



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**POSOUZENÍ EKOTOXICKÉHO PŮSOBENÍ ROZTOKŮ
AKTIVOVANÝCH PLAZMATEM**

ASSESSMENT OF THE ECOTOXIC EFFECT OF PLASMA-ACTIVATED SOLUTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Mária Belisová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1361/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Mária Belisová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Posouzení ekotoxického působení roztoků aktivovaných plazmatem

Zadání diplomové práce:

1. Charakterizovat metody přípravy plazmatem aktivovaných roztoků a možnosti jejich využití se zaměřením na životní prostředí.
2. Z dostupných testů ekotoxicity zvolit vhodnou baterii testů k posouzení účinků těchto roztoků na organismy příslušných ekosystémů.
3. Na základě výsledků testů posoudit efekt takto ošetřených roztoků pro příslušné ekosystémy.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Mária Belisová
student(ka)

doc. MVDr. Helena Zlámalová
Gargošová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá posudzovaním ekotoxicity plazmou aktivovaných roztokov. V rámci experimentov boli pripravované rôzne plazmou aktivované roztoky. V prevažnej väčšine testov to bola plazmou aktivovaná kohútiková voda - PAW. V závislosti od testovacieho organizmu boli ďalej opracované riediace vody, a to konkrétne riediace vody pre organizmy *Thamnocephalus platyurus* a *Daphnia magna*. V tejto diplomovej práci bol posudzovaný ich ekotoxikologický účinok na vybraných testoch ekotoxicity v akvatickom prostredí, na vodnej rastline *Lemna minor*, na kôrovcoch *T. platyurus* a *D. magna* a poľnohospodárskych plodinách *Lactuca sativa* a *Allium cepa* L. V prípade kôrovcov ide o sladkovodné organizmy, na ktorých je možné rýchlo a pomerne jednoducho stanoviť mieru kontaminácie vody. Ďalej boli tieto opracované roztoky testované z hľadiska akútnej toxicity pre pôdne organizmy ekotoxikologickými testami v kontaktnom usporiadaní na dážd'ovke hnojnej *Eisenia fetida*, chvostoskokoch *Folsomia candida* a opäť na semienkach šalátu siateho *L. sativa*, tentokrát v kontaktnom terestrickom usporiadaní. Testy na organizmoch *T. platyurus* a *D. magna* boli vykonané aj v časových rozostupoch a bola pozorovaná zmena mortalít v závislosti na koncentrácii PAW. Ak to dovoľovali výsledky testov, boli spočítané hodnoty LC50, IC50, únikovosť A a NR. V prípade, kedy namerané a vypočítané hodnoty nedovoľovali takýto výpočet, bol posúdený celkový vplyv PAW na organizmy a v prípade testu inhibície rastu koreňa *L. sativa* bol vypočítaný významný rozdiel. Z konečných výsledkov vyplynulo, že PAW pôsobí na akvatické organizmy ekotoxicky, zatiaľ čo na terestrické má skôr prospešné účinky.

ABSTRACT

This master's thesis deals with ecotoxicity assessment of plasma-activated solutions. Various plasma-activated solutions were prepared in the experiments. In the vast majority of tests, it was plasma-activated tap water – PAW. Depending on the test organism, dilution water was further processed, namely dilution water for *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*. In this master's thesis the ecotoxicological effects were assessed through aquatic ecotoxicity tests with an aquatic plant *Lemna minor*, on a crustaceans *T. platyurus* and *D. magna* and on agricultural crops *Lactuca sativa* and *Allium cepa* L. . Crustaceans are fresh-water organisms on which the water contamination can be quickly and quite easily assessed. These plasma-activated solutions were also tested for acute ecotoxicity of soil organisms by ecotoxicological contact tests with *Eisenia fetida*, springtails *Folsomia candida* and seeds of *L. sativa*. Tests on *T. platyurus* and *D. magna* were performed in time intervals and a change in mortality was observed depending on PAW concentration. If the test results allowed, the LC50, IC50, A and NR escapism values were calculated. When the measured and calculated values did not allow such a calculation, the overall effect of PAW on organisms was assessed and a significant difference was calculated for the *L. sativa* root growth inhibition test. The final results showed that PAW has an ecotoxic effect on aquatic organisms, while it has rather beneficial effects on terrestrial organisms.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Plazmou aktivovaná voda, plazma, ekotoxicita, ekotoxikologické testy, životné prostredie

