

# Metodika hodnocení kontaminace lesních půd

## *Certifikovaná metodika*

*Luboš Borůvka<sup>1</sup>, Milan Sáňka<sup>2</sup>, Vít Šrámek<sup>3</sup>, Radim Vácha<sup>4</sup>,  
Jarmila Čechmánková<sup>4</sup>, Pavel Čupr<sup>2</sup>, Ondřej Drábek<sup>1</sup>, Věra Fadrhonsová<sup>3</sup>,  
Adéla Fraňková<sup>1</sup>, Jakub Hofman<sup>2</sup>, Jakub Houška<sup>1</sup>, Viera Horváthová<sup>4</sup>,  
Pavel Rotter<sup>2</sup>, Ondřej Sáňka<sup>2</sup>, Jan Skála<sup>4</sup>, Lucie Šindelářová<sup>2</sup>,  
Václav Tejnecký<sup>1</sup>, Jana Vašíčková<sup>2</sup>, Lucie Vortelová<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra pedologie a ochrany půd

<sup>2</sup>Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX)

<sup>3</sup>Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.

<sup>4</sup>Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i.

# Metodika hodnocení kontaminace lesních půd

## *Abstrakt*

Tento text představuje metodiku pro hodnocení znečištění lesních půd potenciálně rizikovými prvky a perzistentními organickými polutanty. Je uvedena doporučená metodika odběru půdních vzorků a metody jejich zpracování a uchování. Podrobně jsou popsány metody pro stanovení pseudototálního a biologicky dostupného obsahu potenciálně rizikových prvků a obsahu perzistentních organických polutantů v půdách. Doplněny jsou rovněž standardizované metody ekotoxikologického a mikrobiologického hodnocení lesních půd. Metodika má za cíl poskytnutí komplexního, jednotného a standardizovaného souboru metod pro hodnocení kontaminace lesních půd v praxi. Aplikace této metodiky umožní srovnávání úrovně znečištění studované na různých stanovištích různými laboratořemi a vytvoření souboru srovnávacích hodnot pro lesní půdy.

**Klíčová slova:** lesní půdy; kontaminace; potenciálně rizikové prvky; perzistentní organické polutanty; toxicita; analytické metody

# Methods for the Forest Soils Pollution Assessment

## *Abstract*

This text presents a methodology for the assessment of forest soils pollution with potentially toxic elements and persistent organic pollutants. A sampling procedure is recommended. Methods for soil samples storage and treatment are presented. Methods for the determination of the pseudototal and bioavailable contents of potentially risk elements and content of persistent organic pollutants in soils are described. Standardised methods for ecotoxicological and microbiological assessment of forest soil pollution are also given. The methodology aims in providing a complex, uniform and standardised set of methods for the assessment of forest soils pollution in practical conditions. Application of this methodology will enable a comparison of soil pollution state studied in various forest stands analysed by different laboratories and forming a set of reference values for forest soils.

**Key words:** Forest Soils; Pollution; Potentially Toxic Elements; Persistent Organic Pollutants; Toxicity; Analytical Methods

## Adresy autorů

---

*Prof. Dr. Ing. Luboš Borůvka, Ing. Ondřej Drábek, Ph.D., RNDr. Václav Tejnecký, Ph.D., Ing. Adéla Fraňková, Ing. Jakub Houška, Ph.D.*

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra pedologie a ochrany půd  
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol  
<http://www.czu.cz>

---

*Dr. Ing. Milan Sáňka, RNDr. Pavel Čupr, Ph.D., Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D., Mgr. Ondřej Sáňka, Mgr. Pavel Rotter, Mgr. Lucie Šindelářová, Mgr. Jana Vašíčková*  
Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX),  
Kamenice 753/5, pavilon A29, 625 00 Brno  
<http://recetox.muni.cz>

---

*Doc. Ing. Vít Šrámek, Ph.D., Ing. Věra Fadrhonsová, Ing. Radek Novotný, Ph.D., Ing. Lucie Vortelová*  
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.,  
Strnady 136, 252 02 Jíloviště  
<http://www.vulhm.cz>

---

*Doc. Ing. Radim Vácha, Ph.D., Ing. Jarmila Čechmáňková, Ing. Viera Horváthová, Mgr. Jan Skála*  
Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i.,  
Žabovřeská 250, 156 27 Praha 5 – Zbraslav  
<http://www.vumop.cz>

---

## Oponenti

***Prof. Ing. Jiří Kulhavý, CSc., Mendelova univerzita v Brně***

***Dr. Ing. Přemysl Fiala, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský***

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>CÍL METODIKY</b>	<b>1</b>
<b>3.</b>	<b>POTENCIÁLNĚ RIZIKOVÉ PRVKY V LESNÍCH PŮDÁCH</b>	<b>2</b>
3.1.	Zdroje rizikových prvků v lesním ekosystému	2
3.2.	Osud rizikových prvků v lesní půdě	3
3.2.1.	Vertikální distribuce RP v lesní půdě	3
3.2.2.	Faktory ovlivňující zadržování RP v lesním ekosystému	3
3.3.	Interakce rizikových prvků s biotickou složkou půdního prostředí	4
3.4.	Limity RP pro lesní půdy	5
3.4.1.	Současné přístupy k určování kritických limitů	5
3.5.	Průzkumy lesních půd z hlediska kontaminace rizikovými prvky	6
<b>4.</b>	<b>PERZISTENTNÍ ORGANICKÉ POLUTANTY V LESNÍCH PŮDÁCH</b>	<b>7</b>
4.1.	Charakteristika perzistentních organických polutantů	7
4.2.	Zdroje POP v půdách	8
4.3.	Sledování a hodnocení obsahů POP v půdách	8
4.4.	Průzkumy lesních půd z hlediska kontaminace POP	9
<b>5.</b>	<b>VLASTNÍ METODIKA</b>	<b>11</b>
5.1.	Metodika výběru ploch a odběru půdních vzorků	11
5.1.1.	Doporučený způsob odběru půdních vzorků	11
5.2.	Stanovení obsahu potenciálně rizikových prvků v půdách	16
5.2.1.	Rozklad (extrakce) půd lučavkou královskou za horka, tzv. pseudototální obsah	16
5.2.2.	Extrakce půd roztokem dusičnanu amonného (1 mol.l <sup>-1</sup> )	17
5.2.3.	Stanovení rizikových prvků v roztoku	17
5.2.4.	Stanovení celkového obsahu rtuti	17
5.3.	Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), polychlorovaných bifenyly (PCB) a organochlorových pesticidů (OCP)	18
5.3.1.	Princip stanovení PAU, PCB a OCP	18
5.3.2.	Způsoby extrakce PAU, PCB a OCP	18
5.3.3.	Chromatografické stanovení PAU, PCB a OCP v extraktech	21
5.4.	Stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů - PCDDF	24
5.4.1.	Extrakce polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů pro měření GC/MS nebo HRGC/HRMS	24
5.4.2.	Screeningové stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů pomocí imunotestů	25
5.5.	Mikrobiální parametry půd	25
5.5.1.	Velikost mikrobiální biomasy – C <sub>bio</sub>	25
5.5.2.	Mineralizační aktivita půdních mikroorganismů bez přídavku substrátu (bazální respirace – BR)	26
5.5.3.	Mineralizační aktivita půdních mikroorganismů s přídavkem substrátu (substrátem indukovaná respirace – SIR)	27
5.6.	Ekotoxikologické testy	27
5.6.1.	Test na reprodukci rouspic <i>Enchytraeus crypticus</i>	28
5.6.2.	Test na reprodukci chvostoskoků <i>Folsomia candida</i>	28
<b>6.</b>	<b>DOPLŇKOVÉ INFORMACE</b>	<b>30</b>
6.1.	Přínos metodiky	30
6.2.	Zhodnocení novosti postupů	30
6.3.	Popis uplatnění metodiky	30

6.4.	Ekonomické aspekty	30
6.5.	Dedikace	31
<b>7.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>32</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM PŘEDCHÁZEJÍCÍCH PUBLIKACÍ AUTORŮ K TÉMATU</b>	<b>37</b>

# 1. ÚVOD

Lesní půda je dynamický organismus, který je spjatý celou řadou vazeb s dalšími složkami ekosystému. Je úzce provázána s atmosférou, klimatem a biotickou složkou ekosystémů - nejen se dřevinami, ale i s veškerými živými organismy, které půdy pomáhají vytvářet a přispívají k jejich změnám. Ovlivňování biotických i abiotických složek lesních ekosystémů se projevuje i na půdních vlastnostech a naopak změny půdních vlastností mohou ovlivnit strukturu i funkci lesních porostů (Fisher a Binkley, 2000).

Půda je nedílnou a významnou součástí lesních ekosystémů. V důsledku průmyslové činnosti, dopravy a dalších potenciálních zdrojů může docházet k její kontaminaci, ať již přímým vstupem kontaminantů například při záplavách, nebo prostřednictvím atmosférické depozice. Kontaminace lesních půd může mít značný vliv na fungování celých lesních ekosystémů. Ovlivňuje mikrobiální aktivitu v půdě, působí toxicky na rostliny a může tak omezovat nárůst biomasy nebo zdravotní stav porostu, a může rovněž docházet k vyplavování rizikových látek do podzemních či povrchových vod. Dosud se však problematice kontaminace lesních půd věnovalo méně pozornosti než kontaminaci půd zemědělských či městských, neboť nebezpečí vstupu rizikových látek do potravního řetězce či přímého ohrožení lidského zdraví je zde obvykle výrazně nižší. V případě lesních půd je nebezpečí kontaminace spojeno právě spíše s ohrožením lesního ekosystému. Pro lesní půdy dosud nejsou stanoveny limitní ani srovnávací hodnoty a nebyla dosud přijata jednotná metodika stanovení obsahu, případně forem rizikových látek v lesních půdách ani hodnocení jejich vlivu.

Tato metodika shrnuje hlavní metody pro stanovení celkového obsahu a obsahu přístupných forem potenciálně rizikových prvků a celkového obsahu hlavních skupin perzistentních organických polutantů v lesních půdách. Předkládá rovněž doporučený způsob vzorkování lesních půd. Jako návod pro hodnocení dopadu kontaminace na lesní ekosystém jsou zahrnuty vybrané mikrobiologické a ekotoxikologické testy.

## 2. CÍL METODIKY

Cílem předkládané práce je poskytnout souborně základní metody pro stanovení celkového obsahu a obsahu přístupných forem potenciálně rizikových prvků a obsahu perzistentních organických polutantů v lesních půdách. Tyto metody jsou doplněny doporučeným způsobem odběru vzorků a vybranými metodami hodnocení mikrobiologických a ekotoxikologických parametrů, které mohou charakterizovat skutečný vliv kontaminace na lesní půdu a ekosystém.

### 3. POTENCIÁLNĚ RIZIKOVÉ PRVKY V LESNÍCH PŮDÁCH

Chování potenciálně rizikových prvků (RP) v půdách, a tedy i v půdách lesních, je ovlivněno vlastnostmi daného RP a podmínkami půdního prostředí. Tyto faktory rozhodují o mobilitě prvků, jejich přístupnosti pro organismy, nebezpečí vyplavení z půdy, či o jejich akumulaci v půdě. Akutní riziko představují ty prvky, které zůstávají ve velké míře v mobilní, biologicky dostupné formě. Naopak prvky poutané na pevné půdní částice mohou představovat chronické nebezpečí, které se může projevit v případě výrazné změny půdního prostředí například vlivem okyselení, mineralizace organické hmoty apod. Přestože v podmínkách České republiky nepředstavují rizikové prvky v naprosté většině případů hlavní stresor (Uhlířová a Hejdová, 1999), vzhledem ke značnému narušení velké části porostů může být jejich vliv velmi výrazný, což souvisí s obecným jevem snadné ovlivnitelnosti systémů nacházejících se blízko hranice nestability.

#### 3.1. Zdroje rizikových prvků v lesním ekosystému

Vstup RP prvků do lesního ekosystému můžeme rozdělit do dvou skupin: na vstup geogenní (či litogenní), zapříčiněný zvětráváním mateční horniny, a antropogenní, související s činností člověka. V případě lesních půd je hlavním antropogenním vstupem atmosférická depozice, v aluviálních územích pak mohou být dalším antropogenním vstupem kontaminované sedimenty. Antropogenní a geogenní vstupy je nezbytné co možná nejlépe odlišit, a to pokud možno kvantitativně. Pokud totiž chceme omezit antropogenně indukovaný vstup RP do lesního ekosystému za účelem snížení rizika, musíme nutně vědět, jaká část příslušného RP pochází přímo z mateční horniny a nejlépe i jaké je s tímto vstupem spojené riziko, jelikož tento vstup nemůžeme prakticky regulovat.

Již samotné koncentrace RP v půdách nám mohou poskytnout první důležitou informaci, ve většině světových půd sleduje obsah vybraných RP následující sestupnou řadu: Cr, Zn, Ni, Cu, Co, Pb, Cd (Kabata-Pendias a Pendias, 1992). Pokud tedy narazíme na půdu, v níž je toto pořadí výrazně posunuto ve prospěch jednoho prvku, pak to značně posiluje možnost významných antropogenních vstupů. V případě bodového znečištění může být vodítkem k odhadu původu RP v půdě prostorové rozložení. Další hledisko je rozložení obsahu RP v půdním profilu. Pokud koncentrace RP vzrůstá s hloubkou, může to svědčit o jeho litogenním původu, což bylo doloženo na příkladu Cr a Ni (Baize a Sterckeman, 2001). Ovšem tento jev může interferovat s transportními ději v rámci profilu, což může přinést jisté interpretační problémy. Důležitým ukazatelem může být korelace mezi obsahem příslušných RP v mateční hornině a půdě (Kabata-Pendias a Pendias, 1992). Bylo vypracováno několik v praxi použitelných metod umožňujících s jistou přesností odhadnout velikost litogenní frakce RP v půdě. Například některé z těchto metod používají Sc jako referenčního prvku, přičemž se aproximativně předpokládá, že antropogenní vstup Sc do půdy je nulový a že poměr mezi množstvím Sc přítomným v matečné hornině a v půdě je konstantní. Místo Sc se rovněž někdy používá  $Al^{3+}$ ,  $Y^{3+}$  a  $Ti^{3+}$  (Shotyk et al., 2000). Další metody, které mohou být použity jako srovnávací, pracují s různými poměry izotopů Pb v litosféře a půdě, kde existuje významná antropogenní frakce vykazující právě charakteristický a odlišující poměr izotopů Pb (Monna et al., 1997; Komárek et al., 2008). Jinou možností, která může indikovat původ RP v půdě, je podíl jejich mobilní frakce, neboť v případě antropogenních vstupů jsou prvky v půdě zpravidla méně zabudovány a podíl jejich mobilních forem je vyšší než v případě litogenního původu (Vácha et al., 2002). Ani tato metoda není jednoznačně spolehlivá ve všech případech. Při hodnocení původu rizikových prvků jsou vhodným nástrojem vícerozměrné statistické analýzy (např. Borůvka et al., 2005). Komplexní přístup k odlišení geogenní a antropogenní zátěže představuje práce Němečka et al. (1995).

## 3.2. Osud rizikových prvků v lesní půdě

### 3.2.1. Vertikální distribuce RP v lesní půdě

Pokud vstupuje RP do půdního prostředí z atmosféry, přichází nejprve do styku se svrchními humusovými horizonty. S tím, jak je svrchní organický materiál překrýván dalším materiálem a postupuje jeho mineralizace, dochází i k zahušťování obsahu RP. Nárůst obsahu RP s hloubkou v nejsvrchnějších organických horizontech lze popsat vhodnou mocninnou funkcí (Yelpatyevsky et al., 1995).

Ta část RP, která projde svrchními horizonty, putuje dále půdním profilem spolu s půdním roztokem, který vedle rozpustných komplexů, z nichž důležité jsou především ty organické, obsahuje i suspendované částice. Se zvyšující se hloubkou se v těchto suspendovaných částicích zvyšuje podíl anorganických látek. Obecně se v půdním roztoku s narůstající hloubkou rovněž zvyšuje podíl nerozpustných sloučenin, což souvisí s lepšími podmínkami pro vznik agregátů. Tyto podmínky pak vedou ke srážení oxyhydroxidů železa a organických komplexů se železem, které se vyznačují silnou schopností vázat některé RP (Yelpatyevsky et al., 1995).

Navzdory poměrně složité situaci ohledně ovlivnění mobility jednotlivých RP v půdním profilu můžeme konstatovat, že v případě kyselých písčitých půd je obsah RP vždy nižší (Hernandez et al., 2003). Některé práce uvádějí cenné informace o retenčních vlastnostech konkrétních půdních typů. Mimo již výše zmíněnou mobilitu RP v kyselých půdách je podstatný především významný vychytávací potenciál některých půd, zejména andosolů a vápenatých půd. Snadná migrace RP v podzolech souvisí s jejich kyselým charakterem (Hernandez et al., 2003).

