

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

## KINETIKA PŘÍJMU HYDROFOBNÍCH ORGANICKÝCH LÁTEK V ŽÍŽALE EISENIA ANDREI V PŮDÁCH S ROZDÍLNÝM OBSAHEM ORGANICKÉHO UHLÍKU

KINETICS OF HYDROPHOBIC ORGANIC COMPOUNDS UPTAKE IN THE EARTHWORM  
EISENIA ANDREI IN SOILS WITH DIFFERENT CONTENT OF ORGANIC CARBON

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. Klára Šmídová, Ph.D.

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

BRNO 2016



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0959/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Student(ka): **Mgr. Klára Šmídová, Ph.D.**  
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Kinetika příjmu hydrofobních organických látek v žízále *Eisenia andrei* v půdách s rozdílným obsahem organického uhlíku

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracování literární rešerše k příslušné problematice
- 2) Výběr vhodných půd s různým obsahem organického uhlíku
- 3) Kontaminace půd vybranými HOCs, sledování půdní koncentrace v čase
- 4) Stanovení kinetiky příjmu vybraných HOCs pro žízálu *Eisenia andrei* po ustálení koncentrace sledovaných látek v půdách

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

-----  
Mgr. Klára Šmídová, Ph.D.  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá osudem hydrofobních organických polutantů (hydrophobic organic compounds, HOCs) v půdách. V teoretické části shrnuje současné poznatky o biodostupnosti, faktorech ovlivňujících biodostupnost a metodách pro její měření. Pozornost je věnována zejména obsahu organického uhlíku, který je považován za jeden z klíčových činitelů, a vlivu mikroorganismů, které mohou sledované látky degradovat nebo s nimi interagovat a měnit tak jejich biodostupný podíl. V praktické části pak tato práce využívá bioakumulačního testu s žížalou *Eisenia andrei* pro hodnocení kinetiky příjmu HOCs ve třech půdách s rozdílným obsahem organického uhlíku. Půdy byly laboratorně kontaminovány směsí vybraných HOCs (fenanthren, pyren, lindan, p,p'-DDT a PCB 153) a koncentrace látek v těchto půdách byly sledovány po dobu 217 dnů. Následně byl založen bioakumulační test, žížaly byly exponovány jeden až jednadvacet dnů. Ze získaných dat byly namodelovány křivky kinetiky příjmu pro jednotlivé látky. Pro pyren byly nalezeny zalomené bioakumulační křivky, u lindanu došlo k ustálení koncentrace během expozice, zatímco pro p,p'-DDT a PCB 153 byly pozorovány rostoucí koncentrace i po jednadvaceti dnech expozice. Důvodem pro rozdílné chování látek byla pravděpodobně jejich odlišná sorpce na organický materiál, která spolu s různou rychlostí jejich eliminace ovlivnila výslednou koncentraci v žížalách. Fenanthren nebyl v některých vzorcích detekován a modelování proto nebylo možné.

## ABSTRACT

This thesis is concerned with the fate of hydrophobic organic pollutants (HOCs) in soil. The theoretical part summarizes the current knowledge about bioavailability, factors influencing the bioavailability and methods for its measurement. Attention is paid to the organic carbon content, which is considered to be one of the key factors and to the influence of microorganisms that can degrade or interact with the substances, thus changing their bioavailable ratio. The practical part of the thesis uses bioaccumulation test with earthworm *Eisenia andrei* for evaluating the uptake kinetics HOCs in three soils with different organic carbon content. Soils were laboratory contaminated with mixtures of selected HOCs (phenanthrene, pyrene, lindane, p,p'-DDT and PCB 153) and the concentrations of substances in these soils were followed for 217 days. Subsequently, bioaccumulation test was conducted; earthworms were exposed from one to twenty-one days. The collected data were used to model uptake kinetics curves for individual substances. Peak-shaped bioaccumulation were found for pyrene, for lindane a steady-state concentration during exposure was observed, whereas for p,p'-DDT and PCB 153 growing concentrations after twenty days of exposure were detected. The reason for the different behavior of the substances was probably their diverse sorption on the organic material, which together with the different speed of elimination influenced final concentration in earthworms. Phenanthrene was not detected in some samples and therefore the modeling of uptake kinetics was not possible.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hydrofobní organické látky, půda, bioakumulační faktor, *Eisenia andrei*, stárnutí kontaminace

## **KEYWORDS**

hydrophobic organic compounds, soil, bioaccumulation factor, *Eisenia andrei*, aging



ŠMÍDOVÁ, K. *Kinetika příjmu hydrofobních organických látek v žížale Eisenia andrei v půdách s rozdílným obsahem organického uhlíku*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. XY s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za vedení, cenné rady a připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat Centru pro výzkum toxických látek v prostředí (Recetox) za možnost vypracovat diplomovou práci v jejich laboratořích a za finanční podporu, díky které mohla být tato práce provedena. Obzvláště bych pak chtěla poděkovat doc. RNDr. Jakubu Hofmanovi, Ph.D. za odbornou konzultaci a Mgr. Markétě Svobodové za pomoc s finální analýzou vzorků.

V neposlední řadě děkuji své rodině, manželovi za podporu během studií a svým dvěma synům za to, že mi umožnili diplomovou práci uskutečnit.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1	BIODOSTUPNOST .....	9
2.2	OSUD A BIODOSTUPNOST LÁTEK V PŮDÁCH.....	11
2.2.1	<i>Půdní organická hmota (soil organic matter, SOM).....</i>	<i>11</i>
2.2.2	<i>Vliv mikrobiální degradace.....</i>	<i>12</i>
2.3	METODY MĚŘENÍ BIODOSTUPNOSTI .....	13
2.3.1	<i>Bioakumulace HOCs v žížalách.....</i>	<i>14</i>
2.3.2	<i>Kinetika příjmu HOCs žížalami .....</i>	<i>15</i>
2.3.3	<i>Vztah mezi bioakumulací v žížalách a mikrobiální degradací .....</i>	<i>17</i>
<b>3</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>18</b>
3.1	DESIGN EXPERIMENTU .....	18
3.2	POUŽITÉ PŮDY A JEJICH VLASTNOSTI .....	18
3.2.1	<i>Stanovení obsahu organického uhlíku .....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Stanovení pH v půdě .....</i>	<i>19</i>
3.2.3	<i>Stanovení maximální vodní kapacity.....</i>	<i>19</i>
3.2.4	<i>Výpočet spotřeby použitých půd.....</i>	<i>19</i>
3.3	STUDOVANÉ LÁTKY .....	20
3.4	APLIKACE POLUTANTŮ DO PŮD .....	21
3.5	ANALÝZA VZORKŮ PŮDY .....	22
3.6	TESTOVANÉ ORGANISMY A ANALÝZA VZORKŮ ŽÍŽAL .....	23
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>24</b>
4.1	APLIKACE POLUTANTŮ DO PŮD .....	24
4.2	STÁRNUTÍ V PŮDÁCH .....	25
4.3	BIOAKUMULAČNÍ TEST .....	28
4.3.1	<i>Koncentrace látek v půdě během expozice.....</i>	<i>29</i>
4.3.2	<i>Kinetika příjmu látek žížalami .....</i>	<i>31</i>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>48</b>

# 1 ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

V půdách a sedimentech se akumuluje významné množství hydrofobních organických polutantů (hydrophobic organic compounds, HOCs), které se do těchto složek ekosystému dostávají buď záměrnou aplikací (pesticidy, herbicidy) anebo náhodně pomocí atmosférické depozice, splachy z kontaminovaných odpadů nebo při haváriích. V současné době je půda důležitým sekundárním zdrojem HOCs významným zejména z hlediska intenzivního pěstování plodin na zemědělské půdě, možné kontaminace dalšího území vlivem eroze nebo povodní a ohrožení zdrojů podzemních vod. Neméně důležitým faktorem je i samotná toxicita kontaminantů pro půdní organismy, a to jak pro mikrobiální společenstva, tak i pro rostliny a živočichy.

HOCs zahrnují celou řadu látek rozdílných fyzikálně-chemických vlastností a lze je najít ve všech složkách životního prostředí. Zpravidla se jedná o xenobiotika špatně rozpustná ve vodě, odolná proti biologickému, chemickému a fotolytickému rozkladu. Mezi HOCs můžeme zařadit zejména jednoduché aromatické sloučeniny (benzen, toluen, xyleny atd.), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), polychlorované bifenyly (PCBs), organické chlorované pesticidy (OCPs), dále polychlorované naftaleny, polychlorované fenoly a další. HOCs jsou významné hlavně z hlediska svých vlastností. Vlivem vysoké hydrofobicity mají tyto látky tendenci se hromadit v tukových tkáních, a to nejen z prostředí (tzv. biokoncentrace), ale i prostřednictvím potravního řetězce (biomagnifikace). Oba tyto procesy se souhrnně označují jako bioakumulace a jsou příčinou toho, že i koncentrace, které nevykazují akutní účinky na půdní organismy, mohou ohrozit vyšší trofické úrovně. Přítomnost HOCs v půdách je tedy spojena nejen s ohrožením půdních organismů a rostlin, ale i celých ekosystémů.

Klíčovou roli hraje nikoli celková, ale biodostupná frakce HOCs, protože pouze ta může být přijata organismy, způsobit toxicitu nebo se akumulovat v potravních řetězcích. Množství, které je potencionálně dostupné pro příjem živými organismy, se řídí mnoha faktory, jako jsou vlastnosti půdy, vlastnosti sledované látky, vlastnosti exponovaného organismu a doba kontaktu dané látky a prostředí. Důležitým parametrem je pak hydrofobicita (tendence látky vstupovat do nepolární složky prostředí), která ovlivňuje i tendenci látky vázat se na organickou složku půdy (vyjádřená rozdělovacím koeficientem oktanol-organický uhlík  $K_{oc}$ ). Biodostupnost, respektive biodosažitelnost je v posledních letech intenzivně studována hlavně ve vztahu k reálné toxicitě látek v půdách a k extrapolaci dat z laboratoří na terénní studie.

Moje diplomová práce navazuje na předcházející studii o bioakumulaci HOCs v žížale *Eisenia andrei* ve vztahu k různým půdním vlastnostem v laboratorně kontaminované půdě [1]. Design předešlé studie byl upraven s cílem většího pochopení chování látek v reálně kontaminovaných půdách a k objasnění otázek vzniklých během zmíněné studie. Obecně je diplomová práce součástí širšího výzkumu prováděného v půdní laboratoři Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX), který je zaměřen na studium vlivu půdních vlastností a času na biodostupnost látek v půdách. V rámci diplomové práce byly vybrány

půdy s rozdílným obsahem organického uhlíku, který má významný vliv na biodostupnost v půdě. Tyto půdy byly kontaminovány v laboratorních podmínkách vybranými HOCs. Po ustálení koncentrace v půdách byla proměřena kinetika příjmu těchto látek žížalou *Eisenia andrei*. Byl posouzen vliv půdních vlastností, vlastností HOCs a stárnutí kontaminace na biodostupnost.

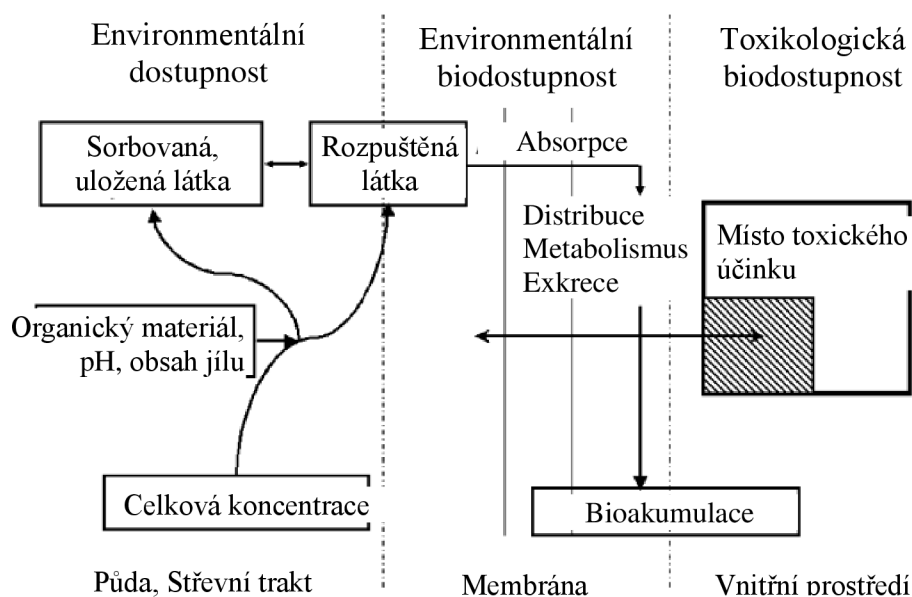
Dílčí cíle diplomové práce byly:

- Zpracování literární rešerše k příslušné problematice
- Výběr vhodných půd s různým obsahem organického uhlíku
- Kontaminace půd vybranými HOCs, sledování půdní koncentrace v čase
- Stanovení kinetiky příjmu vybraných HOCs pro žížalu *Eisenia andrei* po ustálení koncentrace sledovaných látek v půdách

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

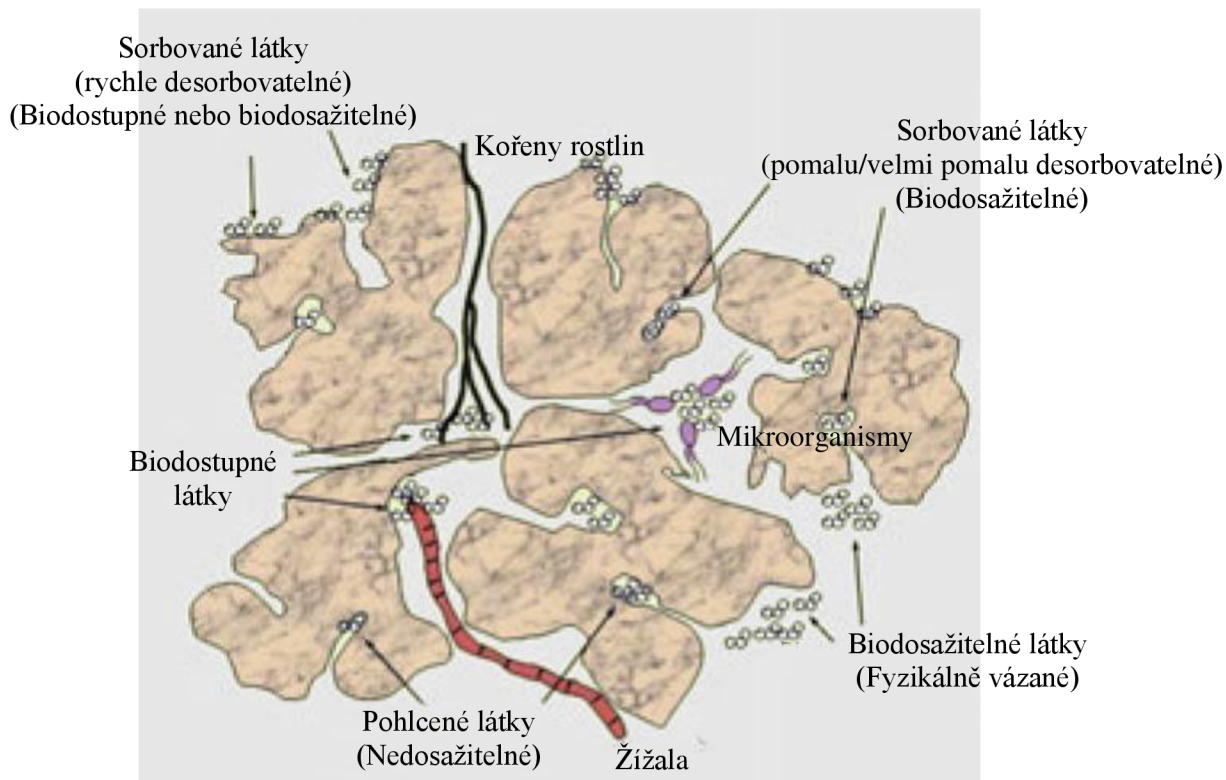
### 2.1 Biodostupnost

Lanno et al. [2] charakterizoval biodostupnost jako frakci chemické látky, která je absorbovaná buňkou a je schopná začlenit se do jejího oběhu. Jinak řečeno, jde o tu část z celkového množství, která je schopna projít buněčnou membránou, vstoupit do buňky a stát se dostupnou pro interakci s receptory. Je tedy nutné brát v úvahu, do jaké míry je sledovaná látka vázána na půdní částice (Obrázek 1).



