12.

OECD. OECD SIDS. 2004. Initial assessment report for SIAM 18.

N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-1,4- phenylenediamine (6PPD). Paris, France. 36 p.

Onosaka, S., Tanaka, K. 1991. Cd-Hem method and its Application. In: Klaassen, C. D., Suzuki, K. T. (eds.). *Metallothionein in Biology and Medicine*. CRC press, Inc. 415 p. ISBN: 0-8493-8832-5.

Ovečka, M., Takáč, T. 2014. Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*. 32. 73-86.

Parkes, H. G., Veys, C. A., Waterhouse, J. A. H., Peters, A. 1982. Cancer mortality in the British rubber industry. *British Journal of Industrial Medicine*. 39. 209-220.

Pavan, I., Belliardo, F., Buglione, E., Massiccio, M. M. 1987. Biomonitoring of Workers Exposed to Aromatic Amines in Rubber Vulcanization. *Chromatographia*. 24. 651-654.

Picketing, Q. H., Henderson, C. 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. *International Journal of Air and Water Pollution*. 10. 453-463.

Pokhrel, L. R., Dubey, B. 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 452-453. 321-332.

Rapta, P., Vargová, A., Polovková, J., Gatial, A., Omelka, L., Majzlík, P., Breza, M. 2009. A variety of oxidation products of antioxidants based on N, N'-substituted p-phenylenediamines. *Polymer Degradation and Stability*. 94. 1457-1466.

- Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D., Hanley, C., Punnoose, A. 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*. 90 (213902).
- Rehwoldt, R., Menapage, L. W., Nerrie, B., Alessandrello, D. 1972. The effect of increased temperature upon the toxicity of some heavy metal ions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 8. 91-96.
- Rehwoldt, R., Lasko, R. L., Shaw, C., Wirkowski, E. 1973. The acute toxicity of some heavy metal ions toward benthic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 10. 291-294.
- Rim, K.-T., Kim, S.-J., Han, J.-H., Kang, M.-G., Kim, J.-K., Yang, J.-S. 2011. Effects of carbon black to inflammation and oxidative DNA damages in mouse macrophages. *Molecular and Cellular Toxicology*. 7. 415-423.
- Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., Del Río, L. A., Sandalio, L. M. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology*. 164. 1346-1357.
- Sachdeva, V., Hooda, V. 2016. Effect of changing the nanoscale environment on activity and stability of nitrate reductase. *Enzyme and Microbial Technology*. 89. 52-62.
- San Miguel, G., Fowler, G. D., Sollars, C. J. 2002. The leaching of inorganic species from activated carbons produced from waste tyre rubber. *Water Research*. 36. 1939-1946.
- Schippers, C., Geßner, K., Müller, T., Scheper, T. 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology*. 83. 189-198.
- Shukla, G., Varma, A. (Eds.). 2011. *Soil enzymology*. Springer. 383 p. ISBN 978-3-642-14225-3.
- Simonich, S. L., Hites, R. A. 1995. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science and Technology*. 29 (12). 2905-2914.

- Singh, D. K., Kumar, S. 2008. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after acetamiprid treatments. *Chemosphere*. 71 (3). 412-418.
- Skidmore, J. F. 1964. Toxicity of Zinc Coumpounds to Aquatic Animals, with Special Reference to Fish. *The Quarterly Review of Biology*. 39 (3). 227-248.
- Smirnova, E., Gusev, A., Zaytseva, O., Sheina, O., Tkachev, A., Kuznetsova, E., Lazareva, E., Onishchenko, G., Feofanov, A. 2012. Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 6. 132-138.
- Smolders, E., Degryse, F. 2002. Fate and Effect of Zinc from Tire Debris in Soil. *Enviromental Science and Technology*. 36 (17). 3706-3710.
- Straif, K., Keil, U., Taeger, D., Holthenrich, D., Sun, Y., Burgers, M., Weiland, S. K. 2000. Exposure to nitrosamines, carbon black, asbestos, and talc and mortality from stomach, lung, and laryngeal cancer in a cohort of rubber workers. *American Journal of Edidemiology*. 152 (4). 297-306.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. ml., Martínek, V., Páca J. st. 2004. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*. 98. 876-890.
- Šarapatka, B. 2003. Phosphatase activities (ACP, ALP) in agroecosystem soils. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Agraria*. 396. 1401-6249.
- Taimr, L., Pospíšil, J. 1980. Antioxidants and stabilizers, 81. Transformations of N,N'-diphenyl- and N-phenyl-N'-isopropyl-1,4-benzoquinonediimines on silicagel. *Macromolecular Materials nad Engineering*. 92 (1). 53-64.
- Thompson, K. C., Wadhia, K., Loibner, A. P. (eds.). 2005. Environmental toxicity testing. Blackwell Publishing Ltd., Great Britain. 388 p. ISBN 1-4051-1819-9.
- Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Villaseñor-Cendejas, L. M., Villegas, J., Carreto-Montoya, L., Borjas-Garcia, S. E. 2012. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience*. 4 (5). 577-591.

