



# STANOVENÍ FYTOTOXICITY KOMPOSTŮ – INHIBICE RŮSTU, KLÍČIVOST A INDEX KLÍČIVOSTI ŘEŘICHY SETÉ (*LEPIDIDIUM SATIVUM*)

Tomáš Bouda, Martina Formánková  
ALS Czech Republic, s.r.o.

Geochemistry

Metallurgy

Mine Site

Inspection

Coal

Oil & Gas

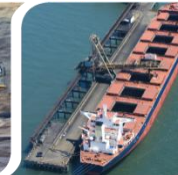
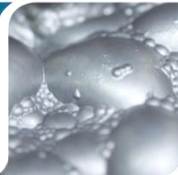
Asset Care

Tribology

Environmental

Food &

Pharmaceutical





## Legislativa kompostovacího procesu

- Malá zařízení, kompostárny a další zařízení s procesem kompostování se řídí § 33 zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a vyhláškou č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady.
- Komunitní kompostování dle zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů v § 10a.



# Komunitní kompostování

- **Obec** může ve své samostatné působnosti, jako opatření pro předcházení vzniku odpadů, stanovit obecně závaznou vyhláškou obce systém komunitního kompostování.
- **Komunitní kompostování** je systém sběru a shromažďování rostlinných zbytků z údržby zeleně a zahrad na území obce, jejich úprava a následné zpracování na **zelený kompost**.
- Kompostovací proces musí být řízen tak, aby byl zajištěn aerobní mikrobiální rozklad organické hmoty bez vzniku zápachu a bez emisí methanu.



# Kompostování

- Kompostování je aerobní exotermní mikrobiologická přeměna biologicky rozložitelných materiálů na látky bohaté na obsah živin a humusu.
- Z důvodu ochrany životního prostředí je nutné využívat „nejlepší technologii kompostování“.
- Pro zajištění optimálního průběhu kompostovacího procesu je nutné monitorovat určité mikrobiologické, fyzikálně-chemické a chemické vlastnosti kompostu. (např. zjištění zralosti kompostu, samozahřívání, ...)



# Kompostování

- **Toxicita kompostu** souvisí s přítomností mnoha faktorů pracujících dohromady (substrát, kyslík, mikrobiální populace, teplota, stupeň přeměny, apod.).
- V nevyzrálém kompostu se také nachází **fytotoxické sloučeniny** (rozpustné formy těžkých kovů, amonné sloučeniny, nadměrná akumulace solí a organických kyselin), které snižují klíčivost a růst rostlin.
- Tyto fytotoxické sloučeniny mohou způsobit **kumulativní toxický účinek** materiálu.

# Řeřichový test fytotoxicity

- Řeřichový test slouží k vyhodnocení intenzity rozkladu organických surovin a zralosti výsledného kompostu.
- Biologická metoda hodnocení fytotoxicity výluhu vzorku indexem klíčivosti řeřichy seté v prostředí vodního výluhu kompostu.





# Řeřichový test fytotoxicity

- Řeřichový test eliminuje chyby vznikající při zjišťování stability finálního produktu kompostování pouze pomocí teploty.
- Hodnota **fytoxicity** je přímým odrazem obsahu toxických meziproduktů, vznikajících při aerobním rozkladu organických látek.
- Umožňuje kvalitativní ohodnocení intenzity rozkladu. **Ukazatelem zralého kompostu je nepřítomnost fytotoxinů (IK [Index klíčivosti] = 100 %).**



# Řeřichový test fytotoxicity

V České republice se řeřichový test toxicity provádí podle příručky P. Plívy a kol.:

P. Plíva a kol. (2006): ***Příručka: Zakládání, průběh a řízení kompostovacího procesu. Kap. 2.4.3. Test fytotoxicity (Řeřichový test).*** VUZT Praha, ISBN 80-86884-11-2, 65 s.

resp. podle metodicky Kv. Hájkové a kol.:

Kv. Hájková a kol. (2007): ***Metodická pomůcka: Kompostování přebytečné travní biomasy. Příloha č. 5: Řeřichový test fytotoxicity.*** ZERA Náměšť nad Oslavou, ISBN 80-903548-6-6, 80 s.



# Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.



## Příprava vodného výluhu:

Do 500mL Erlenmayerovy baňky se naváží **10 g** zkoumaného zhomogenizovaného vzorku a pak se přidá vypočtené množství destilované vody (mL), které je určeno jako násobek sušiny ve vzorku (**5 - 10 x % sušiny**).