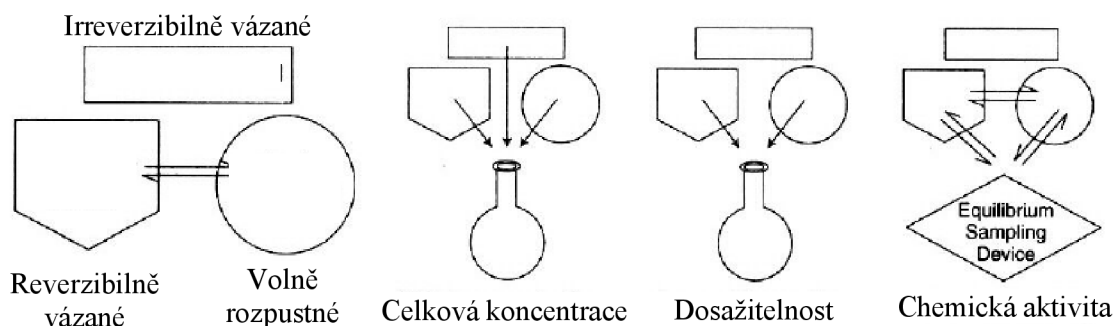
Obrázek 1. Schématický model biodostupnosti [2].

Semple et al. [3] poté definoval biodostupnou (bioavailable) a biodosažitelnou (bioaccessible) složku (Obrázek 2). Biodostupná složka byla charakterizována jako ta, která může volně prostupovat přes buněčnou membránu z prostředí, se kterým je organismus ve stanoveném čase v kontaktu. Biodosažitelná složka potom ta, která je schopna přejít přes buněčnou membránu z prostředí, jestliže organismus přijde s touto látkou do kontaktu. Biodosažitelná složka tedy v sobě zahrnuje biodostupnou složku a její potenciálně dostupnou část, čímž v sobě zahrnuje i další faktor ovlivňující biodostupnost a tím je množství, mobilita a povrch exponovaných jedinců.



Obrázek 2. Biodostupnost a biodosažitelnost v půdách [3].

Reichenberg and Mayer [4] uvedli dva parametry biodostupnosti, a to dosažitelnost a chemickou aktivitu. Dosažitelnost je shodná s definicí biodosažitelnosti dle Semple et al. [3], chemická aktivita pak určuje potenciál pro samovolné fyzikálně-chemické procesy jako je difúze nebo rozdělování a úzce souvisí s fugacitou a volně rozpustnou koncentrací v pórové vodě. Vztahy mezi složkami biodostupnosti znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3. Parametry biodostupnosti [4].

## 2.2 Osud a biodostupnost látek v půdách

Mezi faktory, které mají vliv na biodostupnost, patří:

- vlastnosti látky – chemická struktura, hydrofobicita, rozdělovací koeficient oktanol-voda, těkavost, molekulová hmotnost
- vlastnosti půdy – množství a vlastnosti půdní organické hmoty, sorpční vlastnosti půdy, struktura, množství jílu a jeho vlastnosti, poměr uhlíku a dusíku, pórovitost, půdní vlhkost, kationtová výměnná kapacita, pH, teplota
- vlastnosti organismu – expoziční cesta, fyziologie, chování, obsah lipidů
- biodegradace – schopnost půdních organismů metabolizovat kontaminanty
- přítomnost dalších kontaminantů
- doba kontaktu půdy a kontaminantu (aging)

Bylo dokázáno, že biodostupnost, sorpce a toxicita látek v půdách je ovlivněna převážně půdní organickou hmotou, jejím množstvím a vlastnostmi [5-8]. Proto je tomuto parametru věnována samostatná podkapitola. I další půdní vlastnosti, jako pH, kationtová výměnná kapacita, podíl jednotlivých frakcí, množství jílu a jeho vlastnosti, poměr uhlíku a dusíku, mají přímý nebo nepřímý vliv na chování látek v půdách [9-12]. Mezi vlastnosti látek významně ovlivňující biodostupnost patří chemická struktura, rozdělovací koeficient oktanol-voda, hydrofobicita, Henryho konstanta a molekulová hmotnost a z vlastností organismů je důležité jejich chování, obsah lipidů, fyziologie a rozdíly mezi jednotlivými druhy [13-16]. Doba kontaktu půdy a kontaminantu, mikrobiální aktivita a přítomnost dalších kontaminantů také hrají významnou roli v osudu a chování HOCs v půdách [17-19]. Několik studií se přímo zabývá vlivem doby kontaktu kontaminantu a půdy, zvaným „aging“ [20-23]. Mikrobiální aktivita je vzhledem k zaměření diplomové práce také věnována samostatná podkapitola.

### 2.2.1 Půdní organická hmota (soil organic matter, SOM)

Podíl SOM v půdách a sedimentech je jedním z klíčových faktorů určujících biodostupnost. Tato složka půdy se skládá z humusu, mikrobiální biomasy, hydrofilních organických huminových látek a pozůstatků rostlin v různých fázích dekompozice [24]. Humus se dále skládá z huminových látek, mezi které patří huminové kyseliny (humic acids, HA), fulvokyseliny (fulvic acids, FA) a humin (HM), a z látek nehuminových.

SOM je obecně seskupena do dvou složek, gumovité (rubbery), kterou tvoří například huminové látky, a sklovité (glassy), skládající se mimo jiné z kerogenu a sazí [21, 25-27]. Tabulka 1 ukazuje organické materiály, které tvoří tyto dvě fáze SOM. Tyto dvě domény jsou primárně odpovědné za transport a vázání HOCs [28]. Starší a více kondenzovaná (sklovitá) SOM zřejmě obsahuje více rigidních (tuhých) dutinek a pórů, kde mohou chemické látky interagovat s organickou hmotou [29], než mladší a více amorfní (gumovitá) SOM [7, 29, 30].

Tabulka 1. Organické materiály, ze kterých jsou složeny dvě fáze organického podílu půdní hmoty [31].

<b>Amorfni/rozložená “gumovitá” fáze</b>	<b>Kondenzovaná “sklovitá” fáze</b>
Huminové kyseliny	Saze (black carbon)
Fulvokyseliny	Zuhelnatělé části (black carbon)
Humin	Humin
Polysacharidy	Kerogen
Lipidy	
Proteiny	
Lignin	

Blízký vztah mezi SOM a biodostupností HOCs v půdách naznačuje možnost jeho využití pro extrapolaci toxikologických účinků (NOECs a L(E)C50s) hydrofobních látek mezi jednotlivými půdami [32]. SOM byl použit jako základ pro extrapolaci výsledků toxicity mezi různými půdami v Evropské technické normě pro posuzování rizik [33]. Tento přístup předpokládá, že SOM vykazuje stejné vlastnosti neohledě na její strukturu, typ a vlastnosti. Nicméně v řadě studií bylo ukázáno, že vztah mezi množstvím SOM a biodostupností HOCs v půdách není lineární [24,34]. Rozdíly v sorpčních vlastnostech jednotlivých organických materiálů byly přičítány rozdílné polaritě, aromaticitě, stupni humifikace a velikosti částic organické hmoty [10, 26, 35].

### **2.2.2 Vliv mikrobiální degradace**

Důležitým faktorem ovlivňujícím biodostupnost HOCs v půdách je i přítomnost půdních mikroorganismů a jejich schopnost interagovat s kontaminanty [36-38]. Rychlost, kterou mikrobiální buňky přeměňují chemické látky v průběhu biologického rozkladu, závisí na dvou faktorech:

- a) rychlosti příjmu a metabolismus (vnitřní aktivita buňky) a
- b) rychlosti přenosu látky k buňkám (přestup hmoty).

Mikrobiální společenstva se liší v závislosti na typu půd, a lze očekávat, že tyto rozdíly povedou i k odlišnému osudu znečišťujících látek v půdách. Tím je také omezena možnost extrapolace dat mezi půdami. V literatuře lze najít důkazy o tom, že půdní mikroorganismy jsou schopny degradovat PAHs [19, 39-41] a OCPs [42-44]. Lze také očekávat, že mikrobiální společenstva pocházející z rašeliny, která se standardně používá při přípravě umělých půd, se budou lišit od přirozených společenstev nacházejících se v půdách reálných.

Jedním z možných řešení eliminace vlivu mikrobiální degradace je sterilizace půdy. Proto jsou sterilní půdy široce používány v ekotoxikologických testech [11, 45, 46]. Na druhou



stranu bylo ukázáno, že některé fyzikální a chemické vlastnosti půd mohou být vlivem sterilizace změněny [47-49], což také může mít vliv na osud látek v půdě (např. těkání, sorpce, sekvestrace, biologická dostupnost do mikrobiální degradace).

### 2.3 Metody měření biodostupnosti

Metod pro hodnocení biodostupnosti je v současnosti celá řada a obecně je lze rozdělit na metody biologické a chemické. Žádná z metod není jednoznačně preferována, ale biologické metody by měly být upřednostňovány, neboť mají přímou relevanci k biodostupnosti. U chemických je nutno nejprve vytvořit korelaci s biologickou odezvou organismu a teprve poté je možno je k hodnocení biodostupnosti využít [2].

Mezi biologické metody lze zařadit bioakumulaci a obsah rezidua v organismu (metody přímé) a testování půdních organismů v kontaminovaných vzorcích a studium genů a genových produktů (metody nepřímé). Většinou jde o metody časově, finančně i prostorově náročnější, jejich výhodou je již zmíněná přímá relevance na biodostupnost.

Chemické metody lze rozdělit podle toho, zda se chemické látky extrahují do rozpouštědla nebo na sorbent. K extrakčním metodám patří extrakce vodnými a organickými rozpouštědly, k extrakcím na sorbent lze zařadit mikroextrakci na tuhou fázi, pryskyřici XAD či C18 membrány. Následující tabulka shrnuje jednotlivé kategorie metod hodnocení biodostupnosti včetně příkladů.

Tabulka 2: Přehled metod pro hodnocení biodostupnosti.

Biologické metody	Přímé metody	Bioakumulace Obsah rezidua v organismu
	Nepřímé metody	Testování půdních organismů v kontaminovaných půdách Výzkum genů a genových produktů
Chemické metody	Extrakce vodnými rozpouštědly	Pórová voda Hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinová extrakce Extrakce s využitím $\text{CaCl}_2$
	Extrakce organickými rozpouštědly	Maximální extrakce Mírná (slabá) extrakce rozpouštědly
	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	
	Extrakce na pevnou fázi (SPE)	Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) Tenax Pryskyřice XAD C18 membrány

### 2.3.1 Bioakumulace HOCs v žížalách

Žížaly mohou představovat až 80 % celkové biomasy půdní fauny [50, 51] a podstatně přispívají nejen k tvorbě půdy, ale i k zvyšování její kvality a ke koloběhu živin v terestrických ekosystémech. Žížaly jsou schopny akumulovat různé znečišťující látky, jako jsou PAHs [52], chlorbenzeny [53, 54], OCPs [5, 55] a PCBs [56]. Jsou také důležitým článkem potravního řetězce a akumulace HOCs v jejich tělech může přispívat k zvyšování koncentrací ve vyšších trofických úrovních. Proto se tyto organismy často používají při sledování kontaminovaných půd [57, 58] a při laboratorních zkouškách [59, 60]. Následující tabulka shrnuje druhy žížal, které se v ekotoxikologických testech nejčastěji využívají.

Tabulka 3. Druhy žížal, které se při studiu bioakumulace využívají, a příklady studií, v nichž byly dané druhy použity.

<i>Eisenia fetida</i>	Hallgren et al., 2006; Hu et al., 2005a; Gao, 2009; Kelsey et al., 2005; Matscheko et al., 2002; Tang et al., 1999; Shang et al., 2013 [55, 57, 61-65]
<i>Eisenia andrei</i>	Belfroid et al., 1994, 1995a; Jager et al., 2000, 2005; Šmídová et al., 2015 [53, 54, 56, 66, 67]
<i>Lumbricus terrestris</i>	Kelsey et al., 2005; Kraus et al., 2000 [55, 68]
<i>Lumbricus rubellus</i>	Ma et al., 1995 [52]
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Mäenpää et al., 2008 [69]
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Kelsey et al., 2005 [55]
<i>Allolobophora caliginosa</i>	Shang et al., 2013 [57]

Existují dvě cesty příjmu HOCs žížalami, kterými jsou:

- pasivní absorpce látek rozpuštěných v pórové vodě přes povrch těla a
- příjem látek potravou přes stěnu střeva.

Pro terestrické a bentické organismy se předpokládá, že primární příjem látek probíhá absorpcí látek povrchem těla. U látek s  $\log K_{ow} > 5$  je důležitou cestou příjmu i příjem potravou [70, 71]. Například Leppänen and Kukkonen [72] ukázali, že dominantní cestou vstupu pyrenu do žížaly je právě příjem potravy (asi 61%).

Bioakumulační test s terestrickými bezobratlými má i svoji standardizovatelnou podobu:

- **OECD, 2010, Test No. 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes.**

Přesto, že se tato metoda běžně používá, stále existují důležité otázky, které je nutné zodpovědět. Jednou z nich je shodnost výsledků naměřených v laboratorně kontaminovaných a historicky kontaminovaných půdách. V laboratorně kontaminovaných půdách byl pozorován pokles celkové koncentrace během expozice organismů, a tato skutečnost mohla

v některých studiích ovlivnit naměřené hodnoty bioakumulačních faktorů. Následující kapitola se věnuje kinetice příjmu HOCs žížalami ve vztahu k celkové koncentraci v půdě a jejímu modelování.

### 2.3.2 Kinetika příjmu HOCs žížalami

Kinetické studie patří k těm nejdůležitějším v půdní ekotoxikologii. Vzhledem ke své náročnosti je ale těchto studií jen omezené množství. Dosud není objasněn vliv půdních vlastností na příjem látek, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Některé studie ukazují, že k ustálení rovnováhy mezi půdou a žížalou je zapotřebí deseti nebo patnáctidenní expozice [56, 68, 73, 74], zatímco jiní autoři poukazují na to, že ani devatenáctidenní nebo jednadvacetidenní expozice nemusí být dostatečná [53, 64].

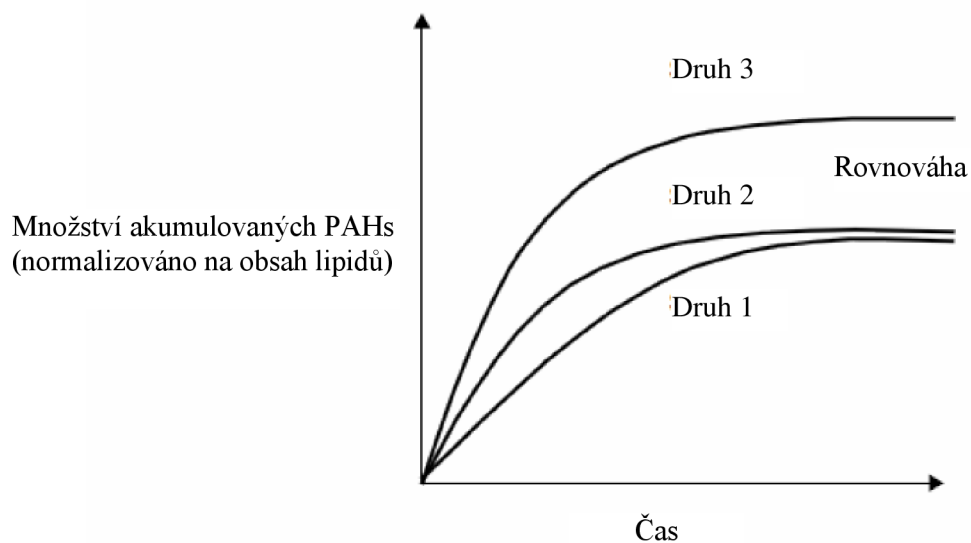
Kinetika bioakumulace může být popsána pomocí kinetiky prvního řádu za předpokladu, že:

- procesy a rychlostní konstanty jsou prvního řádu,
- organismus, potrava, voda a půda nebo sediment jsou homogenní;
- s časem se mění pouze koncentrace v organismu, v potravě, vodě a půdě nebo sedimentu zůstává konstantní [75].