- Tobiszewski, M., Namieśnik, J. 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*. 162. 110-119.
- Tsai, P-J., Shieh, H-Y., Lee, W-J., Lai, S-O. 2001. Health risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a carbon black industry. *The Science of the Total Environment*. 278. 137-150.
- US-EPA (United States Environmental Protection Agency). 2001.[online]. Office of Environmental Information, Emergency Planning and Community Right-to-Know Act-Section 313: Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category. EPA 260-B-01-03. Washington, DC. 40 p. [cit. 2017-01-15]. Dostupné z <www.epa.gov/sites/production/files/documents/2001pacs.pdf>.
- Van Vlaardingen, P. L. A., de Poorter, L. R. M., Fleuren, R. H. L. J., Janssen, P. J. C. M., Posthuma-Doodeman, C. J. A. M., Verbruggen, E. M. J., Vos, J. H. 2007. Environmental risk limits for twelve substances, prioritised on the basis of indicative risk limits. RIVM report (601782003/2007). 230 p.
- Varanasi, U. (ed.). 1989. Metabolism of PAH in the aquatic environment. CRC Press, Inc. 345 p. ISBN: 0-8493-6844-8.
- Wang, B., Feng, W., Wang, M., Wang, T., Gu, Y., Zhu, M., Ouyang, H., Shi, J., Zhang, F., Zhao, Y., Chai, Z., Wang, H., Wang, J. 2008. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Journal of Nanoparticle Research*. 10. 263-276.
- Wang, X., Wu, M., Ma, J., Chen, X., Hua, L. 2016. Modeling of acute cadmium toxicity in solution to barley root elongation using biotic ligand model theory. *Journal of Environmental Sciences*. 42. 112-118.
- Warheit, D. B., Sayes, C. M., Reed, K. L. 2009. Nanoscale and Fine Zinc Oxide Particles: Can in Vitro Assays Accurately Forecast Lung Hazards following Inhalation Exposures? *Environmental Science and Technology*. 43 (20). 7939-7945.
- Wik, A. 2007. Toxic Components Leaching from Tire Rubber. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79. 114-119.
- Wik, A., Göran, D. 2005. Environmental labeling of car tires - toxicity to *Daphnia magna* can be used as a screening method. *Chemosphere*. 58. 645-651.

- Wik, A., Göran, D. 2006. Acute toxicity of leaches of tire wear materil to *Daphnia magna* – Variability and toxic components. *Chemosphere*. 64. 1777-1784.
- Wilson, S. C., Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*. 81 (3). 229-249.
- Wolińska, A., Stępniewska, Z. 2012. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: Canuto, R. A. (ed.). *Dehydrogenases*. InTech Publisher. p. 183-210. ISBN: 978-953-307-019-3.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I, Nel, A. E. 2008. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*. 2 (10). 2121-2134.
- Yang, H., Su, Y. H., Zhu, Y. G., Chen, M. M., Chen, B. D., Liu, Y. X. 2007. Influences of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on soil microbial community composition with or without Vegetation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 42 (1). 65-72.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. 1987. *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 9 (9). 1-110.

