

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

VÝZNAM KONTAKTNÍCH TESTŮ EKOTOXICITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

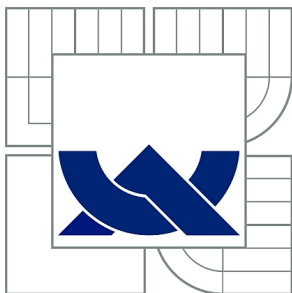
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

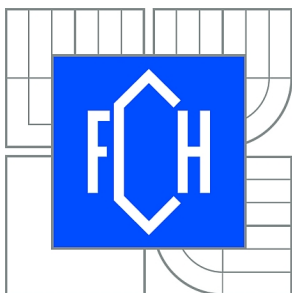
PAVLÍNA ŠKARKOVÁ

BRNO 2010



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

VÝZNAM KONTAKTNÍCH TESTŮ EKOTOXICITY

IMPORTANCE OF CONTACT TESTS OF ECOTOXICITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PAVLÍNA ŠKARKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0480/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Pavčina Škarková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	MVDr. Helena Zlámálová Gargošová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Význam kontaktních testů ekotoxicity

Zadání bakalářské práce:

Práce bude teoretického charakteru založená na studiu literárních zdrojů

Bude zpracována literární rešerše zabývající se charakteristikou, využitím a významem kontaktních testů ekotoxicity. Na základě získaných poznatků bude posouzena vhodnost využití těchto testů, pro hodnocení ekotoxicity pevných matric jako jsou odpady, rekultivační materiály kontaminované půdy a jiné.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

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

Pavčina Škarková
Student(ka)

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

Doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá kontaktními testy ekotoxicity a jejich významem pro testování pevných matric jako jsou odpady, kontaminované půdy aj. Ekotoxicita těchto materiálů je podle požadavků současné legislativy hodnocena pouze na základě výsledků získaných testováním jejich vodných výluhů. V práci je diskutována nutnost zařazení kontaktních testů ekotoxicity do povinné baterie testů pro pevné matrice, neboť stávající sada testů je relevantní pouze pro vodní ekosystém a neumožňuje dostatečnou predikci případných ekotoxikologických dopadů na ekosystém terestrický.

ABSTRACT

This bachelor thesis is dealing with an issue of contact tests of ecotoxicity and their importance for solid matrices testing as wastes, contaminated soil etc. According to the requirements of current legislative, ecotoxicity of these materials is evaluated only for results obtained with testing their water leach. Need of insertion ecotoxicity contact tests into mandatory set of tests is discussed in thesis, because current set of tests is relevant only for water ecosystem and does not support sufficient prediction for eventual ecotoxicologic impacts for terrestrial ecosystem.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxicita, kontaktní testy, alternativní testy

KEYWORDS

ecotoxicity, contact tests, alternative tests

ŠKARKOVÁ, P. *Význam kontaktních testů ekotoxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 40 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou 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

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své rodině za pevné nervy a MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D za cenné rady, dobré připomínky a velmi vstřícný přístup.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 EKOTOXIKOLOGIE A EKOTOXICITA	8
2.1 Ekotoxikologie	8
2.2 Ekotoxicita	8
3 TESTY EKOTOXICITY	9
3.1 Definice testu ekotoxicity	9
3.2 Základní rozdělení testů ekotoxicity	9
3.2.1 Standardní testy	9
3.2.2 Alternativní testy	9
3.2.3 Akvatické testy	10
3.2.4 Terestické testy	10
3.3 Další dělení testů ekotoxicity	10
3.3.1 Doba expozice.	10
3.3.2 Testovací uspořádání.	11
3.3.3 Testovaná matrice.	11
3.3.4 Spektrum testovacích organismů.	11
3.3.5 Typ testovaného vzorku.	11
3.3.6 Způsob přípravy testovaného vzorku.	11
3.3.7 Způsob vyhodnocení.	11
3.3.8 Trofická úroveň testovacích organismů.	12
3.3.9 Pokročilost designu testovacího systému, tzv. generace testů.	12
3.4 Testy in vitro a in situ	12
3.5 Vhodná volba testu	13
3.5.1 Testy chemických látek	13
3.5.2 Testy odpadů	13
3.6 Vyhodnocení testu	14
3.7 Baterie testů	15
4 KONTAKTNÍ TESTY	16
4.1 End-points	16
4.2 Optimální vlastnosti kontaktních testů	17
4.3 Prostředí kontaktních testů	17
4.4 Způsoby aplikace	17
4.5 Volba vhodných organismů	18
4.6 Testy OECD	22
4.6.1 Test akutní toxicity žížal OECD 207	22
4.6.2 Test s vyššími rostlinami: Test klíčivosti a růstu sazenic OECD 208 a Test s vyššími rostlinami: Test vitality rostlin OECD 227	23
4.6.3 Půdní mikroorganismy, Test na transformaci dusíku OECD 216	23
4.6.4 Půdní mikroorganismy, Test na transformaci uhlíku OECD 217	24
4.6.5 Test na reprodukci rouspic OECD 220	24
4.6.6 Test na reprodukci žížal OECD 222	24
4.6.7 Test reprodukce roztočů OECD 226	24
4.6.8 Test reprodukce chvostoskoků v půdě OECD 232	24
4.7 Testy ISO	25

4.8	Testy US EPA	26
4.9	Půdní ekotoxikologie	26
4.10	Ekotoxikologie odpadů	27
4.11	Současné trendy v ekotoxikologických biotestech	28
4.12	Legislativní rámec ČR	28
5	ZÁVĚR	30
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	31
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	40

1 ÚVOD

Dnešní doba je dobou globálních environmentálních problémů, jedním z nich je i velká produkce odpadů. Produkce odpadů každoročně stoupá a je tedy snahou všech vyspělých zemí tento problém řešit. Řešením by měla být minimalizace jejich vzniku. To je však velice utopickým cílem pro dnešní konzumní společnost. Snahou států by tedy mělo být hlavně správně odpad klasifikovat, posoudit jeho nebezpečnost, maximalizovat jeho potenciální využití a minimalizovat dopady na životní prostředí. Nebezpečnost odpadů se klasifikuje dle základních čtrnácti bodů uvedených v platné legislativě, kde vlastnost ekotoxická odpadů H14 je posuzována dle výsledků čtyř standardních testů, tyto testy však pracují pouze s vodným výluhem pevného odpadu, takže posouzení jeho ekotoxicity může být nedostatečné. Může tedy docházet k podcenění ekotoxicity odpadů, ty jsou poté skládkovány na skládkách pro komunální odpady a nezachází se s nimi jako s odpady nebezpečnými a může dojít k velice těžko a ekonomicky nákladně napravitelným škodám na životní prostředí. Problém může být samozřejmě i opačný, kdy se většinou se sedimenty zachází jako s nebezpečnými odpady a nedochází tak k jejich znovuvyužití. Posouzení ekotoxických dopadů pevných matric, kterými odpady jsou, na ekosystém umožňují testy, ve kterých je testovaný organismus v přímém kontaktu s testovanou matricí. Zakotvení kontaktních testů v české legislativě by tedy mělo vést k správnému hodnocení nebezpečnosti odpadů dle kritéria H14.

Testy kontaktní jsou zmíněny pouze ve vyhlášce č. 389/2005 Sb. v příloze č. 2, kde je poukázáno na Test akutní toxicity na žížalách a Metodu pro stanovení aktivity půdních organismů při transformaci dusíku a Metodu pro stanovení aktivity půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Tyto testy však nepatří do povinné baterie testů ekotoxicity, jimiž se prokazuje nebezpečná vlastnost H14.

Ekotoxická pevných matric, není samozřejmě hodnocena pouze u odpadů, ale dalším důležitým místem, kde chybí kontaktní testy, je obor půdní ekotoxikologie. Tento obor je v dnešní době také nepřehlédnutelným, protože půdy jakožto média přibývá pouze asi 1cm³ za 200 až 1000 let, přičemž je půda základním stavebním kamenem terestrických ekosystémů. Cílem tohoto vědního oboru je jak chránit půdu a její kvalitu, tak biotu v ní žijící. To je možné díky testům toxicity prováděných na půdní biotě, na základě výsledků se půda posuzuje a může být např. sanována. Při testování pomocí biotestů je snaha o ekologickou relevanci a co nejrealnější expoziční cestu, to je možné pouze pomocí kontaktních půdních biotestů.

Tyto testy mají však mnohem širší využití, důležité jsou i při hodnocení nově připravených i již existujících chemických látek, při hodnocení pesticidů a přípravků na ochranu rostlin, kalů z ČOV (čistírna odpadních vod), sedimentů, popílků, hnojiv a mnoho jiných látek do půd vstupujících [1,2,3,4,5].

2 EKOTOXIKOLOGIE A EKOTOXICITA

2.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie byla poprvé definovaná okolo roku 1969 členem francouzské akademie věd Dr. Rene Truhautem a to jako oblast toxikologie věnující se studiu toxických účinků vyvolaných přírodními a syntetickými polutanty na složky ekosystémů – živočichy, rostlinstvo a mikroorganismy.

V dnešní době je ekotoxikologie definována jako multidisciplinární věda, integrující toxikologii, chemii životního prostředí a ekologii. Zabývá se analýzou a porozuměním vlivu chemických látek na všechny biologické úrovně živé přírody. Její hlavní cíle jsou ochrana živé přírody a člověka jako její integrální součásti, analýza a pochopení přímých a nepřímých účinků chemikálií na všechny biologické úrovně ekosystému, studium a hodnocení (škodlivých) účinků chemických látek, prevence poškození a ohrožení ekosystémů, předpověď a odhady škodlivosti chemikálií, předpověď a odhad rizik spojených s životním cyklem chemikálií a vývoj praktických nástrojů pro odhady škodlivosti a rizik [2,3].

2.2 Ekotoxicita

Ekotoxicita je nebezpečná vlastnost, kterou mohou vykazovat chemické látky, přípravky, pesticidy, hnojiva, léčiva v životním prostředí, odpady. Je to především jejich toxické působení na životní prostředí nebo na živé organismy.

Ekotoxicita jako vlastnost H14 je definována ve vyhlášce č. 376/2001 Sb. ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb., což je Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.

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 zde alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus pro tyto hodnoty: $LC (EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$

- a) *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod.).
- b) *Daphnia magna* (doba působení 48 hod.).
- c) *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* (doba působení 72 hod.).
- d) Semeno *Sinapis alba* (doba působení 72 hod.).

Pro hodnocení vlastnosti H14 ekotoxicita se používají tyto standardní metody:

- ČSN EN ISO 6341

Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)
Zkouška akutní toxicity.

- ČSN EN 28692

Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum*.

- ČSN EN ISO 7346-2

Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydaniorerio Hamilton-Buchanan* (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] - část 2: Obnovovací metoda.

- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapsi salba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů [4,6,7,8].

3 TESTY EKOTOXICITY

3.1 Definice testu ekotoxicity

Biotest nazývaný také jako bioassay je definován jako „zkouška“ využívající biologický systém, který zahrnuje expozici organismu testovaným materiálem a stanovuje jeho odpověď.

Principem biotestu je kontakt (akutní, chronický apod.) testované látky, směsného či přírodního vzorku za určitých, předem definovaných a kontrolovatelných podmínek s detekčním systémem (zkušebním organismem, tkání, populací, společenstvem apod.). Z jeho reakce potom lze usoudit, zda testovaná látka je toxická, zda vzorek vody obsahuje využitelné živiny, zda je za těchto podmínek sledovaná substance rozložitelná atd.

Biotest většinou nemůže podat informaci, která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku, to je vyhrazeno až chemické analýze, může však velmi jednoduše a rychle říci, zda je či není ve vzorku biologicky aktivní.

Biotest lze definovat jako proces, při němž je testovací systém jako tkáň, organismus či populace exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku [9,10,11].

3.2 Základní rozdělení testů ekotoxicity

Základní rozdělení testů ekotoxicky dle legislativy je na testy standardní versus alternativní a dále pak na testy pracující s vodným výluhem tzv. akvatické versus testy kontaktní neboli terestické.

3.2.1 Standardní testy

Standardní testy jsou testy, jež jsou plně validovány naší legislativou a slouží k vyhodnocení vlastností ekotoxicity dle vyhlášky č. 502/2004 Sb. Výhody těchto testů jsou, že metodiky testů jsou jednotné a porovnatelné s předchozími výsledky v té stejné i v dalších laboratořích, výsledky jsou dobře akceptovatelné pro regulační orgány. Jejich vývoj a optimalizace byly už provedeny. Tyto metody poskytují základ, na němž se dá dále stavět a který se dá případně modifikovat. Obsahují detailní seznam použitých přístrojů, medií, modelových organismů atd. Jsou u nich plně popsány experimentální, analytické a dokumentační postupy. Velkou nevýhodou je že, bývají často příliš specifické, těžko aplikovatelné pro jiné situace nebo k odpovědi dalších otázek. Bývají používány v nevhodných situacích (výzkum, hodnocení příčiny a účinku) a nemusí být aplikovatelné do reálného prostředí.

3.2.2 Alternativní testy

Alternativní testy jsou testy, jejichž postupy nejsou validovány naší legislativou. Tyto testy mají mnoho výhod, především ekonomické, můžeme použít širokou škálu testovaných organismů. Využívají klidových stádií organismů, vajíčka, cysty atd., což znamená, že nevyžadují udržování a kultivaci matečných kultur. Nahrazují používání organismů pro testy toxicity (in vitro tkáň ryb), šetří laboratorní a kultivační prostor, vyžadují jen malé objemy vzorků, proto se jim někdy říká miniaturizované testy.

Nejpoužívanějšími alternativními testy jsou např. Rototoxkit s vířníkem *Brachionus calyciflorus*, Thamnotoxkit s korýšem *Thamnocephalus platyurus*, Daphtoxkit s korýšem *Daphnia pulex* a *Daphnia magna*.

3.2.3 Akvatické testy

Tyto testy pracují s vodným výluhem testované látky nebo matrice, která může být ve stavu pevném nebo kapalném nebo s připraveným roztokem látky, koncentrační řadou. Výluh se často připravuje z pevných látek, jako jsou odpady, sedimenty, zeminy, kaly, popílky, komposty, stavební sutě apod., anebo z kapalných látek jako pesticidy, průmyslové chemikálie, odpadní vody atd. Veškeré sledované biochemické pochody se v akvatických testech dějí cestou přímého kontaktu organismu s tímto výluhem. Nejčastěji se jedná o absorpci látek do organismů z vodního prostředí. Cesta absorpcí není jedinou možnou vstupní bránou toxikantu do vodních organismů, škodlivé látky mohou vstupovat do těla prostřednictvím trávicího traktu.

3.2.4 Terestrické testy

Terestrické neboli kontaktní testy nepracují s vodným výluhem, ale přímo s námi zkoumaným pevným materiálem (odpady, kaly, popílky, komposty, stavební sutě...). Pokud pevná matrice obsahuje nebezpečné a toxické látky, které však nejsou ve vodě rozpustné jako např. PAU (polyaromatické uhlovodíky), PCB (polychlorované bifenylly) a mnoho dalších persistentních organických polutantů, můžeme jejich obsah dokázat právě použitím kontaktních testů. Tyto testy jsou již běžně zmiňovány v normách US EPA (United States Environmental Protection Agency; Agentura Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí), ISO (International Organisation for Standardization; Mezinárodní organizace pro standardizaci), OECD (Organization for Economic Cooperation and Development; Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) a jiných organizací, v české legislativě jsou zatím obsaženy pouze tři kontaktní testy a to v příloze č. 2 ve vyhlášce č. 389/2005 Sb. [1,5,7,8,9,10,11,12].

3.3 Další dělení testů ekotoxicity

Testy ekotoxicity je možné dělit i podle mnoha dalších hledisek, zde jsou uvedena ta nejčastěji používaná.

3.3.1 Doba expozice.

Testy akutní toxicity jsou testy, jež sledují účinek projevující se okamžitě nebo ve velice krátkém čase (hodiny) a to po jednorázové podání vyšší dávky. Charakterizace hodnotami LD50 a LC50.

Testy subchronické (subakutní) toxicity, jejich cílem je zjistit kumulativní vlastnosti látek, pracují v rozmezí 28 – 90 dnů, po tuto dobu je podáváno obvykle jednou denně velice malá dávka.

Testy na chronickou toxicitu, pracují v dlouhé časové expozici nízkých dávek, a to v čase delším obvykle jak tři měsíce.

3.3.2 Testovací uspořádání.

Testy ekotoxicky mohou být různě uspořádány, uspořádání závisí na mnoha faktorech, testy statické, kdy vodný výluh během testu neobnovujeme, semistatické, kdy vodný výluh obnovujeme po 24 hodinách a testy průtočné, kdy je výluh neustále obnovován.

3.3.3 Testovaná matrice.

V životním prostředí se vyskytuje celá řada matric, jejich základní rozdělení je na abiotické a biotické matrice. Abiotická matrice je charakterizována fyzikálními a chemickými parametry. Označuje se také jako tzv. složka neživé, voda, půda atp. Spolu s biotickou matricí tvoří ekosystém. Biotické matrice jsou rostliny a živočichové. Testované matrice jsou zejména voda, půda, vzduch, sediment, odpad nebo chemická látka.

3.3.4 Spektrum testovacích organismů.

Podle spektra testovacích organismů, jež použijeme, se jedná o testy jednodruhové tzv. Single species, kde je testován pouze jeden druh organismu. Nebo o testy vícedruhové tzv. Multi Species, kde je zkoumáno více druhů organismů, jsou to testy s přírodními populacemi i laboratorními směsmi kultur.

3.3.5 Typ testovaného vzorku.

Testovaný vzorek může být čistá chemická látka nebo směs chemických látek. U čisté chemické látky jsou důležité její základní fyzikální vlastnosti, zda se jedná o látku hydrofilní, hydrofobní nebo těkavou. U směsi chemických látek je podstatné, zda se jedná o směs se složením známým či neznámým. Směs chemických látek se složením neznámým je většinou vzorek přírodní matrice, u kterého je složitější interpretace, protože v něm dochází k neznámým interakcím.

3.3.6 Způsob přípravy testovaného vzorku.

Podle toho jak byl vzorek připraven, se může jednat o test vzorku s definovanou koncentrací, jež byl připraven v laboratoři a má přesně definovanou koncentraci chemických látek nebo o testování výluhu vzorků přírodní matrice, používá se např. extrakce organickými rozpouštědly, DMSO (dimethylsulfoxid), vodou, různých hodnot pH či teploty, kde přesnou koncentraci chemických látek neznáme. Nebo se může jednat o vzorek, který byl získán prostřednictvím semipermeabilní membrány.

3.3.7 Způsob vyhodnocení.

Výsledkem testů ekotoxicky jsou různé efekty na testovacích organismech. Mezi nejčastěji sledované efekty jsou řazeny:

Letální efekty, sem náleží mortalita a imobilizaci organismů.

Subletální efekty, to jsou efekty na chování organismů, např. rychlost pohybu jedince.

Hodnocena je také fyziologická aktivita, fotosyntetické asimilace, enzymatická aktivita, efekty na membránách. Dále pak přírůstky, u rostlin délka kořene, u živočichů počet buněk v populaci nebo hmotnost organismu, náchylnost k napadení chorobami, škůdci či parazity.

Genotoxické efekty, což jsou efekty na genetický materiál např. mutageneze, teratogeneze.

Sledována může být dále např. reprodukční aktivita, malformace.

3.3.8 Trofická úroveň testovacích organismů.

Baterie testů ekotoxicky by měla pokrývat tři základní úrovně organismů. Řadíme sem producenty, autotrofní organismy, jež pomocí fotosyntézy produkují novou organickou hmotu a kyslík, jsou to tedy testy na rostlinách a řasách. Konzumenty, což jsou heterotrofní organismy, které spotřebovávají kyslík a organické látky vyrobené producenty a uvolňují oxid uhličitý, tedy nezelené rostliny a většina živočichů. A destruenti, heterotrofní organismy, které rozkládají odumírající biomasu zpět na původní minerální látky, zejména oxid uhličitý a vodu a přitom syntetizují i novou organickou hmotu z vlastních těl. Jsou to především houby, mikroorganismy, hmyz a plísně.

3.3.9 Pokročilost designu testovacího systému, tzv. generace testů.

Biotesty 1. generace jsou klasické (standardní) testy, jejich postupy jsou validovány, jak mezinárodní tak i legislativou ČR, bývají značně neekonomické.

Biotesty 2. generace jsou mikrobiotesty, což jsou alternativní biotesty, které se stále více využívají, jsou výhodné tím, že můžeme použít širokou škálu testovacích organismů. Využívají klidových stádií, což znamená, že nevyžadují udržování a kultivaci matečných kultur. Nahrazují používání zvířat pro testy toxicity (in vitro tkáň ryb), šetří laboratorní a kultivační prostor, vyžadují jen malé objemy vzorků. Nevýhody spočívají především v tom, že nejsou jejich postupy validovány legislativou ČR.

Biotesty 3. generace jsou biosenzory, biosondy a biomarkery. Jsou to nové testy, jejichž vývoj postupuje, jsou založeny na využívání fluorescenčního záření toxické látky.

Biotesty 4. generace jsou on-line systémy s dálkovým přenosem dat, jsou zcela nové a ve vývoji [6,8,9,10,11].