KEYWORDS

Plasma activated water, plasma, ecotoxicity, ecotoxicology tests, environment

BELISOVÁ, Mária. *Posouzení ekotoxického působení roztoků aktivovaných plazmatem*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115985>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a na komerčné účely môže byť využitá iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať vedúcej diplomovej práce pani doc. MVDr. Helene Zlámalovej Gargošovej, Ph.D. za cenné rady, ochotu, všestrannú pomoc a v neposlednom rade za trpezlivosť. Ďalej by som chcela poďakovať pani doc. Ing. Zdenke Kozákovej, Ph.D. za pomoc pri práci v plazmochemickom laboratóriu a za jej ochotu pri vyhodnocovaní nameraných dát.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Plazma	8
2.1.1	Elektrický výboj	8
2.2	Plazmou aktivovaná voda (PAW)	9
2.2.1	Metódy prípravy plazmou aktivovaných roztokov	10
2.2.2	Metódy charakterizácie PAW	13
2.2.3	Možnosti využitia plazmou aktivovaných roztokov	14
2.3	Ekotoxikológia a vybrané ekotoxikologické biotesty	17
	Testy ekotoxicity na zástupcoch akvatických organizmov	17
2.3.1	Test toxicity Thamnotoxkit F TM	17
2.3.2	Test inhibície rastu Žaburinky menšej (Lemna minor)	18
2.3.3	Test toxicity Daphtoxkit F TM	19
2.3.4	Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (Lactuca sativa)	20
2.3.5	Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej (Eisenia fetida)	21
2.3.6	Test únikového správania na chvostoskokoch (Folsomia candida)	21
2.3.7	Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (Allium cepa L.)	22
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Príprava vzoriek a ekotoxikologické biotesty	24
3.1.1	Testy ekotoxicity v akvatickom usporiadaní	25
3.1.1.1	Test toxicity Thamnotoxkit F TM	25
3.1.1.2	Test inhibície rastu Žaburinky menšej (Lemna minor)	26
3.1.1.3	Test toxicity Daphtoxkit F TM	27
3.1.1.4	Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (Allium cepa L.)	28
3.1.1.5	Test inhibície rastu koreňa Lactuca sativa (obdoba testu s Sinapis alba)	29
3.1.2	Testy ekotoxicity v terestrickom usporiadaní	30
3.1.2.1	Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (Lactuca sativa)	31
3.1.2.2	Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej (Eisenia fetida)	31
3.1.2.3	Test únikového správania na chvostoskokoch (Folsomia candida)	32
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	34
4.1	Test toxicity Thamnotoxkit F TM	34
4.2	Test inhibície rastu Žaburinky menšej (Lemna minor)	36

4.3	Test toxicity Daphtoxkit F TM	38
4.4	Test inhibície rastu koreňa <i>Lactuca sativa</i> (obdoba testu s <i>Sinapis alba</i>).....	39
4.5	Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (<i>Allium cepa</i> L.)	43
4.6	Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (<i>Lactuca sativa</i>).....	43
4.7	Test únikového správania na dážďovke hnojnej (<i>Eisenia fetida</i>).....	44
4.8	Test únikového správania na chvostoskokoch (<i>Folsomia candida</i>).....	45
5	ZÁVER	47
6	POUŽITÉ ZDROJE	48
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	51
	PRÍLOHA 1 PROBITOVÁ TABUĽKA [42]	53
	PRÍLOHA 2 Test na <i>L. sativa</i> – opracovaná riediaci voda (5 opakovaní)	54
	PRÍLOHA 3 Test na <i>L. sativa</i> – opracovaná kohútiková voda (5 opakovaní)	55

1 ÚVOD

Viac ako 99 % pozorovateľného vesmíru je tvorená plazmou. Viac ako 71 % našej planéty Zem je pokrytých vodou, kvapalinou. Aj napriek tomuto faktu je interakcia medzi oboma skupenstvami výnimočná a v prírode sa s ňou takmer vôbec nestretávame. Jej účinkami a potenciálnym využitím sa zaoberajú rôzne výskumné odvetia. Súčasné priemyselné využitie nachádza v chemických analýzach, spracovaní potravín, v nových spôsoboch ošetrovania rastlín ale aj v práci s biologickými materiálmi.