Ke stanovení kinetiky příjmu se pak nejčastěji využívá tento vztah:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad (1)$$

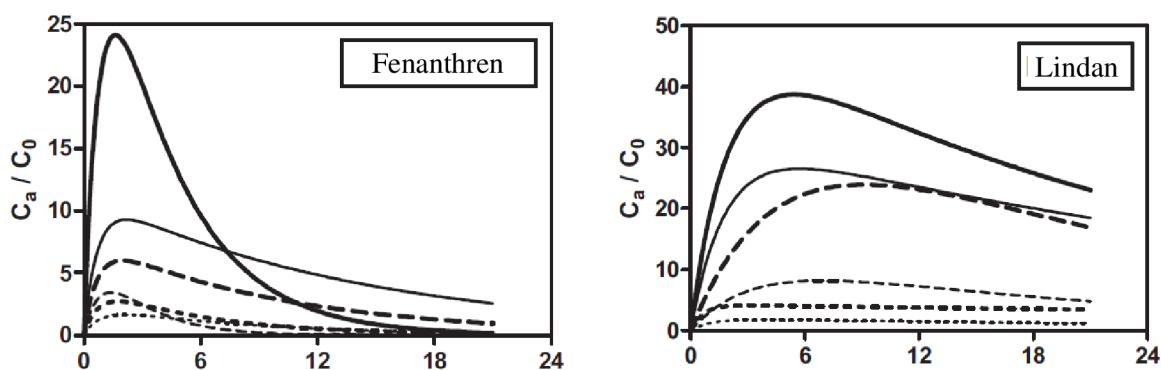
kde  $C_a$  je koncentrace látky v žížale ( $\text{ng g}_{\text{earthworm}} \text{dw}^{-1}$ ),  $k_s$  je rychlostní konstanta příjmu do organismu ( $\text{ng}_{\text{soil}} \text{g}_{\text{žížaly}} \text{dw}^{-1} \text{d}^{-1}$ ),  $k_e$  je rychlostní konstanta eliminace ( $\text{d}^{-1}$ ),  $k_0$  je konstanta rychlosti degradace ( $\text{d}^{-1}$ ) a  $t$  je čas (dny). Obrázek 4 ukazuje idealizovanou kinetiku příjmu PAHs třemi druhy, které se živí sedimentem.



Obrázek 4. Idealizovaný tvar kinetiky příjmu PAHs třemi druhy žijícími v sedimentu [76].

Bioakumulační faktory jsou často využívány při hodnocení rizik kontaminovaných půd. Řada otázek ale vyvstává ohledně kvality a správnosti naměřených hodnot. V některých experimentech není jisté, zda bylo dosaženo rovnováhy mezi koncentracemi v půdě a žížalách, protože kinetika příjmu nebyla studována a byla použita jednotná doba expozice [55, 61, 63]. Jager et al. [53] navrhl výpočet biokoncentračního faktoru (bioconcentration factors, BCFs) nikoli pomocí výsledných koncentrací po expozici, ale s využitím konstant příjmu a eliminace.

Z naší nedávné studie [1], která se zabývala kinetikou příjmu pěti HOCs v šesti půdách s rozdílným obsahem SOM, vyplynulo, že pokles celkové koncentrace v půdě během expozice má za následek i pokles koncentrace v žížalách. Z tohoto důvodu byly pozorovány zaoblené kinetiky příjmu („peak-shaped“). Příklad takovýchto křivek ukazuje Obrázek 5.



Obrázek 5. Kinetika příjmu fenanthrenu a lindanu žížalou *E. andrei* v šesti reálných půdách [1].

Pokud koncentrace v půdě během expozice organismů významně klesá, je zapotřebí nejprve namodelovat průběh tohoto úbytku a vypočítat konstantu rychlosti degradace ( $k_0$ ,  $d^{-1}$ ). Tato konstanta se dá vypočítat podle tohoto vztahu:

$$C_s = C_0(e^{-k_0t}) \quad (2)$$

kde  $C_s$  je koncentrace látky v půdě v daném čase ( $ng\ g_{sol\ dw}^{-1}$ ),  $C_0$  je počáteční koncentrace látky ( $ng\ g_{sol\ dw}^{-1}$ ),  $k_0$  je konstanta rychlosti degradace ( $d^{-1}$ ) a  $t$  je čas (dny).

### 2.3.3 Vztah mezi bioakumulací v žížalách a mikrobiální degradací

Ve zprávě o ECETOC [77] je uvedeno, že množství chemické látky, které může být mineralizováno konkrétním druhem degradujícího mikroorganismu, představuje lepší možnost měření biodosažitelné frakce než když jsou použity větší organismy, jako například žížaly. Využití mikroorganismů má ale i své limitace a některé studie dokládají, že predace a velikost mikroorganismů může mít za následek vyloučení bakterií z 30–50 % porů v půdě [78, 79]. Kromě toho rozdělení mikroorganismů v reálném prostředí je zřídka rovnoměrné a pouze biodostupná (nikoli biodosažitelná) frakce látky je relevantní. V laboratorních experimentech se naproti tomu mikroorganismy používají v nepřírozeně vysokých hustotách buněk a výsledkem experimentu je pak biodosažitelná frakce. Biologická dostupnost pro žížaly se obvykle vyjadřuje pomocí bioakumulačních faktorů, které se vztahují k rovnovážným koncentracím v žížale a v půdě. Takové informace nelze získat pomocí mikrobiální degradace.

Studií, které by srovnávaly chemické metody, mikrobiální mineralizaci a příjem látek do žížal, je velmi málo. V literatuře lze nalézt tyto výsledky:

- množství látky přijaté žížalami i degradované mikroorganismy lze odhadnout pomocí některých extrakčních činidel [80],
- dobrá korelace s butanolovou extrakcí byla nalezena pouze pro mikrobiální degradaci [81],
- některé studie zahrnují jak příjem látek do žížal, tak mikrobiální degradaci, ale neposkytují žádnou korelaci s chemickými metodami [82] a
- většina studií využívá jednu z metod (buď příjem do žížal nebo mikrobiální degradaci) s různými korelačními koeficienty [65, 83, 84].

### 3 MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 Design experimentu

Byly vybrány tři půdy s odlišnými vlastnostmi (zejména v obsahu organického uhlíku), a tyto půdy byl laboratorně kontaminovány směsí vybraných HOCs. Koncentrace látek v půdách byly v pravidelných intervalech analyzovány, dokud nedošlo k jejich ustálení. V takto ustálených půdách byl proveden bioakumulační test se žížalou, který se řídil standardizovanou normou OECD [59].

V nekontaminovaných půdách byly nejprve aklimatizovány žížaly po dobu 3 dnů. Z aklimatizace bylo vybráno vždy 10 žížal na jedno opakování, a ty byly exponovány v jednotlivých kontaminovaných půdách tak, že půda vždy tvořila 1/3 testovací sklenice o objemu 700 ml. Sklenice byly uzavřeny děrovanými víčky pro zajištění dostatečné aerace. Vlhkost půdy byla kontrolována vážením jednou za týden. Expozice probíhala za denního světla při  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  (vzorkovací časy byly 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 a 21 dní). Pro každý vzorkovací čas byla připravena tři nezávislá opakování (tři sklenice). Žížaly byly krmeny jednou za týden granulovaným kravským hnojem. Celková koncentrace v půdě během experimentu byla měřena vzorkováním půd v testovacích sklenicích po expozici žížal a to v časech 3, 7, 13 a 21 dní. Byly také ověřeny pozad'ové koncentrace studovaných látek v chovu a v nekontaminovaných půdách.

#### 3.2 Použité půdy a jejich vlastnosti

V naší předešlé studii [1] bylo studováno šest reálných půd s odlišnými vlastnostmi, převážně s rozdílným obsahem organického uhlíku. Z těchto půd byly vybrány tři tak, aby reprezentovaly již studovaný soubor půd z pohledu rozdílného obsahu organického uhlíku, využití půdy a rozdílného chování studovaných látek v těchto půdách. Půdy byly znovu odebrány (k plánovanému experimentu bylo zapotřebí několik kilogramů suché půdy, přesáté přes 2 mm síto) a jejich vlastnosti byly znovu přeměřeny v laboratoři Recetox (postup jednotlivých měření popsán níže), některé vlastnosti byly měřeny v externí laboratoři (Laboratoře Morava, Studénka, CZ). Následující Tabulka 4 shrnuje jejich nejdůležitější vlastnosti.

Tabulka 4. Nejdůležitější vlastnosti vybraných půd: typ půdy (orná půda, OP; trvalý travní porost, TTP; lesní půda, LP), obsah organického uhlíku (organic carbon, OC), pH měřené v KCl, maximální vodní kapacita (water holding capacity, WHC) a kationtová výměnná kapacita (cation exchange capacity, CEC).

	Typ půdy	OC (%)	pH(KCl)	WHC <sub>max</sub> (ml/g půdy)	CEC (meq/kg)
S1	OP	<b>1,57</b>	7,20	0,44	190
S2	TTP	<b>3,62</b>	4,60	0,60	245
S3	LP	<b>9,30</b>	7,20	1,00	377

### 3.2.1 Stanovení obsahu organického uhlíku

Před samotným měřením byl vzorek nejprve vysušen a rozemlet na kulovém mlýnku Retsch MM301 při frekvenci 30 Hz po dobu 3 minut. Anorganický uhlík byl ze vzorku odstraněn pomocí zředěné a následně koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Přítomnost anorganického uhlíku (zejména uhličitánů) indikovalo „šumění“. Poté byl vzorek vysušen 30 min. při 105 °C. Analýza byla provedena na přístroji LiquiTOCII. Organický uhlík je oxidován na CO<sub>2</sub> a jeho obsah analyzován IR analyzátozem. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

### 3.2.2 Stanovení pH v půdě

Postup stanovení pH se řídil normou ISO 10390 [85]. Byla připravena suspenze půdy a roztoku chloridu draselného o koncentraci 1 mol/l (pH<sub>KCl</sub>) v poměru 1:5, která byla míchána po dobu 5 minut. Po nejméně dvou, nejdéle do 24 hodin, byl vzorek měřen na nakalibrovaném pH metru. Analýza byla provedena ve třech opakováních.

### 3.2.3 Stanovení maximální vodní kapacity

Použitý postup vycházel z normy ISO 11465 [86]. Principem je nasycení vzorku půdy vodou a její následná nenásilná ztráta do ustálení rovnováhy (v kapilárních pórech je největší množství vody). Do infuzních lahví byly posazeny nálevky se složeným filtračním papírem. Do nálevky bylo naváženo 20 g půdy o známé sušině (10 g v případě lesní půdy, která je vysokoobjemová). Do nálevky bylo nalito 100 ml destilované vody a skleněnou tyčinkou byla pomocí opatrného míchání vytvořena homogenní suspenze. Měření bylo provedeno ve dvou opakováních. Se sadou byly analyzovány také dva kontrolní vzorky bez navážené půdy. Nálevky byly zakryty alobalem a nechány přes noc stát. Druhý den byly filtrační papíry s nasáklou vodou zváženy a byla vypočítána maximální vodní kapacita podle následujícího vzorce:

$$\text{WHC}_{\max} (\text{ml.g}^{-1}) = (M_{\text{vz}} - M_{\text{k}} - \text{Suš}) / (\text{Suš} / 100 \times N),$$

kde  $M_{\text{vz}}$  je hmotnost filtračního papíru s nasycenou půdou,  $M_{\text{k}}$  je hmotnost filtračního papíru v kontrole, Suš je obsah sušiny ve vzorku v procentech a N je navážka půdy (většinou 20 či 10 g).

### 3.2.4 Výpočet spotřeby použitých půd

Následující Tabulka 5 ukazuje výpočet množství půdy, které bylo potřeba kontaminovat/ovlhčit. Množství půdy pro jednotlivé opakování se řídilo tím, aby půda tvořila 1/3 testovací sklenice o objemu 700 ml. Cílem bylo mít stejné prostředí (poměr objem půdy/vzduch) ve všech testovacích nádobách. Dále je v tabulce zahrnuto množství půdy potřebné k analýze koncentrací sledovaných látek po dobu ustalování rovnováhy, na ověření homogenity, sušiny a měření pH. Také bylo počítáno s určitým množstvím kontaminované půdy na další případné analýzy, na chemické stanovení biodostupnosti a podobně. Toto množství půdy nebylo v této DP analyzováno, ale pouze zamrazeno na -80 °C. K množství půdy, které bylo potřeba kontaminovat, bylo připočítáno další množství půdy k aklimatizaci žížal a na biologické kontroly (expozice v nekontaminované půdě, přidáno pouze ekvivalentní

množství rozpouštědla). K vypočítaným množstvím byla vždy připočítána rezerva 5, popř. 10 % (ztráty při manipulaci půdy apod.).

Tabulka 5. Výpočet spotřeby jednotlivých půd pro kontaminaci a ovlhčení.

	S1	S2	S3
Množství půdy na 1 opakování	210	150	90
Počet sklenic (opakování)	32		
Množství půdy pro všechna opakování	6720	4800	2880
Koncentrace látek půdě po kontaminaci	20	20	20
Potřeba na aktuální konc. po 4 dnech až 14 týdnech	180	180	180
Rezerva, pokud by k ustálení rovnováhy po 100d nedošlo	200	200	200
Ověření homogenity po ustálení systému	20	20	20
Ověření sušiny a pH	40	40	40
Chemické analýzy (zamrazit, neanalyzovat)	800	800	800
Celkově půdy kontaminovat	7980	6060	4140
<b>Celkově půdy kontaminovat + 5 % rezerva</b>	<b>8379</b>	<b>6363</b>	<b>4347</b>
<b>Celkově půdy kontaminovat v kg</b>	<b>8,38</b>	<b>6,36</b>	<b>4,35</b>
Půda na aklimatizaci	1500	1500	1500
Biologické kontroly (2 opakování)	420	300	180
Celkem půdy ovlhčit	10299	8163	6027
<b>Celkem půdy ovlhčit + 10 % rezerva</b>	<b>11329</b>	<b>8979</b>	<b>6630</b>
<b>Celkem půdy ovlhčit v kg</b>	<b>11,33</b>	<b>8,98</b>	<b>6,63</b>

### 3.3 Studované látky

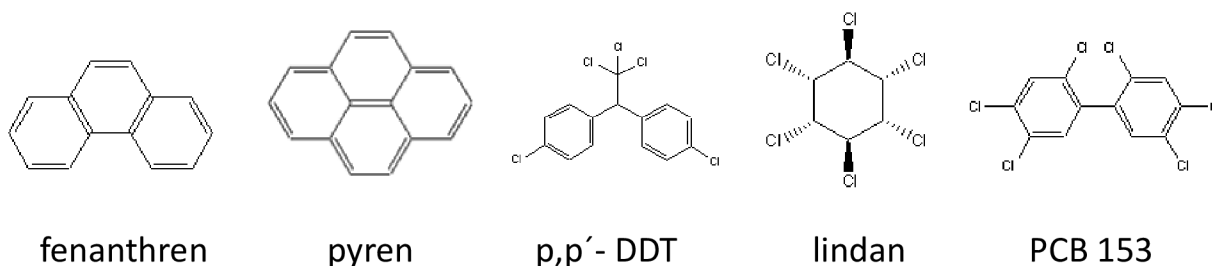
Mezi studované látky patřily dvě sloučeniny ze skupiny PAHs (fenanthren a pyren), dva OCPs (lindan a p,p'-DDT) a jeden PCB (PCB 153). Tyto látky byly vybrány s ohledem na předcházející studie, tak aby mohlo dojít k přímému porovnání výsledků bez nutnosti extrapolace, a s ohledem na množství informací, které bylo o těchto látkách dostupné v literatuře. Tabulka 6 shrnuje nejdůležitější vlastnosti studovaných látek a Obrázek 5 ukazuje jejich strukturální vzorce.



Tabulka 6. Přehled nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností látek použitých v této studii: název, čistota, výrobce a velikost balení, molekulová hmotnost (molecular weight, MW), rozpustnost ve vodě (solubility in water,  $S_w$ ), Henryho konstanta (H), hustota a rozdělovací koeficient oktanol-voda ( $\log K_{ow}$ ).

	Fenanthren	Pyren	Lindan	p,p'-DDT	PCB 153
CAS	85-01-8	129-00-0	58-89-9	50-29-3	35065-27-1
Čistota	98%	98%	07%	98%	99%
Výrobce	Aldrich	Aldrich	Aldrich	Supelco	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Velikost balení	100 g	100 g	100 g	1 g	10 mg
MW (g/mol)	178,2	202,3	290,8	354,5	360,9
$S_w$ (mg/l)	1,15	0,07	7,3	0,025	0,009
H (atm m <sup>3</sup> /mol) při 20 °C	$5.4 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>	$4.6 \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>	$1.4 \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>	$2.2 \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>	$6.2 \times 10^{-5}$ <sup>b</sup>
Hustota	1,063	1,21	1,87	0,99	-
Log $K_{ow}$	4,45	4,88	3,72	6,91	8,35

Poznámky: <sup>a</sup> <http://www.gsi-net.com/en/publications/gsi-chemical-database.html>,  
<sup>b</sup> <http://www.nist.gov/data/PDFfiles/jpcrd639.pdf>.



Obrázek 5. Strukturální vzorce sledovaných látek.