9 Samostatné prílohy

Obr. č. 18: Laboratorní výsledky měření aktivity dehydrogenás u série lesní půdy

Série LESNÍ	DEHYDROGENÁSY												
	Typ enzymu: datum:		11.- 12.7. 2016		průměr (bez blanku)		10.- 11. 8. 2016		průměr (bez blanku)		12.- 13.9.2016		průměr (bez blanku)
	navážka (g)	µg TPF/ml	navážka (g)	µg TPF/ml	navážka (g)	µg TPF/ml	navážka (g)	µg TPF/ml	navážka (g)	µg TPF/ml	navážka (g)	µg TPF/ml	průměr (bez blanku)
Kontrola	5,0002	1,5840	5,0023	1,5915	5,0042	0,9577	1,4044	1,4244	5,0096	1,4244	1,4342	1,4342	1,4342
	5,0006	1,5965	5,0070	1,1648	5,0042	0,9577	1,4044	1,3341	5,0028	1,3341	1,4342	1,4342	1,4342
blank	5,0024	1,7396	5,0063	1,0138	5,0042	0,9577	1,4044	1,5442	5,0014	1,5442	1,4342	1,4342	1,4342
	5,0004	1,2948	5,0042	0,9577	5,0042	0,9577	1,4044	1,1352	5,0044	1,1352	1,4342	1,4342	1,4342
6PPD 0,1 %	5,0003	2,0839	5,0021	1,4044	5,0021	1,4044	1,4044	1,8872	5,0013	1,8872	1,6669	1,6669	1,6669
	5,0034	8,9030	5,0039	3,9816	5,0039	3,9816	3,9816	1,4466	5,0043	1,4466	1,6669	1,6669	1,6669
blank	5,0005	2,0616	5,0074	3,6562	5,0074	3,6562	3,6562	1,6310	5,0020	2,6560	1,6669	1,6669	1,6669
	5,0002	2,5923	5,0032	1,3308	5,0032	1,3308	1,3308	1,6310	5,0011	1,6310	1,6669	1,6669	1,6669
6PPD 0,01 %	5,0001	1,5076	5,0098	1,1663	5,0098	1,1663	1,1663	1,5974	5,0097	1,5974	1,4205	1,4205	1,4205
	5,0015	1,7244	5,0048	2,2616	5,0048	2,2616	2,2616	1,3439	5,0048	1,3439	1,4205	1,4205	1,4205
blank	5,0014	1,4634	5,0092	1,0781	5,0092	1,0781	1,0781	1,3201	5,0080	1,3201	1,4205	1,4205	1,4205
	5,0007	1,4511	5,0066	0,8552	5,0066	0,8552	0,8552	1,4396	5,0091	1,4396	1,4205	1,4205	1,4205
ZnO 0,1 %	5,0088	1,8571	5,0040	1,1152	5,0040	1,1152	1,1152	1,4257	5,0084	1,4257	1,3436	1,3436	1,3436
	5,0006	1,3113	5,0089	0,9131	5,0089	0,9131	0,9131	1,4558	5,0092	1,4558	1,3436	1,3436	1,3436
blank	5,0034	2,0645	5,0004	0,9413	5,0004	0,9413	0,9413	1,1492	5,0028	1,1492	1,3436	1,3436	1,3436
	5,0037	1,3520	5,0027	0,8914	5,0027	0,8914	0,8914	0,9418	5,0009	0,9418	1,3436	1,3436	1,3436
ZnO 0,01 %	5,0043	1,7102	5,0008	1,2120	5,0008	1,2120	1,2120	1,3404	5,0034	1,3404	1,3826	1,3826	1,3826
	5,0022	1,7392	5,0016	1,0820	5,0016	1,0820	1,0820	1,4119	5,0016	1,4119	1,3826	1,3826	1,3826
blank	5,0001	1,5410	5,0030	1,1151	5,0030	1,1151	1,1151	1,3955	5,0089	1,3955	1,3826	1,3826	1,3826
	5,0041	1,5233	5,0040	0,9680	5,0040	0,9680	0,9680	1,1441	5,0018	1,1441	1,3826	1,3826	1,3826
Saze 0,1 %	5,0002	1,6866	5,0052	1,3368	5,0052	1,3368	1,3368	1,4452	5,0037	1,4452	1,4478	1,4478	1,4478
	5,0046	1,8112	5,0096	1,1568	5,0096	1,1568	1,1568	1,5265	5,0039	1,5265	1,4478	1,4478	1,4478
blank	5,0047	1,7400	5,0045	1,0123	5,0045	1,0123	1,0123	1,3716	5,0032	1,3716	1,4478	1,4478	1,4478
	5,0053	1,9846	5,0047	0,9854	5,0047	0,9854	0,9854	0,9984	5,0071	0,9984	1,4478	1,4478	1,4478
Saze 0,01 %	5,0026	1,8661	5,0063	1,2511	5,0063	1,2511	1,2511	1,4877	5,0031	1,4877	1,4514	1,4514	1,4514
	5,0062	1,5815	5,0087	1,2418	5,0087	1,2418	1,2418	1,4826	5,0046	1,4826	1,4514	1,4514	1,4514
blank	5,0056	1,7515	5,0076	1,3146	5,0076	1,3146	1,3146	1,3838	5,0005	1,3838	1,4514	1,4514	1,4514
	5,0012	1,5139	5,0038	1,0392	5,0038	1,0392	1,0392	1,1595	5,0080	1,1595	1,4514	1,4514	1,4514

