

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ KONTAKTNÍCH TESTŮ FYTOTOXICITY PŘI HODNOCENÍ
VEDLEJŠÍCH ENERGETICKÝCH PRODUKTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

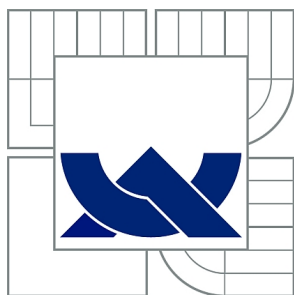
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

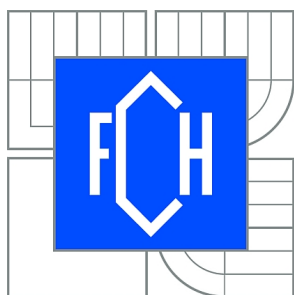
Mgr. ZUZANA JOZÍFKOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ KONTAKTNÍCH TESTŮ FYTOTOXICITY PŘI HODNOCENÍ VEDLEJŠÍCH ENERGETICKÝCH PRODUKTŮ

UTILIZATION OF CONTACTS PHYTOTOXICITY TESTS FOR EVALUATION OF ENERGETIC
BYPRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. ZUZANA JOZÍFKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0485/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Mgr. Zuzana Jozífková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Využití kontaktních testů fyto toxicity při hodnocení vedlejších energetických produktů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na kontaktní testy ekotoxicity
2. Výběr vhodných kontaktních testů fyto toxicity
3. Provedení kontaktních testů fyto toxicity a testů fyto toxicity vyžadovaných stávající legislativou tj. na vodním výluhu testované matrice
4. Posouzení ekotoxicity vedlejších energetických produktů a způsobů testování

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Mgr. Zuzana Jozífková
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

Doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Vedlejší energetické produkty představují část odpadů z energetických provozů, které jsou přímým zůstatkem spáleného paliva, popř. tuhé zbytky z čištění spalín. Jejich další materiálové využití může ovlivňovat terestrické a následně také akvatické ekosystémy. Z těchto důvodů je velmi potřebné zabývat se i jejich případnou ekotoxicitou. V rámci této diplomové práce byly vzorky vedlejších energetických produktů podrobeny ekotoxikologickému testování na vyšších suchozemských rostlinách v kontaktním uspořádání. Rovněž byly testovány vodné výluhy těchto vzorků za účelem porovnání obou způsobů testování. K testování vodných výluhů vedlejších energetických produktů byl použit test inhibice růstu kořene pěti vybraných druhů rostlin; jednalo se o hořčici bílou (*Sinapis alba*), brukve řepku olejku (*Brassica napus*), brukve řepák olejný (*Brassica rapa*), salát setý (*Lactuca sativa*) a oves setý (*Avena sativa*). Pro hodnocení ekotoxicity vzorků v kontaktním uspořádání byly vybrány následující testy fytotoxicity: test klíčivosti a růstu vyšších rostlin - brukve řepky olejky (*Brassica napus*) a ovsa setého (*Avena sativa*), dále byla testována limitní koncentrace odpadu na rostlině *Brassica napus* a proveden screeningový test klíčivosti salátu setého (*Lactuca sativa*). Na základě zjištěných výsledků byla posouzena ekotoxicita vedlejších energetických produktů a diskutována potřeba testování pevných matic v kontaktním uspořádání.

ABSTRACT

The energetic by-products are a part of energetic wastes which are residues of fuels combustion or also the residues of flue-gas cleaning. Their following use could impact the terrestrial and subsequently also aquatic ecosystems. For these reasons it is necessary to evaluate with their possible ecotoxicity. In this diploma work the samples of energy products were subjected to ecotoxicological testing via contact phytotoxicity tests on Embryophyta. Water leaches of these samples were tested in order of comparison of the two testing methods. To test the water leaches of energy by-products the root growth inhibition test of five selected plant species were used; white mustard (*Sinapis alba*), kohlrabi oilseed rape (*Brassica napus*), turnip kohlrabi rape (*Brassica rapa*), garden lettuce (*Lactuca sativa*) and oats (*Avena sativa*). For the evaluation of ecotoxicity in contact arrangement the following phytotoxicity tests were selected: germination and growth of higher plants, brassica oilseed rape (*Brassica napus*) and oats (*Avena sativa*). Furthermore, the limit concentrations of waste at the plant *Brassica napus* were tested and screening tests poppy germination of lettuce (*Lactuca sativa*) were performed. On the basis of obtained results ecotoxicity of energetic by-product was assessed and needs of solid matrices testing in contact arrangement discussed.

KLÍČOVÁ SLOVA

testy ekotoxicity, fytotesty, vedlejší energetické produkty

KEYWORDS

tests of ecotoxicity, phytotests, energetic byproducts

JOZÍFKOVÁ, Z. *Využití kontaktních testů fytotoxicity při hodnocení vedlejších energetických produktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 89 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

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

Děkuji MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a také za její podporu, pomoc, trpělivost a cenné rady.

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Ekotoxikologie.....	9
2.2 Ekotoxikologické biotesty	9
2.3 Rozdělení ekotoxikologických biotestů	10
2.4 Kontaktní testy toxicity	12
2.4.1 Prostředí kontaktních testů toxicity	13
2.4.2 Kontaktní testy toxicity na mikroorganismech	14
2.4.3 Kontaktní testy toxicity na živočiších.....	15
2.5 Kontaktní testy fytotoxicity	17
2.5.1 Požadavky na testovací druhy cévnatých rostlin	19
2.5.2 Aplikace testované látky	20
2.5.3 Endpointy.....	21
2.5.4 Test klíčení semen a růstu kořene cévnatých rostlin	22
2.5.4.1 Princip	22
2.5.4.2 Metodika.....	22
2.5.4.3 Testování limitní koncentrace odpadů	25
2.5.5 Další možnosti využití kontaktních testů fytotoxicity	25
2.6 Vedlejší energetické produkty	26
2.6.1 Charakteristika a využití vedlejších energetických produktů	27
2.6.2 Vznik vedlejších energetických produktů.....	27
2.7 Ekotoxická odpadů.....	28
2.7.1 Princip ekotoxikologického testování odpadů s vodnými výluhy	29
2.7.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (<i>Sinapis alba</i>).....	32
2.8 Související legislativní předpisy.....	33
3 Experimentální část.....	36
3.1 Vzorky vedlejších energetických produktů.....	36
3.2 Popis technologických postupů energetických provozoven	36
3.2.1 Provozovna A.....	37
3.2.2 Provozovna B.....	37
3.2.3 Provozovna C.....	37
3.2.4 Provozovna D.....	38

3.3 Odběr vzorků	38
3.4 Použité přístroje a zařízení	38
3.5 Testy ekotoxicity s vodnými výluhy	39
3.5.1 Příprava vodného výluhu	39
3.5.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (<i>Sinapis alba</i>).....	39
3.5.3 Test inhibice růstu kořene salátu setého (<i>Lactuca sativa</i>)	41
3.5.4 Test inhibice růstu kořene ovsa setého (<i>Avena sativa</i>)	41
3.5.5 Test inhibice růstu kořene brukve řepky olejky (<i>Brassica napus</i>)	42
3.5.6 Test inhibice růstu kořene brukve řepáku olejného (<i>Brassica rapa</i>)	42
3.6 Kontaktní testy fytotoxicity	43
3.6.1 Stanovení účinku chemikálií na klíčivost a růst vyšších rostlin, ISO 11269-2	43
3.6.2 Testování limitní koncentrace, ISO 11269-1	45
3.6.3 Screeningový test klíčivosti salátu, ISO 17126	45
3.7 Výsledky	46
3.7.1 Testování s vodnými výluhy	46
3.7.1.1 Příprava vodného výluhu	46
3.7.1.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (<i>Sinapis alba</i>)	47
3.7.1.3 Test inhibice růstu kořene salátu setého (<i>Lactuca sativa</i>)	49
3.7.1.4 Test inhibice růstu kořene ovsa setého (<i>Avena sativa</i>)	50
3.7.1.5 Test inhibice růstu kořene (<i>Brassica napus</i>).....	52
3.7.1.6 Test inhibice růstu kořene (<i>Brassica rapa</i>)	54
3.7.3 Kontaktní testy fytotoxicity	55
3.7.3.1 Stanovení účinku chemikálií na klíčivost a růst vyšších rostlin, ISO 11269-2. 55	
3.7.3.2 Testování limitní koncentrace, ISO 11269-1	59
3.7.3.3 Screeningový test klíčivosti salátu, ISO 17126.....	60
4 Diskuze výsledků	62
4.1 Diskuze výsledků testů s vodnými výluhy	62
4.2 Diskuze výsledků kontaktních testů fytotoxicity	69
4.3 Srovnání výsledků kontaktních testů s testy s vodnými výluhy	72
5 Závěr.....	74
6 Seznam použitý zdrojů.....	76
7 Seznam použitých zkratk a symbolů	81
8 Seznam příloh	83

Příloha 1 Seznam cévnatých rostlin pro testy fytotoxicity.....	84
Příloha 2 Dunnettova tabulka.....	87
Příloha 3 Příklad výpočtu statistických dat I.....	88
Příloha 4 Příklad výpočtu statistických dat II	89

1 ÚVOD

K hlavním celosvětovým problémům současnosti patří vysoká produkce odpadů, která má následně rozsáhlý dopad na životní prostředí. V Evropské unii se za rok vyprodukuje až cca 1,3 miliardy tun odpadů. Snahou každé vyspělé společnosti by proto měla být minimalizace vzniku odpadů a maximalizace jejich druhotného využití. Situace v České republice je ale zatím jiná, zde se 70 – 80 % odpadů uchovává na skládkách nebo spaluje. Naproti tomu například v Nizozemí se využívá nebo vyváží 100 % energetických odpadů.

Odpady, které vznikají při spalování uhlí v tepelných elektrárnách a v průběhu odsíření spalín, se nazývají vedlejší energetické produkty a je jich celá řada. Vedlejší energetické produkty je možné využít jako druhotné suroviny a to v případě když splňují specifické požadavky na jejich vlastnosti, které jsou zakotveny v normách, vyhláškách a zákonech. Důraz je kladen na hodnocení jejich chemických a ekotoxikologických vlastností. Stanovení ekotoxicity odpadu tak umožňuje odhadnout vliv a chování odpadu v místě jeho uložení nebo při jeho druhotném použití. Za odpady se poté považují jen nevyužitelné vedlejší energetické produkty, které je třeba odstranit uložení na skládky. Možné materiálové využití vedlejších energetických produktů má vždy přednost před skládkováním.

Ekotoxikologické vlastnosti jsou v ČR hodnoceny dle vyhlášky č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Jako nebezpečný se hodnotí odpad, jehož vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z testovacích organismů hodnotu $LC(EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$. Zkoušky akutní toxicity se provádí na třech vodních organismech a jednom suchozemském. Pro hodnocení odpadů využívaných na povrch terénu je podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. předepsáno hodnocení akutní ekotoxicity opět s vodným výluhem a na stejných organismech jako dle vyhlášky č. 376/2001 Sb. Všechny testy jsou prováděny pouze na vodných výluzích, tedy z ekologického hlediska je sada testů relevantní pouze pro akvatické prostředí a je nevhodná pro odhad rizik odpadu na půdní ekosystémy. V současnosti platné principy testování toxicity vodných výluhů podhodnocují ekotoxicitu nebezpečných látek, které mají nízkou rozpustnost, a proto jejich ekotoxicity není ve vodném výluhu zaznamenána.

Ve světě je ekotoxicita odpadu hodnocena i pomocí kontaktních testů toxicity. Ve většině zemí se ekotoxicita odpadů stanovuje sadou testů, která zahrnuje organismy tří trofických úrovní. Nejčastějšími testovacími organismy pro kontaktní testy jsou žížaly, chvostokoci, testy s půdními mikroorganismy a semeny rostlin.

Testy fytotoxicity se v ČR běžně využívají při hodnocení ekotoxikologických vlastností vodných výluhů odpadů. Dle vyhlášky č. 376/2001 Sb. je vyžadován test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Kontaktní testy fytotoxicity nejsou v ČR legislativně ošetřeny. Ve světě se využívají testy klíčení semen a růstu cévnatých rostlin. Používány jsou semena rostlin jednoděložných i dvouděložných, například salát setý (*Lactuca sativa*), brukev řepka olejka (*Brassica napus*) nebo oves setý (*Avena sativa*) [1, 2, 3, 4, 5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je vědní obor, který se zabývá studiem toxického vlivu látek, jak přírodních tak i syntetických, na živé organismy, populace i společenstva. Kromě sledování účinků toxických látek na organismy je také předmětem ekotoxikologie monitoring látek v životním prostředí.

Testování toxicity je prováděno již po staletí. Cílem zájmu těchto testů byl ale vždy pouze člověk. Zlom nastal teprve v 60. letech 20. století, kdy začaly být vyvíjeny metody vhodné k popisu toxického účinku látek produkovaných člověkem na životní prostředí a v něm žijící organismy. Prvním testovacím organismem byly ryby. Dnes rozlišujeme dvě samostatné studijní vědy, toxikologii a ekotoxikologii. Toxikologie je věda, která se zabývá studiem vlivů toxických látek na člověka. Zatímco ekotoxikologie, jak již bylo napsáno, je věda zabývající se studiem vlivů škodlivých látek na celý ekosystém.

Význam ekotoxikologie nespočívá jenom v ochraně živých organismů. V současnosti se také výsledky ekotoxikologických studií aplikují v jiných vědních oborech, které se zabývají životním prostředím. Výsledky ekotoxikologických studií se využívají při novelizaci vyhlášek provádějící zákony, např. Zákon o odpadech, Zákon o chemických látkách.

Cílem ekotoxikologie je vyvíjet metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních reprodukovatelných podmínek. Zároveň musí ekotoxikologické metody umožnit srovnání účinků různých látek mezi sebou a především srovnání získaných výsledků z různých laboratoří [6, 7, 8, 9].

2.2 Ekotoxikologické biotesty

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek jsou upřednostňovány testy biologické, biotesty. Biotesty jsou definovány jako proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace, atd.) exponován v přesně určených podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku. Biotesty slouží k hodnocení nepříznivého vlivu škodlivin na biotickou složku životního prostředí.

Posouzení polutantů z biologického hlediska tvoří vhodný doplněk k tradičně používaným fyzikálně-chemickým metodám. Fyzikální a chemická analýza hraje v hodnocení stupně znečištění životního prostředí nezastupitelnou roli. Výborná úroveň přístrojové techniky umožňuje s vysokou přesností stanovit v analyzovaném vzorku prostředí i velmi malá množství kontaminujících látek. Otázkou zůstává, nač tedy slouží biologické testy, když fyzikálně-chemické metody vynikají velkou přesností. Na základě přítomnosti a koncentrace jednotlivých sloučenin nelze totiž spolehlivě předpovědět jejich toxický vliv na různé formy života. U směsí toxikantů pak zpravidla nebývá výsledný účinek prostým součtem toxických vlivů jednotlivých složek, a proto nelze předem určit, zda budou toxikanty ve směsi vykazovat synergický nebo naopak antagonistický efekt. Nezpochybnitelnou výhodou je také to, že testy toxicity velmi rychle a dostatečně informativně posoudí určitý vzorek z hlediska působení na živou složku ekosystému (například při haváriích spojených s únikem látek do prostředí). Podrobná chemická analýza je dlouhodobější a především finančně náročnější. Proto se stále ve větší míře využívají biologické metody stanovení toxicity a to především v zemích, kde je péči o životní prostředí věnována zvýšená pozornost.

Biotesty nemohou podat informaci o tom jaká látka je přítomná ve vzorku a v jakém množství, mohou však zjistit zda vzorek obsahuje látku, která vyvolává nežádoucí účinky na sledovaném organismu. Sledovaným ekosystémem může být akvatické nebo terestrické prostředí. Testovanou matricí mohou být například odpady, chemické látky. Ekotoxikologické biotesty by měly být provedeny na všech trofických úrovních (producenti, konzumenti, destruenti), protože ovlivnění jedné trofické úrovně vyvolá změny i v dalších a takto může být následně poškozen celý ekosystém.

Vývoj ekotoxikologických testů směřuje k tomu, aby byly co nejvíce miniaturizované, plně validované, aby umožňovaly studovat dopad chemických látek na organismy za standardizovatelných a reprodukovatelných podmínek, a zároveň, aby se co nejvíce přibližovaly reálné situaci v přírodě [8, 10, 11, 12].

2.3 Rozdělení ekotoxikologických biotestů

Ekotoxikologické biotesty se mohou rozdělovat podle různých kritérií. Nejčastěji udávané parametry pro rozdělování ekotoxikologických biotestů jsou podle doby expozice, podle pokročilosti designu testovacího systému a podle trofické úrovně testovacích organismů.

Podle doby expozice

- a. Akutní (krátkodobé) testy
Trvají řádově několik dní, ne však déle než 4 dny (96h). Jejich cílem je stanovit hodnoty LC_{50} , EC_{50} , IC_{50} , NOEC, případně LOEC. LC_{50} (letální koncentrace 50) je koncentrace látky, která způsobí smrt u 50 % sledovaných organismů, kteří byli vystaveni jejímu působení. EC_{50} (efektivní koncentrace 50) je koncentrace látky, která vyvolá účinek (například imobilizaci) u 50 % pozorovaných organismů. IC_{50} (inhibiční koncentrace 50) je koncentrace látky, která vyvolá u 50 % sledovaných organismů útlum (například snížení rychlosti růstu u rostlin). NOEC (No Observed Effect Concentration) představuje nejvyšší koncentraci testovaného vzorku, nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky. LOEC (lowest observed effect concentration) představuje nejnižší koncentraci testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky.
- b. Semiakutní (semichronické) testy
Provádí se většinou na rybách a trvají 14 až 28 dnů. Jejich cílem je stanovit hodnoty NOEC a LOEC.
- c. Chronické (dlouhodobé) testy
Trvají 90 dnů a déle, kdy doba působení toxických látek na organismy musí trvat minimálně jednu desetinu jejich životního cyklu. Jejich cílem je stanovit hodnoty NOEC a EC_{10} a navíc zjistit zda látky prokazují kumulativní účinek. EC_{10} (efektivní koncentrace 10) je koncentrace látky, která vyvolá účinek (například imobilizaci) u 10 % pozorovaných organismů [8, 9, 12, 13, 14].

Podle pokročilosti designu testovacího systému, tzv. generace testů

a. Biotesty 1. generace

První generací biologických testů jsou standardní, konvenční neboli klasické metodiky založené na pokusech s organismy chovanými v laboratoři. Ve světě jsou běžně používány biotesty první generace. V ČR jsou doporučovány 4 konvenční testy:

1. 48 až 96 hodinový akutní test toxicity na rybách (*Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio*).
2. 24 až 48 hodinový imobilizační test na perloočkách (*Daphnia magna*).
3. 72 hodinový růstově inhibiční test na řasách (*Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus quadricaudata*).
4. 72 hodinový test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).

Tyto biotesty mají výhodu v tom, že jsou uznávány mezinárodními legislativami, na druhé straně je jejich provádění značně ekonomicky náročné, protože kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat [12].

b. Biotesty 2. generace

Druhou generací jsou stále více používané alternativní testy toxicity (mikrobiotesty, toxkity). Alternativní testy využívají k testování klidová stadia testovacích organismů, tj. vajíčka, cysty, ehipia, tkáně, lyofilizované a imobilizované kultury organismů. Testům se někdy říká miniaturizované testy, což je dáno minimálním množstvím objemů testovaných roztoků potřebných pro testování, minimálním požadavkem na laboratorní prostory a vybavení. Líhnutí testovacích organismů a příprava kultur záleží na typu organismu, např. líhnutí vířníků z cysty probíhá maximálně 24 hodin, líhnutí korýšů trvá od 24 do 72 hodin od počátku inkubace. Nevýhody mikrobiotestů spočívají především v tom, že jejich postupy nejsou validovány platnou legislativou ČR [8, 9, 12, 14].

c. Biotesty 3. generace

Třetí generace toxikologických testů jsou biosenzory nebo biosondy či biomarkery. Dnes se již reálně aplikují v mnoha rutinních laboratořích. Biomarkery zpravidla indikují mechanismus toxicity, nikoliv určitou látku, ale některé biochemické parametry mohou specificky odrážet expozici některou třídou nebo skupinou kontaminantů. Biologickými modely jsou nejčastěji jaterní tkáň, či primární hepatocyty. Biomarkery by měly intenzívně odrážet vliv znečišťujících látek, ale přitom výrazně nepodléhat fyziologickému kolísání. Příkladem biomarkeru je cytochromu P₄₅₀1A, kde hladina cytochromu je indukována 2,3,7,7 – tetrachlordibenzo-p-dioxinem a příbuznými látkami, dále PCB (polychlorované bifenyly) a PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky). Dalším příkladem biomarkerů jsou metalothioneiny, což jsou sloučeniny nízkomolekulárních proteinů, které obsahují –SH skupinu vázanou s kovy. Metalothioneiny jsou produkovány játry a ledvinami. V přítomnosti toxických kovů dochází ke zvýšení jejich hladiny, což plní důležitou roli v obranném mechanismu organismu [15, 16].

Podle trofické úrovně testovacích organismů

- a. Testy na producentech
Producenti jsou zelené rostliny (ve svých buňkách obsahují zelené rostlinné barvivo chlorofyl), jsou to autotrofní organismy, mající schopnost fotosyntézy, přeměňují anorganické látky na látky organické.
- b. Testy na konzumentech
Konzumenti jsou živočichové, dělí se na tři řády (konzumenti 1. řádu býložravci, 2. řádu masožravci, 3. řádu všežravci), jsou to heterotrofní organismy (živiny musí přijímat ze svého okolí).
- c. Testy na destruentech
Destruenti (dekompozitoři) jsou rozkladači organických látek na anorganické, patří mezi ně například bakterie [8, 9, 13, 14, 17].

2.4 Kontaktní testy toxicity

Kontaktní testy toxicity nebo také testy terestrické či půdní pracují s pevným materiálem, na rozdíl od akvatických testů nepracují s vodným výluhem testované matrice nebo roztokem testované chemické látky. Posuzovaným pevným materiálem může být například pevný odpad, půda, sedimenty, kaly, komposty, popílek, stavební sutě, pesticidy, a jiné. Kontaktní testy toxicity se vyžadují při testování takových látek, které by po vyluhování zůstaly navázány na testovanou matici, a nepřešly by do vodného výluhu. Jinak řečeno pro látky ve vodě nerozpustné [17, 18].

Kontaktní testy zohledňují tu skutečnost, že i když je obsah toxických látek v půdě poměrně velký, nemusí být automaticky pro organismus biodostupný. Další předností oproti akvatickým testům je zjednodušení celého procesu přípravy vzorku k testování. Při přípravě vzorku odpadají procesy, jako je příprava výluhu, homogenizace, filtrace, centrifugace, a jiné. Čímž je zároveň vzorek uchován v původním stavu a v maximální možné míře vykazuje nezměněné fyzikálně chemické vlastnosti a tím i biologické projevy organismů odpovídají více skutečnosti. Všechny tyto kroky vedou k relativní časové, materiálové a finanční úspoře. V neposlední řadě jsou relevantnější také díky tomu, že se při nich mohou projevit vzájemné interakce (synergické, aditivní, antagonistické, atd.) všech přítomných látek, ať už organických, anorganických, volatilních, perzistentních, rozpustných či nerozpustných [15, 19].

Kontaktní testy toxicity se využívají:

- pro zjištění ekotoxikologických dat o toxicitě nových chemikálií, ale i k doplnění informací o existujících chemikáliích (zejména testy na rostlinách a žížalách);
- při testování nebezpečnosti pesticidů (nejčastěji testy na žížalách a v některých případech pomocí mikroorganismů);
- při testování ekotoxicity odpadů, mezi hlavní typy testovaných odpadů patří kaly z čističek odpadních vod, sedimenty, popílky, dřevoštěpa, apod.;
- při zjišťování toxicity hnojiv a dalších možných látek vstupujících do půdy;
- při sanačních pracích a remediacích.

Mezi typické nebezpečné a toxické látky, které se přednostně testují terestrickými testy, patří například PAU, PCB, PCDD (polychlorované dibenzodioxiny), PCDF (polychlorované dibenzofurany) a jiné látky [17, 20].

Cesty vstupu nebezpečných látek do organismů záleží hlavně na druhu organismu. Mohou probíhat následovně:

- pro bakterie a bezobratlovce je typická expozice celým povrchem těla;
- u obratlovců může nastat expozice prostřednictvím potravy nebo vdechováním, kde se využívají uzavřené nádoby;
- u rostlin probíhá expozice prostřednictvím kořenového systému nebo přes listové plochy [17, 18].

Nepříznivé efekty testovaných látek na terestrickou biotu mohou být sledovány na čtyřech úrovních. Za prvé na úrovni organismu, kde se sleduje například změna fyziologického procesu, enzymatická aktivita, genetické změny, popřípadě úhyn. Za druhé na úrovni populací, kde se sleduje například změna počtu jedinců ve sledované populaci. Za třetí na úrovni buněčných mechanismů, kde se sleduje enzymatická aktivita. Za čtvrté interakce mezi populacemi různých druhů organismů, které mohou být testovanou látkou ovlivněny, jedná se například o mykorhizu nebo allelopathie [17, 20].

Zájem o kontaktní testy se odráží i v množství organizací, které se zabývají metodikami těchto testů. Jsou jimi například OECD (Organization for Economic Cooperation Development, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj), ISO (International Standardization Organization, Mezinárodní organizace pro normalizaci), US EPA (United States Environmental Protection Agency, Agentura pro ochranu životního prostředí), ASTM (American Society of Testing and Materials, Společnost pro testování a materiály), AFNOR (Association Française de Normalisation, Organizace pro normalizaci), BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Federální Biologické Výzkumné centrum pro zemědělství a lesnictví), EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, Regionální mezivládní organizace pro ochranu rostlin), IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, Mezinárodní organizace pro biologickou kontrolu), FDA (Food and Drug Administration, Agentura na ochranu a podporu veřejného zdraví prostřednictvím regulace a dohledu nad bezpečností potravin, tabákových výrobků, potravinových doplňků, léků, veterinárních přípravků a kosmetiky), DIN (Deutsches Institut für Normung, Německý institut pro normalizaci), NEN (Nationale normalisatie-institut Nederland, Nizozemský institut pro normalizaci), ANSI (American National Standards Institute, Americký institut pro normalizaci), CEN (European Committee for Standardization, Evropský výbor pro normalizaci), EEC (European Economic Community, Evropské hospodářské společenství), WHO (World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace), OPPTS (The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, úřad prevence pesticidů a toxických látek, součástí EPA), EC (Environment Canada, Životní prostředí Kanady).

2.4.1 Prostředí kontaktních testů toxicity

Prostředím, ve kterém probíhají kontaktní testy toxicity, může být uměle připravená půda, čerstvá (přírodní) půda nebo jiné typy půd [20].

Uměle připravených substrátů existuje větší počet, a liší se především dostupností polutantu a jeho možnou distribucí. Mezi nejběžněji používané umělé substráty patří umělá půda. Umělou půdu si může každá laboratoř podle normovaných postupů připravit sama. Složení této půdy je přesně známo a takto připravené půdy by se neměly navzájem lišit. Podle organizací OECD a ISO obsahuje umělá půda 70 % křemenného jemného písku, obsahujícího nejméně 50 % zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm; 20 % kaolinitového jílu,

obsahujícího nejméně 30 % kaolinitu; 10 % suché jemně namleté rašeliny. Půdní pH je pomocí uhličitanu vápenatého upraveno na $6 \pm 0,5$, celkové množství uhličitanu v umělé půdě bude po přidání 0,3 – 1 %. Vlhkost je upravena destilovanou vodou na 40 % WHC (water holding capacity, vodní kapacita půdy). Umělý substrát oproti jiným obsahuje větší množství organické hmoty a kaolinu. Bývá tedy často označován jako ekologicky nereálný. Reálné půdy obsahují vyšší množství písku a naopak nižší je zastoupení jílu a organické hmoty. A z tohoto důvodu je v současné době umělá půda méně preferována. Existují i další umělé půdy, standardní reálné půdy, jako například LUFA 2.2. LUFA 2.2 se jeví jako nejlepší volba pro kontrolní půdu nebo testování chemických látek namísto umělé půdy OECD a to zejména pro bezobratlé organismy (žížaly). Přestože je tento typ půdy nejpoužívanější, značka LUFA má mnoho dalších variant jako například: LUFA 2.1, LUFA 2.3, LUFA 5M, LUFA 6S, které se od sebe liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Složení půd LUFA je uvedeno v tabulce 1 [17, 20, 21].

Tab. 1: Složení půd LUFA [22].