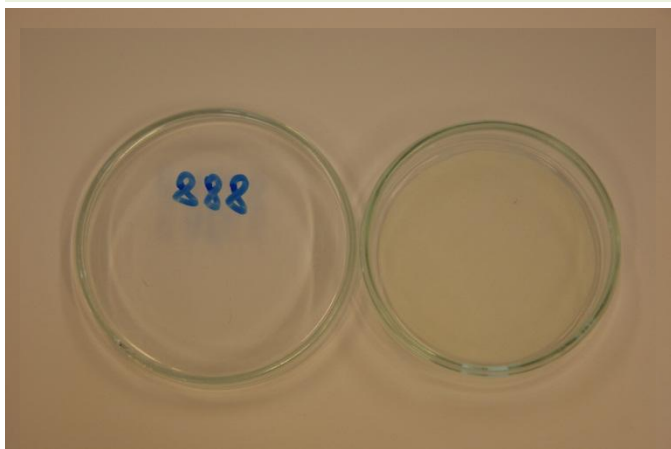
Nádoba se zazátkuje a vloží do horizontální třepačky a vzorek vyluhuje destilovanou vodou cca **2 hod.**

Pak se výluh filtruje přes filtrační papír do kádinky.

# Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.



**Vlastní test:** Do Petriho misek o průměru 5 cm se vloží filtrační papír, který pokryje dno misky, a ovlhčí se **1 mL výluhu**.



Na takto připravený filtrační papír se pravidelně rozmístí **8 semen řeřichy seté**. Pro každý vzorek je potřeba použít paralelně alespoň 10 Petriho misek s 8 semeny (celkem se tedy testuje 80 semen).

Připravené a uzavřené Petriho misky se vloží do termostatu, kde semena klíčí **24 hod, za tmy při teplotě 28 °C**. Ke vzorkům v termostatu se také vloží kontrolní vzorek pouze s destilovanou vodou (též 10 paralelních stanovení po 8 semenech).

# Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.



## Výpočet indexu klíčivosti IK:

$$IK(\%) = 100 \cdot \frac{k_v \cdot l_v}{k_k \cdot l_k}$$

$k_v$  – klíčivost vzorku (%)

$k_k$  – klíčivost kontroly (%)

$l_v$  – průměrná délka kořínků vzorku (mm)

$l_k$  – průměrná délka kořínků kontroly (mm)



# Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.

## Hodnocení indexu klíčivosti:

Index klíčivosti IK, vyjádřený v procentech kontroly (kterou je destilovaná voda), **při hodnotách do 50 %** představuje nepoužitelnost kompostu k přímé aplikaci, **od 60 % do 80 %** dává možnost aplikace s určitým rizikem poškození citlivých rostlin, **při hodnotách 80 % a vyšších** deklaruje zralý kompost.

Je-li index klíčivosti mezi 60 – 80 %, lze říci, že je kompost ve fázi přeměny a má nejlepší hnojivý účinek. Nad 80 % tento účinek klesá a vliv humusu je silnější, tzn. že živiny jsou více vázány. Uvolňování dusíku a fosforu je pomalejší a nedochází k vyplavování živin do spodních vod. Uvedené údaje jsou zpracovány v **Tab. 1**. V **Tab. 2** jsou uvedeny příklady využitelnosti kompostu na základě zjištěného indexu klíčivosti IK.



# Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.

**Tab. 1: Zralost kompostu dle hodnoty indexu klíčivosti IK (interpretace indexu klíčivosti)**

<b>IK (%)</b>	<b>Typ (zralost) kompostu</b>
<b>&gt; 100 %</b>	<b>schopnost stimulačních účinků</b>
<b>80 – 100 %</b>	<b>dobře zralý kompost</b>
<b>60 – 80 %</b>	<b>částečně zralý kompost</b>
<b>&lt; 60 %</b>	<b>nezralý kompost</b>



## Řeřichový test fytotoxicity dle P. Plívy a kol. resp. podle Kv. Hájkové a kol.

**Tab. 2: Použitelnost kompostu dle hodnoty indexu klíčivosti IK**

<b>Třída</b>	<b>IK (%)</b>	<b>Využitelnost kompostu</b>
<b>I.</b>	<b>&gt; 100 %</b>	<b>substráty pro zahradnictví, květinářství</b>
<b>II.</b>	<b>80 – 100 %</b>	<b>aplikace před setím</b>
<b>III.</b>	<b>60 – 80 %</b>	<b>předjarní aplikace, rekultivace do pařenišť, pro pěstování hub</b>
<b>IV.</b>	<b>&lt; 50 %</b>	<b>aplikace riskantní - neekonomická</b>