Obr. č. 19: Laboratorní výsledky měření aktivity dehydrogenás u série orné půdy

Série ORNÁ	Typ enzymu: ORNÁ		DEHYDROGENÁSY											
	datum:		25.-26. 7. 2016				29.-30. 8. 2016				26.-27. 9. 2016			
	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)
Kontrola	5,0058	0,3209	5,0060	0,4069	5,0028	0,7379	5,0059	0,7151	5,0033	0,6087	5,0007	0,1263	5,0030	1,4550
blank	5,0005	0,3233	5,0057	0,3259	5,0087	1,2969	5,0032	0,8077	5,0012	0,5015	5,0020	1,0283	5,0094	0,6968
6PPD 0,1 %	5,0034	0,4993	5,0023	0,3739	5,0036	0,6648	5,0084	0,1496	5,0096	0,4826	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850
blank	5,0058	-0,0770	5,0068	-0,1580	5,0084	0,1496	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088
6PPD 0,01 %	5,0051	1,3558	5,0021	0,4633	5,0030	1,6131	5,0032	0,8077	5,0012	0,5015	5,0020	1,0283	5,0094	0,6968
blank	5,0047	1,2967	5,0010	0,6448	5,0087	1,2969	5,0032	0,8077	5,0012	0,5015	5,0020	1,0283	5,0094	0,6968
6PPD 0,01 %	5,0020	0,9391	5,0009	1,8762	5,0032	0,6648	5,0084	0,1496	5,0096	0,4826	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850
blank	5,0058	1,7767	5,0051	0,3120	5,0012	0,5015	5,0020	1,0283	5,0012	0,5015	5,0020	1,0283	5,0094	0,6968
ZnO 0,1 %	5,0028	0,3010	5,0029	0,4849	5,0020	1,0283	5,0094	0,6968	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088
blank	5,0053	0,3740	5,0018	0,3138	5,0094	0,6968	5,0084	0,1496	5,0096	0,4826	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850
ZnO 0,1 %	5,0001	0,2872	5,0015	0,3889	5,0036	0,6648	5,0084	0,1496	5,0096	0,4826	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850
blank	5,0044	-0,0240	5,0063	-0,0750	5,0084	0,1496	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088
ZnO 0,01 %	5,0026	0,2395	5,0019	0,1832	5,0096	0,4826	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322
blank	5,0050	0,2901	5,0007	0,1873	5,0066	0,6394	5,0015	0,5850	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861
ZnO 0,01 %	5,0066	0,2564	5,0007	0,1715	5,0015	0,5850	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088
blank	5,0090	-0,0730	5,0024	-0,1570	5,0038	0,1069	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088	5,0036	0,2337
Saze 0,1 %	5,0068	0,2170	5,0082	0,2168	5,0038	0,6322	5,0017	0,5861	5,0070	0,5088	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337
blank	5,0058	0,3126	5,0008	0,2295	5,0070	0,5088	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337
Saze 0,1 %	5,0073	0,2920	5,0009	0,3172	5,0070	0,5088	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337
blank	5,0098	-0,1030	5,0017	-0,1490	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337	5,0036	0,2337
Saze 0,1 %	5,0088	0,1667	5,0025	0,1264	5,0089	0,4373	5,0006	0,3978	5,0073	0,4012	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383
blank	5,0068	0,1591	5,0067	0,1757	5,0006	0,3978	5,0073	0,4012	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383
Saze 0,01 %	5,0042	0,1888	5,0026	0,1360	5,0073	0,4012	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383
blank	5,0037	-0,1430	5,0021	-0,2080	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383	5,0098	0,0383
Saze 0,01 %	5,0076	0,2208	5,0043	0,2204	5,0069	0,5613	5,0032	0,7911	5,0047	0,5915	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164
blank	5,0096	0,2406	5,0011	0,2671	5,0032	0,7911	5,0047	0,5915	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164
blank	5,0030	0,2830	5,0013	0,2742	5,0047	0,5915	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164
blank	5,0059	-0,0640	5,0014	-0,1430	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164	5,0004	0,1164