	LUFA 2.1	LUFA 2.2	LUFA 2.3	LUFA 5M	LUFA 6S
Množství organického uhlíku (%)	0.81 ± 0.21	2.16 ± 0.40	0.98 ± 0.05	1.29 ± 0.20	1.75 ± 0.11
částice < 0.02 mm (%)	8.2 ± 0.9	13.9 ± 1.1	22.7 ± 1.1	25.3 ± 1.8	65.1 ± 2.7
pH (0.01M CaCl₂)	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.1	6.4 ± 0.6	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1
Schopnost výměny kationtů (meq/100g)	4 ± 1	10 ± 1	8 ± 2	15 ± 3	22 ± 6
WHC (g/100g)	33.2 ± 1	48.2 ± 5	34.4 ± 2	42.1 ± 4	40.7 ± 5
Hmotnost (g/1000ml)	1404 ± 46	1197 ± 60	1291 ± 30	1212 ± 56	1264 ± 90

Největší část testovaných materiálů, tvoří vzorky z lokalit, u nichž má být testem zjištěno, zda a v jaké míře jsou toxické. Příkladem mohou být půdy ze skládek odpadů, kaly z ČOV (čističek odpadních vod), půdy z požářiště, zemědělské půdy. **Přírodní půdy** je nutné před použitím vhodně ošetřit. Například při testování na bezobratlých živočiších je potřeba tzv. defaunizace půdy. Při defaunizaci je půda zahřátá na 80 °C po dobu 2 h nebo opakovaně zamrzána a roztahována. Pokud provádíme testování na mikroorganismech je nutností vždy odebrat čerstvou přírodní půdu [20].

Do kategorie **jiných typů půd** se řadí takové, které jsou přírodního původu a zároveň jsou součástí evropského konceptu přírodních půd (euro-soils concept). V tomto konceptu se půdy řadí dle původu do několika tříd, například ESo2 – půda z Řecka, ESo5 – půda z Německa, ESo7 – půda z Rakouska atd. Účelem tohoto projektu je vytvoření referenčních půd [20].

2.4.2 Kontaktní testy toxicity na mikroorganismech

Přítomnost mikroorganismů v půdě má značný význam. Mikroorganismy v půdě představují největší podíl v celkové půdní biotě a to 80 – 90 %. Mikroorganismy hrají nezastupitelnou roli v přeměně jednotlivých forem prvků, rozkládají organickou hmotu na anorganickou, která je vzápětí využita a zpracována rostlinami. Typické půdní mikroorganismy jsou bakterie,

houby, prvoci, půdní řasy. Používají se především pro hodnocení případného negativního vlivu pesticidů a hnojiv na půdní biotu.

Testy na mikroorganismech probíhají v laboratorních aerobních podmínkách. Důležitý je vždy výběr půdy pro testování, ten se řídí podle metodik ISO a OECD. Metody správného odběru půdy, skladování a informace o manipulaci s ní jsou přesně definovány ve směrnici ISO 10381-6. K testování se doporučuje použít alespoň dvou typů půd, například půdu z pastvin a ornou půdu [23, 24].

Testovaná látka se aplikuje do půdy ve vhodně zvolené koncentrační řadě, která by měla odpovídat koncentracím, které jsou očekávány v reálném životním prostředí. Pokud neznáme předpokládané koncentrace, zavede se nejdříve předběžné testování. V konečném testu je testováno pět koncentrací. Návod jak přesně určit koncentraci testované látky je uveden ve směrnici BBA VI, 1-1. Kultivace vzorku probíhá při teplotě 20 ± 2 °C v aerobním prostředí a maximální vodní kapacitě 40 – 60 %. Test se vyhodnocuje po 7, 14, 21, 28 dnech. Výsledkem je výpočet hodnot EC_x ze vztahu dávka odpověď. EC_x je koncentrace látky, která vyvolá účinek u x % jedinců (x = 0 – 100) [23].

Příklady kontaktních testů toxicity s mikroorganismy jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Příklady kontaktních testů toxicity na mikroorganismech [25].

Test	Hodnocené parametry	Směrnice
Test přeměny dusíkatých látek	NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- (změna v % v porovnání s kontrolou)	BBA VI
Test inhibice dehydrogenázy	DHA (% inhibice ve srovnání s kontrolou)	BBA VI, 1-1
<i>Vibrio fischeri</i> (redukce emise světla)	Redukce emise světla (LID)	ISO/DIS 11348

2.4.3 Kontaktní testy toxicity na živočiších

- Kontaktní testy toxicity na bezobratlých živočiších

Terestrické testy toxicity na bezobratlých organismech se využívají zejména při testování toxicity pesticidů. Testy se provádí nejčastěji s žížalami, rousnicemi, hlísticemi, chvostoskoky, vosami, včelami, pavouky, mnohonožkami, drabčíky, mouchami atd. Pomocí suchozemských bezobratlovců je možné hodnotit i genotoxicitu. V testech se hodnotí vliv kontaminantů na genetickou informaci. K testování genotoxicity se využívá zejména *Drosophilla melanogaster*. V tabulce 3 jsou uvedeny příklady kontaktních testů toxicity s bezobratlovci [8].

Tab. 3: Příklady kontaktních testů toxicity na bezobratlovcích [25].

Test	Hodnocené parametry	Směrnice
Akutní test s žížalami	Úhyn (LC ₅₀)	OECD 207, ISO 11268-1
Subakutní test s žížalami	Úhyn (LC ₅₀), chování, biomasa	FDA 4.12
Reprodukční test s žížalami	Reprodukce (NOEC)	ISO 11268 - 2.2
Reprodukční test s roupicemi	Reprodukce (EC _x , NOEC)	ISO 16387, OECD 220, ASTM 1676-97
Generační test s drabčíky	Líhnutí, úhyn	BBA VI, 23-2.1.10
Test s pavouky	Úhyn, spotřeba potravy, chování	BBA VI, 23-2.1.9
Test akutní a chronické toxicity se včelou medonosnou	Úhyn (LD ₅₀)	EPPO 170

Nejdéle a nejvíce používaným testem toxicity na bezobratlovcích je test toxicity na žížalách. Testy toxicity na žížalách mohou být akutní nebo chronické. V případě chronického testu je sledován vliv toxikantu na reprodukci žížal. Test se provádí podle mezinárodní směrnice OECD 207, ISO 11268-1 a 11268-2. V těchto testech je často používán epigeický druh žížal. Epigeické žížaly obývají svrchní humusovou vrstvu půdy, patří mezi ně například *Eisenia fetida*. Další možné druhy žížal jsou například *Lumbricus terrestris*, *Aporredoctea caliginosa*. V případě akutního testu se pro přípravu půdního vzorku používá umělé zemině s vyšším obsahem vody, až 35 % hmotnosti půdy. Zkouška probíhá ve skleněných nádobách, kde je do 750 g substrátu umístěno 10 žížal. V případě, že se testuje pevný materiál, připravuje se koncentrační řada smísením zvolených poměrů testovaného vzorku a substrátu. Je-li testovaná látka rozpustná, dávkuje se zvolený objem na 10 g křemenného písku. Písek se vysuší v proudu vzduchu a následně se vmísí do substrátu. Test je prováděn za konstantního osvětlení a při konstantní teplotě 20 °C. Celková expozice trvá 28 dní. První odečet testu se provádí po 14 dnech a zaznamenává se mortalita žížal. Na konci testu se vyhodnotí počet živých žížal a jejich hmotnost.

Chronický reprodukční test se provádí v nádobách s 500 až 600 g půdy, kde se umístí jedna žížala. Po expozici trvající 4 týdny se spočítá počet kokonů a následně počet jedinců narozených z kokonů. V případě chronického reprodukčního testu se využívá žížala *Eisenia fetida*. Jelikož se jedná o test dlouhodobý, je potřeba exponované jedince krmit 5 g sušeného hnoje týdně [18, 26, 27, 28, 29, 30].

- Kontaktní testy toxicity na obratlovcích

Mezi testovací organismy v kontaktním uspořádání patří především ptáci a savci. Nejčastěji využívanými druhy ptáků jsou křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*), bažant obecný (*Phasianus colchicus*), holub skalní (*Columba livia*). Nejčastěji využívanými druhy savců jsou králíci, potkani, myši, psi, kozy, morčata, opice, křečci [8].

Testy na obratlovcích se dají rozdělit do dvou skupin, za prvé na testy laboratorní a za druhé na testy polní s volně žijícími ptáky a savci. V případě laboratorních testů na ptácích je sledována zejména hmotnost těla ptáků a gonád, počet oocytů a spermatogonií a míra přežití. U savců se zejména hodnotí procento úhynu, hmotnost, biochemické parametry. Při polních

pokusech s ptáky se sleduje úspěšnost hnízdění, růst, citlivost embrií a vývin gonád. U savců je zaznamenávána například mortalita, ovogeneze, spermatogram, reprodukční aktivita, vývin embrií, vývin orgánů a parametry biochemického rozboru krve. Jedná se nejčastěji o testy perorální, kdy je zkoušená látka přidávána do potravy. Laboratorní testy u ptáků mohou být uspořádány jako testy subakutní toxicity nebo reprodukční chronické testy.

V současné době vzrůstá potřeba hodnotit účinnost pesticidů nejen z hlediska výsledného efektu, tzn. pozitivní inhibice cílového organismu, ale také z hlediska možného ohrožení necílových organismů. Vzhledem k použití pesticidů patří ptáci mezi necílové organismy. Pro ptáky představují nebezpečí zejména rodenticidní přípravky. Vedle pesticidních látek jsou na ptácích testovány i přípravky na ošetřování zrní.

V rutinních ekotoxikologických pracích se savci nevyužívají, pouze pro speciální studie jako je například sledování bioakumulace toxických látek v srsti. Testy toxicity na savcích slouží spíše pro účely humánní toxikologie. Příklady kontaktních testů s obratlovci jsou uvedeny v tabulce 4, společně se směrnicemi, ve kterých je dostupná metodika testů [8, 13, 31, 32].

Tab. 4: Kontaktní testy toxicity na obratlovcích [25].

Test	Hodnocené parametry	Směrnice
Akutní		
Jednodávkový test na ptácích	úhyn (LD ₅₀)	EPA E 71-1
Test akutní orální toxicity	úhyn (LD ₅₀)	OECD 401
Test akutní dermální toxicity	úhyn (LD ₅₀), podráždění, chování	OECD 402
Chronický		
Reprodukční test na ptácích	úhyn, počet vajíček, morfologické změny vajíček, účinky na ptačí mláďata	OECD 206/ EPA E 71-4

2.5 Kontaktní testy fytotoxicity

Kontaktní testy fytotoxicity využívají jako testovací organismus terestrické rostliny a jsou vhodné na posouzení ekotoxicity kompostů, tuhých odpadů, pesticidů, chemických látek, kalů z mechanické čistírny odpadních vod, atd. Obecně lze testy na producentech využít také při hodnocení genotoxicity či mutagenity, hodnocení detoxikační aktivity, hodnocení vlivu toxikantů na rezistenci k patogenům, hodnocení bioakumulací a biokoncentrací pomocí fototrofních druhů.

Mezi terestrické rostliny patří mechy, lišejníky a cévnaté rostliny. Fytotesty využívající jako testovací organismus mechy se aplikují spíše při testování v akvatických podmínkách. Například vodní mech *Fortinalis* se využívá jako producent s vysokým potenciálem pro bioakumulaci kovů. V případě fytotestů na lišejnících se využívají buď přirozeně se vyskytujícího společenstva lišejníků, nebo tzv. transplantované druhy. Mezi transplantované druhy patří jedinci, u kterých známe věk a jejich historii. Lišejníky se využívají jako bioindikátory. Bioindikátory slouží k odhadu čistoty prostředí podle toho, které organismy se v něm vyskytují, například štovíky ukazují na vysoký obsah dusíku v půdě, jehož zdrojem

může být prosakující septik. Lišejníky se využívají k odhadu imisní zátěže na základě popisu aktuálního stavu epifytické lišejníkové vegetace. V případě působení imisí na lišejníky dochází k ústupu lišejníkové vegetace ve třech základních na sebe navazujících etapách: snižování vitality, snižování abundance a vymizení druhu [6, 8, 9, 13, 15, 33].

Existuje velké množství kontaktních testů fytotoxicity na cévnatých rostlinách. Pro zjednodušení je můžeme **rozdělit** do níže uvedených skupin [8, 9, 13].

- Testy na bylinách nebo testy na dřevinách, například z čeledi bukovitých, borovicovitých.
- Testy na plevelných druzích rostlin, kde se rozlišují tzv. target species, cílové druhy a tzv. non-target species, necílové druhy. Target species jsou druhy rostlin, jejichž růst má být omezen, například pomocí pesticidů. Mezi tzv. target species patří například druhy svačec rolní, pýr plazivý, oves hluchý. Non target species jsou druhy rostlin, jejichž růst nemá být omezen, například hospodářsky významné rostliny.
- Testy zaměřené na jednoděložné rostliny nebo dvouděložné rostliny.
- Testy využívající semena rostlin, nebo využívající cibule a hlízy (test na *Allium cepa*) anebo metody využívající vegetativně množený matečný materiál.

V tabulce 5 je uveden seznam testů ekotoxicity s cévnatými rostlinami včetně příslušných směrnic testů a hodnocených parametrů tzv. endpointů.

Tab. 5: Přehled kontaktních testů fytotoxicity [25].

Test	Hodnocené parametry	Směrnice
Rostlinný růstový test	Klíčivost, růst (EC ₅₀ , LC ₅₀)	OECD 208
Rostlinný růstový test	Síla (vitalita) růstu	OECD 227
Test prodlužování kořene	Prodlužování kořene (EC _x)	ISO 11269-1
Test klíčení semen	Klíčivost, růst (NOEC, LOEC)	ISO 11269-2
Chronický růstový test	Klíčivost, růst, délka výhonku, počet rostlinných pupenů	ISO 22030
Screeningový test klíčovosti salátu	Klíčivost, prodlužování kořene	ISO 17126
Test klíčení semen/prodlužování kořene	Klíčivost, prodlužování kořene (EC ₁₀ , EC ₅₀)	EPA CFR 40-1-R
Test toxicity předčasněho růstu sazenice	Růst kořene, výhonku a celkové rostliny	EPA CFR 40-1-R
Test růstu celé rostliny	Růst celé rostliny, kořene a výhonku (EC ₅₀)	ASTM STP1115
Test životního cyklu rostliny	Klíčivost, růst, vývoj fotosyntetického systému, rozmnožování	ASTM
Test fytotoxicity	Klíčivost, růst (EC ₅₀)	BBA

Kontaktní testy fytotoxicity na cévnatých rostlinách jsou **využívány** výrobci herbicidů, v institucích zabývajících se životním prostředím (Česká inspekce životního prostředí, metodiky OECD, US EPA), důležitou úlohu plní také pro sanační firmy, dále se využívají v rámci rostlinné ekologie, a jsou požadovány při registraci a přeregistrování komerčně vyráběných chemických látek.

Účelem fytotestů při testování herbicidů je zjistit, které chemikálie jsou toxické pro plevely, ale zároveň nepůsobí škodlivě na hospodářsky významné rostliny. K testování se používá nejčastěji pět druhů vyšších rostlin - kukuřice, bavlna, sója, rýže a drobné obiloviny, mezi které se řadí pšenice, ječmen, žito, oves. K těmto testovacím rostlinám se přidá asi sto různých druhů běžných plevelů. Celková délka zkoušky fytotoxicity trvá 4 až 5 let. Hodnotí se velikost rostlin, kvalita rostlin, kvalit rostlinných orgánů.

Účelem ekotestů agentur ochrany životního prostředí je zjistit účinky chemických látek vůči všem rostlinným druhům, které se běžně vyskytují v dané lokalitě. Testovacími organismy jsou semena nebo semenáčky vyšších rostlin. Cílem testu je zjistit nejvyšší možnou koncentraci látky, která se může vyskytovat v prostředí, aniž by působila toxicky na rostliny. Na základě inhibice růstu semenáčků a klíčivosti semen se určuje křivka dávka – odpověď.

Účelem testů fytotoxicity v rámci ekologických studií je například sledování tzv. allelopathie. Allelopathie je jev, při kterém jedna rostlina vylučuje látky, které jsou pro druhou rostlinu toxické, následně dochází k omezení růstu a výskytu druhého organismu na dané lokalitě. Nejčastěji se pro sledování allelopathie využívají testy klíčivosti.

Cílem testů toxicity na cévnatých rostlinách určených pro sanace a rekultivace je zjistit, zda je rostlina odolná vůči kontaminantům, které jsou přítomné v zemině na sledovaném místě a může být použita pro rekultivaci nebo i fytořemediaci této lokality. Fytořemediací se rozumí využití rostlin k akumulaci či odstranění kontaminantů ze životního prostředí. Zavedení fytořemediace pro danou lokalitu vykazuje řadu výhod, především se jedná o poměrně nízké náklady. Metoda je vhodná pro různé kontaminanty, energii rostliny čerpají ze slunečního záření, minimálně se poškozuje okolí a také jde o estetický přínos. Na druhé straně se jedná o pomalejší metodu v porovnání s běžnými fyzikálně-chemickými metodami a také nedochází ke stoprocentnímu odstranění polutantů. Vhodnými organismy pro fytořemediaci jsou například dřeviny rodu vrba, topol, nebo také třezalka tečkovaná a heřmánek pravý [8, 34].

Mezi hlavní **výhody** testování ekotoxicity látek na cévnatých (vyšších) rostlinách lze například považovat následující.

- Jednoduchost provedení testu;
- Vysoká variabilita rostlinných druhů;
- Semena rostlin se získávají ve větším počtu, jsou snadno dostupná a mohou být uchovávána po dobu jednoho roku, ale někdy i déle. Proto například náklady na verifikaci jsou zanedbatelné, na rozdíl od testů s živočichy.
- Pomocí rostlin lze získat různé odezvy na toxicitu látky (například množství biomasy, hmotnost sušiny biomasy, růst kořene, výška rostliny, atd.)
- Kultivace rostlin nevyžaduje velké finanční ani materiální náklady.

Pro úplnost je třeba zmínit i stěžejní **nevýhody** testu na rostlinách. Při fytotestech je někdy potřeba dlouhodobější expozice organismu. Za negativum je také považován vliv půdních faktorů, jako je textura, vodní kapacita, objemová hmotnost a pórovitost, na růst rostlin a na toxicitu látek [34].

2.5.1 Požadavky na testovací druhy cévnatých rostlin

Všechny vybrané rostliny určené k testování toxicity by měly být dobře prostudované, hojně rozšířené, vhodné pro testy v laboratorních podmínkách, citlivé vůči působení toxických látek.

Tabulka 6 obsahuje seznam nejpoužívanější testovacích druhů využívaných v testech toxicity na cévnatých rostlinách. V příloze 1 diplomové práce je uvedena tabulka, ve které je seznam všech rostlinných druhů, které je možné využít při testování toxicity na cévnatých rostlinách.

Tab. 6: Nejpoužívanější rostlinné druhy v testech toxicity na cévnatých rostlinách [35, 36].

Čeleď	Druh
Dvouděložné	
Merlíkovité (<i>Chenopodiaceae</i>)	Řepa obecná (<i>Beta vulgaris</i>)
Hvězdicovité (<i>Asteraceae</i>)	Locika salátová (<i>Lactuca sativa</i>)
Brukvovité (<i>Brassicaceae</i>)	Hořčice bílá (<i>Sinapis alba</i>)
	Čínské zelí (<i>Brassica chinensis</i>)
	Brukev řepka olejka (<i>Brassica napus</i>)
	Brukev zelná (<i>Brassica oleracea, capitata</i>)
	Brukev řepák olejný (<i>Brassica rapa</i>)
	Řeřicha zahradní (<i>Lepidum sativum</i>)
	Ředkev setá (<i>Raphanus sativus</i>)
	(<i>Cucurbitaceae</i>) Okurka setá (<i>Cucumis sativus</i>)
Bobovité (<i>Fabaceae</i>)	Sója luštinatá (<i>Glycine max</i>)
	Vigna zlatá (<i>Phaseolus aureus</i>)
	Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)
	Pískavice řecké seno <i>Trigonella foenum-graecum</i>)
	Štírovník růžkatý (<i>Lotus corniculatus</i>)
	Jetel luční (<i>Trifolium pretense</i>)
	Vikev setá (<i>Vicia sativa</i>)
Lilkovité (<i>Solanaceae</i>)	Rajčata (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
Mířikovité (<i>Apiaceae</i>)	Mrkev obecná (<i>Daucus carota</i>)
Jednoděložné	
Lipnicovité (<i>Poaceae</i>)	Oves setý (<i>Avena sativa</i>)
	Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)
	Jílek vytrvalý (<i>Lolium perenne</i>)
	Rýže setá (<i>Oryza sativa</i>)
	Žito seté (<i>Secale cereale</i>)
	Čirok obecný (<i>Sorghum vulgare</i>)
	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)
	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)
Liliovité (<i>Liliaceae</i>)	Cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i>)

2.5.2 Aplikace testované látky

Testovanou látku je možné aplikovat dvěma způsoby, buď se vpravuje do testovací půdy, nebo se rozstříkuje na její povrch.

Při aplikaci testované látky do půdy nebo umělého substrátu záleží na skupenství této látky a její mísitelnosti s vodou. Rozpustné testované látky se smíchají s vodou a vzniklý roztok se aplikuje do půdy. Tento způsob je vhodný při expozici látek prostřednictvím kořenového systému rostliny, nebo semeny rostlin. Množství vody, kterou půda může poutat, nesmí být

překročeno přidavkem testované látky. Objem přidané vody, musí být stejný pro každou testovanou koncentraci.

Testované látky, které se naopak velmi málo mísí s vodou, se nejdříve smísí s těkavým rozpouštědlem a poté se vzniklý roztok aplikuje do substrátu. Těkavé rozpouštědlo musí být poté ze substrátu odstraněno například pomocí proudu vzduchu. Po odpaření rozpouštědla je možné substrát smíchat s testovanou látkou.

Pevné a nerozpustné testované látky se rozdrtí vhodným zařízením a následně se přidají do zkušebních nádob, do kterých se ihned vysejí semena vyšších rostlin.

Aplikace testované látky na povrch půdy je vhodná zejména při hodnocení toxicity herbicidů. Nanášení testované látky probíhá jako postřik povrchu půdy a simuluje typický postřikovací stroj. Na postřik půdy je vybrána jedna velikost trysky, která zaručí jednotnost v rozsahu dostřiku povrchu půdy pro každou testovanou koncentraci látky [6, 13, 35, 36].

2.5.3 Endpointy

Hodnocení kontaktních testů toxicity na cévnatých rostlinách se provádí různými způsoby. Existuje až několik desítek možností, které závisí od cíle prováděného testu.

Základní sledované znaky, endpointy, jsou:

- měření délky kořene, hypokotylu, nadzemní části rostliny (prýtu) a plochy listu;
- klíčení semen, růst sazenic.

Tato měření se neřadí mezi nejcitlivější, proto se také využívají další možnosti vyhodnocení testů. Jedná se především o:

- hmotnost živé nadzemní biomasy a její sušiny;
- hmotnost živé biomasy kořene a jeho sušiny;
- hmotnost dalších rostlinných orgánů a jejich sušiny;
- doba nutná pro kvetení;
- doba potřebná pro vyklíčení semen a zrání semen.

Dále je možno hodnotit vizuální abnormality rostlin, například:

- defekty chlorofylu;
- nekrózy;
- deformace listů, stonku;
- vadnutí;
- úmrtnost.

Existuje velká skupina metodik hodnotících metabolickou aktivitu, například:

- spotřeba CO_2 nebo uvolňování kyslíku je měřeno gazometrií;
- enzymatické reakce s chromogenními substráty je možno měřit spektrofotometricky nebo z důvodu vysoké citlivosti se dnes do popředí stále více dostávají metody fluorescenční detekce.

Dřeviny bývají nejčastěji hodnoceny:

- podle přírůstků;
- dle fotosyntetické aktivity;
- dle přítomnosti a aktivity mykorhizy, atd. [6, 8, 12, 13, 36].

2.5.4 Test klíčení semen a růstu kořene cévnatých rostlin

Nejčastějším sledovaným parametrem v kontaktních testech fytotoxicity na cévnatých rostlinách je klíčení semen a růst kořene. Semena rostlin jsou nejcitlivějším stádiem rostlinného růstu a proto pokud klíčivost semen poukazuje na toxicitu testované látky nebo matrice, jsou celkové environmentální následky vážné. Testy jsou především zaměřeny na testování chemických látek, které mají být aplikovány do půdy, např. pesticidy nebo hnojiva. Test klíčení semen a růstu kořene cévnatých rostlin je popsán mnoha organizacemi, jejichž metodiky jsou shrnuty v následujících kapitolách [1, 13, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44].

2.5.4.1 Princip

Test hodnotí toxické účinky testovaných látek na klíčení semen a růst kořene cévnatých rostlin. V případě, kdy je hodnoceno klíčení semen, jsou semena vyšších rostlin v přímém kontaktu s půdou, do které je nadávkována sledovaná chemikálie. Hodnocení efektu probíhá nejméně po 14 a nejdéle po 21 dnech, od doby kdy vyklíčí 50 % semen v kontrolní matrici.

V případě, kdy je potřeba posoudit pouze toxický vliv testované látky na růst kořene postačí, aby se semena nechala předklíčit na Petriho miskách vyložených filtračním papírem, který je navlhčeným destilovanou vodou. Následně jsou předklíčená semena nasazena do půdy s testovanou látkou. Kromě klíčivosti semen a délky kořene rostliny je možné hodnotit také hmotnost čerstvé biomasy, hmotnost sušiny a další pozorovatelné škodlivé efekty jako jsou chloróza, úmrtnost nebo rostlinné vývojové abnormality.

Testované chemikálie jsou buď dokonale promíchány s půdou v různých poměrech, nebo jsou aplikovány na půdní povrch. Vždy je prováděn současně i kontrolní test, ve kterém je použita stejná půda, stejná semena, ale bez přítomnosti testované látky. Tímto způsobem připravené zkušební jednotky se vystavují vhodným podmínkám, které podporují růst semen [1, 13, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

2.5.4.2 Metodika

Jako kontrolní půda je vhodná přírodní standardní **půda** LUFA 2.3, popřípadě komerčně dostupná zahradnická půda. Pokud je testovanou látkou pevný odpad může se testovat jako čistý nebo se promíchává v různém poměru s kontrolní půdou [41].

Jako **testovací nádoby** jsou doporučovány buď plastové, například polystyrenové, nebo keramické misky. Testovací nádoby by měly být při všech testováních stejné, aby byly dodrženy totožné podmínky testu.

Testování fytotoxicity je rozděleno do dvou dílčích testů. Prvním testem je **předběžný test**, který slouží k určení vhodného koncentračního rozsahu testovacích směsí. Doporučené koncentrace pro předběžný test jsou 0 (kontrola) - 0,1 – 1 – 10 – 100 % odpadu vmíchaného do standardní půdy. Test probíhá pouze v jednom opakování a na každou koncentraci je použito 10 semen. Na základě předběžného testu je vybráno pro **základní test** pět koncentrací, u kterých je možno stanovit hodnotu EC₅₀. Základní test probíhá ve čtyřech opakováních. Směs odpadu s kontrolní půdou musí být promíchána tak, aby byla homogenní [41, 43].

- Před testem

Nejdříve je nutností zjistit množství vody v půdě a v testovaném substrátu, tzv. **vodní kapacitu půdy** (water holding capacity, WHC). Maximální vodní kapilární kapacita půdy je stav, kdy je půda schopna v přirozeném složení udržet v kapilárních pórech maximální množství vody. Při takovém nasycení se vzduch nachází jen v nekapilárních pórech, tedy zemina obsahuje největší množství vody hygroskopické, obalové a kapilární.

Vodní kapacita půdy se stanoví buď podle přílohy normy ISO 11268-2 nebo podle normy ISO 11269-1. V prvním případě se asi 50 až 100 g vzorku umístí do předem zváženého a vysušeného kovového válce (asi 5 cm v průměru) s jemným sítkem na dně, zemina se poklepe, aby sesedla. Válec se umístí do nádoby s vodou tak, aby hladina vody byla asi ve výšce sloupce vzorku. Ve vodní lázni se válec ponechá 3 hodiny, poté se přemístí do vany s pískem (10 cm výška, zrnitost písku 0,1 mm – 0,7 mm). Po 2 h se nádoba se zeminou váží v 30min. intervalech, dokud se 2 po sobě jdoucí měření neshodují. U minerálních půd probíhá vážení až po 3 h. Nádoba s pískem musí být odvodňována, např. umístěním tkaniny na povrch vrstvy písku a nádoba musí být přikryta, aby se zabránilo vysoušení vzorku. Vzorek se i s válcem zváží, vysuší do konstantní hmotnosti při $105 \pm 5^\circ\text{C}$ a opět se zváží. Měření se provádí ve třech paralelních stanoveních, ze kterých se vypočte průměrná hodnota a ze získaných hodnot se vypočte VKP dle rovnice 1.

$$VKP = \frac{S - T - D}{D} \times 100 \quad (1)$$

VPK je vodní kapacita půdy (%), S je hmotnost nasycené zeminy i s válcem (g), T je hmotnost válce (g), D je suchá hmotnost vzorku (g).