3.4 Testy in vitro a in situ

Testy in vitro, neboli laboratorní testy, sem patří testy jak standardní tak alternativní, dále pak testy procesů bioakumulace, biodegradability a testy orgánové toxicity s laboratorními zvířaty. Výhody testu in vitro jsou, že jsou standardizované, srovnatelné a legislativně ukotvené, nevýhodou je, že jsou vzdáleny přírodním podmínkám, důležitá je tedy správná interpretace dat.

Testy in situ jsou testy, kde jsou použity experimentální mikro a mezokosmy, ale také samozřejmě polní studie. Jsou nesrovnatelně náročnější, jak časově tak fyzicky, ale jsou mnohem realističtější. Zde je ovšem potřeba povolení pro práci v přírodních ekosystémech, kde hrozí nebezpečí vandalizmu.

Testy in situ, jsou tedy tzv. terénní studie, kde dochází k intergaci toxických vlivů, lze sledovat dlouhodobou expozici, negativní však je, že je zde mnoho neznámých faktorů a je tedy problematická interpretace dat. Další nevýhodou terénních studií je, že nelze často dobře odlišit efekt polutantu od přirozených fluktuací, které jsou způsobeny abiotickými i biotickými faktory, proto by k designu terénních studií měla vždy patřit odpovídající kontrola. Jednat se tedy může o studii synchronní, kdy je lokalita znečištěná a neznečištěná. Nebo studii diachronní, kdy je srovnávána stejná lokalita před a po znečištění a jedná se tedy o její sledování v čase [9,11,13].

3.5 Vhodná volba testu

3.5.1 Testy chemických látek

Limitní test

Test pro zjištění reakce testovaných organismů na koncentraci 100 mg/l. Pokud je test negativní, další testy se nevyžadují.

Předběžný test

Tento test se provádí, pokud je limitní test pozitivní. Na test se používá malé množství organismů, provádí se v širokém rozpětí koncentrací testované látky a to od koncentrací 0,01 mg/l až po 100 mg/l. Na základě výsledků tohoto testu se volí užší rozsah koncentrací s předpokládaným účinkem pro základní test.

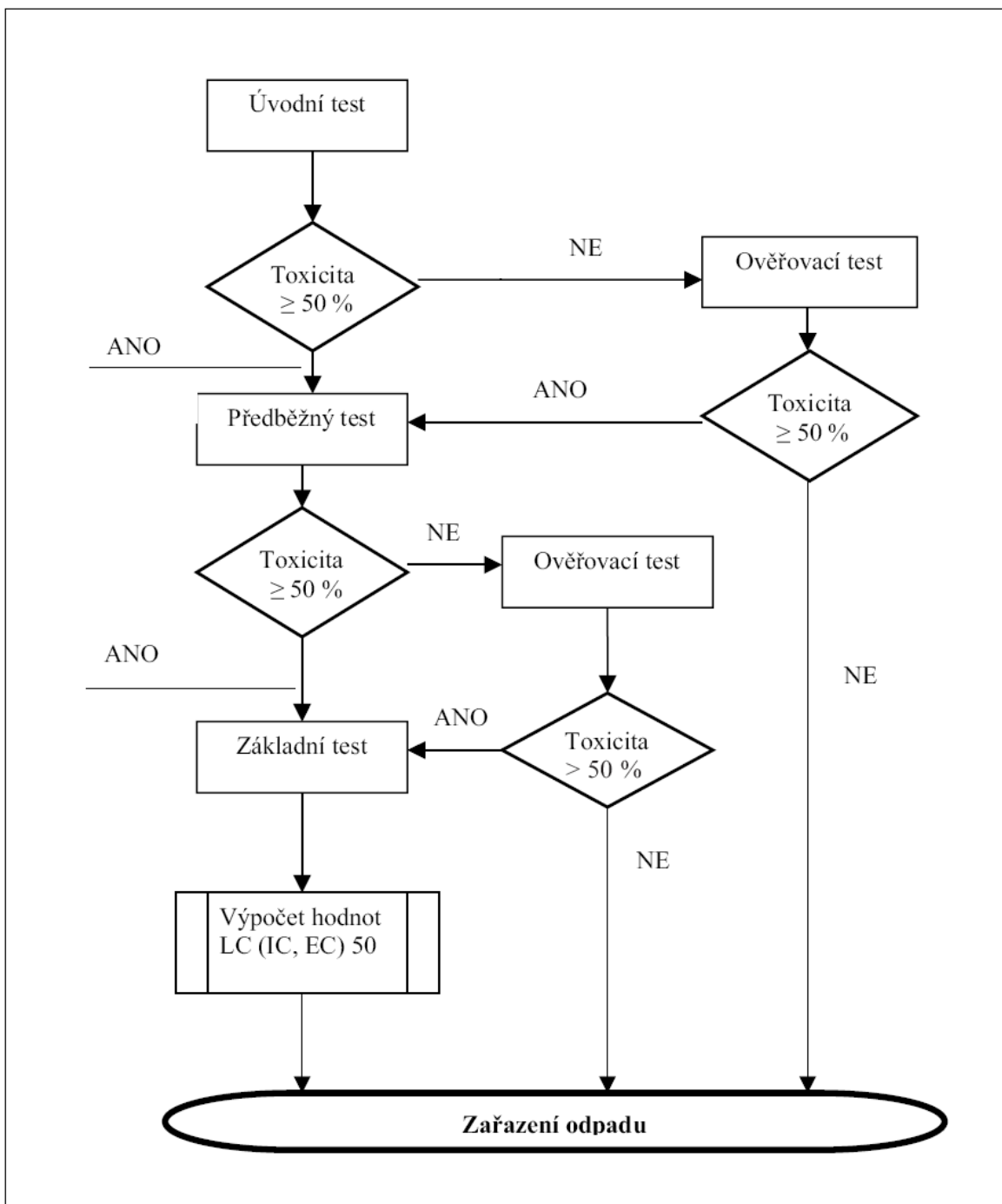
Základní test

Tento test se provádí v očekávaném rozsahu působení, který nám udává předběžný test. Výsledkem tohoto testu jsou hodnoty LC (IC, EC) 50 [6,16].

3.5.2 Testy odpadů

Testy ekotoxicity jsou zahájeny **úvodním testem**. Tento test slouží pro odhad ekotoxicity neředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) na testovací organismus. Do testu se nasazují organismy v počtech, odpovídajících požadavkům pro předběžné testy daným metodikami pro jednotlivé testovací organismy. Pokud je v tomto testu toxický účinek pro ≥ 50 % testovacích organismů, je proveden **předběžný test**, ten slouží k vyhledání intervalu koncentrací ředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) pro provedení základního testu ekotoxicity. Za vhodně zvolenou koncentrační radu vodného výluhu pro předběžný test se považuje řada zahrnující koncentrace s toxickým účinkem pro 0 – 100 % testovacích organismů. **Základní test** je naplánován na základě výsledku předběžného testu. Tento test slouží ke stanovení hodnoty LC (EC, IC) 50. Vyplyne-li však z výsledku předběžného testu, že základním testem nebude možno stanovit hodnotu LC (EC, IC) 50, je proveden **ověřovací test**. V ostatních případech slouží výsledky předběžného testu pro stanovení rozsahu koncentrací pro test základní. V každém testu se nasazuje rovněž kontrola s počtem organismů, odpovídajícím metodice daného testu.

Zařazení odpadu na základě výsledku ekotoxikologických testů pro využití na povrchu terénu se pak provede podle postupu, který je uveden v Metodickém pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů [6,14,15].



Obr.1 Postupový diagram testu k hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita [14].

3.6 Vyhodnocení testu

Nejčastějšími výstupy testů ekotoxicity jsou hodnoty:

LD50 – smrtelná dávka pro 50 % pokusných jedinců

LC50 - smrtelná koncentrace pro 50 % pokusných jedinců

ED50 – efektivní dávka, při které reaguje 50 % pokusných jedinců

EC50 - efektivní koncentrace, při které reaguje 50 % pokusných jedinců

ID50 – dávka, která způsobí inhibici růstu pro 50 % pokusných jedinců

IC50 – koncentrace, která způsobí inhibici růstu pro 50 % pokusných jedinců

V praxi se používají dávky ED (LD, ID) i pro hodnoty jiné než 50 % jedinců, např. LD10 je smrtelná dávka pro 10 % testovaných jedinců.

LOEC – z anglického Lowest Observed Effect Concentration.

Odpovídá nejnižší testované koncentraci, ve které již došlo k inhibičnímu efektu.

NOEC – z anglického No Observed Effect Concentration.

Odpovídá nejvyšší konkrétní zkoušené koncentraci vzorku, u které ještě nedošlo k inhibičnímu efektu. Hodnota NOEC odpovídá zkoušené koncentraci bezprostředně pod hodnotou LOEC.

Pro standardní testy ekotoxicity vyplývající z vyhlášky č. 502/2004 Sb. jsou tyto hodnoty vztažené na jednotlivé testy, dle Metodického pokynu odboru odpadů pro stanovení ekotoxicity odpadů:

EC 50 - koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50% úhyn nebo inhibici pohyblivosti (imobilizaci) perlooček (*Daphnia magna*) ve srovnání s kontrolou v podmínkách určených jednotlivými metodikami testu v [ml.l⁻¹].

IC 50 - koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50% inhibici růstu nebo růstové rychlosti rasové kultury nebo 50% inhibici růstu kořene semen *Sinapis alba* ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku v podmínkách určených jednotlivými metodikami testu v [ml.l⁻¹].

LC 50 – koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku [4,6,15].

3.7 Baterie testů

Jelikož odezva organismů není na působení toxických látek stejná, je doporučeno používat sadu ekotoxikologických testů. Odezva každého organismů je jiná, protože je mnoho faktorů ovlivňujících reakci organismu. Jsou to zejména biologická dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost škodlivou látku odbourávat.

Cílem každé ekotoxikologické studie je získání, co nejkomplexnější informace o toxickém působení toxikantu na živé organismy, používá se tedy více druhů testovaných organismů, přičemž by měly být zástupci všech trofických úrovní. Do baterie jsou vybírány individuální testy tak, aby pokryly co nejvíce skupin toxikantů s vysokou spolehlivostí.

Používají se základní a rozšířené sady ekotoxikologických biotestů. Při hodnocení ekologických rizik je nutné použít testy toxicity na organismech tří trofických úrovní producent, konzument a destruent. Do sady analýz je také nutné vybírat testy, které jsou schopny testovat jak kapalně, tak i pevně vzorky (sedimenty, půda) [1,6,11,16].

4 KONTAKTNÍ TESTY

Kontaktní neboli terestrické testy nepracují s vodným výluhem, ale přímo se zkoumaným pevným materiálem (odpady, kaly, popílky, komposty, stavební sutě...).