### 3.2.2. Faktory ovlivňující zadržování RP v lesním ekosystému

Distribuce příslušného RP v půdě je určována celou řadou faktorů. Důležitost těchto faktorů se může v případě jednotlivých RP lišit. Tyto faktory by měly být určitým způsobem zohledněny při výpočtu zátěží, jelikož jsou klíčové pro určení biologické dostupnosti příslušného RP.

Půdní reakce představuje jeden z klíčových parametrů ovlivňujících retenci a mobilitu RP v půdním profilu. Nižší hodnota pH obecně znamená vyšší biologickou dostupnost a mobilizaci většiny prvků, ovšem rovněž jejich urychlený přesun do oblastí s vyšším pH nebo výstup ze systému (např. Römkens a Salomons, 1998). Nízké pH lesních půd ve znečištěných lesních ekosystémech vede i k preferenci tvorby organických látek s menšími molekulami, na které je vázáno především Cd a Zn, a tím dochází k výraznému zvýšení mobility těchto prvků. V souvislosti s okyselením půd nemusí tedy vždy jít o mobilizaci „volných“ iontů nebo jednoduchých hydroxokomplexů.

V jiných pracích je dokázán vliv zvýšení pH na snížení biologické dostupnosti RP (Kelly et al., 2003). Ke zvýšení pH v těchto studiích autoři užili popílek, vápnění nebo směs kompostu a dřevní štěpky. Aplikace všech těchto směsí a následné zvýšení pH mělo pozitivní vliv na příslušné mikrobiální populace. Pokud je však lesní půda v dobrém stavu, humusojílový sorpční komplex je nasycený a vykazuje vysokou kationtovou výměnnou kapacitu (KVK), nemusí zvýšený vstup  $H_3O^+$  do systému, zapříčiněný například kyselým deštěm, znamenat zvýšení biologické dostupnosti RP a tedy ani zvýšení jejich toxicity (Frey et al., 2006).

Fyzikální a chemické vlastnosti půd mírného klimatického pásu jsou většinou odvozeny z přítomnosti jílových minerálů, organické hmoty a hydratovaných oxidů kovů (železa, hliníku a manganu). Obsahy všech rizikových prvků vykazují silnou závislost na



množství oxyhydroxidů Fe, Mn a Al, což platí hlavně pro Cu a Zn (Ramos et al., 1994; Chlopecka et al., 1996).

Důležitý děj v půdě s ohledem na propustnost pro vodu a tedy i transportní děje představuje tvorba půdní struktury, tedy vznik půdních agregátů. Organická hmota hraje při tvorbě struktury rozdílnou úlohu: některé organické polymery ji urychlují, jiné látky, jako například anionty fulvokyselin a jiných organických kyselin, dispergují agregáty tím, že jsou schopny samy vázat kationty nutné pro vznik agregátů (Oades, 1984).

Velmi cenným parametrem při posuzování mobility jednotlivých iontů v systému pevná fáze půdy-půdní roztok je součin rozpustnosti. U iontů, které mají střední až nízkou rozpustnost, představuje jejich tendence vázat se na povrch jiných částic faktor řídící jejich biologickou dostupnost.

Dalším důležitým faktorem řídícím zadržování RP je obsah a kvalita organické hmoty. To, na kterou část z daného soboru organických látek je konkrétní RP vázán přednostně, značně ovlivňuje migraci RP v profilu. Například Pb, Cu a Fe mají v rámci organické hmoty nejvyšší afinitu k frakci s vysokou molekulovou hmotností; tato frakce se hromadí především ve svrchních půdních horizontech, kde dochází k akumulaci humusu. Zn a Cd migrují spolu s rozpustnou organickou frakcí vyznačující se středně velkou molekulovou hmotností a hypoteticky mohou proto pronikat i do hlubších horizontů. Tato frakce obsahuje především rozpustné, mobilní komplexy fulvokyselin (Hernandez et al., 2003).

V případě nadložních organických horizontů existují určité specifické vlastnosti. Nejvýraznější je tento jev asi u Pb, u něhož se mohou organické horizonty stát jeho významným rezervoárem, a to v případě, že Pb vstupuje do lesního ekosystému převážně atmosférickou depozicí (Yelpatyevsky et al., 1995). Obecně lze říci, že mobilita RP v půdním profilu lesních půd sleduje zhruba následující řadu: Zn>Cd>Cu>Pb>Ni>Cr. Zn a Cd jsou tedy vůbec nejmobilnějšími RP. Olovo se váže především na oxyhydroxidy železa a organickou hmotu, z čehož vyplývá, že můžeme počítat s poměrně nízkou mobilitou tohoto prvku. Vůbec nejnižší mobilitu vykazuje Ni a Cr, jelikož mohou pronikat přímo do struktury jílu (Probst et al., 2003).

### **3.3. Interakce rizikových prvků s biotickou složkou půdního prostředí**

V této podkapitole je podán velmi stručný přehled účinků RP na vybrané organismy vyskytující se v lesních ekosystémech. Zvláštní důraz je kladen na biologickou dostupnost studovanou pomocí vybraných půdních organismů. Z dalších příkladů jsou vybrány především takové interakce RP s organismy, které ovlivňují osud a rozložení RP v lesním ekosystému a také funkčnost celého ekosystému.

Při posuzování vztahu mezi biologickou dostupností a celkovým obsahem RP musíme mít na zřeteli, že snížení dostupnosti neznamená nutně pokles celkové koncentrace RP v půdě, ale mnohdy pouze jejich transformaci na méně rozpustnou formu. Spolu s antropogenně indukovanými vstupy se do ekosystému dostávají RP ve více přístupné a mobilní formě v porovnání s formami, jež pocházejí z mateční horniny (Chlopecka et al., 1996).

RP jsou také vázány v kořenové vrstvě a to především buňkami kořenů. Dnes se již považuje za prokázané, že přítomnost RP v půdě negativně ovlivňuje růst tenkých kořínků, což se projevuje redukcí jejich hustoty ve svrchních vrstvách horizontu a ovlivňuje negativně vodní bilanci celého ekosystému (Menon et al., 2005). Rostliny v odpovědi na zesílené působení stresorů mění svou rhizosféru (Ryan et al., 2001); předpokládá se, že tyto procesy probíhají i při působení RP v lesní půdě (Frey et al., 2006).

Koncentrace RP v pletivech dřevin se liší a sleduje vzrůstající charakter v následující řadě: dřevo kmenů, dřevo tenkých kořenů, dřevo jednoletých výhonků, reprodukční orgány,

listy, kůra kořenů, kůra kmenů, velmi tenké kořínky (průměr menší než 1 mm). Ve znečištěném ekosystému je největší zásobárnou RP kůra kmenů, která obsahuje 88-90 % RP vázaných v biomase; toto množství je až 50-krát větší než množství zachycené v ročním opadu listů (Yelpatyevsky et al., 1995).

Celá řada studií využívajících molekulárně-ekologické metody dokládá, že s ohledem na funkčnost příslušného mikrobiálního společenstva v rámci lesního ekosystému dochází po působení RP k degradabilním posunům v druhovém složení příslušných mikrobiálních společenstev. Původní mikrobiální společenstva jsou v těchto případech nahrazena novými, vůči působení RP odolnějšími, avšak s ohledem na důležité funkční parametry nevhodnými společenstvy. V přírodních podmínkách pak přetrvává tento stav ještě několik let po aplikaci příslušných RP (např. Sandaa et al., 1999; Frey et al., 2006).

Ektomykorhizní houby se vyznačují schopností do jisté míry chránit ekosystém před škodlivými účinky RP v půdě (Frey et al., 2000). Interakce mezi půdou a kořeny se uskutečňují z velké části prostřednictvím ektomykorhizních hub, proto mají tyto houby velký význam i při posuzování působení RP na růst stromů (Jamnická et al., 2007). Existuje úzká souvislost mezi životní strategií jednotlivých druhů hub a jejich schopností vázat RP (Kalač et al., 1996). Například dřevní saprofyty hromadí RP méně než houby rostoucí na půdě, tj. ektomykorhizní houby a saprofyty vyrůstající z půdy (Mutsch et al., 1979).

### **3.4. Limity RP pro lesní půdy**

#### **3.4.1. Současné přístupy k určování kritických limitů**

Stanovení kritických limitů představuje nezbytný krok v hodnocení rizik spojených s působením polutantů na daný systém, to se pochopitelně týká i RP. Při stanovení kritických limitů se nověji postupuje tak, že se nejprve zvolí vhodná skupina receptorů, u nichž se pak zkoumá jejich ovlivnění příslušným RP. Při samotné volbě receptoru můžeme vycházet buď z antropocentrického hlediska nebo z přístupů ekocentrických. V prvním případě zkoumáme možné expoziční či transferové cesty od znečištěním zasaženého systému k člověku, tyto cesty vycházejí ze struktury potravních řetězců, a to ať již přirozené nebo civilizačně ovlivněné; můžeme také zkoumat, jak se v závislosti na znečištění mění některá, pro člověka důležitá vlastnost systému, např. výnos z dané plochy. Tyto přístupy jsou již ze své podstaty pro lesní ekosystémy nevhodné. Přijetí limitů založených na takto postaveném antropocentrickém hledisku by znamenalo nemožnost zaručit ochranu lesních ekosystémů a jejich celospolečensky i ekologicky významných funkcí. Tento přístup také vůbec nezohledňuje systémový charakter lesa a těsnou provázanost jednotlivých složek lesního ekosystému. Zdá se tedy jako nezbytné zvolit receptory s ohledem na ekotoxikologické účinky. Receptory vybrané na základě ekocentrického hlediska můžeme rozdělit do několika skupin (Tyler et al., 1992).

V současné době se k určení limitů na základě ekotoxikologických efektů přistupuje nejčastěji tak, že se uváží struktura daného ekosystému a na základě příslušného výstupu se stanoví klíčové skupiny organismů nezbytné pro udržení a další vývoj ekosystému. V případě terestrických ekosystémů můžeme obecně uvést, že se jedná o skupinu primárních producentů, konzumentů a rozkladačů. V praxi jsou zástupci těchto skupin reprezentováni půdními mikroorganismy nebo skupinou vlastností, jejichž kvalitu mikroorganismy svou činností vytvářejí (např. enzymatická aktivita), dále půdními bezobratlými (např. žížaly, členovci) a rostlinami.

Je třeba zmínit, že mimo postupů odvozování příslušných limitů založených na ekotoxikologických datech se na území ČR doposud častěji používaly a v současnosti stále ještě používají postupy vycházející ze statistického zpracování pozadřových koncentrací RP v prostředí, respektive z dolních mezí difusně-antropogenních koncentrací těchto prvků

(Podlešáková et al., 1994b; Němeček et al., 1995). Tyto metody však neberou v potaz příslušná ekotoxikologická data a tedy nezahrnují v sobě informaci o zranitelnosti jednotlivých důležitých skupin lesních organismů vůči působení RP, což představuje jejich velké omezení.

### 3.5. Průzkumy lesních půd z hlediska kontaminace rizikovými prvky

Hodnocení půdních vlastností je jednou ze součástí typologického průzkumu a bývá zařazeno do většiny projektů z oblasti ekologie lesa, produkce lesa, či hodnocení vitality lesních porostů. Přestože existuje celá řada údajů o vlastnostech lesních půd v České republice, jsou často vázány pouze na konkrétní plochy, regiony či oblasti. Přenos poznatků, či společné zpracování různých typů průzkumů je problematické vzhledem k odlišným metodám odběru i analýz půdních vzorků. Ne vždy lze ze zbytku výsledná data převést, či společně hodnotit (např. Záhornadská, 2002). Mezi nejvýznamnější zdroje dat půdních vlastností, které se vztahují k větším územním celkům, lze zmínit:

- Typologický průzkum Ústavu pro hospodářskou úpravu lesů (ÚHÚL) – většinou jsou k dispozici data od 60. let dvacátého století. Půdy jsou popsány a vzorky odebrány podle genetických horizontů. Výsledky nejsou dostupné pro všechny oblasti a průzkum není prostorově homogenní. Stanovení obsahu rizikových prvků nebylo běžnou součástí tohoto průzkumu.
- Půdní průzkum na tzv. trvalých zkušných plochách (TZP) – plochy spravuje ÚHÚL, analýzy v současné době provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ).
- Průzkum půd jednotlivých přírodních lesních oblastí - na základě zákona o hnojivech provádí ÚKZÚZ. Odebírány jsou vzorky nadložního humusu, svrchního humusem ovlivněného minerálu a vzorky spodního minerálu cca do hloubky 30 cm. Obsahy přístupných živin jsou stanovovány po výluhu v činidle Mehlich III, obsahy celkových živin a rizikových prvků ve výluhu lučavky královské. Výsledky jsou publikovány ve zprávách (např. Fiala et al., 2010, 2011), z nichž některé jsou dostupné i na internetu.
- Průzkum půd v rámci mezinárodního monitoringu zdravotního stavu lesních ekosystémů – provádí VÚLHM na základě spolupráce v mezinárodním kooperativním programu ICP Forests.
- Mezinárodní projekt hodnocení půd na česko-bavorském pomezí realizovaný v rámci programu Iniciativy Evropských společenství INTERREG IIIA. V tomto projektu, řešeném za českou stranu ÚKZÚZ, byly v pravidelné síti 8x8 km hodnoceny půdní vlastnosti včetně obsahu rizikových prvků (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) ve výluhu lučavkou královskou (Čermák et al., 2008).

Kromě toho se provádí řada lokálních průzkumů v rámci řady výzkumných projektů. Metodika jednotlivých průzkumů je ale bohužel často odlišná a vzájemné srovnání výsledků různých studií je tak obtížné.

## 4. PERZISTENTNÍ ORGANICKÉ POLUTANTY V LESNÍCH PŮDÁCH

### 4.1. Charakteristika perzistentních organických polutantů

Perzistentní organické polutanty (POP) jsou velmi rozsáhlou skupinou látek, přírodního nebo antropogenního původu. Přesto, že přírodní cestou vzniká široké spektrum organických sloučenin, je zvýšená zátěž prostředí POP spojována v současnosti především s antropogenní činností. Vzhledem k faktu, že vysoké množství organických polutantů vzniká při procesech hoření, řadí se např. i přírodní rozsáhlé požáry a vulkanická činnost k významným zdrojům POP v prostředí a můžeme tedy konstatovat jejich historickou environmentální přítomnost. Není bez zajímavosti, že i některé nižší organizmy syntetizují např. sloučeniny na bázi chlorovaných organických molekul (houby), popsána byla i syntéza některých PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky) v metabolických procesech vyšších rostlin (Krauss et al., 2005).

Bereme-li v úvahu obrovský rozsah organických sloučenin od relativně jednoduchých k velmi složitým, byla by snaha o monitorování celého jejich spektra v prostředí bezúčelná. Výsledkem aktivit, směřujících ke stanovení výčtu zdravotně rizikových POP, průběžně sledovaných v prostředí, potravinách a organismech, byl tzv. „Holandský seznam“, zahrnující skupinu mono- a polycyklických aromatických uhlovodíků, chlorovaných uhlovodíků, včetně reziduí významných pesticidů a nepolárních extrahovatelných látek. Tento výčet nelze považovat za konečný a rozsah sledovaných sloučenin se neustále rozšiřuje nejenom o další sloučeniny v rámci uvedených skupin, ale i o nové skupiny POP (ftaláty, polybromované sloučeniny v rámci halogenovaných látek, fenoly, nitrolátky aj.). K významné skupině POP náleží polychlorované dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany (PCDD/F), obecně nazývané „dioxiny“. Priorita stanovení jednotlivých POP se vztahuje k charakteru sledovaného média, pravděpodobnému zdroji jeho zátěže, vlivu na ostatní složky prostředí, popř. zdraví člověka atd. Význam perzistentních organických polutantů se odráží i ve snahách o inventarizaci jejich obsahů v prostředí. V České republice byl vypracován projekt implementace „Stockholmské konvence“, která se věnuje inventarizaci POP v celosvětovém měřítku (Holoubek et al., 2003).

Zdravotní rizika POP jsou podmíněna jejich perzistencí, tedy setrváním v prostředí. Doba setrvání různých skupin POP se může výrazně lišit, mnohé sloučeniny se v půdě samovolně rozkládají v rámci několika roků (naftalen, antracen, ale také mnohá PCB, ropné uhlovodíky), jiné sloučeniny, jako je např. benzo-(ghi)perylen nebo PCDD/F jsou i v půdě relativně špatně rozložitelné (Podlešáková et al., 2000), a to i navzdory procesům biodegradace (mikrobiální činnost, fotolýza, hydrolýza atd.). U některých PCDD/F byla popsána až 18-tiletá perzistence v půdním prostředí (Holoubek et al., 2003). Bylo již prokázáno, že zvýšená biologická aktivita v půdách, zejména v rhizosférní oblasti vyšších rostlin, může významně přispívat k rozkladu i relativně hůře rozložitelných POP, jakými jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, s tím, že mezi jednotlivými sloučeninami existují výrazné rozdíly (Rezek et al., 2009; Cheema et al., 2010).