### 3.4 Aplikace polutantů do půd

Kontaminanty byly do půd aplikovány podle doporučení z literatury [87]. Tato metoda umožňuje homogenní kontaminaci i několika kilogramů půdy s použitím minimálního množství kontaminačního roztoku a byla již několikrát úspěšně použita v našich předcházejících studiích. Například ve studii Vlčková et al. [88], kde bylo kontaminováno šest půd o objemech 3,1 kg stejnými látkami, bylo dosaženo homogenní distribuce látek v rozmezí 0,6 – 13,6 %.

Sledované látky byly rozpuštěny v organickém rozpouštědle (aceton a DCM v poměru 2:1) a to bylo aplikováno na čtvrtinu již ovlhčené půdy v poměru 1:80. Po důkladném smíchání byla

půda ponechána v digestoři několik hodin pro odpaření rozpouštědla. Úbytek vody byl sledován vážením kontrolního vzorku vlhké půdy. Po odpaření rozpouštědla byla doplněna chybějící voda a postupně byly přimíchány zbývající tři čtvrtiny půdy. Před dalším použitím půdy byly odebrány tři nezávislé vzorky z každé půdy pro ověření homogenity kontaminace. Výsledná kontaminace byla přepočítána na mg/kg<sub>soil dw</sub> (suchá půda, soil dry weight). Přípravu jednotlivých základních roztoků a následné namíchání kontaminačního roztoku ukazuje Tabulka 7. Navážky na základní roztoky byly uzpůsobeny velikostem a cenám balení, ve kterých se tyto látky prodávají.

Tabulka 7. Příprava zásobních roztoků a kontaminačního roztoku.

	Fenanthren	Pyren	Lindan	p,p'-DDT	PCB 153
Požadovaná koncentrace v půdě (mg/kg)	100	100	10	10	1
Hmotnost všech půd pro kontaminaci (kg)	19,089				
Kolik dodat kontaminantů do půd (mg)	1908,9	1908,9	190,89	190,89	19,089
Navážka na zásobní roztok (mg)	3000	3000	400	400	30
Čistota	0,98	0,98	0,97	0,98	0,999
Navážka vzhledem k čistotě látek (mg)	3061,2	3061,2	412,4	408,2	30
Objem zásobních roztoků (ml)	100	100	50	50	50
Rozpouštědlo	ACE	ACE	DCM	DCM	DCM
Zásobní roztok – koncentrace (mg/ml)	30	30	8	8	0,6
Požadovaná koncentrace v kontaminačním roztoku (mg/ml)	8	8	0,8	0,8	0,08
Objem kont. roztoku (ml)	250				
Kolik smíchat ZR na kont. roztok (ml)	66,7	66,7	25	25	33,3
Získáme tak kont. roztok s objemem (ml)	216,7				
Doplnit ACE (ml)	33,3				

Půdy byly skladovány v klimatizované místnosti ( $20 \pm 2$  °C) v uzavřených skleněných lahvích. Ty byly přikryty neprůhlednou fólií. Po čtyřech, sedmi, čtrnácti dnech a pak v dvoutýdenních intervalech po kontaminaci byly vždy od každé půdy odebrány tři nezávislé vzorky o hmotnosti ekvivalentní 5 g suché půdy a v nich byla stanovena koncentrace sledovaných látek. Po 24 týdnech byl obsah sklenic promíchán a půdy byly ponechány dalších sedm týdnů stárnout. V takto ustálených půdách byl uskutečněn bioakumulační test.

### 3.5 Analýza vzorků půdy

Vzorky půdy o hmotnosti ekvivalentní 5 g suché půdy byly odebrány z různých míst, respektive z různých sklenic po expozici žížal. Půda byla vysušena lyofilizací (lyofilizátor Christ Gamma 1-16 LSC, SciQuip, UK). Ke každému vzorku půdy bylo přidáno 50 µl standardu na výtěžnost pro PAHs a 50 µl standardu na výtěžnost pro chlorované látky. U PAHs se jednalo o směs deuterovaného fenanthrenu a deuterovaného pyrenu (D-PHE a D-PYR) o koncentracích 2500 µg/ml, u chlorovaných látek šlo o směs PCB 30 a 155 o

koncentracích 250 µg/ml. Koncentrace lindanu byla upravena podle standardu pro stanovení výtěžnosti PCB 30, koncentrace p,p'-DDT a PCB 153 podle PCB 155. Poté byly vzorky extrahovány Randalovou extrakcí [89] na extraktoru Velp Scientifica SER 148/6 ve vroucím DCM (80 ml) při teplotě 120 °C po dobu 2 hodin (1 hodina ponor, 1 hodina promývání). Extrakty byly zahuštěny na evaporátoru Evaterm pod proudem dusíku na objem 10 ml (kalibrované vialky) a následně po 1 ml naneseny na dva typy kolonek – aktivovaný silikagel pro analýzu PAHs a aktivovaný silikagel modifikovaný kyselinou sírovou pro analýzu chlorovaných HOCs (22 ml kyseliny sírové na 50 g aktivovaného silikagelu). Kolonky pro analýzu PAHs byly nejprve promyty 10 ml hexanu a poté byly stanovované látky eluovány 20 ml DCM. Chlorované HOCs byly eluovány 30 ml směsí n-hexanu a DCM v poměru 1:1. Eluáty byly zahuštěny na objem zhruba 0,5 ml, převedeny do minivialky a vzorek byl upraven na finální objem 1 ml. Poté bylo přidáno 50 µl vnitřního standardu, u PAHs se jednalo o terfenyl o koncentraci 40 µg/ml, pro analýzu chlorovaných látek bylo použito PCB 121 o koncentraci 4 µg/ml. Daným způsobem byl získán desetinasobně zředěný vzorek, jehož koncentrace byla vyhovující pro finální analýzu na GC/MS (Agilent MSD 5972). Do doby analýzy byly vzorky skladovány v mrazáku při -20 °C.

Pro získání celkové koncentrace p,p'-DDT byly stanoveny koncentrace p,p'-DDE a p,p'-DDD. Výsledná koncentrace p,p'-DDT byla vypočítána jako ekvivalent dílčích koncentrací na základě molárních hmotností podle následujícího vzorce:

$$c_{\text{DDT}_{\text{celk.}}} = (((c_{\text{DDD}}/320) + (c_{\text{DDE}}/318)) \times 354) + c_{\text{DDT}}$$

### 3.6 Testované organismy a analýza vzorků žížal

Chov žížal druhu *Eisenia andrei* je stabilně zaveden v laboratořích Recetox a řídí se standardní operační procedurou, která byla navržena v souladu s OECD a ISO normami [90, 91]. Chovný substrát se skládá z vysušeného a přesátého zahradního substrátu, vysušeného hnoje a rašeliny v poměru 50:40:10. Směs je ovlhčena na 60–80 % WHC a pH upraveno na hodnotu 6–7 pomocí uhličitanu vápenatého. Žížaly jsou chovány v klimatizované místnosti při teplotě 20 ± 2 °C a minimálně jednou týdně krmeny granulovaným kravským hnojem.

Do testu byli vybíráni dospělí jedinci s plně vyvinutým opaskem o hmotnosti 250 až 350 mg.

Analýza vzorků probíhala podobně jako u vzorků půd. Pouze před extrakcí byl každý vzorek rozetřen s 6 g bezvodého síranu sodného a před přečištěním na kolonkách byla zařazena gelová permeační chromatografie (gel permeation chromatography, GPC), kterou byly odstraněny vysokomolekulární látky jako lipidy a barviva. Samotná GPC probíhala v chloroformu, proto bylo nutné vzorky nejprve na evaporátoru odfoukat do poslední kapky, následně bylo přidáno 5 ml chloroformu a na GPC byl nadávkován 1 ml vzorku. Eluáty byly upraveny na objem 2 ml (kalibrovaná vialka) a po 1 ml naneseny na kolonky s aktivovaným silikagelem. Vznikly tím opět desetkrát zředěné vzorky.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Aplikace polutantů do půd

Cílená koncentrace pro fenanthren a pyren byla 100 mg/kg<sub>dw</sub>, pro lindan a p,p'-DDT 10 mg/kg<sub>dw</sub> a pro PCB 153 1 mg/kg<sub>dw</sub>. Koncentrace byly voleny vyšší než v předcházejících studiích, protože se počítalo s jejich úbytkem během stárnutí a bylo potřeba zajistit, aby i po dlouhé době bylo možno provést bioakumulační test a stále jsme byli nad limity detekce u exponovaných žížal. Jedinou výjimkou bylo PCB 153, jehož komerčně dostupné balení je v hmotnosti 10 mg a u této látky nebyl očekáván významný pokles její koncentrace během stárnutí. Následující Tabulka 8 ukazuje nalezené hodnoty koncentrací u vzorků půd odebraných ihned po kontaminaci.

Tabulka 8. Cílené a nalezené koncentrace studovaných látek ihned po kontaminaci, rozptyl měření (n =3) a odchylka mezi zjištěnými a cílenými hodnotami (ztráty).

		Fenanthren	Pyren	Lindan	p,p'-DDT	PCB 153
Cílená koncentrace (mg/kg)		100	100	10	10	1
S1	Koncentrace po kontaminaci (mg/ kg <sub>dw</sub> )	113	121	6,80	8,42	0,754
	RDS (%)	13,8	8,7	9,9	11,9	11,5
	Ztráty (%)	13%	21%	-32%	-16%	-25%
S2	Koncentrace po kontaminaci (mg/ kg <sub>dw</sub> )	103,7	122,3	8,10	8,20	0,676
	RDS (%)	2,0	4,9	10,0	9,0	7,0
	Ztráty (%)	4%	22%	-19%	-18%	-32%
S3	Koncentrace po kontaminaci (mg/ kg <sub>dw</sub> )	107,9	125,3	9,37	9,88	0,777
	RDS (%)	3,4	0,9	8,7	7,4	7,3
	Ztráty (%)	8%	25%	-6%	-1%	-22%

Výsledná koncentrace pro PAHs byla u všech kontaminovaných půd vyšší než cílená koncentrace. Naopak, u chlorovaných látek byla výsledná koncentrace o 1 až 32 % nižší než cílená koncentrace. V našich předcházejících studiích, která využívala stejnou metodiku kontaminace [1, 67, 88] byly pozorovány zpravidla větší ztráty. Co je důležitější než rozdíl mezi cílenou a výslednou koncentrací je, zda byla kontaminace homogenní. V této práci byl rozdíl mezi třemi nezávislými vzorky půd maximálně 13,8 % (u půdy S1 pro fenanthren), což lze považovat za velmi dobrý výsledek vzhledem k množství kontaminované půdy. Půda S1 byla ornou půdou, které bylo zapotřebí kontaminovat více než 8 kg (váha suché půdy) a navíc tato půda po ovlhčení tvořila hrudky, které se velmi těžko roztíraly. U půd S2 a S3 (TTP a LP) jsou rozdíly mezi vzorky dokonce menší, což dokládá, že pokud je kontaminace provedena důkladně, lze zvolený postup kontaminace doporučit i pro další studie.

Rozdíly mezi počátečními koncentracemi v jednotlivých půdách byly způsobeny ztrátami, degradací a těkavostí látek během kontaminace. V předcházejících studiích byly při

kontaminaci velkých objemů půd (kilogramy) pozorovány podobné rozdíly v počátečních koncentracích [1, 70, 88].

## 4.2 Stárnutí v půdách

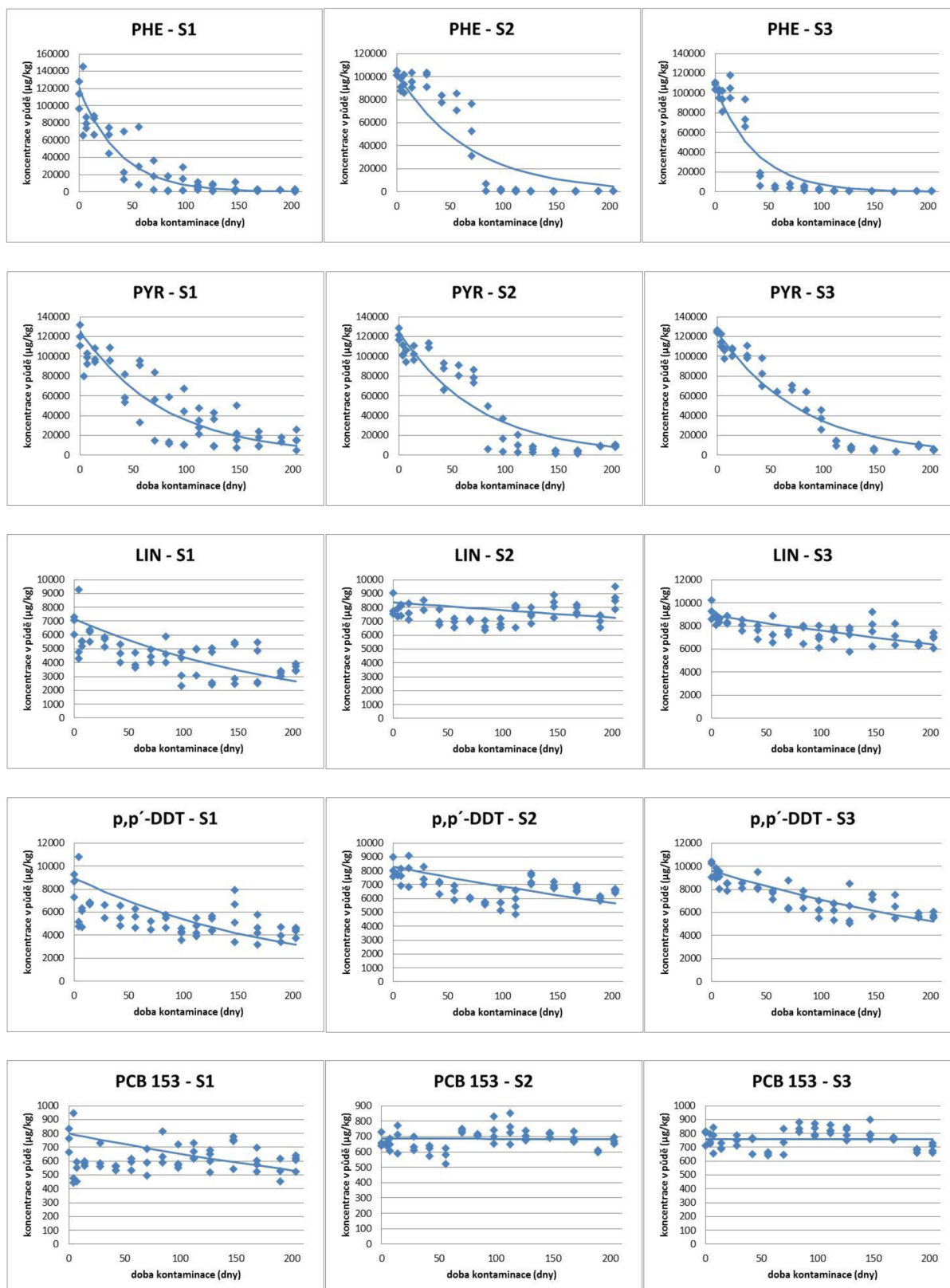
Kontaminované půdy byly vzorkovány po 0, 4, 7, 14 dnech a pak dále v dvoutýdenních intervalech po kontaminaci. Vzorky byly zamraženy na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a uschovány do doby analýzy. Předpoklad byl, že k ustálení koncentrace dojde nejdříve za 100 dní. Tento předpoklad vycházel z předcházející studie [1], kde byl pozorován dramatický úbytek sledovaných látek (obzvláště PAHs) během expozice žížal. Cílem bylo získat „ustálenou“ koncentraci látek, tak aby situace v půdě odpovídala dlouhodobé kontaminaci (tedy ne situaci „po havárii“ nebo „úniku látek“). V studiích zabývajících se stárnutím kontaminace jsou půdy sledovány často 200 i více dní [92-94]. Po uplynutí této doby (14 týdnů, tj. 98 dní) bylo zřejmé, že k ustálení koncentrací všech sledovaných látek nedošlo, a proto byly půdy sledovány dál. Koncentrace PAHs se začala ustalovat po 126 dnech (18 týdnů) od kontaminace, u chlorovaných látek o několik týdnů dříve.

Vlivem vysoké variability dat pro PAHs mezi vzorky odebranými z jednotlivých sklenic (každá půda byla skladována ve 4 identických sklenicích) byl jejich obsah po 24 týdnech znovu promíchán. Po této opětovné homogenizaci kontaminace byly půdy opět rozděleny do jednotlivých sklenic a koncentrace v nich byla dále sledována (27 a 29 týdnů od kontaminace). Až na PAHs u S1 byly koncentrace mezi jednotlivými vzorky (sklenicemi) homogenní v obou odběrech a ani koncentrace mezi odběry se významně nelišily, proto byl po 31 týdnech od kontaminace započat bioakumulační test. Důvod pro rozdílný osud látek v jednotlivých půdách není znám. Víčka sklenic byla utěsněna parafilmem, vlhkost půdy byla před každým odběrem kontrolována vážením sklenic, sklenice byly v temnu a po každém odběru byla změněna jejich pozice v regále. Také v literatuře vysvětlení nebylo nalezeno.