Obr. č. 20: Laboratorní výsledky měření aktivity nitrátreduktázy u série lesní půdy

Série	Typ enzymu:	NITRÁTREDUKTÁZA										
		11. - 12.7. 2016		průměr		10.-11. 8. 2016		průměr		12.-13.9.2016		
		navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml	(bez blanku)	navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml	(bez blanku)	navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml	(bez blanku)	navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml
LESNÍ	5,0028	0,0109	0,0117	5,0014	0,0371	0,0370	5,0043	0,0358	0,0314	5,0014	0,0358	0,0314
	5,0030	0,0128		5,0029	0,0360		5,0014	0,0273		5,0014	0,0273	
	5,0031	0,0114		5,0026	0,0379		5,0017	0,0312		5,0017	0,0312	
	5,0005	0,0103		5,0034	0,0353		5,0067	0,0255		5,0067	0,0255	
6PPD 0,1 %	5,0032	0,0129	0,0141	5,0031	0,0385	0,0365	5,0084	0,0319	0,0279	5,0084	0,0319	0,0279
	5,0010	0,0148		5,0027	0,0354		5,0073	0,0227		5,0073	0,0227	
	5,0024	0,0147		5,0039	0,0355		5,0098	0,0290		5,0098	0,0290	
	5,0035	0,0100		5,0059	0,0332		5,0010	0,0177		5,0010	0,0177	
6PPD 0,01 %	5,0007	0,0243	0,0242	5,0033	0,0363	0,0422	5,0010	0,0259	0,0270	5,0010	0,0259	0,0270
	5,0032	0,0239		5,0069	0,0405		5,0066	0,0298		5,0066	0,0298	
	5,0005	0,0244		5,0028	0,0499		5,0025	0,0252		5,0025	0,0252	
	5,0046	0,0195		5,0067	0,0362		5,0064	0,0261		5,0064	0,0261	
ZnO 0,1 %	5,0003	0,0360	0,0328	5,0060	0,0406	0,0469	5,0052	0,0385	0,0408	5,0052	0,0385	0,0408
	5,0031	0,0316		5,0072	0,0578		5,0093	0,0444		5,0093	0,0444	
	5,0009	0,0307		5,0038	0,0424		5,0036	0,0395		5,0036	0,0395	
	5,0003	0,0204		5,0062	0,0354		5,0037	0,0232		5,0037	0,0232	
ZnO 0,01 %	5,0010	0,0262	0,0262	5,0099	0,0036	vyjmuta	5,0065	0,0147	0,0170	5,0065	0,0147	0,0170
	5,0002	0,0273		5,0094	0,0349	0,0361	5,0032	0,0134		5,0032	0,0134	
	5,0055	0,0251		5,0024	0,0373		5,0082	0,0230		5,0082	0,0230	
	5,0020	0,0196		5,0019	0,0301		5,0015	0,0168		5,0015	0,0168	
Saze 0,1 %	5,0069	0,0231	0,0242	5,0026	0,0350	0,0330	5,0089	0,0379	0,0314	5,0089	0,0379	0,0314
	5,0033	0,0250		5,0010	0,0342		5,0059	0,0297		5,0059	0,0297	
	5,0076	0,0244		5,0089	0,0299		5,0041	0,0265		5,0041	0,0265	
	5,0055	0,0179		5,0010	0,0283		5,0098	0,0322		5,0098	0,0322	
Saze 0,01 %	5,0039	0,0209	0,0210	5,0035	0,0312	0,0306	5,0084	0,0353	0,0278	5,0084	0,0353	0,0278
	5,0033	0,0215		5,0022	0,0323		5,0047	0,0202		5,0047	0,0202	
	5,0027	0,0207		5,0065	0,0284		5,0031	0,0280		5,0031	0,0280	
	5,0017	0,0196		5,0052	0,0272		5,0051	0,0280		5,0051	0,0280	