Je samozřejmé, že pokud pevná matrice obsahuje nebezpečné a toxické látky, které však nejsou ve vodě rozpustné (PAU, PCB a mnoho další persistentních organických polutantů), nevypovídají výsledky akvatických testů ekotoxicity o reálné toxicitě materiálu, ale pouze o ekotoxicitě vodného výluhu.

Cílem studie [1], která vznikla v České republice, zabývající se problematikou využití kontaktních testů toxicity, bylo porovnat toxicitu daných pevných matric (různé typy pevných odpadů a kontaminovaných zemin), kde byly testovány jak vzorky obsahující hydrofobní, tak hydrofilní kontaminanty, tak vzorky s anorganickými a organickými látkami. Většina testovaných vzorků odpadů by určitě poškozovala životní prostředí, ale dle stávajícího hodnocení pomocí akvatických testů jsou definovány jako ne příliš toxické a ve většině případů by vyhovovaly pro ukládání odpadů na skládky. Přitom výsledky terestrických testů vykazovaly vysoké nebezpečí pro životní prostředí. Akvatické testy totiž nemohou postihnout toxicitu látek ve vodě málo rozpustných látek. Ve vodě nerozpustné látky, které odpady mohou obsahovat, se po delší době díky přírodním procesům mohou dostat do potravního řetězce a ohrozit i člověka. Velice závažným příkladem jsou hydrofobní organické látky typu PAU či chlorovaných pesticidů. Využitím terestrických testů je z tohoto důvodu velmi významné.

Mnoho prací, které porovnávaly testy ekotoxicity kontaktní s akvatickými prostřednictvím různě kontaminovaných pevných vzorků, vzniklo i v řadách světových odborníků [18,19,20]. Tyto práce dochází k závěrům, že prostřednictvím akvatických testů nelze získat zcela relevantní výsledky, které by vypovídaly o skutečném environmentálním nebezpečí testované matrice. A že ani pouhá chemická analýza není pro predikci účinků na ekosystém dostačující a biotesty jsou při posuzování ekotoxicity nenahraditelné, což je všemi odborníky uznaný názor. Dále data získaná v práci [19] ukazují, že výluhy odpadů mají reprezentativní výsledky jen pro krátkodobé testy zaměřené na mortalitu, při zjišťování chronické ekotoxicity jsou zcela irelevantní [1,11,17,18,19,20].

4.1 End-points

End-points (konečný stav) jsou změny organismů, které jsou v daném testu sledovány. Dříve byla nejčastějším end-pointem mortalita, avšak sledování pouze jí, je nedostatečné a sledují se i další změny na zkoumaných organismech.

- změny reprodukční schopnosti, reprodukční „rituály“ (hloubení jamek)
- mutagenita, teratogenita, karcinogenita
- změny metabolismu (nitrifikační potenciál, apod.)
- změny luminiscence
- změny respirace
- behaviorální změny (vertikální pohyb, norování)
- malformace (tuhnutí části těla, otoky apod.)
- neurotoxicita
- změny v chování jedinců
- fyziologické změny
- snížení imunity

- aktivity enzymů
- biochemické markery
- genotoxicita [13,16,18].

4.2 Optimální vlastnosti kontaktních testů

Základními vlastnostmi dobrého testu by měla být standardizovatelnost, opakovatelnost, variabilita. Záleží také na ekonomické stránce, tedy na praktické proveditelnosti, ceně a rychlosti. Test by měl být dostatečně citlivý. Důležitá je i jeho vypovídající hodnota a použitelnost na ochranu životního prostředí.

Figuruje zde i pojem ekologická relevance, který znamená, že test má respektovat ekologii organismu, sledované odpovědi by měly být ekologicky relevantní a indikovat stav a funkci organismu (přežití, růst, reprodukce, přijímání potravy a mobilita). Expoziční cesty, biodostupnost a koncentrace by měly napodobovat reálné.

Vzhledem ke stavu v poznání v ekotoxikologii a vzhledem k praxi v některých jiných zemích, byly definovány tyto problémy pro stávající sady testů ekotoxicity pro pevné vzorky. Z ekologického hlediska je sada standardních testů vyžadovaných stávající legislativou relevantní pouze pro vodní ekosystémy. Je nevhodná pro odhady rizik půdních ekosystémů. Sada těchto testů testuje přenesenou vlastnost (toxicitu výluhu) a nikoliv vzorek samotný a nehodnotí toxicitu látek ve vodě nerozpustných. Představa, že toxická je pouze látka ve vodě rozpustná, není správná [13,16,17].

4.3 Prostředí kontaktních testů

Terestrické testy se mohou provádět v prostředí umělé půdy ta je uměle připravená nebo v prostředí reálné půdy.

Složení umělé půdy je přesně definováno, tato půda obsahuje 10 % suché a jemně namleté rašeliny, 20 % kaolinitového jílu obsahující minimálně 30% kolinitu, 70 % jemného křemenného písku a 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého.

Reálná půda je tzv. LUF standardní půda. Těchto půd je několik variant, číselně označených, lze si je koupit. Mají přesně definované složení a pH, důležitá je tedy správná volba vhodné LUFY pro zvolený záměr [16].

4.4 Způsoby aplikace

Organismy mohou být toxickou látkou exponovány několika cestami; přímým kontaktem povrchu těla – dermálně, prostřednictvím potravy – ingescí a orálním vstupem nebo dýcháním, což je velice málo probádaná oblast.

Ingesce a orální vstup – tento vstup je charakteristický pro organismy konzumující půdní částice, minerální a organickou hmotu v půdě. Jedná se tedy o významnou expoziční cestu pro sorbované látky. Dochází také k tomu, že kontaminanty mohou být koncentrovány, např. akumulací v houbách, které konzumují chvostoskoci. Tato cesta je velice významná pro členovce.

Dermální vstup – prostřednictvím tělní stěny dochází k přestupu látek kontaminantů z půdy nebo z pórové vody přes tělní stěnu. Organismy vrtající v půdě, hlavně tedy žížaly a roupice, dále pak organismy s tenkou kutikulou [13,16].

4.5 Volba vhodných organismů

Pro každý test ekotoxicity je velice důležitý výběr vhodných organismů, to platí jak pro testy akvatické, tak pro testy terestrické. Protože každý druh organismu je vůči testované látce jinak citlivý a zastupuje určitou trofickou úroveň. Následuje přehled nejčastěji využívaných organismů v terestrických testech ekotoxicity, včetně stručného popisu výhod a nevýhod, které jsou s použitím těchto druhů spojeny.

Žížaly

Žížaly jsou nejvíce a nejdéle využívaný představitel půdní fauny, jsou typickým geobiontem tzn., že jejich vývojový cyklus probíhá celý v půdě. Jsou to makrokoncentrátoři, což znamená, že mají výrazné bioakumulační a biokoncentrační schopnosti. Mají výrazný podíl na tvorbě půdy a dekompoziční činnosti.

Nejpoužívanější druhy:

Žížala hnojní (*Eisenia fetida*), výhodou je snadná kultivace velkých počtů, krátký životní cyklus, jedná se o standardní druh. Nevýhodou této žížaly je značný nárok na prostor a čas (Obr. 2).

Žížala obecná (*Lumbricus terrestris*)

Existuje celá řada testů ekotoxicity na žížalách, dle norem ISO (ISO 11268-1-3), OECD (OECD 207,222) a US EPA (US EPA 850.6200) jsou uvedeny v tabulkách 1,2 a 3. Test toxicity na žížalách je v české legislativě ukotven v příloze číslo 2 Vyhlášky 222/2004 Sb. ve znění Vyhlášky 389/2005 Sb., tento předpis vychází z normy OECD 207.1984. Žížaly jsou velmi často používaným testovacím organismem, o čemž svědčí také široké spektrum testů prováděných na nich [27]. Velice důležitý je i výběr druhu žížaly, který je v testu použit, v práci [28] došli k závěrům, že při kontaktním testu (jak na filtračním papíře, tak s umělé půdou) s *Perionyx aexcavatus* a *Eisenia andrei*, je vždy více citlivá na obsah MTBE (methyl tert-butylether) *Perionyx aexcavatus*, dle této práce jsou žížaly velice vhodné ke zkoumání ekotoxicity i jiných těkavých organických sloučenin, a to díky své velice dobré odezvě na zvyšující se koncentraci MTBE ve vzorcích [5,13,16,21,22,23,24,25,26,27,28].



Obr. 2 *Eisenia fetida*.

Roupice

Roupice zastávají podobné funkce jako žížaly a v některých systémech je nahrazují, důležitá je také expozice roupic polutanty v horní vrstvičce půdy, v terénu představují velmi dobrý indikátorový organismus. Testy na roupicích mají oproti žížalám nižší nároky

na prostor, čas a jsou tedy ekonomičtější. Výhodou použití rouspic jakožto modelového organismu v kontaktních testech ekotoxicity je možnost jejich chovu také na agarových půdách.

Používanými druhy jsou především *Enchytraeus albidus* (Obr. 3) a *Cognettia sphagnetorum*.

Testy, které se provádí, jsou Testy na reprodukci rouspic s *Enchytraeus albidus* a *Enchytraeus crypticus* dle ISO 16387:2003 a OECD 220 a Avoidance (únikový) test s *Enchytraeus albidus* [13,16,29,30,31].



Obr. 3 *Enchytraeus albidus*

Chvostoskoci

Chvostoskoci jsou ekotoxikologicky dlouho využívané organismy – první test na filtračním papíře byl již v roce 1956 s DDT (dichlordifenyltrichlorethan). Výhodami jsou, že se jedná o dobře prostudovanou skupinu půdních bezobratlých, jsou ekologicky relevantní, široce rozšířené, abundantní v půdách, lehce vzorkovatelní, lze je chovat v laboratoři, mají relativně rychlý životní cyklus s vysokou reprodukcí.

Nejčastěji užívaným druhem je *Folsomia candida* (Obr. 4), dále to jsou pak *Folsomia fimetaria*, *Isotoma viridis*, *Orchesella quadricellatus*, *Orchesella cincta*.

Provádí se Test inhibice reprodukce chvostoskoků *Folsomia candida* dle ISO 11267:1999 a Test reprodukce chvostoskoků v půdě dle OECD 232.2009 [13,16,32,33].



Obr. 4 *Folsomia candida*

Hlístice

Hlístice jsou nejpočetnější půdní bezobratlí. Jejich nevýhodou je, že jsou vodními organismy žijícími v pórové vodě. Také je u testů s nimi nesnadná extrapolace na reálné podmínky. Výhodami jsou velmi rychlé testy, trvající 24 hodin, protože hlístice mají krátký životní cyklus.

Nejčastěji používané druhy jsou *Caenorhabditis elegant* (Obr. 5), *Panagrellus redivivus*, *Plectus acuminatis*.