Zvýšené obsahy POP v půdě mohou být jen těžko příčinou akutní otravy lidského organismu. Významná mohou být rizika spojená s eventuálními projevy chronické toxicity při opakované a dlouhodobé expozici relativně nižším koncentracím organických polutantů. K prokázaným zdravotním poruchám patří zvýšená karcinogenita, mutagenita, teratogenita, genotoxicita, poruchy krvetvorby, zvýšení hladiny cholesterolu v krvi nebo poruchy reprodukce. Právě některé sloučeniny POP (ftaláty, polycyklické aromatické uhlovodíky) jsou označovány za jednu z vážných příčin poklesu plodnosti u mužů, a také samců mnoha živočišných druhů v současnosti.

## 4.2. Zdroje POP v půdách

Díky dlouhodobému sledování zátěže našich zemědělských půd POP (Němeček et al., 1997; Podlešáková et al., 1998; Vácha et al., 2001) bylo zjištěno, že závažné jsou vstupy POP do půdy prostřednictvím:

- imisních spadů v oblastech zvýšeného výskytu průmyslu,
- zátěže ze spalování tuhých paliv v intravilánech,
- kontaminované vody v inundačních pásmech některých řek,
- aplikací kalů ČOV na zemědělskou půdu.

V lesních půdách přicházejí v úvahu první tři typy vstupů. Bylo zjištěno, že zvýšená imisní zátěž vede zejména k nárůstu obsahů polycyklických aromatických uhlovodíků v půdách ekologicky zatížených oblastí (severomoravský imisní region) a dále oblastí s vyšší nadmořskou výškou. To se týká nejenom horských oblastí v relativně exponovanějších oblastech republiky (Krušné hory, Krkonoše, Orlické hory, Hrubý Jeseník, Moravskoslezské Beskydy), ale i oblastí relativně čistých (Šumava, Českomoravská vysočina). Kontinuálně prováděným sledováním (v rámci monitoringu potravních řetězců, prováděným odborem bezpečnosti potravin MZe ČR) se potvrzuje rostoucí zátěž PAU v půdách nacházejících se v těsné blízkosti obcí, a to zejména na návětrných svazích nebo v depresních polohách, na které se dominantně podílí spalování fosilních paliv (respektive tuhých látek, k účelu spalování nevhodných) v domácnostech.

Podobně jako v případě RP, také v případě POP jsou našimi nejvíce zatíženými půdami fluvizemě. To bylo prokázáno již v rámci projektu „Labe“ (Podlešáková et al., 1994a) a v následných studiích, provedených v nivních oblastech našich významných vodních toků. Získané údaje byly dále využity např. při povodních v roce 1997, a zejména pak 2002, kdy bylo možné srovnat zátěž půd po povodních se stavem v polovině devadesátých let 20. století. Zlepšení kvality vod v řekách (rostoucí počet čistíren odpadních vod) vedlo k prokazatelnému poklesu obsahu sledovaných POP ve fluvizemích nivních oblastí, s výjimkou DDT a jeho reziduí (Vácha et al., 2003), kde se předpokládá existence nelegálně likvidovaných zásob a vliv zvýšené zátěže zaplaveného areálu chemického závodu Spolana Neratovice (Holoubek et al., 2002).

## 4.3. Sledování a hodnocení obsahů POP v půdách

Sledování závažných POP v našich zemědělských půdách bylo zahájeno na počátku devadesátých let dvacátého století. Na základě zahraničních zkušeností byl akceptován výčet zdravotně závažných sloučenin ze skupiny POP uvedený v „holandském seznamu“ a byl vypracován návrh kritických obsahů těchto sloučenin pro legislativu (Němeček et al., 1996).

Hodnocení zátěže prostředí POP vykazuje oproti potenciálně rizikovým prvkům významné odlišnosti. Současný přístup prozatím striktněji nerozlišuje (jako je tomu v případě potenciálně rizikových prvků) celkové obsahy v půdě a obsahy mobilní, případně biologicky přístupné. Přesto, že se již i v případě POP začínají obdobné práce objevovat (Thiele a Brümmer, 1999), systémy hodnocení obsahu POP v půdách se zaměřují na jejich celkové koncentrace.

Protože je skupina POP velmi široká a jednotlivé sloučeniny se mohou výrazně lišit svými vlastnostmi (včetně toxicity) i v rámci jednotlivých skupin POP, není ani vyhodnocení jejich obsahu v půdě bez komplikací. V současné době se setkáváme s následujícími způsoby hodnocení:

- a) Vyhodnocení koncentrace obsahu jednotlivých sloučenin. Tento přístup je relativně jednoduchý, může však narazit na nedostatky při srovnání koncentrací s limitními obsahy,

protože ne u všech stupňů limitních hodnot jsou k dispozici kritéria pro všechny individuální sloučeniny.

- b) Vyhodnocení sumárních obsahů. Používá se pro jednotlivé skupiny POP, např. BTEX (suma monocyklických aromátů benzenu, toluenu, etylbenzenu a xylenu), suma indikačních kongenerů polychlorovaných bifenyliů (PCB), v současné době nejčastěji sedmi kongenerů (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), udávaná jako PCB7, suma PAU obsahující zpravidla 13-16 sloučenin, suma polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F), zahrnující 16 nejvýznamnějších kongenerů. Výhodou tohoto postupu je poměrně častá existence limitních hodnot pro sumární obsahy sloučenin. Nevýhodou je však nižší rozlišovací schopnost posouzení rizika, neboť v rámci sumárních obsahů se sčítají koncentrace látek s vysokou i nižší toxicitou, přesto, že v rámci jednotlivých skupin se zahrnují pouze látky s prokázanými toxickými účinky.
- c) Vyhodnocení ekvivalentových faktorů toxicity. Tento postup je založen na principu sumárních obsahů s tím, že je zohledněna potenciální rizikovost jednotlivých sloučenin, vyplývající z posouzení jejich karcinogenních vlastností (postup dle WHO). Jednotlivým látkám s karcinogenním účinkem je přiřazen toxický ekvivalent, jehož nejvyšší hodnota se rovná 1, nejnižší hodnoty jsou zpravidla o dva řády nižší. Součtem násobků koncentrací, násobených uvedeným faktorem, je získána konečná hodnota, která je v případě PCDD/F nebo PCB známá jako mezinárodní faktor toxicity, značený jako I-TEQ. Ve skupině PCDD/F je např. nejtoxičtějším zástupcem 2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin (Van den Berg et al., 2006). Obdobný postup je užíván také u polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), kde nejtoxičtějším zástupcem je benzo(a)pyren a také nověji sledovaný dibenzo(a,h)antracen. Výsledná hodnota se zpravidla uvádí jako suma toxických ekvivalentových faktorů - TEF PAU.

Limitní hodnoty rizikových látek, které jsou zapracovány do legislativních předpisů, lze rozdělit do dvou skupin:

- a) Limitní hodnoty obsahu rizikových látek v půdním prostředí;  
b) Limitní hodnoty rizikových látek v materiálech vstupujících do půd, které omezují vstupy rizikových látek do zemědělských půd.

V České republice jsou obě skupiny limitních hodnot obsaženy v legislativě.

#### 4.4. Průzkumy lesních půd z hlediska kontaminace POP

Vzhledem k finanční náročnosti stanovení perzistentních organických polutantů je výsledků obsahu těchto látek z velkoplošných průzkumů lesních půd výrazně méně než výsledků rizikových prvků. Údaje o zátěži lesních půd některých našich oblastí ale již jsou v ČR dispozici. Uvést lze již výše zmíněný mezinárodní projekt hodnocení půd na česko-bavorském pomezí realizovaný v rámci programu Iniciativy Evropských společenství INTERREG IIIA, kde byly stanovovány i obsahy POP (Čermák et al., 2008). V rámci tohoto projektu monitoroval ÚKZÚZ zátěž zemědělských a lesních půd v příhraniční oblasti jižních a západních Čech. Výsledky jsou cenné nejenom z pohledu srovnání zátěže zemědělských a lesních půd, ale i detailnějšího zkoumání zátěží půd lesních, kde bylo provedeno sledování obsahů POPs v horizontech nadložního humusu (L, F, H) a horizontu minerálním. Ze získaných výsledků jednoznačně vyplynulo, že v lesních půdách sledovaných oblastí byly zjištěny rozdíly mezi zemědělsky využívanými půdami (orná půda, travní porosty) a lesními půdami s tím, že v případě DDT byla celková zátěž lesních půd nižší, u všech ostatních sledovaných skupin POPs (PAU, PCB7, HCB, HCH) pak zřetelně vyšší.

Zjištěné závislosti je možné dokumentovat na skupině PAU. Hodnoty obsahů PAU v lesních půdách potvrdily výrazným rozdílem mezi nadložním horizontem humusu a dalšími horizonty vazbu PAU na půdní organickou hmotu. Obsahy PAU v nadložním horizontu (L, F)

byly vyšší než obsahy PAU v humusových horizontech zemědělských půd. Průměrné obsahy se však od doporučených preventivních limitů pro zemědělské půdy řádově nelišily a v některých případech byly srovnatelné. Nejvyšší průměrné obsahy byly zjištěny u fluoranthenu, v souladu s intenzivnějším výskytem této sloučeniny v prostředí a jeho průměrné zjištěné obsahy ( $365,65 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) se blížily doporučenému preventivnímu limitu pro zemědělské půdy ( $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Ani v rámci naměřených maximálních hodnot nebyly nalezeny hodnoty, které by řádově překračovaly doporučené preventivní hodnoty pro zemědělské půdy. Nejvyšší maximum bylo opět zjištěno v případě fluoranthenu ( $1540 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

V humusových horizontech lesních půd (H) byly obsahy PAU výrazně nižší, než jsou doporučené hodnoty preventivních limitů, a ve většině případů byly nižší než naměřené hodnoty u sond orných půd a TTP. To se týkalo především složitějších sloučenin, které již minimálně pronikají do hlubších horizontů a zůstávají sorbovány v horizontech nadložního humusu.

Ke sloučeninám, které relativně nejvíce pronikaly do hlubších horizontů, se řadí naftalen > fenantren > fluoren > benzo(a)antracen > fluoranten > pyren. Obsahy jednotlivých sloučenin byly závislé na jejich mobilitě, kdy opět pronikaly snadněji jednoduché sloučeniny (naftalen, fluoren) a dále na celkové koncentraci (především fluoranten). U těchto sloučenin bylo možné stanovit jejich průměrné obsahy i v minerálním horizontu, kde nejvyšších průměrných hodnot dosáhla nejjednodušší sloučenina naftalen ( $16,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). U ostatních látek, buď jednodušších sloučenin s celkově nízkou koncentrací (acenaften, acenaftalen, fluoren) nebo sloučenin se složitější strukturou (indeno(1,2,3-c,d)pyren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(g,h,i)perylene a dalších) docházelo k průniku detekovatelných množství do minerálních horizontů velmi ojediněle.

## 5. VLASTNÍ METODIKA

### 5.1. Metodika výběru ploch a odběru půdních vzorků

Pro výběr lokalit a odběry vzorků lesních půd je možné používat různé metody, které jsou většinou definovány typem prováděného půdního průzkumu. Lokality by se neměly nacházet se v blízkosti velkých měst a velkých průmyslových objektů, pokud není předmětem studia vliv právě těchto potenciálních zdrojů kontaminace. Měly by být vyloučeny plochy na okrajích lesních pozemků, odběrová místa by neměla být v těsné blízkosti cesty. Je třeba zaznamenat lesotypologické zařazení lokality, případně nadmořskou výšku, a alespoň základní složení porostu.

Základem pedologických šetření bývá obvykle výkop půdní sondy, či alespoň zákopku do hloubky cca 50 cm, důkladný popis půdního profilu a okolního stanoviště (Němeček et al., 2011, Vokoun et al., 2002, FAO 2006) s následnou klasifikací humusové vrstvy a půdního typu (Němeček et al., 2011, IUSS Working Group WRB 2006). Odběr půdních vzorků se provádí přímo z půdní sondy, nebo systémem jednoho či více směsných vzorků podle předem stanoveného principu náhodného, systematického či kombinovaného výběru.

V případě lesních půd je nutné zvlášť odebrat vrstvu nadložního humusu – buď podle jednotlivých horizontů (L, F, H), nebo jako směs fermentačního a humusového horizontu (F+H). V některých typech průzkumů se humusové horizonty odebírají odděleně pouze v případě, pokud celková výška nadložního humusu dosáhne určité definované mocnosti (např. F+H > 10cm). Pro reprezentativní stanovení vlastností povrchového humusu se doporučuje směsný odběr z více míst v rámci porostu – v optimálním případě z 10 (Muukkonen et al., 2008).

Odběry minerální půdy jsou prováděny buď podle diagnostických horizontů, nebo podle konstantních hloubek. Odběry podle diagnostických horizontů přesněji charakterizují daný půdní typ a umožňují podrobnější charakteristiku stavu vývoje půdního profilu. Někdy jsou určité typy analýz předpokladem přesné klasifikace půdního typu. Odběry podle konstantních hloubek jsou preferovány u rozsáhlejších průzkumů, neboť umožňují snadné vytváření směsných vzorků (lze využít i odběr půdním vrtákem) a jednodušší srovnání výsledků mezi jednotlivými lokalitami. Často jsou oba dva způsoby odběru vzorků kombinovány – odběr vzorků podle diagnostických horizontů z půdní sondy pro přesné určení půdního profilu + odběr směsných vzorků z několika míst vrtáním pro pokrytí variability půdního prostředí.

Vzhledem k tomu, že odběry lesních půd jsou časově, technicky i finančně náročnou činností, bývají vzorky obvykle využity ke komplexním analýzám, kdy stanovení obsahu rizikových látek představují pouze část laboratorních zkoušek. Technické postupy jsou tedy totožné nebo obdobné.

Při odběru je třeba se vyvarovat možnosti druhotné kontaminace vzorků. V případě stanovení potenciálně rizikových prvků není vhodné používat pomůcky z nerezové oceli (obsahuje Cr, Mn, Mo a Ni), ze slitin mědi, či z přírodní gummy (vysoký obsah Zn). V případě stanovení perzistentních organických polutantů nelze používat materiály, které by mohly tyto látky obsahovat a uvolňovat. Doporučuje se pracovat v laboratorních rukavicích.

#### 5.1.1. Doporučený způsob odběru půdních vzorků

Dále popsáný odběr vzorků půdy slouží ke zjišťování fyzikálních, chemických a biologických vlastností půdy, zejména k definici rozsahu kontaminace dané lokality. Byl zvolen odběr 4 vrstev půdního profilu, do celkové hloubky 20 cm. Cíleně jsou tedy vzorkovány svrchnější vrstvy půdního profilu, u kterých se předpokládá největší riziko



znečištění a současně největší vliv na vegetaci a celý lesní ekosystém. Tento způsob odběru je v souladu s příslušnými normami: ČSN 01 5110 Vzorkování materiálu, ČSN 01 5111 Vzorkování sypkých a zrnitých materiálů a ČSN 46 5331 Ochrana přírody; Půdy; Všeobecné požadavky na odběr vzorku.