Výtěžnost pro tyto vzorky byly  $72 \pm 11\%$  pro D-PHE,  $75 \pm 8\%$  pro D-PYR,  $70 \pm 6\%$  pro PCB 30 a  $84 \pm 5\%$  pro PCB 155. Od hodnot upravených dle výtěžnosti byly odečteny koncentrace sledovaných látek v kontrolních vzorcích (blank), ty tvořily průměrně 0,1% výsledku pro PAHs, chlorované látky nebyly v blancích detekovány. Výsledné koncentrace (průměr,  $n = 3$ ) látek během stárnutí lze najít v přílohách v Tabulkách 12 (PAHs) a 13a a 13b (chlorované látky).

Změna koncentrace látek v půdě během experimentu byla pozorována u všech půd a sledovaných látek (ANOVA,  $p < 0,01$ ) s výjimkou PCB 153 u půdy S3. Následující grafy (1-15) ukazují průběh koncentrací pro jednotlivé látky v jednotlivých půdách. Modelování bylo provedeno v Microsoft Excelu 2010 pro Windows pomocí doplňku Řešitel. Výsledné hodnoty  $k_{\text{deg}}$  jsou srovnatelné s hodnotami vypočítanými pomocí programu STATISTICA. Tabulka 9 poté shrnuje degrační konstanty ( $k_0, \text{d}^{-1}$ ).

Grafy 1 – 15. Průběh koncentrací jednotlivých látek ve sledovaných půdách.



Tabulka 9. Degradální konstanty  $k_0$  během stárnutí kontaminace pro jednotlivé látky a půdy ( $d^{-1}$ ).

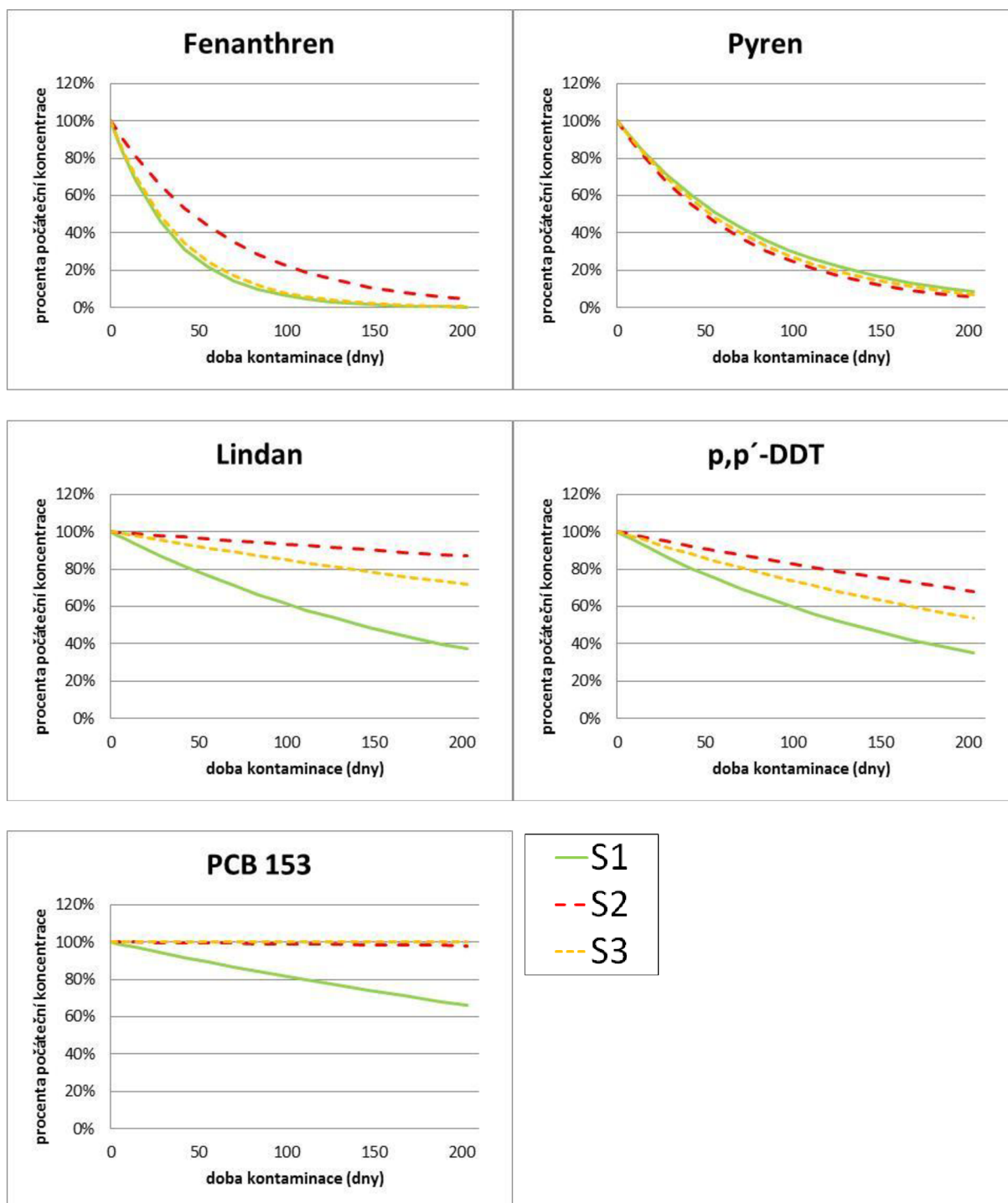
	S1	S2	S3
Fenanthren	0,0267	0,0149	0,0265
Pyren	0,0127	0,0134	0,0129
Lindan	0,0049	0,0007	0,0016
p,p'-DDT	0,0051	0,0019	0,0030
PCB 153	0,0020	0,0000	0,0000

Degradální konstanty byly vyšší pro PAHs než pro chlorované látky. V literatuře lze najít důkazy o tom, že půdní mikroorganismy jsou schopny degradovat fenanthren [95, 96] i pyren [97, 98]. Bossert et al. [99] uvádějí, že menší, více rozpustné a méně hydrofobní PAHs jsou obecně degradovány ve větší míře než větší, méně rozpustné a více hydrofobní PAHs. Tento fenomén byl rovněž pozorován v této studii, kde hodnoty  $k_0$  pro fenanthren byly vyšší než pro pyren ve všech studovaných půdách. Jako důsledek toho jevu můžeme u menších PAHs očekávat snížení rizik pro životní prostředí. Je ale třeba poznamenat, že právě díky biodegradaci, která je proměnlivá v různých půdách, je posouzení rizik PAHs náročné a obecné závěry je těžké definovat.

V naší předcházející studii [1] byly naměřeny zhruba desetinásobné hodnoty degradačních koeficientů  $k_0$ . Tyto výsledky jsou ale těžko porovnatelné, protože v této studii byly použity zhruba desetinásobně vyšší počáteční koncentrace studovaných látek, nešlo o úbytek látek během expozice organismů, a také půdy byly sledovány po dobu 217 dnů místo 21. Nicméně, ve zmiňované studii byly degradační konstanty rovněž vyšší pro PAHs než pro chlorované látky, což bylo pravděpodobně způsobeno již zmíněnou mikrobiální degradací fenanthrenu a pyrenu.

Pokud přepočítáme koncentrace v půdách na procenta počáteční hodnoty (koncentrace v půdě  $C_s$  podělíme koncentrací naměřenou ihned po kontaminaci  $C_0$ ), můžeme průběh koncentrací porovnávat mezi jednotlivými půdami. Grafy 16 – 20 tyto trendy ukazují. Z grafů je patrné, že koncentrace PAHs se u všech sledovaných půd chovaly podobně (jak napovídají již hodnoty degradačních konstant). U chlorovaných látek klesaly koncentrace nejvíce u S1, tedy půdy s nejmenším obsahem organického uhlíku, kde lze předpokládat i menší sorpci látek na organický materiál a potenciálně vyšší možnost degradace nebo těkání. Naopak nejméně klesaly koncentrace u půdy S2, tedy půdy se středním obsahem organického uhlíku. Z výsledků je tedy patrné, že nejen obsah organického uhlíku, ale pravděpodobně také jeho vlastnosti a další charakteristiky půd hrají důležitou roli v chování látek v půdách. V naší předchozí studii [1] také nebyl pozorován přímý vztah mezi hodnotami  $k_0$  a obsahem organického uhlíku.

Grafy 16 – 20. Pokles koncentrací látek v půdách během stárnutí kontaminace přepočítaný na procenta hodnot naměřených ihned po kontaminaci (den 0).



### 4.3 Bioakumulační test

Do bioakumulačního testu byly zahrnuty pouze půdy S1 a S3. S půdou S2 bylo zacházeno stejně jako s ostatními půdami, přesto v ní z neznámého důvodu docházelo k úhynu žížal cca dva dny po expozici (přibližně z 80%). Byly prověřeny následující varianty:



- Porovnání charakteristik dané půdy z odběru ze studie Šmídová and Hofman [1]
- Kontrola pH půdy
- Dodatečné odpaření zbytkového rozpouštědla

Půda použitá v této studii se svými vlastnostmi významně nelišila od půdy z předcházející studie, kde mortalita exponovaných žížal byla průměrně 8 % (stejné místo odběru, ale jiný čas). Při porovnání s našimi dalšími experimentálními daty (expozice žížal ve 20 půdách různých fyzikálně-chemických vlastností, dosud nepublikováno) vyplynulo, že ani pH (4,6) by nemělo mít zásadní vliv na úhyn žížal. Bylo sice nižší než u půd S1 a S3 (7,2 pro obě půdy), nicméně ve zmiňovaném experimentu byla úmrtnost žížal v půdách s pH 3–4 do 30%. Po kontaminaci půdy rozpouštědlem bylo vážením zjištěno, že v ní zůstává 16 g rozpouštědla. Tato hodnota byla srovnatelná s půdami S1 a S3 (19 a 13 g). Přesto byla půda S2 znovu ponechána v digestoři několik hodin pro odpaření zbytkového rozpouštědla, následně byla doplněna odpařenou vodou a bioakumulační test byl založen znovu. I poté ale došlo k významnému úhynu žížal, a proto byla půda S2 z bioakumulačního experimentu vyloučena. Jako vysvětlení připadá v úvahu možná kombinace vlivů (pH, zvýšená citlivost chovu, jiné půdní charakteristiky).

#### 4.3.1 Koncentrace látek v půdě během expozice

Pokles koncentrace látek v čase byl statisticky významný (ANOVA,  $p < 0,05$ ) pouze pro fenanthren a lindan u půdy S1 a pyren u půdy S3. Ve studii Šmídová a Hofman [1] byl pokles koncentrace látek v půdách během expozice žížal významný ve všech půdách (celkem šest půd s rozdílným obsahem OC) a pro všechny studované látky (ty byly shodné s touto studií) kromě PCB 153 a p,p'-DDT u půd s vysokým obsahem OC (7,9 a 20,2%). Tyto výsledky tedy naznačují, že vliv úbytku látek v půdě během expozice žížal u laboratorně kontaminovaných půd lze odstranit dostatečně dlouhou dobou stárnutí kontaminace.

Výtěžnost pro tyto vzorky byly  $87 \pm 10$  % pro D-PHE,  $87 \pm 8$  % pro D-PYR,  $64 \pm 18$  % pro PCB 30 a  $70 \pm 11$  % pro PCB 155. Od hodnot upravených dle výtěžnosti byly odečteny koncentrace sledovaných látek v kontrolních vzorcích (blank), ty tvořily průměrně 2,7% výsledku pro PHE, 0,1% pro PYR, chlorované látky nebyly v blankách detekovány. Výsledné koncentrace (průměr,  $n = 3$ ) látek v půdách během expozice lze najít v přílohách v Tabulkách 14 (PAHs) a 15 (chlorované látky).

Přehled degradačních konstant  $k_0$  během bioakumulačního experimentu ukazuje Tabulka 10. Kromě fenanthrenu byly degradační konstanty během expozice žížal vyšší než během stárnutí kontaminace (agingu). Důvodem byl pravděpodobně vliv žížal, které podle některých studií zvyšují rychlost degradace látek v půdách [100, 101]. Zvýšená rychlost degradačních procesů za přítomnosti žížal byla prokázána pro PAHs [100], DDT [102] i PCBs [101, 103]. Pohyb žížal v půdě a jejich zavrtávání zvyšuje provzdušnění půdy, zlepšuje transport a distribuci mikroorganismů schopných degradace sledovaných látek a tím také zvyšují možnost kontaktu

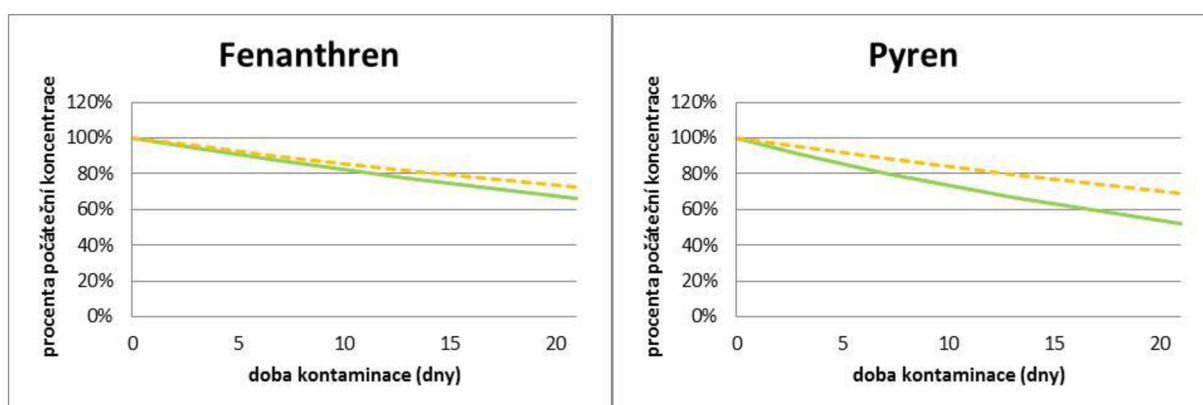
látek a mikroorganismů [103, 104]. V neposlední řadě přeměna organické hmoty a zvýšení dostupnosti nutrientů může obecně zvýšit mikrobiální aktivitu [105].

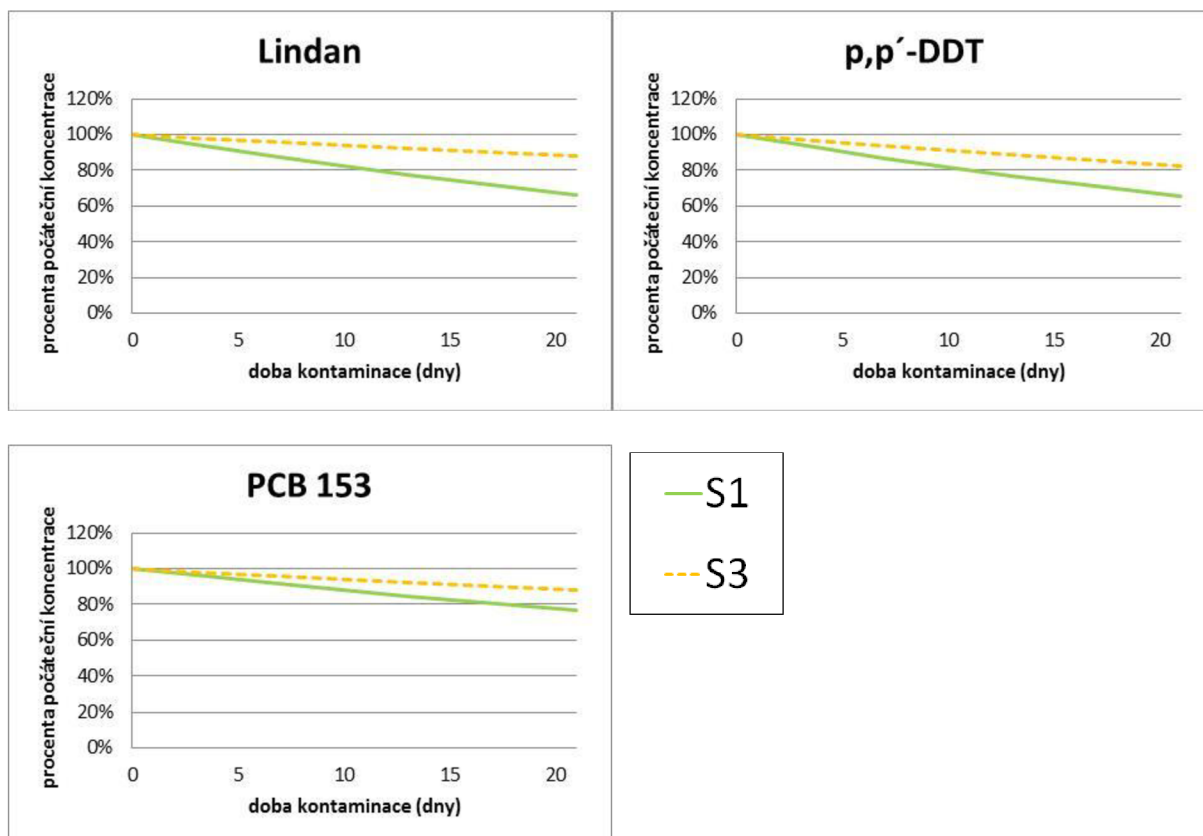
Tabulka 10. Degradční konstanty  $k_0$  během bioakumulačního experimentu pro jednotlivé látky a půdy ( $d^{-1}$ ).