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



V laboratořích ALS Czech Republic, s.r.o. jsme zavedli řeřichový test fytotoxicity v r. 2012 na základě požadavku našich klientů v Portugalsku, kteří požadovali jeho stanovení podle prací **Zucconiho a spol.:**

Zucconi F., Forte M., Monaco A. and de Bertoldi M.(1981): *Biological evaluation of compost maturity*. BioCycle, **22**(4), p. 27-29.

Zucconi F., Forte M., Pera A. and de Bertoldi M. (1981): *Evaluating toxicity of immature compost*. BioCycle, **22**(4), p. 54-57.

Zadání bylo poměrně nejasné, za zralý kompost je dle portugalské legislativy považován kompost s indexem klíčivosti **GI (*germination index*)** větším než 60 %.

Test fytotoxicity na řeřiše seté je nejoblíbenější test klíčivosti. Kompost je netoxický, když je jeho klíčivost větší než 85 % nebo když hmotnosti rostlinných sazenic jsou větší než 90 %. Kromě toho bylo zjištěno, že **index klíčivosti v každé době kompostování nevykazuje žádné významné změny na naředění extraktu, a to až do 75% naředění destilovanou vodou.** Bylo též zjištěno, že amoniak a nízkomolekulární organické kyseliny jsou dvě fytotoxické látky, po jejichž „zmizení“ se zvýší růst rostlin. Když je **GI** vyšší než 80 %, lze považovat kompost za zralý a prakticky bez obsahu fytotoxických látek.

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Odběr a uchování vzorků:

Z důvodu nestálosti jsou vzorky kompostů od odběru do zahájení zpracování uloženy v chladicích boxech. Testování je započato co nejdříve po odběru, nejlépe do 24 hodin. Není-li to možné, jsou vzorky uloženy **v těsně uzavřených vzorkovnicích, v temnu a chladu.** Testování hotových výluhů je započato nejlépe v den jejich přípravy, jinak jsou uchovávány v lednici při **5 až 8 °C**. Před použitím se nechají vytemperovat na laboratorní teplotu.



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Příprava vodného výluhu:

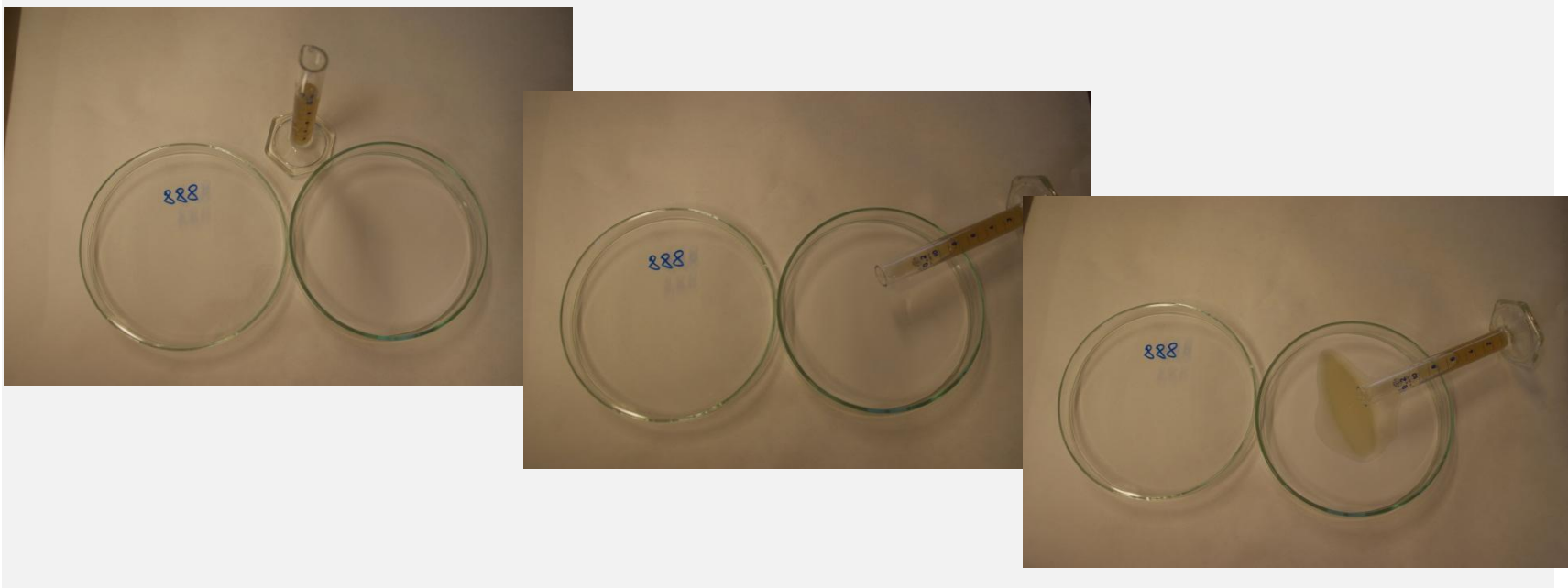
- Reprezentativní vzorek kompostu je síťován přes síto s velikostí ok **10 mm**. Pak je stanoven v dílčím vzorku kompostu obsah **sušiny při 105 °C**.
- Množství vody potřebné pro přípravu 1 litru výluhu se vypočítá z údaje o obsahu vody (sušiny) ve vzorku. Výsledný poměr mezi pevnou a přidanou kapalnou fází směsi je **1 : 10** (vztaženo na sušinu vzorku).
- Směs je ve vhodné vzorkovnici třepána na rotační třepačce **po dobu 1 hodiny**, poté centrifugována (8 min, 4000 – 5000 ot./min) a přefiltrována (filtrační papír o velikosti pórů 5  $\mu\text{m}$ ).

