

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2016

Petr Král



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HODNOCENÍ VEDLEJŠÍCH ENERGETICKÝCH PRODUKTŮ POMOCÍ VYBRANÝCH TESTŮ EKOTOXICITY

EVALUATION OF ENERGETIC BYPRODUCTS VIA SELECTED ECOTOXICITY TESTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Král

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0984/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Petr Král**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Hodnocení vedlejších energetických produktů pomocí vybraných testů ekotoxicity

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Výběr vhodných testů pro ekotoxikologické hodnocení vedlejších energetických produktů
3. Posouzení ekotoxicity vedlejších energetických produktů

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petr Král
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D. prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tématem bakalářské práce je studium ekotoxicity vedlejších energetických produktů vznikajících v energetickém průmyslu. Teoretická část je zaměřena na současnou problematiku testování ekotoxicity odpadů, a to zejména na potřebu využití testů ekotoxicity nejenom v akvatickém, ale i v kontaktním uspořádání. V praktické části práce byly vybrané vedlejší energetické produkty podrobeny ekotoxikologickému hodnocení prostřednictvím akutního testu toxicity a testu únikového chování na půdním organismu žížale hnojní (*Eisenia fetida*), testu inhibice růstu kořene rostlin salátu setého a cibule kuchyňské (*Lactuca sativa* a *Allium cepa*). Rovněž byl použit bioluminiscenční test na bakterii *Vibrio fischeri*. Zjištěné výsledky sloužily k hodnocení případné ekotoxicity testovaných produktů. Bylo zjištěno, že využití testů v kontaktním uspořádání je velmi žádoucí pro komplexní hodnocení negativních vlivů materiálů vnášených do ekosystému. Také význam testu na bakterii *Vibrio fischeri* je nezanedbatelný, neboť poskytne další informaci o působení látek na zástupce destruentů, kteří opět představují významný funkční článek ekosystému.

ABSTRACT

The topic of bachelor thesis is the study of ecotoxicity of energetic byproducts generated from the power industry. The theoretical part is focused on current problems concerning waste ecotoxicity testing namely on needs of ecotoxicity testing not only in terrestrial but also in aquatic arrangement. In practical part selected energetic byproduct were evaluated via Acute toxicity test and Avoidance test on soil organism earthworm (*Eisenia fetida*) and Plant root growth inhibition test on lettuce and onion (*Lactuca sativa* a *Allium cepa*). Luminescent bacteria test on *Vibrio fischeri* was also used. Obtained results served for evaluation of potential ecotoxicity of energetic byproducts discussion. It was found that test in contact arrangement is very important for complex evaluation of negative effects of matrices entering the ecosystem. Also the importance of test on luminescent bacteria *Vibrio fischeri* is not negligible, because provides additional information of effects on representatives of destruent as an important ecosystem function part.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxicita, vedlejší energetické produkty, testy ekotoxicity

KEYWORDS

ecotoxicity, energetic byproducts, ecotoxicity tests

KRÁL, P. *Hodnocení vedlejších energetických produktů pomocí vybraných testů ekotoxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 48 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a pevné nervy. Dále pak Ing. Pavlíně Škarkové za pomoc při terestrických testech.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Vedlejší energetické produkty	8
2.1.1	Vznik VEP	9
2.1.2	Typy VEP	10
2.2	Ekotoxikologie	10
2.2.1	Ekotoxikologické testy	10
2.2.2	Dělení ekotoxikologických testů	11
2.2.3	Testy v kontaktním uspořádání	13
2.2.4	Testy v akvatickém uspořádání	14
2.2.5	Legislativa týkající se VEP	14
2.3	Vodné výluhy pevných matric	16
2.3.1	Bioluminiscenční test na <i>Vibrio fischeri</i> ISO 11348-3	17
2.3.2	Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské	18
2.4	Prostředí terestrických testů	20
2.5	Testy s <i>Eisenia fetida</i>	20
2.5.1	Test akutní toxicity OECD 207	21
2.5.2	Test akutní toxicity na umělé půdě	21
2.5.3	Test únikového chování ISO 17512-1	21
2.6	Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Příprava vodných výluhů	23
3.2	Příprava umělé půdy	24
3.3	Testy na organismu <i>Eisenia fetida</i>	27
3.3.1	Test se standardní látkou	27
3.3.2	Test akutní toxicity OECD 207	29
3.3.3	Test únikového chování ISO 17512-1	29
3.3.4	Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126	30
3.3.5	Bioluminiscenční test na <i>Vibrio fischeri</i> ISO 11348-3	30
3.3.6	Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské ISO 11269-1	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32

4.1	Test akutní toxicity OECD 207	32
4.2	Test únikového chování ISO 17512-1	33
4.3	Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126	34
4.4	Bioluminiscenční test na <i>Vibrio fischeri</i> ISO 11348-3	37
4.5	Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské ISO 11269-1	38
5	ZÁVĚR.....	40
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	40
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	45
	PŘÍLOHA 1 PROBITOVÁ TABULKA	47
	PŘÍLOHA 2 DUNNETTOVA TABULKA	48
	PŘÍLOHA 3 PŘÍKLAD VÝPOČTU DLE DUNNETOVA TESTU	49

1 ÚVOD

Problematika vedlejších energetických produktů je v dnešní době velmi často diskutována, protože poptávka po energiích je stále vyšší a vyšší. Toto má za následek rostoucí spotřebu nejen obnovitelných energetických zdrojů, ale rovněž i klasických fosilních paliv. Vedlejší energetické produkty (VEP) představují materiál, vznikající spalováním fosilních paliv a při následném odsiřování spalin v energetickém průmyslu za produkce technologické páry, horké vody atd. k výrobě elektřiny a tepla. S tím souvisí otázka, co s těmito na první pohled nepoužitelnými produkty spalování z elektrárenských zařízení. VEP, kterými jsou například popílky, strusky, energosádrovce, škváry apod. mohou obsahovat rizikové prvky jako nikl, olovo, měď, chrom, rtuť apod. Nejčastějšími způsoby likvidace těchto látek bylo skladování na skládkách bez dalšího využití, čímž se stávaly odpady. Dalším způsobem je jejich materiálové využití, v různých oblastech lidské činnosti, nejčastěji ve stavebnictví, k rekultivaci půd, výrobě filtrů atd. Z legislativního hlediska je důležité vymezit hranice toxicity a využitelnost látek dále v hospodářství. Důraz se klade především na hodnocení fyzikálních a chemických vlastností a především na splnění environmentálních požadavků těchto VEP. Mezní hodnoty pro zkoumané potencionálně toxické látky jsou dány normami ČSN EN a vyhláškou č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a taktéž vyhláškou č. 294/2005 Sb. o ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu. Dále také platí v zemích Evropské unie povinnost dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek – REACH, kdy se musí povinně registrovat všechny látky a přípravky na území EU vyráběné či na její území dovážené a podléhají následnému materiálovému využití.

Mezi sledované vlastnosti patří i hodnocení ekotoxicity. Skutečnost je prozatím taková, že testování nebezpečné vlastnosti odpadu H-14, ekotoxicity, je dle platné legislativy prováděno, na vodném výluhu odpadu. Testy se provádějí na vodním korýši *Daphnia magna*, na vodní řase *Selenastrum capricornutum*, na rybě *Danio rerio* a na rostlině *Sinapis alba*. Pro určení, zda je odpad nebezpečný, tj. zda vykazuje jednu z nebezpečných vlastností, nebo je dále nevyužitelný rozhoduje hodnota LC (EC, IC)50. V případě, že tato je pro vodný výluh odpadu $\leq 10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ je odpad považován za nebezpečný neboť má jednu z nebezpečných vlastností, a to H-14 ekotoxicitu.

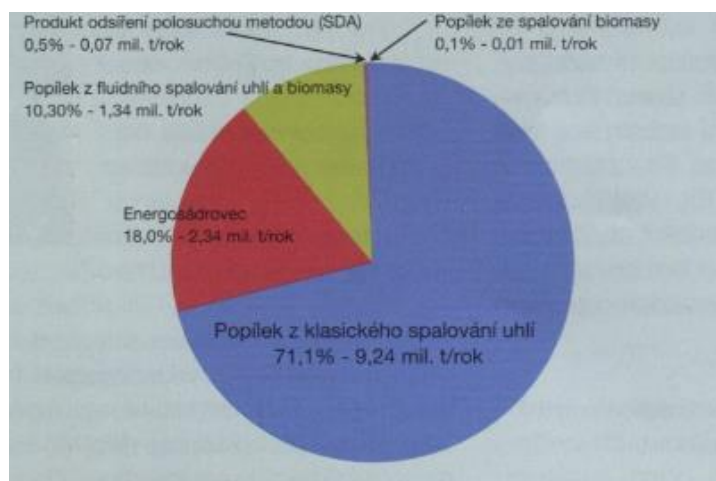
Z výše uvedeného vyplývá, že ekotoxicita odpadu je dosud stanovována prostřednictvím hodnocení výluhu tohoto odpadu tedy pouze v akvatickém uspořádání. Je zřejmé, že celá řada toxických látek, zejména hydrofobních, do výluhu nepřechází. Stanovenou baterií akvatických testů nelze tedy objektivně posoudit vliv těchto látek na jednotlivé složky ekosystému. Vzhledem k tomu, že použití VEP, jako jedna z možností znovuvyužití odpadů, je zamýšleno také v terestrickém ekosystému, v rámci rekultivačních prací. Je vhodné proto zařadit i testy v terestrickém tj. kontaktním uspořádání.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vedlejší energetické produkty

Jako vedlejší energetické produkty (VEP) se označují látky (odpady), které vznikají spalováním neboli přeměnou chemické energie na energii tepelnou, fosilních paliv (tzv. kaustobiolitů) a paliv s možnou příměsí radioaktivních prvků (uran, radium, ...). Další VEP vznikají při následném čištění spalin po spalovacím procesu [1].

Celková produkce VEP v České republice tvoří přibližně 13 mil. tun za rok (Obrázek 1), přičemž se toto číslo může velmi výrazně lišit, protože identifikace závisí na legislativě. Tímto mohou vznikat rozdíly při vyčíslování celkové produkce VEP; část je evidována jako odpad a část jako stavební materiál apod. Celých 59 % produkce se používá pro zásyp povrchových dolů a přibližně 21 % na rekultivace a sanace území a necelých 11 % na betonářské a jiné stavbařské výrobky. Přičemž ve stavebnictví je čím dál větší trend využívat popílky hlavně pro betony s nižším obsahem slinku pro masivní konstrukce, kde přídavek popílku zlepšuje tepelné vlastnosti betonů [2].



Obrázek 1: Procentuální zastoupení VEP [2]

Z hlediska obsahu solí či jiných prvků ve VEP, se jedná zejména o prvky jako chrom, síra, molybden, baryum, zinek aj. a soli jako CaO, PbS, ZnS, FeS₂, apod. U analýz VEP se objevují korelace obsahů těžkých kovů s toxicitou samotnou. Je samozřejmé, že testy na různých organismech a v různých uspořádáních se liší někdy i výrazně svými výsledky v důsledku fyzikálních vlastností testované matrice. Ačkoliv zjištěné toxicity jsou poměrně vysoké, tak korelace mezi obsahy těžkých kovů a toxicitou je spíše nižší a ukazuje míru biologické dostupnosti v případech testů například na *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Vibrio fischeri*. V tomto případě to značí vyluhovatelnost těchto složek při vlastní přípravě výluhů. Dále se také uvádí, že vícestupňové zkoušky pro vodné výluhy odpadů jsou vhodnější s přijatelnějšími výsledky. Je to ale otázka požadavků testu, která metodika vyluhovatelnosti odpadů o určité velikosti zrna se zvolí [3].

2.1.1 Vznik VEP

Jedná se především o pevné produkty spalování jako například ropy, uhlí, zemního plynu, rašeliny atd., které ještě navíc běžně obsahují příměs sirných látek, které se odstraňují v odsířovacích zařízeních. Důležitými faktory pro kvalitu odsíření spalin při vzniku VEP jsou také konstrukce či technický stav spalovacích zařízení. Zejména tepelné elektrárny produkují tyto energetické produkty, protože většina těchto zařízení postrádá vhodné inženýrské technologie pro čištění kouřových plynů.

VEP se běžně používají k výrobě různých stavebních hmot, popř. se využívají při rekultivačních a sanačních pracích, pokud splní příslušné legislativní požadavky viz bod 2.2.5 níže. V opačném případě je s nimi nakládáno jako s odpady dle dané legislativy [1, 4, 5].



Obrázek 2: Fosilní palivo – uhlí [1]

Při spalovacím procesu se přeměňuje chemická energie na energii tepelnou, kdy kvalita spalování závisí na vhodném poměru samotného paliva a kyslíku. Spalování probíhá v kotlích, které se rozlišují dle mnoha hledisek. Například se rozlišují podle teplotních a tlakových poměrů, druhů paliva, konstrukcí, způsobů spalování apod. [6].

- **Fluidní kotle**

Tento typ kotlů patří k těm nejrozšířenějším. Podstatou jeho funkce je užití vznosu topné směsi například rozemleté uhlí se vzduchem. Vháněním vzduchu do vrstvy topné směsi vzniká fluidní vrstva, která má větší povrch, než kusové uhlí v daném případě. Díky tomuto principu lze ve fluidním kotli rychle a rovnoměrně spálit na jemný popel jakékoliv palivo. Účinnost kotle se pohybuje okolo 40 % [6, 7].