Výskumy a rôzne experimenty dokazujú, že plazmové opracovanie urýchľuje klíčenie a pomáha efektívnejšiemu rastu rastlín, čím sa stále viac rozvíja odvetie plazmového poľnohospodárstva. Podobne sa úspešne javí použitie plazmy na hojenie rán, liečbu kože, v zubnom lekárstve ale aj pri liečení rakoviny.

V rámci diplomovej práce bude posúdený účinok plazmou aktivovanej vody - PAW, na vybraných zástupcoch organizmov akvatických a terestrických ekosystémov. Pre tieto účely budú sledované efekty roztokov opracovaných pomocou tryskového systému (PAW) na vhodnej batérii testov ekotoxicity.

Účinok plazmou aktivovanej vody na životné prostredie môže byť pozitívny (v prípade, kedy chceme cielene zahubiť mikroorganizmy na povrchu rastlín alebo zdravotníckych pomôcok) alebo negatívny (použitie PAW môže toxicky vplývať na iné necieľové užitočné organizmy).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Plazma

Ak na ulici zastavíte človeka a spýtate sa ho, čo si predstaví pod pojmom plazma, vo väčšine prípadov je odpoveďou krv, medicína a iné asociácie. Iba málokto si tento pojem spája s fyzikou poprípade s fyzikálnou chémiou. A i napriek tomu, tak ako je krvná plazma neoddeliteľnou súčasťou krvi a život bez nej by pre nás nebol možný, je i nami uvažovaná fyzikálna plazma dôležitým prvkom existujúceho sveta.

Pod pojmom fyzikálna plazma myslíme súbor nabitých a neutrálnych častíc v rôznych kvantových stavoch, o ktorom platí, že jeho priestorový náboj je približne rovný nule (táto vlastnosť sa označuje ako kvazineutralita). Časticami sa v tejto definícii myslia nie len elementárne častice, ako sú napríklad elektróny ale aj ióny, neutrálne atómy a molekuly. Rozlišujeme plazma *izotermické*, pre ktoré platí, že všetky typy častíc majú rovnakú teplotu, a plazma *neizotermické*, v ktorom teplota elektrónov prevažuje nad teplotou ostatných typov častíc. Vznik oboch závisí predovšetkým na spôsobe, akým bola plazme dodávaná energia. Izotermicita býva zvyčajne spájaná s vysokou teplotou plazmy, nie je to však podmienkou. Platí však, že neizotermické plazma v prírode samovoľne zaniká, je teda potrebné udržiavať ho umelo.

Bežné chemické reakcie, ktorými sa zaoberá chémia, väčšinou prebiehajú za normálneho tlaku. Rovnako sa teploty pohybujú v nie príliš širokom rozmedzí. Toto obmedzenie klasickej chémie odstraňuje plazmová chémia, ktorá sa zaoberá reakciami vo veľkom rozmedzí tlakov a teplôt. Teploty sa môžu pohybovať rádovo od jednotiek až po desaťtisíce kelvinov. Podobne sa aj tlaky môžu pohybovať od ultravysokého vákua, vysokého až do atmosférického tlaku. Jedným z dôsledkov toho, že reaktanty sú už pred reakciou ionizované, je to, že sa reaktívnymi stávajú aj také látky, ktoré za normálnych podmienok nereagujú, ako napríklad inertné plyny [1,2].

2.1.1 Elektrický výboj

Výzkum a využitie plazmy má korene už v 19. storočí. Vďaka štúdiám Langmuira, Tonksa a ich spolupracovníkov v dvadsiatych rokoch 20. storočia sa významného pokroku dočkala diagnostika plazmy. Ich výzkum bol podnietený potrebou vyvinúť trubicu, ktorá by pri nízkom tlaku mohla viesť veľké prúdy a musela by byť naplnená ionizovaným plynom. Skúmali slabo ionizované tlejivé výboje a ich kladné stĺpce s typickými hodnotami $kT_{\text{elektronů}} \cong 2 \text{ eV}$ a koncentrácie z intervalu 10^{14} až 10^{18} m^{-3} . Takto bol objavený jav, stenová vrstva obklopujúca elektródu, ktorá je priamo vidieť ako tmava vrstva.