Test mortality hlístic *Caenorhabditis elegans* (*Panagrellus redivivus*). Při prodloužení testu na tři dny lze sledovat i genotoxicitu látek, existuje standardní postup dle ASTM (American Society for Testing and Materials; Americká společnost pro zkoušení a materiály) [13,16,34].



Obr. 5 *Caenorhabditis elegant*

Šneci

Šneci patří mezi velice dobré, ale málo známé bioindikátory. Nejčastěji používaným druhem hlemýždě pro stanovení toxicity je *Helix aspersa*. Expoziční cesty jsou dermální (kontaktem s půdou a výluhy), orální (příjmem potravy půdy a rostlin) a dýcháním. Velkou výhodou je dobrý chov v kontrolovaných podmínkách.

Nejznámějším druhem je *Helix aspersa* (Obr. 6) a používají se i zástupci čeledi *Helicidae*.

Test účinků znečišťujících látek na juvenilní pozemní hlemýždě (*Helicidae*): Stanovení účinků na růst v kontaminované půdě dle ISO 15952:2006 [13,16,35].



Obr. 6 *Helix aspersa*

Roztoči

Roztoči jsou vhodné testovací organismy, zastávají řadu potravních typů, jsou to herbivoři, fungivoři, detrivoři a carnivoři. Jsou schopni akumulovat velké množství polutantů

Nejpoužívanějším druhem jsou *Platynothrus peltifer* a *Hypoaspis aculeifer* (Obr. 7), jehož ekologická úloha spočívá v biokontrolě škůdců rostlin, je tedy predátorem především roupic a chvostoskoků.

Provádí se dvoudruhový test toxicity, jehož uspořádání spočívá v tom, že roztoč *Hypoaspis aculeifer* je predátorem chvostoskoka *Folsomia fimetaria* a test dle metodiky OECD 226.2008 Test reprodukce roztočů (*Hypoaspis Aculeifer*) [13,16,36,37].



Obr. 7 *Hypoaspis aculeifer*

Testy s prospěšnými členovci

Existuje pojem "užiteční (prospěšní) členovci", spojen s ochranou před účinkem pesticidů na necílové organismy, například na pavouky, hmyz a roztoče, které jsou přímo prospěšné, neboť v ekosystémech fungují jako predátoři a parazité škůdců.

Existuje skupina IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants; Mezinárodní organizace pro biologickou a integrovanou kontrolu škodlivých živočichů a rostlin), ta připravila cca 30 testů přípravků na ochranu rostlin analýzy rizik ve 3 stupňovém schématu hodnocení rizik a vychází z testů BBA (Biologische Bundesanstalt; Federální biologický ústav pro půdní a lesní hospodářství) a spolupracuje s BART (Benificial Arthropods Registration Testing Group; Testovací skupina pro registraci užitečných členovců).

Používané druhy k testování jsou většinou predátoři: *Lithobius Mutabilis* (Obr.8), *Philonthus cognatus* a zástupci čeledi *Linyphiidae*.

Z nejznámějších testů lze jmenovat Test účinků znečišťujících látek na larvy hmyzu (*Oxythyrea funesta*): Stanovení akutní toxicity dle ISO 20963:2005 a testy účinků pesticidů na pavoučích [13,16,38,39].



Obr. 8 *Lithobius Mutabilis*

4.6 Testy OECD

Společnost OECD je Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, její mandát je velmi široký, zabývá se mnohými problémy vztahujícími se k ekonomice, životnímu prostředí a sociální politice. Tato společnost se zabývá i vydáváním pokynů pro testování chemických látek. Vyдалa standardy, které se zabývají testováním ekotoxicity v kontaktním uspořádání. Přehled těchto testů je uveden v tabulce č. 1. Mnohé z těchto norem vychází z norem ISO nebo naopak podkladem pro vypracování normy ISO byly metodiky OECD. Např. norma 207.1984 Test akutní toxicity žížal je výchozí pro normu ISO 11268-2:1997 Účinky znečišťujících látek na žížaly (*Eisenia fetida*). Při porovnání množství terestrických testů s platnými standardy pro hodnocení ekotoxicity je zřejmé, že těchto testů je velice málo ve srovnání s akvatickými. Mnohé z nich jsou teprve ve vývoji a pro rutinní použití jsou tyto testy díky kultivaci velice drahé, jak se zmiňují např. i v pracích [40,41].

Tabulka č. 1 OECD standardní postupy kontaktních půdních biotestů.

Číslo	Rok vydání	Název dokumentu OECD
207	1984	Test akutní toxicity žížal
208	2006	Test s vyššími rostlinami: Test klíčivosti a růstu sazenic
216	2000	Půdní mikroorganismy, Test na transformaci dusíku
217	2000	Půdní mikroorganismy, Test na transformaci uhlíku
220	2004	Test na reprodukci roupic
222	2004	Test na reprodukci žížal (<i>E. foetida</i> , <i>E. andrei</i>)
227	2006	Test s vyššími rostlinami: Test vitality rostlin
226	2008	Test reprodukce roztočů (<i>Hypoaspis Aculeifer</i>)
232	2009	Test reprodukce chvostoskoků v půdě

4.6.1 Test akutní toxicity žížal OECD 207

Tento test je nejstarším a tím pádem i nejpropracovanějším testem v kontaktním uspořádání. Byl schválen 4. dubna 1984 a stal se platným standardem OECD.

Tento test obsahuje dvě metodiky, test stanovení akutní toxicity na filtračním papíře a test stanovení akutní toxicity na umělé půdě.

Postup půdního biotestu s *Eisenia fetida* na umělé půdě

Dospělí jedinci jsou chováni 14 dní v umělé půdě (500 gramů) obsahující kontaminant. pH této půdy je upraveno uhličitánem vápenatým na hodnotu 6,0 ($\pm 0,5$). Na každý test je potřeba deset dospělých jedinců. Stejným způsobem je nasazena i kontrola. Během testu je nutno zajistit kontinuální osvětlení, aby testované žížaly byly celou dobu v půdě a taktéž konstantní teplotu 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Po sedmi a čtrnácti dnech je zjišťována váha a mortalita žížal. Mortalita je zjišťována reakcí na jemný mechanický stimul. V případě absence této reakce jsou testovaní jedinci považováni za mrtvé. Tyto hodnoty jsou podkladem pro výpočet hodnoty LC 50 popř. jiné.

Tento test je uveden v příloze č. 2 ve Vyhlášce č. 389/2005 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí. Tento test byl i základem pro normu ISO 11268-2:1997.

Na konečný výsledek testů využívajících umělou půdu, má vliv i její složení, a to zejména obsah organických látek v půdě a hodnota pH půdy [42].

Postup půdního biotestu s *Eisenia foetida* na filtračním papíře

Tento test je velice umělý, neboť dochází k expozici pouze dermální cestou přes pokožku žízá. Jeho dalším nedostatkem je, že jedinci během něj ztrácejí váhu, neboť nejsou dostatečně přikrmováni. Tito jedinci pak mají nižší reprodukční schopnosti. Problém s nedostatkem živin během testu, ale i chovu, bývá řešen přidáním kravské nebo koňské mrvy.

Aplikace látky je ve vodném roztoku nebo volatilním rozpouštědle, které je nutno před zahájením pokusu z filtračního papíru odpařit a následně pak filtrační papír ovlhčit vodou. Žížaly se nechají 48 hodin na navlhčeném filtračním papíře ve zkumavkách při konstantní teplotě 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), ve tmě, do každé zkumavky je vložena jedna žížala. Na každou koncentraci je potřeba deset opakování. Provádí se předběžný test, aby se zjistil užší rozsah koncentrací s předpokládaným účinkem pro základní test, na jehož základě se určuje mortalita žízá po 24 a 48 hodinách. Tyto hodnoty se přepočítávají na hodnoty LC 50 popř. jiné [5,13,16,22,24,27,42].

4.6.2 Test s vyššími rostlinami: Test klíčivosti a růstu sazenic OECD 208 a Test s vyššími rostlinami: Test vitality rostlin OECD 227

Tyto testy popisují obecné zásady pro posouzení klíčivosti a růstu sazenic vyšších rostlin po expozici zkoušenou látkou působící na povrchu půdy nebo v půdě. Zkoušenou látkou mohou být chemické látky, prostředky na ochranu rostlin, pesticidy atd.

Semena rostlin jsou umístěna do půdy, která je obvykle hlinitopísčité s maximálním obsahem organického uhlíku 1,5 %, tyto půdy jsou běžně k dostání nebo je může nahradit uměle vytvořená půda, záleží na tom, jaké chemické látky testujeme. Po dvou až třech týdnech porovnáváme námi sledované end-pointy s kontrolou, kde vzejde 50 % rostlin. Sledovanými parametry v tomto testu jsou především vzcházejivost klíčících rostlin, váha sušiny výhonku respektive délka výhonku a zaznamenány jsou viditelné nepříznivé účinky na částech rostlin. Výsledkem těchto testů může být stanovení hodnot NOEC nebo LOEC a samozřejmě i hodnota LC 50.

Důležitou otázkou je i výběr rostlin pro test. To může být v podstatě jakákoli rychle rostoucí vyšší rostlina. Důležitá je však její schopnost tolerance vůči kontaminantům, protože mnoho rostlin disponuje vysokým potenciálem bioakumulace toxických látek, takže není zřejmý žádný toxický efekt. I když při stejné koncentraci zkoušené látky mnoho jiných rostlin zahyne. Pro volbu testu tedy rostliny s vysokým potenciálem bioakumulace toxických látek nejsou vhodné.

Testu OECD 208 odpovídá test ISO 11269-2:2005 [43,44,45,46].

4.6.3 Půdní mikroorganismy, Test na transformaci dusíku OECD 216

Tento test je zaměřen na tvorbu organického dusíku v půdě. Základem je proces transformace dusičnanů mikroorganismy v půdě během expozice testované látky. Půda pro tento test má splňovat tzv. nejhorší scénář tedy maximální expozici mikroorganismů v půdě polutanty. Půda obsahuje více než 70 % písku a má pH o hodnotách 5,5 – 7,0. Do ní se aplikuje zkoušená látka. Minimální délka testu je 28 dní, po této expozici jsou půdy vylouhovány vhodným rozpouštědlem a je stanovena koncentrace organického dusíku.

Porovnání rychlosti mineralizace dusíku s kontrolou je pak výchozí pro stanovení ekotoxicity vzorku.

Tomuto testu odpovídá norma ISO 14238:1997 [47,48].