- **Práškové kotle**

Do těchto kotlů se topná směs (uhelný prach apod.) vhání pod tlakem, tak aby se podpořilo rychlé spalování primárním vzduchem. Současně se vhání do prostoru kotle i další uhelný prach tak, aby sekundární vzduch podpořil hoření. Doba spalování je oproti roštovým kotlům velice krátká [6].

- **Roštové kotle**

V tomto typu kotlů se spalují celistvé kusy paliva na pevném či mechanickém roštu. Spalují se v nich například různé druhy biomasy. Zde již nevzniká spalováním tak jemný popel jako u fluidních kotlů. Dále vzniká spalováním například škvára, které se u tohoto typu kotlů odstraňuje ručně. Spalování probíhá ve vrstvě topné směsi a nad ní [6].

2.1.2 Typy VEP

Mezi jednotlivé typy vedlejších energetických produktů patří následující látky:

Struska je porézni materiál, který vzniká při spalování uhlí a využívá se jako přísada do škvárobetonů, cihel apod. Z hlediska chemického složení se skládá z oxidu křemičitého, oxidu hlinitého a vody.

Popel vzniká hlavně při spalování hnědého uhlí. Jeho následné využití je jako příměs do různých stavebních hmot či prvků.

Popílek vzniká hlavně ve větších elektrárenských zařízeních a jeho jemnost závisí na druhu a kvalitě výrobních technologií. Jde převážně o směs oxidu křemičitého, hlinitého a oxidů síry. Využití je podobné jako u popílku tj. pro výrobu stavebních hmot.

Škvára má různé složení, a to dle druhu spalovaného materiálu. Při spalování pevných paliv vzniká v kotlech při metalurgických procesech. Původně jde o taveninu za vysokých teplot, která posléze granuluje. Zpracovává se na škvárobeton, jehož předností je výborná tepelná izolace.

Energosádrovec je materiálem pro výrobu cementu, pórobetonu či sádrokartonových systémů. Sestává se z dihydrátu síranu vápenatého s příměsí popílku.

Stabilizát vzniká spalováním hnědého uhlí. Většinou se využívá k rekultivacím území či sanacím. Skládá se z energosádrovce, vápna, strusky a vody [8].

2.2 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je vědní obor zabývající se vlivem toxicity látek přírodních i syntetických na živé organismy v jejich přirozeném prostředí. Rovněž se zabývá monitoringem koloběhu těchto látek v životním prostředí. Ekotoxikologie se vyčlenila z toxikologie, vědního oboru, který studuje vliv toxických látek na člověka, zatímco ekotoxikologie zkoumá vliv škodlivin na celý ekosystém. Poprvé pojem ekotoxikologie použil Dr. Rene Truhaut, člen francouzské Akademie věd [5].

Výsledky ekotoxikologického zkoumání jsou využívány v mnoha dalších vědních oborech, a to např. v chemii ochrany životního prostředí, zpracovatelském průmyslu či stavebnictví. Také jsou vhodnými podklady při vytváření nových vyhlášek a zákonů. Protože nepříznivý vliv toxických látek je testován za určitých standardních reprodukovatelných podmínek, mají výsledky těchto testů svou vypovídací hodnotu a z těchto důvodů lze také získané výsledky mezi sebou porovnávat [5].

2.2.1 Ekotoxikologické testy

Pro hodnocení toxicity látek se využívají především biotesty. Tyto testy se primárně dělí na testy standardní a testy alternativní. Podstatou testů je studium škodlivého vlivu na živou složku životního prostředí v přesně definovaných podmínkách. Hodnotí se například toxicita odpadů, toxicita nových chemických látek zaváděných do ekosystémů jako jsou například hnojiva, pesticidy apod. Standardní testy mají přesně předepsanou metodiku práce a nakládání s organismem/organismy pro získání relevantních výsledků, zatímco u alternativních testů je postup práce poměrně zjednodušený, zejména se jedná o omezení potřeby vlastních chovů, popř. kultivací testovacích organismů, omezení potřeby velkých objemů testovacího media. Cílem alternativních testů je také minimalizovat počet organismů potřebných pro provedení testu, popř. jejich úplná náhrada a celkově zjednodušit práci.

Pro testy se volí organismy, které zastupují nejdůležitější složky ekosystémů tj. producenty, konzumenty a destruenty. Prostřednictvím testu lze tudíž poměrně snadno získat důležité informace, které sice nevedou k určení druhu toxikantu, ale mají vypovídací hodnotu, zda látka je ekotoxická nebo ne [5, 9].

Jak již bylo uvedeno, ekotoxikologické testy by měly být správně prováděny na všech funkčních úrovních ekosystému, protože v rámci ekosystému platí, že když je ovlivněna jedna úroveň (např. producenti), tak poté vliv může zasáhnout i další úrovně a poškodit tím celý ekosystém [9, 12, 14, 16].

2.2.2 Dělení ekotoxikologických testů

Biotesty se nejčastěji dělí dle doby expozice, postavení testovacích organismů v potravním řetězci nebo podle pokročilosti (generace) testů viz Tabulka 1:

Tabulka 1: Základní dělení ekotoxikologických testů [5]

Doba expozice	Trofická úroveň	Generace testů
Akutní testy	Testy na producentech	Testy 1. generace
Semiakutní testy	Testy na konzumentech	Testy 2. generace
Chronické testy	Testy na destruentech	Testy 3. generace

- **Testy dle doby expozice**

Akutní testy ekotoxicity stanovují toxický účinek látky po poměrně krátkém čase. Testovací čas se odvíjí od metodiky daného testu, ale souhrnně se dá říci, že čas akutního testu je 24 – 72 hodin. V tomto testu je toxické látce vystaven organismus přímo a stanovují se hodnoty LD₅₀, LC₅₀, EC₅₀ a IC₅₀. LD značí letální dávku a LC letální koncentraci, kdy uhynie 50 % testovacích organismů. EC znamená efektivní koncentraci, kdy testovaná látka

vyvolá buď 50% úhyn, nebo imobilizace organismů a IC značí inhibiční koncentraci, kdy způsobí 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti oproti kontrolnímu (slepému) vzorku [5].

Při semiakutních testech jsou organismy exponovány toxickou látkou opakovaně a test může trvat od 30 do 90 dní. Z principu je zkoumaná toxická látka v tomto druhu testu v nižší koncentraci než u testů akutních. Výstupem testu je zjištění celkového biologického účinku toxické látky za delší časový úsek popřípadě i kumulativního účinku toxikantu. Výstupními hodnotami jsou NOAEL (No Observed Effect Level) a LOAEL (Lowest Observed Effect Level). Při prvně uvedené hodnotě nejsou ještě patrné škodlivé účinky toxické látky při dané dávce, zatímco při LOAEL je možné již pozorovat změny v porovnání s organismy v kontrolní skupině [9].

Chronické testy trvají nejdéle. Testování trvá i více než 90 dní. Rozvržení plánu testování je řízeno podle výsledků krátkodobějších testů a také podle požadavku na výsledek testování. Výsledkem těchto testů je především zjištění poruch či vad po delším zkoumání celkového biologického vývoje testovacího subjektu. Prokázání reprodukčních, vývojových popř. dědičných vad, patologických nálezů apod. slouží pro dokonalejší zjištění účinků látek po jejich dlouhodobém působení na testovací organismy a mohou být podkladem pro další výzkum. Zjišťované hodnoty jsou totožné jako u semiakutních testů, a to NOAEL a LOAEL [10].

- **Testy dle trofické úrovně testovacích organismů**

Základním pravidlem ekotoxikologického testování, je pro daný účel testování navrhnout vhodnou baterii testů, která by zahrnovala základní trofické úrovně ekosystému (akvatického nebo terestrického) tj. producenty, konzumenty a destruenty. Testy na producentech se provádějí na organismech, které obsahují zelené rostlinné barvivo chlorofyl, a tedy mají schopnost fotosyntézy. Jsou to autotrofní organismy, které přeměňují anorganické látky na látky organické. V testech na konzumentech se využívají heterotrofní organismy. Testy na destruentech jsou uskutečňovány na rozkladačích organických látek, které je konvertují zpět na látky anorganické [5, 9].

- **Testy podle pokročilosti testovacího systému**

Testy se dělí do 3 skupin, tzv. generací. V případě biotestů první generace jde o testy standardní, klasické metodiky. V České republice se především využívá 4 standardních testů, které jsou vyžadovány legislativou zejména při testování odpadů. Jelikož jde o klasické testy, je jejich časová náročnost poměrně značná, vezmeme-li v úvahu péči o testovací organismy. Mezi tyto testy se řadí:

1. Akutní test toxicity na rybách – *Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio* (49 – 96 hodin)
2. Imobilizační test na perloočkách – *Daphnia magna* (24 – 48 hodin)
3. Růstově inhibiční test na řasách – *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov), (*Selenastrum capricornutum*) (72 hodin)
4. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé – *Sinapis alba* (72 hodin)

Biotesty druhé generace jsou v podstatě stále rozšířenější alternativní testy, kdy jde především v porovnání s biotesty první generace, standardními testy, o zjednodušení celého procesu. Tyto testy jsou také nazývány jako testy miniaturizované, dochází ke zmenšování potřebných objemů roztoků, počtu organismů atd. Pro testování se využívá klidových stádií organismů, většinou jde o vajíčka, cysty, imobilizované organismy apod. Příprava organismu do testu je závislá na druhu testovacího organismu. Řádově jde o inkubaci od 24 do 72 hodin. Tyto testy nemají svou legislativní úpravu v České republice [9].

Mezi biotesty třetí generace se řadí biosenzory, biosondy a biomarkery. Biosenzor je primárně měřicí přístroj s citlivým prvkem biologického původu spojeným s určitým převodníkem např. elektrochemickým či optickým. Biologická část může být biokatalytická, kdy se stanovovaná látka přeměňuje na látku druhou a také bioafinitní, kdy jde pro změnu o vznikající afinitní komplex, kde je původní látka vázána. Převodník slouží k transformaci informace na měřitelný signál. Biomarkery dokáží indikovat mechanismus toxicity, a tudíž určit přibližnou skupinu toxikantů. Mezi biomarkery patří například alterace enzymového systému testovacího organismu na přítomnost látek např. PCBs (polychlorované bifenyly), PAHs (polycyklické aromatické uhlovodíky) nebo zvýšená koncentrace metalothioneinů vznikajících v organismu jako reakce na přítomnost rizikových kovů – rtuť, olovo, chrom apod. [10].

Další způsob rozdělení testů vychází z testovaného materiálu, který ovlivňuje konečný návrh designu testů a tedy i prostředí, ve kterém budou testy probíhat. Takto se rozdělují testy na terestrické (kontaktní) a akvatické.

2.2.3 Testy v kontaktním uspořádání

Kontaktní testy jsou tzv. terestrické testy a jsou protikladem testů akvatických, kde se pracuje s roztoky testovaných látek popř. vodnými výluhy testovaných matric. Prostor, ve kterém akvatický test probíhá, je roztok příslušně upravený dle metodiky testu. Hlavním důvodem pro provedení testu v terestrickém/kontaktním uspořádání, je komplexní zkoumání účinků chemických látek, popř. kontaminovaných matric, na organismy terestrických ekosystémů. Skutečnost, že jsou vyžadovány také tyto testy, je dána tím, že v případě přípravy vodných výluhů testovaných matric nemusí všechny přítomné látky vždy přejít do výluhu. Proto je pro relevantní posouzení zkoumané matrice potřeba účinek těchto nerozpustných látek testovat právě v kontaktním uspořádání testů. Zkoumanými matricemi mohou být různé pevné odpady například různé stavební suť, popílek, kaly, jíly, popílky, strusky... Při těchto testech je důležitým poznatkem to, že se zkoumá matrice v nezměněné formě a biologické odezvy testovacích organismů co nejvíce odpovídají situaci, která by nastala při aplikaci těchto matric do ekosystému ať již např. v rámci rekultivačních prací (stavební suť, popílek) nebo hnojení (čistírenské kaly). Procesní výhodou je to, že odpadá tvorba výluhů a s tím spojené homogenizační procesy a zkoušky [10].

Nejčastější využití kontaktních testů je v oblastech testování nových chemikálií nebo ověřování vlastností látek poměrně známých, při testování ekotoxicity odpadů, pesticidů, hnojiv atd. Způsob jakým dojde u toxikantu k překročení vstupní bariéry testovacího

organismu je ovlivněn i druhem matrice, takto pro některé látky může existovat i více možností průniku toxikantu [10].

U mikroorganismů jde především o adsorpci celým povrchem těla, u rostlin o příjem látek kořenovým systémem a u obratlovců může nebezpečná látka vstupovat do organismu například vdechováním, stykem s pokožkou, potravou aj. Následné vlivy toxických látek na organismy je možné pozorovat na více úrovních. Na nejnižší - suborganismální úrovni, kdy se sledují procesy v buňce/buňkách, případně enzymatická aktivita, změna biologických procesů či genetické poruchy. Na druhé úrovni se pozorují změny na úrovni celého organismu (letalita, úbytek váhy, biomasy apod.). Na třetí úrovni - populací, se zkoumá např. změna počtu jedinců v populaci. Na čtvrté úrovni lze pozorovat vzájemné interakce mezi populacemi více druhů organismů [11].

2.2.4 Testy v akvatickém uspořádání

Prostřednictvím těchto testů se studují účinky toxikantů nebo vodné výluhy pevných materiálů ve vodním prostředí. Studují se především na vodních organismech, kde se zkoumá letální, inhibiční, imobilizační účinek, popřípadě se pozoruje v delším časovém úseku celkový vliv na biologické procesy zkoumaného organismu. Další příkladem testů v akvatickém uspořádání mohou být testy fytotoxicity na terestrických rostlinách (např. *Sinapis alba*, *Allium cepa*), kdy testovací organismus je vystaven účinkům rozpuštěných látek nebo výluhů testovaných materiálů [11].