Elektrický výboj je jav vznikajúci pri prechode elektrického prúdu plynom. Podmienky vzniku výboja sú:

- existencia voľných nosičov náboja (elektrónov a iónov)
- elektrická energia dodávaná do plynu.

Výboje môžeme deliť na základe rôznych kritérií: dĺžky trvania, tlaku, typu budenia prípadne prítomnosťou ionizačného činidla.

Oblúkový výboj

Je to samostatný výboj medzi elektródami, charakteristický vysokými prúdmi a teplotami. Predstavuje izotermickú formu plazmy. Najčastejšie prebieha za atmosférického tlaku. Bežne sa používa na oblúkové zváranie kovov, tavenie a podobne.

Iskrový výboj

Je krátkodobý samostatný výboj, ktorý vzniká pri vysokom napätí medzi dvoma vodičmi za atmosférického tlaku a je sprevádzaný zvukovými a svetelnými efektmi. Iskra ma podobu jasno svietiacich kanálikov, v ktorých dochádza k ionizácii pri teplote až 30 000 K.

Koróna

Je to samostatný výboj, ktorý vzniká v silne nehomogénnom elektrickom poli okolo drôtov, hrán a hrotov s vysokým potenciálom. Vzniká za atmosférického tlaku.

Tlejivý výboj

Je samostatný výboj s viditeľnou zložkou, ktorý je možné pozorovať vo výbojkách za zníženého tlaku. Prebieha pri malých prúdoch (rádovo v mA), teplota výbojky a elektród je nízka [1, 2].

2.2 Plazmou aktivovaná voda (PAW)

Plazmou aktivovaná voda je pomenovanie z anglického Plasma Activated Water a obsahuje mnoho aktívnych častíc.

Existuje niekoľko spôsobov ako môžeme aktivovať vodu pomocou plazmy:

1. opracovaním vody plazmou generovanou v plynnom skupenstve (vzduch, argón apod.) priamo. To znamená, že opracovávaná voda je súčasne elektródou, prípadne je v priamom kontakte s plazmou generovanou napr. plazmovou tryskou;
2. aktivovanú vodu pripravíme priamym generovaním plazmy vo vode;
3. nepriamym opracovaním vody produktami výboja, ktoré sú unášané iónovým vetrom a difundujú do vody cez hladinu.

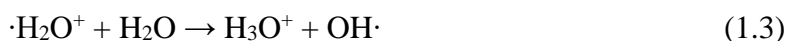
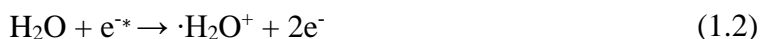
PAW je možné aktivovať rôznymi typmi plazmových zdrojov, ako napríklad plazmovými tryskami, pulznou korónou, prípadne s využitím dielektrického bariérového vývoja (DBD). Použitím neizotermickej plazmy vzniká PAW, ktorá z najväčšej časti obsahuje reaktívne formy kyslíku a dusíku (ROS, RNS). Aby mohli vznikať spomenuté reaktívne komponenty, je potrebné zaistiť dostatočný prísun vzduchu (kyslíku a dusíku. Pre čo najlepšie využitie plazmy je vhodné premiešavať opracovávanú kvapalinu tak, aby boli vznikajúce produkty rovnomerne rozpustené v objeme kvapaliny. Touto metódou je možné pripraviť PAW za využitia elektriny, vzduchu a vody, a nie sú potrebné žiadne chemikálie [3].

Medzi najčastejšie spôsoby konfigurácie elektród patrí hrot-rovina, prípadne takzvaná pin-hole konfigurácia, kedy máme nádobu rozdelenú na dve časti pomocou dielektrickej bariéry, v ktorej sa nachádza malý otvor.

