

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta chemická
Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

RNDr. Karel Picka

**FYTOTOXICITA AROMATICKÝCH NITROSLOUČENIN
A PRODUKTŮ JEJICH BIOTRANSFORMACE**

PHYTOTOXICITY OF AROMATIC NITROCOMPOUNDS
AND PRODUCTS OF THEIR BIOTRANSFORMATION

ZKRÁCENÁ VERZE PH.D. THESIS

Obor: Chemie životního prostředí
Školitel: Prof. RNDr. Zdeněk Friedl, CSc.
Oponenti: Prof. Ing. Jiří Matoušek, DrSc.
Doc. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.
Datum obhajoby: 10. 12. 2003

KLÍČOVÁ SLOVA

fytotoxicity, kořenový elongační test, růstový test, 2,4,6-trinitrotoluen, dinitrotolueny, aminodinitrotolueny, aminonitrotolueny, diaminotolueny, pšenice, hořčice, salát, čočka

KEY WORDS

phytotoxicity, root elongation test, growth test, 2,4,6-trinitrotoluene, dinitrotoluenes, aminodinitrotoluenes, aminonitrotoluenes, diaminotoluenes, wheat, mustard, lettuce, lentil

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE

Areálová knihovna FCH VUT, Purkyňova 118, Brno

OBSAH

Používané názvy a zkratky názvů látek	4
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
1.1 Kontaminace půd nitroderiváty toluenu a produkty jejich biotransformace.....	5
1.2 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce.....	6
1.2.1 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce pro živočichy	6
1.2.2 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce pro suchozemské rostliny	7
1.3 Fytotoxikologické testy	9
1.3.1 Testy inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin.....	9
1.3.2 Růstové testy	10
1.3.3 Volba testovacích rostlin.....	11
2 CÍL PRÁCE	11
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
3.1 Chemikálie, materiál a zařízení	11
3.2 Postup a podmínky provedení testu inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin.....	12
3.3 Postup a podmínky provedení růstového testu.....	13
3.4 Statistické zpracování výsledků	14
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	14
4.1 Výběr testovaných látek	14
4.2 Metody a podmínky testování	14
4.2.1 Testování vlivu látek na elongaci kořenů klíčnicích rostlin.....	14
4.2.2 Testování vlivu látek na vzcházení a počáteční fáze růstu rostlin	15
4.2.3 Výběr testovacích rostlin.....	15
4.3 Výsledky testů fytotoxicity	16
4.4 Diskuse experimentálních výsledků.....	19
4.5 Možnosti praktického využití výsledků	22
4.5.1 Hodnocení ekologických rizik plynoucích z kontaminace půd TNT a DNT.....	22
4.5.2 Využití rostlin jako bioindikátorů kontaminace	23
4.5.3 Fytoremediace.....	24
5 ZÁVĚRY	24
6 LITERATURA	25
7 ABSTRACT	30
PŘÍLOHA A – Curriculum vitae.....	31
PŘÍLOHA B – Seznam publikací výsledků	32

Používané názvy a zkratky názvů látek

V souladu s publikacemi týkajícími se studia problematiky biotransformací a fytotoxicity 2,4,6-trinitrotoluenu, dinitrotoluenů a podobných látek jsou v této práci aminy vznikající redukcí nitroderivátů toluenu nazývány aminotolueny a tedy přítomnost aminoskupin je v jejich názvech vyznačována prefixem amino-, ačkoli podle zásad substitučního názvosloví aminoskupina patří mezi tzv. charakteristické skupiny a její přítomnost v molekule neobsahující substituent s vyšší prioritou má být vyjádřena zakončením -amin.

V následujícím textu jsou používány níže uvedené zkratky názvů látek:

TNT.....	2,4,6-trinitrotoluen (2-methyl-1,3,5-trinitrobenzen, CAS No. 118-96-7)
2-A-4,6-DNT	2-amino-4,6-dinitrotoluen (2-methyl-3,5-dinitrobenzenamin, CAS No. 35572-78-2)
4-A-2,6-DNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-methyl-3,5-dinitrobenzenamin, CAS No. 19406-51-0)
2,4-DNT.....	2,4-dinitrotoluen (1-methyl-2,4-dinitrobenzen, CAS No. 121-14-2)
2,6-DNT.....	2,6-dinitrotoluen (2-methyl-1,3-dinitrobenzen, CAS No. 606-20-2)
DNT.....	2,4-dinitrotoluen a/nebo 2,6-dinitrotoluen
2-A-4-NT.....	2-amino-4-nitrotoluen (2-methyl-5-nitrobenzenamin, CAS No. 99-55-8)
2-A-6-NT.....	2-amino-6-nitrotoluen (2-methyl-3-nitrobenzenamin, CAS No. 603-83-8)
4-A-2-NT.....	4-amino-2-nitrotoluen (4-methyl-3-nitrobenzenamin, CAS No. 119-32-4)
2,4-DAT.....	2,4-diaminotoluen (4-methylbenzen-1,3-diamin, CAS No. 95-80-7)
2,6-DAT.....	2,6-diaminotoluen (2-methylbenzen-1,3-diamin, CAS No. 823-40-5)
DAT.....	2,4-diaminotoluen a/nebo 2,6-diaminotoluen

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V souvislosti s uvažovanými změnami využití některých bývalých vojenských prostorů vyvstávají problémy s jejich znečištěním chemickými látkami. Ke značně závažným kontaminantům některých z těchto míst patří výbušniny. Mezi nejvýznamnější organické energetické sloučeniny užívané při jejich výrobě patří TNT, společně s ním jsou v některých případech používány i 2,4-DNT nebo směs 2,4- a 2,6-DNT, oba tyto DNT bývají obvykle také přítomny v technickém TNT jako nečistoty [1-4].

Zhodnocení toxikologického a ekotoxikologického významu kontaminace půd nitroderiváty toluenu a produkty jejich transformací v přirozených podmínkách je jedním z předpokladů pro analýzu rizik plynoucích z této ekologické zátěže, případně pro posouzení další využitelnosti, potřeby, možností a cílových parametrů sanace kontaminovaných lokalit apod. Významnou součástí suchozemské biocenózy, kterou nelze při hodnocení významu znečištění půd opomenout, jsou rostliny. Proto jsou nezbytné údaje o fytotoxicitě TNT, DNT a při jejich biotransformaci vznikajících produktů.

1.1 Kontaminace půd nitroderiváty toluenu a produkty jejich biotransformace

Od začátku masové produkce výbušnin v období 1. světové války bylo do životního prostředí vneseno významné množství těchto látek. Byly zjištěny v půdách, kalech, povrchových i podzemních vodách, zejména v areálech muničních závodů s intenzivní výrobou v období 2. světové války, ale byly nalezeny také v prostorech likvidace starých zásob výbušnin a munice i na dalších místech [2,5-7].

V literatuře je řada konkrétních údajů o závažném znečištění životního prostředí výbušninami především v USA, kde v prostorech vojenských zařízení objem půdy a sedimentů kontaminovaných TNT a dalšími organickými energetickými látkami v takovém rozsahu, který odůvodňuje nezbytnost remediace, převyšuje 1 milion krychlových yardů [8]. V areálech některých muničních závodů využívaných ve válečném období byla zjištěna znečištění půdy a sedimentů TNT dosahující v extrémních případech až několik desítek $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [9-12], v nižších koncentracích byly prokázány také 2,4- a 2,6-DNT [3,9,11]. V Německu, kromě míst znečištěných v souvislosti s výrobou a zpracováním výbušnin, existují i rozsáhlé kontaminované plochy v místech velkých náletů v době 2. světové války, v prostorech zničených výrobních závodů a skladů munice a v některých oblastech je znečištěna i spodní voda [10,13-15]; v půdách byly stanoveny TNT [7,15,16] i 2,4- a 2,6-DNT [6,7,16].

O znečištění půd výbušninami v České republice nebyly v literatuře nalezeny žádné údaje, ale existence těmito látkami kontaminovaných lokalit se také předpokládá. Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ČR [17] řadí dinitrotolueny a TNT mezi tzv. sledované znečišťující látky a stanoví pro případ jejich

výskytu v zemině a podzemní vodě kritéria znečištění, při jejichž překročení je nutno zpracovat analýzu rizik ohrožení zdraví člověka a složek životního prostředí.

Organické polutanty podléhají v půdě řadě abiotických fyzikálních a chemických pochodů a transformacím půdními organismy; u málo rozpustných, netěkavých a chemicky stálých sloučenin, ke kterým TNT a DNT patří, bývá nejvýznamnějším činitelem ovlivňujícím jejich osud biotransformace.

Podrobnému studiu mikrobiálních transformací nitroderivátů toluenu je již několik desetiletí věnována značná pozornost, jednak s cílem poznání osudu těchto látek v prostředí, jednak ve snaze o vypracování a optimalizaci podmínek pro praktickou realizaci metody biodegradace, jako alternativy k jiným z možných způsobů dekontaminace znečištěných půd a sedimentů, event. povrchových a spodních vod, a proto je publikováno velké množství poznatků z biotransformačních studií [18-21]. I když bylo při vhodných podmínkách dosaženo vysokého stupně biodegradace DNT i TNT a z kontaminovaných lokalit byly izolovány i bakteriální kmeny schopné za řízených podmínek tyto sloučeniny relativně rychle transformovat až úplně degradovat, detekce vysokých koncentrací DNT a především TNT v půdách znečištěných před několika desítkami let jasně dokumentuje, že za přirozených podmínek mineralizace těchto látek v silně kontaminovaných půdách ve významné míře neprobíhá.

Řada studií transformací TNT různými mikroorganismy opakovaně potvrdila, že tato látka nepodléhá známým oxidačním reakcím předcházejícím štěpení benzenového jádra [22], ale naopak relativně snadno probíhá postupná redukce nitroskupin [20,23,24] a teprve takto vznikající intermediáty případně za vhodných podmínek podléhají oxidacím vedoucím ke štěpení benzenového jádra a následné mineralizaci. Přestože bylo při biotransformačních experimentech postupně identifikováno několik desítek mikrobiálních metabolitů TNT, pravidelně byly ve významnějších množstvích zjištěny pouze aminy vznikající redukcí jedné nebo dvou nitroskupin TNT a ve vzorcích půd kontaminovaných touto látkou byly z transformačních produktů prokázány jen 2-A-4,6-DNT a 4-A-2,6-DNT, ve srovnání s TNT však vždy v podstatně nižších koncentracích [7,11,16].

Na rozdíl od TNT byly izolovány i aerobní bakterie schopné přímo oxidovat a následně mineralizovat 2,4- a 2,6-DNT [6,25,26], ale i u těchto látek probíhá velmi snadno redukce nitroskupin [18,27]. V publikacích uvádějících výsledky stanovení DNT v kontaminovaných půdách nejsou uvedeny žádné údaje o přítomnosti jejich transformačních produktů [3,6,7,9,11,16]. Z poznatků o biotransformacích DNT vyplývá, že z produktů mikrobiálních přeměn těchto sloučenin je možno v půdách předpokládat přítomnost aminů vznikajících redukcí nitroskupin DNT, výskyt jiných látek ve významnějších množstvích je nepravděpodobný.

1.2 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce

1.2.1 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce pro živočichy

TNT a DNT byly testovány poměrně důkladně a je řada zkušeností i s jejich účinky na exponované osoby. Na kůži působí dráždivě, jsou akutně a především

chronicky značně toxické (vyvolávají methemoglobinémii, závažná poškození jater, poruchy krvetvorby, působí i na nervovou soustavu) a mohou senzibilizovat [28-30], v řadě testů byla prokázána jejich mutagenita a karcinogenita [30,31]. Údaje o TNT nejsou podle kritérií Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) dostatečné k posouzení karcinogenního rizika pro člověka (zařazen do skupiny 3 podle IARC) [32]. 2,4- a 2,6-DNT jsou, zejména na základě výsledků testů na zvířatech, IARC hodnoceny jako možné karcinogeny (skupina 2B) [33], podle seznamu nebezpečných látek EU, převzatého i ČR, jsou oba DNT klasifikovány jako karcinogeny kategorie 2, mutageny a toxické pro reprodukci kategorií 3 [34].

Jedinými dostupnými toxikologickými údaji o aminodinitrotoluenech, vznikajících redukcí jedné nitroskupiny TNT, jsou střední letální dávky, dokládající jejich poněkud nižší akutní toxicitu v porovnání s TNT, a pozitivní výsledky testů na detekci reverzních mutací u bakterií [29,30]. O diaminonitrotoluenech, které vznikají z TNT, jsou publikovány pouze údaje o detekci mutagenní aktivity mikrobiálním testem na reverzní mutace [30].

Aminonitrotolueny jsou akutně a chronicky značně toxické, byla prokázána i jejich mutagenita, o karcinogenních účincích nejsou údaje dostatečné ke zhodnocení rizika pro člověka [28-30,35]. Diaminy vznikající redukcí 2,4- a 2,6-DNT jsou silně dráždivé, patří mezi významné alergenů, expozice vede i k závažným celkovým účinkům (methemoglobinémie, poškození ledvin, jater a CNS), existují experimentální důkazy o jejich reprodukční a vývojové toxicitě [28-30,36]. 2,4-DAT je IARC zařazen mezi látky s možným karcinogenním účinkem pro člověka (skupina 2B) [37], podle kritérií EU mezi karcinogeny kategorie 2. 2,6-DAT je klasifikován jako mutagen kategorie 3 [34].

Z údajů o toxicitě TNT a DNT pro vodní organismy vyplývá, že tyto látky jsou pro ryby i některé bezobratlé relativně toxické [2,18]. Podle seznamu klasifikovaných nebezpečných látek jsou TNT, 2,4-DNT, všechny aminonitrotolueny i diaminotolueny hodnoceny jako toxické pro vodní organismy, s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky ve vodním prostředí, a 2,6-DNT je klasifikován jako škodlivý pro vodní organismy, s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky ve vodním prostředí [34].

1.2.2 Toxicita TNT, DNT a produktů jejich redukce pro suchozemské rostliny

Při hodnocení toxicity vzorků půdy z prostoru jednoho muničního závodu v USA byl, kromě jiných ekotoxikologických testů, použit i růstový test s okurkou (*Cucumis sativus*) a ředkvi (*Raphanus sativus*), při kterém byla měřena výška rostlin po 14 dnech růstu. Ve většině vzorků půdy byl hlavní kontaminující látkou TNT, v mnoha byly přítomné také 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-A-4,6-DNT a 4-A-2,6-DNT, v porovnání s TNT však vždy v podstatně nižších koncentracích a jejich eventuální příspěvek k toxicitě půdy byl zhodnocen jako málo významný. Ze závislosti mezi koncentrací TNT v půdě a výsledky všech použitých biotestů (růstový test, test toxicity pro žížaly a bakteriální luminiscenční test) byly vypočteny nejnižší účinné

koncentrace (LOEC) TNT; pro skupinu vzorků odebraných v prostoru výroby munice byla určena LOEC 7 mg.kg^{-1} , pro vzorky z prostoru spalování odpadních výbušnin 19 mg.kg^{-1} [11].

Autoři práce zaměřené na možnost využití rostlin při bioremediaci půdy kontaminované TNT sledovali vliv této látky a jednoho z produktů její redukce, 4-A-2,6-DNT, na klíčení, růst kořenů a respiraci kostřavy *Festuca arundinacea* [38]. Při kultivaci v agarové půdě v přítomnosti $0-60 \text{ mg.l}^{-1}$ TNT a $0-15 \text{ mg.l}^{-1}$ 4-A-2,6-DNT bylo zjištěno významné snížení klíčivosti semen při koncentracích TNT 45 a 60 mg.l^{-1} , 4-A-2,6-DNT významně redukoval klíčení při nejvyšší použité koncentraci 15 mg.l^{-1} . Obě látky nepříznivě ovlivňovaly především vývoj kořenů, účinek na jejich morfologii byl obdobný působení dinitroanilinových herbicidů.

Při testování vlivu TNT na klíčení a růst kostřavy *Festuca arundinacea* a sveřepu *Bromus inermis*, provedeném také s cílem zhodnocení možnosti využití obou trav při fytořemediaci kontaminovaných půd, byla připravena řada směsí kontaminované a nekontaminované půdy a hodnocena závislost klíčení a růstu rostlin na koncentraci TNT v půdním roztoku (vodném výluhu) v rozsahu $18-52 \text{ mg.l}^{-1}$. Klíčivost sveřepu byla při koncentracích TNT vyšších než 24 mg.l^{-1} snížena pod 50 %, klíčivost kostřavy byla významně ovlivněna až při koncentracích vyšších než 31 mg.l^{-1} , ale ani při nejvyšší koncentraci TNT 52 mg.l^{-1} nebyla nižší než 50 %. Velikost a hmotnost sušiny obou rostlin byly v porovnání s kontrolou při všech koncentracích TNT významně nižší. TNT silně redukoval vývoj kořenů obou rostlin. Autoři dospěli k závěru, že kostřava může v kontaminované půdě klíčit a růst při koncentraci TNT v půdním roztoku nižší než 31 mg.l^{-1} , sveřep při koncentraci nižší než 24 mg.l^{-1} [39].

V práci zabývající se možnostmi využití hybridního topolu (*Populus deltoides X nigra* DN34) pro fytořemediaci znečištění TNT a RDX bylo na základě sledování změn transpirace zjištěno, že koncentrace TNT v hydroponickém roztoku vyšší než 5 mg.l^{-1} byly pro rostliny toxické [40].

Testování vlivu TNT na klíčení a růst 4 kulturních rostlin ve dvou druzích půdy, za použití řady koncentrací od 5 mg.kg^{-1} , vedlo ke zjištění, že TNT při $5-25 \text{ mg.kg}^{-1}$ půdy stimuloval růst dvouděložných řeřichy (*Lepidium sativum*) a brukve (*Brassica rapa*), ale od 50 mg.kg^{-1} již působil na jejich růst inhibičně (LOAEC) a semena těchto rostlin klíčila pouze při koncentracích TNT do 200 mg.kg^{-1} . Jednoděložné rostliny, oves (*Avena sativa*) a pšenice (*Triticum aestivum*), byly méně citlivé, oves toleroval ještě i nejvyšší použitou koncentraci TNT $1\,600 \text{ mg.kg}^{-1}$ půdy [41].

Ve studii zaměřené na srovnání výsledků růstových testů ve dvou typech půdy a v akvakultuře byla testována toxicita 2,4-DNT pro oves (*Avena sativa*), salát (*Lactuca sativa*) a rajče (*Lycopersicon esculentum*) [42]. Byla hodnocena hmotnost biomasy rostlin po 14 dnech od vzejití. Zjištěné hodnoty nejvyšších neúčinných koncentrací (NOAEC) a středních inhibičních koncentrací (EC_{50}) 2,4-DNT jsou uvedeny v Tab. 1. Střední inhibiční koncentrace 2,4-DNT pro růst rostlin v roztocích živin byly stanoveny také pro ječmen ($2,9 \text{ mg.l}^{-1}$) a sóju ($6,3 \text{ mg.l}^{-1}$) [43].

O fytotoxicitě jiných produktů redukce TNT než 4-A-2,6-DNT, ani 2,6-DNT a produktů redukce 2,4- a 2,6-DNT nebyly v literatuře nalezeny žádné informace.

Tab. 1 NOAEC a EC_{50} 2,4-dinitrotoluenu pro oves, rajče a salát, stanovené růstovým testem ve dvou druzích půd a v roztoku živin [42]

Médium	NOAEC [mg.kg ⁻¹]			EC ₅₀ [mg.kg ⁻¹]		
	oves	rajče	salát	oves	rajče	salát
Jílovitá půda	11	3,2	3,2	46	4,9	5,8
Písčité humózní půda	10	3,2	3,2	35	10	13
Živný roztok	1,1	0,33	1,1	5,3	2,1	2,1

1.3 Fytotoxikologické testy

Mezi biotesty používanými v souvislosti s ochranou životního prostředí před negativním působením chemických látek, přípravků, odpadů a polutantů mají významné místo fytotoxikologické testy [44]. K obdobím, kdy jsou rostliny nejcitlivější k exogenním vlivům, patří počáteční fáze jejich vývoje. Na hodnocení vlivu látek na klíčení semen, růst kořenů klíčících rostlin a tvorbu biomasy v počátečních stádiích růstu se zaměřují testy inhibice elongace kořenů klíčících rostlin a růstové testy.

Základními údaji užívanými k charakterizaci fytotoxicity látky jsou nejvyšší aplikovaná koncentrace, při které nebyl v porovnání s neexponovanou kontrolou pozorován statisticky významný rozdíl v žádném nepříznivém účinku (no observed adverse effect concentration, NOAEC), dále nejnižší aplikovaná koncentrace, při níž byl zjištěn signifikantní negativní účinek oproti kontrole (lowest observed adverse effect concentration, LOAEC) a střední účinná koncentrace (EC_{50}), tj. koncentrace látky, která způsobuje snížení klíčivosti, růstu nebo jiného sledovaného parametru v porovnání s kontrolou o 50 %; někdy je koncentrace způsobující redukci klíčivosti nebo vzcházení o 50 % označována jako střední letální (LC_{50}), koncentrace snižující růst o 50 % jako střední inhibiční (IC_{50}).

1.3.1 Testy inhibice elongace kořenů klíčících rostlin

Testy spočívají v expozici semen hodnocené látky (event. výluhu z odpadu, půdy apod.) za definovaných laboratorních podmínek a následném měření délek kořenů.

Při nejobvyklejším způsobu provedení jsou semena kultivována na Petriho miskách v roztoku látky, výluhu apod. Je možno vysévat semena i na agarovou půdu s testovanou látkou nebo výluhem, přímo na povrch hodnoceného sedimentu či půdy, na miskách nebo v kelímcích, avšak kořínky klíčících rostlin jsou velmi citlivé na mechanické poškození při vyjímání z těchto substrátů, přesné měření jejich délky je pak obtížné, proto se této modifikace postupu běžně nepoužívá.

Testy se provádí zpravidla v termostatu nebo temperované místnosti (nejčastěji 20-25 °C), obvykle ve tmě (není-li klíčení semen použitého druhu světlem příznivě ovlivňováno). Po uplynutí expoziční doby (nejčastěji 72 až 120 hodin) se měří délky kořenů, ze závislosti délek na koncentraci se graficky nebo výpočtem určuje střední

inhibiční koncentrace IC_{50} , významnou informaci o závislosti mezi koncentrací a účinkem poskytuje současně uvedení např. IC_5 , NOAEC nebo LOAEC.

Zkouška inhibice růstu kořenů je u nás požadována při hodnocení nebezpečné vlastnosti ekotoxická tuhých průmyslových odpadů [45,46], test je zařazen např. do souboru fytotoxikologických testů vyžadovaných v USA Environmental Protection Agency (EPA) a Food and Drug Administration (FDA) při hodnocení ekologických rizik plynoucích z kontaminace prostředí a u některých látek a přípravků podléhajících schvalování těmito institucemi [44,47,48].

1.3.2 Růstové testy

Tyto testy jsou používány především k hodnocení toxického vlivu pevných nebo netěkavých kapalných látek v půdě na vzcházení a raná stadia růstu suchozemských rostlin. Testovaná látka je zapravena do půdy, pak jsou zasetá semena a po definované době kultivace se obvykle hodnotí počet vyklíčených semen (vzešlých rostlin) a hmotnost biomasy rostlin, sklizených nejméně po dvou týdnech od doby, kdy v kontrole vzešlo 50 % rostlin. Těmito testy je možno hodnotit i kontaminované půdy a další materiály, např. kaly, sedimenty, odpady apod. Používá se řada modifikací praktického provedení, s cílem sjednocení základních podmínek testování byly zformulovány rámcové zásady ve směrnici Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) [49], později i Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO) [50].

Podle směrnice OECD se u použité půdy požaduje zbavení hrubých částic, obsah organického uhlíku nepřevyšující 1,5 %, obsah částic do 20 μm v rozmezí 10-20 %, pH 5,0-7,5. Je předepsáno testovat koncentrace 0,0 (kontrola), 1,0, 10,0 a 100,0 mg látky v 1 kg suché půdy, u méně toxických látek mohou být použity i koncentrace vyšší, vždy nejméně ve 3 opakováních, s minimálně 5 semeny v každé nádobě [49]. Kultivační nádoby se umísťují do skleníků, fytotronů, růstových komor apod. Velikost nádob, zálivka a další podmínky musí odpovídat požadavkům použitých rostlin, jejich počtu a době kultivace (rostliny v kontrole musí vykazovat normální růst). Zaznamenávají se počty vzešlých rostlin a hmotnost nadzemních částí rostlin v každé nádobě (vážení ihned po sklizni nebo po usušení při 70 °C), případně i vizuálně pozorovatelné projevy fytotoxicity. Směrnice doporučuje vyjádřit účinek testované látky na klíčivost jako LC_{50} , vliv na růst jako EC_{50} . Byla publikována řada zkušeností a doporučení pro testování podle směrnice OECD [42,51]. Při hodnocení rizik plynoucích z přítomnosti škodlivin pro růst rostlin jsou velmi významnými údaji NOAEC, resp. LOAEC, proto jsou někdy růstové testy prováděny jen s cílem získání těchto údajů [50].

Růstový test na suchozemských rostlinách je nejvýznamnější fytotoxikologický test požadovaný v zemích EU i v USA (EPA, FDA) při hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek, přípravků, ekologických zátěží apod. [44]. V ČR je vyžadován jako součást souboru testů k získání údajů o účinné látce a přípravku při registraci pesticidů, event. jako doplňkový test k registraci dalších chemických látek.

1.3.3 Volba testovacích rostlin

Je známo, že existují velké mezidruhové rozdíly v citlivosti rostlin vůči chemickým látkám, proto je velmi důležitá otázka výběru testovacích druhů [44]. Je všeobecně přijímáno, že neexistuje univerzální senzitivní druh nebo skupina druhů a z tohoto důvodu stanovují směrnice EPA, FDA, OECD a ISO seznamy doporučených rostlin a dále upřesňují požadavky na volbu z těchto seznamů [44,49,50]; např. směrnice OECD vyžaduje výběr 3 rostlin, po jedné ze 3 doporučených skupin, v odůvodněných případech je možno použít i další druhy.

Nezanedbatelná jsou při výběru rostlin i hlediska praktická a ekonomická. Důležitá je dobrá klíčivost semen, rychlé vzcházení, stejnoměrný růst, schopnost tvořit normální rostliny za podmínek vhodných pro rutinní testování, dosažení velikosti vhodné pro hodnocení během několika týdnů od zasetí apod. [51,52]

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo shrnutí a zhodnocení poznatků o znečištění půd 2,4,6-trinitrotoluenem, 2,4-dinitrotoluenem a 2,6-dinitrotoluenem, které patří mezi významné polutanty, k jejichž vstupu do životního prostředí došlo v řadě případů v souvislosti s výrobou a používáním vojenských výbušnin, dále o biotransformaci těchto nitroderivátů toluenu a výskytu produktů jejich transformace v kontaminovaných půdách, o fytotoxicitě trinitrotoluenu, 2,4- a 2,6-dinitrotoluenu a jejich redukčních produktů a zhodnocení poznatků o testech, které jsou v současné době používány k hodnocení fytotoxicity chemických látek.

Cílem experimentální části práce bylo provedení fytotoxikologických testů na několika reprezentativních suchozemských rostlinách, k získání základních informací o fytotoxicitě 2,4,6-trinitrotoluenu, 2,4-dinitrotoluenu, 2,6-dinitrotoluenu a produktů jejich biotransformace, jejichž výskyt byl zjištěn nebo je pravděpodobný v kontaminovaných půdách.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, materiál a zařízení

2,4-Dinitrotoluen (97 %), 2,6-dinitrotoluen (98 %), 2-amino-4-nitrotoluen (95 %), 4-amino-2-nitrotoluen (97 %), 2,4-diaminotoluen (98 %) a 2,6-diaminotoluen (97 %) byly získány od firmy Sigma-Aldrich Co., 2-amino-6-nitrotoluen (98 %) od firmy Fluka Chemie AG, vzorek 2,4,6-trinitrotoluenu byl poskytnut firmou Synthesia a.s., Pardubice-Semtín. 2-Amino-4,6-dinitrotoluen a 4-amino-2,6-dinitrotoluen byly syntetizovány na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí Fakulty chemické VUT v Brně.

Byla použita komerčně dostupná osiva pšenice (pšenice obecná, *Triticum aestivum* L., ozimá odrůda Siria, nemořené osivo, Ústřední kontrolní a zkušební

ústav zemědělský v Brně), hořčice (hořčice bílá, *Sinapis alba* L., odrůda Zlata, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně), salátu (locika salátová, *Lactuca sativa* L., odrůda Král máje, Semena Veliby, a.s.) a konzumní velkozrná čočka (čočka jedlá, *Lens culinaris* Med., odrůda Laird, Vitana a.s., Byšice). Všechna semena byla před použitím přebrána (vyloučena mechanicky poškozená a vzhledově odlišná, ponechána jen semena stejnoměrné velikosti a zbarvení), aby použitý biologický materiál byl maximálně homogenní a tak byla omezena nežádoucí variabilita výsledků. Klíčivost použitých semen byla vyšší než 95 %.

Testy inhibice elongace kořenů klíčících rostlin byly prováděny ve vodním termostatu TCH 100, Laboratorní přístroje Praha, ve skleněných nesterilizovaných Petriho miskách o průměru 110 mm.

Pro přípravu kultivační směsi pro růstový test byla použita půda získaná z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně, s obsahem organického (oxidovatelného) uhlíku 0,86 %, obsahem částic menších než 20 μm 17 % a pH 6,1, prosetá sítem se čtvercovými oky 2 mm, a průmyslový křemenný písek o velikosti částic 0,1-0,5 mm. Jako kultivační nádoby byly použity neprůsvitné (hnědé) polystyrenové potravinářské kelímky (dolní průměr 45 mm, horní průměr 65 mm, výška 75 mm), jejichž dno bylo perforováno 3 otvory o průměru 4 mm. Namísto podložních misek byly použity nápojové polystyrenové šálky (dolní průměr 55 mm, horní průměr 70 mm, výška 50 mm). Proti propadávání pěstební substrátu byly otvory pro zálivku v kelímcích zakryty granulemi zahradnického perlitu AGROPERLIT, výrobce PERLIT, s.r.o., Šenov u Nového Jičína.

Růstový test byl prováděn v pěstební komoře o rozměrech 100 x 75 cm, s osvětlovacím blokem s nastavitelnou výškou se 16 zářivkami Tesla 18 W, opatřené ventilátorem a časovým spínačem umožňujícím nastavení doby osvětlení (délky fotoperiody); komora byla zapůjčena Odborem agrochemie, půdy a výživy rostlin Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně.

3.2 Postup a podmínky provedení testu inhibice elongace kořenů klíčících rostlin

Na dna skleněných Petriho misek byly vloženy dvě vrstvy filtračního papíru a napipetován pracovní roztok, v případě kontrol deionizovaná voda; při testech se semeny pšenice, hořčice a salátu bylo pipetováno 10 ml, při testech s čočkou 12 ml roztoku nebo vody. Na navlhčené papíry bylo rovnoměrně rozmístěno 30 semen a misky přiklopeny víčky. Pro každou koncentraci a kontrolu byla provedena 3 paralelní stanovení.

Misky se semeny pšenice, hořčice a čočky byly umístěny do termostatu bez osvětlení, s teplotou 21 °C. V případě pšenice byla doba inkubace 96 hodin, u hořčice a čočky 72 hodin. Misky se salátem byly umístěny na laboratorních stolech v místnosti s teplotou 17-22 °C, za střídání osvětlení a tmy, délka fotoperiody byla 16 hodin, doba inkubace 96 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly

milimetrovým pravítkem změřeny délky kořenů, v případě pšenice vždy nejdelšího; u neklíčících semen byla délka kořenů hodnocena jako nulová.

3.3 Postup a podmínky provedení růstového testu

Odvážené množství látky, odpovídající zvolené koncentraci, bylo ve skleněné třecí misce rozetřeno s navázkou písku a směs látky s pískem byla pak důkladně promíchána s odváženým množstvím půdy v polypropylenovém sáčku.

Do kelímků sloužících jako kultivační nádoby byla po zakrytí otvorů pro zálivku granulami perlitu navážena směs obsahující 90 g suché půdy a 10 g písku se zapravenou testovanou látkou. Pro každou koncentraci každé látky a kontrolu, lišící se pouze nepřítomností testované látky, byly vždy použity 4 replikáty. Do substrátu v každém kelímku bylo zaseto 8 semen a kelímky byly umístěny do plastových podložních šálků, do kterých pak byla odvážena deionizovaná voda v množství odpovídajícím 70 % maximální vodní kapacity kultivační směsi.

Kelímky byly umístěny do pěstební komory. Délka fotoperiody byla nastavena na 16 hodin, intenzita osvětlení $7\,500 \pm 500$ lx (měřeno luxmetrem Metra Blansko PU 550 ve výši 10 cm nad povrchem půdy), teplota v komoře se pohybovala v rozmezí od 17 °C (noc) do 24 °C (den) (měřeno maximo-minimálním teploměrem), relativní vlhkost vzduchu 40 až 60 % (měřeno Assmannovým aspiračním psychrometrem). Rostliny byly zalévány denně podmokem tak, že do podložních šálků všech kelímků bylo naváženo množství deionizované vody potřebné k doplnění vlhkosti kultivační směsi na 70 % plné vodní kapacity. Po zálivce byly kelímky v komoře vždy rozmístěny jiným způsobem než před zálivkou, aby během pokusu nebyly stále na témž místě a tak byly eliminovány případné vlivy různých podmínek na růst rostlin v různých místech komory.

Desátý den od zasetí semen bylo provedeno jednocení rostlin. V kelímcích, ve kterých vzešlo pět nebo více rostlin, u nichž bylo patrné, že jsou dobře vyvinuté a pokračovaly by v růstu až do ukončení experimentu, byly ponechány pouze čtyři reprezentativní, pokud možno rovnoměrně rozmístěné rostliny. V kelímcích, kde byly vzešlé rostliny malé nebo špatně vyvinuté a bylo zřejmé, že se při dalším růstu nebudou vzájemně omezovat, byly ponechány všechny vzešlé rostliny, aby bylo možné zhodnotit, kolik z celkového počtu vzešlých rostlin bude ke dni ukončení experimentu rostoucích a kolik z nich případně uhynie, nebo přestane růst.

Pokusy s pšenicí a čočkou byly ukončeny 18. den od zasetí semen, pokusy s hořčicí a salátem 21. den. Byl zaznamenán celkový počet od počátku experimentu vzešlých rostlin (rostliny byly hodnoceny jako vzešlé, pokud výška klíčících rostlin nad úroveň pěstebního substrátu dosáhla alespoň 10 mm) a počet ke dni ukončení pokusu rostoucích rostlin v každém kelímku (jako rostoucí byly hodnoceny rostliny, které byly v den ukončení experimentu zelené, vzpřímené a nejevily známky vadnutí; do počtu rostoucích byly započítány i rostliny odstraněné při jednocení), rostoucí rostliny byly těsně u povrchu půdy ustřiženy, z každého kelímku sklizené rostliny byly společně sušeny na Petriho miskách v horkovzdušné sušárně, při 70 °C po dobu 16 hodin, a poté byla sušina biomasy zvážena.

3.4 Statistické zpracování výsledků

Nejvyšší v testech použité koncentrace látek bez nepříznivého účinku (NOAEC) a nejnižší koncentrace s významným inhibičním účinkem (LOAEC) na růst kořenů klíčnicích rostlin ve vodných roztocích, nebo na vzcházení a růst rostlin ve směsi půda/písek, v porovnání s kontrolami, byly stanoveny pomocí jednostranného Studentova t-testu shody středních hodnot sledovaných ukazatelů na hladině spolehlivosti 95 %, za použití programu Microsoft Excel.

Střední inhibiční koncentrace látek pro elongaci kořenů klíčnicích rostlin ve vodných roztocích (IC_{50}) a střední inhibiční koncentrace pro vzcházení (LC_{50}) a růst (EC_{50}) rostlin ve směsi půda/písek, včetně 95 % konfidenčních intervalů, byly vypočteny ze závislostí mezi koncentracemi látek a odpovídajícími efekty probitovou metodou pomocí programu PROBITY, který byl pro účely vyhodnocování ekotoxikologických testů vytvořen Výzkumným ústavem rybářským a hydrobiologickým ve Vodňanech.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Výběr testovaných látek

Mezi nitroderiváty toluenu používanými jako výbušniny má dominantní význam TNT, který je někdy používán také společně s 2,4-DNT nebo směsí 2,4- a 2,6-DNT, oba tyto DNT se vyskytují i jako příměsi v technickém TNT a v kontaminovaných půdách byly v mnoha případech zjištěny. Kromě těchto sloučenin byly k otestování vybrány dva v sekvenci biotransformačních reakcí TNT se pravidelně vyskytující, a na místech znečištěných TNT opakovaně detegované, monoaminoderiváty vznikající redukcí jedné z jeho nitroskupin (2-A-4,6-DNT a 4-A-2,6-DNT), dále všechny tři aminonitrotolueny (2-A-4-NT, 4-A-2-NT, 2-A-6-NT) a oba diaminotolueny (2,4-DAT, 2,6-DAT), které mohou vznikat redukcí jedné nebo obou nitroskupin 2,4- a 2,6-DNT.

4.2 Metody a podmínky testování

Za období vysoké citlivosti ke xenobiotikům je považován především počátek ontogeneze rostlin a z tohoto důvodu jsou k hodnocení fytotoxicity látek v největším měřítku používány test inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin a růstový test, zaměřený na hodnocení vzcházení rostlin a produkce biomasy během prvních týdnů růstu rostlin. Tyto dva citlivé a uznávané testy byly proto zvoleny k získání údajů o fytotoxicitě zájmových látek.

4.2.1 Testování vlivu látek na elongaci kořenů klíčnicích rostlin

Kořenové elongační testy byly prováděny obvyklým způsobem v Petriho miskách, v případě pšenice, hořčice a čočky v termostatu ve tmě, kultivary salátu

pro jarní rychlení klíčí lépe za osvětlení, proto byly testy se salátem prováděny na laboratorních stolech za střídání světla a tmy. Byla použita geometrická řada koncentrací látek s kvocientem 2, zahrnující koncentraci 10 mg.l^{-1} , koncentrační intervaly byly voleny na základě předběžných pokusů tak, aby mohly být určeny nejvyšší koncentrace testovaných sloučenin bez nepříznivého účinku (NOAEC), nejnižší inhibiční koncentrace (LOAEC) a pokud možno i střední inhibiční koncentrace (IC_{50}), což ovšem u některých látek omezená rozpustnost neumožnila. V případě TNT byla navíc testována z použité geometrické řady vybočující nejvyšší koncentrace 120 mg.l^{-1} , protože rozpustnost této látky při teplotě $21 \text{ }^\circ\text{C}$ již neumožňuje připravit roztok o koncentraci 160 mg.l^{-1} ; podobně u 4-A-2,6-DNT byla použita také nejvyšší koncentrace 60 mg.l^{-1} , která v tomto případě odpovídá nasycenému roztoku při $21 \text{ }^\circ\text{C}$. U každé látky bylo testováno vždy nejméně 5 koncentrací.

4.2.2 Testování vlivu látek na vzcházení a počáteční fáze růstu rostlin

Růstové testy byly prováděny v pěstební komoře v polystyrenových kelímcích se 100 g směsi půdy a písku v hmotnostním poměru 9 : 1. Byla použita půda s nízkým obsahem organického (oxidovatelného) uhlíku, jehož množství je indikátorem obsahu půdní organické hmoty, která především svými sorpčními vlastnostmi významně ovlivňuje účinnost xenobiotik na rostliny, a proto je pro testování používání půdy s nižším obsahem této složky doporučováno [49]. Písek byl použit jako obvyklý prostředek pro zapravení testovaných látek do půdy. U každé látky byla testována série nejméně 5 koncentrací látek v geometrické řadě, s kvocientem 2, zahrnující koncentraci 10 mg.kg^{-1} . Na základě výsledků orientačních pokusů byly zvoleny koncentrační intervaly umožňující určit hodnoty NOAEC, LOAEC, event. zahrnující střední účinné koncentrace pro inhibici vzcházení (LC_{50}) a růst (EC_{50}) rostlin, nebyly však použity koncentrace vyšší než $2\,560 \text{ mg.kg}^{-1}$. V souladu s požadavkem směrnice OECD byly rostliny kultivovány po takovou dobu, aby test nebyl ukončen dříve než 2 týdny po vzejití 50 % rostlin v kontrole, poté bylo hodnoceno vzcházení a růst, za jehož ukazatel byla zvolena hmotnost sušiny biomasy nadzemních částí rostlin.

4.2.3 Výběr testovacích rostlin

Nejprve byla provedena řada orientačních pokusů se širší škálou kulturních rostlin, s cílem vybrat z nejčastěji doporučovaných nebo používaných některé citlivé i méně citlivé druhy, přednostně po jednom ze 3 skupin uvedených směrnicí OECD [49], s vlastnostmi vhodnými pro experimenty za podmínek, které byly k dispozici; při výběru bylo přihlédnuto k citlivosti rostlin, klíčivosti semen, rovnoměrnosti vzcházení, vyrovnanosti růstu jednotlivých rostlin a dosažení vhodné velikosti během doby kultivace při růstovém testu.

V 1. skupině seznamu rostlin ve směrnici OECD jsou pouze rostliny z čeledi Poaceae. Nejčastěji se používá oves a pšenice. Z několika vzorků osiv těchto rostlin se nejlépe osvědčilo, a proto bylo dále použito, osivo ozimé pšenice Siria.

Z 2. skupiny rostlin doporučené OECD, která obsahuje 5 druhů z čeledi Brassicaceae, byla v orientačních pokusech použita hořčice a ředkvička. Obě tyto rostliny se ukázaly jako vhodné; nakonec byla upřednostněna hořčice (jediná běžná odrůda Zlata), protože je častěji doporučována a používána a je také druhem předepsaným pro testování fytotoxicity výluhů odpadů podle v ČR platné vyhlášky o hodnocení nebezpečnosti odpadů [45].

Jako zástupce rostlin 3. skupiny dle OECD, obsahující druhy z několika čeledí, byl zvolen salát (Asteraceae), který je obecně považován za velmi citlivou rostlinu [53], což se při předběžných testech potvrdilo; z několika dostupných kultivarů byl vybrán Král máje, určený k jarnímu rychlení.

Z dalších dvouděložných bylo orientačně testováno ještě několik rostlin z čeledi Fabaceae (hrách, fazol, vikev, vojtěška a čočka), dále několik osiv různých kultivarů rajčete (Solanaceae) a okurky (Cucurbitaceae). Z nich jako čtvrtá rostlina byla pro testy nakonec vybrána čočka, odrůda Laird. Použití rostliny z ekologicky i ekonomicky významné čeledi Fabaceae při testech fytotoxicity se často doporučuje [51], několik druhů z této taxonomické skupiny je také ve třetí skupině rostlin dle směrnice OECD, čočka však mezi nimi zařazena není. Tato rostlina byla zvolena pro rychlé a stejnoměrné klíčení semen a vhodnou velikost rostlin v prvních dnech vývoje ve srovnání s dalšími uvažovanými bobovitými. Jako velmi citlivá rostlina (srovnatelně, někdy dokonce citlivější než salát) s vysokou klíčivostí, rovnoměrným vzcházením a vhodnou rychlostí růstu se ukázalo také rajče. Nakonec však tato rostlina použita nebyla, protože byly upřednostněny výše uvedené druhy doporučené směrnicí OECD, spolu s čočkou z čeledi Fabaceae.

4.3 Výsledky testů fytotoxicity

K hodnocení statistické významnosti rozdílů středních hodnot sledovaných ukazatelů vlivu látek na testované rostliny v porovnání s kontrolou byl použit jednostranný Studentův t-test, s obecným předpokladem nerovnosti rozptylů; rozdíly byly hodnoceny jako významné, pokud bylo možno zamítnout hypotézu o rovnosti na hladině spolehlivosti nejméně 95 %. Tak byly určeny hodnoty NOAEC a LOAEC. K výpočtům středních účinných koncentrací (IC_{50} , EC_{50} , LC_{50}) byla použita probitová metoda, která patří při modelování závislosti mezi dávkami nebo koncentracemi látek a kvantální i kvantitativní biologickou odpovědí k nejčastěji používaným a je doporučována také některými normami pro ekotoxikologické testy i metodickým návodem MŽP ČR ke stanovení ekotoxicity odpadů [46].

Hodnoty NOAEC, LOAEC a středních inhibičních koncentrací (IC_{50}) testovaných látek ve vodných roztocích, stanovené pro jednotlivé rostliny na základě výsledků kořenových elongačních testů, jsou uvedeny v Tab. 2, hodnoty NOAEC, LOAEC a středních inhibičních koncentrací látek pro vzcházení, resp. růst rostlin (LC_{50} , resp. EC_{50}) ve směsi půda/písek (9 : 1), stanovené na základě výsledků růstových testů, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 2 Výsledky testů inhibice elongace kořenů klíčících rostlin - hodnoty NOAEC, LOAEC a IC₅₀ testovaných látek ve vodě [mg.l⁻¹]

Látka	Pšenice			Hořčice			Salát			Čočka		
	NOAEC	LOAEC	IC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	IC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	IC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	IC ₅₀ ¹
TNT	10	20	54 (52,2-54,8)	10	20	38 (35,1-40,1)	0,625	1,25	4,3 (3,67-4,97)	20	40	110 (97,9-121)
2-A-4,6-DNT	2,5	5	28 (25,3-30,6)	20	40	- ²	1,25	2,5	6,2 (5,42-6,99)	10	20	- ²
4-A-2,6-DNT	10	20	- ³	20	40	- ³	5	10	26 (24,9-27,3)	60 ⁴	-	-
2,4-DNT	10	20	39 (37,9-39,9)	5	10	31 (28,3-34,0)	0,625	1,25	3,7 (3,07-4,46)	20	40	92 (85,8-99,0)
2-A-4-NT	20	40	140 (126-153)	10	20	64 (60,2-68,2)	2,5	5	32 (28,0-36,8)	20	40	120 (107-143)
4-A-2-NT	10	20	88 (81,5-96,0)	5	10	23 (21,8-24,9)	2,5	5	11 (9,80-11,4)	10	20	140 (118-173)
2,4-DAT	40	80	150 (136-169)	80	160	270 (244-299)	20	40	51 (44,7-58,5)	160	320	360 (326-391)
2,6-DNT	20	40	66 (62,3-69,2)	5	10	23 (21,6-25,4)	10	20	36 (34,9-38,0)	10	20	41 (36,5-45,1)
2-A-6-NT	5	10	49 (45,6-53,3)	2,5	5	12 (11,5-13,1)	1,25	2,5	9,4 (8,40-10,6)	10	20	70 (64,7-75,6)
2,6-DAT	40	80	250 (233-266)	80	160	380 (333-443)	10	20	63 (53,1-74,1)	80	160	570 (520-626)

¹ V závorkách jsou uvedeny 95 % intervaly spolehlivosti.

² Inhibice elongace kořenů klíčících rostlin v nasyceném roztoku 2-A-4,6-DNT (40 mg.l⁻¹) byla statisticky významná, avšak nižší než 50 %.

³ Inhibice elongace kořenů klíčících rostlin v nasyceném roztoku 4-A-2,6-DNT (60 mg.l⁻¹) byla statisticky významná, avšak nižší než 50 %.

⁴ Statisticky významná inhibice elongace kořenů klíčících rostlin nebyla pozorována ani při koncentraci nasyceného roztoku 4-A-2,6-DNT (60 mg.l⁻¹).

Tab. 3 Výsledky růstových testů - hodnoty NOAEC, LOAEC, EC₅₀ a LC₅₀ testovaných látek ve směsi půda/písek 9:1 [mg.kg⁻¹]

Látka	Pšenice				Hořčice				Salát				Čočka			
	NOAEC	LOAEC	EC ₅₀ ¹	LC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	EC ₅₀ ¹	LC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	EC ₅₀ ¹	LC ₅₀ ¹	NOAEC	LOAEC	EC ₅₀ ¹	LC ₅₀ ¹
TNT	80	160	211 (186-239)	> 2 560	20	40	83 (77,8-88,2)	1 100 (853-1 510)	20	40	69 (63,7-74,9)	290 (225-372)	80	160	230 (209-247)	330 (261-407)
2-A-4,6-DNT	40	80	100 (88,8-121)	> 2 560	20	40	60 (53,3-68,2)	> 2 560	10	20	50 (45,2-54,4)	1 700 (1 030-2 710)	20	40	240 (180-325)	> 2 560
4-A-2,6-DNT	40	80	210 (179-243)	> 2 560	20	40	73 (66,9-79,6)	> 2 560	20	40	61 (55,7-67,7)	1 700 (1 170-2 340)	40	80	820 (579-1 170)	> 2 560
2,4-DNT	10	20	25 (22,6-28,4)	49 (38,5-63,5)	10	20	38 (34,8-40,7)	120 (102-138)	5	10	21 (18,7-22,5)	80 (58,9-109)	20	40	75 (70,9-79,1)	170 (142-201)
2-A-4-NT	80	160	200 (186-216)	360 (285-465)	10	20	40 (37,2-42,8)	140 (108-177)	10	20	27 (24,2-30,7)	50 (40,0-62,9)	20	40	87 (82,3-92,5)	210 (178-239)
4-A-2-NT	80	160	180 (164-192)	310 (286-334)	20	40	47 (44,0-49,6)	120 (98,9-144)	5	10	18 (17,0-20,0)	29 (23,4-37,0)	20	40	99 (91,3-107)	180 (154-207)
2,4-DAT	640	1 280	1 300 (1 200-1 370)	1 900 (1 650-2 180)	640	1 280	1 300 (1 160-1 410)	2 000 (1 740-2 250)	320	640	750 (658-851)	1 100 (925-1 330)	1 280	2 560	> 2 560	> 2 560
2,6-DNT	20	40	45 (40,8-49,1)	170 (150-190)	20	40	61 (57,2-64,8)	79 (65,4-94,3)	10	20	26 (23,8-28,4)	65 (50,2-84,1)	10	20	36 (32,5-39,4)	74 (59,3-92,8)
2-A-6-NT	40	80	88 (80,5-95,3)	130 (115-152)	10	20	36 (32,4-39,9)	39 (33,5-45,8)	5	10	15 (14,2-16,9)	18 (14,5-21,5)	20	40	61 (56,1-66,1)	110 (90,1-123)
2,6-DAT	640	1 280	1 200 (1 130-1 250)	1 800 (1 580-2 080)	640	1 280	2 100 (1 960-2 210)	> 2 560	160	320	790 (718-872)	1 300 (1 020-1 750)	1 280	2 650	1 800 (1 650-1 910)	2 100 (1 800-2 560)

¹ V závorkách jsou uvedeny 95 % intervaly spolehlivosti.

4.4 Diskuse experimentálních výsledků

Na základě výsledků testů inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin byly pro hodnocené látky zjištěny NOAEC a LOAEC a v krátkodobých testech obvykle nejčastěji stanovované střední inhibiční koncentrace. V předběžných orientačních testech, s použitím širší škály koncentrací, byla v řadě případů pozorována při nízkých koncentracích látek ve vodných roztocích také významná stimulace růstu kořenů, zvláště u čočky a hořčice. Stimulace růstu rostlin nízkými koncentracemi i obecně velmi toxických látek není ničím neobvyklým, ale její studium nebylo cílem této práce a v konečných testech byly použity pouze koncentrace, při kterých se ve významné míře neprojevila.

Hlavním cílem provedení růstových testů bylo určit pro hodnocené látky NOAEC a LOAEC, které jsou nejvýznamnějšími údaji stanovovanými při dlouhodobějších testech. Dále byly ze závislostí mezi koncentracemi testovaných sloučenin a inhibicí vzcházení a růstu rostlin vypočteny i střední účinné koncentrace. Oproti závislostem mezi koncentracemi látek a inhibicí růstu kořenů, pozorovaným v kořenovém elongačním testu, byly v růstovém testu při stejné geometrické koncentrační řadě látek v půdní směsi často zaznamenány značně strmější závislosti mezi koncentracemi a účinky na růst, event. vzcházení rostlin; v několika případech, zvláště u pšenice, byl již při LOAEC některých látek pozorován velmi silný efekt, dokonce i inhibice růstu blízké 50 %. V růstových testech nebylo ani při nízkých koncentracích, použitých v předběžných pokusech, zjištěno statisticky významné stimulační působení látek, pouze u pšenice byla pozorována relativně zřetelnější (ovšem nevýznamná na hladině statistické významnosti 5 %) stimulace růstu při nejnižší testované koncentraci TNT 40 mg.kg⁻¹. Stimulačnímu efektu látek na použité rostliny však zvláštní pozornost věnována nebyla, je samozřejmě možné, že v nižších koncentracích, než které byly použity, by se také projevil. Tak např. významná stimulace růstu ovsa a pšenice (Poaceae) při koncentracích TNT v půdě 25-50 mg.kg⁻¹ a statisticky nevýznamná stimulace růstu řeřichy a brukve (Brassicaceae) při koncentracích TNT v půdě 5-25 mg.kg⁻¹, byla v literatuře popsána [41].

Z porovnání výsledků obou testů (Tab. 2 a 3) jsou patrné jak určité podobnosti, tak někdy značné rozdíly v pořadí účinnosti látek, zjištěném v testech inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin ve vodných roztocích a v růstových testech ve směsi půda/písek. Také poměry mezi hodnotami NOAEC, určenými v obou testech, i poměry mezi hodnotami IC₅₀ a EC₅₀, stanovenými v kořenových elongačních testech a v růstových testech, se pro řadu látek významně liší. Takové rozdíly nejsou překvapivé. Zatímco při kořenovém elongačním testu je sledováno pouze ovlivnění klíčení a růstu kořenů klíčnicích rostlin po relativně krátkodobé expozici látkám v biologicky dostupné formě vodných roztoků o definované koncentraci, vliv na vzcházení rostlin a tvorbu jejich biomasy, sledovaný v růstovém testu, je výsledkem dlouhodobějšího a komplexnějšího působení látek i na další biochemické a fyziologické pochody probíhající v rostlině po fázi klíčení, přičemž jsou rostliny ovlivňovány především expozicí kořenů látkám v půdním roztoku, v němž o jejich koncentraci spolurozhodují procesy ustavování rovnováh, které se vytváří mezi

půdním roztokem a částicemi látky zapravenými do růstového substrátu a jsou v mnoha případech podstatně ovlivňovány především sorpcí, event. i dalšími interakcemi mezi látkou a půdními složkami. Z těchto důvodů mohou relativně jednoduché, rychlé a citlivé testy inhibice elongace kořenů klíčnicích rostlin ve vodných roztocích poskytnout cenné předběžné informace o fytotoxicitě látek, ale má-li být hodnoceno riziko fytotoxicity polutantů v kontaminovaných půdách, je mnohem vhodnější použít testy s delší expozicí látkám v půdním prostředí.

Pro testy byly záměrně vybrány rostliny z různých taxonomických skupin, s cílem použití druhů s rozdílnou citlivostí. V souladu s očekáváním byl v obou testech nejcitlivější salát, hořčice byla středně senzitivní. Pšenice byla použita jako zástupce lipnicovitých, jejichž větší tolerance k širší škále látek je obecně známá a v zemědělské praxi patří některé plevy z této skupiny mezi velmi odolné i vůči dostupným, na tuto čeleď selektivně působícím herbicidům. Pšenice byla k většině testovaných sloučenin méně citlivá než hořčice, ale citlivější než čočka. Ta byla v obou testech k většině látek citlivá nejméně, její tolerance však nebyla nijak mimořádná.

Ve skupině testovaných sloučenin patřily k nejtoxičtějším 2,4- a 2,6-DNT, obecně je lze zařadit mezi středně fytotoxické látky. Výsledky testování 2,4-DNT jsou srovnatelné s již publikovanými údaji, získanými růstovým testem ve dvou typech půdy za použití salátu, rajčete a ovesa [42]. Pro salát uváděné hodnoty nejvyšších koncentrací bez nepříznivého účinku (v obou půdách $3,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) a střední inhibiční koncentrace ($5,8$ a 13 mg.kg^{-1}) jsou v dobré shodě s hodnotou NOAEC (5 mg.kg^{-1}) a vcelku i EC_{50} (21 mg.kg^{-1}), zjištěnými v této práci. Blízké jsou také publikované hodnoty středních inhibičních koncentrací a především nejvyšších neúčinných koncentrací 2,4-DNT pro oves (NOAEC v jedné půdě 10 mg.kg^{-1} , ve druhé 11 mg.kg^{-1}) s hodnotami stanovenými v této práci pro botanicky příbuznou pšenici (NOAEC 10 mg.kg^{-1}).

Oba monoaminoderiváty vzniklé redukcí jedné nitroskupiny 2,4-DNT byly většinou poněkud méně fytotoxické než výchozí 2,4-DNT. 2,6-DNT byl v porovnání s 2,4-DNT někdy méně účinný, jindy toxičtější. Oba DAT byly v obou testech pro všechny rostliny vždy nejméně toxické a lze je řadit k relativně málo až nevýznamně fytotoxickým látkám. Elongaci kořenů všech rostlin inhibovaly pokaždé až ve značně vyšších koncentracích než oba DNT a produkty redukce jedné z jejich nitroskupin, přičemž 2,6-DAT byl obvykle méně účinný než 2,4-isomer. Ještě výrazněji slabší inhibiční působení diaminů na růst rostlin bylo pozorováno v růstovém testu; je pravděpodobné, že se zde uplatňuje vliv možné polymerace a známé významné sorpce na půdní složky [54], které vedou ke snížení jejich biologické dostupnosti, a tím k ještě významnějšímu poklesu výsledné účinnosti oproti ostatním testovaným látkám, než jaký byl zaznamenán v kořenovém elongačním testu ve vodných roztocích.

TNT byl v testech inhibice elongace kořenů většinou srovnatelně účinný s oběma DNT, především 2,4-DNT, ale v růstovém testu byl zpravidla méně toxický než oba DNT i produkty redukce jedné jejich nitroskupiny. Většina dosud publikovaných

údajů o fytotoxicitě TNT byla získána testy za značně odlišných podmínek a s jinými rostlinami, takže, vzhledem ke známé významné závislosti účinků látek na podmínkách testování a rozdílné citlivosti rostlin, je dobře možné srovnávat získané poznatky pouze s výsledky studie vlivu TNT ve dvou různých typech půdy na klíčení a tvorbu biomasy řěřichy, brukve, ovsa a pšenice po 14denní expozici od vyklíčení 50 % rostlin v kontrole [41]. V citované studii bylo zjištěno, že k TNT byly citlivější řěřicha a brukev z čeledi Brassicaceae než oves a pšenice z čeledi Poaceae, obdobně jako v této práci použitá hořčice (Brassicaceae) byla citlivější než pšenice. Publikované hodnoty LOAEC TNT pro řěřichu a brukev (50 mg.kg^{-1}) jsou velmi blízké LOAEC stanovené v této práci pro hořčici ze stejné čeledi (40 mg.kg^{-1}). Nejnižší koncentrace TNT vyvolávající statisticky významnou inhibici růstu pšenice v jednom druhu půdy, použitým v publikované studii, byla 158 mg.kg^{-1} , ve druhém 311 mg.kg^{-1} [41], což je také v dobré shodě s LOAEC stanovenou v této práci (160 mg.kg^{-1}). Hodnoty středních inhibičních koncentrací, které lze odhadnout z grafů závislosti mezi koncentracemi TNT v půdách a hmotností biomasy pšenice, uvedených v citované publikaci, jsou blízké hodnotě vypočtené v této práci (211 mg.kg^{-1}). Autoři studie dále uvádí, že k redukci růstu použitých rostlin docházelo při mnohem nižších koncentracích TNT, než které vyvolávaly inhibici klíčení. Klíčivost pšenice významně nesnižovala ani nejvyšší použitá koncentrace TNT 355 mg.kg^{-1} ; vyšším koncentracím tato rostlina exponována nebyla, současně však byly provedeny experimenty s ovsem, jehož klíčení nebylo ovlivněno ani při nejvyšší použité koncentraci $1\,600 \text{ mg.kg}^{-1}$ [41]. V této práci nebyla zaznamenána statisticky významná inhibice vzcházení pšenice dokonce ještě ani při nejvyšší použité koncentraci TNT $2\,560 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Z produktů redukce jedné nitroskupiny TNT byl 2-A-4,6-DNT většinou srovnatelně nebo poněkud více účinný než TNT, 4-A-2,6-DNT byl v porovnání s TNT obvykle srovnatelně nebo naopak méně fytotoxický. Hlavním pozorovaným zřetelným účinkem TNT a obou testovaných produktů jeho redukce byla výrazná inhibice růstu a vývoje kořenů rostlin. V růstovém testu bylo zaznamenáno, že 2-A-4,6-DNT, 4-A-2,6-DNT, a kromě působení na čočku také TNT, neredukovaly klíčení a vzcházení rostlin ještě i při koncentracích podstatně vyšších, než které prakticky zcela inhibovaly růst kořenů. Malé klíčící rostliny s nevyvinutými kořeny pak, díky udržování stálé vlhkosti půdy (na úrovni 70 % plné vodní kapacity) během experimentu, zůstávaly i v kultivačních směsích s relativně vysokými koncentracemi uvedených látek zelené, jejich růst a vývoj ale stagnoval a rostliny by evidentně při prodloužení doby kultivace dříve nebo později uhynuly. Z těchto výsledků je patrné, že samotné klíčení nebo vzcházení rostlin nejsou vhodnými indikátory fytotoxicity takto působících látek. K obdobnému závěru dospěli i autoři dvou z dříve publikovaných studií fytotoxicity TNT [39,41].

Inhibiční působení TNT a 4-A-2,6-DNT na růst a vývoj kořenů bylo podrobněji analyzováno v práci [38], zabývající se hodnocením jejich vlivu na klíčení a růst kostřavy (*Festuca arundinacea*) v agarové kultuře; bylo popsáno, že obě sloučeniny působily na morfologii kořenů analogicky jako strukturně podobné dinitroanilinové

herbicidey. Tyto látky (většinou na dusíku aminoskupiny dvěma stejnými nebo různými alkyly substituovaný 2,6-dinitroanilin s alkylem nebo trifluormethylovou skupinou v poloze 4) patří mezi prakticky významné selektivní preemergentní herbicidey, které po zapravení do půdy inhibují klíčení nebo zastavují vývoj citlivých rostlin inhibicí růstu jejich kořenů, a jsou používány k ničení hlavně lipnicovitých, ale i některých dvouděložných plevelů [55]. Je zajímavé, že podle výsledků získaných v této práci byl především v růstovém testu 2-A-4,6-DNT pro rostliny toxicitější než TNT a 4-A-2,6-DNT, přestože při povrchním pohledu je jeho molekula dinitroanilinovým herbicidům méně podobná. Obdobné inhibiční působení na růst a vývoj kořenů jako u TNT bylo pozorováno také u obou DNT a 2-A-6-NT, u aminonitrotoluenů vzniklých redukcí 2,4-DNT tento efekt tak výrazný nebyl.

Jedním z cílů testování fytotoxicity nitroderivátů toluenu a aminoderivátů, které vznikají jejich biotransformací, bylo také zodpovězení otázky, zda některé produkty redukce, o nichž nebyly v literatuře nalezeny žádné fytotoxikologické údaje, nejsou pro suchozemské rostliny podstatně toxicitější, než výchozí nitrotolueny. V době zadání a zahájení práce např. nebyly podle klasifikace EU dinitrotolueny vůbec hodnoceny jako nebezpečné pro vodní organismy, avšak aminonitrotolueny byly klasifikovány jako toxické a diaminotolueny dokonce jako vysoce toxické [56] (později byla klasifikace EU přehodnocena, v současnosti jsou 2,4-DNT a všechny aminonitrotolueny i diaminotolueny shodně klasifikovány jako toxické pro vodní organismy, s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky ve vodním prostředí [34]). Výsledky provedených růstových testů ukázaly, že pro použité rostliny byly produkty vznikající redukcí jedné nitroskupiny TNT a DNT jen málokdy toxicitější než výchozí nitrotolueny a pokud v některých případech byly monoaminoderiváty účinnější, nejedná se o natolik závažné zvýšení toxicity, aby tyto transformační produkty mohly mít významný vliv na fytotoxicitu půd, ve kterých jsou TNT nebo DNT převládajícími kontaminanty. Reducí obou nitroskupin 2,4- i 2,6-DNT vznikající diaminy, jak již bylo uvedeno, byly vždy podstatně méně toxické než oba DNT.

4.5 Možnosti praktického využití výsledků

4.5.1 Hodnocení ekologických rizik plynoucích z kontaminace půd TNT a DNT

Pokud byly v publikacích obsahujících výsledky stanovení TNT v půdě kontaminovaných lokalit současně uvedeny i zjištěné koncentrace jeho redukcí vznikajících aminodinitrotoluenů, jednalo se vždy o hodnoty v porovnání s TNT podstatně nižší, zpravidla nejméně o jeden řád [7,11,16]. Za tohoto stavu je možno při hodnocení fytotoxikologického významu kontaminace půd přítomnost obou těchto produktů parciální redukce vedle samotného TNT považovat za nevýznamnou, bez ohledu na skutečnost, že byly často srovnatelně, nebo někdy dokonce poněkud více fytotoxické než TNT. V publikaci uvádějící výsledky stanovení DNT v půdách, v nichž tyto látky byly hlavní kontaminující složkou,

nejsou uvedeny žádné údaje o obsahu produktů jejich redukce. Pokud by, podobně jako produkty transformace TNT, byly aminy vznikající redukcí DNT přítomny v množstvích podstatně nižších než DNT, což je předpoklad zřejmě zcela oprávněný, neboť přítomnost vyšších koncentrací těchto sloučenin by při použitých analytických postupech byla sotva přehlédnuta, bylo by možno celkové riziko fytotoxicity plynoucí z kontaminace zhodnotit dostatečně spolehlivě pouze na základě znalosti údajů o obsahu DNT.

Při analýze rizik patří mezi nejvýznamnější ekotoxikologické údaje o látkách nejvyšší koncentrace, při kterých nebyl pozorován nepříznivý účinek (NOAEC), nebo nejnižší koncentrace, při nichž byl zaznamenán nepříznivý účinek (LOAEC). Tyto charakteristiky byly pro hodnocené látky stanoveny.

Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ČR požaduje provést analýzu rizik pro zdraví a životní prostředí při překročení koncentrací dinitrotoluenů v zemině 5 až 15 mg.kg⁻¹, resp. TNT 2 až 10 mg.kg⁻¹, v závislosti na předpokládaném účelu využití území [17]. Při poprvé v provozním měřítku realizované biologické dekontaminaci (kompostování) zeminy znečištěné výbušninami v USA byla jako cílový parametr stanovena koncentrace TNT 30 mg.kg⁻¹ půdy [57]. Z výsledků získaných při řešení této práce vyplývá, že při koncentracích TNT, a zejména DNT, blízkých výše uvedeným limitům, by již mohl být růst některých velmi citlivých rostlin negativně ovlivněn, pro růst mnoha dalších ale tyto koncentrace zřejmě významné riziko nepředstavují.

4.5.2 Využití rostlin jako bioindikátorů kontaminace

Přestože současné vysoce citlivé a selektivní analytické metody umožňují v půdách detegovat, identifikovat a kvantitativně stanovit i velmi nízké koncentrace polutantů, toxikologický význam znečištění nelze vždy vyhodnotit pouze na základě analytických výsledků. Biologická odezva může být ovlivněna i spolupřítomností dalších nedetegovaných nebo nestanovených látek, produktů jejich abiotické a biotické transformace apod., ale i jinými faktory, které analytické hodnocení nepostihuje. Proto mají při hodnocení možného nepříznivého účinku polutantů, nebo monitoringu znečištění, v mnoha případech nezastupitelný význam biotesty.

Pro využití fytotestů k detekci nebo monitoringu přítomnosti znečišťujících látek je důležitým předpokladem volba vhodných citlivých rostlin. Ke skupině sledovaných látek byl velmi citlivý salát a tuto rostlinu by tedy bylo možno využít jako bioindikátor při hodnocení stupně kontaminace, event. účinnosti dekontaminace apod. Podle orientačních testů, provedených s cílem výběru rostlinných druhů pro konečné testy, bylo ke sledované skupině látek velmi citlivé také rajče.

Z výsledků testování je patrná řada rozdílů mezi účinností látek v testu inhibice elongace kořenů a v růstovém testu. Výhodou kořenového elongačního testu je sice značně jednodušší provedení a citlivost, ale významnou předností růstového testu je, že podmínky testování jsou podstatně bližší reálné situaci v kontaminované půdě.

4.5.3 Fytoremediace

Fytoremediace, tj. metoda využívající schopnosti rostlin akumulovat nebo transformovat polutanty přítomné v půdě, je považována za jednu z perspektivních metod bioremediace, s možností uplatnění především při povrchovém znečištění půd hydrofobními látkami [39,58]. Pro úspěšnou realizaci je nutným předpokladem výběr vhodných, ke kontaminantům především dostatečně tolerantních rostlinných druhů. Z výsledků provedených fytotestů vyplývající zjištění, že vůči sledovaným látkám je relativně málo citlivá pšenice, odpovídá již dříve publikovaným údajům o značné toleranci této rostliny (a ovsa) vůči TNT [41], na základě poznatků o výskytu některých trav na půdách kontaminovaných výbušninami na bázi TNT byly již provedeny i studie zaměřené na ověření vhodnosti některých lipnicovitých při bioremediaci půd znečištěných touto látkou [38,39]. Z dalších rostlin, použitých v této práci, byla k TNT relativně tolerantní i čočka. Tento poznatek nasvědčuje, že k uvedeným látkám jsou méně citlivé rostliny i mezi dvouděložnými a tak by bylo možno vedle využití vhodných lipnicovitých při bioremediaci půd kontaminovaných rezidui výbušnin na bázi TNT uvažovat také o volbě dvouděložných rostlin, přinejmenším z čeledi bobovitých.

5 ZÁVĚRY

V literatuře byla nalezena řada údajů potvrzujících existenci případů významného znečištění půdy výbušninami na bázi nitroderivátů toluenu, nejčastěji TNT, v některých případech také 2,4- a 2,6-DNT.

TNT a DNT patří mezi relativně stálé polutanty, přítomnost těchto látek v lokalitách kontaminovaných před desítkami let dokládá jejich velmi obtížnou mineralizaci. Vedle uvedených nitroderivátů toluenu lze ve znečištěných půdách očekávat i přítomnost produktů jejich biotické a abiotické transformace. Z dosavadních poznatků o mikrobiálních transformacích TNT a DNT vyplynulo, že přednostně dochází k postupné redukci jejich nitroskupin, přičemž ze široké škály známých biotransformačních produktů patří k relativně stálým některé aminy. V půdách kontaminovaných TNT byla opakovaně prokázána přítomnost 4-A-2,6-DNT, event. také 2-A-4,6-DNT, obdobně je možno předpokládat i přítomnost aminoderivátů vznikajících redukcí DNT.

TNT, DNT a produkty redukce jejich nitroskupin patří mezi sloučeniny toxikologicky závažné pro savce, včetně člověka, pro jejich významnou akutní a chronickou toxicitu i možné pozdní účinky. TNT, 2,4-DNT, aminonitrotoluenu a diaminotoluenu jsou v zemích EU i v ČR klasifikovány také jako toxické pro vodní organismy, s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky ve vodním prostředí. Dosud bylo publikováno jen omezené množství informací o fytotoxicitě TNT, 2,4-DNT a 4-A-2,6-DNT; o 2,6-DNT, jiných produktech redukce TNT než 4-A-2,6-DNT a o žádném produktu redukce obou DNT fytotoxikologické údaje v literatuře nebyly vůbec nalezeny. Proto byly pro testování vybrány TNT a oba

aminodinitrotolueny vznikající z TNT redukcí jedné z nitroskupin, dále 2,4-DNT, 2,6-DNT a všechny aminonitrotolueny a diaminotolueny vznikající z uvedených DNT redukcí jedné, nebo obou nitroskupin.

Pro zjištění základních fyto toxikologických údajů byly použity uznávané testy, zaměřené na hodnocení účinků látek na citlivé počáteční fáze vývoje rostlin, test inhibice elongace kořenů klíčících rostlin ve vodných roztocích látek a růstový test, při němž bylo sledováno ovlivnění vzcházení a růstu rostlin ve směsi půda/písek se zapravenými látkami.

K testům byla použita jedna jednoděložná rostlina z čeledi Poaceae, pšenice (*Triticum aestivum* L., ozimá odrůda Siria) a tři dvouděložné, jednak z čeledi Brassicaceae, hořčice (*Sinapis alba* L., odrůda Zlata), další z čeledi Asteraceae, salát (*Lactuca sativa* L., odrůda Král máje) a jedna z čeledi Fabaceae, čočka (*Lens culinaris* Med., odrůda Laird). Z těchto rostlin byl k hodnoceným sloučeninám nejcitlivější salát, hořčice byla středně citlivá, pšenice a čočka byly k většině látek nejméně citlivé.

Pro testované sloučeniny byly stanoveny NOAEC a LOAEC a střední inhibiční koncentrace. Bylo zjištěno, že všechny hodnocené nitroderiváty toluenu a aminy vzniklé redukcí jedné z jejich nitroskupin patří mezi středně fyto toxické látky, diaminy vznikající redukcí obou DNT jsou málo fyto toxické. Monoaminoderiváty vzniklé redukcí TNT a obou DNT jsou v porovnání s těmito sloučeninami někdy toxicitější, jindy méně účinné, celkově však rozdíly v účinnosti všech těchto látek nejsou natolik významné, aby v půdách, kde TNT nebo DNT vedle produktů jejich redukce dominují, byl příspěvek redukčních produktů k fyto toxicitě nitroderivátů samotných podstatný.

Získané poznatky o fyto toxicitě testovaných látek a citlivosti použitých rostlin je možno využít při hodnocení environmentálních rizik, biomonitoringu znečištění nebo fyto remediaci půd kontaminovaných nitroderiváty toluenu používanými ve vojenských výbušninách. Uvedené možnosti jsou v práci diskutovány.

6 LITERATURA

1. Krauz, C.: *Technologie výbušin*. Vědecko-technické nakladatelství, Praha 1950. 943 s.
2. Palmer, W. G., Small, M. J., Dacre, J. C., Eaton, J. C.: Toxicology and Environmental Hazards. In: *Organic Energetic Compounds* (Marinkas, P. L., Ed), p. 289-372. Nova Science Publishers, New York 1996. 421 p.
3. Jenkins, T. F., Walsh, M. E.: Development of Field Screening Methods for TNT, 2,4-DNT and RDX in Soil. *Talanta* **39** (4), 419-128 (1992)
4. Hughes, J. B., Wang, C. Y., Zhang, C.: Anaerobic Biotransformation of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: A Pathway through Dihydroxylamino Intermediates. *Environ. Sci. Technol.* **33** (7), 1065-1070 (1999)

5. Steuckart, C., Berger-Preiss, E., Levsen, K.: Determination of Explosives and Their Biodegradation Products in Contaminated Soil and Water from Former Ammunition Plants by Automated Multiple Development High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **66** (15), 2570-2577 (1994)
6. Nishino, S. F., Spain, J. C., Lenke, H., Knackmuss, H.-J.: Mineralization of 2,4- and 2,6-Dinitrotoluene in Soil Slurries. *Environ. Sci. Technol.* **33** (7), 1060-1064 (1999)
7. Schäfer, R., Achazi, R. K.: The Toxicity of Soil Samples Containing TNT and Other Ammunition Derived Compounds in the Enchytraeid and Collembola-Biotest. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **6** (4), 213-216 (1999)
8. Green, A., Moore, D., Farrar, D.: Chronic Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene to a Marine Polychaete and an Estuarine Amphipod. *Environ. Toxicol. Chem.* **18** (8), 1783-1790 (1999)
9. ATSDR: *Public Health Assessment. Weldon Spring Ordnance Works Weldon Spring, St. Charles County, Missouri.* [HTML dokument] ATSDR, March 8, 1995 [cit. 17. 7. 2002]. Dostupný z:
http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHA/wel_sp/wsta_toc.html
10. Bradley, P. M., Chapelle, F. H.: Factors Affecting Microbial 2,4,6-Trinitrotoluene Mineralization in Contaminated Soil. *Env. Sci. Technol.* **29** (3), 802-806 (1995)
11. Simini, M., Wentsel, R. S., Checkai, R. T., Phillips, C. T., Chester, N. A., Major, M. A., Amos, J. C.: Evaluation of Soil Toxicity at Joliet Army Ammunition Plant. *Environ. Toxicol. Chem.* **14** (4), 623-630 (1995)
12. Jerger, D. E., Simon, P. B., Weitzel, R. L., Schenk, J. E.: *Aquatic Field Surveys at Iowa, Radford, and Joliet Army Ammunition Plants. Volume III, Microbial Investigations, Iowa, and Joliet Army Ammunition Plants. Final Report.* [HTML dokument] Environmental Control Technology Corp., Ann Arbor, USA, Nov. 1976 [cit. 21. 12. 1999]. Dostupný z:
<http://www.jhu.edu/~cpia/database/770770.html>
13. Dornberger, U., Welsch, T.: Explosivstoffe in Altlasten der Rüstungsproduktion. Stand der Analytik. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **7** (5), 302-316 (1995)
14. Chládek, J.: Munice v zemi jako specifický druh odpadu. *Odpady* **1997** (2), 19 (1997)
15. Breitung, J., Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Kaminski, L., Gemsa, K., von Löw, E.: Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene-Contaminated Soils by Two Different Aerated Compost Systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 795-800 (1996)
16. Schneider, K., Oltmanns, J., Radenberg, T., Schneider, T., Pauly-Mundegar, D.: Uptake of Nitroaromatic Compounds in Plants. Implications for Risk Assessment of Ammunition Sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **3** (3), 135-138 (1996)
17. MŽP ČR: Metodický pokyn odboru pro ekologické škody MŽP ČR – kritéria znečištění zemin a podzemní vody. *Věstník MŽP ČR* **1996** (3), 10-55 (1996)

18. Kaplan, D. L.: Biotechnology and Bioremediation for Organic Energetic Compounds. In: *Organic Energetic Compounds* (Marinkas, P. L., Ed.), p. 373-416. Nova Science Publishers, New York 1996. 421 p.
19. Higson, F. K.: Microbial Degradation of Nitroaromatic Compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**, 1-19 (1992)
20. Spain, C. J. (Ed.): *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*. Plenum Press, New York 1995. 232 p.
21. Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G.: Microbial Degradation of Explosives: Biotransformation versus Mineralization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** (5), 605-618 (2000)
22. Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J. C., Knackmuss, H.-J.: Initial Reductive Reactions in Aerobic Microbial Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (1), 246-258 (1998)
23. McCormick, N. G., Feeherry, F. E., Levinson, H. S.: Microbial Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene and Other Nitroaromatic Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31** (6), 949-958 (1976)
24. Kaplan, D. L., Kaplan, A. M.: Thermophilic Biotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene under Simulated Composting Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (3), 757-760 (1982)
25. Spanggard, R. J., Spain, J. C., Nishino, S. F., Mortelmans, K. E.: Biodegradation of 2,4-Dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (11), 3200-3205 (1991)
26. Nishino, S. F., Paoli, G. C., Spain, J. C.: Aerobic Degradation of Dinitrotoluenes and Pathway for Bacterial Degradation of 2,6-Dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (5), 2139-2147 (2000)
27. McCormick, N. G., Cornell, J. H., Kaplan, A. M.: Identification of Biotransformation Products from 2,4-Dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **35** (5), 945-948 (1978)
28. Marhold, J.: *Přehled průmyslové toxikologie. Organické látky*. Avicenum, Praha 1986. 1 744 s.
29. Lewis, R. J. Sr.: *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*. Ninth Edition. Version 1.8 [CD-ROM]. John Wiley & Sons, Inc., New York 1998
30. U.S. Department of Health and Human Services (NIOSH): *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*. In: *Chem-Bank* [CD-ROM]. SilverPlatter International N.V., May 2000
31. U.S. Environmental Protection Agency: *Integrated Risk Information System*. In: *Chem-Bank* [CD-ROM]. SilverPlatter International N.V., May 2000
32. IARC: *Printing Processes and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **65**, 449. IARC, Lyon 1996. 578 p.
33. IARC: *Printing Processes and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **65**, 309. IARC, Lyon 1996. 578 p.

34. Nařízení vlády č. 258/2001 Sb., kterým se mění nařízení vlády č. 25/1999 Sb., kterým se stanoví postup hodnocení nebezpečnosti chemických látek a chemických přípravků, způsob jejich klasifikace a označování a vydává Seznam dosud klasifikovaných nebezpečných chemických látek. *Sbírka zákonů 2001*, částka 99, str. 5693 (2001)
35. IARC: *Some Flame Retardants and Textile Chemicals, and Exposures in the Textile Manufacturing Industry. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **48**, 169. IARC, Lyon 1990. 345 p.
36. WHO: *Diaminotoluenes. Environmental Health Criteria* **74**. WHO, Geneva 1987. 67 p.
37. IARC: *Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Supplement No. 7*, 61. IARC, Lyon 1987. 440 p.
38. Peterson, M. M., Horst, G. L., Shea, P. J., Comfort, S. D., Peterson, R. K. D.: TNT and 4-Amino-2,6-dinitrotoluene Influence on Germination and Early Seedling Development of Tall Fescue. *Environ. Pollu.* **93** (1), 57-62 (1996)
39. Krishnan, G., Horst, G. L., Darnell, S., Powers, W. L.: Growth and Development of Smooth Bromegrass and Tall Fescue in TNT-Contaminated Soil. *Environ. Pollut.* **107**, 109-116 (2000)
40. Thompson, P. L., Ramer, L. A., Schnoor, J. L.: Uptake and Transformation of TNT by Hybrid Poplar Trees. *Environ. Sci. Technol.* **32** (7), 975-980 (1998)
41. Gong, P., Wilke, B.-M., Fleischmann, S.: Soil-Based Phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to Terrestrial Higher Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 152-157 (1999)
42. Adema, D. M. M., Henzen, L.: A Comparison of Plant Toxicities of Some Industrial Chemicals in Soil Culture and Soilless Culture. *Ecotoxicol. Env. Safety* **18**, 219-229 (1989)
43. Melcher, D., Matthies, M.: Application of Fuzzy Clustering to Data Dealing with Phytotoxicity. *Ecol. Model.* **85**, 41-49 (1996)
44. Fletcher, J.: Keynote Speech: A Brief Overview of Plant Toxicity Testing. In: *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume* (Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., Lewis, M. A., Eds.). *ASTM STP 1115*, 5-11. American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1991
45. Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. *Sbírka zákonů 2001*, částka 143, str. 7953 (2001)
46. Ministerstvo životního prostředí: Metodický návod ke stanovení ekotoxicity odpadů. *Zpravodaj MŽP ČR 1998* (12), 23-27 (1998)
47. Smith, B. M.: An Inter- and Intra-Agency Survey of the Use of Plant for Toxicity Assessment. In: *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume* (Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., Lewis, M. A., Eds.). *ASTM STP 1115*, 41-59. American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1991

48. Harrass, M. C., Erikson, C. E. III., Nowell, L. H.: Role of Plant Bioassays in FDA Review: Scenarios for Terrestrial Exposures. In: *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume* (Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., Lewis, M. A., Eds). *ASTM STP 1115*, 12-28. American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1991
49. OECD: *OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 208, Terrestrial Plants, Growth Test*. OECD Publications, Paris 1984. 6 p.
50. ISO Standard 11269-2: *Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora –Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants*. ISO, 1995
51. Windeatt, A. J., Tapp, J. F., Stanley, R. D.: The Use of Soil-Based Plant Test Based on the OECD Guidelines. In: *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume* (Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., Lewis, M. A., Eds.). *ASTM STP 1115*, 29-40. American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1991
52. Cole, J. F. H., Canning, L., Brown, R. A.: Rationale for Choice of Species in the Regulatory Testing of the Effects of Pesticides on Terrestrial Non-Target Plants. In: *Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, 1993, p. 151-156
53. Hulzebos, E. M., Adema, D. M. M., Dirven-Van Breemen, E. M., Henzen, L., Van Dis, W. A., Herbold, H. A., Hoekstra, J. A., Baerselman, R., Van Gestel, C. A. M: Phytotoxicity Study with *Lactuca sativa* in Soil and Nutrient Solution. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1079-1094 (1993)
54. Rieger, P.-G., Knackmuss, H.-J.: Basic Knowledge and Perspectives on Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene and Related Nitroaromatic Compounds in Contaminated Soil. In: *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds* (Spain, C. J., Ed.),. pp. 1-18. Plenum Press, New York 1995. 232 p.
55. Cremlyn, R.: *Pesticidy*. s. 157. SNTL, Praha 1985. 244 s.
56. Nařízení vlády č. 25/1999 Sb., kterým se stanoví postup hodnocení nebezpečnosti chemických látek a chemických přípravků, způsobu jejich klasifikace a označování a vydává Seznam dosud klasifikovaných nebezpečných chemických látek. *Sbírka zákonů 1999*, částka 11, str. 465
57. Emery, D. D., Faessler, P. C.: First Production-Level Bioremediation of Explosives-Contaminated Soil in the United States. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **829**, 326-340 (1997).
58. Kučerová, P., Macková, M., Macek, T.: Perspektivy fytořemediace při odstraňování polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chem. Listy* **93**, 19-26 (1999)

7 ABSTRACT

Up to now published information on the presence of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene and products of their biotransformation in contaminated soils was assessed. Mammalian, aquatic and terrestrial plant toxicity information on 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene and amines formed by their reduction was summarized. The principal methods of phytotoxicity testing are described.

The phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene and seven products of their reduction was tested on four terrestrial plant species, a monocotyledon, wheat (*Triticum aestivum* L.), and three dicotyledons, mustard (*Sinapis alba* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and lentil (*Lens culinaris* Med.). The effects of the test substances on the seedling root elongation in water solutions and on the emergence of seedlings and the early stage of plant growth in soil/sand mixture were assessed. The highest no observed adverse effect concentrations, the lowest observed adverse effect concentrations and the median effective concentrations of the substances tested were determined.

Both the tested toluene nitroderivatives and the monoamines formed by reduction of their one nitro group were found to be moderately phytotoxic substances. The diamines formed by reduction of both nitro groups of dinitrotoluenes were found to be low toxic to all test plant species used.

The amines formed by reduction of one nitro group of 2,4,6-trinitrotoluene or both dinitrotoluenes were sometimes either less or more phytotoxic in comparison with the parent toluene nitroderivatives. Provided that 2,4,6-trinitrotoluene or both dinitrotoluenes are the predominant soil pollutants, the contribution of their reduction products to the phytotoxicity of contaminated soils may be considered unimportant.

Lettuce was the most sensitive species to the compounds tested, whereas wheat and lentil were found to be the most tolerant.

The results of the tests carried out are discussed and compared with already published data. Possibilities of applications of the obtained information to ecological risk assessment, pollution monitoring and phytoremediation of contaminated soils are discussed.

PŘÍLOHA A – Curriculum vitae

Osobní údaje

Narozen 3. 10. 1949 v Počátkách, národnost česká, státní příslušnost ČR, ženatý.

Vzdělání:

Přírodovědecká fakulta UJEP v Brně, obor chemie-matematika (1968–1973).

Přírodovědecká fakulta UJEP v Brně, rigorosní zkouška v oboru organická chemie (1976).

Vysoká škola chemicko technologická v Pardubicích, postgraduální studium Průmyslová toxikologie (1989-1992).

Zaměstnání, odborná a pedagogická praxe, publikace:

Přírodovědecká fakulta UJEP v Brně, katedra organické chemie, odborný asistent – výzkumný pracovník (1974–1976). Syntézy a studium mechanismu vzniku některých dusíkatých heterocyklických látek. Výsledky publikovány na konferenci, v jednom patentu, v časopisech Chemické zvesti (Chemical Papers) a Reaction Kinetics and Catalysis Letters.

Externí výuka předmětu Toxikologie na PřF MU v Brně (od roku 1991 dosud).

Lékařská fakulta UJEP v Brně, katedra lékařské chemie a biochemie, odborný asistent (1976–1978). Výuka praktických cvičení z chemie a biochemie; spoluautor 2 skript pro praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie. Izolace a identifikace alkaloidů z některých rostlin z čeledi Papaveraceae; výsledky publikovány v časopisu Collection of Czechoslovak Chemical Communications.

Výzkumný ústav čistých chemikálií Lachema n.p., Brno, oddělení vývoje technologií výrob organických látek, samostatný výzkumný pracovník (1978–1984). Syntézy a technologie výroby laboratorních chemikálií a neantibiotických stimulatorů užitkovosti hospodářských zvířat. Výsledky zpracovány v 11 výzkumných zprávách, 5 patentech (3 realizovány), část publikována na 2 konferencích a v časopisu Biologizace a chemizace živočišné výroby - Veterinaria.

Krajská hygienická stanice, Brno, oddělení hygieny práce (1984-1995). Problematika toxikologie, prašnosti a mikroklimatických podmínek v pracovním prostředí.

Fakulta chemická VUT v Brně, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, odborný asistent (1995–2001). Výuka předmětů obecná toxikologie (přednáška), speciální toxikologie (přednáška), analýza rizik a chemická bezpečnost (přednáška, seminář), organická chemie I a II (cvičení), praktikum z organické chemie, vedení 6 diplomových prací. Spoluautor skript Základy obecné a speciální toxikologie a Návody pro praktikum z organické chemie. Studium fytotoxicity; výsledky zahrnuté do zprávy o řešení výzkumného projektu ústavu, publikovány na dvou symposiích a v časopisu Chemické listy, další práce odeslána k publikaci.

Krajská hygienická stanice Jihomoravského kraje se sídlem v Brně, oddělení hygienických expertiz (2001 – dosud). Toxikologie, prašnost a mikroklima v pracovním prostředí, nakládání s odpady, hodnocení rizik.

PŘÍLOHA B – Seznam publikací výsledků

1. Picka, K.: *Fytotoxicita aromatických nitrosloučenin a produktů jejich biotransformace*. Pojednání ke státní doktorské zkoušce. FCH VUT, Brno 2000. 49 s.
2. Picka, K.: The Influence of Some Toluene Nitroderivatives and Products of Their Reduction on Root Elongation of Higher Plants. In: Romančík, V. (Ed.): *Industrial Toxicology 2001, Proceedings*, Bratislava 2001; ISBN 80-968011-5-5
3. Picka, K.: Studie fytotoxicity některých nitroderivátů toluenu a produktů jejich redukce. Poster na symposiu Chemistry & Life, Brno 2002
4. Picka, K.: Phytotoxicological Study of Some Toluene Nitroderivatives and Products of Their Reduction. *Chem. Listy, Symposia* **96**, S306-S308 (2002)
5. Picka, K., Friedl, Z.: Phytotoxicity of Some Toluene Nitroderivatives and Products of Their Reduction. Zasláno do tisku (září 2003)