2.2.5 Legislativa týkající se VEP

Ekotoxicita jako jedna z nebezpečných vlastností odpadů je zahrnuta pod označením H-14, ve vyhlášce Ministerstva životního prostředí č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. V návrhu nové vyhlášky, která nabyla účinnosti 1. ledna 2016, se tato vlastnost označuje jako HP-14 a rozšiřuje požadavky na testování odpadů ve vlastnosti ekotoxicita nejen na podkladě vodných výluhů, ale i s využitím terestrických testů. Odpady s tímto kódem jsou považovány za ekotoxické a představují nebezpečí pro jakoukoliv složku životního prostředí. Za ekotoxické podle vyhlášky č. 376/2001 Sb. jsou považovány vodné výluhy testovaných odpadů, jejichž hodnota LC (EC, IC)₅₀ ≤ 10 ml·l⁻¹ na jednom z možných testovacích organismů:

1. Na rybách *Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio* – 96hodinový test
2. Na perloočkách *Daphnia magna* – 48hodinový test
3. Na řasách *Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus subspicatuus* – 72hodinový test
4. Na semenech rostliny *Sinapis alba* – 72hodinový test

S těmito odpady je nakládáno jako s nebezpečnými.

Z poznatků o testech toxicity na rybách a semenech hořčice vyplývá, že tyto testovací organismy jsou málo citlivé v akvatických testech, z tohoto důvodu byly nahrazeny organismem, který zastupuje destruenty, a to bakterií *Vibrio fischeri*. Dále ze studií vyplývá například to, že statistické rozdíly při stanovení WHC (vodní kapacity půdy) a při zkouškách více druhů umělých půd nejsou významné a neměly by tudíž být zdrojem významných chyb

při testování. Je patrné, že citlivost terestrických zkoušek pro hodnocení environmentálních dopadů pevných odpadů vnášených do ekosystému je mnohdy vyšší než u testů akvatických. Spojením obou druhů testů na organismech zastávajících v ekosystému různé funkce jako např. žížal nebo bakterií *Vibrio fischeri*, bylo potvrzeno, že výsledky mnohem lépe odhalí celkový toxický účinek, než tomu bylo doposud [17, 18].

Podle nově navržené vyhlášky pro posouzení vlastnosti ekotoxická jsou v baterii testů v akvatickém uspořádání jako zkušební organismy vyžadovány bakterie *Vibrio fischeri*, perloočka *Daphnia magna* a řasa *Desmodesmus subspicatus*. Navíc je požadován test terestrický na semenech salátu *Lactuca sativa*. Začlenění terestrického testu znamená jistý posun k objektivnímu hodnocení odpadů při jejich dalším materiálovém využití. Navíc odpadne zdlouhavý proces zjišťování hodnoty LC, IC EC50, kdy u vodného výluhu odpadu bude posuzován efekt neředěného 100% výluhu oproti kontrole. Podle návrhu vyhlášky bude za ekotoxický považován odpad, kde bude prokázána inhibice luminescence *Vibrio fischeri* větší, než 20 %, procento imobilizace *Daphnia magna* bude větší než 20 %, inhibice/stimulace růstu řas bude větší než 20 % a inhibice růstu kořene salátu v kontaktním testu bude větší než 30 % ve srovnání s kontrolou.

Další hodnocení odpadů je zaměřené na možnost využití testovaných odpadů k rekultivacím terénů, výrobě dalších produktů či likvidaci nebo ukládání na skládky.

Toto hodnocení odpadů je v České republice podloženo již výše zmíněnou vyhláškou č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech pro nakládání s odpady a vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb. Hodnocení vychází opět pouze z výsledků testování na podkladě vodných výluhů. Odborníci zabývající se nedostatkem v hodnocení odpadů doporučovali, aby množství odpadu pro testování v terestrickém uspořádání představovalo 50 % hmotnostního podílu. Z návrhu vyhlášky ze dne 1. 1. 2015 o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů vyplývá, že pro testování pevných matric se nyní doporučuje 10% hmotnostní podíl testovaného odpadu ve směsi s umělou půdou a považuje se za dostatečný pro objektivní testování odpadu v kontaktních testech. Dle vyhlášky č. 294/2005 Sb platí, že hraniční hodnota pro možné využití odpadu k rekultivacím na povrchu terénu je 30% inhibice růstu řas nebo kořene *Sinapis alba* oproti kontrole. Úmrtnost ryb není tolerována a u organismu *Daphnia magna* nesmí být ve srovnání s kontrolou vyšší než 30 %. Na podkladě platných právních předpisů byly dosud testy prováděny pouze na vodných výluzích, rozhodujícím faktorem bylo stanovení procentuální inhibice, mortality nebo stimulace testovacích organismů. Jak již bylo uvedeno výše, tyto testy nezohledňovaly toxicitu látek ve vodě nerozpustných, kterou je možno zjistit při provedení testu v kontaktním uspořádání na zástupcích všech funkčních úrovních terestrických ekosystémů.

Tyto testy jsou uvedeny v nařízení Komise (ES) č. 440/2008, jenž stanovuje metody testování podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, část C a v novějším nařízení Komise (EU) č. 286/2011 ze dne 10. března 2011, kterým se pro účely přizpůsobení vědeckotechnickému pokroku mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. Toto nařízení - REACH

(Registraction, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), určilo povinnost registrace všech chemických látek na území Evropské unie, se kterými se může dále v průmyslu pracovat. Tato problematika zasahuje i odpady, které se nejčastěji využívají ve stavebnictví, kdy tyto látky musí plnit požadavky na stavební výrobky dle Nařízení vlády č. 163/2002 Sb. Jsou tedy 2 možnosti jak s odpady nakládat, a to jako s odpadem dle výše zmíněných vyhlášek nebo je nutné projít certifikací výrobku dle zákona o odpadech č. 185/2001 Sb. [12, 13, 14, 24, 25, 26].

2.3 Vodné výluhy pevných matric

Vodné výluhy se připravují dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů, kdy je vodný výluh definován jako výluh připravený ze vzorku odpadu podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě, získaný při zkoušce vyluhovatelnosti vodou. Pro přípravu vodného výluhu se používá destilovaná voda. Dle velikosti částic vzorku se odvíjí jeho následné zpracování. Jsou-li ve vzorku obsaženy částice o větším rozměru než 4 mm, musí se vzorek prosít. Při větším zbytku na síti než 5 % původní hmotnosti vzorku se vzorek znovu podrtí a proces se opakuje. Pokud jsou částice vzorku i nadále nevhodné, tak se s nimi dále nepracuje [12, 15].

Po homogenizaci všech podílů se provádí stanovení podílu sušiny DR podle normy ČSN ISO 11465, kdy je vzorek sušen při teplotě 105 °C. Následně se dle matematických vztahů uvedených níže, vypočítá potřebné množství vzorku a vody potřebné pro získání výluhu. Teplota pro vyluhování se musí pohybovat v rozmezí 15 – 25 °C. Nakonec je vzorek s vypočítaným podílem vody umístěn do třepačky na $24 \pm 0,5$ hodin. Třepačka se otáčí rychlostí 5 – 10 otáček za minutu, přičemž jsou vzorky třepány metodou „hlava - pata“. Teprve poté je výluh dle potřeby testování upraven - přefiltrován přes papírový filtr, kdy je důležité, aby se výluh nepromýval vodou a nedošlo jeho kontaminaci jinými látkami. Poté je možné jej využít k testování na 4 předepsaných organismech uvedených v bodě 2.2.5. Odpady, u nichž hodnoty LC (EC, IC)50 pro vodné výluhy jsou $\leq 10 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ se považují za nebezpečné tj. vykazují nebezpečnou vlastnost H-14 ekotoxicitu [16, 19, 20].

Výpočet sušiny vzorku:

$$DR = 100 \cdot \frac{M_D}{M_W} \quad (1)$$

DR odpovídá podílu sušiny ve vzorku [%]

M_D odpovídá hmotnosti vysušeného vzorku [kg]

M_W odpovídá navážce vzorku odpadu [kg]

Výpočet potřebné navážky testovaného vzorku M .

$$M = 100 \cdot \frac{M_T}{DR} \quad (2)$$

M odpovídá hmotnosti vzorku odpadu [kg]

M_T odpovídá teoretické navážce sušiny vzorku [kg]

DR odpovídá podílu sušiny ve vzorku [%]

Pro jednostupňovou vsádkovou zkoušku je třeba k vzorku o hmotnosti M přidat určité množství vody L_A , tak aby byl zachován poměr kapalné a pevné části 10/1.

$$L_A = M_T \cdot \frac{11 - \frac{100}{DR}}{\rho_{H_2O}} \quad (3)$$

L_A odpovídá množství přidané vody [l]

M_T odpovídá teoretické navážce vzorku [kg]

DR odpovídá podílu sušiny ve vzorku [%]

ρ_{H_2O} odpovídá hustotě vody ($1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

Pro účely bakalářské práce byly vybrány dva testy v akvatickém uspořádání, jejichž metodiky jsou uvedeny níže, a to test na zástupci destruentů - test na bioluminiscenční bakterii *Vibrio fischeri* a test na *Allium cepa*.

2.3.1 Bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri* ISO 11348-3

V. fischeri jsou mořské gramnegativní bakterie, které jsou specifické svou schopností bioluminiscence. Z principu jde o enzymaticky katalyzovanou reakci luciferinu enzymem luciferázou. Těto vlastnosti se využívá při testech ekotoxicity na těchto bakteriích [22].

- **Provedení testu**

K testu se užívají lyofilizované bakterie, které téměř ihned po rehydrataci jsou použitelné k testům. Principem testování je měření intenzity bioluminiscence v luminometru, kdy se ze změny intenzity emitovaného záření určuje toxický účinek na bakterie.

Test trvá 15, 30 minut, kdy se odezva testovacích organismů (inhibice luminiscence) měří ve skleněných kyvetách vytemperovaných v luminometru na $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Z důvodu toho, že bakterie jsou mořské organismy je nutno zabezpečit, aby koncentrace NaCl v kontrole i v testovaných vzorcích byla 2%. Další podmínkou dobrého průběhu testu je pH v rozmezí 6 – 8,5 a koncentrace kyslíku $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. U vzorku zabarvených je nutno počítat s korekcí ztráty bioluminiscence oproti bezbarvým vzorkům. Pomocí přístroje Lumistox 300 je možno provádět nejen stanovení hodnot EC50, EC20, ale i screeningové stanovení inhibice luminiscence, kterou vyvolává testovaný vzorek oproti kontrole. Pro platnost výsledků screeningového testu je zapotřebí vypočítat hodnotu korekčního faktoru dle následujícího vztahu [27]:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0} \quad (4)$$

f_{kt} odpovídá korekčnímu faktor pro expozici po daném čase, 30 minut

I_{kt} odpovídá intenzitě luminiscence kontrolního vzorku po expozici po daném čase, 30 minut [rel. jedn. lum.]

I_0 odpovídá intenzitě luminiscence kontrolní suspenze bezprostředně před přidáním vody k zředění [rel. jedn. lum.]

Pro platnost testu musí být splněné tyto podmínky:

Tabulka 2: Parametry pro test na *Vibrio fischeri* [27]

Parametr	Hodnota
f_k	0,6 -1,8
paralelní stanovení vzorků i kontroly	odchylky průměrů o max. 3 %
inhibice v rozmezí pro referenční látky včetně 2% roztoku NaCl	20 – 80 %
inhibice pro referenční roztok 7,5% NaCl	40 – 60 %

2.3.2 Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské

Cibule kuchyňská (*A. cepa*) je cibulovitá zelenina, dvouletá až vytrvalá rostlina, kterou tvoří jednoduché přisedlé listy. Květy jsou oboupohlavné a jejich plodem je tobolka. Taxonomicky patří do taxonů: říše rostliny (*Plantae*), podříše cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložné (*Liliopsida*), řádu chřestotvaré (*Asparagales*), čeledi amarylkovité (*Amaryllidaceae*) a rodu *Allium* [22].

• Provedení testu

Pro test se užívají malé cibulky o velikosti asi 15 – 22 mm a váze 2 – 4 g, které se vystaví po dobu 72 hodin testovaným vzorkům. Dle potřeby je možno test prodloužit až na dobu 168 hodin, kdy výsledný účinek na cibulky je průkaznější.

Test je prováděn při teplotě 20 ± 2 °C; den předem připravené a oloupané cibulky, ponechají ve vodě, aby se oživily zárodečné buňky kořenového systému. Testovaná chemická látka nebo vodný výluh je pro přípravu koncentrační řady ředěn kohoutkovou vodou. Na jednu testovanou koncentraci v koncentrační řadě se nasadí cibulky v optimálním počtu 12 kusů.

Po 72 popř. po 168 hodinách se změří délka kořenů u všech cibulek a určí se průměrná délka kořene na cibulku v dané koncentraci, následně se vypočítá inhibice/stimulace růstu kořene oproti kontrole. Je-li to možné stanoví se hodnota IC50 [28].