Obr. č. 21: Laboratorní výsledky měření aktivity nitrátreduktázy u série orné půdy

Série	Typ enzymu: datum:	NITRÁTREDUKTÁSA				průměr (bez blanku)	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	26.-27.9.2016		průměr (bez blanku)
		25.-26.7.2016		29.-30.8.2016						26.-27.9.2016		
		navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml	navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml					navážka (g)	µg NO ₂ -N/ml	
ORNÁ	Kontrola	5,0009	0,0886	5,0009	0,0581	5,0009	0,0570	5,0001	0,0554	0,0564		
		5,0017	0,0713	5,0011	0,0570	5,0011	0,0570	5,0010	0,0527			
		5,0020	0,0511	5,0059	0,0558	5,0059	0,0558	5,0022	0,0612			
		5,0009	0,0055	5,0043	0,0115	5,0085	0,0148	5,0009	0,0071			
ORNÁ	blank	5,0066	0,0182	5,0041	0,0298	5,0041	0,0332	5,0031	0,0364	0,0414		
		5,0013	0,0369	5,0058	0,0340	5,0041	0,0340	5,0041	0,0409			
		5,0070	0,0396	5,0017	0,0359	5,0019	0,0359	5,0019	0,0468			
		5,0019	0,0055	5,0074	0,0096	5,0009	0,0096	5,0009	0,0071			
ORNÁ	6PPD 0,1 %	5,0060	0,0294	5,0024	0,0332	5,0071	0,0312	5,0071	0,0358	0,0431		
		5,0027	0,0480	5,0042	0,0327	5,0022	0,0327	5,0022	0,0506			
		5,0022	0,0270	5,0095	0,0277	5,0073	0,0277	5,0073	0,0428			
		5,0050	0,0051	5,0010	0,0100	5,0014	0,0100	5,0014	0,0123			
ORNÁ	blank	5,0018	0,1227	5,0030	0,1278	5,0013	0,1143	5,0013	0,2153	0,2226		
		5,0024	0,1059	5,0053	0,1119	5,0018	0,1119	5,0018	0,2355			
		5,0012	0,1503	5,0046	0,1032	5,0012	0,1032	5,0012	0,2171			
		5,0023	0,0135	5,0010	0,0167	5,0024	0,0167	5,0024	0,0147			
ORNÁ	ZnO 0,01 %	5,0060	0,0575	5,0014	0,0383	5,0011	0,0394	5,0011	0,0773	0,0711		
		5,0015	0,0786	5,0004	0,0404	5,0052	0,0404	5,0052	0,0701			
		5,0053	0,1088	5,0053	0,0396	5,0013	0,0396	5,0013	0,0659			
		5,0024	0,0060	5,0036	0,0109	5,0026	0,0109	5,0026	0,0124			
ORNÁ	blank	5,0041	0,0264	5,0089	0,0269	5,0011	0,0270	5,0011	0,0824	0,0756		
		5,0022	0,0340	5,0082	0,0289	5,0027	0,0289	5,0027	0,0721			
		5,0079	0,0212	5,0086	0,0251	5,0017	0,0251	5,0017	0,0723			
		5,0013	0,0148	5,0070	0,0115	5,0016	0,0115	5,0016	0,0390			
ORNÁ	Saze 0,1 %	5,0015	0,0464	5,0021	0,0517	5,0051	0,0480	5,0051	0,0752	0,0792		
		5,0016	0,0849	5,0085	0,0482	5,0035	0,0482	5,0035	0,0725			
		5,0023	0,1012	5,0010	0,0442	5,0024	0,0442	5,0024	0,0899			
		5,0044	0,0068	5,0014	0,0122	5,0005	0,0122	5,0005	0,0370			