Ve druhém případě, dle metodiky ISO 11269-1 se 3 nádoby s půdou umístí do jiné větší nádoby, ve které je udržována hladina vody ve výšce 5 až 10 cm. Jakmile je půda v nádobách mokrá, tak se nádoby překryjí hodinovým sklíčkem a přesunou se na suché místo, kde bude půda vysychat přes noc. Ráno je vlhkost půdy považována za 100%. Půda se zváží a následně se kontroluje její hmotnost až po dobu, kdy je hmotnost půdy 70 %. Tato vlhkost je v testovacích nádobách udržována po celou dobu testu [43, 44].

Po zjištění 70% vodní kapacity půdy (WHC) se naplní testovací nádoby. Do čistých testovacích nádob se nabere kontrolní půda nebo substrát, v takovém množství, aby povrch půdy sahal 1 cm pod horní okraj nádoby. Všechny nádoby, musí obsahovat stejné množství půdy či substrátu, cca 800-1000 g. Do každé testovací nádoby je zaseto 10 semen. Nejprve jsou semena zavlažována demineralizovanou vodou a po vyklíčení dostupným roztokem hnojiva. Vysoká intenzita zavlažování je důležitá pro povzbuzení klíčivosti semen a také proto, aby se testované látky, které byly aplikovány na půdní povrch rychleji dostaly do půdy.

- Během testu

První kontrola klíčivosti semen by měla proběhnout nejpozději za tři dny po výsevu a dále denně. Doba testu fytotoxicity se počítá od okamžiku, kdy vyklíčí 50 % semen v kontrolní půdě. Poté je množství vyklíčených semen v každé testovací misce redukováno na 5 co nejvíce identických jedinců.

- Na konci testu

Test je ukončen nejdříve po 14 dnech a nejdéle po 21 dnech, po vyklíčení 50% semen v kontrolní půdě. Na konci testu se vyhodnocuje počet vyklíčených rostlin v procentech a zaznamenává se biomasa stejně jako vizuální fytotoxicita (chloróza, nekróza, deformace listů, deformace stonku, vadnutí) a úmrtnost. Biomasa může být měřena na základě hmotnosti finálního výhonku, preferuje se hmotnost sušiny, anebo měřením délky kompletního výhonku. Hmotnost sušiny se zjistí tak, že se rostliny vysuší při teplotě 60 °C až 80 °C do stálé hodnoty hmotnosti. Doba sušení trvá přibližně 16 hodin.

Testovací podmínky mají být takové, aby se co nejvíce přibližovaly podmínkám nutným k přirozenému růstu vybraných rostlinných druhů. Při růstu semen se kontroluje nejčastěji vlhkost půdy (substrátu), teplota, koncentrace oxidu uhličitého, vlnová délka světla, intenzita světla, světelná perioda, množství vody, časové nastavení zavlažování, atd. V tabulce 7 jsou uvedeny vhodné testovací podmínky pro vybrané druhy rostlin

Tab. 7: Vhodné testovací podmínky pro vybrané druhy rostlin [41, 43].

Vybrané rostlinné druhy	Vhodné testovací podmínky
Rajčata (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Relativní vlhkost 70 ± 5 % během světelné periody a relativní vlhkost ve tmě 70 ± 5 %.
Okurka setá (<i>Cucumis sativus</i>)	
Locika setá (<i>Lactuca sativa</i>)	
Sója luštinová (<i>Glycine max</i>)	Teplota 20 ± 2 °C během dne a 16 ± 2 °C během noci.
Brukev řepka olejka (<i>Brassica napus</i>)	
Mrkev obecná (<i>Daucus carota</i>)	
Oves setý (<i>Avena sativa</i>)	Světelná perioda: 12 – 16 h světlo a 8 – 12 h tma.
Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)	
Kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)	
Cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i>)	

Aby výsledky testu byly považovány za **validní**, musí být v kontrolním testu dodrženy následující body:

- množství vyklíčených semen musí být nejméně 70 %;
- na sledovaných rostlinách nesmí být pozorován žádný fytotoxický efekt (například chloróza, nekróza, vadnutí, deformace listů a stonků);
- musí přežít nejméně 90 % studovaného materiálu;
- všechny používané testovací nádoby by měly být stejné, vystaveny stejným podmínkám a obsahovat stejné množství půdní matrice, podpůrného média nebo substrátu ze stejného zdroje.

Testováním referenčních látek se zjišťuje, zda nedochází k závažným změnám během stanovení a v odpovědi testovaných rostlin. Každý rostlinný druh má k sobě vhodnou referenční látku, například trichloroctan sodný je referenční látka pro ječmen anebo hlávkový salát a kyselina boritá například pro oves setý nebo brukev řepku olejku.

Součástí **vyhodnocení testu** je grafické vyjádření získaných výsledků, na jehož podkladě je zjištěna hodnota EC₅₀.

2.5.4.3 Testování limitní koncentrace odpadů

Za účelem zjednodušení provádění testu ekotoxicity odpadů je navrženo provádět nikoli úplnou ředící řadu koncentrací odpadu, ale pouze koncentraci 500 g/kg vzorku ve standardní zemině. Při této koncentraci nedochází k negativnímu vlivu fyzikální struktury odpadu na testovací organismus, ale v případě toxického účinku odpadu je toxicita i při této koncentraci zaznamenána. Pokud vzorek odpadu prokazuje toxicitu při této koncentraci, znamená to, že působí toxicky na půdní prostředí. Naopak pokud vzorek odpadů při této koncentraci neprokazuje toxický účinek, můžeme jej ukládat do volné přírody, aniž by na ni působil toxicky.

Koncentrace 500 g/kg byla zvolena z důvodu eliminace nežádoucích nepříznivých účinků fyzikálních vlastností některých odpadů. Mezi nežádoucí fyzikální vlastnosti odpadů patří například schopnost zadržovat vlhkost, vsakovací schopnost, pórovitost.

Provádí se 5 paralelních nasazení testované koncentrace i kontroly. Posouzení, zda se jedná o vzorek toxický, je prováděno statistickými testy shody středních hodnot, tzv. *t*-testy pro střední hodnotu odpovědi organismů, získanou při expozici testovaným vzorkem o koncentraci 500 g/kg a kontrolní půdou. Jestliže se střední hodnoty statisticky významně neliší, lze vzorek považovat za netoxický. Za ekotoxicky pozitivní lze považovat vzorek, který vykázal toxické účinky alespoň na jednom testovacím organismu na hladině významnosti 95 % [35, 43].

2.5.5 Další možnosti využití kontaktních testů fytotoxicity

Kontaktní testy fytotoxicity se mohou kromě běžných kritérií vyhodnocovat také podle metabolické aktivity, kde je například hodnocena inhibice enzymů rostlin nebo se stanovuje rychlost čisté fotosyntézy.

- Hodnocení inhibice enzymů rostlin pomocí fluorescenčních metod

Emisi záření, ke které dochází při přechodu excitované molekuly do základního stavu, souhrnně označujeme jako luminiscenci. Excitace může být vyvolána chemickou reakcí, pak mluvíme o chemoluminiscenci, nebo absorpcí kvanta záření, která vede k jevu označovanému jako fluorescence.

V dnešní době jsou fluorescenční metody využívány jako zdroj informací pro rostlinné fyziology, ale stále více se objevuje i praktické nasazení v toxikologii a ekotoxikologii.

Princip využití fluorescenční detekce spočívá ve sledování přirozené emise záření z rostlinných pigmentů zejména z chlorofylu v reakčních centrech fotosystému II u cévnatých rostlin, ale i u řas a sinic. Rostliny jsou vystaveny měnícím se podmínkám prostředí. Většina stresových faktorů přímo či nepřímo omezuje kapacitu rostliny využívat energii fotonů pro fotosyntézu a modifikuje její optické a fluorescenční vlastnosti. Krátkodobé stresy s dobou působení v rozmezí několika minut až několika hodin přímo narušují fotosyntetickou aktivitu, vliv stresů dlouhodobých, působících na rostlinu několik dnů i déle se může projevat také poklesem obsahu chlorofylu v listu. Za optimálních podmínek je výrazně větší část energie záření absorbovaného fotosyntetickými pigmenty využita pro fotosyntézu než za podmínek stresových. Působení stresových faktorů způsobuje vyšší využití energie pro vznik tepla a fluorescence [42, 45, 48].

- Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky

Fotosyntézu můžeme zjednodušeně definovat jako proces probíhající v zelených rostlinách, který převádí absorbovanou část energie dopadajícího slunečního záření prostřednictvím asimilačních pigmentů, spolu s CO_2 a H_2O , do energie chemických vazeb biochemických produktů fotosyntézy (ATP, NADPH, sacharidy). Jde o fixaci vzdušného oxidu uhličitého rostlinami a vznik sacharidů, jakými jsou sacharózy, škrob, apod.

Gazometrické metody jsou založeny na principu měření rychlosti spotřeby CO_2 rostlinami. Zjednodušeně lze říci, že pomocí těchto metod měříme pokles koncentrace CO_2 v okolí rostliny vyvolaný fotosyntetickou fixací molekul CO_2 . Neboli srovnáváme koncentraci CO_2 rostliny vyskytující se v normálních přirozených podmínkách s koncentrací CO_2 u rostliny vyskytující se ve stresovém prostředí.

Základním přístrojovým vybavením je infračervený analyzátor plynů napojený na komoru, v níž je uzavřen fotosyntetizující objekt (obr. 1) [46, 47].



Obr. 1: Infračervený analyzátor plynů napojený na komoru, v níž je uzavřen fotosyntetizující objekt [47].

2.6 Vedlejší energetické produkty

Energetika tvoří neoddělitelnou součást hospodářství každého státu. Předmětem zájmu energetiky jsou energetické suroviny. Energetickými surovinami nazýváme nerosty, z nichž je možno získávat energii. Dělí se na skupinu kaustobiolitů (fosilních paliv) a radioaktivních látek (uran, thorium a radium). Kaustobiolity jsou hořlavé uhlovodíky, které vznikly nahromaděním odumřelé organické substance a patří mezi ně například rašelina, lignit, hnědé a černé uhlí, antracit, ropa, zemní plyn, propanbutan, hydráty methanu, asphalt [2, 3, 49]. Energetický průmysl je jedním z největších producentů odpadů.

Z důvodu nedostatku vhodných výrobních technologií vytváří energetický průmysl, zejména tepelné elektrárny, teplárny, kotelny, stejně jako i jiné druhy průmyslů, odpady, které souvisí s procesem spalování nebo čištění kouřových plynů. Část těchto odpadů se ukládá

na skládkách, avšak při splnění legislativních požadavků mohou být cenným materiálem pro využití například ve stavebnictví [2, 3, 49].

2.6.1 Charakteristika a využití vedlejších energetických produktů

Vedlejší energetické produkty představují významnou skupinu tuhých odpadů. Jedná se především o popílek, škváru, strusku, energosádrovec, stabilizát nebo popel.

Popílek, vznikající v elektrárnách a teplárnách, bývá dvojího druhu, závisí na systému spalování. Fluidní spalovny produkují popílek s větším podílem síry ve formě oxidu sirového, v porovnání s popílkem, který vzniká vysokotepelným spalováním. Z chemického hlediska se jedná především o oxid křemičitý a oxid hlinitý a uplatňuje se zejména ve stavebnictví, při výrobě stavebních hmot (betonů, malt, cementů, pórobetonu, umělého kameniva).

Škvára může být různého složení, závisí na druhu spalovaného materiálu. Škvára se využívá hlavně ve stavebnictví zejména jako škvárobeton (tepelně izolační materiál), dále například pro úpravu terénu, rekultivace skládek odpadů.

Struska je porézní hmota, vznikající jako vedlejší produkt při spalování uhlí. Z chemického hlediska se skládá především z oxidu křemičitého, oxidu hlinitého a vody. Struska zastává funkci plniva při výrobě stavebních hmot (cementu, cihlářských výrobků, malty, škvárobetonu). Dále je možno ji využít jako zdrsňující posypový materiál pro zimní údržbu komunikací a chodníků. Roční produkce strusky je cca 32000 tun.

Energosádrovec je dihydrát síranu vápenatého s příměsí popílku a vody. Vzniká při mokré metodě odsiřování kouřových plynů. Je certifikovaným materiálem pro výrobu cementu. Další možnosti využití při výrobě pórobetonu, stabilizátu či sádrokartonových desek. Roční produkce činí přibližně 75 000 tun.

Stabilizát je produkt vzniklý po spalování hnědého uhlí, jedná se o směs popílku, energosádrovce, vápna, vody, strusky. Používá se pro rekultivaci zemin a komunikací, při asanacích, pro těsnění skládek odpadů.

Popel je vedlejší energetický produkt vznikající při spalování hnědého uhlí. Využití je obvykle ve stavebnictví k výrobě různých stavebních hmot [48, 49].

2.6.2 Vznik vedlejších energetických produktů

Vedlejší energetické produkty vznikají při spalování paliv. Spalování paliv je chemický proces (rychlá oxidace), kterým se přeměňuje chemická energie vázaná ve spalovaném palivu na energii tepelnou. Jedná se o nejjednodušší metodu pro termickou přeměnu organických paliv za dostatečného přístupu (zpravidla atmosférického) kyslíku na tepelnou energii. Tepelná energie získaná spalováním se pak využívá pro vytápění, ohřev vody, pro výrobu elektrické energie, či jiné technologické procesy. Kvalita spalování závisí na správném poměru paliva a kyslíku, na jejich promísení, dále na konstrukci a technickém stavu spalovacího zařízení [50, 51].

Proces spalování probíhá v hlavní části spalovacího zařízení, kterou je kotel. Kotle se dle způsobu spalování rozdělují na několik druhů. Vedlejší energetické produkty použité v předložené diplomové práci vznikly konkrétně ve třech typech kotlů. Jedná se o kotle fluidní, práškové a roštové.

Fluidní kotle patří k nejpoužívanějším zařízením zejména ve větších a středních teplárnách a elektrárnách. Dnes se ve fluidních kotlích vyrábí až 50 % světové elektrické energie. Palivem

pro fluidní kotle je jemně rozemleté uhlí (případně i jiné látky) smíšené se vzduchem. Využívá se vnosu, který vzniká vháněním spalovacího vzduchu ze spodu kotle do vrstvy jemných částic paliva. Vznikne tak fluidní vrstva. Jemně rozemleté práškové uhlí má daleko větší povrch než stejný objem kusového uhlí, takže rychle a stejnoměrně shoří na jemný popel. Fluidní kotel dosahuje vysoké účinnosti, 37 – 48 % a vysokých teplot, 700 - 900 °C, čímž je zabráněno vzniku například oxidů dusíku. Na druhou stranu se však jedná o zařízení poměrně složité, které se musí před spuštěním přehřívat, navíc vyžaduje ještě například mlýn na uhlí [52, 53].

V **práškových kotlích** se vhání uhelný prach spolu s primárním vzduchem, na rozdíl od roštových kotlů kde se uhlí sype na rošt. Efektivnější vůči fluidním kotlům jsou práškové kotle. Zde se primární vzduch vhání turbodmychadlem pod tlakem, aby bylo více kyslíku pro rychlé spalování. Současně se vhání i uhelný prach do celého objemu ohniště. Sekundární vzduch podporuje hoření. Doba spalování je u práškových kotlů 1 až 3 sekundy, zatímco při spalování na roštu bývá v desítkách minut [54].

V **roštovém kotli** dochází ke spalování kusových paliv v pevné vrstvě. Dělí se do dvou základních skupin. První skupinu tvoří kotle s pevným roštem (palivo vyhořívá v původní nasycené vrstvě, zbytky po spalování - škvára a popel se odstraňují ručně). Druhou skupinu tvoří kotle s mechanickým roštem (palivo se v ohništi posouvá, případně se prohrabuje, postupně vyhořívá a zbytky po spalování jsou vynášeny mechanicky). Spalování probíhá ve dvou fázích a to ve vrstvě na roštu a v prostoru nad vrstvou paliva.

2.7 Ekotoxická odpadů

Ekotoxická odpadů je jednou z nebezpečných vlastností odpadů a ve vyhlášce MŽP č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, v platném znění je zahrnuta pod kódem H 14. Tuto nebezpečnou vlastnost mají odpady, které představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Jako nebezpečný se hodnotí odpad, jehož vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity uvedených v bodě 7 přílohy č. 3 alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus:

- a. ryby *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (96 h)
- b. dafnie *Daphnia magna* (48 h)
- c. řasy *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* (72 h)
- d. semena *Sinapis alba* (72 h)

tyto hodnoty: $LC (EC, IC)_{50} < 10 \text{ ml.l}^{-1}$ [9].

Kromě hodnocení nebezpečnosti odpadů jsou vyžadovány ekotoxikologické zkoušky i při stanovení kritérií pro umístění odpadů na jednotlivé skupiny skládek nebo do podzemních prostor a pro využití odpadů na povrch terénu.

V ČR se provádí hodnocení ekotoxicity odpadů podle platných právních předpisů z oblasti životního prostředí. Základním dokumentem je zákon o odpadech č. 185/2001 Sb. a jeho prováděcí předpisy, kterými jsou kromě výše zmíněné vyhlášky č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů ještě vyhlášky č. 383/2001 Sb. o podrobnostech

pro nakládání s odpady a č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb.

Pro stanovení ekotoxicity jsou v České republice doporučovány čtyři konvenční testy metodicky identické s ISO normami. Jedná se o akutní test na rybách dle ČSN EN ISO 7346-2 Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby - Část 2: Obnovovací metoda. Dále je to imobilizační test na perloočkách dle ČSN EN ISO 6341 Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Zkouška akutní toxicity. Třetím testem je růstově inhibiční test na řasách dle ČSN EN ISO 8692 Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. A čtvrtým je test klíčivosti a růstu kořene hořčice dle Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů uveřejněného ve Věstníku MŽP č. 4/2007.

Podle uvedených právních předpisů se hodnocení akutní ekotoxicity odpadu provádí na jeho vodných výluzech a pro hodnocení je rozhodující určení procenta inhibice, popř. stimulace organismů. Všechny testy jsou prováděny ve vodném prostředí a na akvatických organismech (výjimkou jsou semena *Sinapis alba*). Z ekologického hlediska je proto sada relevantní pouze pro vodní ekosystémy a je nevhodná pro odhady rizik na půdní ekosystémy. Sada testů nehodnotí toxicitu látek, které jsou ve vodě nerozpustné. Z tohoto pohledu má současná česká odpadová legislativa nedostatek, neboť sice je začleněn terestrický organismus (*Sinapis alba*), avšak je opominuta kontaktní expozice.

Ve světě je ekotoxicita odpadu hodnocena i pomocí kontaktních testů toxicity. Ve většině zemí se ekotoxicita odpadů stanovuje sadou testů, která zahrnuje organismy tří trofických úrovní a provádí se jak s výluhem, tak v kontaktním uspořádání. Nejčastějšími testovacími organismy pro kontaktní testy jsou žížaly *Eisenia fetida* či *Lumbricus terrestris* nebo jiní půdní bezobratlí dále půdními mikroorganismy a semena rostlin.

Základem této diplomové práce je testování vedlejších energetických produktů v kontaktním uspořádání pomocí testů fytotoxicity, které je pro úplnost a porovnání výsledků doplněno testy s vodným výluhem vedlejších energetických produktů na semenech vybraných suchozemských vyšších rostlin [1, 2, 3, 4, 49, 54, 56, 55].

2.7.1 Princip ekotoxikologického testování odpadů s vodnými výluhy

Princip ekotoxikologického testování odpadu s vodnými výluhy se řídí dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 11/2007 a je znázorněn schématem 1.

V **úvodním testu** se testuje neředěný vodný výluh odpadu a úkolem je zjistit zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Pokud je toxický efekt v úvodním testu menší než 50 %, provede se ověřovací test. Ověřovací test se provádí s nejméně trojnásobným množstvím organismů proti počtu organismů požadovaných při základních testech. Projeví-li se v úvodním testu toxický účinek větší nebo roven 50%, provede se test předběžný.

Pro **předběžný test** je nutné zvolit vhodnou škálu koncentrací vodného výluhu. Koncentrační řada musí zahrnovat koncentrace s toxickým účinkem 0 - 100 %. Jakmile na základě výsledků předběžného testu nelze stanovit hodnota LC (EC, IC)₅₀, provede se test ověřovací.

V ostatních případech slouží výsledky předběžného testu k určení rozsahu koncentrací pro test **základní**. Součástí každého testu je kontrolní test. V kontrolním testu obvykle nesmí dojít k vyšší než 5 či 10 procentní úmrtnosti [8, 13, 57].

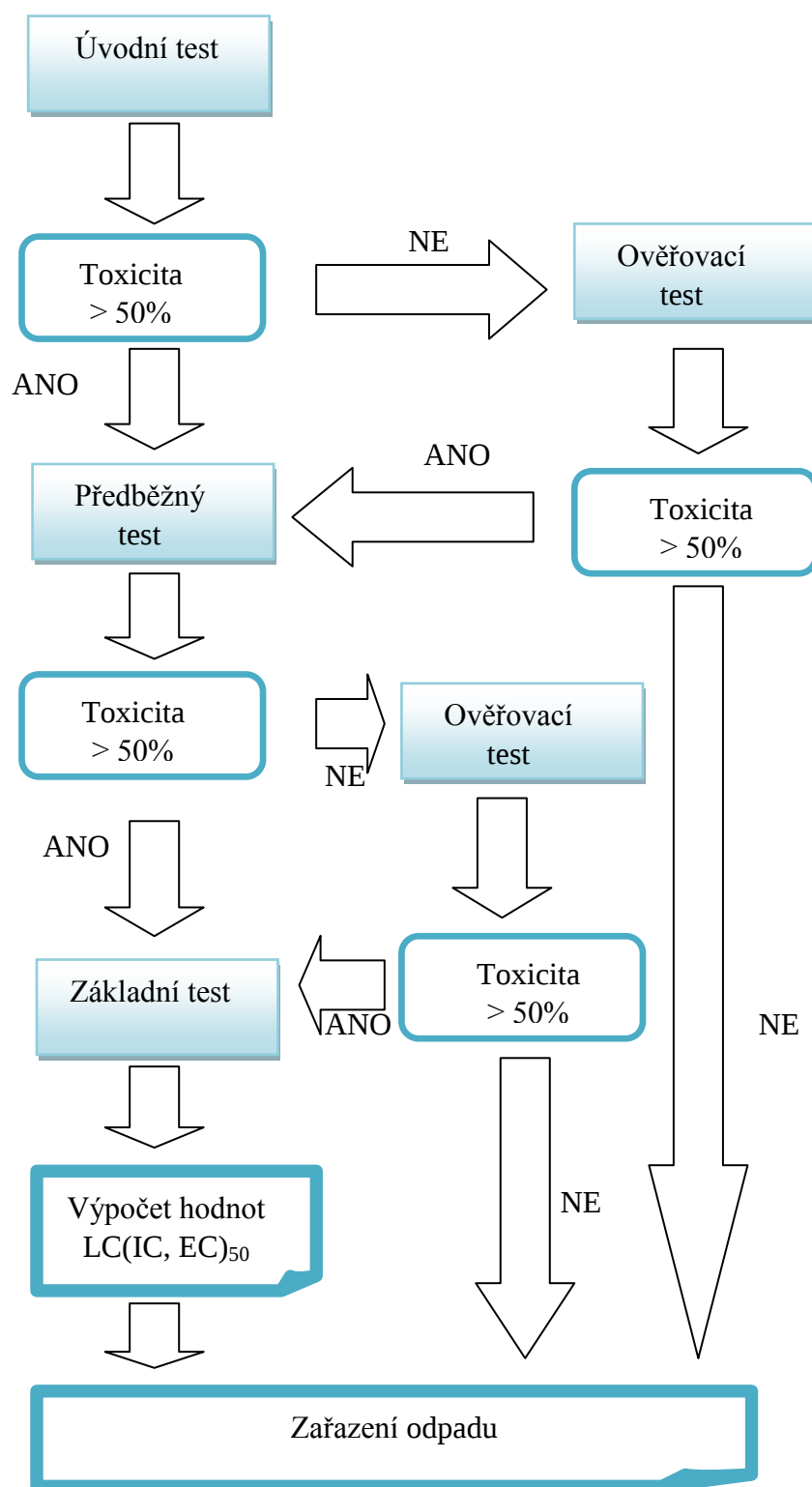


Schéma 1: Schéma ekotoxikologického testování odpadů [57].

Vodný výluh odpadů

Vodný výluh odpadů se připravuje na základě Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů nebo podle normy ČSN EN 12457-4 (2003), Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti

zrnitých odpadů kalů- část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním). Vodný výluh je definován dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008, bod 2.3 jako výluh, který byl připraven ze vzorku odpadu podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě, tj. získaný při zkoušce vyluhovatelnosti vodou.

K přípravě vodného výluhu se používá voda destilovaná, demineralizovaná nebo deionizovaná odpovídající 3. stupni jakosti podle ČSN ISO 3696.

Nejdříve se provede předběžná úprava vzorku, kde se zjistí jeho hmotnost a v případě, že vzorek obsahuje částice větší než 4 mm, proseje se sítím. Pokud zbytek na síti je větší než 5 % hmotnosti vzorku, rozdrť se a znovu se proseje. Pokud je zbytek na síti menší než uvedených 5 %, do dalšího postupu již nevstupuje. Zkušební vzorek se připraví homogenizací všech podsítných podílů. Vlastní přípravě výluhu předchází stanovení podílu sušiny (DR) v samostatném analytickém vzorku. Analytický vzorek se suší do konstantní hmotnosti při teplotě 105 ± 5 °C. Stanovení DR v analytickém vzorku se musí provádět v souladu s postupy podle ČSN ISO 11465 (Kvalita půdy a stanovení hmotnostního podílu sušiny a hmotnostní vlhkosti půdy) a vypočte se z rovnice 2:

$$DR = 100 \frac{M_D}{M_W} \quad (2)$$

DR je podíl sušiny v analytickém vzorku v [%];

M_D je hmotnost vysušeného analytického vzorku v [kg];

M_W je navážka analytického vzorku odpadu pro stanovení podílu sušiny v [kg].

Pro přípravu 1 litru vodného výluhu se ze zkušební vzorku připraví analytický vzorek o celkové hmotnosti M vypočtené podle rovnice 3:

$$M = 100 \frac{M_T}{DR} \quad (3)$$

obsahující $0,1 \text{ kg} \pm 0,005 \text{ kg}$ sušiny M_T (váženo s přesností 0,0001 kg).

M je hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu v [kg];

M_T je teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg], v daném případě pro 1 l vody je

$M_T = 0,100 \text{ kg}$;

DR je podíl sušiny v analytickém vzorku v [%].

Teplota vody použité pro přípravu výluhu musí být po celou dobu vyluhování mezi 15 až 25 °C.

Analytický vzorek o hmotnosti M odpovídající hmotnosti sušiny $M_T = 0,100 \text{ kg}$ se vloží do vzorkovnice a přidá se k němu takové množství vody L_A , aby poměr L/S byl 10/1. Celkové množství vody L je součtem přídatku vody L_A a vlhkosti obsažené ve vzorku odpadu. Množství vody L_A se dávkuje s přesností ± 5 % objemových z celkového množství L_A (výpočet dle rovnice 4).

$$L_A = M_T \frac{11 - 100/DR}{\rho_{H_2O}} \quad (4)$$

L_A je množství přidané vody v [l];

M_T je teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg] (pro cca 1 l výluhu je $M_T = 0,100$ kg);

DR je podíl sušiny v analytickém vzorku v [%];

ρ_{H_2O} je hustota vody (pro účely stanovení vyluhovatelnosti je rovna 1 kg/l).

Takto připravený vzorek se umístí do třepačky. Pohyb třepačky je způsobem „hlava – pata“ rychlostí 5 – 10 otáček za minutu po dobu 24 hodin $\pm$ 0,5 hodiny. Poté se provede sedimentace po dobu 15 minut ($\pm$ 5 minut). Následně se vodný výluh pokud je potřeba upraví odstředěním a filtrací (přes papírový filtr a následně přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μ m). Není dovoleno promývání filtrů vodou nebo jinými rozpouštědly, které by následně vstupovaly do filtrátu. U získaného výluhu se změří jeho celkový objem V_E , konduktivita a pH [57, 58, 59].