Pro výpočet inhibice růstu kořene se užívají následující vztahy:

$$L = \frac{\sum_{i=1}^k l_i}{k} \quad (5)$$

L odpovídá průměrné délce kořene [mm]

l_i odpovídá průměrné délce kořene v i -tém stanovení [mm]

l_k odpovídá průměrné délce kořene v i -tém stanovení [mm]

k počet paralelních stanovení se stejnou střední hodnotou [mm]

$$I = \frac{L_c - L_v}{L_c} \cdot 100 \quad (6)$$

I odpovídá inhibici nebo stimulaci růstu kořene [%]

L_c odpovídá průměrné délce kořene v kontrole [mm]

L_v odpovídá průměrné délce kořene ve vzorku [mm]

Jako výsledek testu se stanovuje hodnota IC50, kdy se inhibice růstu, vyjádřená v [%], vynese do závislosti na dekadickém logaritmu inhibiční koncentrace. V případě stimulace se tato koncentrace do výpočtu nezahrnuje. Výsledná hodnota IC50 se určí výpočtem z rovnice regresní přímky pro 50% inhibici následným odlogaritmováním výsledku.

2.4 Prostředí terestrických testů

Normou OECD 207 je dáno, že pro terestrické testy může být užitá reálná půda nebo také umělá (artificiální) půda. Tato půda se skládá z 70 % suchého křemenného písku s minimálně 50% podílem zrn o velikosti 0,05 – 2 mm, 10 % vysušené rašeliny a z 20 % vysušeného kaolinového jílu s podílem 30 % kaolinitu. Další složkou je uhličitán vápenatý k úpravě hodnoty pH $6,0 \pm 0,5$. Jeho podíl v artificiální půdě je v rozmezí 0,3– 1 %. Stanovení hodnoty pH se provádí s 1M roztokem KCl podle následujícího postupu. Do zkumavky se vloží 5 ml půdy, která je doplněna vodou na celkový objem 30 ml 1M roztoku KCl. Směs se musí důkladně protřepat a nechat 2 hodiny odstát. Posléze se směs opět protřepe a pH metrem se změří výsledná hodnota pH. Povolené rozmezí hodnot pH je 5,5 – 6,5.

Pro dodržení optimálních podmínek testu je potřeba stanovit WHC_{max} (Maximum Water Holding Capacity). To znamená, kolik vody je půda schopna maximálně zadržet v kapilárních pórech. Stanovení se provádí tak, že se naváží 50 g suché artificiální půdy, která se umístí do předem zváženého válce se dnem z polopropustného materiálu. Válec s artificiální půdou se umístí do válce s vodou tak, aby vodní hladina byla v úrovni sloupce vzorku půdy. Ve vodní lázni se váleček nechá 3 hodiny a poté se váleček přemístí na misku s pískem a přikryje tkaninou, aby nevysychal příliš rychle. Po dalších třech hodinách se zváží váleček s půdou a vážení se opakuje každých 30 minut, dokud hmotnost není konstantní. Výpočet se provede dle vzorce (7):

$$WHC_{max} = \frac{(M_{VP} - M_V - 50)}{50} \quad (7)$$

WHC_{max} odpovídá maximální hodnotě vodní kapacity [%]

M_{VP} odpovídá hmotnosti válce s nasycenou zeminou [g]

M_V odpovídá hmotnosti válce [g]

Ze znalosti WHC_{max} se vypočítá potřebné množství vody, kterým se musí půda ovlhčit dle požadavků konkrétního testu.

Použití reálných půd zajišťuje co nejlepší podmínky pro testování, tak že jsou testovací organismy téměř v identickém prostředí jako v přírodě. Avšak jakékoliv odchylky ve složení půd mohou významně změnit výsledky testů a tím i možnost tyto výsledky porovnávat a

vyvozovat závěry. U artificiálních půd se klade důraz právě na složení, které je sice odlišné než v půdě reálné, ale je přesně dané a takto mohou být výsledky jednotlivých studií lépe porovnávány. Artificiální půdy se často označují jako půdy ekologicky nereálné [10, 26].

2.5 Testy s *Eisenia fetida*

Testovací organismus žížala hnojní (*Eisenia fetida*) patří z hlediska taxonomie do těchto taxonů: říše živočichové (*Animalia*), kmenu kroužkovci (*Annelida*), podkmenu opaskovci (*Clitellata*), třídy maloštětinatců (*Oligochaeta*), čeledi žížalovití (*Lumbricidae*) a rodu *Eisenia*. Jde o fotofóbní organismy, které mají nenahraditelnou funkci v půdním ekosystému [22]. Žížaly jsou nenahraditelným organismem v ekosystému, svou dekompoziční činností se podílí na tvorbě a zkvalitňování půd. Rozklad organické hmoty, rostlinné či živočišné, je těsně spjat se symbiózou mezi půdními organismy, kdy se živiny rozdělí mezi všechny organismy dle jejich funkcí. Žížaly napomáhají tomu, aby půda měla dostatek vody a živin pro další půdní organismy a rostliny [23].

Testy na žížalách se provádí na základě normy OECD 207, popř. podle norem ISO 11268-1, ISO 11268-3 a ISO 17512-1 [26, 29, 30, 31].

2.5.1 Test akutní toxicity OECD 207

Test akutní toxicity žížal podle normy OECD 207 je nejstarší test v kontaktním uspořádání. Tímto testem se stanovuje především toxicita chemických látek (hnojiv, pesticidních přípravků), ale popř. i pevných materiálů, které by mohly být zaneseny do půdního prostředí např. v rámci rekultivací. Dle metodiky může být tento test prováděn na filtračním papíře, který je však ekologicky nerelevantní a dále na artificiální půdě.

2.5.2 Test akutní toxicity na artificiální půdě

Test je prováděn s určeným množstvím testované matrice, kdy se smíchá artificiální půda s testovaným materiálem. Test trvá 14 dní. WHC (vodní kapacita) půdy je udržována v rozmezí 40 – 60 %. Uhlíčanem vápenatým se pH upraví do rozmezí $6,0 \pm 0,5$. Optimální teplota pro průběh tohoto testu je 20 ± 2 °C. Počet testovacích jedinců ve váhovém rozmezí 300 – 600 mg na každou testovací nádobu o optimálním rozměru 13x17x6 cm je 10. Testování matrice se provádí ve třech opakováních. Stejně tak kontrola, tj. testovací organismy umístěné pouze v artificiální půdě, je připravena ve třech opakováních.

Po dvou týdnech testování je zjišťována hmotnost, množství biomasy žijících žížal a mortalita žížal. Mortalita se ověřuje reakcí žížaly na mechanickou stimulaci. Je-li odezva negativní, žížala se považuje za mrtvou. Na základě mortality žížal v každé koncentraci lze stanovit hodnotu LC50. Test je platný, pokud je mortalita jedinců v kontrole pod 10 % a úbytek hmotnosti žížal pod 20 % [17, 26].

2.5.3 Test únikového chování ISO 17512-1

Jde o screeningový test, kterým se dokáže poměrně rychle určit biologický vliv toxikantů na testovací organismus. Test může být designově rozdílný, lze ho navrhnout dvoukomorově

nebo i vícekomorově, Je rovněž vhodný, k testování chemických látek a různých pevných matric, se kterými je zamýšlena aplikace do terestrických ekosystémů: kaly, jíly, VEP aj.

Na jednu polovinu testovací nádoby oddělené přepážkou se připraví 250 g testované matrice a na druhou 250 g umělé půdy (kontrolní). Udržuje se hodnota pH a WHC ve stanoveném rozmezí pro testy na žížalách, viz bod 2.5.2. Poté se přepážka vyjme a na tuto dělicí linii se vloží ve stejném čase vždy 10 jedinců. Následně jsou nádoby zakryty víky s provzdušňovacími otvory. Nutné je dodržet stálý světelný a teplotní režim.

Po 48 hodinách se přepážka vrátí do každé nádoby, aby se zamezilo další migraci testovacích jedinců, a v každé části se určí počet organismů. Je-li žížala na pomezí, tak je směrodatné kde má přední část těla. Pro výpočet míry únikovosti platí vzorec (8) [31]:

$$A = \frac{N_0 - N_x}{N_0} \cdot 100 \quad (8)$$

A odpovídá míře únikovosti organismů [%]

N_0 odpovídá předpokládanému počtu jedinců v kontrole

N_x odpovídá počtu jedinců nalezených v kontaminované půdě

Předpokládaný počet jedinců znamená homogenní distribuci organismů mezi kontrolní půdou a testovanou matricí.

2.6 Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126

Salát setý (*Lactuca sativa*) je listová zelenina, jednoletá i dvouletá rostlina, kterou tvoří tmavě zelené listy. Tvoří hlávkové růžice s rovnými či kadeřavými listy. Taxonomicky patří do taxonů: říše rostliny (*Plantae*), podříše cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třídy vyšší dvouděložné (*Rosopsida*), řádu hvězdicotvaré (*Asterales*), čeledi hvězdicovité (*Asteraceae*) a rodu *Lactuca* [22].

• Provedení testu

Podstatou testu je měření délky kořenů salátu setého po 120 ± 2 hodinové inkubaci. Ekotoxicita se stanovuje prostřednictvím vypočtené hodnoty EC50 jestliže byla použita koncentrační řada testované matrice, případně se statisticky hodnotí rozdíly mezi délkou kořínků rostlin, které byly v kontaktu s testovanou matricí a rostlin, které se nacházely pouze v prostředí umělé půdy. Vodní kapacita půdy (WHC) je udržována v rozmezí 70 ± 5 %. Nejprve jsou semena salátu rozložena na připravené Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem a vloženy do inkubátoru, kde se nechají klíčit po dobu 24 – 36 hodin. Teprve po vyklíčení semen na délku kořene max. 2 mm, je možné tyto semena použít do testu. Test probíhá v temnu při teplotě 24 ± 2 °C. Po 120 ± 2 hodinách se měří délky všech kořínků s přesností na 1 mm.

Výsledná hodnota EC50 se stanoví postupem uvedeným v bodě 2.3.2 výše. Dále se pro hodnocení statistické významnosti výsledků používá Dunnettův t-test, příklad výpočtu tohoto testu je uveden v Příloze 3 [32, 33].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Má bakalářská práce navazuje na diplomovou práci Zuzany Jozífkové: Využití kontaktních testů fytotoxicity při hodnocení vedlejších energetických produktů, kdy byly vodné výluhy vedlejších energetických produktů testovány prostřednictvím testu na semenech *Sinapis alba* dle, vyhlášky č. 376/2001 Sb., dále Podle stejné metodiky byly provedeny testy se semeny dalších rostlin: salát setý (*Lactuca sativa*), oves setý (*Avena sativa*), řepka olejka (*Brassica napus*), řepák olejný (*Brassica rapa*). Pro porovnání vhodnosti testování materiálů na podkladě jejich vodných výluhů a v kontaktním uspořádání, byly využity i kontaktní testy, a to chronické na rostlinách *Avena sativa* a *Brassica napus*.

Vzhledem k tomu, že práce Jozífkové prokázala ekotoxicitu VEP, oproti výsledkům práce studentky Ballnerové, která tyto produkty hodnotila pouze na podkladě výluhu, bylo přistoupeno k dalšímu komplexnějšímu testování daných produktů prostřednictvím testů, které byly postupem času v laboratoři ekotoxikologie zavedeny, a to testy na žížalách (akutní test toxicity), test na semenech *Lactuca sativa* a bioluminiscenční test na bakteriích *Vibrio fischeri*. Předmětem mého testování bylo 7 vybraných VEP, které jsou uvedeny v Tabulce 3:

Tabulka 3: Seznam testovaných VEP, jejich vznik a označení

Palivo	Typ kotle	Produkt	Označení
černé uhlí, biomasa	práškový granulační kotel	úletový popílek	B1
hnědé uhlí, biomasa	práškový granulační kotel	škvára	C1
		úletový popílek	C2
		produkt z odsíření	C3
černé uhlí, hnědé uhlí, biomasa	fluidní atmosférický kotel	ložový popel	D1
		úletový popílek	D2
sláma	nízkotlaký roštový kotel	úletový popílek	E1

3.1 Příprava vodných výluhů

Vodné výluhy odpadů byly připraveny podle postupu uvedeném v bodě 2.3. Na základě stanoveného podílu sušiny *DR* byly vypočteny potřebné navážky hmotnosti analytického vzorku a množství přidané vody, viz Tabulka 4. Dále byly zjištěny základní parametry vodných výluhů, a to pH a měrná elektrická vodivost, viz Tabulka 5.