Obr. č. 22: Laboratorní výsledky měření aktivity kys. fosfatázy u série lesní půdy

Série LESNÍ	Typ enzymu:		KYS. FOSFATÁSA				12.8.2016		14.9.2016		průměr (bez blanku)
	datum:	navážka (g)	průměr (bez blanku)	navážka (g)	μmol PNP/ml	navážka (g)	μmol PNP/ml	navážka (g)	μmol PNP/ml		
										průměr (bez blanku)	
Kontrola	2,0009	2,0046	0,0409	2,0046	0,0270	2,0084	0,0297	2,0084	0,0282	0,0262	
	2,0011	2,0072		2,0072	0,0173	2,0072	0,0282	2,0072	0,0208		
	2,0014	2,0059		2,0059	0,0212	2,0008	0,0208	2,0008	0,0027		
	2,0018	2,0041		2,0041	0,0018	2,0008	0,0027	2,0008			
6PPD 0,1 %	2,0033	2,0055	0,0451	2,0055	0,0259	2,0017	0,0235	2,0017	0,0200	0,0201	
	2,0044	2,0085		2,0085	0,0226	2,0012	0,0200	2,0012	0,0167		
	2,0038	2,0028		2,0028	0,0209	2,0018	0,0167	2,0018	0,0022		
	2,0003	2,0028		2,0028	0,0017	2,0004	0,0022	2,0004			
6PPD 0,01 %	2,0055	2,0088	0,0416	2,0088	0,0229	2,0038	0,0209	2,0038	0,0214	0,0213	
	2,0038	2,0046		2,0046	0,0238	2,0010	0,0214	2,0010	0,0216		
	2,0008	2,0016		2,0016	0,0210	2,0010	0,0216	2,0010	0,0027		
	2,0032	2,0043		2,0043	0,0017	2,0016	0,0027	2,0016			
ZnO 0,1 %	2,0069	2,0024	0,0469	2,0024	0,0257	2,0029	0,0270	2,0029	0,0255	0,0229	
	2,0056	2,0078		2,0078	0,0211	2,0024	0,0255	2,0024	0,0161		
	2,0027	2,0062		2,0062	0,0234	2,0004	0,0161	2,0004	0,0026		
	2,0052	2,0089		2,0089	0,0017	2,0007	0,0026	2,0007			
ZnO 0,01 %	2,0036	2,0012	0,0491	2,0012	0,0233	2,0058	0,0207	2,0058	0,0227	0,0213	
	2,0073	2,0046		2,0046	0,0206	2,0011	0,0227	2,0011	0,0206		
	2,0024	2,0021		2,0021	0,0272	2,0015	0,0206	2,0015	0,0024		
	2,0049	2,0080		2,0080	0,0017	2,0015	0,0024	2,0015			
Saze 0,1 %	2,0004	2,0083	0,0440	2,0083	0,0300	2,0066	0,0313	2,0066	0,0215	0,0268	
	2,0020	2,0018		2,0018	0,0245	2,0055	0,0215	2,0055	0,0276		
	2,0023	2,0074		2,0074	0,0243	2,0041	0,0276	2,0041	0,0021		
	2,0023	2,0032		2,0032	0,0018	2,0046	0,0021	2,0046			
Saze 0,01 %	2,0037	2,0040	0,0470	2,0040	0,0251	2,0039	0,0252	2,0039	0,0223	0,0225	
	2,0004	2,0056		2,0056	0,0214	2,0009	0,0223	2,0009	0,0201		
	2,0065	2,0045		2,0045	0,0216	2,0070	0,0201	2,0070	0,0024		
	2,0009	2,0045		2,0045	0,0021	2,0098	0,0024	2,0098			

Obr. č. 23: Laboratorní výsledky měření aktivity kys. fosfatázy u série orné půdy