#### 5.1.1.1. Odběrové pomůcky

- Krumpáč
- Lopata
- Polní lopatka
- Špachtle na odběry vzorků
- Rámeček 25x25 cm na objemové vzorky humusu
- PE pytle na vzorky
- Sklenice s víčky na vzorky POPs
- Měřítka na profil pro fotodokumentaci
- Fotoaparát
- GPS
- Zápisník, formuláře, psací potřeby
- Pásmo
- Čtyři nádoby na homogenizaci vzorků (nejlépe nerezové mísy nebo přenosky)
- Gumové laboratorní rukavice
- Nůžky na kořeny
- Váha

#### 5.1.1.2. Postup odběru vzorků

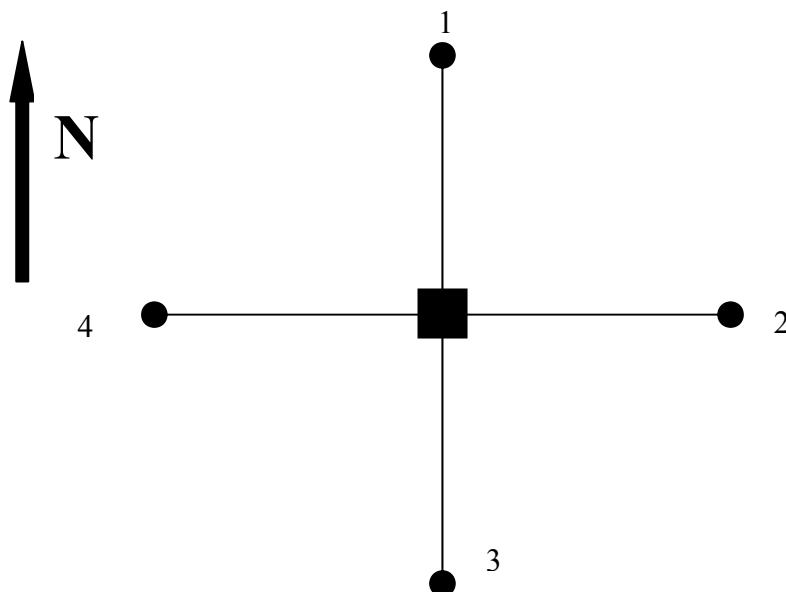
1. Ve zvoleném bodě se vykope pedologická sonda (zákopek) ke stanovení půdního typu, subtypu a diagnostických horizontů. Hloubka by měla být alespoň 0,5 m.
2. Proveďte se fotodokumentace profilu a stanoviště a popis profilu.
3. Odběr směsných vzorků 4 vrstev ze satelitních bodů pro chemické, mikrobiologické a ekotoxikologické vlastnosti. Při tomto odběru se postupuje tak, že se odeberou všechny vrstvy z jednoho satelitního bodu, postoupí se ke druhému až čtvrtému. K tomu jsou potřeba 4 nádoby, v nichž se zvlášť pro každou vrstvu smíchají 4 podvzorky. Doplní se odběrem obdobného množství ze středové sondy.
4. Kvantitativní odběr vzorků horizontů F+H odděleně ze všech 4 satelitních bodů pro stanovení objemové hmotnosti s pomocí rámečku 25x25 cm.
5. Uvedení plochy do původního stavu.

#### 5.1.1.3. Základní parametry odběru vzorků půdy

**Vzorkovací schéma** Vzorek se odebírá jako směsný vzorek 4 individuálních odběrů rozmístěných kolem pedologické sondy (zákopku) do 4 světových stran. Plocha pro odběr směsného vzorku musí být homogenní (konfigurace terénu, antropogenní zásahy, vegetace) a musí reprezentovat plochu porostu.

 půdní sonda (zákopek)

● satelitní body: č. 1, 2, 3, 4 – vzdálené 6,6 m od sondy (pokud nelze, tak v intervalu 5-12 m)



**Typ vzorku:** Porušený.

**Technika vzorkování:** Odběr vzorků se provádí nerezovým rýčem, lopatkou nebo špachtlí ze stanovených horizontů (vrstev). Na každé ze 4 plošek pro odběr individuálního vzorku se odebere vzorek dané vrstvy. Velikost plošky je určena tak, aby bylo odebráno množství, které po smíchání se vzorky z dalších plošek dá požadované množství směsného vzorku (viz dále). V každém ze 4 bodů by mělo být odebráno podobné množství – stejné zastoupení podvzorků ve směsném vzorku, doplněné o obdobné množství ze středové sondy. Individuální vzorky se pak homogenizují v nerezové míse nebo v přepravce. Odstraní se větší kořeny nebo kameny. Při odběru a manipulaci se vzorkem se používají gumové rukavice.

**Hloubka odběru:** Samostatně na každé lokalitě se odebírají tyto vrstvy (horizonty):

1. nadložní horizont F+H – celý horizont v jeho mocnosti, před odběrem se odstraní horizont L
2. horizont A konstantně v mocnosti 0-2 cm
3. vrstva 2-10 cm,
4. vrstva 10-20 cm.

Při odběru horizontů je zásadní dobře stanovit rozlišovací linii mezi nadložním organickým a minerálním horizontem, tj. mezi horizonty F+H a horizontem A. Rozlišovacím znakem je přítomnost minerálních částic v horizontu Ah. (Horizont Ah lesních půd obsahuje do 30 % organických látek, zbytek je minerální podíl). Při popisu profilu je 0 na tomto rozhraní; hloubky nadložních horizontů se označí do zápisu „+“ (např. +2).

Někdy může horizont Ah zcela chybět, v tom případě se odeberou 2 cm vzorku bezprostředně pod horizontem H. Pokud chybí nadložní horizonty F+H, odeberou se pouze minerální horizonty.

### **Hmotnost směšného vzorku při odběru:**

Horizonty F+H min. 2,5 kg čerstvé hmoty a horizont A (0-2 cm) minimálně 3 kg čerstvé hmoty; zvlášť se odebírá vzorek na stanovení objemové hmotnosti

Vrstvy 2-10 a 10-20 cm: každý vzorek minimálně 1,5 kg čerstvé hmoty

**Balení, dělení a popis:** Vzorky jsou v terénu homogenizovány kvartací a pak rozděleny následujícím způsobem:

**Horizont F+H a vrstva 0-2 cm:** Základní homogenizovaný vzorek o hmotnosti cca 2,5 kg (pro horizont F+H) nebo 3 kg (pro horizont A) je v terénu rozdělen na 3 dílčí vzorky pro stanovení:

#### ***1. Mikrobiologie a ekotoxikologie***

Základní homogenizovaný vzorek o hmotnosti cca 1,5-2 kg – do zpracování (sušení, přesívání – viz dále) uchován v PE pytlí a nutno skladovat v chladničce ve 4 °C.

#### ***2. Rizikové prvky***

Jeden vzorek o hmotnosti minimálně 0,5 kg. Tento vzorek se suší na vzduchu při laboratorní teplotě.

#### ***3. Perzistentní organické polutanty***

Odebere se ze základního homogenizovaného vzorku, hmotnost cca 0,5-1,0 kg, uchovává se ve skleněné lahvi s uzávěrem (zavařovačka 0,7l).

Samostatně se odebírá vzorek horizontů F+H na objemovou hmotnost:

#### ***4. Objemová hmotnost (pouze F+H)***

Odebírá se pomocí ocelového rámečku 25x25 cm odděleně z každého ze 4 satelitních bodů. Do PE sáčku se odebere celá vrstva horizontu uvnitř ocelového rámečku a změří se mocnost u horizontu F+H. Změřená mocnost se musí zapsat.

**Vrstvy 2-10 a 10-20 cm:** Základní homogenizovaný vzorek o hmotnosti cca 1,5 kg je v terénu dělen pouze na 2 vzorky (jeden je sklenice na POPs a na rizikové prvky). Neodebírají se vzorky na mikrobiologii a ekotoxikologii a na objemovou hmotnost.

### **Dokumentace:**

Každý směšný vzorek je identifikován souřadnicemi JTSK – střed plochy pro odběr směšného vzorku. Je provedena fotodokumentace lokality a záznam všech parametrů do formuláře. Jsou též zaznamenány případné rušivé jevy nebo anomálie. Vzorek je označen pořadovým číslem lokality a za lomítkem je číslo horizontu. Popisuje se i charakter horizontů F+H a hloubky F a H.

### **Čas vzorkování:**

Nejvhodnějším obdobím pro odběr je jaro a podzim, v zásadě však po celou dobu vegetační sezóny.

**Přeprava vzorků:** Vzorky jsou z lokality dopraveny do laboratoře v technologicky nejkratším možném čase (obvykle do 24 hodin).

Obrázek 1. Ukázka vzorků z jednotlivých horizontů půdního profilu



#### 5.1.1.4. Zacházení se vzorky po odběru

##### Vzorky pro mikrobiologii a ekotoxikologii (č. 1a, 1b):

Vzorky jsou z lokality dopraveny do laboratoře v technologicky nejkratším možném čase. Po odběru je třeba dodržet tyto zásady:

- 1) Hned po odběru vzorek rozprostřít do vrstvy (možno na rozříznutém pytli z odběrů, či na inertním materiálu) a nechat prosychat za přístupu vzduchu při laboratorní teplotě;
- 2) Vzorky na mikrobiologii (1a):
  - v co nejkratším čase po odběru, jakmile je vzorek přesívatelný (cíl: co nejmenší ztráta vlhkosti oproti polní vlhkosti v době odběru), celý objem promíchat (a rozlámat hroudy) a poté přesát přes 2 mm síto tolik, aby bylo 300 g přirozeně vlhké jemnozeme (zbytek po přesívání nevracet na hromadu, vyhodit);
  - těchto 300 g umístit do krabičky, kde je dostatečný prostor vzduchu nad vzorkem, ale není zcela vzduchotěsná (ale zase těsní natolik, aby vzorek nevysychal). Kdyby byl vzorek natolik objemný, že 300 g zabírá celou krabičku a nenechává ani minimálně 1 cm vrstvy vzduchu nad vzorkem, je nutno použít krabičky dvě na jeden vzorek;
  - skladovat v ledničce (cca 4°C);
  - vzorky na mikrobiologii by neměly být skladovány více než 1-3 měsíce.
- 3) Vzorky na testy toxicity (1b):
  - nechat vzorky vysušit až do suchého stavu, dát zpět do pytle; není nutno uzavírat vzduchotěsně, skladovat při laboratorní teplotě;
  - tyto vzorky lze před analýzou skladovat libovolně dlouho.

##### Vzorky pro stanovení rizikových prvků (č. 2):

Vzorky jsou z lokality dopraveny do laboratoře v technologicky nejkratším možném čase. Po odběru je třeba dodržet tyto zásady:

- 1) Hned po odběru vzorek rozprostřít do vrstvy (možno na rozříznutém pytli z odběrů) a nechat vyschnout při laboratorní teplotě; poté se vzorek proseje přes síto s průměrem ok 2 mm (jemnozeme);
- 2) Vzorek se skladuje v PE sáčcích při laboratorní teplotě. Tyto vzorky lze předat k analýze kdykoliv, ale čím dříve, tím lépe.

### **Vzorky pro stanovení POPs (č. 3)**

Uzavřené skleněné lahve se vzorky se uchovávají v mrazáku, co nejdříve se doručí k analýze.

### **Vzorky pro stanovení objemové hmotnosti (č. 7)**

V laboratoři se vzorky horizontů F+H odebrané pomocí rámečku z jednotlivých satelitních bodů vysuší při teplotě 60°C, zváží a pomocí změřené mocnosti se vypočítá objemová hmotnost. Celková objemová hmotnost se vypočte jako průměr ze 4 dílčích hodnot.

## **5.2. Stanovení obsahu potenciálně rizikových prvků v půdách**

Obsahy potenciálně rizikových prvků jsou stanovovány dvěma způsoby:

1. Rozklad (extrakce) lučavkou královskou, tzv. pseudototální obsah, jako ukazatel celkového zatížení lokality;
2. Výluh roztokem dusičnanu amonného jako ukazatel biologicky přístupných forem rizikových prvků v půdě.

### **5.2.1. Rozklad (extrakce) půd lučavkou královskou za horka, tzv. pseudototální obsah**

Půdní vzorek se rozkládá směsí kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné (3+1, v+v) za varu. Lučavka královská rozpouští většinu minerálních vazeb – jde o tzv. pseudototální obsah, který přibližuje potenciální zásobu prvků v půdě

#### **Potřeby:**

- Analytické váhy
- 150 cm<sup>3</sup> varná baňka
- Suchý filtrační papír plošné hmotnosti 84 g.m<sup>-2</sup>
- Hodinové sklo
- Topná deska
- 100 cm<sup>3</sup> odměrná baňka
- 100 cm<sup>3</sup> PE lahvička,

#### **Chemikálie:**

- Deionizovaná voda
- Kyselina chlorovodíková (HCl), konc. 36% (m/m), 12 mol.l<sup>-1</sup>, 1,19 g.ml<sup>-1</sup>
- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>), konc. 65% (m/m), 14,4 mol.l<sup>-1</sup>, 1,4 g.ml<sup>-1</sup>
- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>), zředěná, 0,5 mol.l<sup>-1</sup>: 35 ml koncentrované kyseliny dusičné se zředí vodou na výsledný objem 1000 ml

#### **Postup extrakce:**

Do varné baňky o objemu 150 ml se naváží cca 3 g vzorku minerální půdy nebo cca 2 g vzorku organické půdy, zvlhčí se 2 - 3 ml deionizované vody a přidá se 21 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a následně 7 ml koncentrované kyseliny dusičné. Kyseliny se přidávají tak, aby se omezilo pění (případně i po kapkách). Varná baňka se přikryje filtračním papírem a nechá se stát v digestoři při laboratorní teplotě 16 hodin (nejlépe přes noc). Druhý den se varná baňka přikryje hodinovým sklíčkem a umístí na topnou desku, kde se vaří 2 hodiny při teplotě 200°C (teplota se postupně zvyšuje - čím déle se nechá vzorek

reagovat s kyselinami za studena a čím pomaleji se vzorek zahřívá, tím menší je nebezpečí, že při zahřívání vzorek překypí). Po ukončení rozkladu a po zchladnutí na laboratorní teplotu se obsah varné baňky kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 100 cm<sup>3</sup>, doplní se po rysku deionizovanou vodou a po promíchání se zfiltruje suchým filtrem plošné hmotnosti 84 g.m<sup>-2</sup> do suché 100 cm<sup>3</sup> PE lahvičky - prvních 10-15 ml filtrátu se odstraní. Takto připravený extrakt je využit pro stanovení pseudototálního obsahu prvků metodou AAS nebo ICP-OES. Extrakt by měl být zpracován do 1 měsíce od přípravy.

**Poznámka:**

Existuje více variant této metody. Výsledky použití různých variant jsou zpravidla srovnatelné.

### 5.2.2. Extrakce půd roztokem dusičnanu amonného (1 mol.l<sup>-1</sup>)

Množství prvků extrahovaných roztokem dusičnanu amonného představuje odhad obsahu přístupného rostlinám. Extrakce probíhá při pH půdy.

**Potřeby:**

- Analytické váhy
- Laboratorní rotační třepačka
- 100-150 ml lahvičky
- Membránový filtr

**Chemikálie:**

- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>), konc. 65% (m/m), 14,4 mol.l<sup>-1</sup>, 1,4 g.ml<sup>-1</sup>
- Roztok dusičnanu amonného (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 1 mol.l<sup>-1</sup>: 80,04 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (p.a.) se rozpustí v deionizované vodě a doplní na 1000 ml

**Postup extrakce:**

20 g upraveného půdního vzorku se v lahvi z vhodného plastu o objemu 100 až 150 ml extrahuje 50 ml 1M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 120 minut na rotační třepačce při asi 20 ot./min a teplotě 20°C. Suspenze se nechá 15 minut sedimentovat a roztok se potom dekantuje přes membránový filtr do vhodné plastové nádobky, prvních 5 ml filtrátu se odstraní. Aby se zamezilo ztrátám sorpcí na stěny nádobky během uchovávání, je třeba výluh okyselit přidávkem koncentrované kyseliny dusičné (1 ml na 100 ml extraktu).

### 5.2.3. Stanovení rizikových prvků v roztoku

V roztocích získaných extrakcí půdy lučavkou nebo dusičnanem amonným se stanoví koncentrace rizikových prvků (Cd, Pb, Zn, As) metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (ICP-OES) za standardních podmínek. V případě lučavky lze použít též atomový absorpční spektrometr (AAS).

### 5.2.4. Stanovení celkového obsahu rtuti

Celkový obsah rtuti v pevných vzorcích půdy se stanovuje na přístroji AMA-254. Přesná navážka vzorku se v proudu kyslíku postupně vysuší a rozloží programovatelným nárůstem teploty. Proud kyslíku vede spaliny spolu se rtutí přes katalyzátor, kde dojde k dokonalé oxidaci spalin a k odstranění nežádoucích složek. Rtuť se potom zachytí v amalgamátoru. Po kvantitativním zachycení rtuti se amalgamátor zahřeje a uvolněné páry rtuti se vedou do měřicího prostoru, kde se měří pokles intenzity záření rtuťové výbojky způsobený přítomností rtuti.

**Potřeby:**

- Analytické váhy
- Analyzátor stopových množství rtuti AMA-254 (TMA-254)
- Ruční dávkovací mikropipeta

**Chemikálie:**

- Kyslík technický
- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>), konc. 65% (m/m), 14,4 mol.l<sup>-1</sup>, 1,4 g.ml<sup>-1</sup>
- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>), zředěná, 2 mol.l<sup>-1</sup>: 138 ml koncentrované kyseliny dusičné se zředí vodou na výsledný objem 1000 ml

**Postup stanovení:**

Navážka vzorku v rozsahu 20-150 mg ± 0,1 mg v niklové lodičce se umístí do držáku přístroje a spustí se analytický cyklus. Postup termického zpracování je volitelný. Pro minerální půdní vzorky je postačující doba sušení 20 s, doba rozkladu 120 s a prodleva 60 s. U vzorků organických horizontů je třeba krok rozkladu prodloužit na 150-210 s a prodlevu na 90 s. po tomto termickém cyklu probíhá vlastní měřicí cyklus.

### **5.3. Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), polychlorovaných bifenyly (PCB) a organochlorových pesticidů (OCP)**

#### **5.3.1. Princip stanovení PAU, PCB a OCP**

PAU, PCB a OCP se z půdy extrahují směsí hexan-aceton (1:1, v/v). Při stanovení PCB a OCP je používána metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Používá se metoda vnitřního standardu. Při chromatografii je nosným plynem helium.

Alternativně lze odděleně extrahovat PAU z půdy acetonem, výluhy jsou přečištěny na SPE kolonkách C8 a eluovány tetrahydrofuranem. Analyzovány jsou poté vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí a gradientovým průběhem. Jako mobilní fáze se použije acetonitril a směs acetonitril-voda (1:1, v/v).

#### **5.3.2. Způsoby extrakce PAU, PCB a OCP**

Pro extrakci POP byla jako nejvhodnější zvolena metoda automatické Soxhletovy extrakce s následným přečištěním extraktu na SPE kolonách. Tento postup lze použít, pokud je pracoviště vybaveno extrakčním přístrojem (např. SER148 Solvent Extraction Unit; Velp Scientifika). Alternativními metodami jsou základní extrakce podle Soxhleta, extrakce pomocí ultrazvuku a mikrovlnná extrakce. Tyto postupy jsou dále popsány jen stručně, podrobnější postup je uveden např. v citovaných metodikách U.S. EPA.

##### **5.3.2.1. Automatická Soxhletova extrakce (také extrakce dle Randalla)**

**Princip metody:**

Jedná se o upravenou Soxhletovu metodu (*U.S. EPA Method 3541 Automated Soxhlet extraction*), kdy hlavním rozdílem je, že v první fázi extrakce (60 min) je vzorek v patroně ponořený do vroucího rozpouštědla (140 °C), v druhé fázi (60 min) je patrona vytažena nad rozpouštědlo a vzorek je, stejně jako při klasické Soxhletově extrakci, prokapáván kondenzujícím rozpouštědlem. Po ukončení extrakce je vzorek automaticky zakoncentrován.

Tato metoda výrazně zkracuje čas extrakce a snižuje množství použitého rozpouštědla (z 300 na 50 ml), extrakce je zároveň účinnější.

Pro použití této metody jsou dostupné automatické (např. Buchi) a poloautomatické přístroje (Soxtec). Plně automatizované přístroje umožňují dobu extrakce zkrátit až na 60 min.

#### **Potřeby a přístroje:**

- Analytické váhy
- SER148 Solvent Extraction Unit (Velp Scientifika)
- extrakční patrony
- nastavitelná dávkovací pipeta 10 – 100µl
- vialky o objemu 22 ml se šroubovacím uzávěrem a PTFE septy pro manipulaci se vzorkem
- 10 ml zásobní vialky na standardy
- kalibrované vialky o objemu 1,8 ml se šroubovým uzávěrem a PTFE septy pro závěrečnou fázi přípravy a stanovení vzorku
- 5, 10, 25 a 50 ml odměrná baňka třídy „A” se skleněnou zátkou
- hruškovitý nástavec 50 a 100 ml
- 11mm kleště na zavírání vialek
- 10 ml zásobní vialky na standardy
- skleněné kolonky pro chromatografii s průměrem 1 cm
- Pasteurovy pipety pro přenos extraktů
- Laboratorní lžička z nerezavějící oceli
- skelná vata čištěná extrakcí hexanem v Soxhletově extraktoru po dobu 8 hodin
- hliníková fólie
- teflonové varné kamínky
- zařízení na odpařování pod proudem dusíku
- vakuová odparka

#### **Činidla:**

- aceton p.a.
- n-hexan pro organickou stopovou analýzu
- aceton pro organickou stopovou analýzu
- stlačené helium čistoty 0,99999
- dusík žárovkový
- silikagel 100, Merck
- florisil 60/100 mesh, Chromservis a.s
- voda čistoty Milli-Q

#### **Standardy:**

- CLP-semivolatile ISTD (Absolute Standards), 10009 – pro přípravu surrogate standardů
- Surrogate mix (Restek), 32000 - pro přípravu surrogate standardů
- PCB Mix 1 (Analytika), CE150 10I – pro externí kalibraci
- PAU Mix 2 (Analytika), CE002 4,5C – pro externí kalibraci
- CLP Semivolatile PAH Standard (Absolute Standards), 10007 - pro přípravu surrogate standardů
- Referenční materiál METRANAL 23

#### **Příprava sady kalibračních roztoků:**

Pro přípravu sady kalibračních roztoků se použijí certifikované roztoky standardů cílových analytů a to tak, že se nejprve do n-hexanu připraví zásobní roztok všech analytů o



koncentraci 1000 ng/ml (kalibrační úroveň č.5). Další kalibrační úrovně označené jako EN 1-4 o koncentracích 2, 10, 50, 200, se připraví ředěním této úrovně do n-hexanu. Kalibrační úroveň EN 6 o koncentraci 500 ng/ml se připraví pouze pro PAH. Roztoky jsou stále 3 měsíce. Kontrola koncentrace kalibračních roztoků se provádí měřením pracovního roztoku pro přípravu fortifikované matrice. Pro metodu stanovení s detekcí v režimu SIM se používá kalibrace nejméně 4 bodová s nástřikem standardu EN 1. Pro metodu stanovení s detekcí v režimu FULL se používá kalibrace nejméně 4 bodová s nástřikem standardu EN 2.

#### **Příprava surrogate standardů:**

Pracovní roztok surrogate standardů o koncentraci 2 µg/ml se připraví do 50 ml odměrné baňky přidáním 25 µl standardu CLP Semi volatil. ISTD (4000 µg/ml, Absolute Standards) a 500 µl standardu Surrogate mix (200 µg/ml, Restek) a doplněním odměrné baňky acetonem po rýsku. Roztoky jsou stále 3 měsíce. Pracovní roztok je označen EN-SS.

#### **Extrakce půd:**

Z homogenizovaného vzorku půdy navážíme do patrony extraktoru 10 g na předvážkách. Vzorek v patroně obohatíme 100 µl pracovního roztoku surrogate standardu v acetonu a patronu zasuneme do extrakčního prostoru. Vzorek extrahujeme programem po dobu 60 minut ponořený v 60 ml do vroucího rozpouštědla (140°C), po 60 minutách vytáhneme patronu nad vroucí roztok a dalších 60 min necháme rozpouštědlo vzorkem prokapávat. Získaný extrakt na extraktoru zahustíme na objem cca 5 ml a necháme jej 10 minut vychladnout. Vzorek je dále nutné přečistit pomocí kolonové chromatografie.

Pro přečištění je nejdříve nutná příprava deaktivovaného florisilu, silikagelu a eluční směsi:

*Příprava deaktivovaného florisilu:* Florisil se vyžihá při 500°C po dobu 12 hodin. Po té se přidá ke zváženému množství vyžihaného florisilu 15% hmotnostní přídavek vody čistoty Mili-Q (příklad: k 100 g florisilu se přidá 15 g vody) a nechá 12 hodin třepat na reciproční třepačce při frekvenci kyvů 300/min. Takto připravenou směs uchováváme v uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

*Příprava deaktivovaného silikagelu:* Silikagel se suší při 200 °C v sušárně po dobu 12 hodin. Po té se přidá ke zváženému množství vysušeného silikagelu 10% hmotnostní přídavek vody čistoty Milli-Q (příklad: k 100 g silikagelu se přidá 10 g vody) a nechá 12 hodin třepat na reciproční třepačce při frekvenci kyvů 300/min. Takto připravenou směs uchováváme v uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

*Eluční směs hexan:aceton (95:5)* se připraví smícháním 950 ml hexanu a 50 ml acetonu.

Do upravených skleněných kolonek se vloží skelná vata a nasype se nejprve 3 g deaktivovaného silikagelu (10% přídavkem vody), poté 3 g deaktivovaného florisilu (15% přídavkem vody) a nakonec laboratorní lžička bezvodého síranu sodného. Při každé vrstvě se poklepává na kolonku z důvodu odstranění případných mezer vzniklých při sypání. Kondicionace se provádí 25 ml n-hexanu pro stopovou analýzu. Na kolonku se nanese extrakt zemin (2-4 ml) a nechá se vsáknout. Eluce se provádí 85 ml směsí: hexan:aceton (95:5) a to následovně: nejdříve se zkumavka vypláchne cca 2 ml eluční směsí a po vsáknutí se nanese zbytek eluční směsí (83 ml). První 5ml podíl je odpadní, zbytek eluátu se jímá do hruškovité baňky se zábrusem. Extrakty se zakoncentrují na vakuové odparce na 6 ml. Extrakt se následně převede do 20 ml zkumavky, hruškovitá baňka se 3x vypláchne 1 ml hexanu a přidá do 20 ml zkumavky. Konečný objem extraktu zemin je jemným proudem dusíku upraven na objem 1 ml a převeden do vialky a předán k analýze.

S každou sérií reálných vzorků probíhá současně stanovení laboratorního slepého vzorku (extrakt hexanu) a referenčního materiálu (navážka 5 g) stejným postupem jako v případě reálného vzorku.

#### **5.3.2.2. Extrakce dle Soxhleta (*U.S. EPA Method 3540 Soxhlet extraction*)**

Vzorek určený k extrakci (cca 10 g) je usušen za pokojové teploty nebo smíchán s bezvodým síranem sodným, následně je vložen do extrakční patry, která je po dobu 16-24 h promývána kondenzujícím rozpouštědlem (cca 300 ml) v Soxhletově aparatuře. Po ukončení extrakce je vzorek nutno zakoncentrovat na Kuderna Danish aparatuře nebo pomocí vakuové odparky. Po zkoncentrování se vzorek přečišťuje na SPE kolonkách a následně znovu zkoncentruje a předá k analýze.

Vzorek je možné extrahovat pomocí různých rozpouštědel. Nejčastěji používané jsou směsi aceton/hexan (1:1), methylen chlorid/aceton (1:1), dichlormethan, 40% aceton rozpuštěný ve vodě, toluen/metanol (10:1).

EPA doporučuje vzhledem k nízké toxicitě použití směsi hexan:aceton (1:1), tato směs je zároveň v několika studiích prokázala nejlepší extrakční efektivitu extrakce (Lau et al., 2010).

#### **5.3.2.3. Extrakce pomocí ultrazvuku**

Extrakce ultrazvukem (*U.S. EPA Method 3550C Ultrasonic extraction*) se používá pro extrakci netěkavých a polotěkavých analytů z pevných vzorků, včetně půdních vzorků. 30 g vzorku se umístí do baňky, přidá se 100 ml rozpouštědla. Baňka se umístí do ultrazvuku a sonifikuje po dobu 3 min (další postupy doporučují sonifikaci po dobu např. 15 min). Vzorek se tímto způsobem extrahuje třikrát. Výsledný extrakt je opět nutné zkoncentrovat na Kuderna Danish aparatuře. Extrakce je ve srovnání s dvěma předchozími metodami vysoce závislá na druhu půdy a koncentraci kontaminantů ve vzorku (Lau et al., 2010)

#### **5.3.2.4. Mikrovlnná extrakce**

Metoda (*U.S. EPA Method 3546 Microwave extraction*) se používá pro extrakci ve vodě nerozpustných nebo velmi málo rozpustných organických látek z půd, sedimentů, kalů a odpadních materiálů. Extrakce probíhá v komerčně dostupných zařízeních. Zařízení využívá mikrovlnného záření k ohřevu vzorku na vyšší teplotu (100 – 115 °C), a zároveň ke zvýšení tlaku v uzavřeném systému (50 – 175 psi), který obsahuje vzorek a vhodné rozpouštědlo. Spotřeba rozpouštědla při mikrovlnné extrakci je nižší a extrakce probíhá 10 – 20 min. K extrakci se obvykle používá velmi malé množství vzorku cca 1 g, které nemusí být vždy dostatečné.

### **5.3.3. Chromatografické stanovení PAU, PCB a OCP v extraktech**

Kalibrace se provádí na pěti, respektive 7 (pro metodu C) koncentračních úrovních. Vztahy použité pro výpočet rovnice kalibrační křivky jsou uvedeny v kapitole Výpočty a vyjadřování výsledků. Četnost kalibrací na odezvu detektoru je minimálně jedenkrát za dva týdny. Chromatografické podmínky, pořadí analytů, kvalifikační a kvantifikační ionty jsou uvedeny v Tabulkách 1 až 3.

Metodou C –FULL jsou měřeny analyty PCB, OCP (včetně HCH) a PAU. Metoda SIM je vhodná pro některé PCB a isomery HCH.

### 5.3.3.1. Stanovení PAU, PCB a OCP

Parametry nastavení a postup stanovení ve dvou analytických programech (MS-FULL a MS-SIM) jsou uvedeny v Tabulce 1, Tabulky 2 a 3 uvádějí, pro které látky jsou jednotlivé analytické módy vhodné.

Tab. 1. Parametry postupu a nastavení pro chromatografické stanovení POP s uvedením analytů u jednotlivých metod

<b>Základní parametry shodné pro oba programy</b>	Kolona	Varian Factor 4 CP8944 (30m × 0,25mm × 0,25μm)
	Injektor	teplota 40°C (0,12 min), 500°C/min na 310°C Pulsní tlak 50 psi, pulsní čas 2,55 min, purge time 2,50 min,
	nosný plyn	Helium
	tlak na hlavě kolony	7 psi
	průtok nosného plynu	1 ml/min
	detektor	MSD, teplota - transferline 280 °C
<b>MS-FULL (pro PCB+OCP+PAH)</b>	teplotní program	60°C (2,65 min), 35°C/min do 100°C, 8°C/min do 220°C, 8°C/min do 305°C, 100 °C do 310 (6min), doba analýzy ... 37,34 min.
	nástřik	4 μl
<b>MS-SIM (pro PCB+isomery HCH)</b>	teplotní program	60°C (2,65 min), 100°C/min do 220°C, 5°C/min do 240°C, 100°C/min do 310°C (8min) doba analýzy ... 16,95 min.
	nástřik	3 μl

### Výpočty a vyjadřování výsledků, odhad nejistot

Linearita kalibrační křivky byla pro jednotlivé analyty ověřena v rozsahu koncentrací uvedených v 8 bodech (2, 10, 50, 200, 1000, 5000 ng/ml). Hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé analyty s lineární odezvou by neměly být menší než 0,985, tzn. metoda je v navrhovaném rozsahu lineární.

Koncentrace analytu v zeminách se vypočte metodou vnější kalibrace s následnou korekcí na surrogate standard a je vypočtena ze vztahu:

$$cz = \frac{c_i \times V_k}{M_{vz}} \times \frac{10}{\text{Rec} \times \text{Sus}}$$

kde  $cz$  je koncentrace analytu v zeminách [mg/kg sušiny],  $c_i$  je koncentrace analytu změřená na GC [ng/ml],  $V_k$  je konečný objem zkoncentrovaného extraktu [ml],  $M_{vz}$  je navážka vzorku [g] použitého k extrakci, **Rec** - výtěžnost surrogate standardu [%], **Sus** – sušina [%].

Nejistota měření se vyjadřuje jako dvojnásobek směrodatné odchylky měření fortifikovaných vzorků za podmínek reprodukovatelnosti. Jde tedy o rozšířenou (k=2) kombinovanou nejistotu zahrnující dílčí nejistoty pipetování, odměrování objemů extrakčních činidel, extrakce vzorku, odměrování objemů extraktů, dávkování, měření, přípravy kalibračních standardů a integrace chromatogramu. Ostatní složky nejistot byly zanedbány. Pro výpočet nejistot byla užitá sada dat s nejvyššími hodnotami relativní směrodatné odchylky.

Tab. 2. Pořadí analytů, kvalifikační a kvantifikační ionty pro GC-MS systém, metoda FULL

Analyt	Kvant. ion	Q1 ion	Q2 ion	Q3 ion
D4-1,4 dichlorbenzen	150,0	152,0	115,0	78,0
hexachlorethan	200,9	164,0	166,0	202,8
d8-naftalen	136,1	108,0	137,1	134,0
naftalen	128,1	102,0	129,1	127,0
hexachlorbutadien	224,9	226,9	259,8	189,9
1,2,4,5+1,2,3,5-tetrachlorbenzen	215,9	213,9	217,9	180,9
1,2,3,4-tetrachlorbenzen	215,9	213,9	217,9	180,9
acenaftylen, other PAH	152,1	76,0	126,0	151,1
D10-acenaften	164,1	162,1	160,1	163,1
acenaften, other PAH	153,1	154,1	152,1	76,0
pentachlorbenzen	249,9	251,8	214,9	212,9
fluoren, other PAH	166,1	165,1	167,1	163,1
TCMX	243,9	209,0	207,0	241,9
trifluralin	306,1	264,0	290,1	335,0
a-HCH	218,9	254,0	216,9	220,9
HCB	283,8	285,8	281,8	283,8
b-HCH	218,9	254,0	216,9	220,9
g-HCH	218,9	254,0	180,9	216,9
D10-fenantrhren	188,1	189,1	184,1	160,0
fenanthren	178,1	176,0	152,1	179,0
anthracen	178,1	176,0	152,1	179,0
d-HCH	218,9	254,0	220,9	216,9
PCB 28	256,0	258,0	186,0	260,0
alachlor	160,1	188,1	237,1	169,1
heptachlor	271,8	273,8	336,9	372,0
PCB 52	291,9	289,9	220,0	255,0
aldrin	262,9	264,9	293,0	298,0
telodrin	310,9	312,8	374,8	377,0
isodrin	262,9	194,9	192,9	364,0
cis heptachloroepoxid	352,9	236,8	354,9	262,8
trans heptachloroepoxid	352,9	236,8	354,9	262,8
fluoranthren	202,1	200,1	203,1	201,1
o,p-DDE	246,0	248,0	317,9	315,9
PCB 101	325,9	323,9	253,9	291,0
pyren	202,1	200,1	101,0	204,1
a-endosulfan	338,9	276,9	307,0	265,0
p,p DDE	246,0	248,0	317,9	315,9
dieldrin	262,9	278,9	277,0	237,0
o,p DDD	235,0	237,0	165,1	199,0
endrin	262,9	265,0	344,9	279,0
PCB 118	325,9	323,9	255,9	328,0
endosulfan II	195,0	236,9	266,9	338,9
p,p DDD	235,0	237,0	165,1	199,0
o,p DDT	235,0	237,0	165,1	199,0
PCB 153	359,9	361,9	289,9	364,0
p,p DDT	235,0	237,0	165,1	246,0

Analyt	Kvant. ion	Q1 ion	Q2 ion	Q3 ion
PCB 138	359,9	361,9	289,9	325,0
benzo-(a)-anthracen	228,1	229,1	224,0	226,0
D12-chrysen	240,2	236,2	120,1	241,0
methoxychlor	227,1	152,0	212,1	196,0
chrysen, karc. PAH	228,1	229,1	226,0	227,0
PCB 180	393,8	395,9	323,9	359,0
benzo-(b)-fluoranthen	252,1	250,1	253,0	248,0
benzo-(k)-fluoranthen	252,1	250,1	254,0	248,0
PCB 209	497,7	499,7	427,8	503,7
benzo-(a)-pyren	252,1	253,0	250,1	248,0
D12-perylen	264,2	260,1	132,1	265,0
indeno-pyren, karc PAH	276,1	277,1	138,1	274,0
dibenzo-(a,h)-anthracen	278,1	279,1	276,0	274,0
benzo-(ghi)-perylen	276,1	274,1	138,0	277,1

Tab. 3. Pořadí analytů, kvalifikační a kvantifikační ionty pro GC-MS systém - metoda SIM

Analyt	Kvant. ion	Q1 ion	Q2 ion	Q3 ion
TCMX	243,9	209,0	207,0	241,9
a-HCH	218,9	253,9	216,9	180,9
b-HCH	218,9	253,9	216,9	180,9
g-HCH	218,9	253,9	218,9	216,9
d-HCH	218,9	253,9	180,9	216,9
PCB 28	256,0	258,0	186,0	188,0
PCB 52	291,9	289,9	220,0	255,0
PCB 101	325,9	323,9	253,9	291,0
PCB 118	325,9	323,9	255,9	328,0
PCB 153	359,9	361,9	289,9	325,0
PCB 138	359,9	361,9	289,9	325,0
PCB 180	393,9	395,9	323,9	359,0
PCB 209	497,7	499,7	427,8	503,7

#### 5.4. Stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů - PCDDF

Přesné stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů v půdě je náročné finančně i na zařízení laboratoře, je vyžadován plynový chromatograf s vysokým rozlišením s hmotnostní detekcí s vysokým rozlišením (HRGC/HRMS). Proto je zpravidla prováděno pouze ve specializovaných laboratořích. Jinou možností je screening, pomocí kterého lze vytipovat vzorky s vyšším obsahem některých dioxinů, jež je potom vhodné podrobit přesnější analýze. Screening lze dělat buď pomocí běžnější GC/MS nebo pomocí imunotestů.

##### 5.4.1. Extrakce polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů pro měření GC/MS nebo HRGC/HRMS

Pro účely screeningu pomocí GC/MS i pro přesné stanovení pomocí HRGC/HRMS se dioxiny z půdy extrahují do toluenu. Surový extrakt se převede do hexanu a přečistí na koloně se silikagelovým sorbentem smočeným koncentrovanou kyselinou sírovou. Dalším stupněm

čištění je adsorpce planárních aromatických sloučenin na aktivní uhlí. Používá se metoda izotopicky značených vnitřních standardů. Při stanovení dioxinů je používána metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Při chromatografii je nosným plynem helium.

#### **5.4.2. Screeningové stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů pomocí imunostestů**

Extrakce vzorků se provede podle pokynů výrobce komerčních kitů. Obecně se jedná o přidání síranu sodného k určenému množství půdy, ke vzorku se dále přidá dimethylformamid a vzorek se 2 h protřepává. Extrakt je přečištěn směsí hexanu a koncentrované kyseliny sírové. Extrakt se dále odpaří a převede do s vodou mísitelného rozpouštědla. Takto je extrakt připraven k analýze dle pokynů výrobce.

### **5.5. Mikrobiální parametry půd**

Pro pilotní informaci o biologické půdní kvalitě lze použít standardní kombinaci kvantifikace mikrobiální biomasy půd (stanovení mikrobiálně vázaného uhlíku  $C_{bio}$ ) a stanovení její mineralizační aktivity bez a s přidavkem substrátu (bazální respektive substrátem indukovaná respirace, BR respektive SIR). Tyto parametry jsou doporučeny proto, že další aktivity jako například nitrifikace jsou v lesních půdách často inhibovány nízkým pH. Uvedené analýzy je vhodné provádět na vzorcích nadložních horizontů (F+H) a horizontů organominerálních (A, 0-2 cm, případně 2-10 cm). Pro mikrobiální analýzy půda nesmí vyschnout, proto hned po odběrech, nebo jakmile to její struktura dovolí, je půda přesáta přes síta s průměrem ok 2 mm a skladována v přirozené vlhkosti ve 4 °C v takovém přístupu vzduchu, který nezpůsobí vysychání půdy, ale zamezí vzniku anaerobních podmínek. Před stanovením mikrobiálních parametrů je půda předinkubována několik dní ve 22 °C, aby se aktivovaly a stabilizovaly mikrobiální procesy. Analýzy mikrobiálních parametrů musí proběhnout co nejdříve po odběrech, nejpozději 3-5 měsíců po odběru. Následující metodika je založena na ISO normách a standardních operačních postupech laboratoří RECETOX.

#### **5.5.1. Velikost mikrobiální biomasy – $C_{bio}$**

##### **Princip metody:**

Mikrobiální biomasa –  $C_{bio}$  je měřena dle normy ISO 14240-2 (1997). Metoda je založena na usmrcení a lýzi buněk půdních mikroorganismů tím, že jsou vystaveny parám chloroformu (fumigantu - redestilovaný chloroform bez etanolu). Tím dojde k uvolnění uhlíku z mikrobiálních buněk a k jeho zpřístupnění extrakci. Biomasa je pak stanovena z rozdílu extrahovatelného C ve fumigovaných (F) a nefumigovaných (NF) vzorcích.

##### **Potřeby a přístroje:**

- Váhy s přesností na 0,1g a analytické váhy
- Třepačky
- Skleněné pipety 1, 2, 5 a 10ml či mikropipety s vhodnými špičkami
- Infúzní láhve 100 či 120ml s víčky
- Exsikátor, vývěva olejová
- Odměrný válec 50ml
- Nálevky, baňky, kádinky
- Filtrační papíry kvantitativní FILTRAK 391 (či Whatman 42, Machery & Nagel 261 G1/4)
- Automatická byreta

**Chemikálie:**

- Chloroform bez ethanolu
- Kyselina sírová, kyselina fosforečná
- 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (87,1g / 1000 ml)
- 0,0667M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1,9622 g / 100ml)
- Roztok Mohrovy soli 0,1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (39,2140 g + 20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 1000 ml)
- Indikátor - 0,5 g difenylaminu + 20 ml dH<sub>2</sub>O + 100ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

**Postup stanovení:**

10 g vzorků půdy v přirozené vlhkosti se naváží do skleněných lahví o objemu 100 ml ve třech opakováních ve fumigované i nefumigované variantě a ovlhčí se na 60 % maximální vodní kapacity půdy pro lepší pronikání chloroformu do půdní struktury. Vzorky k fumigaci jsou vystaveny v exsikatoru parám z cca 60 ml chloroformu. Exsikator je ponechán evakuovaný v temnu při laboratorní teplotě 22 hodin, poté je otevřen, je vyjmut chloroform a 12-krát opakovaně odsáván pro odstranění zbytků par chloroformu. Extrakce fumigovaných i nefumigovaných vzorků se provádí 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> při extrakčním poměru 1/4 (w/v) a třepáním po dobu 30 min. Extrakty jsou zfiltrány přes kvantitativní filtrační papír FILTRAK 391 a uskladněny při 4 °C maximálně 24 hodin před stanovením uhlíku. Obsah C v extraktech je stanoven spalováním chromsírovou směsí (8 ml vzorku, 2 ml dichromanu, 10 ml kyseliny sírové a 5 ml kyseliny fosforečné, spalovat při 120 °C 1 hod) a zpětnou titrací zbývajícího dichromanu roztokem Mohrovy soli (indikátor – difenylamin). Uhlík v extraktech lze také stanovit pomocí analyzátoru TOC. Uhlík imobilizovaný v biomase - E<sub>C</sub> - získáme randomizací odečtu C<sub>NF</sub> od C<sub>F</sub> hodnot (průměr a směrodatná odchylka). C<sub>bio</sub> lze pak spočítat jako C<sub>bio</sub> = 2,64 × E<sub>C</sub>.

**5.5.2. Mineralizační aktivita půdních mikroorganismů bez přídavku substrátu (bazální respirace – BR)****Princip metody:**

Bazální respirace se stanoví jako produkce CO<sub>2</sub> půdou v uzavřené infuzní láhvi (ISO 16072).

**Potřeby a přístroje:**

- Infusních lahve o objemu 120 ml s gumovou zátkou
- Injekční stříkačka
- Plynový chromatograf s tepelně vodivostním detektorem
- Termostat

**Chemikálie, plyny:**

- Hélium
- CO<sub>2</sub> v Ar o koncentraci 1,1 %

**Postup stanovení:**

Půdní vzorky jsou naváženy po 10 g do infusních lahví o objemu 120 ml, ovlhčeny na cca 40% maximální vodní kapacity a inkubovány několik dní ve 22°C pro ustálení mikrobiálních aktivit. Poté jsou vzorky provětrány, přidána destilovaná voda na 60 % maximální vodní kapacity a lahve uzavřeny pryžovými zátkami. Po 24 hodinách inkubace ve 22°C je změřena produkce CO<sub>2</sub> analýzou vzorku plynu (1 ml) nad půdou, který byl odebrán z láhve injekční stříkačkou. Koncentrace CO<sub>2</sub> je analyzována na plynovém chromatografu s tepelně vodivostním detektorem s mobilní fází He a stacionární fází kapilární kolonou J&W GS-

GasPro (délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm). Jako kalibrační plyn lze použít CO<sub>2</sub> v argonu o koncentraci 1,1 %.

### **5.5.3. Mineralizační aktivita půdních mikroorganismů s přidavkem substrátu (substrátem indukovaná respirace – SIR)**

#### **Princip metody:**

Substrátem (přidavkem glukózy) indukovaná respirace je měřena dle normy ISO 14240-1 (1997).

#### **Potřeby a přístroje:**

- Infuzních lahve o objemu 120 ml s gumovou zátkou
- Injekční stříkačka
- Plynový chromatograf s tepelně vodivostním detektorem
- Termostat

#### **Chemikálie a plyny:**

- Glukóza
- Hélium
- CO<sub>2</sub> v Ar o koncentraci 1,1 %

#### **Postup stanovení:**

Půdní vzorky jsou naváženy po 10 g do infuzních lahví o objemu 120 ml, ovlhčeny na cca 40% maximální vodní kapacity a inkubovány několik dní ve 22°C pro ustálení mikrobiálních aktivit. Poté jsou vzorky provětrány. Vzorky půdy jsou následně ovlhčeny na 80 % maximální vodní kapacity tak, že v roztoku je dodána glukóza (0,5 % uhlíku v glukóze na 1 gram sušiny půdy). Poté jsou infuzní lahve uzavřeny pryžovými zátkami a po dobu šest hodin (inkubace při 22°C) je měřena produkce CO<sub>2</sub> analýzou vzorku plynu (1 ml) nad půdou, který je odebrán z lahve injekční stříkačkou. Koncentrace CO<sub>2</sub> je analyzována na plynovém chromatografu s tepelně vodivostním detektorem s mobilní fází He a stacionární fází kapilární kolonou J&W GS-GasPro (délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm). Jako kalibrační plyn je použit CO<sub>2</sub> v argonu o koncentraci 1,1 %. Lineární regresí závislosti CO<sub>2</sub> na čase lze vypočítat SIR.

## **5.6. Ekotoxikologické testy**

Protože se jedná o půdy lesní, které ze zkušeností nejsou vhodné z důvodu svých fyzikálně-chemických vlastností (např. nižší pH, nevhodná kompozice organické hmoty) pro testy se žížalou *Eisenia fetida* či pro testy s rostlinami, lze doporučit dva testy ekotoxicity: test na reprodukci chvostoskoků *Folsomia candida* a test na reprodukci roupic *Enchytraeus crypticus*. Roupice a chvostoskoci zastupují typické složky fauny lesních půd, která má významnou dekompoziční roli v půdě spočívající zejména ve fragmentaci rostlinných zbytků v opadu, promíchávání organických zbytků s půdou a tvorbě půdní struktury. Dva druhy jsou použity proto, že reprezentují dosti odlišné skupiny s odlišnou morfologií a také expozičními cestami (měkký tělní povrch roupic proti chitinovému exoskeletonu chvostoskoků). Metodika testů ekotoxicity s chvostoskokem *Folsomia candida* a roupicí *Enchytraeus crypticus* je založena na ISO normách a standardních operačních procedurách laboratoří RECETOX. Testy je doporučeno použít na vzorky nadložního humusu, tedy F+H.

Vzorky půd pro testy ekotoxicity se vysuší za laboratorní teploty a poté jsou přesáty přes síto s oky 2 mm a skladovány v suchu v laboratorní teplotě. Před vlastními testy toxicity



se půda ovlhčí na 50 % maximální vodní kapacity. Testy se provádějí ve 4 opakováních na každou půdu. Protože výsledky testů vykazují určitou fluktuaci, se sadou 5-10 vzorků půd je vždy testována také půda referenční (kontrola) - umělá půda smíchaná dle ISO 16387 (2004) z písku, jílu a rašeliny a ovlhčená na 50 % maximální vodní kapacity a testována v 8 opakováních. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako relativní hodnoty vůči této kontrole, čímž je možné srovnat více vzorků mezi sebou. U chvostoskoka a roupice se hodnotí přežívání a reprodukce (počet juvenilů) po 28 dnech.

### **5.6.1. Test na reprodukci roupic *Enchytraeus crypticus***

#### **Princip metody:**

Za řízených podmínek se hodnotí přežívání a rozmnožování jedinců roupic vysazených do vzorku. Postup tohoto testu toxicity odpovídá normovaným postupům dle ISO 16387 (2004) a OECD (2004).

#### **Potřeby a přístroje:**

- Petriho misky, plastové krabičky, háček z mikrobiologické kličky
- Testovací nádoby s víčky, misky
- Fotoaparát

#### **Chemikálie, pomocné látky:**

- Ovesné vločky pro krmení
- Agar
- Etanol
- Roztok Bengálské červeně
- Koloidního oxid křemičitý (Ludox)

#### **Postup stanovení:**

Jedinci *Enchytraeus crypticus* se chovají na 1,3 % agaru na Petriho miskách. Krmí se mletými ovesnými vločkami. Před experimentem se potřebné množství dospělých roupic (s opaskem a vajíčky) přemístí do kontrolní půdy na aklimatizaci. Testované vzorky se rozváží po 20 g do testovacích nádob, přidají se mleté ovesné vločky a do každé nádoby se přidá 10 dospělých jedinců z aklimatizace. Nádoby se uzavrou víčky a uloží do 20 °C. Každý týden probíhá kontrola ztráty vlhkosti a přidávání potravy. Po 28 dnech se stanoví počet přeživších dospělců a nově narozených juvenilů. Ke vzorku se přidá 5 ml etanolu, voda do výšky 2 – 3 cm a několik kapek roztoku Bengálské červeně. Druhý den jsou roupice obarveny a provede se vyplavení pomocí koloidního oxidu křemičitého (Ludox) na vodní hladinu a její fotografování. Dle velikosti lze na snímcích rozlišit dospělé a juvenilů a určit jejich počet. Výstupem je počet přežívajících dospělců, počet vyprodukovaných juvenilů a počet juvenilů na jednoho dospělého.

### **5.6.2. Test na reprodukci chvostoskoků *Folsomia candida***

#### **Princip metody:**

Za řízených podmínek se hodnotí přežívání a rozmnožování jedinců chvostoskoků vysazených do vzorku. Postup testu byl zpracován na základě ISO 11267 (1999) a OECD (2009).

#### **Potřeby a přístroje:**

- Testovací nádoby s víčky

- Miska, štětec
- Fotoaparát

**Chemikálie, pomocné látky:**

- Sádra, aktivní uhlí
- Kvasnice na krmení
- Inkoust

**Postup stanovení:**

Chvostoskoci *Folsomia candida* se chovají na směsi sádry a aktivního uhlí 9:1, která je pravidelně vlhčena. Potravou jsou drcené suché kvasnice. Před vlastním testem se provede synchronizace za účelem, získat jedince stejného stáří (10 - 12 dnů). Do testovací nádoby se naváží 20 g vzorku, přidá trochu drcených kvasnic a 10 jedinců ze synchronní kultury. Nádoby se uzavřou parafilmem a uloží do 20 °C. Každý týden je kontrolován úbytek vody a přidána potrava. Po 28 dnech se vzorek převrství vodou, jemně promíchá, suspenze se přelije do misky a obarví inkoustem. Povrch hladiny se vyfotí fotoaparátem s dostatečným rozlišením a bílí, dobře viditelní chvostoskoci se následně na snímku lehce spočítají. Dospělce lze snadno odlišit od juvenilů na základě velikosti. Výstupem je počet přežívajících dospělců, počet vyprodukovaných juvenilů a počet juvenilů na jednoho dospělého.

## **6. DOPLŇKOVÉ INFORMACE**

### **6.1. Přínos metodiky**

Metodika soustřeďuje informace o analytických metodách stanovení potenciálně rizikových látek v lesních půdách, včetně metod mikrobiologického a ekotoxikologického hodnocení. Aplikace této metodiky umožní sjednocení postupů používaných pro hodnocení kontaminace lesních půd na různých pracovištích a usnadní tak vzájemnou porovnatelnost výsledků. Zavedení jednotných metod je také prvním krokem k vytvoření srovnávacích hodnot pro posuzování úrovně kontaminace v různých kategoriích lesních stanovišť.

### **6.2. Zhodnocení novosti postupů**

Metodika přináší kombinaci standardních analýz zachycených v platných národních i mezinárodních normách s vybranými postupy mikrobiologických a ekotoxikologických analýz ověřenými výzkumnými projekty vědeckých pracovišť v zahraničí i vlastním řešitelským kolektivem. Představuje tak komplexní a ucelený soubor metod, které lze využít pro stanovení kontaminace lesních půd a hodnocení rizika obsahu potenciálně rizikových prvků a perzistentních organických polutantů pro lesní ekosystém.

### **6.3. Popis uplatnění metodiky**

Metodika je určena pro organizace zabývající se průzkumem půdního prostředí lesních porostů ve vztahu ke zdravotnímu stavu dřevin, produkci a plnění mimoprodukčních funkcí lesních ekosystémů. Bude využita především výzkumnými pracovišti, univerzitami a rezortními organizacemi odvětví lesního hospodářství.

V návaznosti na diferencované srovnávací referenční hodnoty bude možné metodiku uplatnit jako první krok pro hodnocení úrovně kontaminace lesních půd ve vymezených územích nebo i na menších plochách. Výsledky tohoto prvního kroku hodnocení by měly sloužit k rozhodování, zda je účelné použití přesnějších (avšak náročnějších) metod hodnocení, především rizikové analýzy, která by charakterizovala rizika pro ekosystémy nebo člověka vzhledem ke konkrétním podmínkám stanoviště.

Metodika přináší ovšem cenné informace i pro vlastníky a správce lesních majetků, na kterých se projevují narušení zdravotního stavu či ztráta na produkci vlivem kontaminace půdního prostředí, zejména v oblastech výrazněji zatížených vstupy potenciálně rizikových prvků nebo persistentních organických polutantů.

### **6.4. Ekonomické aspekty**

Uplatnění jednotné metodiky hodnocení kontaminace půd zjednoduší dosud často diverzifikované laboratorní postupy. Při počtech běžně analyzovaných půdních vzorků různými pracovišti lze odhadovat v tomto směru ekonomický přínos 200 až 500 tis. Kč ročně. Jednotná metodika analýz umožní následně vytvořit jednotná kritéria pro objektivní hodnocení kontaminace lesních půd, což může znamenat další ekonomické přínosy.

Ekonomické aspekty využití této certifikované metodiky jsou ale z větší části nepřímé a nevyplývají přímo pro její přímé uživatele, ale následně pro vlastníky a správce lesů v oblastech s narušeným půdním prostředím. Cílené analýzy půd, které poskytnou objektivní informace o obsahu a účincích rizikových látek, umožní efektivnější plánování případných remediačních zásahů. V tomto směru lze očekávat celkový ekonomický přínos v rozsahu 1 až 2 mil. Kč ročně.

## **6.5. Dedikace**

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektu NAZV QI112A201 „Metody hodnocení zátěže lesních půd rizikovými látkami a identifikace ekologických rizik kontaminace lesních půd“. Využity byly i podklady získané jednotlivými zúčastněnými pracovišti v rámci předchozích výzkumných projektů.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Baize, D., Sterckeman, T. (2001): Of the necessity of knowledge of natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Science of the Total Environment*, 264: 127–139.
- Borůvka, L., Vacek, O., Jehlička, J. (2005): Principal component analysis as a tool for the indication of the origin of potentially toxic elements in soils. *Geoderma*, 128: 289-300.
- Čermák P. et al. (2008): Obsahy rizikových prvků a látek a základní agrochemické charakteristiky půd v oblasti jižních a západních Čech. Mezinárodní projekt realizovaný ÚKZÚZ v rámci programu Iniciativy Evropských společenství INTERREG IIIA (Bavaria – Czech Republic), Priority 3, Measures 3.1 – Protection of nature and environment 2008. ÚKZÚZ Brno, 68 s. ISBN 978-80-7401-010-1
- DIN, Deutsches Institut für Normung (1995): Bodenbeschaffenheit. Extraktion von Spurenelemente mit Ammonium-nitratlösung. Vornorm DINV 19730, DIN Boden-Chemische Bodenuntersuchungs-verfahren, Berlin, Germany.
- Fiala, P., Reininger, D., Samek, T. (2010): Vyhodnocení dat chemických analýz z průzkumu na trvalých zkušných plochách, provedeného v roce 2009. Závěrečná zpráva. ÚKZÚZ, Brno: 45s.
- Fiala, P., Reininger, D., Samek, T. (2011): Vyhodnocení dat chemických analýz z průzkumu na trvalých zkušných plochách, provedeného v roce 2010. Závěrečná zpráva. ÚKZÚZ, Brno: 27s.
- Fisher, R.F., Binkley, D., 2000: Ecology and management of forest soils. Third edition. John Wiley & Sons, Inc.: 489 pp.
- Frey, B., Stemmer, M., Widmer, F., Luster, J., Sperisen, C. (2006): Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1745-1756.
- Frey, B., Zierold, K., Brunner, I. (2000): Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies*–*Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant, Cell and Environment*, 23: 1257-1265.
- Hernandez, L., Probst, A., Probst, J. L., Ulrich, E. (2003): Heavy metal distribution in some French forest soil: evidence for atmospheric contamination. *Science of the Total Environment*, 312: 195-219.
- Holoubek I. et al. (2003): Národní inventura perzistentních organických polutantů v České republice. Project GF/CEH/01/003 Enabling activities to facilitate early action on the implementation of the Stockholm Convention on Persistent organic pollutants (POPs) in the Czech Republic. TOCOEN REPORT No. 249.
- Holoubek, I., Čupr, P., Škarek, M., Černá, M., Sáňka, M. (2002): Shrnutí měření kontaminace okolí Spolany Neratovice PCDD/F a bifenyly po povodních 2002. TOCOEN, s.r.o. Brno. TOCOEN REPORT No. 236: 62s.
- Cheema, S.A., Khan, M.I., Shen, C.F., Tang, X.J., Farooq, M., Chen, L., Zhang, C.K., Chen, Y.X. (2010): Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 384-389.
- Chlopecka, A, Bacon, J.R., Wilson, M.J., Kay, J. (1996): Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from southwest Poland. *Journal of Environmental Quality*, 25: 69-79.

- ISO 11267 (1999). Soil Quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 11466 (1995): Soil Quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO 14240-1 (1997): Soil quality. Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 14240-2 (1997): Soil quality. Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 16072 (2002): Soil quality. Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. International Organization for Standardization.
- ISO 16387 (2004): Soil Quality. Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 19730 (2008): Soil quality. Extraction of trace elements from soil using ammonium nitrate solution. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jamnická, G., Bučinová, K., Havranová, I., Urban, A. (2007): Current state of mineral nutrition and risk elements in a beech ecosystem situated near the aluminium smelter in tiár nad Hronom, Central Slovakia. *Forest Ecology and Management*, 248:ist 26-35.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. (1992): Trace elements in soils and plants, 2nd ed. CRC Press, London.
- Kalač, P., Nižňanská, M., Bevilaqua, D., Stašková, I. (1996): Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and a copper smelter. *Science of the Total Environment*, 177: 251-258.
- Kalač, P., Svoboda, L. (2000): A review of trace element concentration in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69: 273-281.
- Kelly, J.J., Haggblom, M.M., Tate, R.L. (2003): Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biology and Fertility of Soils*, 38: 65-71.
- Komárek, M., Ettler, V., Chrástný, V., Mihaljevič, M. (2008): Lead isotopes in environmental sciences: A review. *Environment International*, 34 (4): 562-577.
- Krauss, M., Wilcke, W., Martius, C., Banderia, A.G., Garcia, M.V.B., Amelung, W. (2005): Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental Pollution* 135: 143-154.
- Lau, E.V., Gan, S., Ng, H.K (2010): Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2010: 9p.
- Menon, M., Hermle, S., Abbaspour, K.C., Günthardt-Goerg, M.S., Oswald, S.E., Schulin, R. (2005): Water regime of metal-contaminated soil under juvenile forest vegetation. *Plant and Soil*, 271: 227-241.
- Monna, F., Lancelot, J., Croudace, I.W., Cundy, A.B., Lewis, J.T. (1997): Pb isotopic composition of airborne particulate material from France and the southern United

- Kingdom: implications for Pb pollution sources in urban areas. *Environmental Science and Technology*, 31: 2277-2286.
- Mutsch, F., Horak, O., Kinzel, H. (1979): Spurenelemente in höheren pilzen. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 94: 1-10.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Pastuszková, M. (1995): Pozad'ové obsahy potenciálně rizikových prvků v půdách ČR (obsahy v extraktu 2M HNO<sub>3</sub>). *Rostlinná Výroba*, 41 (1): 25-29.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Pastuszková, M. (1996): Návrh limitů kontaminace půd perzistentními organickými xenobiotickými látkami pro ČR. *Rostlinná Výroba*, 42 (2): 49-53.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Pastuszková, M. (1997): Některé specifické rysy kontaminace půd ČR perzistentními organickými xenobiotickými látkami. *Rostlinná Výroba*, 43: 365-370.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Vácha, R. (1996): Geochemické a antropogenní zatížení půd. *Rostlinná výroba*, 42 (12): 535-541.
- Oades, J. M. (1984): Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*, 76: 319-337.
- OECD (2004): Enchytraeid Reproduction Test. Test No. 220. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD (2009): Collembolan Reproduction Test in Soil. Test No. 232. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Hálová, G. (1994a): The load of fluvisols of Labe by risk compounds. *Rostlinná Výroba*, 40: 69-80.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Hálová, G. (1994b): Pozad'ové hodnoty obsahů potenciálně rizikových prvků v půdách ČR (celkové obsahy). *Rostlinná Výroba*, 40: 1095-1105.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Sirový, V., Lhotský, J. et al. (1992): Rozbory půd, vod a rostlin. VÚMOP, Praha.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (2000): Zatížení zemědělských půd polychlorovanými dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany. *Rostlinná Výroba*, 46: 349-354.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R., Pastuszková, M. (1998): Contamination of soils with persistent organic xenobiotic substances in the Czech Republic. *Toxicology and Environmental Chemistry* 66: 91-103.
- Probst, A., Hernandez, L., Probst, J.L. (2003): Heavy metals partitioning in three French forest soil by sequential extraction procedure. *Journal De Physique IV*, 107: 1103-1107.
- Ramos, L., Hernández, L.M., González, M.J. (1994): Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from near Donana National Park. *Journal of Environmental Quality*, 23: 50-57.
- Rezek, J., der Wiesche, C., Macková, M., Zdražil, F., Macek, T. (2009): Biodegradation of PAHs in long-term contaminated soil cultivated with European white birch (*Betula pendula*) and red mulberry (*Morus rubra*) tree. *International Journal of Phytoremeditaion*, 11: 66-81.

- Römkens, P.F.A.M., Salomons, W. (1998): Metal mobility and risk assessment. *Soil Science*, 163: 859-871.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., Jones, D.L. (2001): Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 527-560.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D. (1999): Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 237-251.
- Shotyk, W., Laser, P., Grünig, A., Cheburkin, A.K. (2000): A new approach for quantifying cumulative, anthropogenic, atmospheric lead deposition using peat cores from bogs: Pb in eight Weiss peat bog profiles. *Science of the Total Environment*, 249: 281-295.
- SOP Stanovení semivolatilních organických látek (2006), Q21-350-016/02, Standardní operační postup zahrnuje stanovení obsahu analytů v pitných, povrchových, podzemních, odpadních vodách a zeminách metodou GC s hmotnostní detekcí.
- Thiele, S., Brümmer, G.W. (1999): Chemische Extraktionverfahren zur Abschätzung des mikrobiell abbaubaren PAK-Anteils kontaminierten Böden. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 91/I: 522-525.
- Tyler, G. (1992): Critical Concentrations of Heavy Metals in the Mor Horizon of Swedish Forests. Swedish Environmental Protection Agency, Solna.
- U.S. EPA Method 3540 (1996): Soxhlet extraction
- U.S. EPA Method 3541 (1994): Automated Soxhlet extraction
- U.S. EPA Method 3546 (2007): Microwave extraction
- U.S. EPA Method 3550C (2007): Ultrasonic extraction
- U.S. EPA Method 4025 (2002): Screening for polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) by immunoassay.
- U.S. EPA Method 8270D (2007): Semivolatile organic compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).
- U.S. EPA Method 8280B (2007): The analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by high resolution gas chromatography/low resolution mass spectrometry (HRGC/LRMS).
- U.S. EPA Method 8290A (2007): Polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS).
- Uhlířová, H., Hejdová, J. (1999): Těžké kovy v lesních ekosystémech České republiky. *Zprávy lesnického výzkumu*, 44: 1-10.
- Vácha, R., Němeček, J., Podlešáková, E. (2002): Geochemical and anthropogenic soil loads by potentially risky elements. *Rostlinná Výroba*, 48 (10): 441-447.
- Vácha, R., Podlešáková, E., Němeček, J., Poláček, O. (2001): Stav zatížení zemědělských půd perzistentními organickými polutanty. *Chemické Listy*, 95: 590-593.
- Vácha, R., Poláček, O. Horváthová, V. (2003): State of contamination of agricultural soils after floods in August 2002. *Plant, Soil and Environment*, 49: 307-313.



- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E. (2006): The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Review. Toxicological Sciences, 93 (2): 223-241.
- Vokoun, J. a kolektiv (2002): Příručka pro průzkum lesních půd. Ústav pro hospodářskou úpravu lesů, Brandýs nad Labem: 44 s.
- Yelpatyevsky, P.V., Arghanova, V.S., Lutsenko, T.N. (1995): Heavy metals in polluted ecosystem of an oak forest. Science of the Total Environment, 162: 13-18.
- Záhornadská, J. (2002): Srovnávací studie analytických metodik pro rozbory půd VÚLHM a ÚKZÚZ. VÚLHM, Strnady: 17s.
- Zbiral J. (2003): Analýza půd II. Jednotné pracovní postupy. ÚKZÚZ, Brno.
- Zbiral, J. (2002): Analýza půd I. Jednotné pracovní postupy. ÚKZÚZ, Brno

## 8. SEZNAM PŘEDCHÁZEJÍCÍCH PUBLIKACÍ AUTORŮ K TÉMATU

- Borůvka, L., Drábek, O. (2004): Heavy metal distribution between different fractions of humic substances in a heavily polluted soil. *Plant, Soil and Environment*, 50 (8): 339-345.
- Borůvka, L., Huan-Wei, Ch., Kozák, J., Křišťoufková, S. (1996): Heavy contamination of soil with cadmium, lead and zinc in the alluvium of the Litavka river. *Rostlinná Výroba*, 42 (12): 543-550.
- Borůvka, L., Kozák, J., Křišťoufková, S. (1997): Distribution of Cd, Pb and Zn in plants grown on heavily polluted soils. *Rostlinná Výroba*, 43 (6): 249-256.
- Borůvka, L., Kozák, J., Křišťoufková, S. (1997): Speciace těžkých kovů v kontaminované půdě. *Chemické Listy*, 91: 868-870.
- Borůvka, L., Křišťoufková, S., Kozák, J. (1997): Heavy metal accumulation in plants grown in heavily polluted soils. *Folia Microbiologica*, 42 (5): 524-526.
- Borůvka, L., Křišťoufková, S., Kozák, J., Huan-Wei, Ch. (1997): Speciation of cadmium, lead and zinc in heavily polluted soils. *Rostlinná Výroba*, 43 (4): 187-192.
- Borůvka, L., Mládková, L., Drábek, O., Vašát, R. (2005): Factors of spatial distribution of forest floor properties in the Jizera Mountains. *Plant, Soil and Environment*, 51 (10): 447-455.
- Borůvka, L., Podrázský, V., Mládková, L., Kuneš, I., Drábek, O. (2005): Some approaches to the research of forest soils affected by acidification in the Czech Republic. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51 (5): 745-749.
- Borůvka, L., Vacek, O., Jehlička, J. (2005): Principal component analysis as a tool for the indication of the origin of potentially toxic elements in soils. *Geoderma*, 128 (3-4): 289-300.
- Borůvka, L., Vácha, R. (2006): Litavka River alluvium as a model area heavily polluted with potentially risk elements. Some methods for studying polluted soils. In: Morel, J.-L., Echevarria, G., Goncharova, N. (eds.): *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils. Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, held in Trest, Czech Republic, 18-30 August 2002. Chapter 9.* Springer, Dordrecht (ISBN: 1-4020-4686-3): 267-298.
- Čupr, P., Bartoš, T., Sáňka, M., Klánová, J., Mikeš, O., Holoubek, I. (2010): Soil burdens of persistent organic pollutants - their levels, fate and risks. Part III. Quantification of the soil burdens and related health risks in the Czech Republic. *Science of the Total Environment*, 408 (3):486-94. 25/09/2009.
- Galušková, I., Borůvka, L., Drábek, O. (2011): Urban soil contamination by potentially risk elements. *Soil and Water Research*, 6 (2): 55-60.
- Holoubek, I., Dušek, L., Sáňka, M., Hofman, J., Čupr, P., Jarkovský, J., Zbiral, J., Klánová, J. (2009): Soil burdens of persistent organic pollutants - Their levels, fate and risk. Part I. Variation of concentration ranges according to different soil uses and locations. *Environmental Pollution*, 157 (6): 1917-1923.
- Chrastný, V., Vaněk, A., Komárek, M., Farkaš, J., Drábek, O., Vokurková, P., Němcová, J. (2012): Incubation of air-pollution-control residues from secondary Pb smelter in

- deciduous and coniferous organic soil horizons: Leachability of lead, cadmium and zinc. *Journal of Hazardous Materials*, 209: 40-47.
- Kočárek, M., Kodešová, R., Kozák, J., Drábek, O. (2010): Field study of chlorotoluron transport and its prediction by the BPS mathematical model. *Soil and Water Research*, 5 (4): 153-160.
- Kodešová, R., Kočárek, M., Hájková, T., Hýbler, M., Drábek, O., Kodeš, V. (2011): Chlorotoluron mobility in compost amended soil. *Soil & Tillage Research*, 118: 88-96.
- Kodešová, R., Kočárek, M., Kodeš, V., Drábek, O., Kozák, J., Hejtmánková, K. (2011): Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. *Journal of Hazardous Materials*, 186 (1): 540-550.
- Kratina, J., Borůvka, L., Tejnecký, V., Drábek, O., Šebek, O. (2010): Rozdíly ve vlastnostech horských lesních půd na kyselých a bazických matečních horninách. *Geologické výzkumy na Moravě a ve Slezsku*: 66-72.
- Kubošová, K., Komprda, J., Jarkovský, J., Sánka, M., Hájek, O., Dušek, L., Holoubek, I., Klánová, J. (2009): Spatially resolved distribution models of POP concentrations in soil: A stochastic approach using regression trees. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43 (24): 9230-9236.
- Kukučka, P., Klánová, J., Sanka, M., Holoubek, I. (2010): Soil burdens of persistent organic pollutants; their levels, fate and risk. Part II. Are there any trends in PCDD/F levels in mountain soils? *Environmental Pollution*, 157 (12): 3255-3263.
- Lochman, V., Šrámek, V., Fadrhonsová, V., Lachmanová, Z. (2008): Změny zásoby sledovaných prvků v lesních půdách na plochách Moldava v Krušných horách. *Zprávy lesnického výzkumu*, 53: 165-178.
- Lomský, B., Šrámek, V., Novotný, R. (2012): Changes in the air pollution load in the Jizera Mts.: effects on the health status and mineral nutrition of the young Norway spruce stands. *European Journal of Forest Research*, 131: 757-771.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Vácha, R. (1996): Geochemické a antropogenní zatížení půd. *Rostlinná Výroba*, 42 (12): 535-541.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Vácha, R. (2001): Prediction of the transfer of trace elements from soils into plants. *Rostlinná Výroba*, 47 (10): 425-432.
- Němeček, J., Podlešáková, E., Vácha, R. (2002): Transfer of trace elements with low soil mobility into plants. *Rostlinná Výroba*, 48 (2): 45-50
- Němeček, J., Vácha, R., Podlešáková, E. (2010): *Hodnocení kontaminace půd v ČR. VÚMOP v.v.i.*, 148 s. ISBN: 978-80-86561-02-4
- Nikodem, A., Kodešová, R., Drábek, O., Bubeníčková, L., Borůvka, L., Pavlů, L., Tejnecký, V. (2010): A numerical study of the impact of precipitation redistribution in a beech forest canopy on water and aluminum transport in a podzol. *Vadose Zone Journal*, 9 (2): 238-251.
- Nikodem, A., Pavlů, L., Kodešová, R., Borůvka, L., Drábek, O. (2013): Study of podzolization process under different vegetation cover in the Jizerské hory Mts. Region. *Soil and Water Research*, 8: 1-12.
- Novotný, R., Lachmanová, Z., Šrámek, V., Vortelová, L. (2008): Air pollution load and stand nutrition in the forest district Jablunkov, part Nýdek. *Journal of Forest Science*, 54: 49-54.

- Pavlu, L., Borůvka, L., Nikodem, A., Rohošková, M., Penížek, V. (2007): Altitude and forest type effects on soils in the Jizera Mountains region. *Soil and Water Research*, 2: 35–44.
- Petrovský, E., Kapička, A., Jordanová, L., Borůvka, L. (2001): Magnetic properties of alluvial soils contaminated with lead, zinc and cadmium. *Journal of Applied Geophysics*, 48: 127-136.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Pastuszková, M., Vácha, R. (1996): Contamination of soils with persistent organic xenobiotics substances in the Czech Republic. Proceedings 3<sup>rd</sup> International Symposium “Fate and Effects of Persistent Organic Pollutants in the Environment” TOCOEN 96, and Stelite Workshops, programme; April 1996, Luhačovice, Czech Republic; 265-268 p.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha R. (2001): Mobility and bioavailability of trace elements in soils. In: Ed. by Iskandar, I. K., Kirkham, M. B. *Trace Elements in Soil: Bioavailability, Flux, and Transfer*. Boca Raton, London, NY, Washington, DC, USA: CRC Press LLC., 2001, s. 21 – 42. ISBN 1-56670-507-X.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (1994): Kontaminace půd severočeského regionu rizikovými prvky. *Rostlinná výroba*, 40 (2): 123 - 130.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (1997): Zatížení půd v České republice persistentními organickými xenobiotickými látkami. *Rostlinná Výroba*, 43 (8): 357-364.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (1999): Approaches to the assessment of soil vulnerability against contaminants and soil pollution. Proceedings International Conference “Soil conservation in large – scale land use”, May 1999, Bratislava, Slovak Republic, 241-246 p.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (1999): Stav kontaminace půd v imisně zatížených regionech severních a severozápadních Čech. *Časopis lékařů českých*, 138 (18): 547-551.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (1999): Zatížení půd a rostlin severomoravského imisního regionu rizikovými látkami. *Vědecké práce VÚMOP* (10): 109-122.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (2000): The transfer of less hazardous trace elements with a high mobility from soils into plants. *Rostlinná Výroba*, 47 (10): 433-439.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (2000): Zatížení zemědělských půd polychlorovanými dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany. *Rostlinná Výroba*, 46 (8): 349-354.
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R. (2002): Critical values of trace elements in soils from the viewpoint of transfer pathway soil – plant. *Rostlinná Výroba*, 48 (5):193-202
- Podlešáková, E., Němeček, J., Vácha, R., Pastuszková, M. (1998): Contamination of soils with persistent organic xenobiotic substances in the Czech Republic. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 66: 91-103.
- Sáňka, M.(2012):Areal, regional and local levels of soil contamination and possible risks for humans and environment. Proceedings from the conference Effects of acidification on the soil and water sources. September 6 – 7, 2012 in Mariánské Lázně.

- Slodičák, M., Balcar, V., Borůvka, L., Fadrhonsová, V., Jurásek, A., Hadaš, P., Kacálek, D., Kantor, P., Kulasová, A., Kulhavý, J., Leuber, F., Lomský, B., Matějka, K., Mauer, O., Navrátil, P., Nárovec, V., Novák, J., Ostrovský, J., Palátová, E., Podrázský, V., Rychnovská, A., Řičář, L., Skorupski, M., Smejkal, J., Souček, J., Stoklasa, M., Šach, F., Šrámek, V., Vacek, S. (2005) : Lesnické hospodaření v Jizerských horách. Lesy ČR, Hradec Králové (ISBN 80-86945-00-6), VÚLHM, Jiloviště-Strnady (ISBN 80-86461-51-3): 232 s.
- Šamonil, P., Tejnecký, V., Borůvka, L., Šebková, B., Janík, D., Šebek, O. (2010): The role of tree uprooting in Cambisol development. *Geoderma*, 159 (1-2): 83–98.
- Šmejkalová, M., Mikanová, O., Borůvka, L. (2003): Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. *Plant, Soil and Environment*, 49 (7): 321-326.
- Šrámek, V. Borůvka, L., Drábek, O., Fadrhonsová, V., Novotný, R., Tejnecký, V., Vortelová L. (2011): Metody analýz forem hliníku v lesních půdách, půdním roztoku a kořenech dřevin. *Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce 8/2011*, 33s.
- Šrámek, V., Slodičák, M., Lomský, B., Balcar, V., Kulhavý, J., Hadaš, P., Půlkráb, K., Šišák, L., Pěnička, L., Sloup, M. (2008): The Ore Mountains: Will successive recovery of forests from lethal disease be successful? *Mountain Research and Development*, 28: 216-221.
- Šrámek, V., Fadrhonsová, V., Vortelová, L., Lomský, B. (2012): Development of chemical soil properties in the western Ore Mts. (Czech Republic) 10 years after liming. *Journal of Forest Science*, 58: 57-66.
- Štrudl, M., Borůvka, L., Dimitrovský, K., Kozák, J. (2006): Contents of potentially risk elements in natural and reclaimed soils of the Sokolov region. *Soil and Water Research*, 1: 99-107.
- Tejnecký, V., Bradová, M., Borůvka, L., Němeček, K., Šebek, O., Nikodem, A., Zenáhlíková, J., Rejzek, J., Drábek, O. (2013): Profile distribution and temporal changes of sulphate and nitrate contents and related soil properties under beech and spruce forests. *Science of the Total Environment*, 442: 165–171.
- Tejnecký, V., Drábek, O., Borůvka, L., Nikodem, A., Kopáč, J., Vokurková, P., Šebek, O. (2010): Seasonal variation of water extractable aluminium forms in acidified forest organic soils under different vegetation cover. *Biogeochemistry*, 101 (1-3): 151–163.
- Tejnecký, V., Šamonil, P., Borůvka, L., Drábek, O., Janík, D., Nikodem, A., Šebek, O. (2010): Změny forem Fe a Al v rámci pedogeneze vývratišť v přirozeně se vyvíjejícím jedlo-bukovém pralese . *Geologické výzkumy na Moravě a ve Slezsku*: 209-211.
- Vácha R., Macurová H., Skála J., Havelková M., Čechmánková J., Horváthová V. (2008) Possibilities of some methods for risk assessment of arsenic load in soils. *Plant, Soil and Environment*, 54: 279-287.
- Vácha, R., Vysloužilová, M., Horváthová, V. (2005): Polychlorinated dibenzo-p-dioxines and dibenzofurans in agricultural soils of Czech Republic. *Plant, Soil and Environment*, 51 (10): 464 – 468.
- Vácha, R., Čechmánková, J., Skála, J. (2010): Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and selected plants. *Plant, Soil and Environment*, 56: 434-443.
- Vácha, R., Čechmánková, J., Skála, J. (2011): Persistent Organic Pollutants in Agricultural Soils and their Evaluation in the Czech Republic. In: Daniels J.A. (ed.): *Advances in*

Environmental Research. Volume 22. Nova Science Publishers, Inc., New York. ISBN 978-1-61470-851-3

- Vácha, R., Čechmánková, J., Vysloužilová, M., Horváthová, V., Skála, J. (2008) Přestup polycyklických aromatických uhlovodíků z půdy do vybraných rostlin, *Chemické Listy*, 102: 1003-1010.
- Vácha, R., Macurová, H., Javůrková, H., Čechmánková, J., Skála, J., Kuba, P. (2009): Pravidla pro odběr vzorků a operativní stanovení vybraných forem As v půdě. *Certifikovaná metodika, VÚMOP v.v.i.*, 45 s. ISBN 978-80-87361-01-6
- Vácha, R., Němeček, J., Podlešáková, E. (2002): Geochemical and anthropogenic soil loads by potentially risky elements. *Rostlinná Výroba*, 48 (10): 441-447.
- Vácha, R., Podlešáková, E., Němeček, J., Poláček, O. (2001): Stav zatížení zemědělských půd perzistentními organickými polutanty. *Chemické Listy*, 95: 590-593.
- Vácha, R., Sánka, M., Sánka, O., Skála, J., Čechmánková, J. (2013): The Fluvisol and sediment trace element contamination level as related to their geogenic and anthropogenic source. *Plant, Soil and Environment*, 59 (3): 136-142
- Vácha, R., Skála, J., Čechmánková, J. (2010) Development and opportunities for evaluation of anthropogenic soil load by risky substances in the Czech Republic. In: *Land and Degradation and Desertification*, Springer, ISBN 978-90-481-8656-3, p. 413-422.
- Vaněk, A., Borůvka, L., Drábek, O., Mihaljevič, M., Komárek, M. (2005): Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. *Plant, Soil and Environment*, 51 (7): 316-321.
- Vaněk, A., Ettler, V., Grygar, T., Borůvka, L., Šebek, O., Drábek, O. (2008): Combined chemical and mineralogical evidence for heavy metal binding in mining- and smelting- affected alluvial soils. *Pedosphere*, 18(4): 464-478.
- Vaněk, A., Chrastný, V., Komárek, M., Galušková, I., Drahot, P., Grygar, T., Tejnecký, V., Drábek, O. (2010): Thallium dynamics in contrasting light sandy soils - Soil vulnerability assessment to anthropogenic contamination. *Journal of Hazardous Materials*, 173: 717-723.
- Vaněk, A., Komárek, M., Vokurková, P., Mihaljevič, M., Šebek, O., Panušková, G., Chrastný, V., Drábek, O. (2011): Effect of illite and birnessite on thallium retention and bioavailability in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 191 (1-3): 170-176.