Tabulka 4: Vypočtené hodnoty pro přípravu 1 l vodného výluhu [34]

VEP	DR [%]	M anal. vz. [g]	LA voda [ml]
B1	99,91	100,09	999,91
C1	63,54	157,38	942,62
C2	99,92	100,08	999,92
C3	98,89	101,12	998,88
D1	99,71	100,30	999,70
D2	99,91	100,09	999,91
E1	98,54	101,48	998,52

Tabulka 5: Hodnoty pH a vodivosti pro vodné výluhy odpadů

VEP	pH	σ [mS·cm ⁻¹] při 20 °C
B1	11,80	2,640
C1	10,13	1,290
C2	10,80	0,697
C3	11,73	9,790
D1	11,96	10,940
D2	11,77	9,880
E1	11,13	6,650



Obrázek 3: Vzorokly na rotační třepače

3.2 Příprava umělé půdy

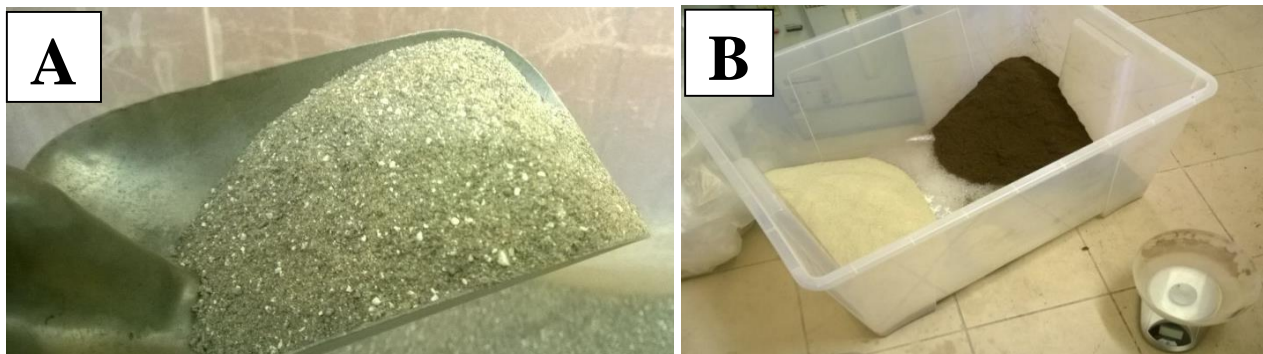
Podle postupu v bodě 2.4 byla připravena umělá půda pro testy v kontaktním uspořádání tj. pro testy na žížalách (únikový, akutní) a pro test na semenech *L. sativa*.

Celkem bylo připraveno 42 kg půdy postupem, který zaručil metodikou daný poměr rašeliny, písku a kaolinu 1:7:2. Nejprve byl proset křemičitý písek, který byl ponechán 3 dny předem vysušit na vzduchu, přes síto s velikostí ok 0,05 mm tak, aby nadsítný podíl výsledné

váhy písku tvořil 75 %. Nadsítný podíl byl proset přes síto s velikostí ok 0,2 mm a tento podíl tvořil 25 % z celkové hmotnosti naváženého písku, což bylo 29,4 kg.

Rovněž 3 dny předem byla ponechána vysušit rašelina v množství 4,2 kg a následně proseta přes síto s velikostí ok 2 mm.

Posledním podílem bylo 8,4 kg suchého kaolinu. Směs byla důkladně promíchána a posléze bylo přidáno 66 kg CaCO_3 k úpravě hodnot pH v rozmezí hodnot $6 \pm 0,5$.



Obrázek 4: A – Vzorek umělé půdy, B – Příprava umělé půdy

Pro účely bakalářské práce byly následně vytvořeny koncentrační řady testovaných materiálů a to 5, 10 a 50 % koncentrace každé testované matrice v umělé půdě. Pro každou testovanou koncentraci daného VEP bylo stanoveno pH a WHC_{max} podle postupů uvedených v bodě 2.4. Zjištěné hodnoty pH jsou uvedeny v Tabulce 6.

Hodnota WHC_{max} byla rovněž stanovena pro každou testovanou matrici. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 6: Hodnoty pH pro půdy s 5, 10 a 50% obsahem odpadu

VEP	Koncentrace [%]	pH
B1	5	6,50
	10	7,10
	50	9,38
C1	5	7,22
	10	7,12
	50	8,91
C2	5	6,92
	10	6,96
	50	7,47
C3	5	6,30
	10	7,00
	50	9,00
D1	5	6,15
	10	7,01
	50	9,48
D2	5	6,85
	10	6,79
	50	8,72
E1	5	7,01
	10	8,50
	50	9,43

Tabulka 7: Hodnoty WHC_{max} pro půdy s 5, 10 a 50% obsahem odpadu

VEP	Koncentrace [%]	WHC_{max} [g/100 g]
B1	5	41
	10	45
	50	47
C1	5	48
	10	55
	50	65
C2	5	26
	10	32
	50	43
C3	5	47
	10	42
	50	82
D1	5	37
	10	33
	50	22
D2	5	44
	10	23
	50	10
E1	5	51
	10	48
	50	43

3.3 Testy na organismu *Eisenia fetida*

3.3.1 Test se standardní látkou

Pro test akutní toxicity žížal dle normy OECD 207 se jako standardní látka používá 2-chloracetamid. Základní vlastnosti 2-chloracetamidu jsou uvedeny v Tabulce 8.

Pro tento test byla připravena 2 opakování pro následující koncentrační řadu. 1, 35, 70, 125 s $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Do každé nádoby bylo naváženo 500 g suché umělé půdy, do níž bylo přidáno příslušné množství 2-chloracetamidu s podílem vody na dosažení potřebné hodnoty WHC půdy.

Pro platnost testu je nutné, aby se hodnota LC50 pro tento standard pohybovala v rozmezí 20 – 80 mg·kg⁻¹ suché půdy [26].

Tabulka 8: Základní údaje o 2-chloracetamidu [35]

CAS číslo	79-07-2
Molekulová hmotnost	93,5 g·mol ⁻¹
Sumární vzorec	C ₂ H ₄ ClNO
Forma	Bílý krystalický prášek
Bod varu	220 °C
Bod tání	116 – 119 °C

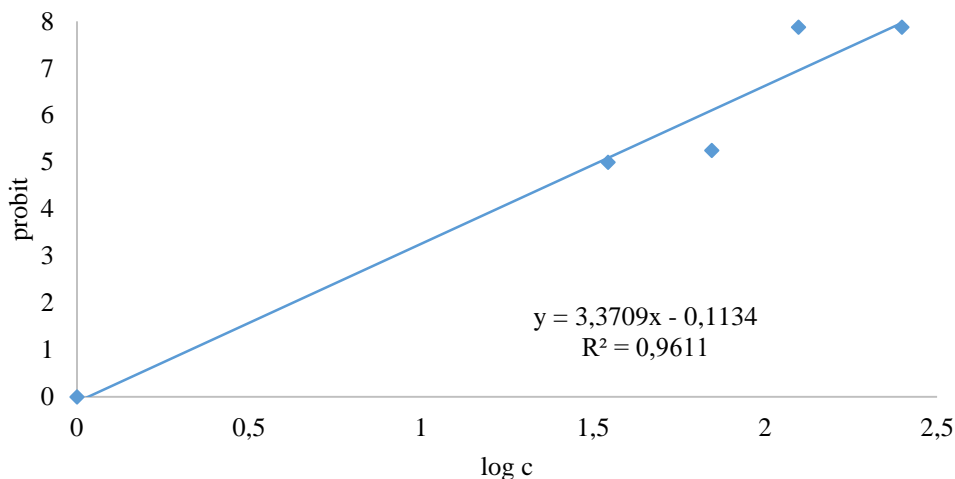


Obrázek 5: Vyhodnocování testu se standardní látkou

Hodnota LC50 byla vypočtena obdobným způsobem jako v bodě 2.3.2 u testu na cibuli. Na osu y byla vynesena úmrtnost žížal převedená na probity, na ose x koncentrace, která příslušnou mortalitu vyvolala. Z rovnice regresní přímky pak byla vypočtena LC50.

Tabulka 9: Hodnoty pro standardní test

koncentrace [mg·kg⁻¹]	log c [1]	probit
1	0	0
35	1,544 068	5
70	1,845 098	5,253
125	2,096 910	7,878
250	2,397 940	7,878

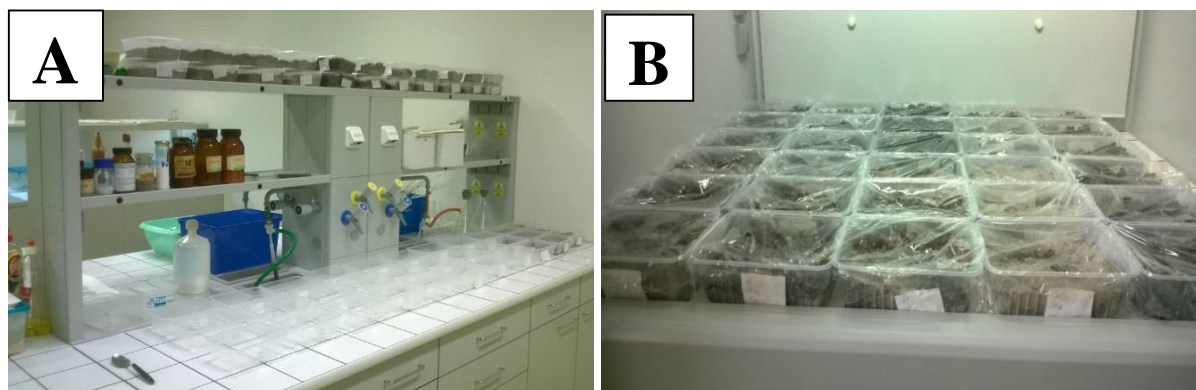


Obrázek 8: Závislost pro standardní test s 2-chloracetamidem

Pro standardní látku byla stanovena hodnota LC50 na $28,161 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, takto byla ověřena validita výsledků testu, neboť jak je uvedeno výše, test je platný v případě, že hodnota LC50 se pohybuje v rozmezí $20 - 80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.3.2 Test akutní toxicity OECD 207

Do testovacích nádob byly připraveny směsi umělé půdy a testovaného VEP v koncentraci 50, 10 a 5 % testovaného VEP dle pokynů v bodě 2.5.2. Do každé testovací nádoby bylo dáno 10 organismů ve váhovém rozmezí 300 – 600 mg. Dle metodiky byla upravena hodnota WHC na 40 % a pH 6,0 viz bod 2.4. Test byl proveden ve 3 opakováních pro každou koncentraci testovaného VEP. Po inkubaci byla určena úmrtnost testovaných organismů a bylo-li to možné vypočtena i hodnota LC50.



Obrázek 9: A – Příprava testovacích nádob pro test, B – Nasazený test akutní toxicity se žížalami

3.3.3 Test únikového chování ISO 17512-1

Tento test byl proveden podle postupu uvedeném v bodě 2.5.3. Polovina testovacích nádob byla naplněna umělou půdou, druhá polovina směsí této půdy s testovanou maticí (stejná koncentrace jako v případě akutního testu). Rozdílem bylo provedení únikového testu pouze ve

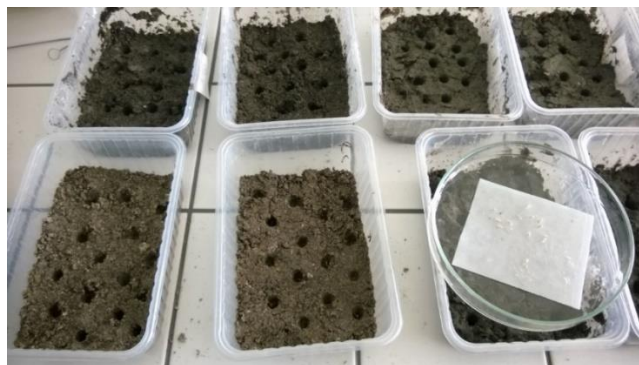
dvou opakováních. Na startovací linii bylo uloženo 10 jedinců o hmotnosti v rozmezí 300 - 600 mg. Hodnota pH a vodní kapacity (WHC) byla udržována ve správném rozmezí daném testem. Po uplynutí 48 hodin byla stanovena míra únikovosti organismů.



Obrázek 8: Kontrola hmotnosti vybraných žížal pro únikový test

3.3.4 Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126

Pro test byla připravena semena salátu setého podle postupu v bodě 2.6 v celkovém počtu 720. Testované matrice (stejně koncentrační řady jak u testu na žížalách, pouze dvě opakování pro každou koncentraci) byly předem upraveny na správnou hodnotu pH a WHC podle bodu 2.4. Do půd byly vytvořeny asi 1 cm hluboké jamky (15 na testovací nádobu), do nichž bylo poté vloženo naklíčené semínko s maximální délkou kořínku 2 mm. Po 120 hodinách byla semena opatrně vyjmuta, změřeny délky kořínků a vypočteno procento inhibice/stimulace růstu kořene a kde to bylo možné, byla vypočtena i hodnota EC50.



Obrázek 9: Vyhlobené jamky pro test se salátem

3.3.5 Bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri* ISO 11348-3

Z důvodu nedostatku bakterií *Vibrio fischeri* pro stanovení hodnot EC20 a EC50, pro všechny vzorky VEP, byla zvolena rychlá screeningová metoda, pro zjištění inhibice záření testovaného vzorku oproti kontrolnímu, viz bod 2.3.1. Pro tento screening bylo připraveno 8 kyvet; do první kyvety bylo přidáno 500 μ l suspenze bakterií a 500 μ l 2% roztoku NaCl

(kontrola). Další kyvety obsahovaly 500 μ l každého testovaného výluhu VEP obohaceného NaCl a 500 μ l suspenze bakterií. V měřícím modu přístroje pro screening byl naměřen rozdíl inhibice bioluminiscence oproti kontrole v procentech.



Obrázek 10: LUMISTox 300 s termoblokem LUMIStherm [38]

3.3.6 Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské ISO 11269-1

Test byl proveden s celkem 132 cibulkami, vždy po 6ti cibulkách bylo dáno na hrdlo zkumavky naplněné testovaným vodným výluhem VEP. Vodné výluhy testovaných VEP byly připraveny dle bodu 2.3 a následně naředěny na 50%, 10% a 5% koncentraci kohoutkovou vodou. V průběhu testu byly roztoky průběžně doplňovány a kontrolován stav cibulek nasazených v testu. Po 168 hodinách byla stanovena inhibice či stimulace růstu kořene a určen hmotnostní rozdíl biomasy kořene oproti kontrole. Kde to bylo možné, byla vypočtena i hodnota IC50.