2.7.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Předmětem testu je stanovení toxického účinku látek obsažených ve vodném výluhu na klíčivost semen a růst kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Test inhibice růstu kořene kompletně popisuje Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů zveřejněný ve Věstníku č. 4/2007.

Princip a vyhodnocení testu

Principem testu je kultivace semen v Petriho miskách na filtračním papíře, který je nasycený testovaným roztokem. Současně se semena nasadí do standardně připravené ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Celková délka testu je 72 hodin a celý test probíhá za nepřístupu světla. Na konci testu se stanovuje počet vyklíčených semen a měří se délka kořene. Z naměřených délek kořene se vypočte jejich aritmetický průměr dle rovnice 5:

$$\bar{L} = \frac{\sum L_i}{n} \quad (5)$$

$\bar{L}$ je průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm);

L_i je průměrná délka i-tého kořene ve zvolené koncentraci (mm);

N je počet semen ve zvolené koncentraci.

Vyhodnocení testu spočívá ve výpočtu inhibice růstu kořene pro určitou koncentraci testované látky a určení koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici růstu kořene po 72 hodinách ve srovnání s kontrolou, výsledkem je hodnota 72hIC₅₀. Inhibice růstu kořene se vypočte dle rovnice 6:

$$I = \frac{L_k - L_t}{L_k} \cdot 100 \quad (6)$$

I je inhibice růstu kořene v %;

L_k je průměrná délka kořene v kontrole (mm);

L_t je průměrná délka kořene v testované matrici (mm).

Koncentrace látky, při které došlo k inhibici růstu kořene, se vyjádří v logaritmické podobě. Sestaví se graf, ve kterém se na osu x nanese koncentrace v logaritmické hodnotě a na osu y inhibice růstu kořene vyjádřená v procentech. Jednotlivé body se v grafu spojí přímkou a v průsečíku této přímky s hodnotou inhibice růstu kořene 50 % se spustí kolmice na osu x , kde se odečte koncentrace. Získaná koncentrace se odlogaritmuje, čím získáme hodnotu inhibiční koncentrace, IC_{50} . Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, tzn. průměrná délka kořene v testované látce je větší jak v kontrole, výpočet inhibiční koncentrace se neprovádí [60].

2.8 Související legislativní předpisy

Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech, ve znění pozdějších předpisů, definuje, v §3 odpad jako každou movitou věc, které se osoba zbavuje nebo má úmysl nebo povinnost se jí zbavit a přísluší do některé ze skupin odpadů uvedených v příloze č. 1 k tomuto zákonu. Součástí výše zmíněného zákona je i povinnost přednostního využívání odpadů definována v §11 - každý má při své činnosti nebo v rozsahu své působnosti povinnost v mezích daných tímto zákonem zajistit přednostně využití odpadů před jejich odstraněním. Materiálové využití odpadů má přednost před jiným využitím odpadů.

Vydání Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek označované jako REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) určilo povinnost registrovat všechny látky, přípravky a předměty, které jsou na území Evropské unie vyráběny, popř. na její území dováženy. Tato povinnost se týká i odpadů, které mají být materiálově využity. Vedlejší energetické produkty se dále využívají zejména jako stavební výrobky. Stavební výrobek je definován v Nařízení vlády č. 163/2002 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na vybrané stavební výrobky, v §1a jako každý výrobek určený výrobcem nebo dovozcem pro trvalé zabudování do staveb, pokud jeho vlastnosti mohou ovlivnit alespoň jeden ze základních požadavků na stavby uvedených v příloze č. 1 k tomuto nařízení, (dále jen "výrobek"), kdy trvalým zabudováním výrobku do stavby je takové zabudování, při kterém se vyjmutím nebo výměnou výrobku trvale mění vlastnosti stavby, přičemž vyjmutí nebo výměna výrobku je stavební prací.

Producenti vedlejších energetických produktů mohou volit ze dvou alternativ. Producent splní všechna kritéria stanovená směrnicí (ES) 98/2008 o odpadech a zákonem č. 185/2001 Sb., včetně splnění podmínek pro certifikaci produktu a deklarování jeho využití a poté výrobek může být uveden na trh, anebo se producent rozhodne tuhého zbytku po spalování zbavit a bude s ním dále nakládat jako s odpadem v režimu zákona o odpadech. Rozhodovací proces producenta je znázorněn schématem 2 [61, 62, 63].

Ekotoxikologické i toxikologické testování je také součástí Nařízení č. 1907/2006/ES REACH. Jelikož produkce vedlejších energetických produktů z většiny energetických

zařízení je větší než 1 000 t/rok, vztahují se na certifikované vedlejší energetické produkty přílohy č. VII, VIII, IX a X Nařízení č. 1907/2006/ES REACH. Dle těchto příloh bude nutné provádět ekotoxikologické a toxikologické testování v následujícím rozsahu:

1. Toxicita pro vodní prostředí

- a) Zkoušky subakutní toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*)
- b) Studie inhibice růstu vodních rostlin (upřednostňují se řasy)
- c) Studie subakutní toxicity na rybách
- d) Zkoušky inhibice respirace aktivovaného kalu
- e) Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*)
- f) Zkoušky chronické toxicity na rybách
 - Zkouška toxicity u ryb v raných vývojových stádiích
 - Zkouška subakutní toxicity na rybích embryích a plůdcích se žloutkovým vakem
 - Růstová zkouška na nedospělých rybách

2. Rozklad

- a) Biotický
 - Snadná biologická rozložitelnost
 - Simulační zkoušky konečného rozkladu v povrchových vodách
 - Simulační zkoušky půdy (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na půdu)
 - Simulační zkoušky sedimentu (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na sediment)
- b) Abiotický
 - Hydrolýza jako funkce pH
- c) Určení produktů rozkladu

3. Osud a chování v životním prostředí

- a) Screening adsorpce nebo desorpce
- b) Bioakumulace ve vodních druzích, přednostně u ryb
- c) Další informace o adsorpci nebo desorpci
- d) Další informace o osudu a chování látky nebo produktů rozkladu

4. Účinky na suchozemské organismy

- a) Subakutní toxicita u bezobratlých
- b) Účinky na půdní mikroorganismy
- c) Subakutní toxicita u rostlin
- d) Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých
- e) Zkoušky chronické toxicity na rostlinách

5. Chronická toxicita u organismů v sedimentu

6. Chronická nebo reprodukční toxicita u ptáků [64]

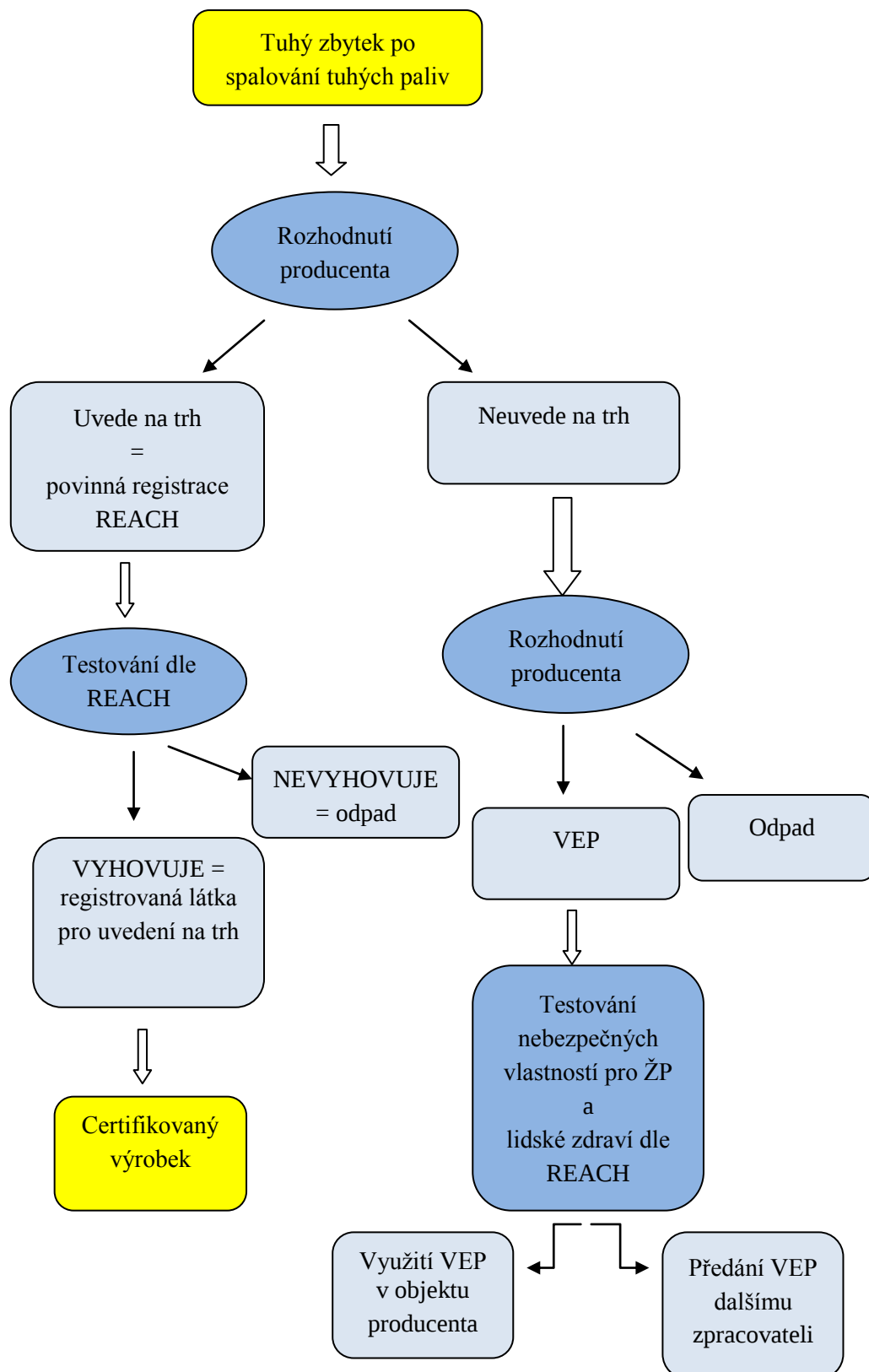


Schéma 2: Schéma rozhodovacího procesu producenta [63].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Diplomová práce navazuje na diplomovou práci Petry Ballnérové, ve které byly testovány vodné výluhy vzorků vedlejších energetických produktů pomocí vybraných organismů. Jednalo se o test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*), akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*), test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*), test inhibice růstu okřešku menšího (*Lemna minor*), Thamnotoxkit (*Thamnocephalus platyurus*) FTM a Rapidtoxkit FTM. Ekotoxicita vzorků byla testována dle stávající legislativy, a to na vodném výluhu odpadu. Cílem této práce bylo stejné vzorky uskladněné v plastových sáčcích při laboratorní teplotě otestovat pomocí kontaktních terestrických testů fytotoxicity, a to na semenech vyšších rostlin a porovnat tyto výsledky s výsledky testů získaných testováním vzorků na terestrických rostlinách dle stávající metodiky testování odpadů, která vychází z testů v akvatickém uspořádání.

Vzorky vedlejších energetických produktů poskytlo pět různých energetických společností, většina z nich si dala podmínku, aby název jejich instituce zůstal v anonymitě. K dispozici bylo celkem 5 vzorků.

3.1 Vzorky vedlejších energetických produktů

V tabulce 8 je přehled všech testovaných vzorků vedlejších energetických produktů (VEP) a provozoven, ze kterých pochází, včetně jejich označení.

Tab. 8: Přehled vzorků vedlejších energetických produktů (VEP) [64].

Označení provozovny	Palivo	Spalovací zařízení	VEP
A	Hnědé uhlí Biomasa	Atmosférický fluidní kotel	Ložový popel
B	Černé uhlí Biomasa	Práškový kotel granulační	Úletový popílek
C	Hnědé uhlí Biomasa	Práškový kotel granulační	Škvára Produkt z odsíření
D	Černé uhlí Hnědé uhlí Biomasa	Atmosférický fluidní kotel	Úletový popílek

3.2 Popis technologických postupů energetických provozoven

Provozovny A až D jsou definovány dle zákona č. 86/2001 Sb. o ochraně ovzduší, ve znění pozdějších předpisů, jako zvláště velké spalovací zdroje o jmenovitém tepelném příkonu 50 MW a vyšším. Výstupem z provozoven A až D je nejen technologická pára používaná

k výrobě elektrické energie, ale i teplá a horká voda využívaná v teplárenství. Provozovna E představuje malou obecní kotelnu, která zásobuje domácnosti teplou užitkovou vodou [64].

3.2.1 Provozovna A

V provozovně A je spoluspalováno hnědé uhlí a biomasa ve dvou atmosférických fluidních kotlích s cirkulující vířivou vrstvou při teplotě 820 až 850 °C.

Po shoření paliva ve spalovacím prostoru je ložový popel odváděn z ohniště ve dnu spalovací komory, je chlazen a po vytřídění na vibračním síti, je pneumaticky dopravován do sila ložového popele na míchacím centru.

Úletový popílek je zachytáván ve sběracích výsypkách pod dodatkovými plochami kotlů, pod kouřovody a ve dvou elektrostatických odlučovačích. Následně je pneumaticky dopravován do dvou sil na míchacím centru.

Součástí spalovacího zařízení je i technologie sloužící ke snižování emisí oxidů síry přidáváním vápence přímo do fluidního lože ve spalovací komoře. Produkty reakce, sádra a nezreagovaný vápenec, se odstraňují z lože částečně s ložovým popelem a částečně s úletovým popínkem z elektrostatického odlučovače. Míchací centrum popelovin zajišťuje meziuskladnění, plynulou vykládku, dopravu a úpravu tuhých zbytků po fluidním spalování, přičemž jeho technologie umožňuje výrobu koncentrované popílkové suspenze s volitelnou konzistencí bez přebytku vody, kterou lze použít např. k rekultivaci skládek.

Provozovna A poskytla ložový popel, což je minerální tuhý zbytek obsahující hrubší částice spalitelných látek s obsahem vápna [64].

3.2.2 Provozovna B

V provozovně B je spoluspalováno černé uhlí a biomasa ve čtyřech granulážních kotlích, přičemž podíl biomasy může být maximálně 10 až 15 hm. % spalovací směsi. Škvára je pomocí vynašeče dopravována na přepadovou hranu, odkud padá do drtiče, který ji rozdrtí na požadovanou velikost potřebnou pro splavování na odkaliště popelovin. Popílek zachycený ve výsypkách elektroodlučovačů je veden dopravou do mezisila a dále pak může být buď splavován na odkaliště popelovin, nebo dopravován do expedičních sil, odkud je následně stáčen do autocisteren či železničních vagónů. Expediční sila jsou součástí míchacího centra popelovin, které slouží k míchání stabilizátu, který je poté využíván k rekultivaci a zajišťování skládek.

Odkaliště popelovin slouží jako dočasné úložiště popílku a škváry, přičemž po odloučení vody je tato hydrosměs odtěžena do trvalého úložiště, popř. předávána externím firmám jako surovina k dalšímu využití.

Provozovna B poskytla úletový popílek, což je jemný prášek z kulovitých sklovitých částic bez obsahu vápna [64].

3.2.3 Provozovna C

V provozovně C je spoluspalováno hnědé uhlí s biomasou ve třech granulážních kotlích, přičemž podíl biomasy může být maximálně 10 hm. % spalovací směsi. Pod každým kotlem je

umístěný vynašeč škváry, který ji po ochlazení ve vodě dopravuje do zásobníku, odkud je následně dopravována na manipulační plochu v blízkosti míchacího centra.

Za každým kotlem je zařazen elektrostatický odlučovač tuhých znečišťujících látek obsažených ve spalínách, ve kterých je zachycován popílek. Ten je následně pneumaticky dopravován do mezisil a pak do dvou expedičních sil na míchacím centru.

Spaliny jsou poté odsiřovány polosuchou metodou za pomoci vápenné suspenze, tzv. vápenného mléka, které se připravuje z páleného vápna, recyklované části produktu z odsíření a vody. Po odsíření prochází spaliny přes tkaninové filtry, ve kterých je zachycován produkt z odsíření, který je následně pneumaticky dopravován do expedičních sil na míchacím centru. Vzniklé vedlejší energetické produkty jsou předávány externím společností k dalšímu materiálovému využití.

Provozovna C poskytla dva vzorky:

- Škváru, což jsou hrubší spečené části nespalitelných látek bez obsahu vápna,
- produkt z odsíření, což je jemný prášek vznikající při čištění spalin s obsahem vápna [64].

3.2.4 Provozovna D

V provozovně D je spalováno hnědé i černé uhlí a biomasa ve dvou fluidních kotlích, přičemž ložový popel je pneumaticky dopravován do expedičních sil u míchacího centra. Úletový popílek je zachytáván v elektrostatických odlučovačích a tkaninových filtrech a následně je opět pneumaticky dopravován do expedičních sil u míchacího centra. Z míchacího centra je ložný popel i úletový popílek dále expedován ve formě stabilizátu k dalšímu využití. Vlastní odsiřování je realizováno přímým dávkováním vápence do spalovací komory.

Provozovna D poskytla úletový popílek, což je jemný prášek z kulovitých sklovitých částic s obsahem vápna [64].

3.3 Odběr vzorků

Odběr vzorků z jednotlivých provozoven byl proveden jejich proškolenými pracovníky v souladu s platnými normami a legislativou. Odběrnými místy byly buď výsypky elektrostatických odlučovačů, vzorkovací místa na míchacích centrech a plocha odkaliště, popř. plocha volně loženého úletového popílku.

Všechny vzorky byly odebrány do plastových pytlů, pevně zavázány a následně skladovány při laboratorní teplotě, která byla dodržena i během dopravy vzorků osobním automobilem do laboratoře FCH VUT Brno.

3.4 Použité přístroje a zařízení

- Laboratorní sklo
- Analytické váhy SCALTEC SPB 31
- Překlopná třepačka Heidolph REAX 20
- pH metr typu Stirrer type OP – 951
- Konduktometr typu WTW series inoLab, cond 720

- Laboratorní teploměr
- Inkubátor Nüve Cooled Incubator ES 110
- Testovací misky pro *Brassica napus* a *Lactuca sativa* (14,5 x 14,5 x 6,5 cm)
- Testovací nádoby pro *Avena sativa* (16 x 14 cm)
- Truhlíky (15,5 x 48 x 17 cm)
- Osvětlení o intenzitě ≥ 7000 lx

3.5 Testy ekotoxicity s vodnými výluhy

V České republice, jak bylo uvedeno v kapitole 2.6.1 Ekotoxicita odpadů a legislativa, se testování ekotoxicity odpadů provádí pouze na jejich vodných výluzích.

K testování s vodnými výluhy byla využita semena nejen *Sinapis alba*, která je metodikou vyžadována, ale i semena několika dalších jednoděložných a dvouděložných rostlin, která jsou využívána v testech terestrických. Jednalo se o semena salátu setého (*Lactuca sativa*), ovsa setého (*Avena sativa*), brukve řepky olejky (*Brassica napus*), brukve řepáku olejného (*Brassica rapa*).

3.5.1 Příprava vodného výluhu

Vodný výluh odpadů se připravuje na základě Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů nebo taktéž podle normy ČSN EN 12457-4 (2003), Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů kalů- část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalně a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním).

Vodný výluh byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 2.6.3.1 Princip ekotoxikologického testování odpadů s vodnými výluhy. Následně byl obohacen čtyřmi zásobními roztoky solí. Odměrná baňka o objemu jednoho litru byla částečně naplněna vodným výluhem odpadu a poté bylo do ní nadávkováno po 2,5 ml každého zásobního roztoku a doplněna vodným výluhem na objem 1 l. Z důvodu zaručení homogenity vzorku bylo nutné vodný výluh před každým použitím důkladně protřepat.

Byly připraveny čtyři zásobní roztoky. K přípravě prvního zásobního roztoku bylo naváženo 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, převedeno do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ostatní zásobní roztoky byly připraveny podobně s navážkami 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl [57, 58].

3.5.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Princip testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) je popsán v kapitole 2.7.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).

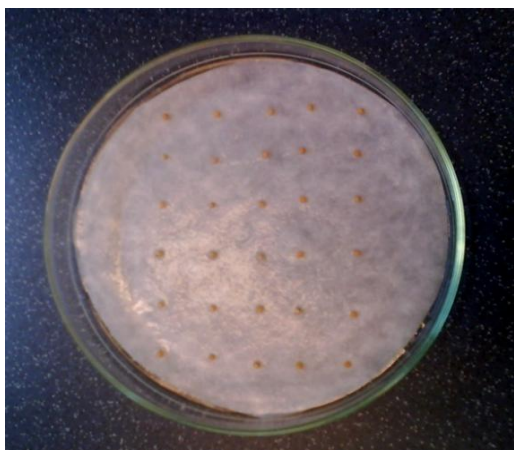
Nejdříve byla ze zásobních roztoků solí a destilované vody připravena ředící voda. Do 1 l odměrné baňky se z každého zásobního roztoku odpipetovalo 25 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

Byl proveden **úvodní test** s neřaděnými vodnými výluhy, které byly obohaceny výše zmíněnými solemi ve stejném poměru jako ředící voda. Současně byly provedeny i kontrolní testy ve třech paralelních stanoveních. Na základě výsledků úvodního testu byl proveden **test předběžný**. Vodné výluhy byly naředěny následovně: 0 ml/l, 10 ml/l, 100 ml/l a 500 ml/l. K ředění byla využita připravená ředící voda. Podle výsledků testu předběžného byla zvolena koncentrační řada **základního testu**.

Na dno Petriho misek o průměru 140 mm byl vložen filtrační papír a na něj bylo odpipetováno 5 ml testovaného roztoku vodného výluhu VEP. Poté bylo rovnoměrně rozmístěno 30 semen hořčice bílé a misky byly uzavřeny víčkem (obr. 2).

Petriho misky byly na 72 hodin umístěny do inkubátoru, bez přístupu světla, ve kterém byla udržována teplota 22 °C (obr. 3).

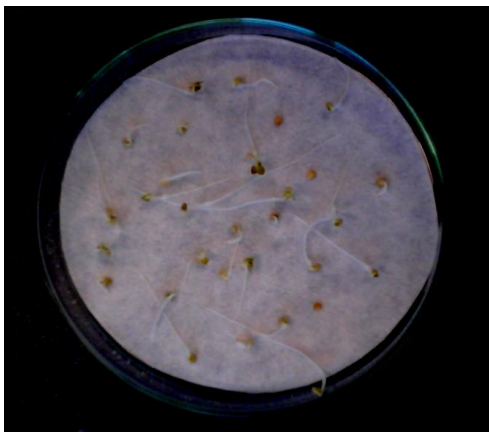
Test byl vyhodnocen po 72 hodinách inkubace, kdy byla změřena délka vyklíčených kořenů v každé koncentraci roztoku vodného výluhu a kontrole (obr. 4). Následně byla vypočtena průměrná délka kořene v každé koncentraci roztoku vodného výluhu VEP a inhibice růstu kořene ve srovnání s kontrolou. Koncentrace látky, u které došlo k inhibici růstu, se vyjádřila v logaritmických hodnotách a vynesla se na osu x . Na osu y byla pro danou koncentraci vynesena inhibice růstu vyjádřená v %. Jednotlivé získané body se spojily přímkou a v průsečíku přímky s hodnotou inhibice 50 % se sestrojila kolmice na osu x . Odečtená hodnota koncentrace z osy x se odlogaritmovala, čímž byla určena hledaná koncentrace IC_{50} . Podmínky testu jsou shrnuty v tabulce 9.



Obr. 2: Rozmístění semen hořčice bílé na Petriho misce.



Obr. 3: Uložení semen do inkubátoru.



Obr. 4: Semena hořčice bílé po 72 hodinách klíčení.

Tab. 9: Podmínky testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Teplota	20 ± 2 °C
Množství vzorku na jednu Petriho misku o průměru 120 až 140 mm	5 ml
Počet testovaných semen na jedné Petriho misce	30
Délka expozice	72 hodin
Ostatní podmínky	Inkubace ve tmě

3.5.3 Test inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*)

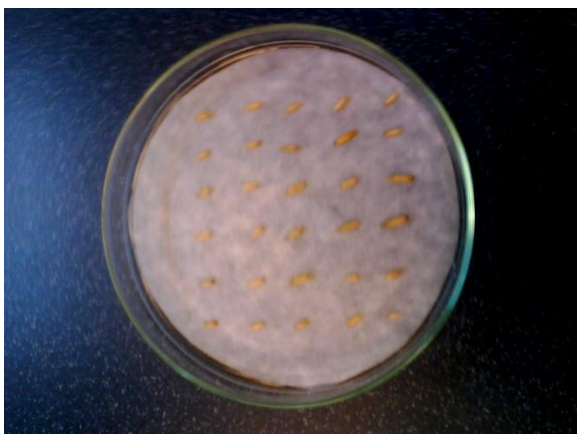
Test inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*) byl proveden podle stejného metodického pokynu jako test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Výjimkou byla pouze použitá semena rostlin. K testování byla využita semena salátu setého (*Lactuca sativa*), (obr. 5). Semena jsou šedohnědá vřetenovitá o velikosti 1 mm. Salát setý, též locika setá je jednoletá dvouděložná rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) [65].



Obr. 5: Semena salátu setého (*Lactuca sativa*) po 72 hodinách klíčení.

3.5.4 Test inhibice růstu kořene ovsa setého (*Avena sativa*)

Testovacím organismem jsou světle hnědá vřetenovitá semena ovsa setého (*Avena sativa*) o velikosti 1 cm, (obr. 6, 7). Oves setý je 40 - 120 cm vysoká jednoděložná obilnina (tráva) z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) [65]. Test byl proveden podle stejného metodického pokynu jako test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).



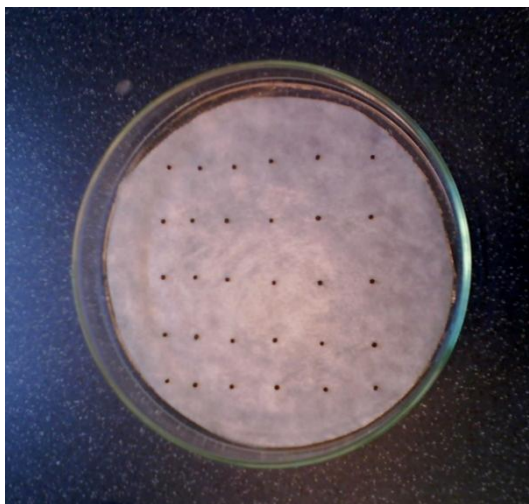
Obr. 6: Rozmístění semen ovsa setého (*Avena sativa*) na Petriho misce.



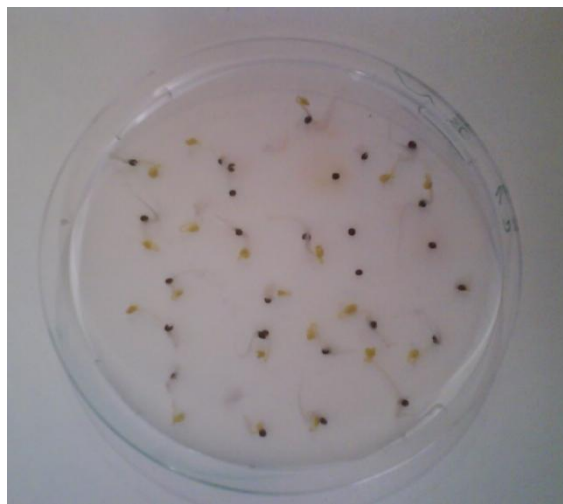
Obr. 7: Semeno ovsa setého po 72 hodinách klíčení.

3.5.5 Test inhibice růstu kořene brukve řepky olejky (*Brassica napus*)

Test inhibice růstu kořene *Brassica napus* byl realizován podle Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů zveřejněný ve Věstníku č. 4/2007. K testování byla využita černohnědá semena *Brassica napus* (obr. 8, 9) o velikosti 0,5 mm. Brukev řepka olejka je 60 – 120 cm vysoká dvouděložná bylina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) [65].



Obr. 8: Rozmístění semen *Brassica napus* na Petriho misce.

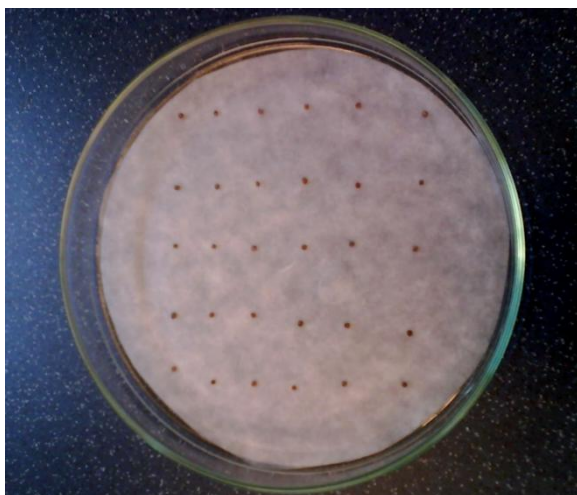


Obr. 9: Semena *Brassica napus* po 72 hodinách klíčení.