	S1	S3
Fenanthren	0,0197	0,0154
Pyren	0,0308	0,0175
Lindan	0,0198	0,0060
p,p'-DDT	0,0203	0,0096
PCB 153	0,0128	0,0061

Následující grafy (26 – 30) ukazují průběh koncentrací látek v půdách S1 a S3 během expozice žížal. Z grafů je patrné, že degradace byla pomalejší pro všechny látky u půdy S3, která měla vyšší obsah organické hmoty. To je pravděpodobně zapříčiněno větší sorpcí látek na organickou hmotu a související nižší biodostupností látek pro případnou degradaci/těkání. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2, v naší předcházející studii [1] nebyl pozorován vztah mezi rychlostí degradace látek v půdě a obsahem organického materiálu. Ve zmíněné studii šlo ale o čerstvou kontaminaci (mezi kontaminací a počátkem bioakumulačního testu byly pouze 4 dny) a je možné, že za tu dobu nebyla ustálena rovnováha mezi kontaminanty a sorpčními vlastnostmi půd. K jednoznačným závěrům by bylo zapotřebí otestovat větší množství půd s rozdílným obsahem OC.

Grafy 26 – 30. Pokles koncentrací látek v půdách během bioakumulačního testu přepočítaných na procenta hodnot naměřených ihned po kontaminaci (den 0).





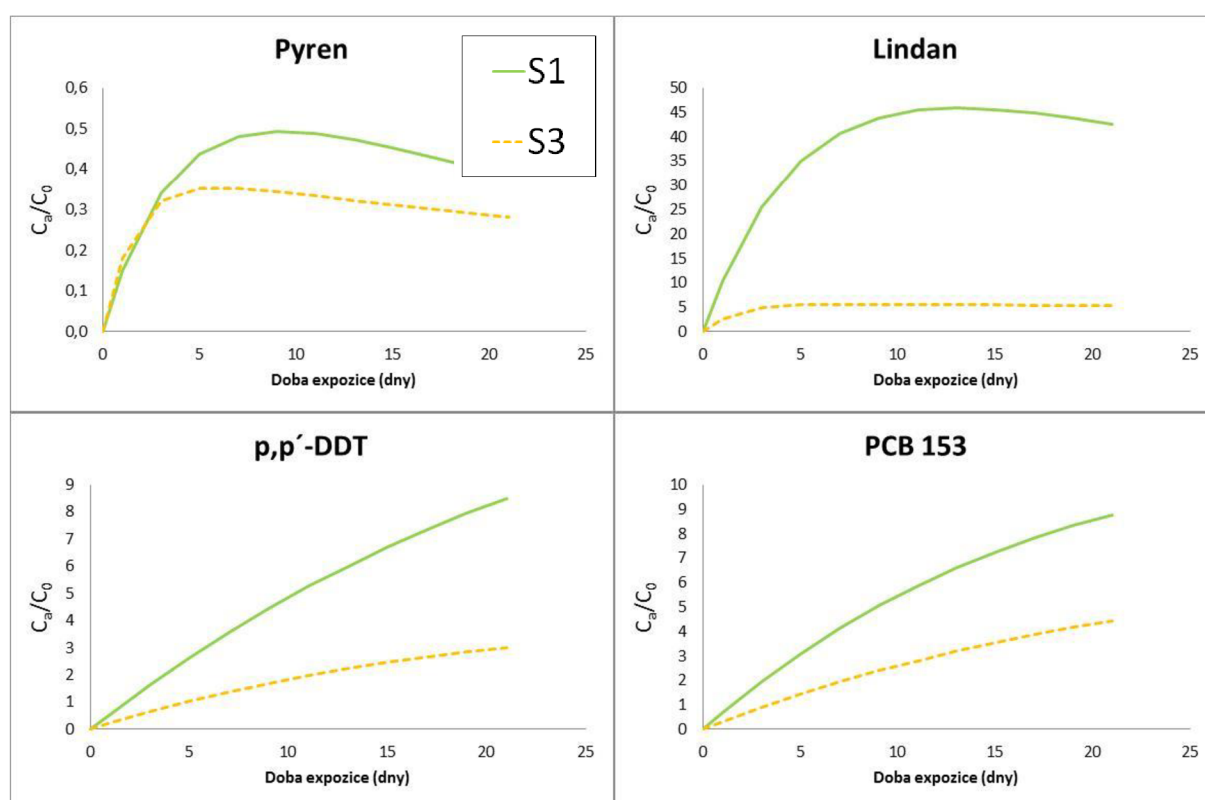
#### 4.3.2 Kinetika příjmu látek žížalami

Mortalita exponovaných organismů byla < 10%, tak jak požaduje norma OECD 317 [59]. Výtěžnosti pro tyto vzorky byly  $81 \pm 7 \%$  pro D-PHE,  $76 \pm 12 \%$  pro D-PYR,  $66 \pm 16 \%$  pro PCB 30 a  $75 \pm 9 \%$  pro PCB 155. Od hodnot upravených dle výtěžnosti byly odečteny koncentrace sledovaných látek v kontrolních vzorcích (blank). Ty tvořily průměrně 2,0% výsledku pro PYR, chlorované látky nebyly v blankách detekovány. Naměřené koncentrace fenanthrenu v exponovaných žížalách byly kromě prvních tří odběrů (1, 3 a 5 den expozice) srovnatelné s hodnotami naměřenými v kontrolních vzorcích. Výsledné koncentrace (průměr,  $n = 3$ ) látek v žížalách během expozice lze najít v přílohách v Tabulkách 16 (PAHs) a 17 (chlorované látky).

Přesný důvod, proč v některých vzorcích nebyl PHE detekován mi není znám. Počáteční koncentrace v půdě na začátku expozice byla  $1,76 \text{ mg kg}_{\text{soil dw}}^{-1}$  u půdy S1 a  $0,75 \text{ mg kg}_{\text{soil dw}}^{-1}$  u půdy S3, což je asi desetkrát nižší hodnota než v předcházejících studiích [1, 67, 88]. Spolu s nižšími BAFs pro fenanthren uváděnými v literatuře [52, 53, 88] a předpokládanou sníženou dostupností látek pro testované organismy vlivem sorpce mohlo dojít k menší akumulaci PHE. Zředěním vzorků (desetkrát) se pak koncentrace fenanthrenu mohly dostat na hladinu srovnatelnou s kontrolními vzorky (blanky). Pro vyslovení závěrů je zapotřebí zbylé extrakty zahustit a znovu analyzovat.

Abychom byli schopni porovnat půdy s rozdílnou počáteční koncentrací sledovaných látek, byly koncentrace látek v žížalách ( $C_a$ ) poděleny počáteční koncentrací látek v jednotlivých půdách ( $C_0$ ). Kinetika příjmu je pak znázorněna na Grafech 31 – 34. Graf kinetiky příjmu fenanthrenu není znázorněn, protože pouze ve třech odběrech byly nalezeny koncentrace odlišné od pozadí a tento počet hodnot neumožňoval modelovat chování sledované látky v žížalách.

Grafy 31 – 34. Kinetika příjmu sledovaných látek žížalami během 21 denní expozice. Koncentrace v žížalách ( $C_a$ ) byly poděleny počáteční koncentrací studovaných látek ( $C_0$ ) v půdách S1, respektive S3.



V naší předcházející studii [1] byly u PAHs a lindanu pozorovány zalomené bioakumulační křivky („peak-shaped“), což bylo způsobeno úbytkem látek v půdě během expozice a souvisejícím snížením jejich biodostupného podílu. V této diplomové práci byl pokles koncentrace látek v půdě během expozice statisticky významný pro fenanthren a lindan u půdy S1 a pro pyren u půdy S3. Přesto výsledkem pro pyren byly zalomené bioakumulační křivky. Může to být způsobeno snížením biodostupného podílu látek během stárnutí kontaminace, kdy rychlost eliminace pyrenu převyšovala rychlost příjmu. Skutečnost, že byl fenanthren detekován u obou půd v prvních třech odběrech může také naznačovat zahnuté bioakumulační křivky (tzn. po 7 dnech expozice se koncentrace snížily natolik, že je již

nebylo možné odlišit od kontrolních vzorků), pro potvrzení této hypotézy je zapotřebí dalšího měření.

Ve zmiňované studii [1] došlo k ustálení rovnováhy mezi koncentracemi lindanu v půdě a žížalách pouze u půd s nejvyšším obsahem organického uhlíku (7,9 a 20,2%). V této studii došlo k ustálení rovnováhy v půdě S1 i S3, v obou případech již po 5 dnech expozice (koncentrace v žížalách ve třech po sobě následujících odběrech se statisticky nelišily, ANOVA,  $p > 0,05$ ). Porovnáním s výsledky předcházející studie tedy vyplývá, že pro chlorované látky s nižším  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow} < 5$ ) je vliv úbytku látek během expozice možné odstranit dostatečně dlouhou dobou stárnutí kontaminace. K potvrzení této teorie je však zapotřebí dalšího testování.

Na druhou stranu, v minulé studii došlo k ustálení rovnováhy p,p'-DDT a PCB 153 po 11 dnech expozice. V této studii k dosažení rovnováhy ani po 21 dnech nedošlo. Také poměry  $C_a/C_0$  byly pro tyto dvě látky zhruba pětinašobně nižší než v předešlé studii a lze tedy očekávat další růst tohoto poměru, pokud by expozice byla delší. Může to být zapříčiněno již zmíněnou sorpcí látek na organickou hmotu a související horší dostupností látek pro příjem žížalami. Tyto výsledky naznačují, že nejen u laboratorně kontaminovaných půd, ale také pro testování reálně kontaminovaných půd je znalost kinetiky příjmu látek exponovanými organismy nezbytná. Porovnáním výsledků obou studií se jeví, že k ustálení rovnováhy chlorovaných látek s vysokým  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow} > 5$ ) je zapotřebí delší doba expozice u dlouhodobě kontaminovaných půd než u půd laboratorně/krátkodobě kontaminovaných.

Tabulka 11 shrnuje rychlostní konstanty příjmu látky do organismu a eliminace látky. Pomocí těchto konstant lze také vypočítat hodnoty bioakumulačních faktorů (BAF) jako poměr  $k_s$  a  $k_e$ . Pro fenanthren nebylo možné pro nedostatek hodnot zmíněné veličiny vypočítat.

Tabulka 11. Rychlostní konstanty příjmu látky do organismu  $k_s$  ( $\text{ng}_{\text{soil}} \text{g}_{\text{earthworm}} \text{dw}^{-1}, \text{d}^{-1}$ ) a rychlostní konstanta eliminace látky  $k_e$  ( $\text{d}^{-1}$ ) během bioakumulačního experimentu pro jednotlivé látky a půdy.

	S1			S3		
	$k_s$	$k_e$	BAF	$k_s$	$k_e$	BAF
Fenanthren	-	-	-	-	-	-
Pyren	0,173	0,265	0,654	0,244	0,621	0,39
Lindan	11,584	0,195	59,5	3,547	0,599	5,9
p,p'-DDT	0,573	0,013	44,5	0,231	0,037	6,2
PCB 153	0,703	0,038	18,5	0,319	0,035	9,2

V předcházející studii byl pozorován vztah mezi konstantou příjmu látky do organismu  $k_s$  a obsahem organického uhlíku [1]. Pokud porovnáme hodnoty  $k_s$  z obou studií (Tabulka 12),

zjistíme, že konstanty pro lindan jsou úměrné předešlé studii a OC, hodnoty pro p,p'-DDT a PCB 153 jsou naproti tomu zhruba desetkrát nižší než hodnoty odpovídající příslušným hodnotám OC ze studie Šmídová and Hofman [1]. Pravděpodobnou příčinou je to, že vzhledem k nízké hodnotě  $k_s$  k ustálení rovnováhy mezi žížalami a půdou po 21-denní expozici nedošlo.

Tabulka 12. Obsah organického uhlíku (OC) a rychlostní konstanty příjmu látky do organismu  $k_s$  ( $\text{ng}_{\text{soil}} \text{g}_{\text{earthwormy}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) ze studie Šmídová a Hofman [1] pro půdy NS1 – NS6 a z této studie pro půdy S1 a S3 (tučně).

	OC	LIN	p,p'-DDT	PCB 153
NS 1	0,47	24,7	6,7	3,8
NS 2	1,55	17,3	5,5	5,2
<b>S1</b>	<b>1,59</b>	<b>11,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>
NS 3	1,88	7,8	1,2	1,0
NS 4	2,59	3,6	3,4	1,6
NS 5	7,88	6,6	2,8	2,6
<b>S3</b>	<b>9,30</b>	<b>3,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>
NS 6	20,19	1,9	2,6	1,0

Rychlostní konstanty příjmu  $k_s$  pro pyren byly deset až stokrát nižší než v předcházející studii, zatímco rychlostní konstanty eliminace  $k_e$  byly srovnatelné [1]. To by napovídalo tomu, že v této práci byla biodostupná frakce vlivem stárnutí kontaminace snížena (počáteční koncentrace látek v obou studiích jsou v jednotkách  $\text{mg kg}_{\text{soil}}^{-1} \text{dw}^{-1}$ ), a proto byly pozorovány zalomené bioakumulační křivky, ačkoli v půdách byl zaznamenán statisticky nevýznamný pokles sledovaných látek.

Rychlostní konstanty eliminace látky  $k_e$  ( $\text{d}^{-1}$ ) byly pro všechny studované látky vyšší u půdy s vyšším obsahem OC, což je shodné s výsledkem studie Šmídová a Hofman [1]. Žádný další vztah mezi vlastnostmi půdy a hodnotami  $k_e$  nebyl v předešlé studii pozorován a k vyvození vztahů z této studie bylo protestováno málo půd.

V literatuře lze nalézt hodnoty  $k_s$  a  $k_e$  jen velmi výjimečně. Sousa et al. [106] publikovali asimilační konstanty ( $\text{pg}/\text{animal}/\text{d}$ ) a  $k_e$  pro  $^{14}\text{C}$ -lindan u terestrických stejnonožců. Například rychlostní konstanta eliminace v jejich studii se pohybovala v rozmezí 0,2 a 0,4  $\text{d}^{-1}$ . V této studii byly naměřené hodnoty  $k_e$  pro lindan 0,2 a 0,6  $\text{d}^{-1}$ . Amorim et al. [5] publikovali asimilační a eliminační konstanty pro  $^{14}\text{C}$ -lindan u roupice *Enchytraeus albidus*. Ve studii Belfroid et al. [107] byly uvedeny hodnoty  $k_s$  pro PCB 153 u žížal *Eisenia andrei* exponovaných kontaminovanou potravou. Kromě naší předcházející studie [1] si nejsem vědoma žádné další studie, která by poskytovala hodnoty  $k_s$  i  $k_e$  pro látky a druh žížal použité při tomto experimentu.

BAFs vypočítané na základě poměru  $k_s$  a  $k_e$  byly výrazně nižší u půdy s vysokým obsahem organického uhlíku S3 než u půdy s nízkým obsahem organického uhlíku S1. Stejně výsledky byly pozorovány i v naší předcházející studii, kde byly hodnoty BAF vypočítány stejným způsobem [1, Supplementary material]. Ve zmiňované studii se BAFs mezi jednotlivými půdami lišily až o jeden řád, podobných výsledků bylo dosaženo i v této práci.