Obrázek 11: Design testu s A. cepa

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V mé bakalářské práci byly testovány vedlejší energetické produkty - VEP, viz Tabulka 3, prostřednictvím pěti vybraných testů ekotoxicity, a to 3 testů terestrických a 2 testů akvatických. Šlo o akutní a únikový test toxicity na organismu *Eisenia fetida* v kontaktním uspořádání a test na *Lactuca sativa*. V případě akvatických testů byly užity bakterie *Vibrio fischeri* a *Allium cepa*, kdy terestrická rostlina byla využita v testu v akvatickém uspořádání. Předmětem bylo posouzení, zda jsou testované VEP ekotoxické. Dále také porovnání citlivosti testovacích organismů a rovněž posouzení vhodnosti vybraných testů pro testování materiálů typu VEP.

4.1 Test akutní toxicity OECD 207

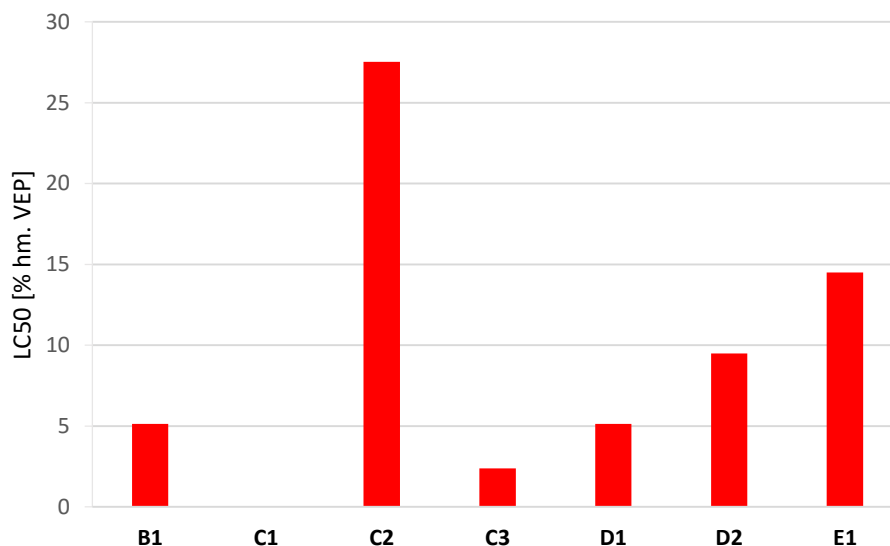
Z výsledků testu akutní toxicity pro jednotlivé VEP vyplývá, že směs umělé půdy a škváry (C1) není pro testovací organismy toxická v žádné testované koncentraci. Mortalita odpovídá přirozené úmrtnosti, která je tolerována pro organismy v kontrolní skupině. Takto nebylo možné stanovit hodnotu LC50. U dalších VEP bylo už možné tuto hodnotu stanovit, viz Tabulka 11 a Obrázek 12. Z uvedených výsledků je patrné, že v tomto terestrickém testu se jako nejtoxičtější VEP jevil produkt z odsíření (C3) s hodnotou LC50 = 2,38 % hm. vznikající spalováním hnědého uhlí. Dále úletový popílek (B1) a ložový popel (D1) vykazují také poměrně negativní účinek, pro tyto dva VEP byla vypočtena stejná hodnota LC50 5,13 % hm. S odstupem následují další testované produkty v rozmezí 9,50 – 27,53 %.

Tabulka 10: Úmrtnost žížal v testu akutní toxicity

	Úmrtnost [%]											
	Koncentrace testovaného VEP v umělé půdě											
	50 %				10 %				5 %			
	1. op.	2. op.	3. op.	Průměrná mortalita	1. op.	2. op.	3. op.	Průměrná mortalita	1. op.	2. op.	3. op.	Průměrná mortalita
B1	100	100	70	90	0	0	10	3,33	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	10	10	0	6,67	0	0	10	3,33
C2	70	50	80	66,67	0	20	40	20	10	40	0	16,67
C3	100	100	100	100	100	70	100	90	10	10	120	13,33
D1	100	100	100	100	100	90	90	93,33	100	0	0	33,33
D2	100	100	100	100	100	60	90	83,33	0	40	0	13,33
E1	100	100	100	100	20	20	0	13,33	10	10	0	6,67

Tabulka 11: Hodnoty LC50 v testu akutní toxicity

VEP	LC50 [% hm. VEP]
B1	5,13
C2	27,53
C3	2,38
D1	5,13
D2	9,50
E1	14,50



Obrázek 12: Grafické znázornění výsledků pro test akutní toxicity

4.2 Test únikového chování ISO 17512-1

Výsledky tohoto testu více méně korespondují s testem akutní toxicity. Dále bylo zaznamenáno, že testovací organismy, žížaly hnojní (*Eisenia fetida*), ve velké většině případů unikaly z testované matrice odpadu, kdy s klesající koncentrací VEP v umělé půdě, klesala priorita úniku do kontrolní půdy. Jedinou výjimkou byl úletový popílek (C2) a úletový popílek (E1), kde organismy preferovaly zůstat v testované matrici. Jak je vidět v Tabulce 12, Tabulce 13 a na Obrázku 13, tak nejvyšší únikovosti byly zaznamenány u produktu z odsíření (C3) a u úletového popílku (D2), kde se pohybovaly v rozmezí 60 – 100 %. V obou případech jde převážně o produkty spalování hnědého uhlí. Protipólem jsou úletové popílky (E1) a (B1) s mírami únikovosti ve spíše záporných hodnotách, což značí, že organismus preferoval zůstat v testované matrici. Zde šlo o produkty spalování slámy a černého uhlí.

Tabulka 12: Počty jedinců v jednotlivých půdách únikového testu žízal

-	50%				10%				5%			
-	Testovaná matrice								Artificiální půda			
-	1. op.		2. op.		1. op.		2. op.		1. op.		2. op.	
B1	3	7	3	7	2	8	2	8	8	2	10	0
C1	2	8	2	8	1	9	3	7	3	7	0	10
C2	3	7	1	9	7	3	2	8	3	7	5	5
C3	0	10	0	10	2	8	1	9	0	10	2	8
D1	2	8	2	8	3	7	2	8	1	9	2	8
D2	1	9	0	10	1	9	1	9	2	8	1	9
E1	4	6	6	4	7	3	6	4	3	7	3	7

Tabulka 13: Míra únikovosti testovaných organismů v únikovém testu

-	50%		10%		5%	
-	1. op.	2. op.	1. op.	2. op.	1. op.	2. op.
B1	40	40	60	60	-60	-100
C1	60	60	80	40	40	100
C2	40	80	-40	60	40	0
C3	100	100	60	80	100	60
D1	60	60	40	60	80	60
D2	80	100	80	80	60	80
E1	20	-20	-40	-20	40	40

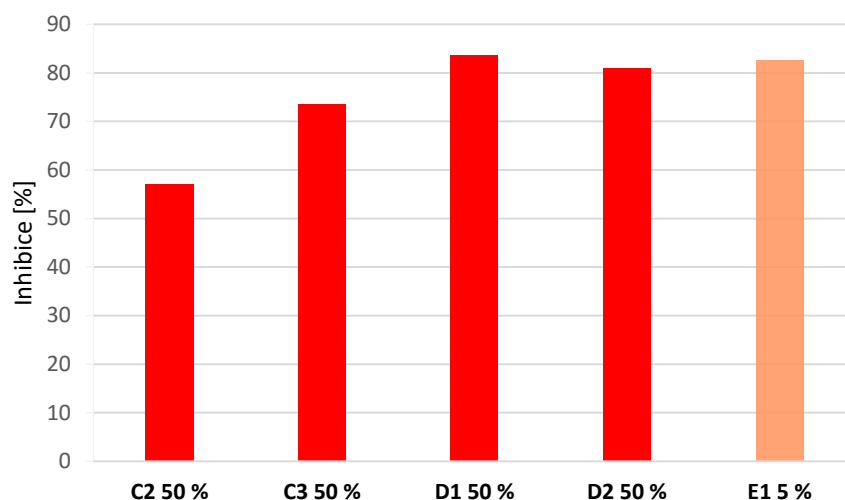
4.3 Test inhibice růstu kořene salátu setého ISO 17126

Výsledky testu poukazují na tu skutečnost, že ve většině případů, kdy byly testovány 5 a 10% koncentrace VEP, byl růst kořene salátu stimulován. Tudíž nebylo možné určit hodnotu IC50. Pouze v případech 50% koncentrace VEP úletového popílku (C2), produktu z odsíření (C3), ložového popela (D1) a úletového popílku (D2) byla prokázána inhibice růstu kořene salátu. Výjimku představoval úletový popílek (E1). V tomto případě, docházelo k inhibici růstu kořene salátu oproti kontrole pouze při testované koncentraci 5 %, viz Tabulka 14 a Obrázek 13. Z důvodu nedostatku testovaného vzorku nemohlo být toto testování již opakováno a výsledek potvrzen. Vzhledem k tomu, že prostřednictvím ostatních testů tato matrice patřila spíše do skupiny vzorků s nižším negativním efektem na testovací organismy, je možné, že inhibice byla způsobena jinými faktory, než vlastní ekotoxicitou vzorku, např. nedostatkem živin obsažených právě v testovaném 5% VEP. Výsledky testů s VEP v těch koncentracích, které vykazovaly inhibici, byly dále podloženy tzv. Dunnettovým t-testem, kdy byla určena statistická významnost odlišnosti zjištěných délek kořínků rostlin ve směsích s VEP oproti kontrole a takto vyvrácena variabilitu růstu rostliny. Statisticky významné

rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly potvrzeny u všech zmíněných VEP, viz Tabulka 15. Zjištěné efekty VEP vyjádřené v podobě procentuální inhibice růstu kořene korespondují s již zjištěnými efekty v testu se žížalami jen s tím rozdílem, že u úletového popílku (E1) s rostoucí koncentrací inhibice růstu klesá.

Tabulka 14: Výsledky testu inhibice růstu kořene salátu setého

VEP	c [%]	Průměrná délka kořene [mm]	Inhibice růstu [%]	Stimulace x Inhibice
Kontrola	0	12,27	-	-
B1	50	29,93	-144,02	Stimulace
	10	14,17	-15,49	Stimulace
	5	23,37	-90,49	Stimulace
C1	50	19,73	-60,87	Stimulace
	10	24,13	-96,74	Stimulace
	5	29,67	-141,85	Stimulace
C2	50	5,27	57,07	Inhibice
	10	24,03	-95,92	Stimulace
	5	27,93	-127,72	Stimulace
C3	50	3,23	73,64	Inhibice
	10	20,50	-67,12	Stimulace
	5	21,73	-77,17	Stimulace
D1	50	2,00	83,70	Inhibice
	10	20,00	-63,04	Stimulace
	5	22,73	-85,33	Stimulace
D2	50	2,33	80,98	Inhibice
	10	19,77	-61,14	Stimulace
	5	21,80	-77,72	Stimulace
E1	50	20,77	-69,29	Stimulace
	10	20,87	-70,11	Stimulace
	5	2,13	82,61	Inhibice



Obrázek 13: Porovnání míry inhibice testovaných VEP, u kterých byla prokázána inhibice růstu salátu

Tabulka 15: Statistické údaje dle Dunnettova t-testu pro test se salátem

VEP	c [%]	Průměrná délka kořene [mm]	Významný rozdíl SD [mm]	Významná odlišnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$
Kontrola	0	12,27	-	-
C2	50	5,27	0,71	ANO
C3	50	3,23	1,44	ANO
D1	50	2,00	0,46	ANO
D2	50	2,33	0,38	ANO
E1	5	2,13	0,47	ANO

4.4 Bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri* ISO 11348-3

Z důvodu nedostatku bakterií pro měření inhibice luminiscence koncentrační řady testovaného výluhu zmíněném v bodě 2.3.1, bylo zvoleno rychlé screeningové měření, kdy luminometr v tomto módu vyhodnotil přímo inhibici luminiscence po 15 a 30 minutách oproti kontrolnímu vzorku. Výsledné hodnoty inhibice jsou uvedeny v Tabulka 16. Z výsledků je patrné, že úletový popílek (C2), ložový popel (D1) a úletový popílek (E1) způsobovaly nejvyšší inhibici emise záření, viz Obrázek 14. Tyto výsledky (vyjma výsledků pro úletový popílek E1) opět korespondují s výsledky testů využitých v mé práci. Úletový popílek (C2) v případě tohoto testu vykazoval nejvyšší inhibici a takto i ekotoxicitu, na rozdíl od ostatních testů, kde získané výsledky inhibice popř. letality a míry únikovosti řadily úletový popílek mezi VEP s nižšími negativními účinky.

Stanovené a vypočtené parametry 7,5% standardního roztoku NaCl (kontroly) jsou uvedeny v Tabulce 17. Platnost testu byla potvrzena tím, že inhibice luminiscence kontrolního

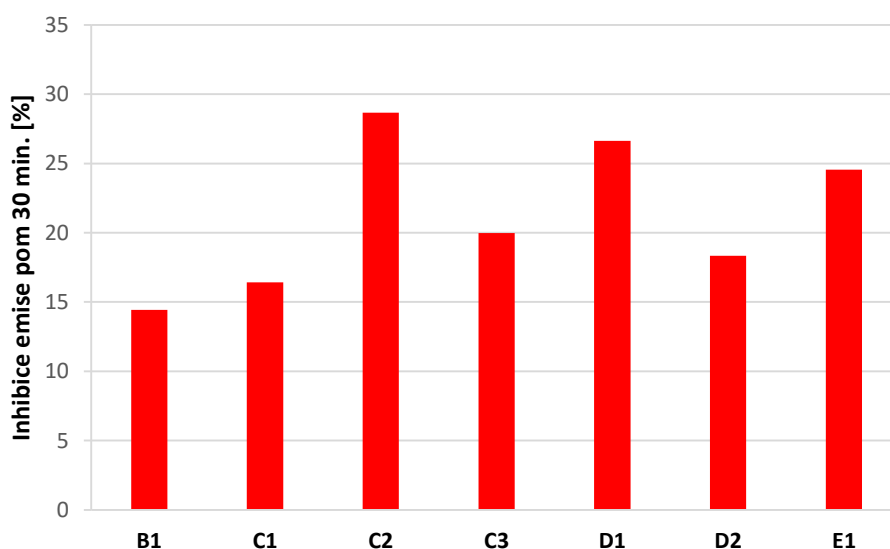
vzorku byla po 15ti minutách 44,98 % a po 30ti minutách 44,80 %. Takto byla splněna podmínka rozmezí hodnot inhibice mezi 40 – 60 %. Další splněnou podmínkou validity testu byly hodnoty korekčních faktorů pro expozici f_{kt} , které se pohybovaly v rozmezí 0,6 – 1,8, a to $\overline{f_{k15}} = 0,862$ a $\overline{f_{k30}} = 0,862$. Nakonec paralelní stanovení kontroly se od svých průměrů nelišily o více než 3 % - odch. $\overline{f_{k15}} = \pm 0,806$ a odch. $\overline{f_{k30}} = \pm 0,296$.

Tabulka 16: Výsledné hodnoty inhibice bioluminiscence bakterií

VEP	Inhibice emise, 15 min. [%]	Inhibice emise, 30 min [%]
B1	9,66	14,43
C1	12,97	16,41
C2	26,86	28,67
C3	16,07	19,98
D1	22,77	26,63
D2	15,76	18,33
E1	20,90	24,54

Tabulka 17: Měření intenzity emise bakterií pro 7,5 % roztok standardu NaCl

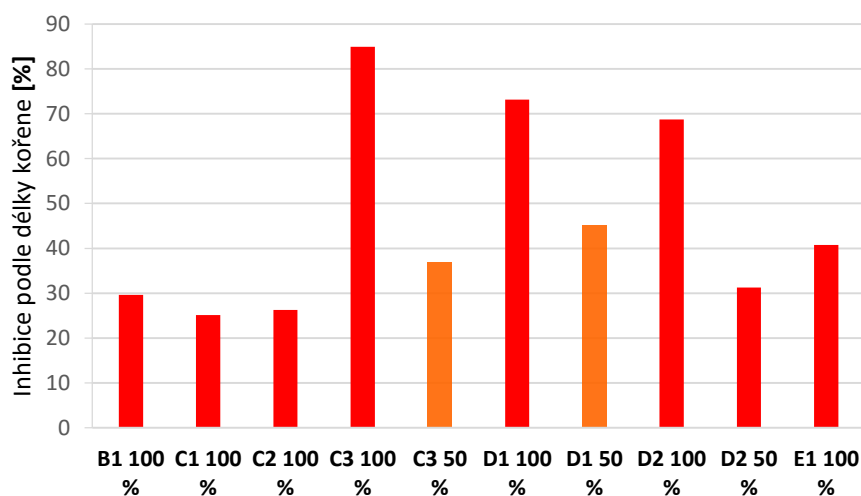
Pozice vzorku	I_0 [rel. jedn. lum.]	I_{15} [rel. jedn. lum.]	I_{30} [rel. jedn. lum.]	f_{k15} [1]	$\overline{f_{k15}}$	f_{k30} [1]	$\overline{f_{k30}}$	Platnost zkoušky (odchylka od průměru v %)	
								odch. $\overline{f_{k15}}$	odch. $\overline{f_{k30}}$
1B	755,9	657,2	635,4	0,869	0,862	0,841	0,8435	±0,806	±0,296
1C	554,8	474,5	469,3	0,855		0,846			



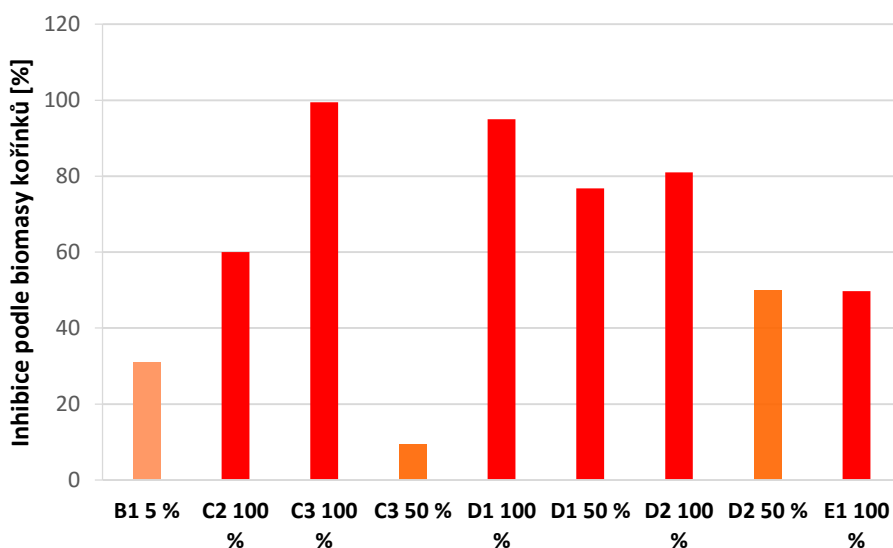
Obrázek 14: Výsledné inhibice bioluminiscence bakterií

4.5 Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské ISO 11269-1

Inhibice růstu kořene byly stanoveny na základě měření jeho délky a podle hmotnosti biomasy kořínků u všech vzorků vodných výluhů VEP, viz Tabulka 18. Hodnoty IC50 nebylo možné stanovit, protože v mnohých případech daných koncentracích VEP, docházelo ke stimulaci. Nejčastěji docházelo k inhibici růstu kořene ve výluhu o koncentracích 100 % a 50 %. Ne vždy docházelo ke shodě výsledků při hodnocení inhibice růstu podle růstu kořene a biomasy. U úletového popílku (B1) a škváry (C1) jsou rozdíly, které lze vidět na Obrázku 15 a Obrázku 16, kde jsou výše jmenované inhibice růstu vyjádřené v % a znázorněny graficky. Opět u vzorků VEP produktu z odsíření (C3), ložového popela (D1) a úletového popílku (D2) lze vidět vysoké hodnoty inhibice a takto výsledné efekty prokázané tímto testem korespondují s výsledky předchozích testů.



Obrázek 15: Inhibice růstu kořene dle jeho délky v testu s cibulí



Obrázek 16: Inhibice růstu kořene dle biomasy v testu s cibulí

Tabulka 18: Výsledné inhibice růstu pro test s cibulí

VEP	c [%]	Průměrná délka kořene [mm]	Inhibice růstu [%]	Rozdíl v hmotnosti biomasy [g]	Inhibice růstu dle biomasy [%]
Kontrola	0	29,83	-	0,915	-
B1	100	21,00	29,61	1,009	-10,27
	50	32,50	-8,94	1,818	-98,69
	5	36,5	-22,35	0,633	30,82
C1	100	22,33	25,14	1,435	-56,83
	50	38,17	-27,93	1,38	-50,82
	5	35,00	-17,32	0,992	-8,42
C2	100	22,00	26,26	0,366	60,00
	50	36,17	-21,23	1,866	-103,93
	5	31,00	-3,91	1,63	-78,14
C3	100	4,50	84,92	0,005	99,45
	50	18,83	36,87	0,829	9,40
	5	40,00	-34,08	1,421	-55,30
D1	100	8,00	73,18	0,046	94,97
	50	16,33	45,25	0,212	76,83
	5	41,00	-37,43	1,193	-30,38
D2	100	9,33	68,72	0,174	80,98
	50	20,50	31,28	0,458	49,95
	5	41,67	-39,66	1,288	-40,77
E1	100	17,67	40,78	0,46	49,73
	50	38,17	-27,93	1,516	-65,68
	5	44,33	-48,60	1,477	-61,42

5 ZÁVĚR

Záměrem práce bylo získání dalších informací o případné ekotoxicitě VEP na podkladě rozšířené baterie ekotoxikologických testů. Jednalo se o využití terestrických/kontaktních testů vedle testů akvatických pracujících s vodnými výluhy testovaných matric tak, aby celá baterie testů podávala komplexnější informace o testovaném materiálu. V mé bakalářské práci byly provedeny testy v kontaktním uspořádání s následujícími organismy: *Eisenia fetida*, *Lactuca sativa* a testy v akvatickém uspořádání na *Vibrio fischeri* a *Allium cepa*.

Na podkladě požadavků nové vyhlášky týkající se hodnocení ekotoxicity odpadů z výsledků testu na *V. fischeri* lze za toxické považovat tyto VEP: úletový popílek (C2), ložový popel (D1) a úletový popílek (E1). Testy s vodným výluhem těchto VEP vykazovaly inhibici luminiscence vyšší než 20 % oproti kontrole.

Dále lze z výsledků kontaktních testů usuzovat, že VEP produkt z odsíření (C3), ložový popel (D1) a úletový popílek (D2) vykazují velkou míru toxicity ve všech testech. Úletový popílek (E1) nelze hodnotit jednoznačně; v kontaktních testech (test únikového chování) vykazoval mírně odlišné efekty od testů akvatických (test na *A. cepa*), kdy v únikovém testu nezpůsobil vysokou únikovost organismů, zatímco v testu na *A. cepa* působil ve vyšší koncentraci výluhu inhibičně. Na druhou stranu úletový popílek (B1), škvára (C1) a úletový popílek (C2) působily ve většině případů stimulačně. Jen ve vyšších koncentracích vykazovaly negativní efekt na testovací organismy.

Prostřednictvím akvatických testů bylo potvrzeno, že negativní efekt na testovací organismy vykazují všechny neřaděné výluhy VEP, přičemž za VEP s vlastností H-14 lze označit pouze C2, D1 a E1.

Jako nejcitlivější organismus se projevil bakterie, *Vibrio fischeri*. Další organismus s dobrou odezvou v testech byly žížaly *Eisenia fetida*. Tento test však pro pracnost provedení není v povinné baterii testů pro posuzování ekotoxicity vyžadován.

Z výsledků je patrné, že pro plnohodnotné testování jakýkoliv matric (odpadů), které mají být využity v terestrickém prostředí, je důležité, aby byly testovány nejen v akvatickém ale i terestrickém uspořádání. Tímto se lze vyvarovat chyb při posuzování ekotoxicity odpadů. Prostřednictvím akvatických testů může být ekotoxicita podhodnocena, nemusí být odhaleny efekty hydrofóbních látek, které do výluhu nepřecházejí a tím pádem nemohou interagovat s testovacím organismem. Naopak u terestrických testů se používá umělá půda, která je sice považována za ekologicky nerelevantní, ale je standardizovaná a do jisté míry dokáže napodobit životní prostředí testovacích organismů. Prostřednictvím do ní zakomponovaných testovaných materiálů je možné testovat různorodé směsi a získat tak co nejpřesnější obraz o tom, zda testovaná matrice je ekotoxická či ne, zda má nepříznivé účinky na přítomné organismy.

Dále také pro komplexní testování je vhodné použít dlouhodobější testy. U testů akutních nemusí dojít v kratším časovém úseku k odhalení všech případných toxických efektů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vedlejší energetické produkty. *Vodní a tepelné elektrárny* [online]. [cit. 2015-12-16]. Dostupné z: <http://www.vodni-tepelne-elektrarny.cz/vedlejsi-energeticke-produkty.htm>
- [2] ŠMILAUER, V., O. ZOBAL, Z. BITTNAR, R. HELA, R. SNOP a P. DONÁT. Využití úletových popílků pro betonáž masivních konstrukcí. *Beton: Technologie, konstrukce, sanace* [online]. 2014, **14**(2), 60-65 [cit. 2016-05-12]. ISSN 1213-3116. Dostupné z: http://www.betontks.cz/sites/default/files/BETON_TKS_2014-02.pdf
- [3] TSIRIDIS, V., M. PETALA, P. SAMARAS, A. KUNGOLOS a G.P. SAKELLAROPOULOS. Environmental hazard assessment of coal fly ashes using leaching and ecotoxicity tests: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2012, **84**, 212-220 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.07.011. ISSN 01476513. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651312002345>
- [4] Odpadové fórum 4/2005. In: *Odpadové fórum: Odborný měsíčník o odpadech a druhotných surovinách* [online]. 2005 [cit. 2015-12-31]. Dostupné z: <http://www.odpadoveforum.cz/upload/pageFiles/4-2005-pdf.pdf>
- [5] KOČÍ, V. a K. MOCO VÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2009, 199 s. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [6] BAŠTA, J. Topenářská příručka: 120 let topenářství v Čechách a na Moravě. 1. vyd. Praha: GAS, 2001. ISBN 80-861-7682-7.
- [7] Kovosta.cz. *Fluidní kotle* [online]. Kovosta-fluid, a.s., 2016 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://www.kovosta.cz/fluidni-kotle.html>
- [8] KIZLINK, J. *Odpady: sběr, zpracování, využití, zneškodnění, legislativa*. 3., upr. a rozš. vyd., V Akademickém nakl. CERM 1. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2014. ISBN 978-80-7204-884-7.
- [9] FARGAŠOVÁ, A. *Ekotoxikologické biotesty*. 1. vyd. Bratislava: Perfekt, 2009. 317 s. ISBN 978-80-8046-422-6.
- [10] HALOUSKOVÁ, O., V. KOČÍ a B. MARŠÁLEK. *Ekotoxikologické biotesty: sborník pracovní konference*. Praha: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, ISBN 80-903-2030-9.
- [11] BALOG, K., ZAPLETALOVÁ - BARTLOVÁ, I. *Základy toxikologie*. 1. vyd.: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě, 1998. 107 s. ISBN 80-86111-29-6.

[12] Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. In Sběrka zákonů, Česká republika. 2001.

[13] Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady. In Sběrka zákonů, Česká republika. 2001.

[14] Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady. In Sběrka zákonů, Česká republika. 2005.

[15] Ministerstvo životního prostředí České republiky. Metodický pokyn odboru odpadů k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. 2008.

[16] Ministerstvo životního prostředí České republiky. Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Únor 2007

[17] HOFMAN, Jakub. *Ekologické biotesty: Půdní biotesty* [online]. In: . s. 98 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/Bi5620/um/7676529/Pudni_biotesty.pdf?fakulta=1431%20;obdobi=4445;kod=Bi5620;lang=en

[18] HOFMAN, J., S. VOSÁHLOVÁ, D. SIROTKOVÁ, V. KOČÍ, V. MATĚJŮ a M. ZÁLESKÁ. Ekotoxicita odpadů stanovená akvatickými a terestrickými zkouškami podle navržených metodických pokynů MŽP k hodnocení ekotoxicity odpadů [online]. In: . s. 31 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/14_vosahlova.pdf

[19] Český normalizační institut. ČSN EN 12457- 4 Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním). Srpen 2003.

[20] ČSN ISO 11465:1993 *Kvalita půdy - Stanovení hmotnostního podílu sušiny a hmotnostní vlhkosti půdy - Gravimetrická metoda*. [online] 1998. cit. [2016-01-01] Dostupné z: <https://vufind.mzk.cz/Record/MZK04-000024997>

[21] KAFKA, Z. a J. PUNČOCHOVÁ. Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 199n. l., **93**(10) [cit. 2016-01-01]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_10_604-606.pdf

[22] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.

[23] POMMERESCHE, Reidun. *Žížaly a jejich význam pro zlepšování kvality půdy*. Olomouc: Bioinstitut, 2010. ISBN 978-80-87371-02-2.

[24] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Část C.

[25] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 286/2011 ze dne 10. března 2011, kterým se pro účely přizpůsobení vědeckotechnickému pokroku mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí.

[26] OECD TG 207. Earthworm, Acute Toxicity Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006, 21 stran, Dostupný na WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/18/1/1948293.pdf> >.

[27] ISO 11348-3:2007 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO International Standards for Business, Government and Society, 2007. Dostupné také z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=40518

[28] FISKESJÓ, G. Allium test I: A 2–3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality*. 1993, 8(4), 461 - 470.

[29] ISO 11268-1:2012 *Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei**. ISO International Standards for Business, Government and Society, 2012. Dostupné také z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=53527

[30] ISO 11268-3:2014 *Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations*. ISO International Standards for Business, Government and Society, 2014. Dostupné také z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=5758

3

- [31] ISO 17512-1:2006 Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO International Standards for Business, Government and Society, 2008. Dostupné také z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=38402
- [32] ISO 17126:2005 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.). ISO International Standards for Business, Government and Society, 2005. Dostupné také z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=31214
- [33] *Stanovení inhibice růstu kořene Lactuca sativa L.* [online]. In: . VŠCHT v Praze: Laboratoř ekotoxikologie a LCA, Ústav chemie ochrany prostředí, s. 3 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/CZverze/13_Sal%E1t.pdf
- [34] JOZÍFKOVÁ, Zuzana. *Využití kontaktních testů fytotoxicity při hodnocení vedlejších energetických produktů.* Brno, 2011, 89s. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36909. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [35] *Bezpečnostní list, 2-chloracetamid* [online]. In: . s. 4 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <https://www.alfa.com/en/content/msds/czech/A15238.pdf>
- [36] BALLNÉROVÁ, Petra. *Ekotoxikologické testy a jejich aplikace k hodnocení vedlejších energetických produktů.* Brno. 2009. 116 s. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=15388. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [37] Dunnett Table: Number of Groups Including Control Group [cit. 2011-04-19]. Dostupné z :http://davidmlane.com/hyperstat/table_Dunnett.html.
- [38] *LUMIStox 300 s termoblokem LUMIStherm.* Dostupné také z: http://www.ung.si/media/storage/cms/images/2013/01/09/17/28/03/Lumistox_img_zoom.jpg

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

VEP	Vedlejší energetické produkty
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> - Registrace, evaluace, autorizace a omezování chemických látek
ČSN	Česká statní norma
ČSN EN	Harmonizovaná evropská norma
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> – Mezinárodní organizace pro normalizaci
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
WHC	<i>Water Holding Capacity</i> – vodní kapacita půdy [%]
WHC_{max}	<i>Maximum Water Holding Capacity</i> – maximální vodní kapacita půdy [%]
M_{VP}	motnost válce s nasycenou zemínou [g]
M_V	hmotnost válce [g]
EC50	efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů
IC50	inhibiční koncentrace, která způsobí 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolním vzorkem
LC50	letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovacích organismů
LD50	letální dávka, při které uhynie 50 % testovacích organismů
EC0	efektivní koncentrace, která nevyvolá žádnou interakci testovacího organismu
EC100	efektivní koncentrace, která vyvolá 100% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> – dávka, při které nebyl ještě pozorován škodlivý účinek
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i> – nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs	polychlorované bifenyly
DR	podíl sušiny ve vzorku [%]
M_D	hmotnost vysušeného vzorku [kg]
M_W	navážka vzorku odpadu [kg]
M	hmotnost vzorku odpadu [kg]
M_T	teoretická navážka sušiny vzorku [kg]
DR	podíl sušiny ve vzorku [%]
L_A	množství přidané vody [l]
M_T	teoretická navážka vzorku [kg]
DR	podíl sušiny ve vzorku [%]

ρ_{H_2O}	hustota vody ($1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
A	míra únikovosti organismů [%]
N_0	předpokládaný počet jedinců v kontrole
N_x	počet jedinců nalezených v kontaminované půdě
L	průměrná délka kořene [mm]
l_i	průměrná délka kořene v i-tém stanovení [mm]
l_k	průměrná délka kořene v k-tém stanovení [mm]
k	počet paralelních stanovení se stejnou střední hodnotou [mm]
I	inhibice nebo stimulace růstu kořene [%]
L_c	průměrná délka kořene v kontrole [mm]
L_v	průměrná délka kořene ve vzorku [mm]
f_{kt}	korekční faktor pro expozici po daném čase, 30 minut
I_{kt}	intenzita luminiscence kontrolního vzorku po expozici po daném čase, 30 minut [rel. jedn. lum.]
I_0	intenzita luminiscence kontrolní suspenze bezprostředně před přidáním vody k zředění [rel. jedn. lum.]

PŘÍLOHA 1 PROBITOVÁ TABULKA [36]

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10	3,718	30	4,476	50	5,000	70	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11	3,773	31	4,504	51	5,025	71	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12	3,825	32	4,532	52	5,05	72	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13	3,874	33	4,560	53	5,075	73	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14	3,92	34	4,588	54	5,100	74	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15	3,964	35	4,615	55	5,126	75	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16	4,006	36	4,642	56	5,151	76	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17	4,046	37	4,668	57	5,176	77	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18	4,085	38	4,695	58	5,202	78	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19	4,122	39	4,722	59	5,228	79	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20	4,158	40	4,747	60	5,253	80	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21	4,194	41	4,772	61	5,278	81	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22	4,228	42	4,798	62	5,305	82	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23	4,261	43	4,824	63	5,332	83	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24	4,294	44	4,849	64	5,358	84	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25	4,326	45	4,874	65	5,385	85	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26	4,357	46	4,900	66	5,412	86	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27	4,387	47	4,925	67	5,440	87	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28	4,417	48	4,950	68	5,468	88	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29	4,447	49	4,975	69	5,496	89	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

PŘÍLOHA 2 DUNNETTOVA TABULKA [37]

a	b	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	0.05	2.57	3.03	3.29	3.48	3.62	3.73	3.82	3.9	3.97
	0.01	4.03	4.63	4.98	5.22	5.41	5.56	5.69	5.8	5.89
6	0.05	2.45	2.86	3.1	3.26	3.39	3.49	3.57	3.64	3.71
	0.01	3.71	4.21	4.51	4.71	4.87	5	5.1	5.2	5.28
7	0.05	2.36	2.75	2.97	3.12	3.24	3.33	3.41	3.47	3.53
	0.01	3.5	3.95	4.21	4.39	4.53	4.64	4.74	4.82	4.89
8	0.05	2.31	2.67	2.88	3.02	3.13	3.22	3.29	3.35	3.41
	0.01	3.36	3.77	4	4.17	4.29	4.4	4.48	4.56	4.62
9	0.05	2.26	2.61	2.81	2.95	3.05	3.14	3.2	3.26	3.32
	0.01	3.25	3.63	3.85	4.01	4.12	4.22	4.3	4.37	4.43
10	0.05	2.23	2.57	2.76	2.89	2.99	3.07	3.14	3.19	3.24
	0.01	3.17	3.53	3.74	3.88	3.99	4.08	4.16	4.22	4.28
11	0.05	2.2	2.53	2.72	2.84	2.94	3.02	3.08	3.14	3.19
	0.01	3.11	3.45	3.65	3.79	3.89	3.98	4.05	4.11	4.16
12	0.05	2.18	2.5	2.68	2.81	2.9	2.98	3.04	3.09	3.14
	0.01	3.05	3.39	3.58	3.71	3.81	3.89	3.96	4.02	4.07
13	0.05	2.16	2.48	2.65	2.78	2.87	2.94	3	3.06	3.1
	0.01	3.01	3.33	3.52	3.65	3.74	3.82	3.89	3.94	3.99
14	0.05	2.14	2.46	2.63	2.75	2.84	2.91	2.97	3.02	3.07
	0.01	2.98	3.29	3.47	3.59	3.69	3.76	3.83	3.88	3.93
15	0.05	2.13	2.44	2.61	2.73	2.82	2.89	2.95	3	3.04
	0.01	2.95	3.25	3.43	3.55	3.64	3.71	3.78	3.83	3.88
16	0.05	2.12	2.42	2.59	2.71	2.8	2.87	2.92	2.97	3.02
	0.01	2.92	3.22	3.39	3.51	3.6	3.67	3.73	3.78	3.83
17	0.05	2.11	2.41	2.58	2.69	2.78	2.85	2.9	2.95	3
	0.01	2.9	3.19	3.36	3.47	3.56	3.63	3.69	3.74	3.79
18	0.05	2.1	2.4	2.56	2.68	2.76	2.83	2.89	2.94	2.98
	0.01	2.88	3.17	3.33	3.44	3.53	3.6	3.66	3.71	3.75
19	0.05	2.09	2.39	2.55	2.66	2.75	2.81	2.87	2.92	2.96
	0.01	2.86	3.15	3.31	3.42	3.5	3.57	3.63	3.68	3.72
20	0.05	2.09	2.38	2.54	2.65	2.73	2.8	2.86	2.9	2.95
	0.01	2.85	3.13	3.29	3.4	3.48	3.55	3.6	3.65	3.69
30	0.05	2.04	2.32	2.47	2.58	2.66	2.72	2.77	2.82	2.86
	0.01	2.75	3.01	3.15	3.25	3.33	3.39	3.44	3.49	3.52
40	0.05	2.02	2.29	2.44	2.54	2.62	2.68	2.73	2.77	2.81
	0.01	2.7	2.95	3.09	3.19	3.26	3.32	3.37	3.41	3.44
60	0.05	2	2.27	2.41	2.51	2.58	2.64	2.69	2.73	2.77
	0.01	2.66	2.9	3.03	3.12	3.19	3.25	3.29	3.33	3.37

Vysvětlivky: a - počet stupňů volnosti, b - počet stanovení, 0,05; 0,01 hladina Významnosti

PŘÍLOHA 3 PŘÍKLAD VÝPOČTU DLE DUNNETOVA TESTU

Příklad výpočtu pro test inhibice růstu kořene *Lactuca sativa*:

Stupně volnosti v :

$$v = \text{počet stanovení} \cdot (\text{počet testovaných semen} - 1) = 2 \cdot (15 - 1) = \underline{28}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n \cdot \sum x_j^2}{v}} = \sqrt{\frac{15\,726 - 15 \cdot 697,13}{28}} = \underline{1,015}$$

kde $\sum x_i^2$ odpovídá součtu druhých mocnin jednotlivých délek kořínků

$\sum x_j^2$ odpovídá počtu stanovení vynásobeným součtem druhých mocnin průměrných délek kořínků

Směrodatná chyba SE:

$$SE = S \cdot \sqrt{\frac{T-1}{N}} = 1,015 \cdot \sqrt{\frac{2-1}{15}} = \underline{0,262}$$

kde T odpovídá počtu stanovení

N odpovídá počtu měřených kořínků na jedno stanovení

Významný rozdíl SS v [mm]:

$$SD = t \cdot SE = 2,04 \cdot 0,262 = \underline{0,53}$$

kde t odpovídá tabelované hodnotě z Dunnettovy tabulky pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$, viz Příloha 2 Dunnettova Tabulka.