4.6.4 Půdní mikroorganismy, Test na transformaci uhlíku OECD 217

Tento test je zaměřen na tvorbu organického uhlíku v půdě. Základem je proces transformace uhlíku mikroorganismy v půdě během expozice testované látky. Půda pro tento test má splňovat tzv. nejhorší scénář tedy maximální expozici mikroorganismů v půdě polutanty. Půda tedy obsahuje více než 70 % písku a má pH v rozmezí hodnot 5,5 – 7,0, aplikuje se do ní glukosa a zkoušená látka. Minimální délka testu je 28 dní. U tohoto testu na transformaci uhlíku se měří odchylka jako respirační rychlost, tzn. uvolněný oxid uhličitý či jako spotřebovaný kyslík po 0, 7, 14 a 28 dnech, v porovnání s kontrolou [49].

4.6.5 Test na reprodukci rousic OECD 220

Tento test je možný provádět s *Enchytraeus albidus* a *Enchytraeus crypticus*. Používají se inertní nádoby a do každé se dá potřebné množství umělé půdy, které je pro každý druh rousic specifické a přidá se deset dospělých jedinců. Po dvou resp. třech týdnech se spočítá množství mrtvých jedinců a ti se odstraní z půdy, po dalších dvou resp. třech týdnech je určena reprodukce rousic. Tento test je kratší než stanovení reprodukce u žížal.

Ze standardu OECD 220 vychází norma ISO 16387:2004 [29,30].

4.6.6 Test na reprodukci žížal OECD 222

Test na reprodukci žížal, se provádí v nádobě o obsahu 1 až 2 litry, kde je vrstvičku 5-6 cm umělé půdy. Půda se nejprve ovlhčí, vybere se 10 reprezentativních adultů z chovu, ti se omyjí a zváží a přidají do nádoby s půdou. Při testu je konstantní teplota 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Po čtyřech týdnech se hodnotí mortalita žížal a opět se váží, spočítají se kokony a juvenilové. Žížaly jsou během testu přikrmovány asi 0,5 gramy hnoje na jedince na týden. Kokony se inkubují další čtyři týdny a poté se spočítají juvenilové. Výsledkem tohoto testu je váha dospělců a počet juvenilů na dospělého [13,16,25,27].

4.6.7 Test reprodukce roztočů OECD 226

Na tento test je potřeba deset samic a pět samečků *Hypoaspis Aculeifer* a sto jedinců *Folsomia Candida*, ty umístíme do 60 gramů umělé půdy a po třech týdnech jsou sledovány end-pointy; přežití, růst a reprodukce roztočů. Jako potrava pro chvostoskoky se na začátku a po čtrnácti dnech přidávají kvasnice [37].

4.6.8 Test reprodukce chvostoskoků v půdě OECD 232

Pro tento test je doporučený druh chvostoskoků *Folsomia candida*. Test se provádí v umělé půdě, která musí být dostatečně ovlhčena a při konstantní teplotě 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Do každé nádoby se nasadí 10 jedinců starých asi 10 dní a nádoby se uzavrou. Po 28 dnech se sleduje mortalita a počet juvenilů. Během testu jsou jedinci přikrmováni cca třikrát týdně kvasnicemi. Výsledkem tohoto testu je reprodukce (produkce vajíček), také růst, změny v chování a mortalita jedinců.

Tomuto testu odpovídá norma ISO 11267:1999 [32,33].

4.7 Testy ISO

Problematicou terestrických testů se zabývá i organizace ISO, což je mezinárodní organizace pro standardizaci. Uvedená tabulka obsahuje normy ISO pro stanovení ekotoxicity v kontaktním uspořádání. Některé z těchto norem vychází ze standardů OECD, jak je uvedeno výše. Zde je uveden jen přehled vybraných norem.

Tabulka č. 2: ISO standardní postupy kontaktních půdních biotestů.

Označení normy	Název normy
ISO/TS 10832:2009	Účinky znečišťujících látek na mykorhizní houby: Test na klíčivost spor [50].
ISO/CD 11063	Metoda pro přímou extrakci DNA z půdních vzorků (v přípravě) [51].
ISO 11267:1999	Test na inhibici reprodukce chvostoskoků (<i>Folsomia candida</i>) ve znečištěné půdě [52].
ISO 11268-1:1993	Účinky znečišťujících látek na žížaly (<i>Eisenia fetida</i>): Stanovení akutní toxicity pomocí umělých půdních substrátů [21].
ISO 11268-2:1998	Účinky znečišťujících látek na žížaly (<i>Eisenia fetida</i>): Stanovení účinků na reprodukci [22].
ISO 11268-3:1999	Účinky znečišťujících látek na žížaly (<i>Eisenia fetida</i>): Pokyny pro stanovení účinků v polních studiích [23].
ISO 11269-1:1993	Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru: Metoda měření inhibice růstu kořene (novela v přípravě) [45].
ISO 11269-2:2005	Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru: Účinky chemických látek na klíčivost a růst rostlin [46].
ISO 14238:1997	Stanovení dusíku mineralizací a nitrifikací v půdě a vlivu chemických látek na tyto procesy [48].
ISO 15952:2006	Účinky znečišťujících látek na juvenilní pozemní hlemýžďe (<i>Helicidae</i>): Stanovení účinků na růst v kontaminované půdě [35].
ISO 16387:2004	Účinky znečišťujících látek na roupice (<i>Enchytraeus sp.</i>): Stanovení účinků na reprodukci a přežití [29].
ISO 17126:2005	Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru: Screeningový test pro vývoj sazenice salátu (<i>Lactuca sativa L.</i>) [53].
ISO 20963:2005	Účinky znečišťujících látek na larvy hmyzu (<i>Oxythyrea funesta</i>): Stanovení akutní toxicity [38].
ISO 22030:2005	Biologické metody: Stanovení chronické toxicity vyšších rostlin [54].

4.8 Testy US EPA

Společnost US EPA, což je Agentura Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí, která vydává také normy pro stanovení ekotoxicity, se zabývá i testy v kontaktním uspořádání. Z následujícího přehledu metodik, které jsou uvedeny v tabulce č. 3, vyplývá, že potřeba využívat testy v kontaktní uspořádání pro posuzování ekotoxicity látek, je vnímána nejen v Evropě.

Tabulka č. 3: US EPA standardní postupy kontaktních půdních biotestů.

Označení normy	Název normy
850.2450	Test půdního mikrokosmu (půdní výkroj) [55].
850.4000	Test na necílové rostliny [56].
850.4100	Toxicita suchozemských rostlin, Úroveň I (vývoj sazenic) [57].
850.4150	Toxicita suchozemských rostlin, Úroveň I (vegetativní vitalita) [58].
850.4200	Test toxicity na klíčivost semen a růst kořene [59].
850.4225	Vývoj sazenic, Úroveň II [60].
850.4230	Test toxicity prvotního růstu sazenic [61].
850.4250	Vegetativní vitalita, Úroveň II [62].
850.4300	Terénní studie suchozemských, Úroveň III [63].
850.4600	Test toxicity lusku <i>Rhizobium</i> [64].
850.4800	Test příjmu a přesunu rostlin [65].
850.5100	Test toxicity půdní mikrobiální toxicity [66].
850.6200	Subchronický test toxicity žížal [26].

4.9 Půdní ekotoxikologie

Cílem půdní ekotoxikologie je chránit půdu a půdní biotu před účinky chemických látek, protože půda je nepostradatelná složka přírody, základna pro růst rostlin, zásobárna živin, je počátkem a koncem potravního řetězce a cyklů prvků.

Půda obsahuje všechny tři fáze, pevnou, kapalnou a plynou. V půdě tedy dochází k mnoha interakcím, mezi ty nejdůležitější řadíme procesy sorpce, adsorpce a klíčový faktor půdních procesů – biodostupnost.

O sorpci se mluví u všech procesů, při kterých se chemická látka spojuje s pevnou fází. O adsorpci pak, pokud látky interagují s dvourozměrným povrchem. Oba tyto procesy mohou mít charakter vratných i nevratných dějů.

Biodostupnost nemá jednotnou definici, ta se liší se v jednotlivých složkách životního prostředí, ale vždy se jedná o popis interakcí mezi chemickou, fyzikální a biologickou složkou.

Cílem půdních biotestů je určit jaká koncentrace chemické látky je v půdě nebezpečná, k tomu slouží soubor půdních ekotoxikologických biotestů, pomocí kterých se testuje chemická látka v určité koncentrační řadě v mg dané látky/kg suché půdy. Nebo se testuje daný materiál kaly z ČOV, sedimenty atd., kdy koncentrační řada vzniká ředěním s referenční půdou.

V dnešní době roste potřeba dat o rizicích spojených s novými chemikáliemi, s pesticidy a odpady a proto má půdní ekotoxikologie nezastupitelnou úlohu v hodnocení rizik.

Půdní ekotoxikologie sleduje kontaminaci půd, zdroje a hladiny kontaminace, osudy kontaminantů v půdě a jejich efekty na půdní organismy, z těchto dat vyhodnocuje vlastnosti půdy jako celku [13,16].

4.10 Ekotoxikologie odpadů

Vysoká produkce odpadů je v dnešní době řazena mezi hlavní environmentální problémy v České republice, Evropské unii a samozřejmě na celém světě. V EU se za rok vyprodukuje přibližně 1,3 miliardy tun odpadů a z toho je asi 40 milionů tun odpadu klasifikovatelných jako odpad nebezpečný. Musí se však k tomuto množství připočítat také 0,7 miliardy zemědělského odpadu, které je ročně vyprodukováno.

Množství vzniklého komunálního odpadů se každý rok zvyšuje a předpokládá se, že do roku 2020 se zvýší o dalších 25%. Takové množství odpadu a samozřejmě i jeho zpracování má rozsáhlé dopady na životní prostředí.

Snahou by mělo být tedy správné vyhodnocení vlastností odpadů, jeho zařazení a nakládání s ním. Dle údajů EEA (European Environment Agency; Evropská agentura pro životní prostředí) je v EU cca 50–60 % odpadu spáleno nebo skládkováno (v České republice cca 70-80%), přičemž toto množství obsahuje výrazný podíl odpadu, který by bylo možné opět využít. Do jisté míry je to také způsobeno legislativou týkající se odpadů, některé materiály jsou nejednoznačně legislativně ošetřeny (vytěžené sedimenty) či není podporováno jejich znovuvyužití (kaly z ČOV). Samozřejmě i vyhodnocení vlastností H14 je nedostatečné a u odpadů takřka zcela špatné. Neboť odpady a jejich případná ekotoxicita jsou posuzovány na základě výsledků testů, které pracují s vodným výluhem odpadu. Takto může být ekotoxicita odpadů zcela podceňena, např. u odpadu, který obsahuje látky ve vodě málo či vůbec nerozpustné. Tento odpad bude hodnocen jako odpad určený např. ke skládkování, a tak se do našeho životního prostředí dostávají velice nebezpečné látky, které mohou ovlivnit celý okolní ekosystém a náprava pak může být velice ekonomicky a časově nákladná. Samozřejmě dochází i k přeceňování reálné environmentální nebezpečnosti některých materiálů a zachází se s nimi na podkladě špatného managementu jako s nebezpečnými odpady. Tyto materiály by při tom mohly být vhodně využívány.