3.5.6 Test inhibice růstu kořene brukve řepáku olejného (*Brassica rapa*)

Pátým testovacím organismem jsou červenohnědá semena brukve řepáku olejného (*Brassica rapa*) o velikosti 0,5 mm, (obr. 10, 11). *Brassica rapa* je dvouděložná bylina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) [65].

Test inhibice růstu kořene *Brassica rapa* se s výjimkou použitých semen nelišil od testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).



Obr. 10: Rozmístění semen *Brassica rapa* na Petriho misce.



Obr. 11: Semena *Brassica rapa* po 72 hodinách klíčení.

3.6 Kontaktní testy fytotoxicity

Jak již bylo řečeno v teoretické části diplomové práce, pro testování vedlejších energetických produktů, potenciálních odpadů, se v kontaktním uspořádání využívá test klíčení semen a růstu vyšších rostlin. Test klíčení semen a růstu vyšších rostlin je metodicky zpracován mnoha organizacemi. Podle dostupné literatury je v České republice preferována metodika ISO 11269-2, Kvality půdy – Stanovení účinku polutantů na půdní flóru -- Část 2: Stanovení účinku chemikálií na klíčivost a růst vyšších rostlin, podle které bylo v našem případě také postupováno. Další testy byly provedeny podle metodiky ISO 11269-1, Kvality půdy - Stanovení účinku polutantů na půdní flóru -- Část 1: Stanovení inhibice růstu kořene a podle metodiky ISO 17126, Kvality půdy – Stanovení účinku polutantů na půdní flóru – Screeningový test klíčivosti salátu (*Lactuca sativa* L.), které jsou doporučovány pro doplnění sady testů využívaných k hodnocení ekotoxicity odpadů.

3.6.1 Stanovení účinku chemikálií na klíčivost a růst vyšších rostlin, ISO 11269-2

Test dle metodiky ISO 11269-2 byl proveden na semenech dvouděložné rostliny *Brassica napus* a semenech jednoděložné rostliny *Avena sativa*.

Do testovacích misek bylo připraveno 5 koncentrací: 0 – 0,1 – 1 – 10 – 100 % vzorku vedlejšího energetického produktu smíchaného s přírodní standardní půdou LUFA 2.3 (obr. 12). Do dna testovacích misek byl vyříznut otvor, kterým se protáhl knot. Druhá strana knotu byla vložena do kelímku se zavlažovací vodou (obr. 13).

Do první misky bylo naváženo 600 g standardní půdy LUFA 2.3. Do ostatních testovacích nádob bylo přidáno 0,6; 6; 60 a 600 g vzorku vedlejšího energetického produktu a zbytek byl doplněn standardní půdou LUFA 2.3 na celkovou hmotnost obsahu misky 600 g. Vzorky byly důkladně promíchány. Poté bylo rovnoměrně zaseto 8 stejných semen rostliny *Brassica napus* nebo *Avena sativa*. Semena rostliny *Brassica napus* byla umístěna do hloubky 5 – 10 mm a semena rostliny *Avena sativa* do hloubky 10 -15 mm. Po dobu testování byla teplota v místnosti udržována na hodnotě 20 ± 2 °C, intenzita osvětlení byla větší než 7000 lx a perioda byla 16 h světlo a 8 h tma. 50 % semen v kontrole vyklíčilo po 4 dnech. Po dobu

těchto 4 dní byla semena zavlažována destilovanou vodou. Od 5. dne byly rostliny zavlažovány roztokem univerzálního hnojiva. Celková délka testování od vyklíčení 50 % semen v kontrole byla 14 dnů (obr. 14, 15). Během testu byly každým dnem testovací nádoby dle náhodného schématu přemísťovány.

Před samotným zahájením testu bylo nutností stanovit **vodní kapacitu půdy** WHC (water holding capacity). Vodní kapacita půdy byla stanovena podle metodiky ISO 11269-1. Postup stanovení je uveden v kapitole 2.5.4 Test klíčení semen a růstu kořene cévnatých rostlin. Po celou délku testu byla udržována vodní kapacita půdy na hodnotě 70 %.

Pro kontrolu testovacích podmínek byl proveden **test s referenční látkou**. Referenční látkou je kyselina boritá. Bylo opět připraveno 5 testovacích koncentrací: 0 - 0,1 – 1 – 10 – 100 % kyseliny borité smíchané s přírodní standardní půdou LUFA 2.3. Do první misky bylo naváženo 600 g standardní půdy LUFA 2.3. Do ostatních testovacích nádob bylo přidáno 0,6; 6; 60 a 600 g kyseliny borité a zbytek byl doplněn standardní půdou LUFA 2.3 na celkovou hmotnost obsahu misky 600 g. Byla zaseta semena rostliny *Brassica napus*. Následně se postupovalo stejně, jako u testování VEP (obr. 16).

pH půdy bylo stanoveno následujícím způsobem: k 5ml vysušeného půdního vzorku byl přidán 1M roztok KCl na celkový objem 30 ml. Takto připravená půdní suspenze byla uzavřena víčkem a třepána po dobu 5 minut. Minimálně po 2 hodinách se změřilo pH. Vzorek byl těsně před měřením protřepán.



Obr. 12: Test klíčení semen a růstu rostlin *Brassica napus* - koncentrační řada vedlejších energetických produktů.



Obr. 13: Detail uspořádání testovacích nádob.



Obr. 14: Test klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus* na konci testu.



Obr. 15: Test klíčení semen a růstu rostlin *Avena sativa* na konci testu.



Obr. 16: Nasazení testu s referenční látkou kyselinou boritou.

3.6.2 Testování limitní koncentrace, ISO 11269-1

Do testovacích misek byla připravena koncentrace 500 g/kg vedlejšího energetického produktu. Pro každý vzorek VEP byly udělány 3 paralelní stanovení. Do stejných testovacích misek byla připravena kontrola, standardní přírodní půda LUFA 2.3. Testování s kontrolou bylo provedeno také ve třech opakováních. Zavlažování vzorků bylo řešeno stejným způsobem jako u testování koncentrační řady. Byly použity semena rostliny *Brassica napus*. Celková délka testu byla 14 dní. Podmínky testu byly stejné jako při testování úplné koncentrační řady.

3.6.3 Screeningový test klíčivosti salátu, ISO 17126

Semena salátu setého se nechala předklíčit na vrstvě filtračního papíru zvlhčeného destilovanou vodou po dobu 24 - 48 hodin, při laboratorní teplotě, bez osvětlení. Pro testování byla následně vybrána semena s kořínkem kratším než 2 mm. Do uzavíratelných misek bylo

naváženo vždy 200 g vzorku a 200 g kontrolní zeminy. Obsah misek byl navlhčen na 70 % hodnoty vodní kapacity půdy. Byla rozvrhnuta síť 5 x 3 jamek, do jamek bylo umístěno 15 předklíčených semen. Semena se sela kořínkem dolů a nezakrývala se půdou.

Misky se zasazenými semínky se přikryly víčkem a ponechaly se v termostatu po dobu 120 ± 2 h při 24°C. Po uplynutí doby inkubace, byly vyklíčené rostliny opatrně vyjmuty pomocí pinzety a délka jednotlivých kořenů byla změřena pomocí milimetrového měřítka. Všechna stanovení byla provedena ve dvou paralelních stanoveních.

3.7 Výsledky

3.7.1 Testování s vodnými výluhy

Výsledky ekotoxikologického testování s vodnými výluhy byly pro vyšší přehlednost a orientaci shrnuty do tabulek a grafů.

3.7.1.1 Příprava vodného výluhu

V tabulce 10 je uveden podíl sušiny v analytickém vzorku v procentech - DR, dále hmotnost analytického vzorku nutného pro přípravu 1 l vodného výluhu odpadu – M (g) a množství přidané vody v ml - L_A .

U získaného vodného výluhu byl změřen základní charakteristiky; celkový objem, konduktivita, hodnota pH, teplota, barva a zápach. Získaná data jsou shrnuta v tabulce 11.

Tab. 10: Veličiny nutné k přípravě 1 l vodného výluhu odpadu.

Vzorek	Podíl sušiny v analytickém vzorku, DR (%)	Hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu, M (g)	Množství přidané vody, L_A (ml)
Ložový popel	99,86	100,15	999,86
Úletový popílek z provozovny B	99,91	100,09	999,91
Škvára	63,54	157,38	942,63
Produkt z odsíření	98,89	101,12	998,89
Úletový popílek z provozovny D	99,91	100,10	999,91

Tab. 11: Charakteristiky vodného výluhu odpadu.

Vzorek	Celkový objem (ml)	Konduktivita (mS.cm ⁻¹)	pH	Teplota (°C)	Barva	Zápach
Ložový popel	999	11,00	12,25	21,8	Bez barvy	Bez zápachu
Úletový popílek z provozovny B	999	2,87	11,84	21,8	Bez barvy	Bez zápachu
Škvára	942	0,86	9,23	21,8	Bez barvy	Bez zápachu
Produkt z odsíření	998	10,10	12,45	21,8	Bez barvy	Bez zápachu
Úletový popílek z provozovny D	999	10,30	12,50	21,8	Bez barvy	Bez zápachu

3.7.1.2 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Test inhibice růstu kořene hořčice bílé byl proveden dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Stejným způsobem byly provedeny testy na semenech ostatních rostlin. Vzorky VEP, které působily na semena inhibičně, jsou v tabulkách zvýrazněny červenou barvou.

- Úvodní test

V tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty délky kořene *Sinapis alba* a inhibice nebo stimulace růstu kořene. Úvodní test byl prováděn s neředěným vodným výluhem jednotlivých vedlejších energetických produktů, který byl obohacený solemi ve stejném poměru jako ředící voda.

Tab. 12: Výsledky úvodního testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).

Vzorek	Délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x Stimulace
Kontrola	14,77		
Ložový popel	14,67	0,68	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	12,87	12,87	Inhibice
Škvára	15,67	-6,10	Stimulace
Produkt z odsíření	8,03	45,60	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	11,80	20,09	Inhibice

- Ověřovací test

V úvodním testu inhibice růstu kořene hořčice bílé nebyla prokázána inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů, byl proto proveden ověřovací test ve třech opakováních. Výsledky ověřovacího testu jsou shrnuty v tabulce 13.

Tab. 13: Výsledky ověřovacího testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*), kde L_1 , L_2 , L_3 jsou průměrné délky kořene v jednotlivých stanoveních.

Vzorek	Průměrná délka kořene (mm)				Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
	L_1	L_2	L_3	Průměr (L_1 , L_2 , L_3)		
Kontrola	13,83	15,12	14,10	14,6492		
Ložový popel	12,19	14,67	13,43	13,4278	8,34	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	11,70	8,33	7,82	9,2817	36,64	Inhibice
Škvára	16,31	15,55	15,35	15,7333	-7,40	Stimulace
Produkt z odsíření	8,08	6,21	8,69	7,6601	47,71	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	10,16	12,34	11,12	11,2096	23,48	Inhibice

Ověřovací test potvrdil výsledky úvodního testu. U žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů nebyla v ověřovacím testu sledována inhibice růstu větší než 50 %. Vzhledem k této skutečnosti nebylo možné stanovit hodnotu $72hIC_{50}$. Kdyby byla ekotoxicita hodnocena pouze na základě výsledků stanovených na *Sinapis alba*, tak podle vyhlášky č. 376/2001 Sb., která stanoví limit $72hIC_{50} \leq 10$ ml/l, nevykazuje ani jeden vzorek nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicita. Podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. vykázal dva vzorky inhibici větší než 30 %, tudíž dle této vyhlášky vykazují vzorky úletového popílku z provozovny B a produkt z odsíření nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicita. Všechny vzorky nelze tedy využít k rekultivaci vytěžených povrchových důlních děl, jako jsou povrchové doly, lomy, pískovny, ale i na povrchu terénu k terénním úpravám nebo rekultivacím lidskou činností postižených pozemků [4, 5].

- **Předběžný test**

Předběžný test byl proveden jen u vzorků vykazujících inhibici růstu. Výsledky předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 14. Protože některé vzorky VEP vykazovaly na testech s vodnými výluhy velmi malé procento inhibice, nebylo možné vypočítat hodnoty $72hIC_{50}$. Aby bylo možné mezi sebou vzorky porovnat, byly vypočteny alespoň hodnoty $72hIC_5$.

Tab. 14: Výsledky předběžného testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).

Vzorek	Koncentrace (ml/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	0	14,65		
Ložový popel	10	14,43	1,52	Inhibice
	100	13,83	5,57	Inhibice
	500	13,52	7,70	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	10	13,67	6,71	Inhibice
	100	10,05	31,40	Inhibice
	500	9,39	35,89	Inhibice
Produkt z odsíření	10	13,22	9,78	Inhibice
	100	12,47	14,90	Inhibice
	500	7,92	45,96	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	10	13,99	4,51	Inhibice
	100	13,63	6,93	Inhibice
	500	12,08	17,52	Inhibice

3.7.1.3 Test inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*)

- Úvodní test

V tabulce 15 jsou uvedeny naměřené a vypočtené hodnoty délky kořene salátu setého a inhibice růstu kořene.

Tab. 15: Výsledky úvodního testu inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*).

Vzorek	Délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	14,65		
Ložový popel	15,83	-8,08	Stimulace
Úletový popílek z provozovny B	14,98	-2,21	Stimulace
Škvára	16,20	-10,58	Stimulace
Produkt z odsíření	13,90	5,12	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	17,40	-18,77	Stimulace

- Ověřovací test

V úvodním testu inhibice růstu kořene salátu setého nebyla prokázána inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů, byl proto proveden ověřovací test. Výsledky ověřovacího testu jsou shrnuty v tabulce 16. Vzorky VEP, které způsobily stimulaci růstu kořene větší než 30 %, jsou v tabulkách zvýrazněny zelenou barvou.

Tab. 16: Výsledky ověřovacího testu inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*), kde L_1 , L_2 , L_3 jsou průměrné délky kořene v jednotlivých stanoveních.

Vzorek	Průměrná délka kořene (mm)				Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
	L_1	L_2	L_3	Průměr (L_1 , L_2 , L_3)		
Kontrola	13,57	13,30	13,43	13,43		
Ložový popel	14,38	15,30	13,47	14,38	-7,06	Stimulace
Úletový popílek z provozovny B	14,50	14,67	14,83	14,67	-9,18	Stimulace
Škvára	15,72	16,80	15,63	16,05	-19,47	Stimulace
Produkt z odsíření	11,63	13,80	13,72	13,05	2,86	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	18,72	17,23	20,20	18,72	-39,33	Stimulace

Ověřovací test potvrdil výsledky úvodního testu. V ověřovacím testu nebyla sledována inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů. Ze stejného důvodu jako při testech na *Sinapis alba* nemohla být určena hodnota $72hIC_{50}$. Tentokrát nebyla prokázána ani inhibice větší než 30 %. U úletového popílku z provozovny D ovšem nastala stimulace růstu větší než 30 %, proto tento vzorek je dle testu na salátu setém považován za nebezpečný. Kdyby byl testovacím organismem salát setý, mohly by být všechny vzorky, s výjimkou úletového popílku z provozovny D, využity na povrch terénu [4, 5].

- Předběžný test

Předběžný test byl proveden pouze u produktu z odsíření, který vykazoval v úvodním testu inhibici. Výsledky předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 17.

Tab. 17: Výsledky předběžného testu inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*).

Vzorek	Koncentrace (ml/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	0	13,43		
Produkt z odsíření	10	12,33	8,19	Inhibice
	100	15,33	-14,14	Stimulace
	500	13,53	-0,74	Stimulace

3.7.1.4 Test inhibice růstu kořene ovesa setého (*Avena sativa*)

- Úvodní test

V tabulce 18 jsou uvedeny hodnoty délky kořene ovesa setého a inhibice růstu kořene v porovnání s kontrolou. Úvodní test byl prováděn s neřaděným vodným výluhem jednotlivých vedlejších energetických produktů.

Tab. 18: Výsledky úvodního testu inhibice růstu kořene ovsa setého (*Avena sativa*).

Vzorek	Délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	34,37		
Ložový popel	34,35	0,05	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	53,03	-54,32	Stimulace
Škvára	46,93	-36,57	Stimulace
Produkt z odsíření	34,41	-0,12	Stimulace
Úletový popílek z provozovny D	30,00	12,71	Inhibice

- Ověřovací test

V úvodním testu inhibice růstu kořene ovsa setého nebyla prokázána inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů, byl proto proveden ověřovací test. Výsledky ověřovacího testu jsou shrnuty v tabulce 19.

Tab. 19: Výsledky ověřovacího testu inhibice růstu kořene ovsa setého (*Avena sativa*), kde L₁, L₂, L₃ jsou průměrné délky kořene v jednotlivých stanoveních.

Vzorek	Průměrná délka kořene (mm)				Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
	L ₁	L ₂	L ₃	Průměr (L ₁ , L ₂ , L ₃)		
Kontrola	33,16	35,26	31,23	33,22		
Ložový popel	31,07	32,85	31,80	31,91	0,97	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	45,33	49,15	46,10	46,86	-45,45	Stimulace
Škvára	51,58	49,74	49,50	50,27	-56,04	Stimulace
Produkt z odsíření	33,56	34,91	33,60	34,02	-5,60	Stimulace
Úletový popílek z provozovny D	33,23	32,17	32,10	32,80	1,26	Inhibice

Ověřovací test potvrdil výsledky úvodního testu. V ověřovacím testu nebyla sledována inhibice růstu větší než 50 % ani větší než 30 % u žádného ze vzorků VEP. Dle metodiky nevykazují nebezpečnou vlastnost H 14. Vzhledem k tomu, že úletový popílek z provozovny B a škvára vykazovaly stimulaci 45,45 % a 56,04 %, tak kdyby se rozhodovala na základě testu na semenech *Avena sativa*, nemohou být využity k rekultivacím i k terénním úpravám.

- Předběžný test

Předběžný test byl proveden u ložového popele a úletového popílku z provozovny D, které v úvodním testu prokázaly nepatrnou inhibici, zvláště v případě ložového popele. Výsledky předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 20.

Tab. 20: Výsledky předběžného testu inhibice růstu kořene ovsa setého (*Avena sativa*).

Vzorek	Koncentrace (ml/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	0	33,22		
Ložový popel	10	34,38	-0,03	Stimulace
	100	34,42	-0,17	Stimulace
	500	34,83	-1,33	Stimulace
Úletový popílek z provozovny D	10	33,78	1,71	Inhibice
	100	33,25	3,25	Inhibice
	500	31,33	8,83	Inhibice

3.7.1.5 Test inhibice růstu kořene (*Brassica napus*)

- Úvodní test

V tabulce 21 jsou uvedeny hodnoty délky kořene *Brassica napus* a inhibice růstu kořene v porovnání s kontrolou. Úvodní test byl prováděn s neřaděným vodným výluhem jednotlivých vedlejších energetických produktů.

Tab. 21: Výsledky úvodního testu inhibice růstu kořene (*Brassica napus*).

Vzorek	Délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	8,47		
Ložový popel	7,37	12,99	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	5,20	38,58	Inhibice
Škvára	11,43	-35,03	Stimulace
Produkt z odsíření	7,10	16,14	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	6,33	25,20	Inhibice

- Ověřovací test

V úvodním testu inhibice růstu kořene *Brassica napus* nebyla prokázána inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů, byl proto proveden ověřovací test. Výsledky ověřovacího testu jsou shrnuty v tabulce 22.

Tab. 22: Výsledky ověřovacího testu inhibice růstu kořene (*Brassica napus*), kde L_1 , L_2 , L_3 jsou průměrné délky kořene v jednotlivých stanoveních.

Vzorek	Průměrná délka kořene (mm)				Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
	L_1	L_2	L_3	Průměr (L_1 , L_2 , L_3)		
Kontrola	5,90	7,10	8,30	7,10		
Ložový popel	6,07	6,23	6,40	6,23	12,21	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	7,23	5,27	6,18	6,23	12,30	Inhibice
Škvára	11,87	11,87	11,98	11,90	-67,66	Stimulace
Produkt z odsíření	8,80	4,70	7,53	7,01	1,25	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	6,00	7,20	6,67	6,62	6,73	Inhibice

Ověřovací test potvrdil výsledky úvodního testu. V ověřovacím testu nebyla sledována inhibice růstu větší než 50 % a ani větší než 30 % u žádného ze vzorků VEP. Vzorek škváry nelze vzhledem k vysoké hodnotě stimulace dále využívat a je označen, dle testu na semenech *Brassica napus*, jako nebezpečný.

- Předběžný test

Předběžný test byl kromě škváry proveden se všemi vodnými výluhy. Výsledky předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 23.

Tab. 23: Výsledky předběžného testu inhibice růstu kořene (*Brassica napus*).

Vzorek	Koncentrace (ml/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	0	7,10		
Ložový popel	10	7,07	0,46	Inhibice
	100	8,95	-25,99	Stimulace
	500	7,77	-9,39	Stimulace
Úletový popílek z provozovny B	10	9,53	-34,27	Stimulace
	100	9,67	-36,15	Stimulace
	500	8,50	-19,72	Stimulace
Produkt z odsíření	10	6,90	2,82	Inhibice
	100	7,60	-7,04	Stimulace
	500	9,23	-30,05	Stimulace
Úletový popílek z provozovny D	10	8,43	-18,79	Stimulace
	100	6,03	15,02	Inhibice
	500	6,13	13,62	Inhibice

3.7.1.6 Test inhibice růstu kořene (*Brassica rapa*)

- Úvodní test

V tabulce 24 jsou uvedeny hodnoty délky kořene *Brassica rapa* a inhibice růstu kořene v porovnání s kontrolou. Úvodní test byl prováděn s neřaděným vodným výluhem jednotlivých vedlejších energetických produktů.

Tab. 24: Výsledky úvodního testu inhibice růstu kořene *Brassica rapa*

Vzorek	Délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	19,07		
Ložový popel	15,34	19,53	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	28,17	-47,72	Stimulace
Škvára	31,43	-64,86	Stimulace
Produkt z odsíření	17,17	9,97	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	15,60	18,18	Inhibice

- Ověřovací test

V úvodním testu inhibice růstu kořene *Brassica rapa* nebyla prokázána inhibice růstu větší než 50 % u žádného ze vzorků vedlejších energetických produktů, byl proto proveden ověřovací test. Výsledky ověřovacího testu jsou shrnuty v tabulce 25.

Tab. 25: Výsledky ověřovacího testu inhibice růstu kořene *Brassica rapa*, kde L₁, L₂, L₃ jsou průměrné délky kořene v jednotlivých stanoveních.

Vzorek	Průměrná délka kořene (mm)				Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
	L ₁	L ₂	L ₃	Průměr (L ₁ , L ₂ , L ₃)		
Kontrola	21,20	19,03	19,77	20,00		
Ložový popel	13,90	13,77	13,33	13,67	31,67	Inhibice
Úletový popílek z provozovny B	30,17	28,20	30,83	29,73	-48,67	Stimulace
Škvára	32,97	33,50	32,60	33,02	-65,11	Stimulace
Produkt z odsíření	18,03	16,07	16,10	16,70	16,50	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	19,73	17,67	17,70	18,37	8,17	Inhibice

V ověřovacím testu byla sledována u ložového popele inhibice růstu větší než 30 % a proto tento vzorek VEP není možné využít při úpravách na povrchu. Vzorky úletového popílku a škváry vyvolaly stimulaci růstu kořene *Brassica rapa* větší než 30 % a stejně jako ložový popel nemohou být dále využity.

- Předběžný test

Předběžný test byl proveden se třemi vzorky VEP, které prokazovali inhibice růstu kořene. Výsledky předběžného testu růstu kořene *Brassica rapa* jsou shrnuty v tabulce 26.

Tab. 26: Výsledky předběžného testu inhibice růstu kořene *Brassica rapa*.

Vzorek	Koncentrace (ml/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice růstu (%)	Inhibice x stimulace
Kontrola	0	20,00		
Ložový popel	10	19,13	4,33	Inhibice
	100	18,78	6,11	Inhibice
	500	17,34	13,28	Inhibice
Produkt z odsíření	10	19,17	4,17	Inhibice
	100	18,50	7,50	Inhibice
	500	17,93	10,33	Inhibice
Úletový popílek z provozovny D	10	19,67	1,67	Inhibice
	100	18,80	6,00	Inhibice
	500	17,33	13,33	Inhibice

3.7.3 Kontaktní testy fytotoxicity

3.7.3.1 Stanovení účinku chemikálií na klíčivost a růst vyšších rostlin, ISO 11269-2

Testování bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.6.1. Nejdříve bylo měřeno pH, stanovena vodní kapacity půdy (WHC) a testována referenční látka. Následovalo testování na semenech rostlin *Brassica napus* a *Avena sativa*.

- pH a WHC

Byla změřena hodnota pH jednotlivých testovaných koncentrací VEP, výsledky jsou zapsány v tabulce 27.

Vodní kapacita půdy byla stanovena dle směrnice ISO 11269-1. Postup stanovení je uveden v kapitole 2.5.4. Z naměřených dat byla vypočítaná hodnota WHC v % podle vzorce č. 1. Výsledky WHC jsou sepsány v tabulce 27.

Tab. 27: pH a vodní kapacita půdy pevných vzorků.

Vzorek	Koncentrace (%)	pH (1M KCl)	WHC (g/100 g)
Ložový popel	0,1	6,43	35
	1	6,45	34
	10	7,01	33
	50	9,48	22
	100	12,15	10
Úletový popílek z provozovny B	0,1	6,55	37
	1	6,61	40
	10	7,11	45
	50	9,38	46
	100	11,61	57
Škvára	0,1	6,70	35
	1	6,74	40
	10	7,12	54
	50	8,91	66
	100	9,60	94
Produkt z odsíření	0,1	6,41	46
	1	6,44	55
	10	7,00	42
	50	9,00	81
	100	12,31	123
Úletový popílek z provozovny D	0,1	6,18	23
	1	6,25	26
	10	6,78	45
	50	8,72	69
	100	12,37	135

- Test s referenční látkou

Délka testu s referenční látkou, kyselinou boritou po vyklíčení 50% semen v kontrole byla 14 dní. Poté byla zjištěna hmotnost čerstvé biomasy (nadměrného výhonku rostliny) a hmotnost sušiny biomasy v každé testované koncentraci. Z výsledku uvedených v tabulce 28 byl sestaven graf závislosti úbytku hmotnosti sušiny biomasy v % na logaritmu koncentrace. Z rovnice spojnice trendu byla vypočítána hodnota EC_{50} . Dle metodiky jsou podmínky testu splněny tehdy, pokud hodnota EC_{50} leží v rozmezí 100 – 400 mg/kg. Testovací podmínky byly splněny, neboť EC_{50} bylo 251,50 mg/kg.

Tab. 28: Výsledky testu s referenční lávkou.

Vzorek	Koncentrace (mg/kg)	Hmotnost čerstvé biomasy (mg)	Hmotnost sušiny biomasy (mg)	Inhibice (%)
Kontrola	0	774,0	40,8	0
Kyselina boritá	1000	177,7	16,8	58,83
	10000	0	0	100
	100000	0	0	100
	1000000	0	0	100

- Test klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus*

Test klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus* byl proveden dle směrnice ISO 11269-2. Od vyklíčení 50% semen v kontrole byla celková délka testu 14 dní. Na konci testu bylo spočítáno množství vyklíčených semen, změřena délka nadzemního výhonku, zjištěna hmotnost čerstvé biomasy a hmotnost sušiny biomasy. Výsledky testu jsou shrnuty v tabulce 29. U vzorků VEP, které prokazovaly inhibice větší než 50 %, byla stanovena hodnota EC₅₀. Byl sestaven graf závislosti úbytku hmotnosti sušiny biomasy na logaritmu koncentrace a z rovnice spojnice trendu byla vypočtena hodnota EC₅₀.

Tab. 29: Výsledky předběžného testu klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus*, kde c je koncentrace, p počet vyklíčených rostlin, d průměrná délka nadzemního výhonku, hč hmotnost čerstvé biomasy, hs hmotnost sušiny biomasy, I je inhibice a S je stimulace.