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Provedení řeřichového testu fytotoxicity:

Na filtrační papír, který je vložen na dno Petriho misky, se nalije 10 mL výluhu kompostu.



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.

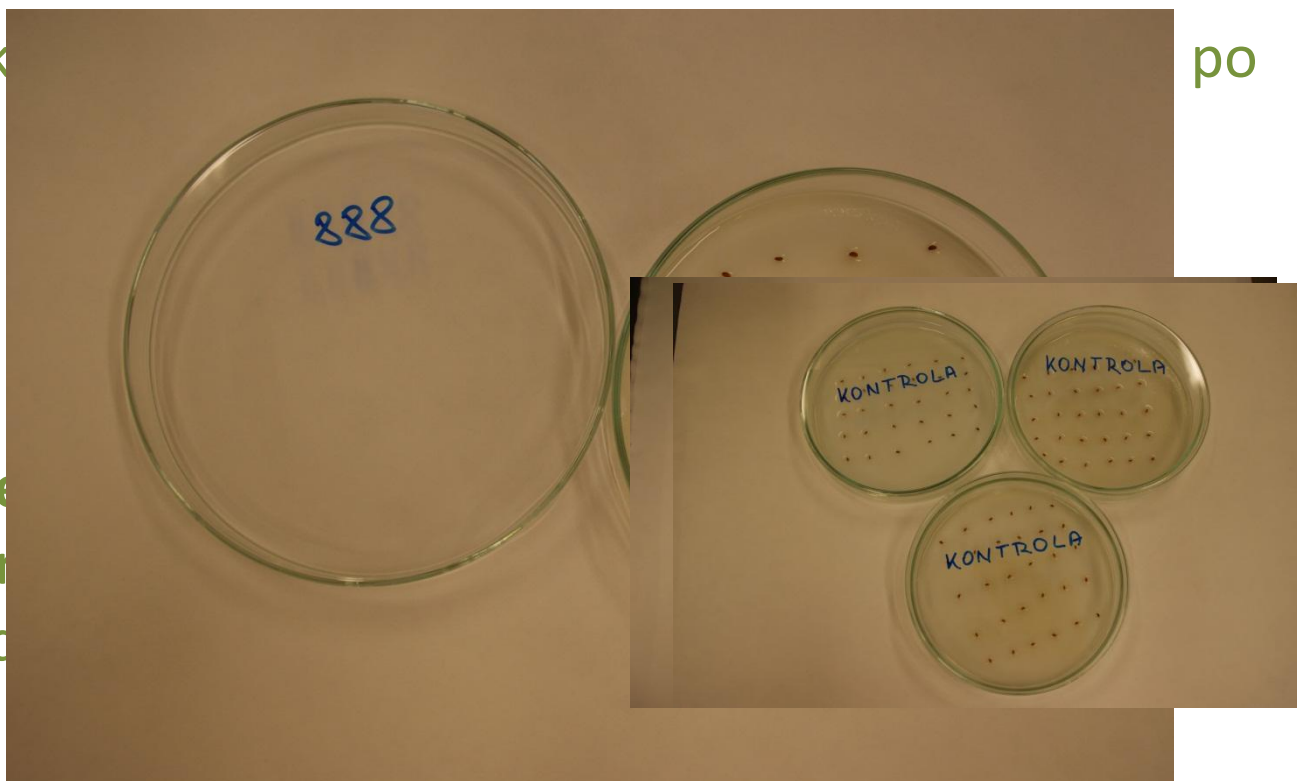


Na filtračním papíru rovnoměrně rozmístíme 30 semen řeřichy seté.

Každý vzorek 30 semenech,

po

Současně se stanoví pro představuje de Kontrolní vzor stejných pod kompostu.



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



Petriho misky se semeny řeřichy seté se umístí do termostatu na dobu **48 hod (při 27 °C)** a **bez přístupu světla**.

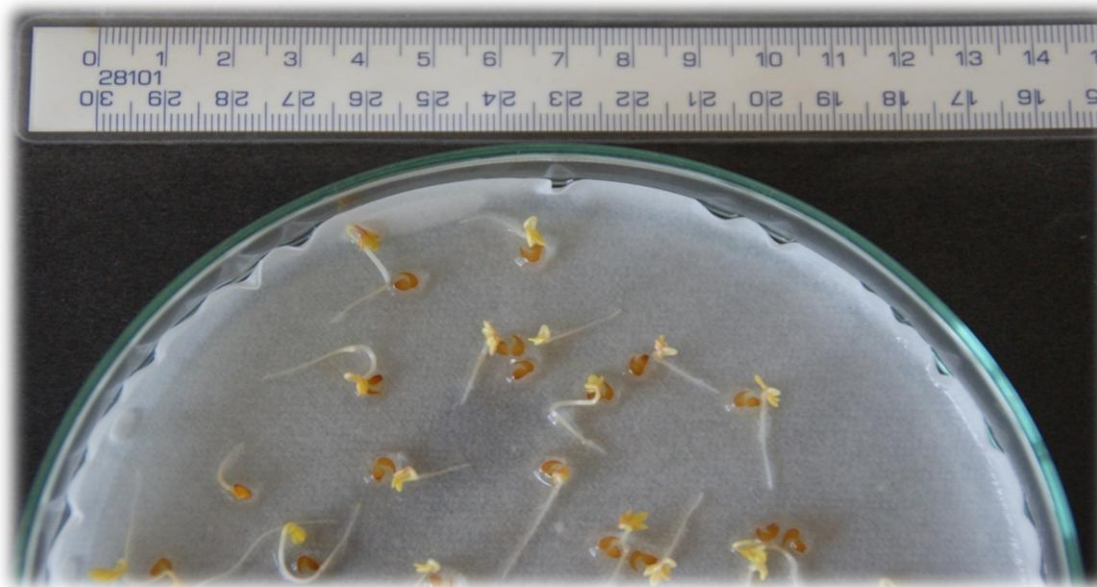


# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Vyhodnocení testu:

Po uplynutí doby expozice je stanoven **počet nevyklíčených semen**, manuálně jsou změřeny a zaznamenány **délky jednotlivých kořenů**



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Vyhodnocované parametry:

**G (%)** - *germination*, klíčivost

**L (%)** - *elongation*, nárůst průměrné délky kořenů

**GI (%)** - *germination index*, index klíčivosti IK

**I (%)** - inhibice růstu kořene

## Výpočty:

$$G(\%) = 100 \cdot \frac{N_v}{N_k}$$

**$N_v$**  - Počet vyklíčených semen v testovaném výluhu

**$N_k$**  - Počet vyklíčených semen v kontrolním vzorku

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Vyhodnocované parametry:

**G (%)** - *germination*, klíčivost

**L (%)** - *elongation*, nárůst průměrné délky kořenů

**GI (%)** - *germination index*, index klíčivosti IK

**I (%)** - inhibice růstu kořene

## Výpočty:

$$L(\%) = 100 \cdot \frac{\overline{L}_v}{\overline{L}_k} = 100 - I(\%)$$

$\overline{L}_v$  - Průměrná délka kořene v testovaném výluhu

$\overline{L}_k$  - Průměrná délka kořene v kontrolním vzorku

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Vyhodnocované parametry:

G (%) - *germination*, klíčivost

L (%) - *elongation*, nárůst průměrné délky kořenů

GI (%) - *germination index*, index klíčivosti IK

I (%) - inhibice růstu kořene

## Výpočty:

$$GI(\%) = \frac{G(\%) \cdot L(\%)}{100}$$



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



## Vyhodnocované parametry:

G (%) - *germination*, klíčivost

L (%) - *elongation*, nárůst průměrné délky kořenů

GI (%) - *germination index*, index klíčivosti IK

I (%) - **inhibice růstu kořene**

## Výpočty:

$$I(\%) = 100 \cdot \frac{\overline{L}_k - \overline{L}_v}{\overline{L}_k} = 100 - L(\%)$$

$\overline{L}_v$  - **Průměrná délka kořene v testovaném výluhu**

$\overline{L}_k$  - **Průměrná délka kořene v kontrolním vzorku**

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Platnost testu:

Výsledky testů se považují za platné, jestliže jsou splněny následující požadavky:

- 1) Klíčivost semen v kontrolním vzorku je nejméně 90 %.
- 2) Výsledek kontrolního týdenního testu na standardní látce  $K_2Cr_2O_7$  o koncentraci 50 mg/L je v aktuálních regulačních mezích

## Procesní řízení kvality spočívá v:

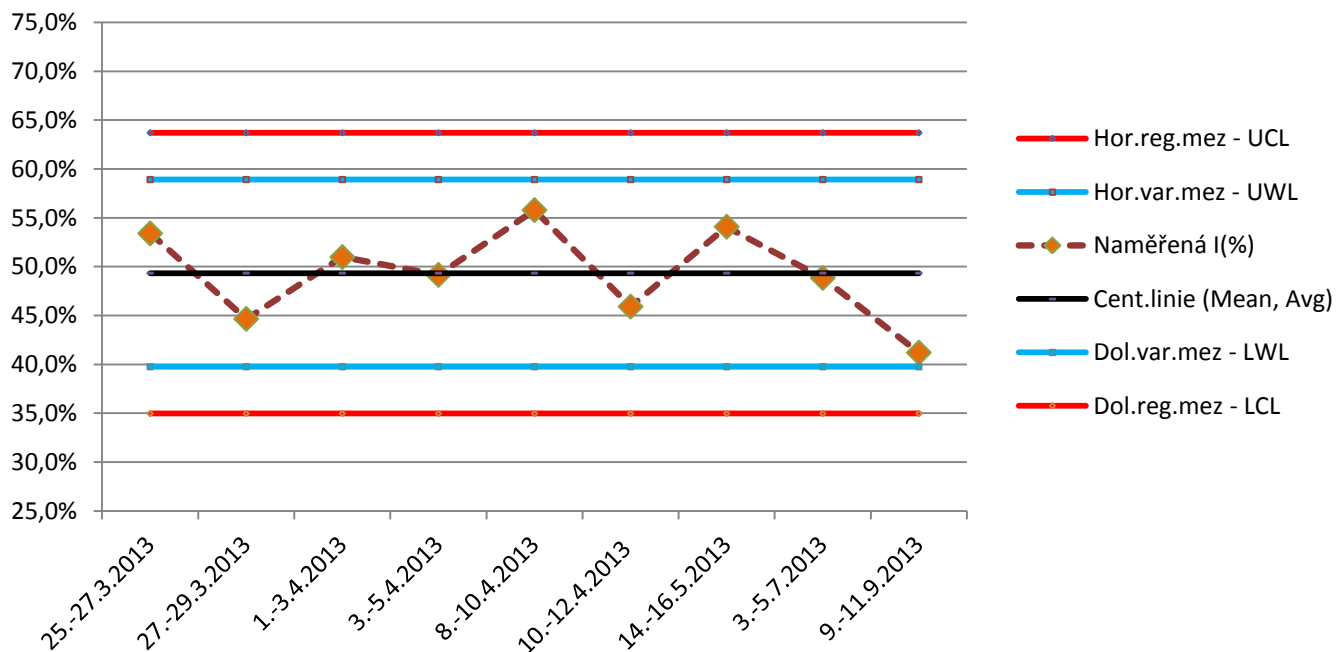
- 1) Kontrolování a dodržování podmínek platnosti testů.
- 2) Provádění kontrolních testů na standardní látce  $K_2Cr_2O_7$  o koncentraci 50 mg/L s každou analytickou várkou, maximálně však 1x týdně. Kontrolní test fytotoxicity na řeřiše seté se provádí za stejných podmínek a vyhodnocuje stejným způsobem jako v případě reálného vzorku. *Hodnota inhibice růstu kořene v této standardní látce I je rovna 50 %; horní varovná mez je 59 % dolní varovná mez je 41 %, horní regulační mez je 63 % a dolní regulační mez je 36 %.*
- 3) Provádění analýz duplicitních vzorků výluhů nejméně 2x za rok.

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Ukázka regulačního diagramu

Regulační diagram Inhibice růstu I [%] kořene *Lepidium Sativum* v roztoku  $K_2Cr_2O_7$  o koncentraci 50 mg/L



# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Nejistoty stanovení:

- Nejistota stanovení inhibice růstu kořene řeřichy seté je obdobná nejistotám stanovení inhibice na podobném rostlinném organismu hořčici bílé (*Sinapis alba*), a pohybuje se na úrovni nižších desítek procent.
- Experimentálně stanovená rozšířená relativní nejistota inhibice růstu kořene řeřichy seté v roztoku dichromanu draselného  $K_2Cr_2O_7$  o koncentraci 50 mg/L je 20 % (viz předchozí RD).
- V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky duplicitních analýz 7 7 reálných vzorků kompostu včetně vyhodnocení nejistot měření jednotlivých parametrů G, L, I a GI.

## Hodnocení fytotoxicity

Pro hodnocení fytotoxicity kompostů na základě **Indexu klíčivosti GI** se používá místní legislativa, nebo je možno použít též hodnocení uvedená dříve v **Tab. 1** a v **Tab. 2**.

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Nejistoty stanovení klíčivosti G(%)

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky duplicitního stanovení klíčivosti **G** v 7 reálných vzorcích:

Vzorek (ID)	G [%]	G [%]- dupl. vz.	R [%-rel.]	NM [% rel.]
7341-1	92.1	93.3	1.2%	<b>2.9%</b>
7661-1	101.1	101.1	0.0%	<b>2.0%</b>
7361-1	101.1	98.9	2.2%	<b>4.5%</b>
39833	100	96.7	3.4%	<b>6.3%</b>
8443-1	98.9	98.9	0.0%	<b>2.0%</b>
9070-1	101.1	100.0	1.1%	<b>2.8%</b>
9275-1	101.1	101.1	0.0%	<b>2.0%</b>
<b>Průměr</b>			<b>1.1%</b>	<b>3.2%</b>

**R** je relativní rozpětí, **NM** je odhad rozšířené nejistoty stanovení klíčivosti **G** v relativních procentech. **NM** klíčivosti **G** se pohybuje v rozmezí **2 – 6 %**. Pokud je však klíčivost **G** nižší než cca 15 %, je hodnota **NM** vyšší než 20 %.

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Nejistoty stanovení nárůstu průměrné délky kořene L(%)

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky duplicitního stanovení nárůstu průměrné délky kořene L v 7 reálných vzorcích:

Vzorek (ID)	L [%]	L [%]- dupl. vz.	R [%-rel.]	NM [% rel.]
7341-1	16.2	17.6	8.3%	<b>18%</b>
7661-1	173.4	173.1	0.2%	<b>10%</b>
7361-1	193.6	186.4	3.8%	<b>12%</b>
39833	260.0	254.0	2.3%	<b>11%</b>
8443-1	150.3	156.3	3.9%	<b>12%</b>
9070-1	109.9	107.3	2.4%	<b>11%</b>
9275-1	106.4	113.0	6.0%	<b>15%</b>
<b>Průměr</b>			<b>3.8%</b>	<b>12.6%</b>

**R** je relativní rozpětí, **NM** je odhad rozšířené nejistoty parametru **L** v relativních procentech. **NM** parametru **L** se pohybuje v rozmezí **10 – 20 %**. Čím je nižší hodnota L, tím je vyšší její NM.

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Nejistoty stanovení inhibice růstu kořene I(%)

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky duplicitního stanovení inhibice růstu kořene v 7 reálných vzorcích:

Vzorek (ID)	I [%]	I [%]- dupl. vz.	R [%-rel.]	NM [% rel.]
7341-1	83.8	82.4	1.7%	4%
7661-1	-73.4	-73.1	0.4%	24%
7361-1	-93.6	-86.4	8.0%	25%
39833	-160	-154	3.8%	18%
8443-1	-50.3	-56.3	11%	35%
9070-1	-9.9	-7.3	30%	137%
9275-1	-6.4	-13.0	68%	165%
<b>Průměr</b>			<b>18%</b>	<b>58%</b>

**R** je relativní rozpětí, **NM** je odhad rozšířené nejistoty inhibice růstu kořene **I** v relativních procentech. **NM** inhibice **I** se pohybuje v rozmezí **5 – 200 %**. Vysoké hodnoty **NM** jsou pro absolutní hodnotu inhibice **I** nižší než cca **15 %**, což ale platí pro ekotoxikologické testy obecně.

# Řeřichový test fytotoxicity - Kontrola kvality



## Nejistoty stanovení indexu klíčivosti GI(%)

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky duplicitního stanovení indexu klíčivosti v 7 reálných vzorcích:

Vzorek (ID)	GI [%]	GI [%]- dupl. vz.	R [%-rel.]	NM [% rel.]
7341-1	15	16	9.5%	<b>18%</b>
7661-1	175	175	0.2%	<b>10%</b>
7361-1	196	184	6.0%	<b>13%</b>
39833	260	246	5.7%	<b>13%</b>
8443-1	149	155	3.9%	<b>12%</b>
9070-1	111	107	3.5%	<b>11%</b>
9275-1	108	114	6.0%	<b>15%</b>
<b>Průměr</b>			<b>5.0%</b>	<b>13%</b>

**R** je relativní rozpětí, **NM** je odhad rozšířené nejistoty indexu klíčivosti **GI** v relativních procentech. **NM** indexu klíčivosti **GI** se pohybuje v rozmezí **10 – 25 %**. Vyšší hodnoty **NM** jsou pro absolutní hodnoty **GI** nižší než cca 15 %, z důvodu vyšších nejistot hodnot **L** a **G**.



# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



Metoda stanovení fytotoxicity na řeřiše seté umožňuje kvantitativní hodnocení kompostů z hlediska jejich vyzrálosti a fytotoxicity.

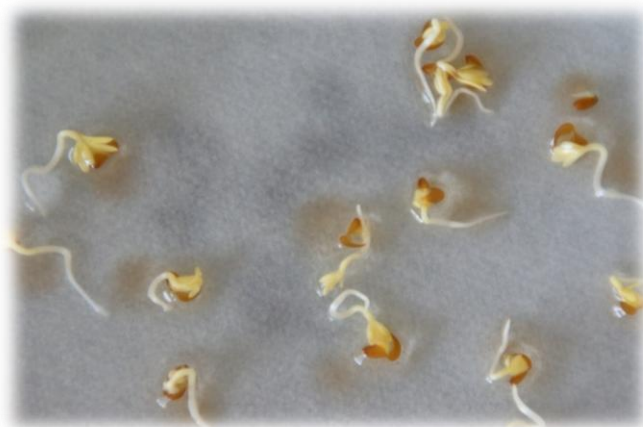
Testování fytotoxicity kompostů nebylo zatím normalizováno v rámci mezinárodních institucí, a proto firma **ALS Czech Republic, s.r.o.** zavedla metodiku požadovanou zahraničním klientem, která vycházela zejména z prací F. Zucconiho et al.

V rámci České republiky lze použít doporučené testy uvedené v příručce **VÚZT Praha** nebo v metodické pomůcce **ZERA**, zpracované s podporou Ministerstva zemědělství ČR.

# Řeřichový test fytotoxicity dle metodiky zavedené v ALS Czech Republic, s.r.o.



**Děkujeme za pozornost!**



## **Kontakty:**

**Tomáš Bouda – 602 144 727 / 487 828 500**

**[Tomas.Bouda@ALSglobal.com](mailto:Tomas.Bouda@ALSglobal.com)**

**Martina Formánková – 487 828 545**

**[Martina.Formankova@ALSglobal.com](mailto:Martina.Formankova@ALSglobal.com)**



# Děkujeme za pozornost



Geochemistry

Metallurgy

Mine Site

Inspection

Coal

Oil & Gas

Asset Care

Tribology

Environmental Pharmaceutical