Série ORNÁ	Typ enzymu:		KYS. FOSFATÁSA															
	datum:		26.7.2016		průměr (bez blanku)		navážka (g)		30.8.2016		průměr (bez blanku)		navážka (g)		29.9.2016		průměr (bez blanku)	
	navážka (g)		μmol PNP/ml		navážka (g)		μmol PNP/ml		navážka (g)		μmol PNP/ml		navážka (g)		μmol PNP/ml		navážka (g)	
Kontrola	2,0007		0,0398	0,0402	2,0016		0,0126	0,0129	2,0062		0,0167	0,0159	2,0062		0,0167	0,0159	2,0062	
	2,0030		0,0377		2,0051		0,0135		2,0025		0,0157		2,0025		0,0157		2,0025	
	2,0046		0,0431		2,0022		0,0125		2,0017		0,0152		2,0017		0,0152		2,0017	
blank	2,0014		0,0037		2,0013		0,0015		2,0043		0,0027		2,0043		0,0027		2,0043	
6PPD 0,1 %	2,0037		0,0333	0,0347	2,0033		0,0122	0,0124	2,0041		0,0120	0,0124	2,0041		0,0120	0,0124	2,0041	
	2,0026		0,0350		2,0093		0,0121		2,0092		0,0115		2,0092		0,0115		2,0092	
	2,0055		0,0359		2,0070		0,0128		2,0066		0,0137		2,0066		0,0137		2,0066	
blank	2,0069		0,0029		2,0052		0,0015		2,0069		0,0019		2,0069		0,0019		2,0069	
6PPD 0,01 %	2,0044		0,0318	0,0359	2,0082		0,0192	0,0150	2,0098		0,0142	0,0143	2,0098		0,0142	0,0143	2,0098	
	2,0063		0,0375		2,0054		0,0125		2,0034		0,0127		2,0034		0,0127		2,0034	
	2,0022		0,0383		2,0027		0,0133		2,0021		0,0160		2,0021		0,0160		2,0021	
blank	2,0046		0,0030		2,0006		0,0018		2,0035		0,0022		2,0035		0,0022		2,0035	
ZnO 0,1 %	2,0051		0,0297	0,0303	2,0063		0,0105	0,0119	2,0003		0,0113	0,0120	2,0003		0,0113	0,0120	2,0003	
	2,0018		0,0304		2,0009		0,0124		2,0055		0,0117		2,0055		0,0117		2,0055	
	2,0052		0,0307		2,0086		0,0127		2,0049		0,0129		2,0049		0,0129		2,0049	
blank	2,0012		0,0042		2,0088		0,0026		2,0051		0,0024		2,0051		0,0024		2,0051	
ZnO 0,01 %	2,0053		0,0249	0,0333	2,0007		0,0161	0,0168	2,0022		0,0195	0,0183	2,0022		0,0195	0,0183	2,0022	
	2,0025		0,0371		2,0066		0,0174		2,0032		0,0187		2,0032		0,0187		2,0032	
	2,0030		0,0379		2,0040		0,0169		2,0073		0,0166		2,0073		0,0166		2,0073	
blank	2,0008		0,0039		2,0037		0,0017		2,0014		0,0027		2,0014		0,0027		2,0014	
Saze 0,1 %	2,0051		0,0354	0,0405	2,0090		0,0169	0,0144	2,0033		0,0146	0,0153	2,0033		0,0146	0,0153	2,0033	
	2,0035		0,0409		2,0037		0,0112		2,0030		0,0159		2,0030		0,0159		2,0030	
	2,0058		0,0453		2,0050		0,0152		2,0016		0,0155		2,0016		0,0155		2,0016	
blank	2,0043		0,0042		2,0025		0,0027		2,0005		0,0045		2,0005		0,0045		2,0005	
Saze 0,01 %	2,0031		0,0371	0,0393	2,0024		0,0110	0,0139	2,0038		0,0135	0,0149	2,0038		0,0135	0,0149	2,0038	
	2,0029		0,0430		2,0018		0,0152		2,0006		0,0140		2,0006		0,0140		2,0006	
	2,0030		0,0378		2,0048		0,0155		2,0093		0,0172		2,0093		0,0172		2,0093	
blank	2,0063		0,0041		2,0013		0,0024		2,0070		0,0026		2,0070		0,0026		2,0070	