Potřeba zařazení kontaktních testů ekotoxicity do povinné baterie testů, sloužící jako podklad k jejímu relevantnímu posouzení, je diskutována v poslední době celou řadou odborníků [1,18,19,20]. Pro tyto účely byla v práci [1] v České republice navrhována základní sada testů Obr. č. 4, která by měla obsahovat jak testy kontaktní tak akvatické, tak testy zastupující různé trofické úrovně. K ní by měla být ještě sada doplňková, která by obsahovala další vhodné testy, a to testy v kontaktním uspořádání i akvatické [1,17].

Testy pevného odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
žížala <i>Eisenia fetida</i>	akutní	mortalita	14 dní	LC50	ISO 11268-1
rostlina <i>Avena sativa, Brassica rapa</i>	akutní	vykličení inhibice růstu	cca 14 dní	EC50	ISO 11269-2
Testy vodného výluhu odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	akutní	inhibice luminiscence	30 min	EC50	ISO 11348
korýš <i>Daphnia magna</i>	akutní/chronický	inhibice mobility	48 hod	EC50	ISO 6341
řasa <i>Desmodesmus subcapitatus</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	chronický	růst	EC20	3 dny	ISO 8692

Obr. č. 4 Základní sada testů ekotoxicky pro posouzení pevného materiálu [1].

4.11 Současné trendy v ekotoxikologických biotestech

Rostoucí potřeba testovat nové chemické látky a vzorky z životního prostředí ve velkých sériích vedla k následujícím trendům ve vývoji biotestů. Je snaha o miniaturizaci prostorového uspořádání, objemu testovacích nádob a medií, zkrácení doby inkubace při zachování citlivosti testu, tyto kroky vedou ke zlevnění biotestů. Je ovšem bezpodmínečně nutné zapojení biotestů reprezentujících různé trofické úrovně v ekosystému. V dnešní době dochází k přehodnocování standardních testů (OECD, ISO, US EPA) a tvorbě nových Draftů. To je možné díky využití nových vědeckých poznatků; např. řízení produkce klidových stádií, uchovávání řasových kultur, využívání lyofilizovaných kultur pro biotesty s bakteriemi. Dnešní ekotoxikologové se snaží, co nejvíce se přibližovat při testování reálné situaci v terénu, takže zapojují nové metody vzorkování (permeabilní membrány) a také samozřejmě využívají kontaktních testů tedy přímé testování bez nutnosti přípravy výluhu, které testuje ekotoxicitu pevné matrice, nikoliv přenesenou vlastnost ekotoxicitu vodného výluhu. Dochází k rozšiřování standardní baterie ekotoxikologických biotestů (zaměřených na toxicitu, mortalitu) také na sadu biotestů zaměřených na mutagenitu, genotoxicitu, teratogenitu a biochemické markery, enzymatické aktivity, či buněčné kultury, zaměřené na konkrétní typ látky, nebo účinek [21,20].

4.12 Legislativní rámec ČR

Platná legislativa České republiky se v hodnocení ekotoxicky odpadů opírá o Zákon o odpadech 185/2001 Sb. ve znění Sbírky zákonů č. 106/2005 Sb., podle kterého jsou akreditované zkoušky ekotoxicity prováděny především v souladu s následujícími vyhláškami a nařízením vlády. Vyhláška 294/2005 Sb. je Vyhláška o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady. Vyhláška č. 376/2001 Sb. ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb. je Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Dále pak nařízení č. 163/2002 Sb. což je Nařízení vlády, kterým se stanoví technické požadavky na vybrané stavební ve znění nařízení vlády č. 312/2005. Vyhláška č. 41/2005 Sb., kterou se mění vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady.

Důležitým opěrným bodem v hodnocení ekotoxicky chemických látek je zákon č. 356/2003 Sb. Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 186/2004 Sb., zákonem č. 125/2005 Sb., zákonem č. 345/2005 Sb. a zákonem č. 222/2006 Sb. Tento zákon se zabývá především podmínky uvádění nebezpečných látek na trh, systémem klasifikace nebezpečných vlastností a základními požadavky na laboratoře klasifikující nebezpečné vlastnosti [požadavek SLP (Správná laboratorní praxe)]. Prováděcími předpisy, které je nutno si zmínit jsou vyhláška č. 220/2004 Sb., kterou se stanoví náležitosti oznamování nebezpečných chemických látek a vedení jejich evidence. Vyhláška č. 222/2004 Sb. ve znění vyhlášky č. 389/2005 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí. Vyhláška č. 223/2004 Sb., kterou se stanoví bližší podmínky hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí. Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků. Vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejich uvádění na trh je zakázáno nebo jejich uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno.

Dalším důležitým zákonem, vztahujícím se k účinku pesticidů, je zákon č. 326/2004 Sb. O rostlinolékařské péči a jeho prováděcí vyhláška č. 371/2006 Sb. O přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin. Tato vyhláška uvádí testy ekotoxicity jako požadavek při dokládání seznamu studií, které žadatel musí dodat pro hodnocení a to testy na necílové suchozemské členovce, žížaly a mikroorganismy podle metod SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry; Společnost pro environmentální toxikologii a chemii), jsou to postupy pro posouzení osudu pesticidů v životním prostředí a jejich ekotoxicity.

Všechny výše zmíněné zákony a jejich prováděcí vyhlášky vychází při hodnocení ekotoxicky z akvatických testů, pouze v příloze č. 2 vyhlášky č. 389/2005 Sb. je zmíněn kontaktní test Test akutní toxicity na žížalách a Metoda pro stanovení aktivity půdních organismů při transformaci dusíku a Metoda pro stanovení aktivity půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Tyto testy však nepatří do povinné baterie testů při hodnocení ekotoxicity, ale je pokrokem, že česká legislativa vůbec tyto testy zmiňuje být v příloze. A také výše zmiňované testy ve vyhlášce č. 371/2006 Sb.

[4,5,7,16,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76].

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá kontaktními testy ekotoxicky. Problematika predikce účinků chemických látek obsažených v pevných matricích je velmi často diskutovaným tématem, o čemž svědčí množství článků, věnujících se této problematice, z nichž nelze opomenout ani příspěvky českých ekotoxikologů skupiny RECETOX (Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí) Blahoslava Maršálka a Jakuba Hofmana např. ve sbornících Ekotoxikologické biotesty I a III.

Ze všech odborných článků, které mi byly podkladem pro vypracování bakalářské práce, vyplývá skutečnost, že biotesty jsou nezastupitelné a nanejvýš vhodné jako doplněk k chemické analýze a potřeba jejich využití v rámci ochrany životního prostředí stoupá. Dále pak, že českou legislativou daná sada povinných testů stanovující ekotoxicitu pevných materiálů na základě čtyř konvenčních, již zmíněných, testů je nevyhovující a nedostatečná. Je tedy nutné rozšířit stávající sadu o testy terestrické, neboť testy pracující s vodným výluhem nestanovují toxicitu pevného materiálu, ale jeho výluhu, testují tak tedy pouze přenesenou vlastnost, dále pak protože testované materiály mohou obsahovat látky ve vodě špatně nebo vůbec rozpustné, výsledek testu vodného výluhu tedy obsah těchto látek ve vzorku vůbec neukazuje. Sada testů legislativně zakotvených k posuzování ekotoxicity je tedy relevantní pouze pro vodní ekosystém nikoliv terestrický. Zde je tedy naše legislativa značně pozadu.

Bylo by tedy nanejvýš vhodné rozšířit sadu stávajících testů a to např. na podkladě norem vydaných společnostmi OECD, ISO či US EPA. Metodiky těchto testů se mnohdy liší, a proto by bylo také dobré jejich sjednocení, přehodnocení jednotlivých postupů a vydání nových mezinárodních draftů, které by za své převzala i česká legislativa.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. HOFMAN, J., VÁCHA, R., KULOVANÁ, M. Ekotoxikologické hodnocení vytěžených sedimentů a tuhých odpadů. In *Odpadové fórum 2009 - sborník přednášek*. [s.l.] : [s.n.], 2009. s. 8.
2. ČABALA, R.: *Ekotoxikologie* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Universita Karlova v Praze, Přírodovědná fakulta. Dostupné z WWW:
<<https://portal.natur.cuni.cz/Members/cabala/ke-stazeni/ekotoxikologie/soubor-prednasek-z-ekotoxikologie-zs2009/prednaska-1>>.
3. KOČÍ, V. Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In KOČÍ, V., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 1*, 18. - 19. října 2002. Seč : [s.n.], 2002. s. 5.
4. Vyhláška č. 376/2001 Sb. ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb. je Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.
5. Vyhláška č. 389/2005 Sb., kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí.
6. SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINSK, J.: *Ekotoxikologie praktická cvičení část I*. Veterinární a Farmaceutická univerzita, Brno 2000. 64 s.
7. HILSCHNEROVÁ, K. *Legislativní rámec ekotoxikologických biotestů*. [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:
<<http://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/Bi5620/um/7865700/Legislativa2009.pdf?fakulta=1431;období=4445;kod=Bi5620;lang=en>>.
8. MARŠÁLEK, B. *Alternativní testy toxicity* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:
<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf>.
9. MARŠÁLEK, B. *Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití*. [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:
<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf>.
10. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Encyklopedie hydrobiologie* [online]. 0. [s.l.] : VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-03-16]. Dostupné z WWW:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/>.

11. MARŠÁLEK, B. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití.. In KOČÍ, Vladimír, HALOUSKOVÁ, Olga. *Ekotoxikologické biotesty 1, 18 - 19.října 2002*. Seč : [s.n.], 2002. s. 16.
12. HOFFMAN, D. J., RATTNER B. A., BURTON G. ALLEN, Jr., CAIRNS J., Jr.: *Handbook of ecotoxicology*, CRC Press, 1995, 755 stran, ISBN 0-87371-585-3.
13. HOFMAN, J. Půdní ekotoxikologie. In KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 3, 22 - 23.října 2003*. Brno : [s.n.], 2003. s. 27.
14. Věstník MŽP č. 4/2007 Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů.
15. KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A. (2001): Testy akutní a semichronické toxicity. VŠCHT Praha, interní text Laboratoře ekotoxikologie a LCA.
16. 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>.
17. KOČÍ, V., KULOVANÁ, M., VOSÁHLOVÁ, S. Srovnání citlivosti akvatických a terestrických testů toxicity při testování ekotoxicity odpadů a kontaminovaných zemín. In *Odpadové fórum 2008 - sborník přednášek*. [s.l.] : [s.n.], 2008. s. 9.
18. LEITGIB, L., KÁLMÁN, J., GRUIZ, K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* [online]. January 2007, 66, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 428-434 . Dostupný z WWW:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V74-4KGG5SK-B&_user=10&_coverDate=01%2F31%2F2007&_alid=1334369692&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5832&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=541&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6f880a67f0cf1766c40f37be10d66f5a>.
19. DOMENE, X., ALCANIZ, J. M.; ANDRÉS, P. Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environmental Pollution* [online]. February 2008, 151, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 549-558. Dostupný z WWW:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VB5-4NVC92M-1&_user=10&_coverDate=02%2F29%2F2008&_alid=1316177175&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5917&_docanchor=&view=c&_ct=5&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e2aed2fb5e7c31dbeb605869d7fe66ac>.
20. PROKOP, Z., CUPR, P., et al. Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environmental Research* [online]. February 2003, 91, 2, [cit. 2010-04-29]. s. 119-126 . Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDS-47RJH3V-2&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F2003&_alid=1316194289&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6774&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=1681&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6eb8e1e2879a72a359520e4515116234>.