## 5 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byl sledován osud pěti vybraných HOCs (fenanthren, pyren, lindan, p,p'-DDT a PCB 153) ve třech reálných půdách (orná půda, trvalý lesní porost, lesní půda). Půdy byly vybrány tak, aby měly rozdílný obsah organického uhlíku (1,6, 3,6 a 9,3 %), který je považován za jeden z klíčových faktorů určujících biodostupnost. Půdy byly laboratorně kontaminovány a jejich koncentrace byla pravidelně sledována po dobu 217 dnů. Pokles koncentrace látek během stárnutí kontaminace nastal u všech půd a sledovaných látek kromě PCB 153 u půdy nejvyšším obsahem OC (9,3%). Nejdramatičtější pokles byl sledován u PAHs, pravděpodobnou příčinou je degradace těchto látek mikroorganismy. Mikrobiální degradace nebyla v této diplomové práci studována, příslušné informace lze ale najít v literatuře. Po ukončení doby stárnutí byly získány kontaminované půdy se stabilní koncentrací látek, které měly reprezentovat dlouhodobou kontaminaci v reálném prostředí.

Poté byl založen bioakumulační test se žížalou *Eisenia andrei* a příjem látek z půdy do žížal byl sledován v průběhu 21 dnů (odběry v liché dny). Zároveň byly sledovány koncentrace látek v půdách během expozice. Úbytek látek z půd během expozice byl rychlejší než v průběhu stárnutí kontaminace. To může být způsobeno jednak akumulací látek do žížal, jednak přítomností samotných žížal, které, podle některých studií, zvyšují rychlost degradace látek v půdách. Zvýšená rychlost degradačních procesů za přítomnosti žížal byla zdůvodněna zejména jejich pohybem a zavrtáváním v půdě, kterým se zvyšuje provzdušnění půdy, zlepšuje transport a distribuce mikroorganismů schopných degradace sledovaných látek a tím se také zvyšuje možnost kontaktu látek a mikroorganismů.

Z naměřených koncentrací v exponovaných žížalách byly namodelovány křivky příjmu látek z půdy do žížal a vypočítány rychlostní konstanty příjmu  $k_s$  ( $\text{ng}_{\text{soil}} \text{g}_{\text{earthworm}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) a eliminace látek  $k_e$  ( $\text{d}^{-1}$ ). Z výsledků vyplynulo:

- pro PAHs byly pozorovány zalomené bioakumulační křivky přesto, že se koncentrace látek v půdě během expozice žížal zpravidla neměnily. To může to být způsobeno snížením biodostupného podílu látek během stárnutí kontaminace, kdy rychlost eliminace pyrenu převyšovala rychlost příjmu.
- pro chlorované látky s nižším  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow} < 5$ , zastoupené lindanem v této studii) je vliv úbytku látek během expozice možné odstranit dostatečně dlouhou dobou stárnutí kontaminace,
- k ustálení rovnováhy mezi exponovanými žížalami a koncentracemi látek v půdách u chlorovaných látek s vysokým  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow} > 5$ , zastoupené p,p'-DDT a PCB 153 v této studii) je zapotřebí delší doba expozice u dlouhodobě kontaminovaných půd než u půd laboratorně/krátkodobě kontaminovaných.

K potvrzení závěrů pro PAHs je zapotřebí dodatečné stanovení koncentrací fenanthrenu v koncentrovaných vzorcích. Příčinou, proč nebyl fenanthren v některých vzorcích detekován, byly pravděpodobně, kromě zmíněného zředění vzorků při analýze, nižší koncentrace látky v půdě na začátku expozice a snížená biodostupnost vlivem sorpce.



## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Šmídová, K. and J. Hofman. Uptake kinetics of five hydrophobic organic pollutants in the earthworm *Eisenia fetida* in six different soils. *Journal of Hazardous Materials* 2014, vol. 267, no. 0, pp. 175-182.
- [2] Lanno, R., J. Wells, J. Conder, K. Bradham and N. Bast. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004, vol. 57, no. 1, pp. 39-47.
- [3] Semple, K.T., K.J. Doick, K.C. Jones, P. Burauel, A. Craven and H. Harms. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* 2004, vol. 38, no. 12, pp. 228A-231A.
- [4] Reichenberg, F. and P. Mayer. Two complementary sides of bioavailability: Accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006, vol. 25, no. 5, pp. 1239-1245.
- [5] Amorim, M.J., P.J. Sousa, A.J.A. Nogueira and A.M.V.M. Soares. Bioaccumulation and elimination of <sup>14</sup>C-lindane by *Enchytraeus albidus* in artificial (OECD) and a natural soil. *Chemosphere* 2002, vol. 49, no. 3, pp. 323-329.
- [6] Hofman, J., A. Rhodes, and K.T. Semple. Fate and behaviour of phenanthrene in the natural and artificial soils. *Environmental Pollution* 2008, vol. 152, no. 2, pp. 468-475. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.05.034
- [7] Peters, R., J.W. Kelsey and J.C. White. Differences in p,p'-DDE bioaccumulation from compost and soil by the plants *Cucurbita pepo* and *Cucurbita maxima* and the earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 2007, vol. 148, no. 2, pp. 539-545. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.11.030
- [8] Pignatello, J.J. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science* 1998, vol. 77, pp. 445-467.
- [9] Bielská, L., I. Hovorková, K. Komprdová, and J. Hofman. Variability of standard artificial soils: Physico-chemical properties and phenanthrene desorption measured by means of supercritical fluid extraction. *Environmental Pollution* 2012, vol. 163, no. 0, pp. 1-7.
- [10] Grathwohl, P. Influence of organic-matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic-hydrocarbons - implications on Koc correlations. *Environmental Science & Technology* 1990, vol. 24, no. 11, pp. 1687-1693.
- [11] Nam, K., N. Chung and M. Alexander. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science & Technology* 1998, vol. 32, no. 23, pp. 3785-3788.
- [12] Sun, H.W. and J.G. Li. Availability of pyrene in unaged and aged soils to earthworm uptake, butanol extraction and SFE. *Water, Air, & Soil Pollution* 2005, vol. 166, no. 1-4, pp. 353-365.
- [13] Belfroid, A.C., D. Sijm and C.A.M. Van Gestel. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Research* 1996, vol. 4, pp. 276-299.

- [14] Bruner, K.A., S.W. Fisher and P.F. Landrum. The Role of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, In Contaminant Cycling: II. Zebra Mussel Contaminant Accumulation from Algae and Suspended Particles, and Transfer to the Benthic Invertebrate, *Gammarus fasciatus*. *Journal of Great Lakes Research* 1994, vol. 20, no. 4, pp. 735-750.
- [15] Bruner, K.A. and S.W. Fisher. The Effects of Temperature, Ph, and Sediment on the Fate and Toxicity of 1-Naphthol to the Midge Larvae *Chironomus-Riparius*. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* 1993, vol. 28, no. 6, pp. 1341-1360.
- [16] Ehlers, L.J. and R.G. Luthy. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environmental Science & Technology* 2003, vol. 37, no. 15, pp. 295A-302A.
- [17] Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 2000, vol. 34, no. 20, pp. 4259-4265.
- [18] Palomo, M. and A. Bhandari. Impact of aging on the formation of bound residues after peroxidase-mediated treatment of 2,4-DCP contaminated soils. *Environmental Science & Technology* 2006, vol. 40, pp. 3402-3408.
- [19] Rhodes, A.H., J. Hofman and K.T. Semple. Development of phenanthrene catabolism in natural and artificial soils. *Environmental Pollution* 2008, vol. 152, no. 2, pp. 424-430. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.072
- [20] Alexander, M. How toxic are toxic-chemicals in soil. *Environmental Science & Technology* 1995, vol. 29, no. 11, pp. 2713-2717.
- [21] Pignatello, J.J. and B.S. Xing. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science & Technology* 1996, vol. 30, no. 1, pp. 1-11.
- [22] Reid, B.J., J.D. Stokes, K.C. Jones, and K.T. Semple. Nonexhaustive cyclodextrinbased extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science & Technology* 2000, vol. 34, no.15, pp. 3174-3179.
- [23] Semple, K.T., A.W.J. Morriss and G.I. Paton. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* 2003, vol.54, no. 4, pp. 809-818.
- [24] Cuypers, C., T. Pancras, T. Grotenhuis and W. Rulkens. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-[beta]- cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 2002, vol. 46, no.8, pp. 1235-1245.
- [25] Huang, W., P. Peng, Z. Yu and J. Fu. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry* 2003, vol. 18, pp. 955-972.
- [26] Luthy, R.G., G.R. Aiken, M.L. Brusseau, S.D. Cunningham, P.M. Gschwend, J.J. Pignatello, M. Reinhard, S.J. Traina, W.J. Weber and J.C. Westall. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science & Technology* 1997, vol. 31, no. 12, pp. 3341-3347.
- [27] Weber, W.J., P.M. McGinley and L.E. Katz. A Distributed Reactivity Model for Sorption by Soils and Sediments .1. Conceptual Basis and Equilibrium Assessments. *Environmental Science & Technology* 1992, vol. 26, no.10, pp. 1955-1962.

- [28] Weber, W.J and W. Huang, W. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 4. Intraparticle heterogeneity and phase-distribution relationships under nonequilibrium conditions. *Environmental Science & Technology* 1996, vol. 30, pp. 881-888.
- [29] Xing, B.S. and J.J. Pignatello. Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science & Technology* 1997, vol. 31, no. 3, pp. 792-799.
- [30] Sun, K., B. Gao, Z. Zhang, G. Zhang, Y. Zhao and B. Xing. Sorption of atrazine and phenanthrene by organic matter fractions in soil and sediment. *Environmental Pollution* 2010, vol. 158, no. 12, pp. 3520-3526.
- [31] Ehlers, G.A.C. and A.P. Loibner. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: a review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution* 2006, vol. 141, no. 3, pp. 494-512.
- [32] van Gestel, C.A.M. and A.M.F. van Diepen. The influence of soil moisture content on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1997, vol. 36, no. 2, pp. 123-132.
- [33] European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment. In: Part II: Environmental Risk Assessment. European Commission, Luxembourg, European Chemical Bureau.
- [34] Weston, D.P. Hydrocarbon bioaccumulation from contaminated sediment by the deposit-feeding polychaete *Abarenicola pacifica*. *Marine Biology* 1990, vol. 107, pp. 159-169.
- [35] Xing, B., W.B. McGill and M.J. Dudas. Sorption of [alpha]-naphthol onto organic sorbents varying in polarity and aromaticity. *Chemosphere* 1994, vol. 28, no. 1, pp. 145-153.
- [36] Guthrie, E.A. and F.K. Pfaender. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environmental Science & Technology* 1998, vol. 32, no. 4, pp. 501-508.
- [37] Macleod, C.J.A. and K.T. Semple. Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils. *Environmental Science & Technology* 2000, vol. 34, no. 23, pp. 4952-4957.
- [38] Semple, K.T., K.J. Doick, L.Y. Wick and H. Harms. Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* 2007, vol. 150, no. 1, pp. 166-176. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.07.023
- [39] Macleod, C.J.A. and K.T. Semple. The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism. *Environmental Pollution* 2002, vol. 119, no. 3, pp. 357-364.
- [40] Cerniglia, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Current Opinion in Biotechnology* 1993, vol. 4, no. 3, pp. 331-338.
- [41] Yang, Y., N. Zhang, M. Xue, S.T. Lu and S. Tao. Effects of soil organic matter on the development of the microbial polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation potentials. *Environmental Pollution* 2011, vol. 159, no. 2, pp. 591-595.

- [42] Pesce, S.F. and D.A. Wunderlin. Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2004, vol. 54, no. 4, pp. 255-260.
- [43] Hofman, J., I. Hovorková and K.T. Semple. The variability of standard artificial soils: Behaviour, extractability and bioavailability of organic pollutants. *Journal of Hazardous Materials* 2014, vol. 264, no. 0, pp. 514-520.
- [44] Abhilash, P.C., S. Srivastava and N. Singh. Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane. *Chemosphere* 2011, vol. 82, no. 1, pp. 56-63.
- [45] Northcott, G.L. and K.C. Jones. Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environmental Science & Technology* 2001, vol. 35, no. 6, pp. 1103-1110.
- [46] Zhao, Q., P. Li, F. Stagnitti, J. Ye, D. Dong, Y. Zhang and P. Li. Effects of aging and freeze-thawing on extractability of pyrene in soil. *Chemosphere* 2009, vol. 76, no. 4, pp. 447-452.
- [47] Wolf, D.C., T.H. Dao, H.D. Scott and T.L. Lavy. Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. *Journal of Environmental Quality* 1989, vol. 18, no 1, 39-44.
- [48] Lotrario, J.B., J. Stuart, T. Lam, R.R. Arands, O.A. O'Connor and D.S. Kosson. Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: implications for sorption isotherm analyses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1995, vol. 54, no. 5, pp. 668-675.
- [49] McNamara, N.P., H.I.J. Black, N.A. Beresford, N.R. Parekh. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 2003, vol. 24, no. 2, pp. 117-132.
- [50] Kabata-Pendias, A. Trace Elements in Soils and Plants. Florida, USA, CRC Press 2010 (Fourth edition).
- [51] Bouché, A. Ecotoxicology of Earthworms, ed. P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards and F. Heimbach, Andover, UK, 1992, pp. 20-35.
- [52] Ma, W.C., J. Immerzeel and J. Bodt. Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1995, vol. 32, no. 3, pp. 226-232.
- [53] Jager, T., F.A.A. Sanchez, B. Muijs, E.G. van der Velde and L. Posthuma. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000, vol. 19, no. 4, pp. 953-961.
- [54] Belfroid, A.C., M. Sikkenk, W. Seinen, K. Vangestel and J. Hermens. The Toxicokinetic Behavior of Chlorobenzenes in Earthworm (*Eisenia-Andrei*) Experiments in Soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1994, vol. 13, no. 1, pp. 93-99.
- [55] Kelsey, J.W., A. Colina and J.C. White. Effect of species differences, pollutant concentration, and residence time in soil on the bioaccumulation of 2,2-bis(p-

- chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene by three earthworm species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005, vol. 24, no. 3, pp. 703-708.
- [56] Belfroid, A.C., M. Vandenberg, W. Seinen, J. Hermens and K. Vangestel. Uptake, bioavailability and elimination of hydrophobic compounds in earthworms (*Eisenia andrei*) in field-contaminated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1995, vol. 14, no. 4, pp. 605-612.
- [57] Shang, H., P. Wang, T. Wang, Y. Wang, H. Zhang, J. Fu, D. Ren, W. Chen, Q. Zhang and G. Jiang. Bioaccumulation of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs by earthworms in field soils of an E-waste dismantling area in China. *Environment International*, 2013, vol. 54, no. 0, pp. 50-58.
- [58] Suthar, S., S. Singh and S. Dhawan. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecological Engineering*, 2008, vol. 32, no. 2, pp. 99-107.
- [59] OECD 317: 2010. Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. OECD Publishing, 2010, Paris, France.  
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264090934-en>.
- [60] ISO17512-1: 2008. Soil Quality - Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour - Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). International Organization for Standardization, 2008, Geneva, Switzerland.
- [61] Hallgren, P., R. Westbom, T. Nilsson, S. Spörting and E. Björklund. Measuring bioavailability of polychlorinated biphenyls in soil to earthworms using selective supercritical fluid extraction, *Chemosphere*, 2006, vol. 63, no. 8, pp. 1532-1538. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.09.007
- [62] Hu, X.Y., B. Wen, S.Z. Zhang and X.Q. Shan. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, vol. 62, no. 1, pp. 26-34.
- [63] Gao, H. Bioaccumulation of hexachlorobenzene in *Eisenia foetida* at different aging stages, *Journal of Environmental Science*, 2009, vol. 21, no. 7, pp. 948-953. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62366-9
- [64] Matscheko, N., S. Lundstedt, L. Svensson, M. Harju and M. Tysklind. Accumulation and elimination of 16 polycyclic aromatic compounds in the earthworm (*Eisenia fetida*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, vol. 21, no. 8, pp. 1724-1729.
- [65] Tang, J.X., B.K. Robertson and M. Alexander. Chemical-extraction methods to estimate bioavailability of DDT, DDE, and DDD in soil, *Environmental Science and Technology*, 1999, vol. 33, no. 23, pp. 4346-4351.
- [66] Jager, T., L. Van der Wal, R. Fleuren, A. Barendregt and J.L.M. Hermens. Bioaccumulation of organic chemicals in contaminated soils: Evaluation of bioassays with earthworms, *Environmental Science and Technology*, 2005, vol. 39, no. 1, pp. 293-298.

- [67] Šmídová, K., J. Šerá, L. Bielská and J. Hofman. Influence of feeding and earthworm density on compound bioaccumulation in earthworms *Eisenia andrei*. *Environmental Pollution*, 2015, vol. 207, pp. 168-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.025>
- [68] Krauss, M., W. Wilcke and W. Zech. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) to earthworms in urban soils, *Environmental Science and Technology*, 2000, vol. 34, no. 20, pp. 4335-4340.
- [69] Mäenpää, K., K. Sorsa, M. Lyytikäinen, M.T. Leppänen and J.V.K. Kukkonen. Bioaccumulation, sublethal toxicity, and biotransformation of sediment-associated pentachlorophenol in *Lumbricus variegatus* (Oligochaeta), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, vol. 69, no. 1, pp. 121-129. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.12.019
- [70] Jager, T., R. Fleuren, E.A. Hogendoorn and G. De Korte. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), *Environmental Science and Technology*, 2003, vol. 37, no. 15, pp. 3399-3404.
- [71] Thomann, R.V., J.P. Connolly and T.F. Parkerton. An equilibrium model of organic chemical accumulation in aquatic food webs with sediment interaction, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1992, vol. 11, pp. 615-629.
- [72] Leppanen, M.T. and J.V.K. Kukkonen. Relationship between reproduction, sediment type, and feeding activity of *Lumbricus variegatus* (Muller): Implications for sediment toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, vol. 17, no. 11, pp. 2196-2202.
- [73] Hu, X.Y., B. Wen, X.Q. Shan and S.Z. Zhang. Bioavailability of pentachlorophenol to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils, *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2005, vol. 40, no. 10, pp. 1905-1916.
- [74] Li, J., H. Sun, B. Wang and G. Hu. Prediction of pyrene bioavailability in soil by earthworm (*Eisenia foetida*) bioaccumulation, *Journal of Agricul. Environ. Science* 2004, vol. 23, no. 6, pp. 1151-1155.
- [75] Sijm, D., R. Kraaij and A. Belfroid. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution*, 2000, vol. 108, no. 1, pp. 113-119.
- [76] Burgess, R.M., M.J. Ahrens, C.W. Hickey, P.J.D. Besten, D.T. Hulscher, B. van Hattum, J.P. Meador and P.E.T. Douben. An Overview of the Partitioning and Bioavailability of PAHs in Sediments and Soils. PAHs: an ecotoxicological perspective / edited by Peter E.T. Douben, 2003, ISBN 0-471-56024-3.
- [77] ECETOC. Understanding the relationship between extraction technique and bioavailability, Technical Report No. 117. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, ISSN-2079-1526-117 (online), 2013, Brussels, Belgium .
- [78] Harms, H. and T.N.P. Bosma. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 18, pp. 97-105.

- [79] Postma, J. and J.A. van Veen. Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced soil. *Microbial Ecology*, 1990, vol. 19, pp. 149-161.
- [80] Kelsey, J.W., B.D. Kottler and M. Alexander. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, 1997, vol. 31, no. 1, pp. 214-217.
- [81] Liste, H.H. and M. Alexander. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere*, 2002, vol. 46, no. 7, pp. 1011-1017.
- [82] White, J.C., J.W. Kesley, P.B. Hatzinger and M. Alexander. Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, vol. 16, no. 10, pp. 2040-2045.
- [83] Hawthorne, S.B. and C.B. Grabanski. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behavior of PAHs in a field treatment plot. *Environmental Science & Technology*, 2000, vol. 34, no. 19, pp. 4103-4110.
- [84] Latawiec, A.E., A.L. Swindell and B.J. Reid. Environmentally friendly assessment of organic compound bioaccessibility using sub-critical water. *Environmental Pollution* 2008, vol. 156, no.2, pp. 467-473.
- [85] ISO 10390: 1994. Soil quality -- Determination of pH. International Organization for Standardization, 1994, Geneva, Switzerland.
- [86] ISO 11465: 1993: Soil quality -- Determination of dry matter and water content on a mass basis -- Gravimetric method. International Organization for Standardization, 1993, Geneva, Switzerland.
- [87] Doick, K.J., P.H. Lee and K.T. Semple. Assessment of spiking procedures for the introduction of a phenanthrene-LNAPL mixture into field-wet soil. *Environmental Pollution*, 2003, vol. 126, no. 3. pp. 399-406.
- [88] Vlčková, K. and J. Hofman. A comparison of POPs bioaccumulation in *Eisenia fetida* in natural and artificial soils and the effects of aging. *Environmental Pollution*, 2012, vol. 160, no. 0, pp. 49-56.
- [89] Eljarrat, E., J. Caixach and J. Rivera. Extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from solid samples using the Randall technique, *Chemosphere*, 2000, vol. 40, no. 2, pp. 187-193.
- [90] ISO 11268-1: 1993. Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. International Organization for Standardization, 1993, Geneva, Switzerland.
- [91] OECD 207: 1984. Earthworm, Acute Toxicity Tests. Organisation for Economic Co-operation and Development, 1984, Paris, France.
- [92] Conrad, A.U., S.D. Comber and K. Simkiss. Pyrene bioavailability; effect of sediment-chemical contact time on routes of uptake in an oligochaete worm. *Chemosphere*, 2002, vol. 49, no. 5, pp. 447-454.
- [93] Chung, N.H. and M. Alexander. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environmental Science & Technology*, 1998, vol. 32, no. 7, pp. 855-860.

- [94] Slizovskiy, I.B. and J.W. Kelsey. Soil sterilization affects aging-related sequestration and bioavailability of p,p'-DDE and anthracene to earthworms. *Environmental Pollution*, 2010, vol. 158, no. 10, pp. 3285-3289.
- [95] Oyelami, A.O., U.V. Okere, K.T. Orwin, G.B. De Deyn, K.C. Jones and K.T. Semple. Effects of plant species identity, diversity and soil fertility on biodegradation of phenanthrene in soil. *Environmental Pollution*, 2013, vol. 173, pp. 231-237.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.020>
- [96] Stroud, J.L., M. Tzima, G.I. Paton and K.T. Semple. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the biodegradation of <sup>14</sup>C-phenanthrene and <sup>14</sup>C-hexadecane in soil. *Environmental Pollution*, 2009, vol. 157, no. 10, pp. 2678-2683.
- [97] Couling, N.R. M.G. Towell and K.T. Semple. Biodegradation of PAHs in soil: Influence of chemical structure, concentration and multiple amendment. *Environmental Pollution*, 2010, vol. 158, no. 11, pp. 3411-3420.
- [98] Macleod, C.J.A. and K.T. Semple. The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism. *Environmental Pollution*, 2002, vol. 119, no. 3, pp. 357-364.
- [99] Bossert, I.D. and R. Bartha. Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1986, vol. 37, pp. 490-495.
- [100] Eijsacker, H., C.A.M., Van Gestel, S. De Jonge, B. Muijs and D. Slijkerman. Polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted dredged peat sediments and earthworms: A mutual interference. *Ecotoxicology*, 2001, vol. 10, no. 1, pp. 35-50.
- [101] Singer, A.C., W. Jury, E. Luepromchai, S.C. Yahng and D.E. Crowley. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, vol. 33, no. 6, pp. 765-776.
- [102] Lin, Z., X.M. Li, Y.T. Li, D.Y. Huang, J. Dong and F.B. Li. Enhancement effect of two ecological earthworm species (*Eisenia foetida* and *Amyntas robustus* E. Perrier) on removal and degradation processes of soil DDT. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 1551-1558.
- [103] Luepromchai, E., A.C. Singer, C.H. Yang and D.E. Crowley. Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *Fems Microbiology Ecology*, 2002, vol. 41, no. 3, pp. 191-197.
- [104] Hickman, Z.A. and B.J. Reid. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International*, 2008, vol. 34, no. 7, pp. 1072-1081.
- [105] Suthar, S. Nutrient changes and biodynamics of epigeic earthworm *Perionyx excavatus* (Perrier) during recycling of some agriculture wastes. *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, no. 8, pp. 1608-1614.
- [106] Sousa, J.P., S. Loureiro, S. Pieper, M. Frost, W. Kratz, A.J.A. Nogueira and A. Soares. Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, vol. 19, no. 10, pp. 2557-2563.
- [107] Belfroid, A.C., J. Meiling, H.J. Drenth, J. Hermens, W. Seinen and K. Vangestel. Dietary Uptake of Superlipophilic Compounds by Earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, vol. 31, no. 3, pp. 185-191.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE	aceton
BAF	bioakumulační faktor
CAC	kationtová výměnná kapacita (cation exchange capacity)
DCM	dichlormethan
p,p'-DDD	1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
p,p'-DDE	1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethen
p,p'-DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
D-PHE	deuterovaný fenanthren
D-PYR	deuterovaný pyren
g <sub>soil dw</sub>	gram suché půdy (soil dry weight)
g <sub>earthworm dw</sub>	gram žížaly, suchá váha (earthworm dry weight)
GPC	gelová permeační chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detektorem
HCH	hexachlorcyklohexan
HOCs	hydrofobní organické látky (hydrophobic organic compounds)
LIN	lindan – $\gamma$ -HCH
LP	lesní půda
OC	obsah organického uhlíku (organic carbon content)
OCPs	organochlorové pesticidy
OP	orná půda
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs	polychlorované bifenyly
PCB 30	2,4,6-trichloro-1,1'-biphenyl
PCB 121	2,3',4,5',6-pentachloro-1,1'-biphenyl
PCB 153	2,2',4,4',5,5'-hexachlor-1,1'-biphenyl

PCB 155	2,2',4,4',6,6'-hexachloro-1,1'-biphenyl
PHE	fenanthren
PYR	pyren
SOM	půdní organická hmota (soil organic matter)
TTP	půda trvalého travního porostu
WHC	maximální vodní kapacita (water holding capacity)

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 12. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) během 29 týdnů od kontaminace u třech sledovaných půd (S1, S2 a S3).

Tabulka 13a. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) během 29 týdnů od kontaminace u tří sledovaných půd (S1 a S2).

Tabulka 13b. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) během 29 týdnů od kontaminace u tří sledovaných půd (S3).

Tabulka 14. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) v půdě během expozice žížal u sledovaných půd S1 a S3.

Tabulka 15. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) v půdě během expozice žížal u sledovaných půd S1 a S3.

Tabulka 16. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) v žížalách během expozice u sledovaných půd S1 a S3.

Tabulka 17. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) v žížalách během expozice u sledovaných půd S1 a S3.

## 9 PŘÍLOHY

Tabulka 12. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) během 29 týdnů od kontaminace u třech sledovaných půd (S1, S2 a S3).

Čas odběru	S1		S2		S3	
	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)
4 dny	112961,8	120977,7	103653,9	122280,0	107938,9	125264,0
7 dnů	105512,6	129703,6	92495,0	104917,3	100255,4	115715,1
1 t	80160,1	98271,4	93731,3	102148,8	92362,7	104098,0
2 t	80028,4	99937,4	96437,2	103159,5	105768,2	105102,1
4 t	61883,6	100066,3	98806,7	110325,6	77526,4	103567,3
6 t	35946,6	64633,2	80440,6	82082,6	13794,5	83636,7
8 t	37888,6	73566,0	78085,6	85888,7	4990,3	64127,0
10 t	19236,9	51602,3	53415,7	79310,9	6157,7	68279,2
12 t	7205,9	27999,4	24859,5	46263,4	4031,4	58135,2
14 t	12063,3	33124,0	11395,8	29713,2	2429,3	36315,4
16 t	6733,4	32881,8	4062,1	17432,3	1248,0	12868,1
18 t	4878,9	24436,4	1746,6	9889,5	747,6	7436,3
21 t	4272,2	23813,2	566,6	3740,6	761,9	5482,6
24 t	1846,4	15158,9	626,1	3586,9	480,9	3377,4
27 t	2554,3	15664,2	651,0	9394,5	1045,4	9414,4
29 t	1758,9	15212,3	744,9	9640,1	745,3	5227,8

Tabulka 13a. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) během 29 týdnů od kontaminace u tří sledovaných půd (S1 a S2).

Čas odběru	S1			S2		
	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)
4 d	6795,1	8417,0	754,3	8101,6	8196,9	675,8
7 d	6119,9	6920,7	622,2	7548,1	7707,8	648,1
1 t	5421,0	5715,0	532,1	7880,7	7555,7	646,8
2 t	6045,2	6773,8	582,3	7662,9	8034,3	689,7
4 t	5569,5	6052,6	625,9	8048,5	7572,6	648,6
6 t	4667,7	5637,3	553,4	7192,0	6890,7	612,8
8 t	4053,9	5515,0	581,0	6902,8	6462,1	576,3
10 t	4463,7	5889,2	590,9	7073,8	6008,6	738,2
12 t	4861,3	5290,1	679,6	6677,5	5653,8	708,0
14 t	3630,4	4169,6	606,3	6782,5	5803,8	731,9
16 t	4334,7	4601,2	659,5	7700,2	5717,8	746,1
18 t	3692,9	4976,7	613,0	7435,0	7420,1	700,4
21 t	4408,4	5791,0	704,2	8070,2	6924,3	713,9
24 t	3860,2	4445,1	599,2	7822,6	6701,0	688,5
27 t	3239,2	4033,3	534,7	6994,4	6025,8	603,6
29 t	3618,6	4315,4	599,1	8644,7	6567,5	668,2

Tabulka 13b. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) během 29 týdnů od kontaminace u tří sledovaných půd (S3).

Čas odběru	S1		
	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)
4 d	9373,1	9885,3	777,1
7 d	8566,9	9345,3	753,8
1 t	8523,5	8899,2	761,0
2 t	8449,8	8302,8	705,4
4 t	8074,2	8397,5	749,1
6 t	7501,4	8559,0	725,5
8 t	7557,6	7571,6	653,8
10 t	7365,0	7157,8	738,2
12 t	7454,7	7163,8	841,8
14 t	7039,3	6220,3	820,8
16 t	7483,4	6264,0	825,2
18 t	7122,4	6333,4	801,7
21 t	7307,1	6983,8	810,8
24 t	7220,9	6511,5	763,7
27 t	6397,8	5716,0	675,8
29 t	6697,7	5718,4	693,7

Tabulka 14. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) v půdě během expozice žížal u sledovaných půd S1 a S3.

Čas odběru	S1		S3	
	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)
0 dnů	1372,0	10983,6	623,3	3564,4
3 dny	1153,2	8199,8	635,2	3679,6
7 dnů	835,4	7208,8	575,2	3148,3
13 dnů	1310,2	8352,1	498,8	2877,7
21 dnů	777,6	5544,6	428,1	2302,7

Tabulka 15. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) v půdě během expozice žížal u sledovaných půd S1 a S3.

Čas odběru	S1			S3		
	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)
0 dnů	5349,1	10750,8	844,8	10821,7	15505,1	1034,5
3 dny	4428,9	9224,8	738,1	9114,7	13628,5	963,8
7 dnů	4094,6	9121,7	729,7	10273,3	14038,3	973,5
13 dnů	3859,8	8774,0	725,2	9576,5	13627,8	933,6
21 dnů	4128,9	6907,5	660,0	9174,8	13071,2	917,1

Tabulka 16. Průměrné koncentrace PAHs (n=3) v žížalách během expozice u sledovaných půd S1 a S3.

Čas odběru	S1		S3	
	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)	PHE (ng/g)	PYR (ng/g)
1 den	411,0	3177,3	316,4	752,2
3 dny	797,0	7206,6	235,6	1028,7
5 dnů	281,0	4094,6	113,5	3042,6
7 dnů	n.d.	4505,6	n.d.	1308,8
9 dnů	n.d.	5233,6	n.d.	1098,8
11 dnů	n.d.	5096,2	n.d.	
13 dnů	n.d.	6947,0	n.d.	1122,3
15 dnů	n.d.	5942,1	n.d.	1438,0
17 dnů	n.d.	4605,4	n.d.	928,0
19 dnů	n.d.	2917,1	n.d.	857,1
21 dnů	n.d.	4168,8	n.d.	1019,9

Poznámka: n.d. – nedetekováno (not detected)

Tabulka 17. Průměrné (n=3) koncentrace chlorovaných látek (lindan, p,p'-DDT a PCB 153) v žížalách během expozice u sledovaných půd S1 a S3.

Čas odběru	S1			S3		
	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)	LIN (ng/g)	DDT (ng/g)	PCB 153 (ng/g)
1 den	53187,0	5122,0	708,0	40365,8	3464,0	478,2
3 dny	147228,9	10214,4	1220,3	45499,3	6675,7	861,0
5 dnů	202651,4	20933,4	2255,2	49000,1	14200,5	1497,7
7 dnů	194693,3	30251,5	2888,6	62783,1	19385,6	1911,4
9 dnů	205482,5	58067,2	4682,0	54308,5	21750,1	2172,4
11 dnů	228120,5	58090,5	4804,2	66564,4	39415,3	3311,8
13 dnů	300186,3	64533,3	5963,8	60048,8	37017,3	3295,7
15 dnů	290270,6	81372,6	6920,7	67089,8	40969,9	4013,6
17 dnů	226804,4	84634,0	6954,7	50072,2	42294,7	3900,4
19 dnů	192267,1	67459,8	5884,4	52440,5	38381,0	4119,6
21 dnů	227510,3	96824,0	7571,1	71887,4	47893,8	4612,8