Vzorek	c (%)	p (%)	d (cm)	hč (mg)	hs (mg)	I (%) / S
Kontrola	0	100	6,30	774,0	59,3	0
Ložový popel	0,1	100	7,97	1555,2	109,4	stimulace
	1	100	8,91	1638,3	112,5	stimulace
	10	0	0	0	0	100
	100	0	0	0	0	100
Úletový popílek z provozovny B	0,1	37,5	3,71	590,7	48,4	18,38
	1	25	1,70	245,5	17,3	70,83
	10	0	0	0	0	100
	100	0	0	0	0	100
Škvára	0,1	100	7,88	1276,7	82,5	stimulace
	1	100	7,28	1320,3	91,8	stimulace
	10	75	7,84	1605,4	113,6	stimulace
	100	75	4,30	768,5	30,7	48,23
Produkt z odsíření	0,1	100	9,83	1648,5	99,1	stimulace
	1	100	8,50	1264,2	87,2	stimulace
	10	62,5	1,31	268,2	12,3	79,26
	100	0	0	0	0	100
Úletový popílek z provozovny D	0,1	87,5	10,95	1475,1	123	stimulace
	1	87,5	6,06	1099,9	61,3	stimulace
	10	75	3,38	314,8	31,6	46,71
	100	0	0	0	0	100

Na základě předběžného testu mohla být hodnota EC_{50} stanovena u tří vzorků, jednalo se o úletový popílek z provozovny B, produkt z odsíření a úletový popílek z provozovny D. V případě ložového popele jsou výsledky 100% inhibice u dvou nejvyšších testovaných koncentrací způsobeny tím, že půda ztvrdla a tím bylo znemožněno klíčení i růst rostlin. Hodnota EC_{50} úletového popílku z provozovny B byla 4,86 g/kg; produktu z odsíření byla 3,89 g/kg a úletového popílku z provozovny D byla 115,28 g/kg.

- Test klíčení semen a růstu rostliny *Avena sativa*.

Celková doba testu klíčení semen a růstu rostliny *Avena sativa* byla po vyklíčení 50% semen v kontrole 14 dní. Poté byly změřeny délky nadzemních výhonků, zjištěna hmotnost čerstvé biomasy a hmotnost sušiny biomasy v každé testované koncentraci VEP a kontrole. Na základě hmotnosti sušiny biomasy byla vypočtena inhibice popřípadě stimulace růstu rostliny v porovnání s kontrolou, tabulka 30. Pokud vzorek vedlejšího energetického produktu působil na růst rostliny inhibičně, byla vypočtena hodnota EC_{50} . Hodnota EC_{50} byla vypočtena stejným způsobem jako při testu klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus*.

Tab. 30: Výsledky předběžného testu klíčení semen a růstu rostliny *Avena sativa*, kde c je koncentrace, p je počet vyklíčených rostlin, d je průměrná délka nadzemního výhonku, hč je hmotnost čerstvé biomasy, hs je hmotnost sušiny biomasy, I je inhibice a S je stimulace.

Vzorek	c (%)	p (%)	d (cm)	hč (mg)	hs (mg)	I (%) / S
Kontrola	0	100	40,91	2669,5	309	
Úletový popílek z provozovny B	0,1	87,5	33,70	4117,0	452	Stimulace
	1	87,5	42,48	7876,5	2088	Stimulace
	10	100	35,61	4010,1	469,9	Stimulace
	100	0	0	0	0	100
Škvára	0,1	100	39,20	3824,3	512,1	Stimulace
	1	100	38,65	3760,4	656,6	Stimulace
	10	100	45,93	6009,1	650,4	Stimulace
	100	87,5	38,20	2553,1	409,2	Stimulace
Produkt z odsíření	0,1	87,5	26,84	2290,9	316,5	Stimulace
	1	100	32,76	968,2	248,3	19,64
	10	100	30,00	1338,6	233	24,60
	100	0	0	0	0	100
Úletový popílek z provozovny D	0,1	100	37,5	2448,2	359	stimulace
	1	100	30,25	1204,3	228,3	26,12
	10	37,5	4,69	266,5	68,4	77,86
	100	0	0	0	0	100

Hodnotu EC_{50} bylo možné stanovit pouze u dvou vzorků VEP, jednalo se o produkt z odsíření a úletový popílek z provozovny D. Ostatní testované vzorky vedlejších energetických produktů působily na rostlinný růst stimulačně nebo pouze jedna testovaná koncentrace

způsobila inhibici, a proto nemohla být vypočtena hodnota EC_{50} . Hodnota EC_{50} pro produkt z odsíření byla 111,63 g/kg a pro úletový popílek z provozovny D byla 32,58 g/kg.

3.7.3.2 Testování limitní koncentrace, ISO 11269-1

Testování limitní koncentrace bylo provedeno se semeny rostliny *Brassica napus* a celková délka testu byla také 14 dní od vyklíčení 50% semen v kontrole. Poté byly rostliny opatrně vytaženy z půdy a byla změřena délka jejich kořenů. Výsledky testu s limitní koncentrací jsou uvedeny v tabulce 31. Naměřená data byla statisticky zpracována dunnettovým *t*-testem a shrnuta do tabulky 32, příklad výpočtu je uveden v příloze 3.

Tab. 31: Výsledky testu klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus* s limitní koncentrací.

Vzorek	Koncentrace (%)	Délka kořene (mm)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	průměr
Kontrola	0	33	35	19	17	31	32	47	26	30,00
	0	35	30	30	18	35	31	24	31	29,25
	0	18	33	29	34	34	16	30	30	28,00
Úletový popílek z provozovny B	50	19	18	0	0	0	0	0	0	4,63
	50	20	19	0	0	0	0	0	0	4,88
	50	21	28	19	0	0	0	0	0	8,5
Škvára	50	32	42	51	42	42	53	0	0	32,75
	50	44	20	28	38	37	0	0	0	20,88
	50	36	35	36	35	0	0	0	0	17,75
Produkt z odsíření	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Úletový popílek z provozovny D	50	36	25	6	0	0	0	0	0	8,38
	50	18	17	16	0	0	0	0	0	6,38
	50	19	19	0	0	0	0	0	0	4,75

Tab. 32: Statistické údaje vypočítané podle Dunnetova *t*-testu, kde SE je směrodatná chyba (Standard Error) a SD je významný rozdíl (Significant difference).

Vzorek	Koncentrace (%)	Průměrná délka kořene (mm)	SE	SD (mm)	Významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$
Kontrola	0	29,08			
	0				
	0				
Úletový popílek z provozovny B	50	6,00	4,54	9,18	ano
	50				
	50				
Škvára	50	23,79	6,12	12,37	ne
	50				
	50				
Produkt z odsíření	50	0	4,24	8,56	ano
	50				
	50				
Úletový popílek z provozovny D	50	6,50	4,60	9,28	ano
	50				
	50				

Ze statistických výsledků testu klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus* s limitní koncentrací je patrné, že pouze škváru lze považovat za ekotoxicky negativní. Škvára působila na růst kořene rostliny inhibičně ve srovnání s kontrolou, ale odlišnost od kontroly není významná na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Ostatní vzorky vedlejších energetických produktů působily na růst kořene také inhibičně, ovšem vykazovaly významnou odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Úletový popílek z provozovny B, produkt z odsíření a úletový popílek z provozovny D jsou ekotoxicky pozitivní.

3.7.3.3 Screeningový test klíčivosti salátu, ISO 17126

V tabulce 33 jsou uvedeny výsledky pětidenního screeningového testu klíčivosti salátu setého (*Lactuca sativa*). Statistické údaje byly vypočítány pomocí Dunnettova *t*-testu. Příklad výpočtu je uveden v příloze 4.

Tab. 33: Výsledky testu inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*) a statistické údaje vypočítané podle Dunnetova *t*-testu, kde SE je směrodatná chyba (Standard Error) a SD je významný rozdíl (Significant difference).

Vzorek	Koncentrace (%)	Průměrná délka kořene v jednotlivých miskách (mm)	Průměrná délka kořene (mm)	SE	SD (mm)	Významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$
Kontrola	0	6,27	5,77			
	0	5,27				
Úletový popílek z provozovny B	50	8,13	8,07	Stimulace růstu kořene		
	50	8,00				
Škvára	50	8,93	8,50	Stimulace růstu kořene		
	50	8,07				
Produkt z odsíření	50	2,13	2,13	1,06	2,12	ano
	50	2,13				
Úletový popílek z provozovny D	50	2,80	3,27	1,07	2,14	ano
	50	3,73				

Stimulace růstu kořene nastala u dvou vzorků VEP, jednalo se o úletový popílek z provozovny B a škváru. Tyto dva vzorky lze považovat za negativní ve vlastnosti ekotoxicita. Naopak inhibice růstu kořene salátu v porovnání s kontrolou byla pozorována u produktu z odsíření a úletového popílku z provozovny D, proto byla vypočtena hodnota SD. V obou případech byla zjištěna významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Oba vzorky lze proto považovat za ekotoxicky pozitivní.

4 DISKUZE VÝSLEDKŮ

Ekotoxikologické hodnocení vzorků vedlejších energetických produktů bylo provedeno na vyšších suchozemských rostlinách v kontaktním i v akvatickém uspořádání. Pro lepší porovnání a zhodnocení výsledků byla vypočtená data znázorněna graficky.

Vodné výluhy všech vzorků vedlejších energetických produktů byly testovány na semenech pěti suchozemských rostlin. V kontaktním uspořádání testu byly využity semena tří suchozemských rostlin.

4.1 Diskuze výsledků testů s vodnými výluhy

Výsledky testů ekotoxicity s vodnými výluhy na jednotlivých suchozemských rostlinách byly mezi sebou porovnány z hlediska vykazovaných účinků na testovací organismus. Jelikož nebylo možné vypočítat hodnoty $72hIC_{50}$, byly pro srovnávání vypočteny alespoň hodnoty $72hIC_5$.

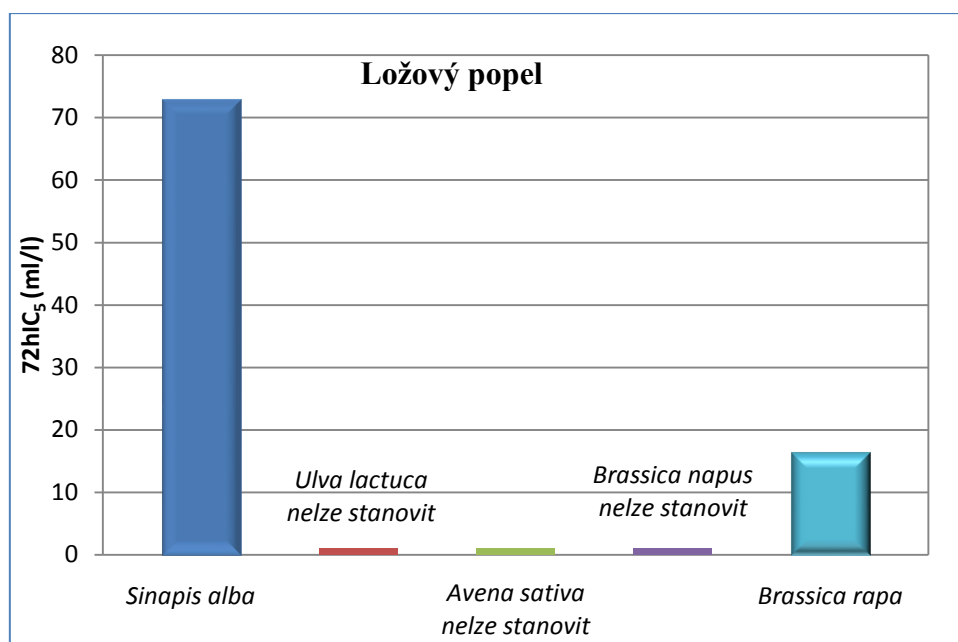
Pro lepší přehlednost jsou výsledky testů znázorněny pro každý vzorek zvlášť v grafech 1 až 5. Následně jsou graficky znázorněny výsledky pro každou testovací rostlinu v grafech 6 až 8.

- **Ložový popel**

Výsledky testování s vodnými výluhy jsou znázorněny v grafu č. 1. Ložový popel neprokázal inhibici větší než 50 % u žádné rostliny a proto nemohla být stanovena hodnota $72hIC_{50}$. Výsledky testu na semenech rostlin *Lactuca sativa*, *Avena sativa*, *Brassica napus* neumožňují stanovit ani hodnotu $72hIC_5$, neboť ložový popel působil na rostliny stimulačně. Naopak z dat získaných při testování na rostlinách *Sinapis alba* a *Brassica rapa* bylo možné stanovit hodnotu $72hIC_5$. Hodnota $72hIC_5$ pro ložový popel při testování na semenech *Sinapis alba* byla 72,90 ml/l a hodnota $72hIC_5$ při testování na semenech *Brassica rapa* byla 16,45 ml/l.

Neředitelný vodný výluh ložového popele způsobil v jednom případě inhibice růstu kořene 31,67 %, jednalo se o test na semenech rostliny *Brassica rapa*. Pokud by byl ložový popel hodnocen podle tohoto testu, nevyhovoval by vyhlášce č. 294/2005 Sb.

Jako nejcitlivější se při testech ložového popele projevila semena *Sinapis alba*, která prokázala nejvyšší inhibici.

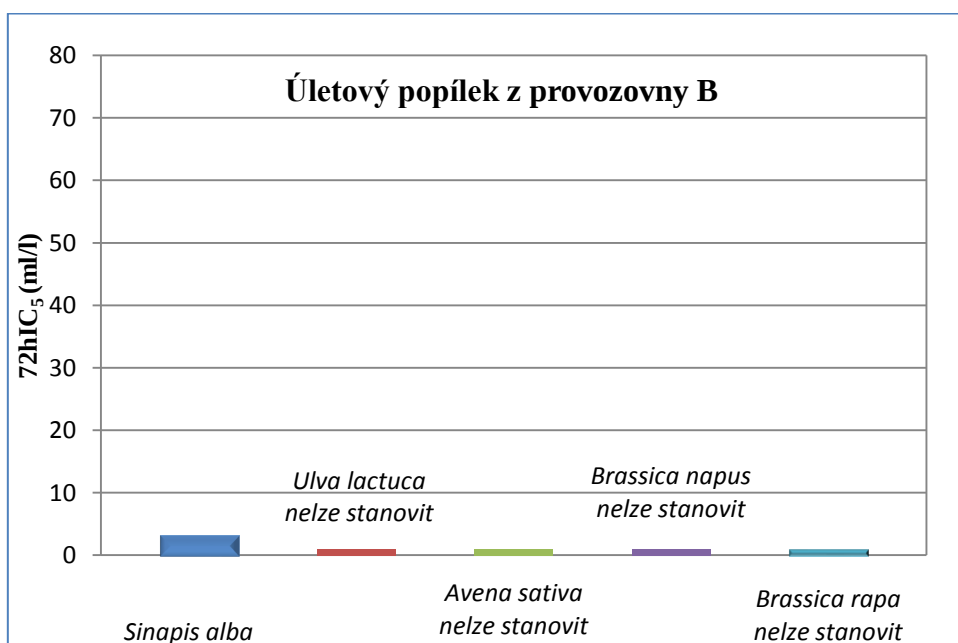


Graf č. 1: Souhrn výsledků testování na vodných výluzích pro ložový popel.

- **Úletový popílek z provozovny B**

Výsledky testování s vodnými výluhy jsou shrnuty v grafu č. 2. Pro úletový popílek z provozovny B bylo možno vypočítat hodnotu 72hIC₅₀ jenom při testování na semenech rostliny *Sinapis alba*. Vypočtená hodnota 72hIC₅₀ byla 3,18 ml/l. Vodný výluh úletového popílku na ostatní semena působil stimulačně, na semenech rostlin *Avena sativa* a *Brassica rapa* byla dokonce stimulace větší než 30 % a z tohoto důvodu vzorek nesplňuje požadavky stanovené ve vyhlášce č. 294/2005 Sb.

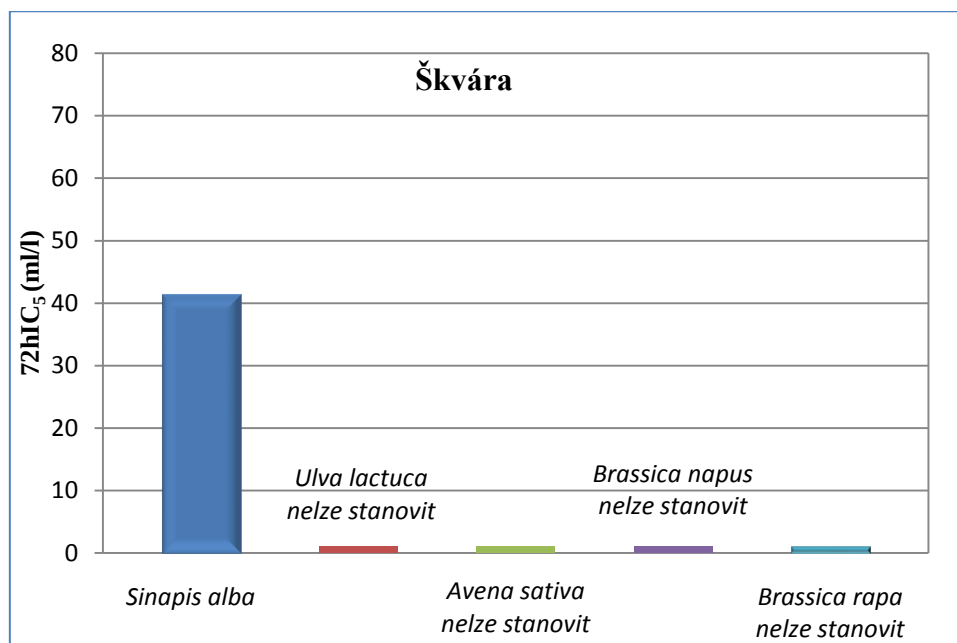
Na základě výsledků testů s vodnými výluhy byl ze všech vzorků vedlejších energetických produktů úletový popílek z provozovny B nejméně toxický.



Graf č. 2: Souhrn výsledků testování na vodných výluzích pro úletový popílek z provozovny B.

- **Škvára**

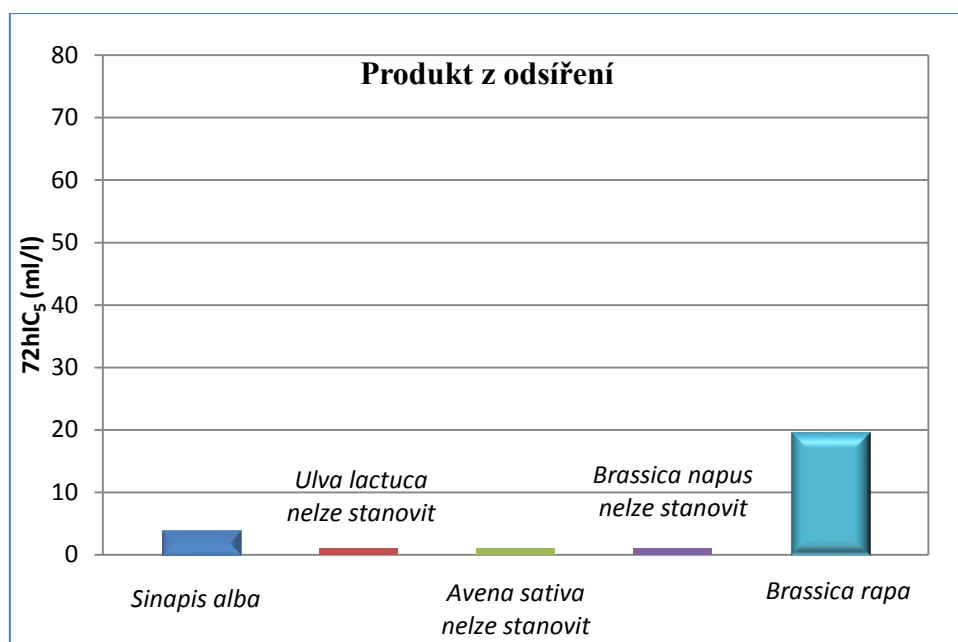
Výsledky testování s vodnými výluhy škváry jsou shrnuty v grafu č. 3. V případě škváry bylo možno ze stejných důvodů jako u předchozích vzorků vypočítat pouze hodnotu $72hIC_5$ opět jenom při testování na semenech rostliny *Sinapis alba*. Hodnota $72hIC_5$ byla 41,44 ml/l. Vodný výluh škváry působil stimulaci růstu kořene větší než 30 %, a to konkrétně na semenech rostlin *Avena sativa*, *Brassica napus* a *Brassica rapa*. Proto je škvára dle požadavků ve vyhlášce č. 294/2005 Sb. považována za nebezpečnou.



Graf č. 3: Souhrn výsledků testování na vodných výluzích pro škváru.

- **Produkt z odsíření**

V grafu č. 4 jsou shrnuty výsledky ekotoxikologického testování na vodných výluzích pro produkt z odsíření. Hodnota $72hIC_5$ byla možná stanovit v případě testování na semenech *Sinapis alba* a *Brassica rapa*. Vypočtená hodnota $72hIC_5$ v případě testu na semenech *Sinapis alba* byla 3,87 ml/l a při testech na semenech *Brassica rapa* 19,61 ml/l.



Graf č. 4: Souhrn výsledků testování na vodných výluzích pro produkt z odsíření.

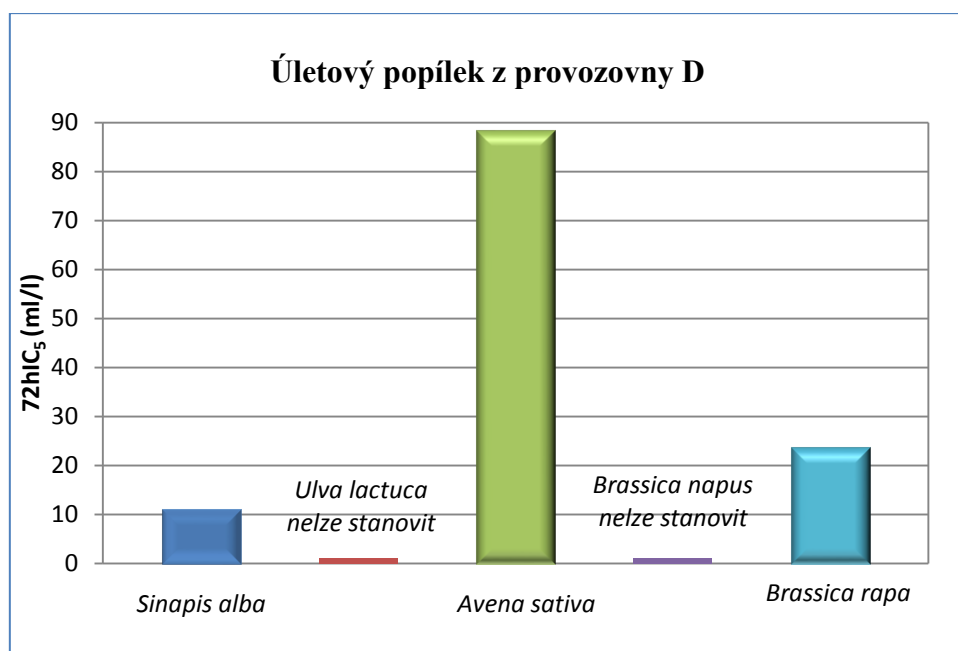
- **Úletový popílek z provozovny D**

Výsledky testování jsou shrnuty v grafu č. 5. Hodnotu 72hIC₅₀ pro úletový popílek bylo možno stanovit při testování na semenech *Sinapis alba*, *Avena sativa* a *Brassica rapa*. Hodnota 72hIC₅₀ při testech na semenech *Sinapis alba* byla 11,03 ml/l, při testech na semenech *Avena sativa* 88,49 ml/l a při použití testů na *Brassica rapa* byla hodnota 72hIC₅₀ 23,55 ml/l.

Jako nejcitlivější se při kontaktu s výluhem úletového popílku z provozovny D projevila semena rostliny *Avena sativa*. Pokud bychom posuzovali toxicitu podle výsledků získaných na semenech této rostliny, jevil by se vzorek úletového popílku z provozovny D, jako nejtoxičtější ze všech VEP.

Ke stejnému závěru bychom došli, kdybychom vzorek hodnotili podle výsledku testu na semenech *Brassica rapa*. I v tomto případě se vzorek úletového popílku v porovnání s ostatními vzorky jeví jako nejtoxičtější.

Pokud bychom hodnotili toxicitu vzorků na základě výsledků testu na metodikou určených semenech *Sinapis alba*, byl by vzorek na třetím místě.

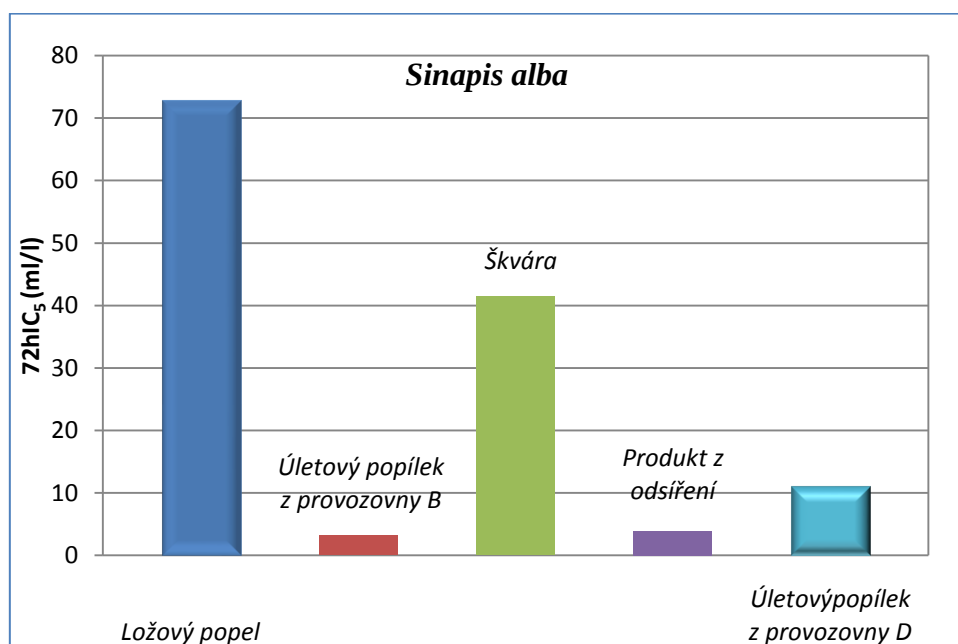


Graf č. 5: Souhrn výsledků testování na vodných výluzích pro úletový popílek z provozovny D.

Následující grafy byly sestaveny za účelem přehledného porovnání účinků VEP na jednotlivé testovací organismy.

- ***Sinapis alba***

Při porovnání odezvy semen jednotlivých testovacích rostlin na působení VEP je možno říci, že až na některé výjimky (produkt z odsíření, úletový popílek z provozovny D) byla nejcitlivější rostlinou hořčice bílá (*Sinapis alba*). *Sinapis alba* v našem případě reagovala inhibičně na všech pět testovaných vzorků, přičemž ložový popel vykázal na semenech *Sinapis alba* nejvyšší toxicitu (graf č. 6).



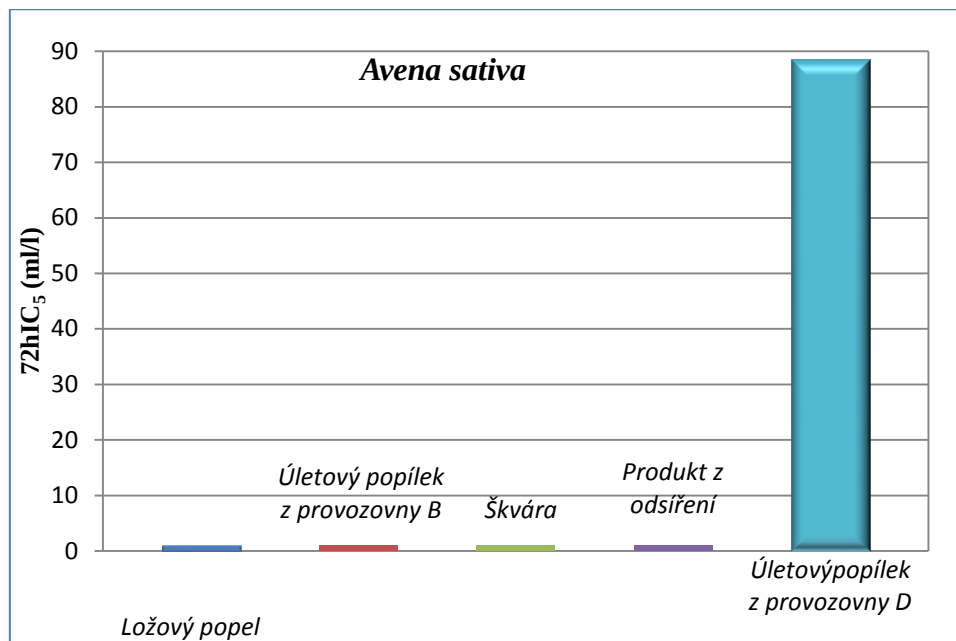
Graf č. 6: Souhrn výsledků 72hIC₅₀ testování vodných výluhů na semenech *Sinapis alba*.