21. ISO 11268-1:1993. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=19246>.

22. ISO 11268-2:1998. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): Determination of effects on reproduction, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=20993>.

23. ISO 11268-3:1999. Effects of pollutants on earthworms: Guidance on the determination of effects in field situations, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=22764&commid=54328>.

24. OECD TG 207. Earthworm, Acute Toxicity Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006, 21 stran, Dostupný na WWW:

<<http://www.oecd.org/dataoecd/18/1/1948293.pdf>>.

25. OECD TG 222. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*), [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2004, 18 stran, Dostupný na WWW:

<<http://oberon.sourceoecd.org/vl=2438611/cl=20/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s23/p1>>.

26. US EPA 850.6200. Earthworm subchronic toxicity test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 13 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-6200.pdf>.

27. BEZCHLEBOVÁ, J. Využití žížal v půdní ekotoxikologii. In KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 3, 22 - 23. října 2003*. Brno : [s.n.], 2003. s. 11.

28. JOO AN, Y. Assessing soil ecotoxicity next term of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay; closed previous term soil next term microcosm test for volatile organic compounds. *Environmental Pollution* [online]. March 2005, 134, 2, [cit. 2010-04-29]. s. 181-186. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VB5-4DTM06F-4&_user=10&_coverDate=03%2F01%2F2005&_alid=1316031781&_rdoc=1&_fmt=high&_

orig=search&_cdi=5917&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=1059&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=5672487080ad975358bdf888695fae9>.

29. ISO 16387:2004. Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): Determination of effects on reproduction and survival, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=30946>.

30. OECD TG 220. Enchytraeid Reproduction Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2004, 22 stran, Dostupný na WWW:

<<http://oberon.sourceoecd.org/vl=2438611/cl=20/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s21/p1>> .

31. AMORIN, M. J. B, ROMBKE, J., SOARES, A. M. V. M. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, phenmedipham and different soil types . *Chemosphere* [online]. April 2005, 59, 4, [cit. 2010-04-29]. s. 501 – 510. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V74-4FN76K2-8&_user=10&_coverDate=04%2F30%2F2005&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1258775823&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=01d8efba53ccc29c40c39c472f4ecef2>.

32. ISO 11267:1999. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=19245>.

33. OECD TG 232. Collembolan Reproduction Test in Soil, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2009, Dostupný na WWW: <<http://lysander.sourceoecd.org/vl=2755913/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s32/p1>>

34. ASTM (2001): E2172-01. Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. American Society for Testing and Materials, USA. Dostupný z WWW:

<http://www.techstreet.com/standards/ASTM/E2172_01?product_id=946477>.

35. ISO 15952:2006. Effects of pollutants on juvenile land snails (*Helicidae*): Determination of the effects on growth by soil contamination, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=37667>.

36. HAMERS, T., KROGH, P. H. Predator-Prey Relationships in a Two-Species Toxicity Test System. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. August 199, 37, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 203-212. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDM-45M8SY5-3H&_user=10&_coverDate=08%2F31%2F1997&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1258817614&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=a11a8ebc86f54a4bf97ff844984454b3>.

37. OECD TG 226. Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2008, Dostupný na WWW:

<<http://lysander.sourceoecd.org/vl=2755913/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s26/p1>>.

38. ISO 20963:2005. Effects of pollutants on insect larvae (*Oxythyrea funesta*): Determination of acute toxicity, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?ics1=13&ics2=080&ics3=30&csnumber=34352>.

39. HOF, A., HEIMANN, D., AND RÖMBKE, J. Further development for testing the effects of pesticides on wolf spiders. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. August 1995, 31, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 264-270. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDM-5S90BC1C&_user=10&_coverDate=08%2F31%2F1995&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1258838093&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=5e5601e74bf28a37263ecc37468d9800>.

40. KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity Tests for Compost Applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. May 2001, 49, 1, [cit. 2010-04-29]. s. 1-16. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDM-458W5C7-11&_user=10&_coverDate=05%2F31%2F2001&_alid=1316185111&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6770&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=230&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=07e92c6e4a98e3b635b1aee37868747e>.

41. WADHIAA, K.; THOMPSON, K. Clive. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. April 2007, 26, 4, [cit. 2010-04-29]. s. 300-307. Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V5H-4MVN0VW-1&_user=10&_coverDate=04%2F30%2F2007&_alid=1316189128&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5787&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=7&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=9c4ed75c6f35fbaf20014113b992148e>.

42. ELLIS, R. S., HODSON, M. E. AND WEGE, P. The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazim to the earthworm *Eisenia fetida* in laboratory toxicity tests. *European Journal of Soil Biology* [online]. November 2007, 43, 1, [cit. 2010-04-29]. s. 239-245 . Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VR7-4PRHJ8B-B&_user=10&_coverDate=11%2F30%2F2007&_alid=1259018591&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6227&_sort=r&_st=4&_docanchor=&_ct=1336&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7037ae2a625a1c9b82b5ed3caf36daef>.

43. OECD TG 208. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006, 21 stran, Dostupný na WWW:

<<http://lysander.sourceoecd.org/vl=1902642/cl=13/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s9/p1>>.

44. OECD TG 227. Terrestrial Plant Test: Vegetative vigour Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006, Dostupný na WWW:

<<http://lysander.sourceoecd.org/vl=2755913/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s27/p1>>.

45. ISO 11269-1:1993. Determination of the effects of pollutants on soil flora: Method for the measurement of inhibition of root growth, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=19247&commid=54328>.

46. ISO 11269-2:2005. Determination of the effects of pollutants on soil flora: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36425&commid=54328>.

47. OECD TG 216. Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2000, 10 stran, Dostupný na WWW: <<http://oberon.sourceoecd.org/vl=2550400/cl=11/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s17/p1>>.

48. ISO 14238:1997. Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=23950>.

49. OECD TG 217. Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2000, 10 stran, Dostupný na WWW:

<<http://oberon.sourceoecd.org/vl=2722060/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s18/p1>>.

50. ISO/ TS 10832:2009. Effects of pollutants on mycorrhizal fungi,[online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=46187>.

51. ISO/CD 11063. Method to directly extract DNA from soil samples, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?ics1=13&ics2=80&ics3=30&csnumber=50025>.

52. ISO 17126:2005 Determination of the effects of pollutants on soil flora: Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.), [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=31214>.

53. ISO 22030:2005. Biological methods: Chronic toxicity in higher plants, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW:

<http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36065>.

54. US EPA 850.2450. Terrestrial (soil-core) microcosm test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 19 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-2450.pdf>.

55. US EPA 850.4000. Background-Nontarget plant testing, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 15 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4000.pdf>.

56. US EPA 850.4100. Terrestrial plant toxicity, Tier I (seedling emergence), [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 8 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/oppts/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4100.pdf>.

57. US EPA 850.4150. Terrestrial plant toxicity, Tier I (vegetative vigor), [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 8 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4150.pdf>

58. US EPA 850.4200. Seed germination root elongation toxicity test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 8 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4200.pdf>.

59. US EPA 850.4225. Seedling emergence, Tier II, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 9 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4225.pdf>.

60. US EPA 850.4230. Early seedling growth toxicity test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 9 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4230.pdf>.

61. US EPA 850.4250. Vegetative vigor, Tier II, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 10 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4250.pdf>.

62. US EPA 850.4300. Terrestrial plants field study, Tier III, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 8 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4300.pdf>.

63. US EPA 850.4600. Rhizobium-legume toxicity, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 14 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4600.pdf>.

64. US EPA 850.4800. Plant uptake and translocation test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 13 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4800.pdf>.

65. US EPA 850.5100. Soil microbial community toxicity test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 11 stran, Dostupný na WWW:

<http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-5100.pdf>.

66. Sbírka zákonů o odpadech a o změně některých dalších zákonů č. 106/2005 Sb.

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

68. NAŘÍZENÍ VLÁDY č. 163/2002 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na vybrané stavební výrobky, ve znění nařízení vlády č.312/2005 Sb.

69. Vyhláška č. 41/2005 Sb., kterou se mění vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady.

70. Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 186/2004 Sb., zákonem č. 125/2005 Sb., zákonem č. 345/2005 Sb. a zákonem č. 222/2006 Sb.

71. Vyhláška č. 220/2004 Sb., kterou se stanoví náležitosti oznamování nebezpečných chemických látek a vedení jejich evidence.

72. Vyhláška č. 223/2004 Sb., kterou se stanoví bližší podmínky hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí.

73. Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků.

74. Vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejich uvádění na trh je zakázáno nebo jejich uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno.

75. Zákon č. 326/2004 Sb. Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů.

76. Vyhláška č. 371/2006 Sb., kterou se mění vyhláška č. 329/2004 Sb. O přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ČOV	Čistírna odpadních vod
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
ČSN	Česká technická norma
EN	Evropská norma
ISO	International Organisation for Standardization (Mezinárodní organizace pro standardizaci)
LC50	Letální koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu.
EC50	Efektivní koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu.
IC50	Inhibiční koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu.
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Agentura Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí)
PAU	Polyaromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
DMSO	Dimethylsulfoxid
MTBE	Methyl tert-butylether
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (Nejnižší pozorovaná účinná koncentrace)
NOEC	No Observed Effect Concentration (Koncentrace bez pozorovaného účinku)
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
ASTM	American Society for Testing and Materials (Americká společnost pro zkoušení a materiály)
IOBC	International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (Mezinárodní organizace pro biologickou a integrovanou kontrolu škodlivých živočichů a rostlin)
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Federální biologický ústav pro půdní a lesní hospodářství)
BART	Beneficial Arthropods Registration Testing Group (Testovací skupina pro registraci užitečných členovců)
EEA	European Environment Agency (Evropská agentura pro životní prostředí)
SLP	Správná laboratorní praxe
SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Společnost pro environmentální toxikologii a chemii)
RECETOX	Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí