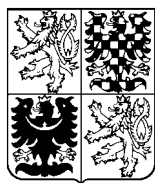


Ročník 2005



SBÍRKA ZÁKONŮ

ČESKÁ REPUBLIKA

Částka 134

Rozeslána dne 1. října 2005

Cena Kč 49,50

O B S A H:

389. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí

389**VYHLÁŠKA**

ze dne 15. září 2005,

kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí

Ministerstvo životního prostředí stanoví podle § 8 odst. 5 písm. c) zákona č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů:

Čl. I

Vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí, se mění takto:

1. V § 2 odst. 1 se slova „části I. přílohy č. 2“ nahrazují slovy „příloze č. 2“.

2. V § 2 se na konci odstavce 1 tečka nahrazuje čárkou a doplňují se písmena v) až y), která znějí:

- „v) aktivity půdních mikroorganismů při transformaci dusíku,
- w) aktivity půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku,
- x) aerobní a anaerobní transformace v půdě,
- y) aerobní a anaerobní transformace v systémech voda-sediment.“.

3. V § 2 se odstavec 2 zrušuje a zároveň se zrušuje označení odstavce 1.

4. V příloze č. 2 části I se doplňují body XXI až XXIV, které znějí:

„XXI. METODA PRO STANOVENÍ AKTIVITY PŮDNÍCH MIKROORGANISMŮ PŘI TRANSFORMACI DUSÍKU

(metoda C.21 podle přílohy směrnice 2004/73/ES ze dne 29. dubna 2004, kterou se po dvacáté deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek)

XXI.1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá metodě OECD TG 216 (2000).

XXI.1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování dlouhodobých účinků chemických látek po jednorázové expozici na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci dusíku. Je založena na

podkladech a doporučeních národních i mezinárodních organizací (viz literatura 1 až 7). Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek může být nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci dusíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci dusíku, tak zkouška na transformaci uhlíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot nacházených pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé porušení těchto biochemických procesů by mohlo porušit koloběh živin a to by mohlo mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace dusíku v aerobních povrchových půdách. Tato metoda rovněž umožňuje odhadnout účinky látek na transformaci uhlíku půdní mikroflórou. K tvorbě dusičnanů dochází po rozpadu vazeb uhlík-dusík. Pokud je tedy u zkušebních a kontrolních půd zjištěna stejná rychlost tvorby dusičnanů, je vysoce pravděpodobné, že hlavní schéma odbourávání uhlíku je neporušené a funkční. Substrát zvolený pro zkoušku (prášková vojtěšková moučka) má příznivý poměr uhlíku a dusíku (obvykle od 12/1 do 16/1). Je tedy snížen nedostatek uhlíku v průběhu zkoušky, a dojde-li k poškození populace mikroorganismů chemickou látkou, může k jejich obnově dojít opět do 100 dnů.

Zkouška, na níž je založena tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Použití zkoušky však není omezeno pouze na agrochemikálie. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení dat lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se tedy stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci dusíku. Data z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky

závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x , kde x je procentuální účinek.

XXI.1.2 DEFINICE

Transformace dusíku: je konečný rozklad dusíkaté organické látky mikroorganismy cestou amonifikace a nitrifikace na příslušný konečný anorganický produkt – dusičnan.

EC_x (Účinná koncentrace): je koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x -procentní inhibici transformace dusíku na dusičnan.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): je koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50% inhibici transformace dusíku na dusičnan.

XXI.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

XXI.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Do proseté půdy se vpraví prášková rostlinná moučka a na půdu se poté aplikuje zkoušená látka, nebo se půda ponechá nedotčená (jako kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentraci na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy vyluhují vhodným rozpouštědlem a stanoví se obsah dusičnanů. Rychlost tvorby dusičnanů v exponovaných vzorcích se porovnává s rychlostí v kontrolních vzorcích a vypočte se procentuální odchylka hodnot experimentálních vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou 25 % nebo větší, v měření se pokračuje až do 100 dnů. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a množství vzniklých dusičnanů v experimentálních a kontrolních vzorcích se měří po 28denní inkubaci. Výsledky zkoušek s více koncentracemi se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

XXI.1.5 VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi koncentracemi dusičnanů v kontrolní a exponovaných vzorcích, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

XXI.1.6 POPIS METODY

XXI.1.6.1 Zkušební zařízení

Nádoby použité ve zkoušce musí být z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, která by měl odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou

polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí uzavřené plynotěsné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Použije se standardní laboratorní vybavení, které zahrnuje

- třepačku: mechanickou třepačku nebo rovnocenné vybavení;
- odstředivku (3 000 g) nebo filtrační zařízení (za použití filtračního papíru bez dusičnanů);
- měřicí zařízení pro stanovení dusičnanů s vhodnou citlivostí a reprodukovatelností.

XXI.1.6.2 Výběr a počet půd

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

- obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %;
- pH: 5,5 – 7,5;
- obsah organického uhlíku: 0,5 – 1,5 %;
- stanoví se mikrobiální biomasa (viz literatura 8, 9) a její uhlík by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejkonzervativnější případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. V důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo v případě elektrostaticky nabitých chemikálií.

XXI.1.6.3 Odběr a skladování vzorků půd

XXI.1.6.3.1 Odběr

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými kulturními plodinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo zavodnění (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba,

může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm).

Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

XXI.1.6.3.2 *Skladování*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, může být skladována v temnu při $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při -18°C až -22°C . Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

XXI.1.6.4 **Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**

XXI.1.6.4.1 *Předběžná inkubace*

Pokud byla půda skladována (viz oddíl 1.6.3.2), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

XXI.1.6.4.2 *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

XXI.1.6.4.3 *Obohacení organickým substrátem*

Půda by měla být obohacena vhodným organickým substrátem, např. zelenou travní moučkou s vojtěškou (hlavní složka: *Medicago sativa*) s poměrem C/N od 12/1 do 16/1. Doporučená dávka vojtěškové moučky je 5 g vojtěšky na kilogram půdy (vztaženo na sušinu).

XXI.1.6.5 **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1 – 0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikrobiální flóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální distribuci zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba pokud možno zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látko se např. nastříkne do půdy na více místech).

XXI.1.6.6 Zkušební koncentrace

Při zkoušení agrochemikálií se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sytnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (*Predicted Environmental Concentration*, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky. U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. V rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovené hodnoty EC_x.

XXI.1.7 PROVEDENÍ ZKOUŠKY

XXI.1.7.1 Podmínky expozice

XXI.1.7.1.1 *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při míšení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

XXI.1.7.1.2 *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků

důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

XXI.1.7.1.3 *Podmínky zkoušky a její trvání*

Zkouška se provádí v temnu při pokojové teplotě (20 ± 2) °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovnávají rychlosti tvorby dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích a vypočítají se hodnoty EC_x .

XXI.1.7.2 **Odběry vzorků a analýzy půd**

XXI.1.7.2.1 *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se obsah dusičnanů ve vzorcích analyzuje v 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14-denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah dusičnanů se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jeho konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nezbytné, lze provést další mezilehlé měření, např. v 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení EC_x chemické látky. Podle potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít ve zprávě jako výchozí koncentraci dusičnanů v půdě.

XXI.1.7.2.2 *Analýza vzorků půd*

Pro každý čas odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví obsah dusičnanů. Dusičnany se extrahují ze vzorků třepáním s vhodným extrakčním roztokem, např. s 0,1M roztokem chloridu draselného. Doporučuje se použít 5 ml roztoku KCl na gram sušiny půdy. Při optimální extrakci by měly být nádoby s půdou a extrakčním roztokem naplněny nejvýše z jedné poloviny. Směsi se extrahují třepáním při 150 ot./min. po dobu 60 minut. Směsi se odstředí nebo zfiltrují a kapalná fáze se analyzuje na dusičnany. Kapalný extrakt zbavený pevných částic lze před analýzou skladovat při (-20 ± 5) °C po dobu šesti měsíců.

XXI.2. DATA**XXI.2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství vytvořených dusičnanů v každém duplikátním vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Rychlost přeměny dusíku se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem na 5 % hladině významnosti). Množství vzniklých dusičnanů se vyjádří v mg dusičnanů na kg sušiny půdy za den. Rychlost tvorby dusičnanů se pro každou expozici porovná s rychlostí získanou pro kontrolní vzorky a vypočte se odchylka od kontrolních vzorků v procentech.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství dusičnanů v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Množství dusičnanů (tj. množství dusičnanů v mg na kg sušiny půdy) zjištěná v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. Z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se vynesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x . Standardními metodami (viz literatura 10 až 12) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti ($p = 0,95$) pro vypočtené hodnoty EC_x .

Zkoušené látky s vysokým obsahem dusičnanů mohou přispívat k množství dusičnanu vytvořeného při zkoušce. Pokud se zkouší vysoké koncentrace těchto látek (např. chemikálie, u nichž se očekává opakované použití), musí být součástí zkoušky vhodné kontrolní vzorky (tj. půda a zkoušená látka bez rostlinné moučky). Data z těchto kontrol musí být zohledněna při výpočtech EC_x .

XXI.2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při jakémkoli odběru po 28 dnech rozdíl rychlosti tvorby dusičnanů při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti tvorby v kontrolách roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci dusíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10} .

XXI.3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

- zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka);
- informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.);
- způsob využití (např. zemědělská půda, les atd.);
- hloubka odběru vzorků (cm);
- obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny);

- pH (ve vodě);
- obsah organického uhlíku (v % sušiny);
- obsah dusíku (v % sušiny);
- výchozí koncentrace dusičnanů (mg dusičnanů na kg sušiny);
- kapacita iontové výměny (mmol/kg);
- mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku;
- odkaz na metody použité pro stanovení každého z parametrů;
- všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd;
- podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha a případně fyzikálně-chemické vlastnosti;
- případně údaje o chemické identitě, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Substrát:

- zdroj substrátu;
- složení (tj. vojtěšková moučka, zelená travní moučka s vojtěškou);
- obsah uhlíku, dusíku (v % sušiny);
- velikost síta (mm).

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem;
- počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací;
- podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky na půdu;
- inkubační teplota;
- vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu;
- použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy);
- počet duplikátních vzorků;
- doby odběru vzorků;
- metoda použitá pro extrakci dusičnanů z půdy.

Výsledky:

- postup analýzy a zařízení použité pro stanovení dusičnanů;

- jednotlivé naměřené hodnoty obsahu dusičnanů a jejich průměrné hodnoty v tabulkové formě;
- rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd;
- podle potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech;
- procentuální odchylka v rychlosti tvorby dusičnanů pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95% intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivosti a graf křivky závislosti odpovědi na dávce;
- statistické zpracování výsledků;
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

XXI.4. LITERATURA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1 – 16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1 – 1 (2. vyd., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. září, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, (vyd. M. R. Lynch), Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) ISO 14238 (1997). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4.
- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18.-20. ledna 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J. T., Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. Exper. Ther.*, 96, 99 – 113.

- (11) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis, 3. vyd., Cambridge, London, New York.
- (12) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

XXII. METODA PRO STANOVENÍ AKTIVITY PŮDNÍCH MIKROORGANISMŮ PŘI TRANSFORMACI UHLÍKU

(metoda C.22 podle přílohy směrnice 2004/73/ES ze dne 29. dubna 2004, kterou se po dvacáté deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek)

XXII.1. METODA

Tato metoda odpovídá metodě OECD TG 217 (2000).

XXII.1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování možných dlouhodobých účinků jednorázové expozice přípravkům na ochranu rostlin a popřípadě jiným chemickým látkám na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Je založena na pokladech a doporučeních národních i mezinárodních organizací (viz literatura 1 až 6). Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek může být nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci uhlíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci uhlíku, tak zkouška na transformaci dusíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot nacházených pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé porušení těchto biochemických procesů by mohlo porušit koloběh živin a to by mohlo mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace uhlíku v aerobních povrchových půdách. Zkouška je citlivá na změny ve velikosti a aktivitě mikrobiální populace, která je odpovědná za transformaci uhlíku, neboť tyto populace budou vystaveny jak chemickému stresu, tak nedostatku uhlíku. Použijí se písčité půdy s nízkým obsahem organického materiálu. Tyto půdy se exponují zkoušené látce a inkubují se za podmínek, které umožňují rychlý mikrobiální metabolismus. Za těchto podmínek se zdroje snadno

dostupného uhlíku rychle vyčerpají. To způsobí nedostatek uhlíku, který vede nejen k odumření mikrobiálních buněk, ale také indukuje klidové stadium a/nebo tvorbu sporů. Pokud se zkouška provádí déle než 28 dnů, lze souhrn těchto reakcí měřit v kontrolních vzorcích (neexponovaná půda) jako postupnou ztrátu metabolicky aktivní mikrobiální biomasy (viz literatura 7). Pokud je biomasa v půdě s nedostatkem uhlíku za podmínek zkoušky ovlivněna přítomností chemické látky, pravděpodobně se nevrátí do téhož stavu jako kontrolní vzorek. Porušení stavu způsobené zkoušenou látkou kdykoliv během zkoušky tedy často přetrvává až do konce zkoušky.

Zkouška, na níž je založena tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Zkouška však není omezena na chemické látky, jejichž koncentraci v životním prostředí lze předpovědět. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení dat lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se proto stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci uhlíku. Data z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x , kde x je procentuální účinek.

XXII.1.2 DEFINICE

Transformace uhlíku: je rozklad organického materiálu působením mikroorganismů, jehož výsledkem je anorganický konečný produkt oxid uhličitý.

EC_x (Účinná koncentrace): je koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x -procentní inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): je koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50% inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

XXII.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

XXII.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Prosetá půda se buď exponuje zkušební látce, nebo se ponechá neexponovaná (kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentraci na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy smísí s glukosou a po následujících 12 h se měří respirační rychlost vyvolaná glukosou. Respirační rychlost se vyjádří jako uvolněný oxid uhličitý (v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu) nebo jako spotřebovaný kyslík (v mg kyslíku na kg půdy za hodinu). Průměrná respirační rychlost u exponovaných vzorků půd se porovná s rychlostí u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních

vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou rovné 25 % nebo větší, v měření se pokračuje ve 14-denních intervalech nejdéle do 100 dnů. Při zkoušení jiných chemických látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a respirační rychlost vyvolaná glukosou (tj. průměrné množství uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku) se změří po 28 dnech. Výsledky zkoušek s řadou koncentrací se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

XXII.1.5 VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi uvolněným oxidem uhličitým nebo spotřebovaným kyslíkem u kontrolních a exponovaných vzorků, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

XXII.1.6 POPIS METODY

XXII.1.6.1 Zkušební zařízení

Nádoby použité ve zkoušce musí být z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, který by měl odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace souhrnného vzorku půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí uzavřené plynotěsné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Pro stanovení respirace vyvolané glukosou jsou nezbytné inkubační systémy a přístroje pro měření uvolňovaného oxidu uhličitého nebo spotřeby kyslíku. Příklady takových systémů lze nalézt v literatuře 8 až 11.

XXII.1.6.2 Výběr a počet půd

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

- obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %;
- pH: 5,5 – 7,5;
- obsah organického uhlíku: 0,5 – 1,5 %;
- stanoví se mikrobiální biomasa (viz literatura 12 a 13) a její obsah uhlíku by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejkonzervativnější případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. V důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností může být nezbytné nasazení další půdy, např. při

zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo v případě elektrostaticky nabitých chemikálií.

XXII.1.6.3 Odběr a skladování vzorků půd

XXII.1.6.3.1 Odběr

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými kulturními plodinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo zavodnění (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru mírně překračovat 20 cm (např. až 25 cm). Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

XXII.1.6.3.2 Skladování

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, může být skladována v temnu při $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu maximálně tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při -18°C . Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

XXII.1.6.4 Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku

XXII.1.6.4.1 Předběžná inkubace

Pokud byla půda skladována (viz oddíl 1.6.3.2 a 1.7.1.3), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

XXII.1.6.4.2 Fyzikálně-chemické charakteristiky

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo

deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

XXII.1.6.5 Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1 – 0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální distribuci zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaheno na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

XXII.1.6.6 Zkušební koncentrace

Při zkoušení přípravků na ochranu rostlin nebo jiných chemických látek, u nichž lze předpovědět koncentraci v životním prostředí, se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které v reálných podmínkách pronikne do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi předpokládané koncentrace v životním prostředí (*Predicted Environmental Concentration*, PEC) a jejich pětinasobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky.

U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. V rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovované hodnoty EC_x.

XXII.1.7 PROVEDENÍ ZKOUŠKY

XXII.1.7.1 Podmínky expozice

XXII.1.7.1.1 *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím

zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při míšení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

XXII.1.7.1.2 *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

XXII.1.7.1.3 *Podmínky zkoušky a její trvání*

Zkouška se provádí v temnu při pokojové teplotě $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovnávají množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u exponovaných a kontrolních vzorků. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných chemických látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u exponovaných a kontrolních vzorků a vypočítají se hodnoty EC_x .

XXII.1.7.2 **Odběry vzorků a analýzy půd**

XXII.1.7.2.1 *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se rychlost respirace vyvolané glukosou ve vzorcích analyzuje 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah respirace vyvolané glukosou se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jeho konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nezbytné, lze provést další mezilehlé měření, např. 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení EC_x chemické látky. V případě potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít k odhadu výchozího množství metabolicky aktivní mikrobiální biomasy v půdě.

XXII.1.7.2.2 *Měření rychlostí respirace vyvolané glukosou*

Pro každý čas odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví rychlost respirace vyvolané glukosou. Vzorky půd se smísí s dostatečným množstvím glukosy, aby se ihned vyvolala maximální respirační odezva. Množství glukosy potřebné pro vyvolání maximální respirační odezvy u dané půdy lze stanovit v orientační zkoušce se sérií koncentrací glukosy (viz literatura 14). U písčitých půd s obsahem organického uhlíku od 0,5 do 1,5 % obvykle stačí 2 000 mg až 4 000 mg glukosy na kg sušiny. Glukosu lze rozmělnit na prášek s čistým křemenným pískem (10 g písku na kg sušiny) a homogenně smísit s půdou.

Vzorky půdy obohacené glukosou se inkubují ve vhodné aparatuře, která umožňuje měřit respirační rychlosti při $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ buď kontinuálně, nebo každou hodinu, nebo každé dvě hodiny (viz oddíl 1.6.1). Měření uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku se provádí nepřetržitě po dobu 12 h a měření se zahájí co nejdříve, tj. do 1 až 2 h po přidání glukosy. Změří se celkové množství uvolněného oxidu uhličitého nebo celkové množství spotřebovaného kyslíku za 12 h a stanoví se průměrná respirační rychlost.

XXII.2. **DATA**

XXII.2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u každého duplikátního vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Výsledky se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5% hladině významnosti). Rychlosti respirace vyvolané glukosou se vyjádří v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo v mg kyslíku na kg sušiny za hodinu. Průměrná rychlost uvolňování oxidu uhličitého nebo průměrná rychlost spotřeby kyslíku u každé expozice se porovná s odpovídajícími hodnotami u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Rychlosti respirace vyvolané glukosou (tj. mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo mg kyslíku na kg sušiny za hodinu) zjištěné v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. Z těchto údajů se

pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se vynesou proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x . Standardními metodami (viz literatura 15 až 17) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti ($p = 0,95$) pro vypočtené hodnoty EC_x .

XXII.2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při kterémkoli odběru po 28 dnech rozdíl respiračních rychlostí při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti u kontroly roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci uhlíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10} .

XXII.3. ZPRÁVY

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

- zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka);
- informace o historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.);
- způsob využití (např. zemědělská půda, les atd.);
- hloubka odběru vzorků (cm);
- obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny);
- pH (ve vodě);
- obsah organického uhlíku (v % sušiny hmotnosti);
- obsah dusíku (v % sušiny);
- kapacita iontové výměny (mmol/kg);
- výchozí mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku;
- odkaz na metody použité pro stanovení každého z parametrů;
- všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd;
- podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha a případně její fyzikálně-chemické vlastnosti;
- případně údaje o chemické identitě, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem;
- počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací;
- podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky na půdu;
- inkubační teplota;
- vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu;
- použitá metoda inkubace (tj. buď inkubace souhrnného vzorku půdy, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy);
- počet duplikátních vzorků;
- doby odběru vzorků.

Výsledky:

- metoda a zařízení použité pro měření respiračních rychlostí;
- data včetně jednotlivých hodnot a průměrných hodnot množství oxidu uhličitého nebo kyslíku zpracovaná v tabulkové formě;
- rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd;
- v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech;
- procentuální odchylka v rychlostech respirace vyvolané glukosou pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95% intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivosti a graf křivky závislosti odpovědi na dávce;
- případné statistické vyhodnocení výsledků;
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

XXII.4 LITERATURA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1 – 16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1 – 1 (2. vyd., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, vyd. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18.-20. ledna, 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments. In: Pesticide Effects on Soil Microflora. Vyd. L. Somerville, M. P. Greaves, Chap. 3: 45 – 60.
- (8) Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration. In: Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monograph N° 9. Vyd. A. L. Page, R. H. Miller a D. R. Keeney. 41: 831 – 871.
- (9) ISO 11266-1 (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E. A., Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77 – 81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, Braunschweig, 38: 113 – 120.
- (15) Litchfield, J. T., Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. Exper. Ther.*, 96, 99 – 113.
- (16) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3. vyd., Cambridge, London, New York.
- (17) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

XXIII. METODA PRO STANOVENÍ AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE CHEMICKÉ LÁTKY V PŮDĚ

(metoda C.23 podle přílohy směrnice 2004/73/ES ze dne 29. dubna 2004, kterou se po dvacáté deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek)

XXIII.1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá metodě OECD TG 307 (2002).

XXIII.1.1 ÚVOD

Postup popsáný v této zkušební metodě je vyvinut pro účely hodnocení aerobní a anaerobní transformace chemické látky v půdě. Je založen na doporučeních a směrnících národních a mezinárodních organizací (viz literatura 1 až 9). Účelem experimentů je stanovit i) rychlost transformace zkoušené látky a ii) povahu a rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů, kterým mohou být rostliny a půdní organismy vystaveny. Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které se aplikují přímo do půdy nebo pravděpodobně mohou proniknout do půdního ekosystému. Výsledky těchto laboratorních studií mohou být také použity pro vypracování postupů odběru vzorků a analýzy u podobných polních studií.

Pro vyhodnocení způsobu transformace obvykle postačují aerobní a anaerobní studie s jedním druhem půdy (viz literatura 8, 10 a 11). Rychlosti transformace se stanoví alespoň pro tři další půdy (viz literatura 8 a 10).

Druhy zkušebních půd by měly být reprezentativní pro environmentální podmínky, v nichž dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Například chemické látky, k jejichž uvolnění může dojít v subtropickém až tropickém klimatu, by měly být zkoušeny s ferrasoly nebo nitosoly (systém FAO). Tato metoda se rovněž týká půd rýžových polí.

XXIII.1.2 DEFINICE

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO₂ a látek, které jsou přítomny ve vázaných reziduích.

Vázaná rezidua: sloučeniny v půdě, rostlině nebo v živočichu, které po extrakci zůstávají v matici ve formě výchozí látky nebo (jejího metabolitu (jejích metabolitů) nebo transformačních produktů. Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vyjasnit extrakcí spojenou se změnami v matici a náročnými analytickými technikami. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (viz literatura 12) [upraveno podle IUPAC 1984 (viz literatura 13)].

Aerobní transformace: reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (viz literatura 14).

Anaerobní transformace: reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (viz literatura 14).

Půda: směs minerálních a organických chemických složek oživená malými organismy (většinou mikroorganismy), přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Lze pracovat s dvěma formami půdy:

- a) s neporušenou půdou, jak v průběhu času vznikla, s charakteristickými vrstvami různých druhů půdy;
- b) s porušenou půdou, která se obvykle vyskytuje na obdělávaných polích v případě, že se vzorky odebírají vyrýváním a používají se v této zkušební metodě (viz literatura 14).

Mineralizace: úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 , H_2O za aerobních podmínek a na CH_4 , CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V souvislosti s touto metodou, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se radioisotopy uhlíku oxidují za tvorby odpovídajícího množství $^{14}\text{CO}_2$ (viz literatura 14).

Poločas: $t_{0,5}$, je čas, za který dojde k 50% transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT₅₀ (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %; liší se od poločasu $t_{0,5}$, pokud transformace neprobíhá podle kinetiky prvního řádu.

DT₇₅ (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT₉₀ (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %.

XXIII.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky se použijí pro charakterizaci a/nebo identifikaci transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

XXIII.1.4 POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro něž je k dispozici analytická metoda s dostatečnou správností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné i nerozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z půdy silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy v půdě udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

XXIII.1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak značené látky. Značený materiál je nezbytný pro studium

způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C , avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část (nejstabilnější části) molekuly. Pokud například zkoušená látka obsahuje jeden aromatický kruh, je třeba, aby byl tento kruh označen. Pokud zkoušená látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie s cílem podchytit zbytky každého z kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.). Čistota látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky na aerobní a anaerobní transformaci v půdě by měly být k dispozici alespoň tyto informace o látce:

- a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6)
- b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;
- c) tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta;
- d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);
- e) chemická stabilita v temnu (hydrolyza) (metoda C.7);
- f) $\text{p}K_{\text{a}}$, pokud u molekuly nastává protonace nebo deprotonace [směrnice OECD 112] (viz literatura 16).

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy [zkušební metody C.21 a C.22] (viz literatura 16).

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů.

XXIII.1.6 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Vzorky půdy se exponují zkušební látce a inkubují se v temnu v biometrických baňkách nebo v průtokových systémech za řízených laboratorních podmínek (při konstantní teplotě a vlhkosti půdy). Ve vhodných intervalech se vzorky půd extrahují a analyzuje se obsah výchozí látky a transformačních produktů. Vhodným absorpčním zařízením se k analýze shromáždí také těkavé produkty. Prostřednictvím materiálu značeného isotopem ^{14}C lze po zachycení uvolněného $^{14}\text{CO}_2$ měřit různé rychlosti mineralizace zkoušené látky a dále lze stanovit látkovou bilanci včetně tvorby vázaných reziduí v půdě.

XXIII.1.7 KRITÉRIA JAKOSTI

XXIII.1.7.1 Výtěžnost

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků půdy ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí. Výtěžnosti by se měly nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (viz literatura 8) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek (viz literatura 3).

XXIII.1.7.2 Opakovatelnost a citlivost analytické metody

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů půdy, která byla dostatečně dlouho inkubována, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg půdy (pro zkoušenou látku) nebo 1 % aplikované dávky, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantitativní stanovitelnosti (LOQ).

XXIII.1.7.3 Správnost dat o transformaci

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o spolehlivosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} , popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} .

XXIII.1.8 POPIS METODY

XXIII.1.8.1 Vybavení a chemická činidla

Inkubačními systémy jsou statické uzavřené systémy nebo vhodné průtokové systémy (viz literatura 7 a 17). Příklady vhodných průtokových inkubačních aparatur a biometrických baněk jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Oba typy inkubačních systémů mají své výhody a svá omezení (viz literatura 7 a 17).

Pro zkoušku je nezbytné standardní laboratorní vybavení, zejména:

- analytické přístroje, jako jsou GLC, HPLC, TLC, včetně vhodných detekčních systémů pro analýzu značených nebo neznačených látek nebo pro inverzní isotopovou zředovací metodu;
- přístroje pro identifikaci látek (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.);
- kapalinový scintilační spektrometr;
- okysličovací zařízení pro spalování radioaktivního materiálu;
- odstředivka;
- extrakční aparatura (např. centrifugační zkumavky pro studenou extrakci a Soxhletův přístroj pro kontinuální extrakci s refluxem);
- zařízení pro zkoncentrování roztoků a extraktů (např. rotační odparka);
- vodní lázeň;
- mechanické míchací zařízení (např. hnětací zařízení, rotační mixér).

Použijí se např. tato chemická činidla:

- NaOH p.a, 2 M, nebo jiná vhodná zásada (např. KOH, ethanolamin);

- H_2SO_4 p.a., 0,05 M;
- ethylenglykol p.a.;
- tuhý absorpční materiál, např. natronové vápno, a polyurethanové zátky;
- organická rozpouštědla čistoty p.a., např. aceton, methanol atd.;
- kapalný scintilátor.

XXIII.1.8.2 Aplikace zkoušené látky

Za účelem aplikace zkoušené látky do půdy a jejího rozptýlení lze zkoušenou látku rozpustit ve vodě (v deionizované nebo destilované vodě) nebo lze v případě potřeby použít co nejmenší množství acetonu nebo jiných organických rozpouštědel (viz literatura 6), ve kterých je zkoušená látka dostatečně rozpustná a stabilní. Zvolené množství rozpouštědla však nesmí mít významný vliv na mikrobiální aktivitu půdy (viz oddíly 1.5 a 1.9.2 až 1.9.3). Rozpouštědla, která působí jako inhibitory mikrobiální aktivity, např. chloroform, dichloromethan a jiná halogenovaná rozpouštědla, nesmějí být použita.

Látku lze do půdy přidat také např. ve směsi s křemenným pískem (viz literatura 6) nebo ve formě malých dílčích vzorků zkušební půdy, které byly předem vysušeny na vzduchu a sterilizovány. Pokud se látka přidává pomocí rozpouštědla, mělo by být rozpouštědlo odpařeno ještě před tím, než jsou k původním nesterilním vzorkům půdy přidány obohacené dílčí vzorky.

U běžně používaných chemických látek, jež se dostávají do půdy prostřednictvím zemědělské aplikace kalů z čistíren odpadních vod, se zkoušená látka nejprve přidá do kalu, který se poté vpraví do vzorku půdy (viz oddíly 1.9.2 a 1.9.3).

Nedoporučuje se používat rutinně přípravky v komerční úpravě. Například u špatně rozpustných látek však může být použití přípravku v komerční úpravě vhodnou alternativou.

XXIII.1.8.3 Půdy

XXIII.1.8.3.1 Výběr půd

Pro stanovení způsobu transformace lze použít reprezentativní půdy; doporučují se písčitohlinitá, prachovitohlinitá, hlinitá nebo hlinitopísčítá půda [podle klasifikace FAO a USDA (viz literatura 18)] o hodnotě pH 5,5 až 8,0 a obsahu organického uhlíku 0,5 – 2,5 %, přičemž mikrobiální biomasa by měla tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku (viz literatura 10).

Pro studie transformačních rychlostí se použijí alespoň tři další půdy reprezentující rozsah relevantních půd. Půdy by se měly lišit, pokud jde o obsah organického uhlíku, pH, obsah jílů a mikrobiální biomasy (viz literatura 10).

U všech půd by měly být charakterizovány alespoň jejich: struktura (% písku, % prachu, % jílu) [podle klasifikace FAO a USDA (viz literatura 18)], pH, kationtová výměnná kapacita, organický uhlík, sytná hustota, schopnost zadržet vodu a mikrobiální biomasa (pouze pro aerobní studie). Schopnost půdy zadržet vodu lze měřit jako polní kapacitu, jako retenční vodní kapacitu nebo jako vodní sací tlak (pF). Vysvětlení je uvedeno v dodatku 1. V protokolu o zkoušce by mělo být uvedeno, zda byly schopnost půdy zadržet vodu a sytná hustota stanoveny u neporušených polních vzorků, nebo porušených (zpracovaných) vzorků. Pro interpretaci výsledků mohou být užitečné další informace o vlastnostech půdy. Pro stanovení charakteristik půdy lze použít metody doporučené v literatuře (viz literatura 19 až 23). Mikrobiální biomasa se stanoví metodou respirace indukované substrátem (SIR) (viz literatura 25 a 26) nebo alternativními metodami (viz literatura 20).

XXIII.1.8.3.2 *Odběr, příprava a skladování půd*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Těmito informacemi jsou přesná poloha, vegetační kryt, údaje o ošetřování chemickými látkami, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo jiná kontaminace. Pokud byla půda v předchozích čtyřech letech ošetřena zkoušenou látkou nebo látkami s analogickou strukturou, neměla by být použita pro transformační studie (viz literatura 10 a 15).

Půda by měla být čerstvě odebraná z terénu (z A horizontu nebo z horní 20cm vrstvy) a měla by být tak vlhká, aby bylo možné snadné prosévání. Kromě půd z rýžových polí by půdy neměly být odebírány v průběhu dlouhých období (více než 30 dnů) sucha, mrazů nebo zavodnění nebo krátce po těchto obdobích (viz literatura 14). Vzorky se přepravují způsobem, který minimalizuje změny obsahu vody v půdě, a uchovávají se v temnu za co největšího přístupu vzduchu. Pro tento účel je obecně vhodný volně uzavřený polyethylenový sáček.

Půda se zpracuje co nejdříve po odběru. Před proséváním na sítu o velikosti 2 mm, při němž se odstraní malé kameny, drobní živočichové a zbytky rostlin, se z půdy odstraní vegetace, větší živočichové a kameny. Před proséváním by nemělo dojít k nadměrnému vysušení a rozdrčení půdy (viz literatura 15).

Pokud je v zimě obtížné odebrat vzorky v terénu (zmrzlá půda, sněhová pokrývka), mohou být odebrány z půdy skladované ve skleníku pod vegetačním pokryvem (např. zatrávněné půdy nebo půdy s travní směsí s jetelem). V každém případě se upřednostňují studie s čerstvě odebranými půdami; pokud má být odebraná a zpracovaná půda před zahájením studie skladována, musí být skladována za odpovídajících podmínek a pouze po omezenou dobu (při $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu maximálně tří měsíců), aby byla zachována mikrobiální aktivita. Z výsledků nedávných výzkumů vyplývá, že půdy z mírného pásma lze skladovat při -20°C déle než tři měsíce (viz literatura 28 a 29), aniž dojde k významné ztrátě mikrobiální aktivity.

Podrobné pokyny pro odběr, zpracování a skladování půd pro biotransformační experimenty lze nalézt v literatuře (viz literatura 8, 10, 15, 26 a 27).

Před tím, než se zpracovaná půda použije ve zkoušce, provede se její předběžná inkubace, aby se umožnilo klíčení a odstranila se semena a aby se po změnách podmínek, ke kterým došlo od odběru nebo skladování po nastolení inkubačních podmínek, znovu ustavila rovnováha mikrobiálního metabolismu. Obecně postačuje předběžné inkubační období v délce od 2 do 28 dnů při podmínkách teploty a vlhkosti blížících se podmínkám zkoušky (viz literatura 15). Skladování a předběžná inkubace by dohromady neměly trvat déle než tři měsíce.

XXIII.1.9 PROVEDENÍ ZKOUŠKY

XXIII.1.9.1 **Zkušební podmínky**

XXIII.1.9.1.1 *Zkušební teplota*

V průběhu celé zkoušky by měly být půdy inkubovány v temnu při stálé teplotě, která je reprezentativní pro klimatické podmínky, ve kterých dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Pro zkoušky všech látek, které se dostávají do půdy v mírném klimatickém pásu, se doporučuje teplota $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Teplota musí být monitorována.

V případě chemických látek aplikovaných nebo uvolňovaných v chladném klimatickém pásu (např. v severských zemích, během podzimu/zimy) se inkubují další vzorky půdy, avšak při nižší teplotě (např. při $(10 \pm 2) ^\circ\text{C}$).

XXIII.1.9.1.2 *Vlhkost*

Pro účely dostatečného provzdušňování a výživy půdní mikroflóry by půda neměla být ani příliš vlhká, ani příliš suchá. Vlhkost půdy doporučená pro optimální růst mikroflóry se nachází v rozmezí od 40 % do 60 % retenční vodní kapacity a v rozmezí od 0,1 do 0,33 bar (viz literatura 6). Naposledy uvedený rozsah odpovídá rozsahu pF od 2,0 do 2,5. Typická vlhkost různých druhů půd je uvedena v dodatku 2. Pro transformační zkoušky při aerobních podmínkách se vlhkost nastaví a udržuje na hodnotě pF od 2,0 do 2,5 (viz literatura 3). Vlhkost půdy se vyjádří jako hmotnost vody na jednotku hmotnosti sušiny půdy, pravidelně se kontroluje (např. každé 2 týdny) vážením inkubačních baněk a ztráta vody se vyrovnává přidáním vody (nejlépe sterilně filtrované vody z vodovodu). Při upravování vlhkosti je třeba zabránit ztrátám zkoušené látky a/nebo transformačních produktů v důsledku tékání nebo případné fotodegradace, nebo je třeba tyto ztráty minimalizovat.

V případě transformačních zkoušek za anaerobních podmínek a za podmínek rýžového pole se půda nasytí vodou tak, že se zaplaví.

XXIII.1.9.1.3 *Podmínky aerobní inkubace*

V průtokových systémech se aerobní podmínky udržují občasným propláchnutím nebo nepřetržitým provětráváním zvlhčeným vzduchem. V biometrických baňkách se výměna vzduchu udržuje difúzí.

XXIII.1.9.1.4 *Sterilní aerobní podmínky*

Za účelem získání informací o možné abiotické transformaci zkoušené látky lze vzorky půdy sterilizovat (metody sterilizace jsou uvedeny v literatuře 16 a 29), exponovat je sterilní zkoušené látce (např. přidáváním roztoku přes sterilní filtr) a provzdušňovat je zvlhčeným sterilním vzduchem, jak je popsáno v oddíle 1.9.1.3. U půd z rýžových polí se půda a voda sterilizuje a inkubace se provede způsobem uvedeným v oddílu 1.9.1.6.

XXIII.1.9.1.5 *Podmínky anaerobní inkubace*

S cílem nastolit a udržovat anaerobní podmínky se půda, která byla exponována zkoušené látce a inkubována za aerobních podmínek 30 dnů nebo jeden poločas nebo po dobu odpovídající DT_{50} (podle toho, co je kratší), zaplaví vodou (vrstva vody 1 – 3 cm) a inkubační systém se propláchne inertním plynem (např. dusíkem nebo argonem). Aerobní podmínky převažují v povrchových půdách a dokonce v podpovrchových půdách. Anaerobní podmínky se mohou vyskytovat jen příležitostně během zaplavení půdy po vydatných srážkách, nebo jsou-li takové podmínky ustaveny na rýžových polích. Zkušební systém musí umožňovat měření pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukčního potenciálu a musí být vybaven zařízením pro zachycování těkavých produktů. Biometrický systém musí být uzavřený, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu difuzí.

XXIII.1.9.1.6 *Inkubace za podmínek rýžového pole*

Pro účely studia transformace v půdách rýžových polí se půda zaplaví vrstvou vody o výšce asi 1 – 5 cm a zkoušená látka se aplikuje do vodné fáze (viz literatura 9). Doporučená tloušťka vrstvy půdy je alespoň 5 cm. Systém se provzdušňuje vzduchem jako za aerobních podmínek. Hodnota pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál vodné vrstvy se monitorují a zaznamenávají. Před zahájením transformačních studií je nezbytné alespoň dvoutýdenní předběžné inkubační období (viz oddíl 1.8.3.2).

XXIII.1.9.1.7 *Délka zkoušky*

Studie rychlosti a způsobu transformace by neměly za normálních podmínek trvat déle než 120 dnů (viz literatura 3, 6 a 8), neboť poté by podle očekávání mělo v umělém laboratorním systému izolovaném od přirozeného doplňování postupně docházet ke snižování mikrobiální aktivity půdy. Aerobní studie mohou být ukončeny daleko dříve než za 120 dnů, pokud je v dané době jasné dosaženo konečného transformačního schématu a konečné mineralizace. Zkoušku lze ukončit po 120 dnech, nebo pokud se transformovalo 90 % zkoušené látky, avšak pouze tehdy, vytvořilo-li se alespoň 5 % CO_2 . Pokud je to nezbytné pro popis rozkladu zkoušené látky a tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů, lze studie prodloužit (např. na 6 nebo 12 měsíců) (viz literatura 8). Delší inkubační období by měla být zdůvodněna ve zprávě o zkoušce a doplněna měřeními biomasy během těchto období a na jejich konci.

XXIII.1.9.2 Provedení zkoušky

Do každé z inkubačních baněk se vpraví asi 50 až 200 g půdy (hmotnost sušiny) (viz obrázky 1 a 2 v dodatku 3) a půda se jednou z metod uvedených v oddílu 1.8.2 exponuje zkoušené látce. Pokud se pro účely aplikace zkoušené látky použijí organická rozpouštědla, odstraní se z půdy odpařením. Půda se poté důkladně promíchá špachtlí nebo se baňka protřepe. Pokud se studie provádí za podmínek rýžového pole, půda a voda se po aplikaci zkoušené látky důkladně promísí. Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Alternativní metody jsou uvedeny níže.

Aplikované množství by mělo odpovídat nejvyššímu aplikovanému množství přípravku na ochranu rostlin doporučenému podle pokynů k použití a rovnoměrnému zapravení do vhodné hloubky na poli (např. do horní 10cm vrstvy půdy).

Výpočet výchozí koncentrace na základě plochy se provede takto:

$$C_{\text{půda}} = \frac{A[\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l[\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d[\text{kg}_{\text{půda}}/\text{m}^3]}$$

$C_{\text{půda}}$ = výchozí koncentrace v půdě [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]; A = aplikační dávka [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = tloušťka půdní vrstvy na poli [m], d = sypná hustota suché půdy [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]. Zhruba platí, že aplikační dávka $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ vede ke koncentraci v půdě přibližně $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v 10cm vrstvě (při předpokládané sypné hustotě $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$). Například u chemických látek aplikovaných na list nebo do půdy bez zapravení se pro výpočet množství chemické látky, které je třeba přidat do každé baňky, použije hloubka vrstvy půdy 2,5 cm. U chemických látek zapravovaných do půdy je příslušná hloubka specifikována v pokynech pro použití. U chemických látek obecně by mělo být aplikované množství odhadnuto na základě hlavní cesty vstupu do půdy; jsou-li například hlavní cestou vstupu do půdy kaly z čistíren odpadních vod, měla by být chemická látka přidána do kalu v koncentraci, která odráží očekávanou koncentraci v kalu, a množství kalu zapravené do půdy by mělo odpovídat normálnímu množství kalu zapravovanému do zemědělských půd. Pokud tato koncentrace není dostatečná pro identifikaci hlavních transformačních produktů, může napomoci inkubace samostatných půdních vzorků obsahujících vyšší koncentrace, avšak neměly by být používány nadměrné koncentrace, které mají vliv na mikrobiální funkce (viz oddíly 1.5 a 1.8.2).

Jinou možností je expozice velké dávky půdy (tj. 1 až 2 kg), její důkladné promísění vhodným míchacím zařízením a přenesení malých podílů o hmotnosti 50 až 200 g do inkubačních baněk (např. pomocí dělice vzorku). Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrné distribuce. Takový postup se upřednostňuje, neboť umožňuje stejnoměrnější rozptýlení zkoušené látky v půdě.

Neexponované vzorky se inkubují za stejných podmínek (aerobních) jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy během studií a na jejich konci.

Pokud se látka aplikuje do půdy rozpuštěná v organickém rozpouštědle (organických rozpouštědlech), inkubují se vzorky půdy vystavené témuž množství rozpouštědla (rozpouštědel) za týchž (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy na začátku studií, v jejich průběhu a na jejich konci za účelem kontroly účinků rozpouštědla (rozpouštědel) na mikrobiální biomasu.

Baňky obsahující exponovanou půdu se buď zapojí do průtokového systému popsaného na obrázku 1, nebo se uzavřou absorpční kolonou, jak je uvedeno na obrázku 2 (viz dodatek 3).

XXIII.1.9.3 Odběr vzorků a měření

V příslušných časových intervalech se vyberou duplikátní inkubační baňky, vzorky půd se extrahují vhodnými rozpouštědly různé polaritry a analyzují na zkoušenou látku a/nebo na transformační produkty. V dobře založených studiích je k dispozici dostatečný počet baněk, aby bylo možné ke každému odběru vybrat dvě baňky. V různých časových intervalech (v 7denních intervalech během prvního měsíce a po prvním měsíci v 17denních intervalech) během inkubace každého vzorku půdy a dále na konci inkubace se také odeberou absorpční roztoky nebo tuhé absorpční materiály a analyzují se na těkavé produkty. Kromě vzorku půdy odebraného ihned po aplikaci (vzorek ze dne 0) se provede alespoň dalších 5 odběrů. Časové intervaly se zvolí tak, aby bylo možné stanovit schéma rozkladu zkoušené látky a způsob tvorby a rozkladu transformačních produktů (např. po 0, 1, 3, 7 dnech; po 2, 3 týdnech; po 1, 2, 3 měsících atd.).

V případě zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se spálením kvantitativně stanoví neextrahovatelná radioaktivita a pro každý vzorkovací interval se vypočte látková bilance.

V případě anaerobní inkubace nebo inkubace za podmínek rýžového pole se půda a vodná fáze analyzují na zkoušenou látku a transformační produkty buď společně, nebo se před extrakcí a analýzou oddělí filtrací nebo centrifugací.

XXIII.1.9.4 Nepovinné zkoušky

Pro odhad vlivu teploty a vlhkosti půdy na rychlosti transformace zkoušené látky a/nebo jejích transformačních produktů v půdě mohou být užitečné aerobní nesterilní studie při další teplotě nebo vlhkosti půdy.

O další charakterizaci neextrahovatelné radioaktivity se lze pokusit například použitím metody extrakce tekutinou v nadkritickém stavu.

XXIII.2. DATA

XXIII.2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý vzorkovací interval se uvede množství zkoušené látky, transformačních produktů, těkavých látek (pouze v %) a neextrahovatelných látek v procentech výchozí koncentrace, popřípadě

v mg na kg půdy (na hmotnost sušiny). Pro každý vzorkovací interval se uvede látková bilance v procentech výchozí koncentrace. Grafické znázornění závislosti koncentrace zkoušené látky na čase umožní provést odhad jejího poločasu transformace nebo hodnoty DT_{50} . Měly by být identifikovány hlavní transformační produkty a měly by být také sestrojeny křivky jejich závislosti na čase, aby se ukázala rychlost jejich tvorby a rozkladu. Hlavním transformačním produktem je jakýkoli produkt, který kdykoli během studie představuje $\geq 10\%$ aplikované dávky.

Zachycené těkavé produkty jsou určitým ukazatelem těkavosti zkoušené látky a jejich transformačních produktů z půdy.

Přesnější stanovení poločasů nebo hodnot DT_{50} a popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} se provede výpočtem za použití vhodného modelu kinetiky. Společně s hodnotami poločasu a DT_{50} se uvede popis použitého modelu kinetiky, řád kinetiky a koeficient determinace (r^2). Pokud není $r^2 < 0,7$, upřednostňuje se kinetika prvního řádu. Podle možnosti se výpočty použijí také na hlavní transformační produkty. Příklady vhodných modelů jsou popsány v literatuře 31 až 35.

V případě studií rychlosti prováděných při různých teplotách se závislost rychlosti transformace na teplotě popíše v rozsahu experimentálních teplot pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ nebo } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

kde $\ln A$ a B jsou regresní konstanty získané z úseku na ose y a ze směrnice regresní přímky závislosti $\ln k$ na $1/T$, kde k je rychlostní konstanta při teplotě T a T je teplota v Kelvinech. Je třeba věnovat pozornost omezení rozsahu teplot, v němž platí Arrheniova rovnice, jestliže transformaci určuje mikrobiální činnost.

XXIII.2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Přestože se studie provádějí v umělém laboratorním systému, umožňují výsledky odhadnout rychlost transformace zkoušené látky a rovněž rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů za polních podmínek (viz literatura 36 a 37).

Studie transformačního způsobu zkoušené látky poskytuje informaci o způsobu, jakým se mění struktura aplikované látky v půdě působením chemických a mikrobiálních reakcí.

XXIII.3. ZPRÁVY

XXIII.3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

- obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího atomu (značících atomů) při použití radionuklidů) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5);

- čistota zkoušené látky (obsah nečistot);
- popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita;

Referenční látky:

- chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu;

Zkušební půdy:

- podrobné údaje o místě odběru;
- datum a postup odběru vzorků půdy;
- vlastnosti půdy, např. pH, obsah organického uhlíku, struktura (% písku, % prachu, % jílu), kationtová výměnná kapacita, sypná hustota, schopnost zadržet vodu a mikrobiální biomasa;
- doba skladování půdy a podmínky skladování (pokud byla skladována);

Zkušební podmínky:

- datum provedení studií;
- množství aplikované zkoušené látky;
- použitá rozpouštědla a metoda aplikace zkoušené látky;
- hmotnost exponované půdy na začátku zkoušky a hmotnost půdy odebírané pro analýzu v každém intervalu;
- popis použitého inkubačního systému;
- rychlosti průtoku vzduchu (pouze u průtokových systémů);
- zkušební teplota;
- vlhkost půdy během inkubace;
- mikrobiální biomasa na začátku aerobních studií, během nich a na jejich konci;
- pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál na začátku anaerobních studií a studií za podmínek rýžového pole, během nich a na jejich konci;
- metoda (metody) extrakce;
- metody kvantitativního stanovení a identifikace zkoušené látky a hlavních transformačních produktů v půdě a v absorpčních materiálech;
- počet duplikátních vzorků a počet kontrol.

Výsledky:

- výsledky stanovení mikrobiální aktivity;
- opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod;
- hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1);

- tabulky s výsledky vyjádřenými v % výchozí aplikované dávky, popřípadě v mg na kg půdy (vztaženo na hmotnost sušiny půdy);
- látková bilance během studií a na jejich konci;
- charakterizace neextrahovatelné (vázané) radioaktivity nebo reziduí v půdě;
- kvantifikace uvolněného CO₂ a dalších těkavých sloučenin;
- křivky závislosti koncentrací zkoušené látky, popřípadě hlavních transformačních produktů v půdě na čas;
- poločas nebo hodnoty DT₅₀, DT₇₅ a DT₉₀ pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty včetně příslušných intervalů spolehlivosti;
- odhad rychlosti abiotického rozkladu za sterilních podmínek;
- posouzení kinetiky transformace pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty;
- případný návrh způsobu transformace;
- diskuse a interpretace výsledků;
- nezpracovaná data (tj. chromatogramy jednotlivých vzorků, příklady výpočtu rychlostí transformace a metody použité pro identifikaci transformačních produktů).

XXIII.4. LITERATURA

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Evropská unie (EU) (1995). Směrnice Komise 95/36/ES ze dne 14. července 1995, kterou se mění směrnice Rady 91/414/EHS o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh. Příloha II část A a příloha III část A: Rozpad a chování v životním prostředí.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil, Technical Committee ISO/TC 190/SC 4.
- (7) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Vyd. Mark R. Lynch.
- (9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Itálie, 18. – 20. ledna 1995.
- (11) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In: Interactions between Herbicides and the Soil (Vyd. R. J. Hance), Academic Press, 123 – 157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. *Pure Appl. Chem.* 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (přijato 12. května 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Příloha V směrnice 67/548/EHS
- (17) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry. Vyd. D. H. Hutson, T. R. Roberts, J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) a *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. Vyd. A. Klute, Agronomy Series No 9, 2. vydání.
- (20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. Vyd. A. L. Page, R. H. Miller, D. R. Kelney, Agronomy Series No 9, 2. vydání.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis, 1. vydání.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J. P. E., Domsch, K. H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215 – 221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: Fumigation-extraction method.

- (26) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In: *Pesticide Effects on Soil Microflora*. Vyd. L. Somerville, M. P. Greaves, Taylor & Francis, 45 – 60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105 – 120.
- (28) Keuken O., Anderson J. P. E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In: *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59 – 63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In: *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197-200.
- (31) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141-146.
- (32) Hamaker, J. W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides*, 181-199.
- (33) Goring, C. A. I., Laskowski, D. A., Hamaker, J. W., Meikle, R. W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In: *Environmental Dynamics of Pesticides*. Vyd. R. Haque, V. H. Freed, 135 – 172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer* 39, 188 – 204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer* 33, 47 – 60.
- (36) Gustafson D. I., Holden L. R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. *Environm. Sci. Technol.* 24, 1032 – 1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In: *Interactions between Herbicides and the Soil*. Vyd. R. J. Hance , Academic Press, 83 – 122.

DODATEK 1**TLAK VODY, POLNÍ KAPACITA (PK) A RETENČNÍ VODNÍ KAPACITA (RVK)**

Výška vodního sloupce [cm]	pF^a	bar ^b	Poznámky
10^7	7	10^4	Suchá půda
$1,6 \cdot 10^4$	4,2	16	Bod vadnutí
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3,3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ^c	
10^2	2	0,1	} Rozpětí polní kapacity ^d
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	RVK (přibližná hodnota)
1	0	0,001	Půda nasycená vodou

^a pF = dekadický logaritmus výšky vodního sloupce v cm.

^b 1 bar = 10^5 Pa.

^c Odpovídá přibližnému obsahu vody při složení 10 % písku, 35 % hlíny a 45 % jílu.

^d Polní kapacita není konstanta, ale mění se v závislosti na druhu půdy od pF 1,5 do 2,5.

Tlak vody se vyjadřuje v cm vodního sloupce nebo v jednotkách bar. Vzhledem k velkému rozpětí se sací tlak vyjadřuje jednoduše jako hodnota pF , která je ekvivalentní logaritmu vodního sloupce v cm.

Polní kapacita je definována jako množství vody, které přírodní půda po delším deštivém období nebo po dostatečném zavlažení udrží proti gravitaci 2 dny. Stanovuje se u neporušené půdy v polním pokusu. Naměřená hodnota tedy není použitelná pro laboratorní vzorky porušené půdy. Hodnoty PK stanovené u porušených půd mohou vykazovat větší systematické odchylky.

Retenční vodní kapacita (RVK) se stanovuje v laboratoři u neporušené i porušené půdy tak, že se kapilárním vztlínáním nasytí sloupec půdy vodou. Využije se zejména u porušených půd, kdy může být RVK až o 30 % vyšší než polní kapacita (1). Také se stanovuje snadněji než spolehlivé hodnoty PK.

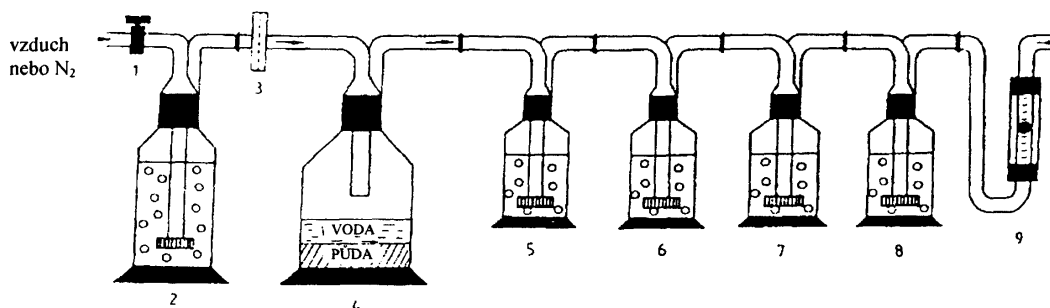
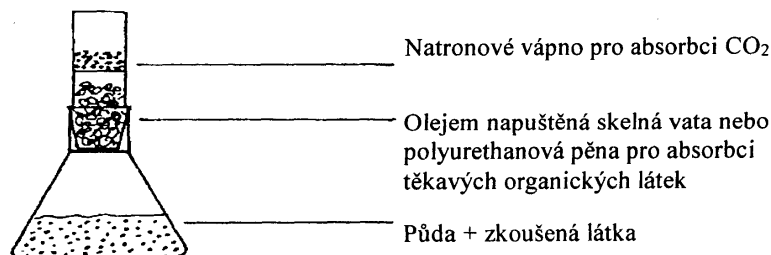
DODATEK 2**VLHKOST PŮDY (v g vody na 100 g sušiny) U RŮZNÝCH DRUHŮ PŮD
Z RŮZNÝCH ZEMÍ**

Druh půdy	Země	Vlhkost půdy při		
		RVK ¹	pF = 1,8	pF = 2,5
Písčítá	Německo	28,7	8,8	3,9
Hlinitopísčítá	Německo	50,4	17,9	12,1
Hlinitopísčítá	Švýcarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitohlinitá	Švýcarsko	72,8	56,6	28,4
Jílovitohlinitá	Brazílie	69,7	38,4	27,3
Jílovitohlinitá	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Písčitohlinitá	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitohlinitá	USA	47,2	33,2	18,8
Písčitohlinitá	USA	40,4	25,2	13,3

¹ Retenční vodní kapacita

DODATEK 3**Obrázek 1****Příklad průtokové aparatury pro studium transformace chemických látek v půdě (viz literatura 1 a 2)**

- | | | |
|--|--|--|
| 1: jehlový ventil | 4: baňka pro studium metabolismu v půdě (zalitá vodou pouze v případě anaerobních podmínek a podmínek rýžového pole) | 7, 8: zátka z hydroxidu sodného pro zachycení CO_2 a jiných kyselých těkavých látek |
| 2: promývačka s vodou | 5: baňka s ethylenglykolem pro zachycení organických těkavých sloučenin | 9: průtokoměr |
| 3: ultramembrána (pouze ve sterilních podmínkách), velikost pórů $0,2 \mu\text{m}$ | 6: baňka s kyselinou sírovou pro zachycení alkalických těkavých sloučenin | |

**Obrázek 2****Příklad biometrické baňky pro studium transformace chemických látek v půdě (viz literatura 3)**

- (1) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In: Interactions between Herbicides and the Soil. Vyd. R. J. Hance, Academic Press, 123 – 157.
- (2) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry. Vyd. D.H. Hutson, T.R. Roberts, J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.
- (3) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141 – 146.

XXIV. METODA PRO STANOVENÍ AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA-SEDIMENT

(metoda C.24 podle přílohy směrnice 2004/73/ES ze dne 29. dubna 2004, kterou se po dvacáté deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek)

XXIV.1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 308 (2002).

XXIV.1.1 ÚVOD

Chemické látky se mohou dostat do mělkých nebo hlubokých povrchových vod takovými cestami, jako jsou přímá aplikace, unášení postřiku, odtok, ukládání odpadu, průmyslové, komunální nebo zemědělské emise a atmosférický spad. V této zkušební metodě je popsán laboratorní postup posouzení aerobní a anaerobní transformace organických chemických látek v systémech voda-sediment. Je založena na doporučeních a směrnicích národních a mezinárodních organizací (viz literatura 1 až 8). Tyto studie jsou požadovány u látek, které jsou aplikovány bezprostředně do vody nebo které se mohou dostat do vody výše uvedenými cestami.

Podmínky ve vrchní vodní fázi přírodních systémů voda-sediment jsou často aerobní. Podmínky v povrchové vrstvě sedimentu mohou být buď aerobní, nebo anaerobní, zatímco podmínky hlouběji v sedimentu jsou obvykle anaerobní. S cílem zahrnout všechny tyto možnosti je v tomto dokumentu popsána zkouška jak za aerobních podmínek, tak za anaerobních podmínek. Aerobní zkouškou se simuluje aerobní vodní sloupec nad aerobní vrstvou sedimentu, pod níž leží vrstva s anaerobním gradientem. Anaerobní zkouška simuluje zcela anaerobní systém voda-sediment. Pokud je z okolností zřejmé, že je třeba se odchýlit od těchto doporučení, např. použít nedotčené střední vrstvy sedimentů nebo sedimenty, které mohly být exponovány zkoušenou látkou, existují jiné metody určené k tomuto účelu (viz literatura 9).

XXIV.1.2 DEFINICE

Ve všech případech je třeba používat jednotky mezinárodní soustavy jednotek (SI).

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO₂ a vázaných reziduí.

Vázaná rezidua: „Vázaná rezidua“ jsou sloučeniny v půdě, rostlině nebo v živočichu, které po extrakci zůstávají v matici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů). Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vyjasnit extrakcí spojenou se změnami v matici a náročnými

analytickými technikami. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (viz literatura 10) [upraveno IUPAC 1984 (viz literatura 11)].

Aerobní transformace: (oxidační): reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (viz literatura 12).

Anaerobní transformace: (redukční): reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (viz literatura 12).

Sediment: je směs minerálních a organických chemických složek, přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Ukládají se v povrchových vodách a vytvářejí rozhraní s těmito vodami.

Mineralizace: je úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4 , CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V rámci této zkušební metody, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se značící atomy uhlíku kvantitativně oxidují nebo redukují, přičemž se uvolňuje odpovídající množství $^{14}\text{CO}_2$ nebo $^{14}\text{CH}_4$.

Poločas, $t_{0,5}$, je čas, za který dojde k 50% transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT₅₀ (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %.

DT₇₅ (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT₉₀ (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %.

XXIV.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky by měly být použity pro identifikaci a kvantitativní stanovení transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

XXIV.1.4 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak značené látky, přičemž značené materiály jsou upřednostňovány. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C , avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část (části) molekuly. Pokud například látka obsahuje kruh, je třeba tento kruh označit; pokud látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie za účelem stanovení osudu každého z označených kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů. Chemická a/nebo radiochemická čistota látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky by měly být k dispozici tyto informace o látce:

- a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);
- b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;
- c) tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta;
- d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);
- e) adsorpční koeficient (podle potřeby K_d , K_f nebo K_{oc}) (metoda C.18);
- f) hydrolýza (metoda C.7);
- g) disociační konstanta (pK_a) [směrnice OECD 112] (viz literatura 13);
- h) chemická struktura zkoušené látky a případně poloha značícího nuklidu.

Poznámka: Ve zprávě se uvede teplota, při které byla měření prováděna.

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy, údaje o snadné nebo vlastní biologické rozložitelnosti a údaje o aerobní a anaerobní transformaci v půdě.

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů ve vodě a sedimentu (viz oddíl 1.7.2).

XXIV.1.5 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

V metodě popsané v této zkoušce se používají aerobní i anaerobní systémy voda-sediment (viz dodatek 1), které umožňují

- i) měřit rychlost transformace zkoušené látky v systému voda-sediment,
- ii) měřit rychlost transformace zkoušené látky v sedimentu,
- iii) měřit rychlost mineralizace zkoušené látky a/nebo produktů její transformace (pokud se použije zkoušená látka značená izotopem ^{14}C),
- iv) identifikaci a kvantitativní stanovení produktů transformace ve vodě a v sedimentu, včetně látkové bilance (pokud se použije značená zkoušená látka),
- v) měřit distribuci zkoušené látky a produktů její transformace mezi dvěma fázemi během inkubace v temnu (aby nedošlo např. k vykvetení řas) při konstantní teplotě. Pokud to údaje umožňují, stanoví se poločasy a hodnoty DT_{50} , DT_{75} a DT_{90} , které by však neměly být příliš extrapolovány mimo obor experimentálních hodnot (viz oddíl 1.2).

Pro aerobní i anaerobní studie jsou nezbytné alespoň dva sedimenty a příslušné vodní fáze (viz literatura 7). V některých případech by však měly být použity více než dva systémy voda-sediment, např. u chemických látek, které mohou být přítomny ve sladkovodním i mořském ekosystému.

XXIV.1.6 POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro něž je k dispozici analytická metoda s dostatečnou správností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné nebo špatně rozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z vody silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy ve vodě nebo v sedimentu udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

Tato metoda je dosud používána ke studiu transformace chemických látek ve sladkovodním systému voda-sediment, avšak může být v zásadě použita také na estuární a mořské systémy. Není vhodná k simulaci podmínek v tekoucích vodách (např. řekách) nebo na otevřeném moři.

XXIV.1.7 KRITÉRIA JAKOSTI

XXIV.1.7.1 Výtěžnost

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků systému voda-sediment ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí (pokud se použije značený materiál). Výtěžnosti by se měly nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (viz literatura 6) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek.

XXIV.1.7.2 Opakovatelnost a citlivost analytické metody

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantitativního stanovení zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků těchto extraktů vzorků vody nebo sedimentu, které byly dostatečně dlouho inkubovány, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce analytické metody (LOD) pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg vody nebo sedimentu (pro zkoušenou látku) nebo 1 % výchozího množství aplikovaného do zkušebního systému, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantitativní stanovitelnosti (LOQ).

XXIV.1.7.3 Správnost dat o transformaci

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o správnosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} a popřípadě hodnoty DT_{75} a DT_{90} .

XXIV.1.8 POPIS METODY

XXIV.1.8.1 Zkušební systém a aparatura

Studie se provede se skleněnými nádobami (např. baňkami, centrifugačními kyvetami), pokud z předběžných informací (např. z rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda, ze sorpčních dat atd.)

nevyplývá, že látka může ulpívat na skle; v takovém případě lze zvážit použití náhradního materiálu (např. teflonu). Pokud je o zkoušené látce známo, že ulpívá na skle, lze problém zmírnit jednou z následujících metod:

- stanovením hmotnosti zkoušené látky a transformačních produktů sorbovaných na skle;
- zajištěním, aby se na konci zkoušky omylo rozpouštědlem veškeré laboratorní sklo;
- použitím komerční úpravy přípravků (viz také oddíl 1.9.2);
- použitím většího množství pomocného rozpouštědla za účelem přidání zkoušené látky do systému; pokud se použije pomocné rozpouštědlo, nesmí štěpit zkoušenou látku solvolýzou.

Příklady typických zkušebních aparatur, tj. průtokové a biometrické systémy, jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3 (viz literatura 14). Jiné užitečné inkubační systémy jsou popsány v literatuře (viz literatura 15). Experimentální aparatura by měla být konstruována tak, aby byla možná výměna vzduchu nebo dusíku a zachycení těkavých produktů. Rozměry aparatury musí splňovat požadavky zkoušky (viz oddíl 1.9.1). Ventilace musí být zajištěna buď jemným probubláváním, nebo proháněním vzduchu nebo dusíku nad hladinou vody. V druhém případě se doporučuje vodu seshora mírně promíchávat, aby docházelo k lepší distribuci kyslíku nebo dusíku ve vodě. Neměl by se použít vzduch zbavený CO_2 , neboť by došlo ke zvýšení pH vody. V žádném případě není žádoucí, aby došlo ke zviření sedimentu, a je tomu třeba pokud možno zabránit. Slabě těkavé chemické látky se zkoušejí v biometrickém systému za mírného promíchávání vodní hladiny. Lze rovněž použít uzavřené nádoby s volným objemem pod víčkem vyplněným atmosférickým vzduchem nebo dusíkem a vnitřní ampulky pro zachycování těkavých produktů (viz literatura 16). U aerobních zkoušek je nezbytná pravidelná výměna plynu pod víčkem, aby se vyrovnávala spotřeba kyslíku biomasou.

Mezi vhodné lapače pro shromažďování těkavých transformačních produktů patří kromě jiných roztok hydroxidu draselného nebo sodného o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro zachytávání oxidu uhličitého a ethylenglykol, ethanolamin nebo 2% parafín v xylenu pro organické sloučeniny. Vzhledem k tomu, že alkalické roztoky absorbují oxid uhličitý ze vzduchu určeného k provzdušňování a oxid uhličitý uvolňující se respirací v aerobních experimentech, musí být pravidelně vyměňovány, aby se nevyčerpala jejich absorpční kapacita. Těkavé látky tvořící se za anaerobních podmínek, např. methan, lze zachytávat na molekulovém sítu. Takové těkavé látky lze spálit např. na CO_2 v křemenné trubičce za přítomnosti CuO při teplotě 900°C a vzniklý CO_2 lze zachytit v absorbéru s alkálií (viz literatura 17).

Pro chemickou analýzu zkoušené látky a transformačních produktů jsou nezbytné laboratorní přístroje (např. přístroje pro plynovou chromatografii s kapalinovou stacionární fází (GLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC), hmotnostní spektrometrii (MS), kombinaci plynové chromatografie a

hmotnostní spektrometrie (GC-MS), kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS), jadernou magnetickou rezonanci (NMR) atd.), včetně detekčních systémů pro detekci sloučenin značených nebo neznačených radioisotopy. Pokud se použije materiál značený radioisotopy, je třeba mít k dispozici scintilační spektrometr a zařízení pro spalování za přítomnosti oxidačního činidla (pro spalování vzorků sedimentů před radiometrickým měřením).

Další standardní laboratorní vybavení pro fyzikálně-chemická a biologická stanovení (viz oddíl 1.8.2.2 tabulka 1), laboratorní sklo, chemikálie a činidla se použijí podle potřeby.

XXIV.1.8.2 Výběr a počet vodních sedimentů

Místa odběru by měla být vybrána podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru místa odběru vzorků musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo komunálních vstupů do povodí a do vod proti proudu. Sedimenty by neměly být použity, pokud byly v předchozích 4 letech kontaminovány zkoušenou látkou nebo jejími strukturními analogy.

XXIV.1.8.2.1 Výběr sedimentů

Pro aerobní studie se obvykle použijí dva sedimenty (viz literatura 7). Tyto dva vybrané sedimenty by se měly lišit co do obsahu organického uhlíku a textury. Jeden sediment by měl mít vysoký obsah organického uhlíku (2,5 – 7,5 %) a jemnou texturu a druhý sediment by měl mít nízký obsah organického uhlíku (0,5 – 2,5 %) a hrubou texturu. Obsah organického uhlíku by se měl zpravidla lišit alespoň o 2 %. „Jemná textura“ je definována obsahem složky [jíl + prach], ([jíl + prach] je minerální frakce sedimentu s velikostí částic < 50 µm) vyšším než 50 % a „hrubá textura“ je definována obsahem složky [jíl + prach] nižším než 50 %. Rozdíl v obsahu složek [jíl + prach] u obou sedimentů by měl být zpravidla alespoň 20 %. V případě, že se může chemikálie dostat do mořských vod, měl by alespoň jeden systém voda-sediment pocházet z moře.

Pro přísně anaerobní studii by měly být odebrány dva sedimenty (včetně příslušné vody) z anaerobních zón povrchových vod (viz literatura 7). Se sedimentem i vodní fází by mělo být zacházeno opatrně a měly by být přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku.

Pro výběr sedimentu mohou být důležité i jiné parametry, které by měly být zvažovány případ od případu. Rozpětí pH sedimentů je například důležité pro zkoušení chemikálií, u nichž transformace a/nebo sorpce mohou záviset na pH. Závislost sorpce na pH by se mohla odrážet v hodnotě pK_a zkoušené látky.

XXIV.1.8.2.2 Charakterizace vzorků systému voda-sediment

Klíčové parametry, které musí být jak u vody, tak u sedimentu měřeny a uvedeny ve zprávě (s odkazem na použitou metodu), a fáze zkoušky, ve které mají být měřeny, jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. Metody stanovení těchto parametrů jsou pro informaci uvedeny v literatuře 18 až 21.

Kromě toho může být případ od případu nezbytné měřit a uvádět další parametry (např. u sladkovodního systému: obsah částic, alkalita, tvrdost, vodivost, NO_3/PO_4 (poměr jednotlivých hodnot); u sedimentů: kationtová výměnná kapacita, retenční vodní kapacita, obsah uhlíčanů, celkový obsah dusíku a fosforu; u mořských systémů: salinita). Pro posouzení oxidačně-redukčních podmínek, a zejména v souvislosti s anaerobní transformací, může být také užitečná analýza sedimentů a vody na dusičnany, sírany, biologicky dostupné železo, popřípadě na jiné akceptory elektronů.

Měření parametrů pro charakterizaci vzorků systémů voda-sediment (viz literatura 7, 22 a 23)

Parametr	Fáze zkušebního postupu					
	odběr v terénu	manipulace po odběru	zahájení aklimatizace	zahájení zkoušky	samotná zkouška	konec zkoušky
Voda						
Původ/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Koncentrace O_2^*	x		x	x	x	x
Oxidačně-redukční potenciál*			x	x	x	x
Sediment						
Původ/zdroj	x					
Hloubka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuce částic		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobiální biomasa**		x		x		x
Oxidačně-redukční potenciál*	Pozorování (barva/zápach)		x	x	x	x

* Výsledky nedávných výzkumů ukázaly, že měření koncentrace kyslíku ve vodě a oxidačně-redukčního potenciálu vody nemají vypovídací hodnotu, pokud jde o mechanismus růstu a vývoje mikrobiální populace v povrchových vodách, a nemají ani předpovědní hodnotu (viz literatura 24 a 25). Stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BOD, při odběru vzorků v terénu a při zahájení a na konci zkoušky) a koncentrace mikro- a makroživin Ca, Mg a Mn ve vodě (při zahájení a na konci zkoušky) a měření celkového obsahu N a P v sedimentech (při odběru vzorků v terénu a na konci zkoušky) může být lepším nástrojem pro interpretaci a hodnocení rychlosti a způsobů aerobní biotransformace.

** Metoda měření rychlosti mikrobiální respirace (viz literatura 26), fumigační metoda (viz literatura 27) nebo měření počtu mikroorganismů (např. bakterií, aktinomycet, plísní a celkového počtu kolonií) pro aerobní studie; rychlost methanogeneze u anaerobních studií.

XXIV.1.8.3 **Odběr vzorků, manipulace s nimi a jejich skladování**

XXIV.1.8.3.1 *Odběr*

Vzorky sedimentu se odeberou podle návrhu směrnice ISO pro odběr vzorků sedimentů (viz literatura 8). Vzorky se odeberou z celé 5 až 10 cm silné horní vrstvy sedimentu. Současně se sedimentem se odebere z téhož místa nebo lokality příslušný vzorek vody. U anaerobní studie musí být sediment a příslušná voda odebrány a přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku (viz literatura 28) (viz oddíl 1.8.2.1). V literatuře je popsáno několik odběrových zařízení (viz literatura 8 a 23).

XXIV.1.8.3.2 *Manipulace*

Sediment se oddělí od vody filtrací a poté se pomocí přebytku vody z místa odběru prosévá za mokra na 2mm sítu; voda se odstraní. Poté se v inkubační baňce v požadovaném poměru (viz oddíl 1.9.1) smísí známé množství sedimentu a vody a směs se připraví pro aklimatizaci (viz oddíl 1.8.4). U anaerobní studie musí být všechny kroky prováděny s vyloučením přístupu kyslíku (viz literatura 29 až 33).

XXIV.1.8.3.3 *Skladování*

V každém případě se doporučuje používat čerstvě odebraný sediment a vodu; je-li však skladování nezbytné, sediment s vodou se proseje výše popsaným způsobem a zalitý vodou (vrstva vody 6 – 10 cm) se skladuje v temnu při $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (viz literatura 4) maximálně 4 týdny (viz literatura 7, 8 a 23). Vzorky pro aerobní studie se skladují za volného přístupu vzduchu (např. v otevřených nádobách), zatímco vzorky pro anaerobní studie se skladují s vyloučením přístupu kyslíku. Při přepravě a skladování nesmí sediment a voda zmrznout a sediment nesmí být vysušován.

XXIV.1.8.4 **Příprava vzorků systému sediment-voda ke zkoušce**

Před přidáním zkoušené látky musí proběhnout aklimatizace, při níž musí být vzorky sedimentu-vody umístěny v inkubační nádobě, která se použije při hlavní zkoušce; podmínky aklimatizace musí být totožné s podmínkami inkubace při zkoušce (viz oddíl 1.9.1). Doba aklimatizace je čas nezbytný pro dostatečnou stabilizaci systému, kterou lze posoudit podle pH, koncentrace kyslíku ve vodě, oxidačně-redukčního potenciálu sedimentu a vody a makroskopické separace fází. Doba aklimatizace není obvykle delší než jeden až dva týdny a neměla by překročit čtyři týdny. Výsledky měření provedených během této doby se uvedou ve zprávě.

XXIV.1.9 **PROVEDENÍ ZKOUŠKY**

XXIV.1.9.1 **Zkušební podmínky**

Zkouška se provede v inkubační aparatuře (viz oddíl 1.8.1) při poměru objemu vody a sedimentu 3:1 až 4:1, s vrstvou sedimentu 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm). Doporučené minimální množství sedimentu na inkubační nádobu je 50 g (hmotnost sušiny). Z nedávných studií vyplývá, že skladování při $4 ^\circ\text{C}$ může vést k poklesu obsahu organického uhlíku v sedimentu, který by mohl případně vést k poklesu mikrobiální aktivity.

Zkouška se provádí v temnu za konstantní teploty v rozmezí 10 až $30 ^\circ\text{C}$. Vhodná je teplota $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Podle potřeby lze případ od případu

v závislosti na zaměření zkoušky zvolit další, nižší teplotu (např. 10 °C). Inkubační teplota se sleduje a uvede se ve zprávě.

XXIV.1.9.2 Úprava zkoušené látky a její aplikace

Použije se jedna zkušební koncentrace chemické látky. Zkouška s druhou koncentrací může být užitečná u chemických látek, které se dostávají do vod různými cestami, a vykazují tedy významně odlišné koncentrace, pokud lze nižší koncentraci analyzovat s dostatečnou správností. U přípravků na ochranu rostlin aplikovaných přímo do vodního tělesa se použije maximální dávkování uvedené na etiketě jako maximální aplikovaná dávka vypočtená podle plochy hladiny vody ve zkušební nádobě. Ve všech ostatních případech se použije koncentrace založená na odhadech emise do životního prostředí. Je třeba spolehlivě zajistit, aby byla aplikována dostatečná koncentrace zkoušené látky pro charakterizaci postupu transformace a tvorby a odbourávání transformačních produktů. V situaci, kdy se koncentrace zkoušené látky na začátku studie blíží mezím detekce a/nebo kdy by nebylo možné detekovat hlavní transformační produkty, jsou-li přítomny v množství odpovídajícím 10 % výchozí aplikované dávky, může být nezbytné aplikovat vyšší dávky (např. 10krát vyšší). Použité vyšší koncentrace však nesmí mít významné nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu v systému voda-sediment. S cílem dosáhnout konstantní koncentrace v nádobách různých rozměrů může být nezbytné upravit množství použitého materiálu, přičemž se vychází z výšky vodního sloupce v nádobě v poměru k hloubce vody v odběrovém místě (předpokládá se hloubka 100 cm, možná je však i jiná hloubka). Příklad výpočtu je uveden v dodatku 4.

V ideálním případě se zkoušená látka aplikuje do vodné fáze zkoušeného systému ve formě vodného roztoku. Je-li to nevyhnutelné, je přípustné použít pro aplikaci a rozptýlení zkoušené látky malé množství rozpouštědla mísitelného s vodou (např. acetonu nebo ethanolu), avšak jeho množství by nemělo překročit 1 % (obj.) a rozpouštědlo by nemělo mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému. Přípravě vodného roztoku zkoušené látky je třeba věnovat pozornost a k zajištění naprosté homogenity může být vhodné použít generátorové kolony a předem připravené směsi. Po přidání vodného roztoku do zkušebního systému se doporučuje vodnou fázi mírně promíchat tak, aby se sediment zvířil co nejméně.

Použití komerčních úprav přípravků se nedoporučuje, neboť složky přípravku mohou mít vliv na distribuci zkoušené látky a/nebo transformačních produktů mezi vodu a sediment. U špatně rozpustných zkoušených látek však může být použití komerční úpravy vhodnou možností.

Počet inkubačních nádob závisí na počtu intervalů, v nichž mají být prováděny odběry (viz oddíl 1.9.3). Je třeba nasadit dostatečný počet zkušebních systémů, aby bylo možné v každém intervalu vyhodnotit dva systémy. Použijí-li se pro každý systém voda-sediment kontrolní systémy, neexponují se zkoušené látky. Kontrolní systémy lze použít pro stanovení mikrobiální biomasy sedimentu a celkového organického uhlíku ve vodě na konci studie. Dva kontrolní systémy (tj. po jednom kontrolním systému

z každého systému voda-sediment) mohou být použity pro sledování požadovaných parametrů v sedimentu a ve vodě v průběhu aklimatizace (viz tabulka v oddílu 1.8.2.2). Dva další kontrolní systémy musí být nasazeny za účelem měření nepříznivých účinků na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému v případě, že se zkoušená látka aplikuje pomocí rozpouštědla.

XXIV.1.9.3 **Délka zkoušky a odběry vzorků**

Délka experimentu by neměla překročit 100 dnů (6) a experiment by měl trvat tak dlouho, dokud se nestanoví způsob rozkladu a distribuce ve vodě/sedimentu, nebo dokud se transformací a/nebo těkáním nevyčerpá 90 % zkoušené látky. Odběr by měl být proveden nejméně v šesti časech (včetně času 0), přičemž vhodný režim odběrů a délka zkoušky se stanoví nepovinnou orientační studií (viz oddíl 1.9.4), nejsou-li k dispozici vhodné údaje o zkoušené látce z dřívějších studií. U hydrofobních zkoušených látek může být potřeba dodatečným vzorkováním v průběhu počáteční fáze studie zjistit stupeň distribuce mezi vodu a sediment.

V příslušnou dobu se k analýze odebere celý obsah inkubačních nádob (včetně duplikátních nádob). Sediment a voda nad sedimentem se analyzují zvlášť. Může-li snadno docházet k rychlé opětovné oxidaci produktů anaerobní transformace, měly by být během odběru a analýzy zachovány anaerobní podmínky.

Voda se za minimálního zviření sedimentu opatrně odebere. Vhodnými analytickými postupy se provedou extrakce a charakterizace zkoušené látky a transformačních produktů. Je třeba také pečlivě shromáždit materiál, který může být adsorbován na inkubační nádobě nebo ve spojovacích trubičkách použitých k zachycení těkavých látek.

XXIV.1.9.4 **Nepovinná orientační zkouška**

Pokud nelze délku etapy, kdy jsou odebírány vzorky, odhadnout z jiných relevantních studií zkoušené látky, lze případně provést orientační zkoušku, která se provede za týchž zkušebních podmínek, jaké jsou navrženy pro hlavní studii. Příslušné podmínky a výsledky orientační zkoušky, pokud byla provedena, by měly být v krátkosti uvedeny ve zprávě.

XXIV.1.9.5 **Měření a analýza**

Pro každý čas odběru se provede měření koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů ve vodě a v sedimentu a výsledky se uvedou ve zprávě (jako koncentrace a v procentech aplikovaného množství). V zásadě by měla být při každém odběru provedena identifikace transformačních produktů, které obsahují ≥ 10 % radioaktivity aplikované do celého systému voda-sediment, pokud nejsou dostatečné důvody proti tomu. Měly by být také identifikovány transformační produkty, jejichž koncentrace v průběhu studie nepřetržitě roste, třebaže nedosahuje výše uvedené meze, neboť to může znamenat, že se jedná o perzistentní produkty. Tento postup by měl být zvážen případ od případu a ve zprávě by měl být odůvodněn.

Pro každý čas odběru se uvedou výsledky ze systémů pro zachycování plynů/těkavých látek (CO₂ a jiných těkavých organických sloučenin). Uvede se rychlost mineralizace. Pro každý čas odběru se uvedou neextrahovatelná (vázaná) rezidua v sedimentu.

XXIV.2. DATA

XXIV.2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý čas odběru se vypočte celková látková bilance nebo výtěžnost (viz oddíl 1.7.1) přidané radioaktivity. Výsledky se uvedou v procentech přidané radioaktivity. Pro každý čas odběru se uvede distribuce radioaktivity mezi vodu a sediment (vyjádřeno v koncentracích a v procentech).

Pro zkoušenou látku se vypočítá poločas a hodnoty DT₅₀ a popřípadě hodnoty DT₇₅ a DT₉₀ a intervaly spolehlivosti těchto hodnot (viz oddíl 1.7.3). Vhodnými hodnotícími nástroji lze zjistit míru zániku zkoušené látky ve vodě a v sedimentu. Může jít o použití zdánlivé kinetiky prvního řádu, o techniky proložení empirické křivky za použití grafického nebo numerického řešení a o složitější hodnocení, např. pomocí modelu s jednou nebo více složkami. Další podrobné informace lze získat z publikované literatury 35 až 37).

Všechny přístupy mají své silné a slabé stránky a značně se liší v komplexnosti. Předpoklad kinetiky prvního řádu může být sice přílišným zjednodušením procesu rozkladu a distribuce, vede však v ideálním případě k hodnotám (rychlostní konstantě nebo poločasu), které jsou snadno srozumitelné a mají význam pro simulační modelování a výpočet předpokládaných koncentrací v životním prostředí. Empirický přístup nebo lineární transformace mohou vést k lepšímu proložení dat křivkami, a tedy k lepšímu odhadu poločasů, hodnot DT₅₀ a popřípadě DT₇₅ a DT₉₀. Použití odvozených konstant však má své meze. Složkové modely mohou poskytovat řadu užitečných konstant, které jsou důležité pro posouzení rizika a pro popis rozkladu chemické látky v různých složkách a pro její distribuci. Použijí se rovněž pro odhad rychlostních konstant tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů. V každém případě však musí být volba metody odůvodněna a experimentátor by měl graficky nebo statisticky prokázat její oprávněnost.

XXIV.3. ZPRÁVY

XXIV.3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

- obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího nuklidu u látek značených radionuklidy) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti;
- čistota zkoušené látky (obsah nečistot);
- popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a molární aktivita.

Referenční látky:

- chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební sedimenty a vody:

- lokalita a popis odběrového místa (odběrových míst) sedimentu a vody, pokud možno včetně dřívější kontaminace;
- všechny informace týkající se odběru, případného skladování a aklimatizace systému voda-sediment;
- charakteristiky vzorků systému voda-sediment, jak jsou uvedeny v tabulce v oddílu 1.8.2.2.

Zkušební podmínky:

- použitý zkušební systém (např. průtokový systém, biometrický systém, způsob provzdušňování, způsob míchání, objem vody, hmotnost sedimentu, tloušťka vrstvy vody i sedimentu, rozměry zkušebních nádob atd.);
- aplikace zkoušené látky do systému: použitá zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a kontrol, způsob aplikace zkoušené látky (např. případné použití rozpouštědla) atd.
- inkubační teplota;
- doby odběru;
- metody extrakce a účinnosti extrakce, analytické metody a meze detekce;
- metody charakterizace/identifikace transformačních produktů;
- odchylky od zkušebního postupu nebo zkušebních podmínek.

Výsledky:

- původní číselná data reprezentativních analýz (všechna původní data musí být uložena v archivu vedeném podle zásad správné laboratorní praxe);
- opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod;
- hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1);
- výsledky pro zkoušenou látku, popřípadě i pro transformační produkty a neextrahovatelnou radioaktivitu, zpracované v tabulkové formě a vyjádřené v % aplikované dávky a v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro vodu, sediment a celý systém (pouze v %);
- látková bilance během studií na jejich konci;
- grafické schéma transformace ve vodě a sedimentu a v celém systému (včetně mineralizace);
- rychlosti mineralizace;

- poločas, hodnoty DT_{50} a popřípadě DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty, včetně intervalů spolehlivosti, pro vodu, sediment a celý systém;
- charakteristika kinetiky transformace zkoušené látky, popřípadě i hlavních transformačních produktů;
- případný návrh způsobu transformace;
- diskuse o výsledcích.

XXIV.4. LITERATURA

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. 35 – 37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162 – 3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Vyd. Dr. Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18. – 20. ledna 1995.
- (8) ISO 5667-12. (1995). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments, Technical Committee ISO/TC 146/SC 6.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem.* 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (přijato 12. května 1981).

- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C., Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149 – 158.
- (15) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry. Vyd. D. H. Hutson, T. R. Roberts, J. Wiley & Sons, Vol. 1, 85 – 114.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631 – 637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661 – 667.
- (18) Black, C. A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17. vyd.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D. L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chem.* 44, 1038 – 1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3. – 4. června 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop „On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA)“, 8. – 10. listopadu 1993. Vyd. I. R. Hill, P. Matthiessen, F. Heimbach.
- (24) Vink, J. P. M., van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858 – 2868.
- (25) Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S. E. A. T. M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329 – 338.
- (26) Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197 – 203.

- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- (28) Beelen, P. Van, F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13 – 21.
- (29) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850 – 857.
- (30) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere*, 19, 1527 – 1550.
- (31) Pagga, U., Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499 – 1509.
- (32) Nuck, B. A., Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597 – 3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller, Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961 – 968.
- (35) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187 – 203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47 – 60.
- (37) Carlton, R.R., Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349 – 1354.

DODATEK 1

POKYNY K AEROBNÍM A ANAEROBNÍM ZKUŠEBNÍM SYSTÉMŮM

Aerobní zkušební systém

Aerobní zkušební systém popsáný v této zkušební metodě se skládá z aerobní vodní vrstvy (typická koncentrace kyslíku v rozmezí od 7 do 10 mg·l⁻¹) a vrstvy sedimentu, která je na povrchu aerobní a pod povrchem anaerobní (typické průměrné oxidačně-redukční potenciály (E_h) v anaerobní zóně sedimentu jsou v rozmezí -80 až -190 mV). Nad vodní hladinu v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený vzduch, aby se v prostoru pod víčkem udržovala dostatečná koncentrace kyslíku.

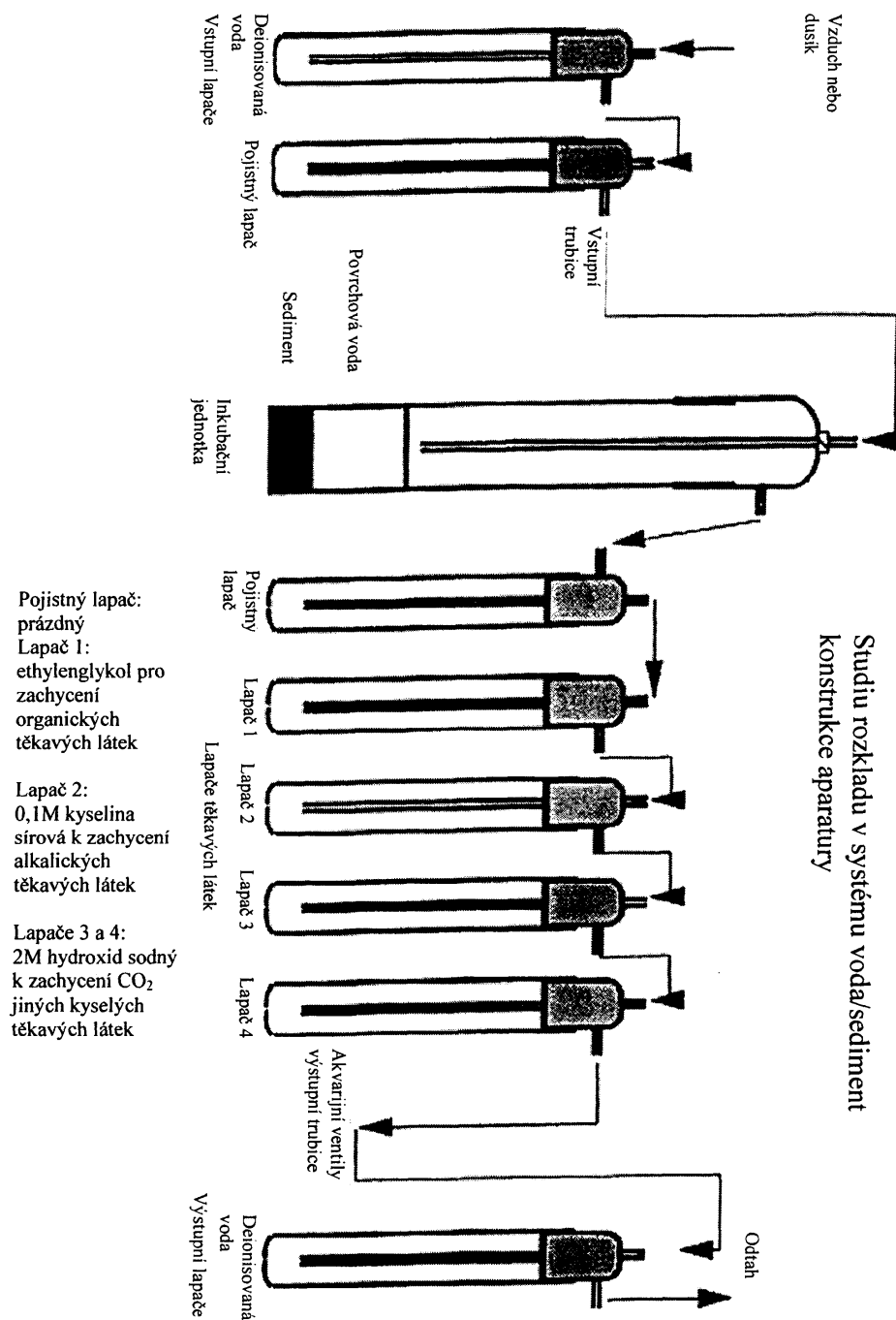
Anaerobní zkušební systém

Pro anaerobní zkušební systém je zkušební postup v podstatě tentýž, jako postup popsáný pro aerobní systém, liší se však tím, že nad hladinu vody v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený dusík, aby se udržovala jeho koncentrace v prostoru pod víčkem. Sediment a voda jsou považovány za anaerobní, pokud je oxidačně-redukční potenciál (E_h) nižší -100 mV.