- ***Lactuca sativa***

Semena salátu setého (*Lactuca sativa*) reagovala na všechny vzorky VEP stimulačně, proto u žádného vzorku nebylo možné určit hodnotu 72hIC₅.

- ***Avena sativa***

úletový popílek z provozovny D vykázal na semenech *Avena sativa* nejvyšší toxicitu ze všech testovaných vzorků (graf č. 7).



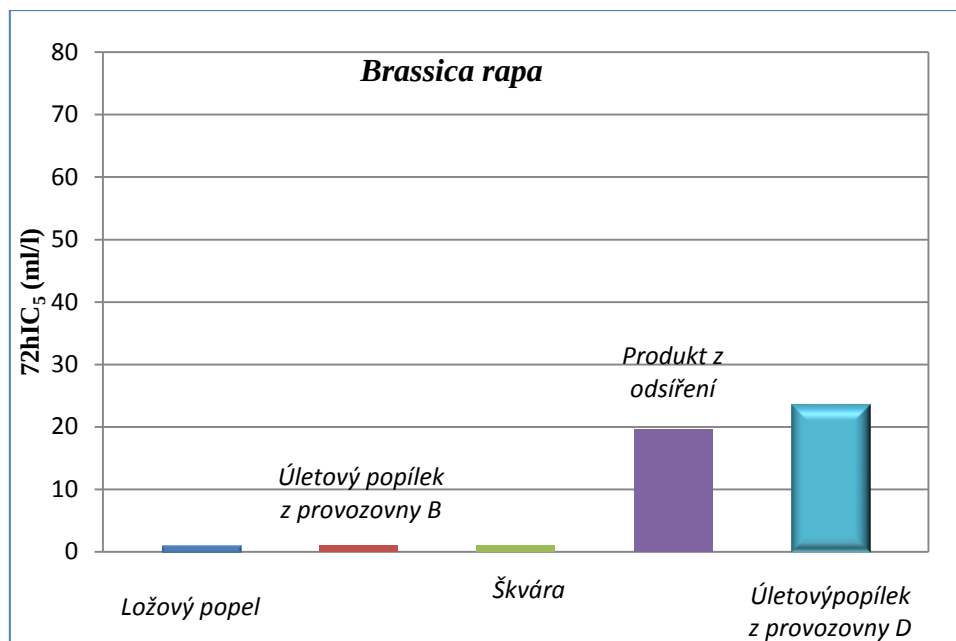
Graf č. 7: Souhrn výsledků 72hIC₅₀ testování vodných výluhů na semenech *Avena sativa*.

- ***Brassica napus***

V případě testů na semenech rostliny *Brassica napus* nešlo určit ani hodnotu 72hIC₅₀, neboť všechny vzorky růst kořenů stimulovaly.

- ***Brassica rapa***

Oproti tomu testování vodných výluhů na semenech *Brassica rapa* potvrdilo výsledky testů na rostlině *Avena sativa*, tudíž že nejtoxičtější je úletový popílek z provozovny D (graf č. 8).



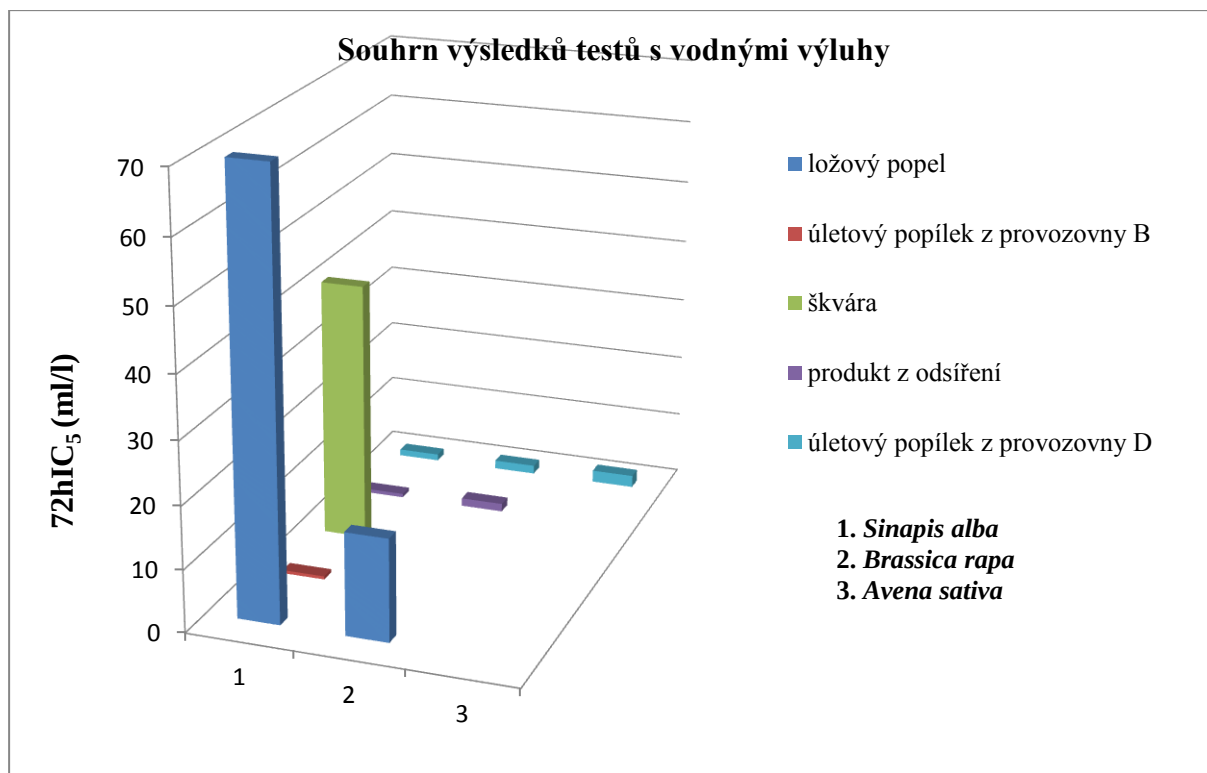
Graf č. 8: Souhrn výsledků 72hIC₅₀ testování vodných výluhů na semenech *Brassica rapa*.

- **Souhrn výsledků testů s vodnými výluhy**

U žádného vodného výluhu vedlejšího energetického produktu nemohla být určena hodnota 72hIC₅₀. Jak již bylo řečeno v předchozích odstavcích, podle vyhlášky č. 376/2001 Sb. nevykazují vzorky nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicitu. U úletového popílku z provozovny B a produktu z odsíření byla prokázána, v porovnání s vyhláškou č. 294/2005 Sb., inhibice růstu kořene větší než 30 % při testech na *Sinapis alba* a u jednoho vzorku i na semenech *Brassica rapa* a tyto vzorky nelze využít k rekultivacím na povrchu terénu.

Z důvodu malých inhibičních účinků, které vykazovala semena některých rostlin, a pouze jen v reakci na některé vzorky, byly pro srovnání jejich citlivosti a pro porovnání účinků VEP vypočteny alespoň hodnoty 72hIC₅₀. V grafu č. 9 je uveden souhrn výsledků testů, kde jednotlivé sloupce představují hodnotu 72hIC₅₀. Hodnota 72hIC₅₀ mohla být stanovena pouze v pěti případech, a to třikrát u úletového popílku z provozovny D na semenech rostliny *Avena sativa*, *Sinapis alba* a *Brassica rapa*. A celkově dvakrát bylo možné stanovit hodnotu 72hIC₅₀ u produktu z odsíření a ložového popele. Testovacím organismem byla v tomto případě semena rostlin *Sinapis alba* a *Brassica rapa*. Nejvyšší hodnota 72hIC₅₀ byla stanovena u ložového popele, 72,90 ml/l.

Nejcitlivějším organismem byla semena rostliny *Sinapis alba*. Naopak nejméně citlivá byla semena rostliny *Brassica napus*, která jsou doporučována v kontaktních testech toxicity.



Graf č. 9: Souhrn výsledků testů s vodnými výluhy.

4.2 Diskuze výsledků kontaktních testů fytotoxicity

- Ložový popel

Z důvodu nedostatečného množství vzorku mohl být v kontaktním uspořádání proveden s ložovým popelem pouze jeden test; test klíčení semen a růstu kořene *Brassica napus*, ISO 11269-2. Ložový popel působil na růst rostlin v koncentraci 0,1 % a 1 % stimulačně. Naopak v případě 10% a 100% koncentrace ztuhl tak, že nebylo možné jej zavlažovat ani zkypřit jeho povrch, což vysvětluje 100% inhibici klíčení semen a růstu rostlin. Ložového popele při styku s vodou ztuhne, ztratí jakékoli póry a možnost příjmu vody je omezená.

- Úletový popílek z provozovny B

Úletový popílek z provozovny B byl testován na všech čtyřech prováděných kontaktních testech ekotoxicity. Test klíčení semen a růstu rostliny *Brassica napus* prokázal, že vzorek způsobuje inhibici růstu větší než 50 % a hodnota EC_{50} byla 4,86 g/kg. V případě téhož testu, ale na rostlině *Avena sativa* působil vzorek na růst rostliny stimulačně až do koncentrace 10 %. 100% inhibici růstu rostliny *Avena sativa* vyvolal 100 % vzorek úletového popílku z provozovny B. Z důvodu nedostatku kontrolní půdy nemohl být proveden test základní a zjištěna hodnota EC_{50} . Nicméně test s limitní koncentrací 500 g/kg na rostlině *Brassica napus* jednoznačně prokázal, že tento vzorek je ekotoxicky pozitivní. K opačnému výsledku se dospělo screeningovým testem inhibice růstu kořene salátu setého (*Lactuca sativa*), podle něhož vzorek ekotoxikologické vlastnosti neprokázal.

- Škvára

Škvára byla ve všech kontaktních testech fytotoxicity zhodnocena jako ekotoxicky negativní. V testu klíčení semen a růstu rostlin *Brassica napus* a *Avena sativa* nebyla prokázána inhibice větší než 50 %. V testech vyhodnocovaných statistickými metodami nebyla nalezena významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

- Produkt z odsíření

Výsledky prováděných kontaktních testů fytotoxicity ukázaly, že produkt z odsíření je toxický pro životní prostředí. Hodnoty EC_{50} zjištěné na základě testu klíčivosti semen a růstu rostlin *Brassica napus* a *Avena sativa* byly 3,89 g/kg a 111,63 g/kg. Z výsledků kontaktních testů hodnocených na základě Dunnettova *t*-testu byla zjištěna významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

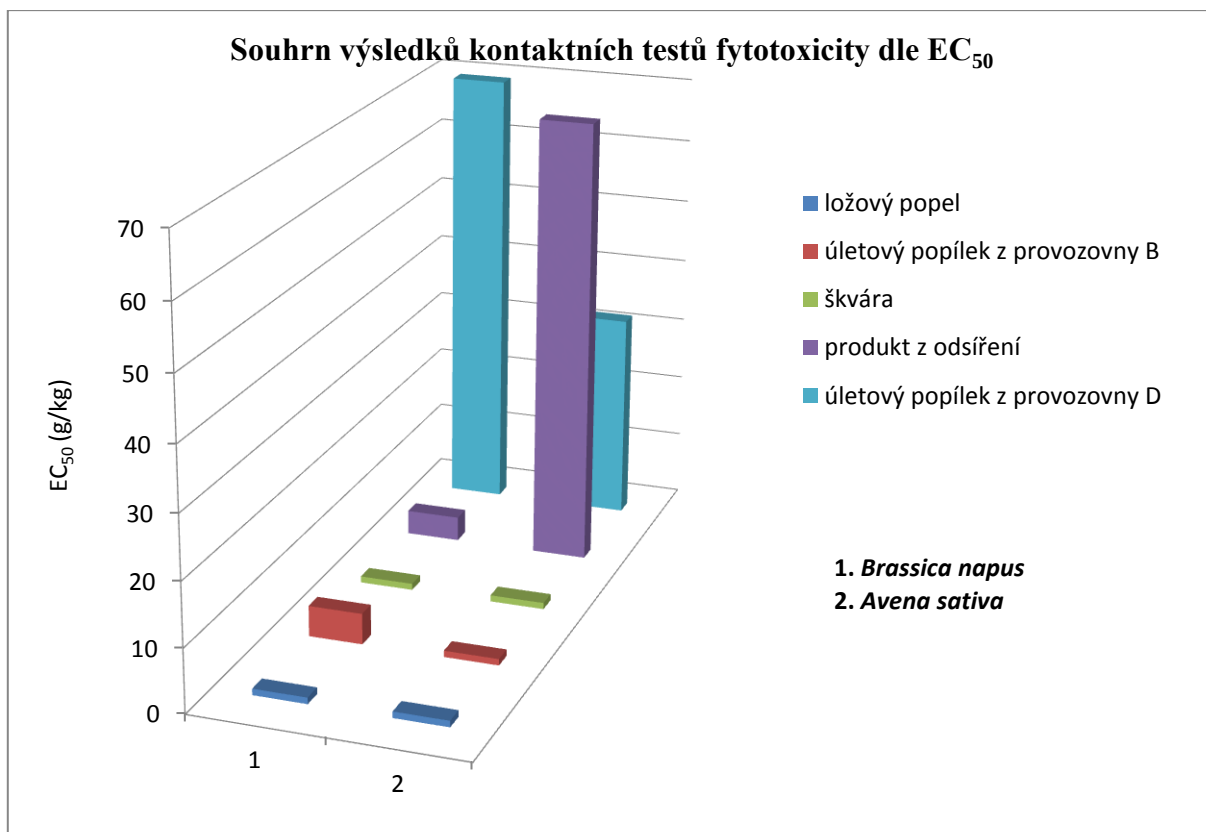
- Úletový popílek z provozovny D

Úletový popílek z provozovny D je ekotoxicky pozitivní, tuto skutečnost potvrzují všechny prováděné kontaktní testy fytotoxicity. Hodnota EC_{50} zjištěná při testech na semenech *Brassica napus* byla 115,28 g/kg a na semenech *Avena sativa* byla 32,58 g/kg. Výsledky testu limitní koncentrace na rostlině *Brassica napus* a screeningového testu na rostlině *Lactuca sativa* byly vyhodnoceny jako významně odlišné od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

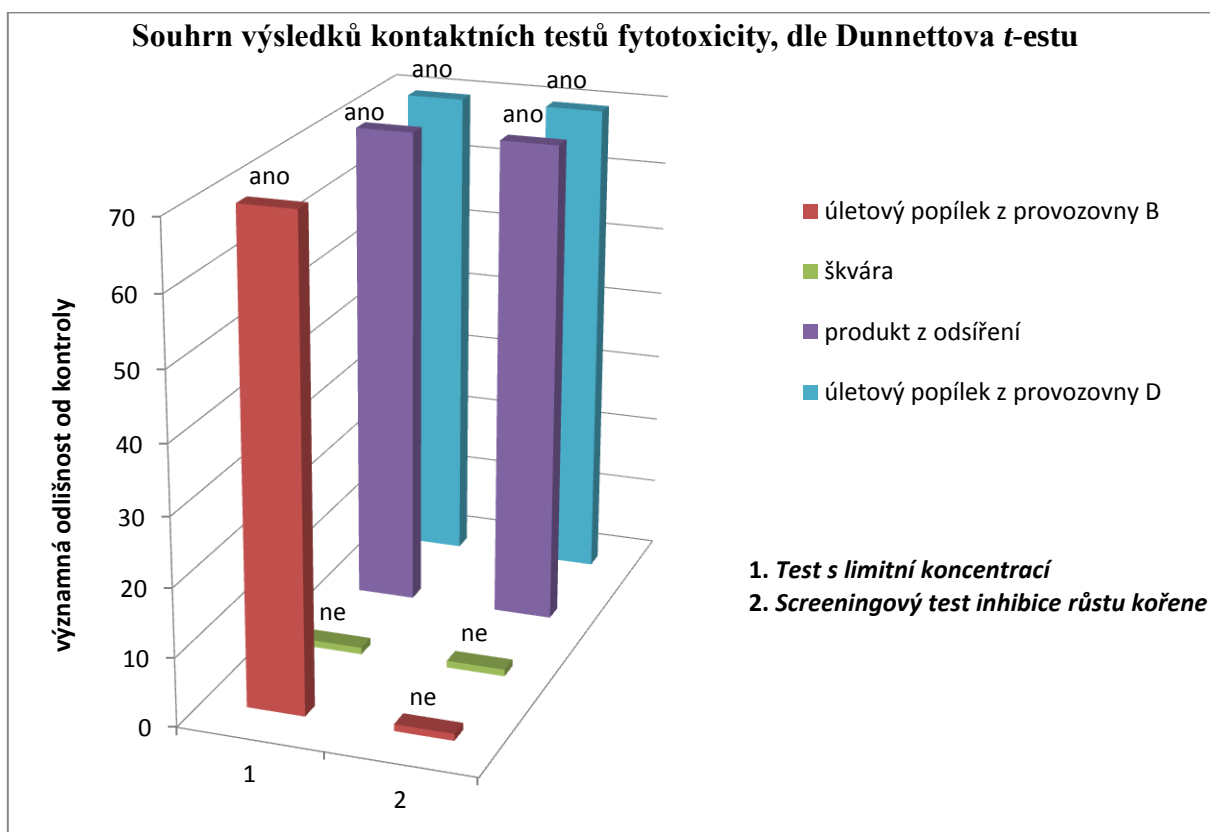
- Souhrn výsledků kontaktních testů fytotoxicity

Souhrn výsledků kontaktních testů fytotoxicity pomocí hodnoty EC_{50} je uveden v grafu č. 10, z něhož je patrné, že nejvíce toxické pro životní prostředí jsou úletový popílek z provozovny D a produkt z odsíření. Naopak vzorek ekotoxicky negativní je škvára. Ekotoxicitu ložového popele nebylo možno objektivně posoudit, z důvodu provedení pouze jednoho kontaktního testu.

Stejných výsledků se dosáhlo při hodnocení ekotoxicity na základě statistických testů shody, graf č. 11. Mezi ekotoxicky pozitivní vzorky se řadí produkt z odsíření a úletový popílek z provozovny D. Na základě testu s limitní koncentrací na semenech rostliny *Brassica napus* vykazoval ekotoxické účinky i úletový popílek z provozovny B. Škvára je ekotoxicky negativní.



Graf č. 10: Souhrn výsledků kontaktních testů fytotoxicity, dle hodnot EC_{50} .



Graf č. 11: Souhrn výsledků kontaktních testů fytotoxicity, dle Dunnettova t -testu.

4.3 Srovnání výsledků kontaktních testů s testy s vodnými výluhy

Ekotoxická vodných výluhů byla posuzována na základě vyhlášky 376/2001 Sb. a vyhlášky 294/2005 Sb. Vzorky vodných výluhů vedlejších energetických produktů nezpůsobily u žádného testovacího organismu inhibici růstu kořene větší než 50 %, proto nemohla být stanovena hodnota $72hIC_{50}$. Podle vyhlášky 376/2001 Sb. nevykazuje žádný ze vzorků VEP nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická. U některých vzorků VEP byla prokázána inhibice a stimulace větší než 30 %, proto dle vyhlášky 294/2005 Sb. vykazují nebezpečnou vlastnost H 14.

V případě kontaktních testů fytotoxicity byl vzorek označen jako ekotoxicky pozitivní, pokud vykázal hodnotu EC větší než 50 % nebo pokud byl výsledek testu významně odlišný od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V následujících odstavcích jsou výsledky diskutovány pro každý vedlejší energetický produkt samostatně a následně pro přehlednost shrnuty v tabulce 34.

- Ložový popel

Na základě výsledků s vodnými výluhy ložového popele nelze vzorku přidělit nebezpečnou vlastnost H 14. Jak již bylo řečeno, z důvodu nedostatečného množství vzorku byl proveden pouze jeden kontaktní test fytotoxicity. Ten ovšem poukázal na negativní fyzikální vlastnosti ložového popele, které neumožňovaly klíčení a růst rostlin v koncentraci 10 % a více.

- Úletový popílek z provozovny B

Vodný výluh úletového popílku z provozovny B způsobil inhibici růstu větší než 30 % na semenech rostlin *Sinapis alba* a *Brassica napus*, proto nevyhovuje požadavkům stanovených ve vyhlášce č. 294/2005 Sb. a dle těchto testů vykazuje nebezpečnou vlastnost H 14. Testy na dalších třech semenech tuto skutečnost nepotvrdily, ovšem ty nejsou legislativou vyžadovány. Z výsledků kontaktních testů toxicity je možné nahlížet na tento vzorek jako na ekotoxicky pozitivní, neboť 3 testy ze čtyř prokázaly ekotoxicitu.

- Škvára

Vodný výluh škváry působil na semena všech rostlin stimulačně. Ke stejným výsledkům se dospělo i v případě kontaktních testů fytotoxicity. Škvára je proto ekotoxicky negativní.

- Produkt z odsíření

Vodný výluh produktu z odsíření vyvolal inhibici větší než 30 % při testech na semenech rostliny *Sinapis alba*. V ostatních čtyřech testech se tato skutečnost neprojevila.

Opačná situace nastala u kontaktních testů toxicity. Na základě výsledků prováděných kontaktních testů fytotoxicity bylo jednoznačně zhodnoceno, že produkt z odsíření je toxický pro životní prostředí.

- Úletový popílek z provozovny D

Vodný výluh úletového popílku z provozovny D lze jednoznačně označit jako ekotoxicky negativní, zatímco na základě výsledků kontaktních testů fytotoxicity lze jednohlasně označit vzorek za toxický pro životní prostředí.

Tab. 34: Srovnání kontaktních testů s testy s vodnými výluhy.

Vzorek VEP	Nebezpečná vlastnost odpadu H 14 Ekotoxická			
	Testy s vodnými výluhy		Kontaktní testy fytotoxicity	
	Vyhláška č. 376/2001 Sb.	Vyhláška č. 294/2005 Sb.	Inhibice větší než 50 %	Významná odlišnost od kontroly
Ložový popel	Ne	Ne	Ano	Nedostatek vzorku
Úletový popílek z provozovny B	Ne	Ano	Ano	Ano
Škvára	Ne	Ne	Ne	Ne
Produkt z odsíření	Ne	Ano	Ano	Ano
Úletový popílek z provozovny D	Ne	Ne	Ano	Ano

5 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo zhodnotit ekotoxikologický vliv vedlejších energetických produktů na suchozemské vyšší rostliny. K testování byly využity semena pěti rostlin, jednalo se čtyři dvouděložné rostliny, hořčici bílou (*Sinapis alba*), salát setý (*Lactuca sativa*), brukev řepku olejku (*Brassica napus*), brukev řepák olejní (*Brassica rapa*) a jednu jednoděložnou rostlinu oves setý (*Avena sativa*). Na těchto testovacích organismech byly provedeny jak testy s vodnými výluhy, tak kontaktní testy fytotoxicity.

Výsledky testování s vodnými výluhy vedlejších energetických produktů lze zhodnotit jako velmi příznivé, neboť nebezpečná vlastnost H 14 Ekotoxická dle vyhlášky č. 376/2001 Sb. nebyla prokázána ani u jednoho vzorku. Pouze u úletového popílku z provozovny B a produktu z odsíření byla prokázána, v porovnání s vyhláškou č. 294/2005 Sb., inhibice růstu kořene větší než 30 % při testech na *Sinapis alba* a u jednoho vzorku i na semenech *Brassica rapa*, proto tyto vzorky nelze využít k rekultivacím na povrchu terénu. Vzorky vedlejších energetických produktů, které způsobily stimulaci růstu kořene větší než 30 %, také nelze využít k úpravám na povrchu terénu. Jednalo se o úletový popílek z provozovny B, škváru a v jednom případě i o vzorek úletového popílku z provozovny D.

Výsledky kontaktních testů fytotoxicity prokazují nebezpečnou vlastnost H 14 u čtyř z pěti vzorků. Za ekotoxicky negativní lze považovat pouze škváru z provozovny C, ostatní vzorky lze považovat za ekotoxické pro životní prostředí.

Porovnáním citlivosti testovacích organismů v testech ekotoxicity lze konstatovat, že hořčice bílá (*Sinapis alba*) se projevila jako nejcitlivější k vodným výluhům vedlejších energetických produktů. *Sinapis alba* reagovala inhibičně na všech pět testovaných vzorků a bylo možné stanovit hodnoty 72hIC₅₀. Semena *Brassica rapa* projevila inhibici na dva testované vzorky a semena *Avena sativa* na jeden.

Kontaktní testy fytotoxicity byly prováděny na semenech rostlin *Avena sativa*, *Brassica napus* a *Lactuca sativa*. Semena dvou posledních zmiňovaných rostlin se v testech s vodnými výluhy projevila jako nejméně citlivá, avšak pro kontaktní testy jsou doporučována.

Výsledky akvatických testů a testů kontaktních spolu korespondují jenom v jednom případě, a to u vzorku z provozovny C škváry. Shodně vyhodnotily tento vzorek jako ekotoxicky negativní. Ložový popel byl zhodnocen na základě testů s vodnými výluhy jako ekotoxicky negativní, ovšem pomocí testů kontaktních jako ekotoxicky pozitivní, stejný případ nastal i u úletového popílku z provozovny D. Úletový popílek z provozovny B a produkt z odsíření nelze dle testů s vodnými výluhy využít při rekultivacích na povrchu terénu a dle testů kontaktních nelze tyto vzorky využít vůbec, neboť se vyznačují nebezpečnou vlastností H 14 Ekotoxická.

Z výsledků diplomové práce je patrné, že kontaktní testy ekotoxicity by měly být neoddelitelnou součástí testování odpadů, neboť testy s vodnými výluhy poskytují jen informace o toxicitě látek, které se rozpouští ve vodě a jsou vhodné jen pro predikci účinků testovaných matric na akvatický ekosystém. Výsledky testů s vodnými výluhy neposkytnou informaci o toxicitě látek, které zůstaly sorbovány na částice pevného odpadu. Další důležitou informací, kterou nám umožní zjistit kontaktní testy toxicity na rozdíl od testů s vodnými výluhy, je vliv fyzikálních vlastností testovaného materiálu na klíčení semen a růst rostlin, což se například u vzorku ložového popele prokázalo jako velmi důležité.

Kontaktní testy fytotoxicity byly prováděny podle tří různých metodik, jednalo se o metodiku ISO 11269-1, ISO 11269-2 a ISO 17126. První dva testy trvají 14-21 dnů od vyklíčení 50%

semen v kontrole a třetí test je pouze pětidenní. Podle mého názoru se jako objektivnější pro posouzení případné ekotoxicity jeví spíše testy dlouhodobější.

6 SEZNAM POUŽITÝ ZDROJŮ

- [1] HOFMAN, J.; VÁCHA, R.; KULOVANÁ, M. Ekotoxikologické hodnocení vytěžených sedimentů a tuhých odpadů a legislativní změny. *Odpadové fórum*. 2009, Aprochem 2009, s. 3482-3489.
- [2] KULOVANÁ, M.; KOČÍ, V. *Odpadové fórum* [online]. 2009 [cit. 2010-09-07]. Jak dál v hodnocení ekotoxicity odpadů. Dostupné z WWW: <<http://www.odpadoveforum.cz/OF2009/CD2009/TextyOF/481.pdf>>.
- [3] ZEŽULOVÁ, H.; LEDEREROVÁ, J.; SVOBODA, M. Ekologické požadavky na využití zbytkových materiálů z těžby, úpravy a zpracování surovin. In *13th INTERNATIONAL CONFERENCE Ecology and new building materials and products* [online]. Brno: Research Institute of Building Materials, 26. 5. 2009 [cit. 2010-09-07]. Dostupné z WWW: <http://www.vustah.cz/vezpom/to1/2009_Zezulova_Ledererova_Svoboda.pdf>.
- [4] Česká republika. Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 2001.
- [5] Česká republika. Ministerstvo životního prostředí. ZÁKON č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 2005.
- [6] HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of ecotoxicology*. 2nd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. 1290 s. ISBN 1-56670-546-0.
- [7] NEWMAN, M. C., et al. *Fundamentals of ecotoxicology*. 2nd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2001. 402 s. ISBN 1-57504-013-1.
- [8] KOČÍ, V., MOCOŮVÁ, K. *Ekotoxikologie pro chemiky*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2009. 180 s. ISBN: 978-80-7080-699-9.
- [9] KOČÍ, V. Ekotoxikologie – nauka o účincích toxických látek na životní prostředí. In *Podzimní škola ASTRA* [online]. Praha, 2003 [cit. 2010-08-29]. Dostupné z WWW: <<http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2003.pdf>>.
- [10] KAFKA, Z.; PUNČOCHÁŘOVÁ, J. Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí. *Chemické listy*. 1999, č. 93, s. 604-606. Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_10_604-606.pdf>. ISSN 0009-2770.
- [11] JOZÍFKOVÁ, Z. *Využití alternativních testů biotoxicity pro stanovení nebezpečnosti polutantů*. Brno, 2007. 40 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta. Vedoucí práce Ing. Karel Bednařík, Ph.D.
- [12] KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 1-4: souhrn příspěvků z pracovních konferencí v letech 2002-2004/Editor CD: Vladimír Kočí, Blahoslav Maršálek, Olga Halousková*. Vodní zdroje Ekomonitor, 2005. Elektronický optický disk (CD-ROM)
- [13] FARGAŠOVÁ, A. *Ekotoxikologické biotesty*. 1. vyd. Bratislava: Perfekt, 2009. 317 s. ISBN 978-80-8046-422-6.
- [14] MÁCHOVÁ, J. *Testy toxicity na vodních organismech* [online]. 27. 3. 2008 [cit. 2010-08-30]. Dostupné z WWW: <http://www.vurh.jcu.cz/files/celozivotni_vzdelavani/kombinovane%20studium%20rybarstvi/4blok_prednasky/M%C3%A1chov%C3%A1/M%C3%A1chov%C3%A1%20testy%20toxicity.pdf>.

- [15] KOČÍ, V.; MARŠÁLEK, B.; TLUSTÁ, P. *Ekotoxikologické biotesty 4: sborník pracovní konference*. 1. vyd. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2004. 218 s. ISBN 20041108.
- [16] Aplikovaná hydrobiologie I. In *Aplikovaná hydrobiologie I - toxikologie vod* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého, 2010 [cit. 2011-02-12]. Dostupné z WWW: <http://ekologie.upol.cz/ku/ahdo/Toxikologie_vod.pdf>.
- [17] HOFMAN, J. *Půdní biotesty* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/Bi5620/um/7676529/Pudni_biotesty.pdf?fakulta=1431;obdobi=4445;kod=Bi5620;lang=en>.
- [18] KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 3*, 22. - 23. Října 2003. 1. vyd. Brno: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o., 2003. 194 s. ISBN: 80-903203-6-8.
- [19] DYMÁK, M. *Hodnocení ekotoxicity vytěžených a dnových sedimentů ekotoxikologickými testy výluhů*. Brno, 2010. 59 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, centrum pro výzkum toxických látek v prostředí. Vedoucí práce RNDr. Jakub Hofman, PhD.
- [20] PRIESSNIETZ, J. *Testy únikového chování v půdní ekotoxikologii*. Brno, 2008. 60 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, RECETOX, výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii. Vedoucí práce RNDr. Klára Kobetičová.
- [21] *Ministerstvo životního prostředí* [online]. 20. 8. 2008 [cit. 2010-08-28]. Definice, význam a funkce půdy. Dostupné z WWW: <[http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/definice_pudy/\\$FILE/OOHPP_definice_pudy-20080820.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/definice_pudy/$FILE/OOHPP_definice_pudy-20080820.pdf)>.
- [22] *Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungs Anstalt Speyer* [online]. [cit. 2010-11-30]. Dostupné z WWW: <<http://lufa-speyer.de/>>.
- [23] ČERNOHLÁVKOVÁ, J. *Effects of persistent organic pollutants (POPS) on soil microorganisms*. Brno, 2007. 40 s. Rigorózní práce. Masaryk university, Research centre for environmental chemistry and ecotoxicology. Vedoucí práce RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.
- [24] JELÍNEK, J.; ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia: praktická a teoretická část*. 6. rozšířené vydání. Olomouc, 2003. 574 s. ISBN 80-7182-159-4.
- [25] The available scientific approaches to assess the potential effects and risk of chemicals on terrestrial ecosystems. In *Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment (CSTEE)* [online]. Brussels : European commission directorate-general health and consumer protection, 9 November 2000 [cit. 2010-08-29]. 178 s. Dostupné z WWW: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out83_en.pdf>.
- [26] CHRISTENSEN, O. M.; MATHER, J. G. Earthworms as ecotoxicological test-organism. *Ministry of the environment, Denmark* [online]. 1994, Nr. 5, [cit. 2010-09-05]. Dostupné z WWW: <<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/1994/87-7810-207-3/pdf/87-7810-207-3.pdf>>.
- [27] Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes. In *OECD* [online]. Brussels : OECD guideline for the testing of chemicals, March 2009 [cit. 2010-09-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/8/42551309.pdf>>.
- [28] ZICHÁČEK, V. *Zoologie*. 1. vyd. Olomouc: FIN, 1995. 292 s. ISBN 80-85572-74-5.

- [29] OECD 207. *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Brussels : OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, 4. 4. 1984. 9 s. Dostupné z WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/18/1/1948293.pdf>>.
- [30] Toxicity assessment of BTEX compounds. Dr. Ted Nason, Alberta Environment, Environmental Science Division, Science and Technology Branch [online]. August 2001, G1132, [cit. 2010-09-01]. Dostupný z WWW: <http://www.ptac.org/env/dl/FINALReport_Sept4.pdf>.
- [31] OECD 401. *Acute Oral Toxicity*. Brussels : OECD guideline for testing of chemicals, 24. 2. 1987. 7 s. Dostupné z WWW: <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/udpProc/udpfin01/append/AppI.pdf>.
- [32] OECD 205. *Avian Dietary Toxicity Test*. Brussels: OECD guideline for testing of chemicals, 4. 4. 1984. 10 s. Dostupné z WWW: <<http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9720501E.PDF>>.
- [33] ANDĚL, P. Bioindikační hodnocení vývoje imisní zátěže v Krkonoších pomocí lišejníků. *Opera corcontica* [online]. 2000, 37, [cit. 2011-02-22]. s. 21-29. Dostupný z WWW: <http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:hV7JjPe3o3MJ:opera.krnep.cz/_pdf/37/oc37-2.pdf+li%C5%A1ejn%C3%ADky+imise&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESghdm6U7Oc3IQpcmzrYfvFfOyhgywlIqHSF7oAz30D2Q5FSZ3r0g1EjLcyjYTwpFAOt07r_RWx2ejQxoDy8k2tAjD_X2wpeHoiZvdaZYitpvu5eg1Z7J9jtHU6HJblktZD92xbi&sig=AHIEtbRMYLf0mIYuyRw-mFizbCZ5cMGH2A>.
- [34] BAKALOVÁ, L. *Testy fyto toxicity a jejich využití pro hodnocení vlivu xenobiotik*. Brno, 2006. 41 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Marie Kummerová, CSc.
- [35] OECD 227. *Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test*. OECD Guideline for the testing of chemicals, September 2003. 16 s. Dostupné z WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/2/41/11988186.pdf>>.
- [36] KOČÍ, V.; HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 2: sborník pracovní konference*. 1. vyd. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003. 139 s. ISBN 80-903203-0-9.
- [37] OPPTS 850.4200. *Ecological effects test guidelines: Seed germination/root elongation toxicity test*. US EPA, April 1996. 6 s.
- [38] OPPTS 850.4225. *Ecological effects test guidelines: Seedling Emergence Tier II*. US EPA, April 1996. 8 s.
- [39] KULOVANÁ, M.; KOČÍ, V.; VOSÁHLOVÁ, S. Jak dál v hodnocení ekotoxicity odpadů. *Odpadové fórum*. 2009, Aproxem 2009, s. 3358-3365.
- [40] OECD 208. *Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*. OECD Guideline for the testing of chemicals, September 2003. 19 s. Dostupné z WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>.
- [41] DIN/ISO 11269-2. *Seedling emergence and growth of terrestrial plants*. Deutsches institut für normung e. V. Berlin, 2005 [cit. 2011-02-12]. Dostupné z WWW: <http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/resources/SOP_Plant.pdf>.
- [42] OPPTS 850.4100. *Ecological effects test guidelines: Terrestrial plant toxicity Tier I (Seedling emergence)*. US EPA, April 1996. 6 s.

- [43] DIN/ISO 11269-1. *Determination of the effects of pollutants on soil flora: Method for the measurement of inhibition of root growth*. Berlin: Deutsches institut für normung e. V., 1993. 8 s.
- [44] *Laboratoř ekotoxikologie* [online]. Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze: Laboratoř ekotoxikologie a LCA, 2010 [cit. 2011-04-11]. Stanovení inhibice růstu kořene salátu (*Lactuca sativa* L.). Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/13_salat_2010.pdf>.
- [45] ROHÁČEK, K. *Fotofyzikální děje během fotosyntetické přeměny zářivé energie na biochemicky využitelnou formu*. [online]. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin České Budějovice, Ústav fyzikální biologie JU Nové Hradky, 2008 [cit. 2011-02-12]. Dostupné z WWW: <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/4.pdf>>.
- [46] Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky. In *Gazometrie* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2010 [cit. 2011-02-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/gazometrie.pdf>>.
- [47] Gazometrická stanovení fotosyntetických parametru. In *Gazometrická měření* [online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 18. 4. 2008 [cit. 2011-02-12]. Dostupné z WWW: <http://www.google.cz/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fkfr.prf.jcu.cz%2Fdownload%2Flectures%2FKFR220%2FKFR220_U05-Gazometrie2008.pdf&rct=j&q=kfr.prf.jcu.cz%2Fdownload%2Flectures%2F...%2FKFR220_U05-Gazometrie2008.pdf&ei=PGhWTejrGY7DtAbO56mlCw&usg=AFQjCNGEvph2GwWJKAMn4r2MEwTyAwZp0g&cad=rja>.
- [48] HLÍZOVÁ, E. *Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu vegetace*. Praha, 2008. 34 s. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce Doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.
- [49] KIZLINK, J. *Nakládání s odpady*. 1. vyd. Brno: VUT FCH, 2007. 283 s. ISBN 978-80-214-3348-9.
- [50] ANDERT, D.: Zkušenosti ze spalování alternativních peletek. *Biom.cz* [online]. 2010-01-27 [cit. 2010-11-11]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/zkusenosti-ze-spalovani-alternativnich-peletek>>. ISSN: 1801-2655.
- [51] *Spalování paliv* [online]. [cit. 2010-11-11]. Schiedel. Dostupné z WWW: <<http://www.schiedel.cz/servis/podklady-pro-projektovani/zaklady-kominove-techniky/neco-malo-o-spalovani/>>.
- [52] *Fluidní kotel* [online]. [cit. 2010-11-12]. Energetický poradce. Dostupné z WWW: <<http://www.energetickyporadce.cz/slovník/fluidni-kotel.html>>.
- [53] HRDLÍČKA, J.: Fluidní kotel na biomasu s inertní náplní Liapor. Sborník příspěvků ze semináře „Energie z biomasy X“, VUT v Brně, 2009, ISBN 978-80-214-4027-2
- [54] *Princip tepelné elektrárny* [online]. 2010 [cit. 2010-11-13]. Vodní a tepelné elektrárny. Dostupné z WWW: <<http://www.vodni-tepelne-elektrarny.cz/princip-tepelne-elektrarny.htm>>.
- [55] Česká republika. Ministerstvo životního prostředí. Vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 2001.

- [56] Česká republika. Ministerstvo životního prostředí. ZÁKON č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 2001.
- [57] Ministerstvo životního prostředí České republiky. Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Únor 2007.
- [58] Český normalizační institut. ČSN EN 12457- 4 Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním). Červenec 2003.
- [59] Ministerstvo životního prostředí České republiky. Metodický pokyn odboru odpadů k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. 2008.
- [60] KOČÍ, V.; RAKOVICKÝ, T.; ŠVAGR, A. VŠCHT v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí. [cit. 2010-11-15]. Testy semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm#_Toc525630662>.
- [61] ZÁRUBOVÁ, R. Certifikace vedlejších energetických produktů: Seminář „Vedlejší energetické produkty a nařízení REACH v praxi“. *Výzkumný ústav pro hnědé uhlí a. s.* [online]. Únor, 2011, Praha, [cit. 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:J0mlGu3wBgCJ:www.asvep.cz.web3.web4ce.cz/index.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D17%26Itemid%3D30+vedlej%C5%A1%C3%AD+energetick%C3%A9+produkty+odpad&cd=12&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&source=www.google.cz>.
- [62] SCHREIER, M. Přichází století velmi cenných odpadů. *Tretiruka.cz* [online]. 2010, [cit. 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.tretiruka.cz/news/prichazi-stoleti-velmi-cennych-odpadu/>>.
- [63] KULHÁNKOVÁ, P. REACH z pohledu MPO. *Ministerstvo průmyslu a obchodu* [online]. 2011, Praha, [cit. 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:n03Oi7NdRr0J:www.asvep.cz.web3.web4ce.cz/index.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D14%26Itemid%3D30+vedlej%C5%A1%C3%AD+energetick%C3%A9+produkty+odpad+reach&cd=2&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&source=www.google.cz>.
- [64] BALLNĚROVÁ, P. *Ekotoxikologické testy a jejich aplikace k hodnocení vedlejších energetických produktů*. Brno 2009. 116 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta. Vedoucí práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
- [65] *Květena ČR* [online]. Petr Kocián. 2010 [cit. 2011-02-21]. Dostupné z WWW: <<http://www.kvetenacr.cz/>>.
- [66] Dunnett Table: Number of Groups Including Control Group [cit. 2011-04-19]. Dostupné z WWW: <http://davidmlane.com/hyperstat/table_Dunnett.html>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\bar{L}$	průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm)
AO	autorizovaná osoba
ASTM	<i>American Society of Testing and Materiale</i> – Americká společnost pro testování a materiály
ATP-ADP	Adenosintrifosfát-adenosindifosfát
BBA	<i>Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft</i> - Federální Biologické Výzkumné centrum pro zemědělství a lesnictví
c	koncentrace látky
ČOV	Čistička odpadních vod
ČSN	České technické normy
D	hmotnost vysušeného vzorku
d	průměrná délka nadzemního výhonku
DHA	dehydrogenázová aktivita
DMSO	dimethylsulfoxid
DR	podíl sušiny v analytickém vzorku v [%]
D_t	průměrná délka kořene v testované matrici (mm)
EC_{50}/EC_x	koncentrace, která vyvolá efekt (úbytek sušiny biomasy) u 50 (X) % testovacích organismů
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> - Agentura ochrany životního prostředí
EPPO	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i> – Evropská a středomořská organizace pro ochranu rostlin
ESo	<i>euro-soils</i> - evropské přírodní půdy
hč	hmotnost čerstvé biomasy
hs	hmotnost sušiny biomasy
I	inhibice růstu
IC_{50}/IC_x	koncentrace, která vyvolá inhibici u 50 (X) % testovacích organismů
IRGA	infračerveného analyzátoru plynů
ISO	<i>International Standardization Organization</i> - Mezinárodní organizace pro normalizaci
L_A	množství přidané vody v [l]
LC_{50}	koncentrace, která vyvolá úhyn u 50 % testovacích organismů
L_i	průměrná délka i-tého kořene ve zvolené koncentraci (mm)
LID	Redukce emise světla
L_k	průměrná délka kořene v kontrole (mm)
LOEC	<i>lowest observed effect concentration</i> - nejnižší koncentrace látky, při které je pozorována daný efekt
M	hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu v [kg]
M_D	hmotnost vysušeného analytického vzorku v [kg]
M_T	teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg]
M_W	navážka analytického vzorku odpadu pro stanovení podílu sušiny

	v [kg]
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
N	počet semen ve zvolené koncentraci
NOEC	<i>No observable effect concentrations</i> - nejvyšší koncentrace látky, při které není pozorovatelný daný efekt
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation Development</i> - Organizace pro hospodářskou spolupráci rozvoj
p	počet vyklíčených rostlin
PAM	pulzní amplitudové modulace
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
PCDD	Polychlorované dibenzodioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
pH	Vodíkový exponent - záporný dekadický logaritmus rovnovážné koncentrace iontů H_3O^+
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> - Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
S	Stimulace růstu
SD	<i>Significant difference</i> - významný rozdíl
SE	<i>Standard Error</i> - směrodatná chyba
STO	stavební technické osvědčení
T	hmotnost válce
v	počet stupňů volnosti
VEP	vedlejší energetické produkty
VPK	vodní kapacita půdy
WHC	<i>water holding capacity</i> - celková kapacita zadržování vody
$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$	hustota vody

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulka všech vyšších rostlin možných k použití při testování toxicity.

Příloha 2: Dunnettova tabulka.

Příloha 3: Příklad výpočtu statistických dat podle Dunnettova testu.

Příloha 4: Příklad výpočtu statistických dat podle Dunnettova testu pro screeningový test klíčivosti salátu (*Lactuca sativa*).

PŘÍLOHA 1 SEZNAM CÉVNATÝCH ROSTLIN PRO TESTY FYTOTOXICITY

Tabulka všech vyšších rostlin možných k použití při testování toxicity.

Čeleď	Druh
Laskavcovité (<i>Amaranthaceae</i>)	Laskavec ohnutý (<i>Amaranthus retroflexus</i>)
Mířikovité (<i>Apiaceae</i>)	Kerblík lesní (<i>Anthriscus sylvestris</i>)
	Bohlelav plamatý (<i>Conium maculatum</i>)
	Mrkev obecná (<i>Daucus carota</i>)
	Bedrník obecný (<i>Pimpinella saxifraga</i>)
	Tořice japonská (<i>Torilis japonica</i>)
Toješťovité (<i>Apocynaceae</i>)	<i>Apocynum cannabinum</i>
Hvězdníkovité (<i>Asteraceae</i>)	Řebříček obecný (<i>Achillea millefolium</i>)
	Sedmikráska chudobka (<i>Bellis perennis</i>)
	Dvouzubec níčí (<i>Bidens cernua</i>)
	<i>Bidens pilosa</i>
	Bodlák obecný (<i>Carduus acanthoides</i>)
	Chřpa modrá (<i>Centaurea cyanus</i>)
	Chřpa černá (<i>Centaurea nigra</i>)
	Chřpa čekánek (<i>Centaurea scabiosa</i>)
	Pcháč oset (<i>Cirsium arvense</i>)
	Pcháč obecný (<i>Cirsium vulgare</i>)
	Svízel přítula (<i>Galium aparine</i>)
	Oman pravý (<i>Inula helenium</i>)
	Máchelka podzimní (<i>Leontodon autumnalis</i>)
	Máchelka srstnatá (<i>Leontodon hispidus</i>)
	Kopretina bílá (<i>Leucanthemum vulgare</i>)
	Třapatka srstnatá (<i>Rudbeckia hirta</i>)
	Zlatobýl kanadský (<i>Solidago canadensis</i>)
	Mléč zeliný (<i>Sonchus oleraceus</i>)
	Kozí brada luční (<i>Tragopogon pratensis</i>)
	<i>Xanthium pensylvanicum</i>
	Řepěň trnitý (<i>Xanthium spinosum</i>)
	Řepěň durkoman (<i>Xanthium strumarium</i>)
Břízovité (<i>Betulaceae</i>)	Bříza papírovitá (<i>Betula papyrifera</i> Marsh.)
Brukvovité (<i>Brassicaceae</i>)	Česnáček lékařský (<i>Alliaria petiolata</i>)
	Řeřišnice luční (<i>Cardamine pratensis</i>)
	Hořčice polní (<i>Sinapsis arvensis</i>)
	Penízek rolní (<i>Thlaspi arvense</i>)
Hvozdíkovité (<i>Caryophyllaceae</i>)	Kohoutek luční (<i>Lychnis flos-cuculi</i>)
	Silenka bílá (<i>Silene alba</i>)
	Silenka dvoudomá (<i>Silene dioica</i>)
	Merlík bílý (<i>Chenopodium album</i>)
Klusiovité (<i>Clusiaceae</i>)	Třezalka chlupatá (<i>Hypericum hirsutum</i>)
	Třezalka tečkovaná (<i>Hypericum perforatum</i>)

Čeleď	Druh
Svlačcovité (<i>Convolvulaceae</i>)	Svlačec rolní (<i>Convolvulus arvensis</i>)
	<i>Ipomea hederacea</i>
Šáchorovité (<i>Cyperaceae</i>)	Šáchor hlíznatý (<i>Cyperus rotundus</i>)
Štětkovité (<i>Dipsacaceae</i>)	Štětka planá (<i>Dipsacus fullonum</i>)
Pryšcovité (<i>Euphorbiaceae</i>)	Bažanka vytrvalá (<i>Mercurialis perennis</i>)
Bobovité (<i>Fabaceae</i>)	<i>Cassia obtusifolia</i>
	Štírovník růžkatý (<i>Lotus corniculatus</i>)
	Tolice dětelová (<i>Medicago lupulina</i>)
	<i>Senna obtusifolia</i>
	<i>Sesbania exaltata</i>
	Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i>)
	Jetel plazivý (<i>Trifolium repens</i>)
	Vikev ptačí (<i>Vicia cracca</i>)
	Vikev čtyřsemenná (<i>Vicia tetrasperma</i>)
Hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	Měrnice černá (<i>Ballota nigra</i>)
	Bukvice lékařská (<i>Betonica officinalis</i>)
	Pitulník žlutý (<i>Lamiaeum galeobdolon</i>)
	Hluchavka bílá (<i>Lamium album</i>)
	Srdečník obecný (<i>Leonorus cardiaca</i>)
	Karbinec evropský (<i>Lycopus europaeus</i>)
	Máta klasnatá (<i>Mentha spicata</i>)
	Šanta kočičí (<i>Nepeta cataria</i>)
	Černohlávek obecný (<i>Prunella vulgaris</i>)
	<i>Stachys officinalis</i>
Hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	Ožanka lesní (<i>Teucrium scorodonia</i>)
<i>Limnanthaceae</i>	Kakost maličký (<i>Geranium pusillum</i>)
Slézovité (<i>Malvaceae</i>)	Mračník theophrastův (<i>Abutilon theophrasti</i>)
	Sléz lesní (<i>Malva sylvestris</i>)
	<i>Sida spinosa</i>
Mákovité (<i>Papaveraceae</i>)	Mák vlčí (<i>Papaver rhoeas</i>)
Borovicovité (<i>Pinaceae</i>)	Borovice (<i>Pinus resinosa</i>)
Jitrocelovité (<i>Plantaginaceae</i>)	Jitrocel kopinatý (<i>Plantago lanceolata</i>)
	Jitrocel prostřední (<i>Plantago media</i>)
Lipnicovité (<i>Poaceae</i>)	Pýr plazivý (<i>Agropyron repens</i>)
	Psineček (<i>Agrostis tenuis</i>)
	Psineček výběžkatý (<i>Agrostis stolonifera</i>)
	Psárka polní (<i>Alopecurus myosuroides</i>)
	Ovsík vyvýšený (<i>Arrhenatherum elatius</i>)
	Oves hluchý (<i>Avena fatua</i>)
	Válečka lesní (<i>Brachypodium sylvaticum</i>)
	Sveřep vzpřímený (<i>Bromus erectus</i>)
	Sveřep jalový (<i>Bromus sterilis</i>)
	Sveřep střešní (<i>Bromus tectorum</i>)
	Pohánka hřebenovitá (<i>Cynosurus cristatus</i>)

Čeleď	Druh
	Srha laločnatá (<i>Dactylis glomerata</i>)
	Rosička krvavá (<i>Digitaria sanguinalis</i>)
	Ježatka kuří noha (<i>Echinochloa crus galli</i>)
	Kalužnice indická (<i>Eleusine indica</i>)
	Pýrovník kanadský (<i>Elymus canadensis</i>)
	<i>Elymus repens</i>
	Kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i>)
	<i>Festuca elatior</i>
	Kostřava luční (<i>Festuca pratensis</i>)
	Ječmen myší (<i>Hordeum murinum</i>)
	Bojínek luční (<i>Phleum pratense</i>)
	Lipnice roční (<i>Poa annua</i>)
	Čirok halepský (<i>Sorghum halepense</i>)
Rdesnovité (<i>Polygonaceae</i>)	Rdesno blešník (<i>Polygonum lapathifolium</i>)
	Rdesno svlačcovité (<i>Polygonum convolvulus</i>)
Rdesnovité (<i>Polygonaceae</i>)	Rdesno (<i>Polygonum pensylvanicum</i>)
	<i>Polygonum persicaria</i>
	Šťovík kadeřavý (<i>Rumex crispus</i>)
	Šťovík tupolistý (<i>Rumex obtusifolius</i>)
	Šťovík krvavý (<i>Rumex sanguineus</i>)
Prvosenkovité (<i>Primulaceae</i>)	Drchnička rolní (<i>Anagallis arvensis</i>)
	Prvosenka vyšší (<i>Primula elatior</i>)
	Prvosenka jarní (<i>Primula veris</i>)
	Prvosenka bezlodyžná (<i>Primula vulgaris</i>)
Pryskyřníkovité (<i>Ranunculaceae</i>)	Pryskyřník prudký (<i>Ranunculus acris</i>)
	Pryskyřník plazivý (<i>Ranunculus repens</i>)
Růžovité (<i>Rosaceae</i>)	Tužebník jilmový (<i>Filipendula ulmaria</i>)
	Kuklík městský (<i>Geum urbanum</i>)
	Mochna plazivá (<i>Potentilla reptans</i>)
Mořenovité (<i>Rubiaceae</i>)	Svízel povázka (<i>Galium mollugo</i>)
	Svízel syřišťový (<i>Galium verum</i>)
	Svízel přitula (<i>Gallium aparine</i>)
Krtičníkovité (<i>Scrophulariaceae</i>)	Náprstník červený (<i>Digitalis purpurea</i>)
	Lnice květel (<i>Linaria vulgaris</i>)
	<i>Mimulus ringens</i>
	Divizna malokvětá (<i>Verbascum thapsus</i>)
	Rozrazil perský (<i>Veronica persica</i>)
Kopřivovité (<i>Urticaceae</i>)	Kopřiva dvoudomá (<i>Urtica dioica</i>)

PŘÍLOHA 2 DUNNETTOVA TABULKA

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

Vysvětlivky: a - počet stupňů volnosti, b - počet stanovení, 0,05; 0,01 hladina Významnosti [66].

PŘÍLOHA 3 PŘÍKLAD VÝPOČTU STATISTICKÝCH DAT I

Příklad výpočtu statistických dat podle Dunnettova t -testu pro test limitní koncentrace.

Počet stupňů volnosti (v):

$$v = \text{počet stanovení} \times (\text{počet měřených rostlin} - 1) = 2 \times (24 - 1) = 46$$

$$S^2 = \frac{\sum x_i^2 - n \sum x_j^2}{v} = \frac{24560 - 1763,29}{46}$$

$$S = \sqrt{495,58} = 22,26$$

kde:

$\sum x_i^2$ je součet druhých mocnin jednotlivých délek nadzemních částí rostlin;

$n \sum x_j^2$ je počet stanovení $\times$ součet druhých mocnin průměrných délek nadzemních částí rostlin.

Směrodatná chyba (Standard error) SE:

$$SE = S \times \sqrt{\frac{T - 1}{N}} = 22,26 \times \sqrt{\frac{2 - 1}{24}} = 4,54$$

kde:

T je počet stanovení;

N je počet měřených délek nadzemních částí rostlin na jedno stanovení.

Významný rozdíl (Significant difference) SD v mm:

$$SD = t \times SE = 2,02 \times 4,54 = 9,18$$

Kde:

t je tabelovaná hodnota z dunettovy tabulky, viz příloha 2 [66].

PŘÍLOHA 4 PŘÍKLAD VÝPOČTU STATISTICKÝCH DAT II

Příklad výpočtu statistických dat podle Dunnettova t -testu pro screeningový test klíčivosti salátu (*Lactuca sativa*).

Počet stupňů volnosti (v):

$$v = \text{počet stanovení} \times (\text{počet měřených rostlin} - 1) = 2 \times (30 - 1) = 58$$

$$S^2 = \frac{\sum x_i^2 - n \sum x_j^2}{v} = \frac{2024 - 75,6116}{58} = 33,5929$$

$$S = \sqrt{33,5929} = 5,7959$$

kde:

$\sum x_i^2$ je součet druhých mocnin jednotlivých délek kořene;

$n \sum x_j^2$ je počet stanovení x součet druhých mocnin průměrných délek kořene.

Směrodatná chyba (Standard error) SE:

$$SE = S \times \sqrt{\frac{T - 1}{N}} = 5,7959 \times \sqrt{\frac{2 - 1}{30}} = 1,0582$$

kde:

T je počet stanovení;

N je počet měřených délek nadzemních částí rostlin na jedno stanovení.

Významný rozdíl (Significant difference) SD v mm:

$$SD = t \times SE = 2 \times 1,0582 = 2,1164$$

Kde:

t je tabelovaná hodnota z dunettovy tabulky, viz příloha 2 [66].