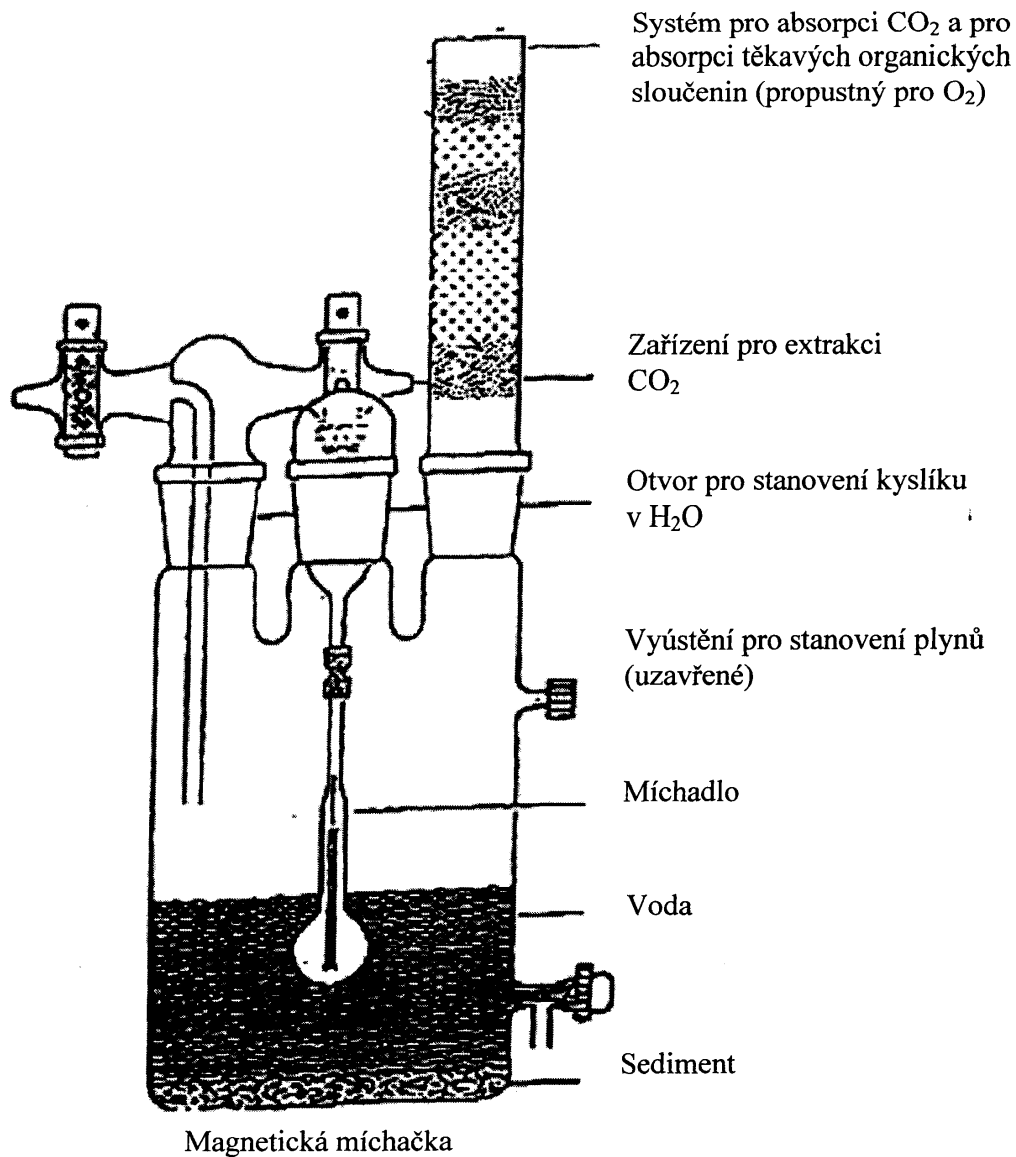
V anaerobní zkoušce se mineralizace posuzuje na základě měření uvolněného oxidu uhličitého a methanu.

DODATEK 2

PŘÍKLAD SKLENĚNÉ PRŮTOKOVÉ APARATURY



DODATEK 3
PŘÍKLAD BIOMETRICKÉ APARATURY



DODATEK 4**PŘÍKLAD VÝPOČTU DÁVKY APLIKOVANÉ DO ZKUŠEBNÍCH NÁDOB**

Vnitřní průměr válce:	= 8 cm
Výška vodního sloupce bez sedimentu:	= 12 cm
Plocha hladiny: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Dávkování: 500 g zkoušené látky na ha odpovídá 5 µg/cm ²	
Celkové množství v µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Přepočet celkového množství na hloubku 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Objem vodního sloupce: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrace ve vodě: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml nebo 50 µg/l ^{cc} .

5. V příloze č. 2 se část II. zrušuje a zároveň se zrušuje označení části I.

Čl. II
Účinnost

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 8. října 2005.

Ministr:

RNDr. Ambrozek v. r.



ISSN 1211-1244

Vydává a tiskne: Tiskárna Ministerstva vnitra, p. o., Bartůňkova 4, pošt. schr. 10, 149 01 Praha 415, telefon: 272 927 011, fax: 974 887 395 – **Redakce:** Ministerstvo vnitra, Nad Štolou 3, pošt. schr. 21/SB, 170 34 Praha 7-Holešovice, telefon: 974 832 341 a 974 833 502, fax: 974 833 502 – **Administrace:** písemné objednávky předplatného, změny adres a počtu odebíraných výtisků – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, fax: 519 321 417, e-mail: sbirky@moraviapress.cz. Objednávky ve Slovenské republice přijímá a titul distribuuje Magnet-Press Slovakia, s. r. o., Teslova 12, 821 02 Bratislava, tel.: 00421 2 44 45 46 28, fax: 00421 2 44 45 46 27. **Roční předplatné** se stanovuje za dodávku kompletního ročníku včetně rejstříku a je od předplatitelů vybíráno formou záloh ve výši oznámené ve Sbírce zákonů. Závěrečné vyúčtování se provádí po dodání kompletního ročníku na základě počtu skutečně vydaných částek (první záloha na rok 2005 činí 3000,- Kč, druhá záloha na rok 2005 činí 3000,- Kč) – Vychází podle potřeby – **Distribuce:** MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, celoroční předplatné – 516 205 176, 519 305 176, 516 205 174, 519 205 174, objednávky jednotlivých částek (dobírky) – 516 205 207, 519 305 207, objednávky-knihkupci – 516 205 161, 519 305 161, faxové objednávky – 519 321 417, e-mail – sbirky@moraviapress.cz, zelená linka – 800 100 314. **Internetová prodejna:** www.sbirkyzakonu.cz – **Drobný prodej** – Benešov: Oldřich HAAGER, Masarykovo nám. 231; Brno: Ing. Jiří Hrazdil, Vranovská 16, SEVT, a. s., Česká 14; Břeclav: Prodejna tiskovin, 17. listopadu 410, tel.: 519 322 132, fax: 519 370 036; České Budějovice: SEVT, a. s., Česká 3, tel.: 387 432 244; Hradec Králové: TECHNOR, Wonkova 432; Cheb: EFREX, s. r. o., Karlova 31; Chomutov: DDD Knihkupectví – Antikvariát, Ruská 85; Kadaň: Knihařství – Přibíková, J. Švermy 14; Kladno: eL VaN, Ke Stadionu 1953; Klatovy: Krameriovo knihkupectví, nám. Míru 169; Liberec: Podještědské knihkupectví, Moskevská 28; Litoměřice: Jaroslav Tvrdík, Lidická 69, tel.: 416 732 135, fax: 416 734 875; Most: Knihkupectví „U Knihomila“, Ing. Romana Kopková, Moskevská 1999; Olomouc: ANAG, spol. s r. o., Denisova č. 2, Zdeněk Chumchal – Knihkupectví Tycho, Ostružnická 3, Knihkupectví SEVT, a. s., Ostružnická 10; Ostrava: LIBREX, Nádražní 14, Profesio, Hollarova 14, SEVT, a. s., Nádražní 29; Ostrokovice: Ing. Kučeřík, Jungmannova 1165; Pardubice: LEJHANEK, s. r. o., třída Míru 65; Plzeň: TYPOS, a. s. Úslavská 2, EDICUM, Vojanova 45, Technické normy, Lábkova pav. č. 5, Vydavatelství a naklad. Aleš Čeněk, nám. Českých bratří 8; Praha 1: Dům učebnic a knih Černá Labuť, Na Poříčí 25, FIŠER-KLEMEN-TINUM, Karlova 1, LINDE Praha, a. s., Opletalova 35, NEOLUXOR s. r. o., Václavské nám. 41; Praha 2: ANAG, spol. s r. o., nám. Míru 9 (Národní dům), SEVT a. s., Slezská 126/6; Praha 4: SEVT, a. s., Jihlavská 405; Praha 5: SEVT, a. s., E. Peškové 14; Praha 6: PPP – Staňková Isabela, Puškinovo nám. 17; Praha 7: MONITOR CZ, s. r. o., V háji 6, tel.: 272 735 797; Praha 8: JASIPA, Zenklova 60, Specializovaná prodejna Sbírky zákonů, Sokolovská 35, tel.: 224 813 548; Praha 9: Abonentní tiskový servis-Ing. Urban, Jablonecká 362, po-pá 7-12 hod., tel.: 286 888 382, e-mail: tiskovy.servis@abonent.cz; Praha 10: BMSS START, s. r. o., Vinohradská 190; Přerov: Odborné knihkupectví, Bartošova 9, Jana Honková – YAHOO – i – centrum, Komenského 38; Sokolov: KAMA, Kalousek Milan, K. H. Borovského 22, tel.: 352 303 402; Šumperk: Knihkupectví D & G, Hlavní tř. 23; Tábor: Milada Šimonová – EMU, Budějovická 928; Teplice: Knihkupectví L & N, Masarykova 15; Trutnov: Galerie ALFA, Bulharská 58; Ústí nad Labem: Severočeská distribuční, s. r. o., Havířská 327, tel.: 475 259 032, fax: 475 259 029, Kartoony, s. r. o., Solvayova 1597/3, Vazby a doplňování Sbírek zákonů včetně dopravy zdarma, tel.+fax: 475 501 773, www.kartoon.cz, e-mail: kartoon@kartoon.cz; Zábřeh: Mgr. Ivana Patková, Žižkova 45; Zatec: Prodejna U Pivovaru, Žižkovo nám. 76, Jindřich Procházka, Bezděkov 89 – Vazby Sbírek, tel.: 415 712 904. **Distribuční podmínky předplatného:** jednotlivé částky jsou expedovány neprodleně po dodání z tiskárny. Objednávky nového předplatného jsou vyřizovány do 15 dnů a pravidelné dodávky jsou zahajovány od nejbližší částky po ověření úhrady předplatného nebo jeho zálohy. Částky vyšlé v době od zaevidování předplatného do jeho úhrady jsou doposílány jednorázově. Změny adres a počtu odebíraných výtisků jsou prováděny do 15 dnů. **Reklama:** informace na tel. číslech 516 205 207, 519 305 207. V písemném styku vždy uvádějte IČO (právnícká osoba), rodné číslo (fyzická osoba). **Podávání novinových zásilek** povoleno Českou poštou, s. p., Odštěpný závod Jižní Morava Ředitelství v Brně č. j. P/2-4463/95 ze dne 8. 11. 1995.