Po zapojení elektród a zapnutí zdroja elektrického prúdu, vzniká silné elektrické pole. Jeho pôsobením na kvapalinu sa v priestore výboja urýchľujú voľné elektróny. Pri zrážkach voľných elektrónov s okolitými molekulami dochádza k ionizácii a disociácii molekúl a k vzniku chemicky vysoko aktívnych častíc. Týmto zrážkami sa tvoria nové voľné elektróny, ktoré ionizujú vodu a vznikajú plazmové kanáliky, tzv. „streamery“. Pôsobením vysokého elektrického poľa sa kvapalina postupne zahrieva a čiastočne odparuje, začínajú sa vytvárať bubliny až nastane zapálenie výboja. Vzniknutý streamerový výboj sa vo vode ďalej šíri pomocou bublín [4].

Medzi najdôležitejšie aktívne častice patria kyslíkové a hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a ozón (O_3). Vyznačujú sa vysokým oxidačno-redukčným potenciálom a veľkou reaktivitou. Vďaka svojej reaktivite sú schopné pôsobiť na molekuly látok, ktoré sú rozpustené v kvapaline a zapríčiňujú vznik a zánik molekúl [5].

Priebeh disociácie a ionizácie vody je možné popísať týmito chemickými reakciami:



Chemické reakcie, ktoré prebiehajú pri elektrickom výboji v kvapaline, môžeme zhrnúť do dvoch oddelených súčasne prebiehajúcich reakcií [4]:



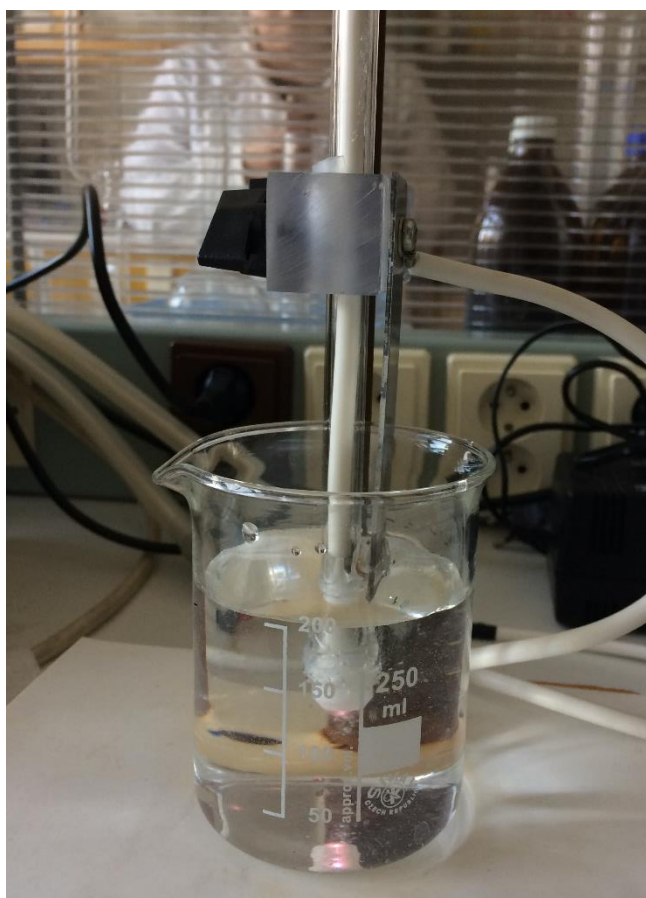
Ďalšie veľmi dôležité častice, ktoré vznikajú pri procese opracovanie vody plazmou, sú dusíkaté častice a radikály dusíku. Medzi tieto častice patrí NO_2^- , ktorý spolu s peroxidom vodíka vytvára nitračné činidlo peroxyinitrit ONOO^- . Jeho prítomnosť je možné dokázať pomocou detekcie špecifických nitrovaných produktov fenolu (4-nitrofenol, 2-nitrofenol). Tieto produkty poskytujú jasný dôkaz o tvorbe radikálov $\text{NO}_2\cdot$, $\text{NO}\cdot$ a $\text{OH}\cdot$ radikálov spolu s NO^+ iónmi. Zo spomínaných dusíkatých častíc je pre organizmy toxický (antimikrobiálny) práve peroxyinitrit, ktorého množstvo závisí na koncentrácií NO_2^- a H_2O_2 . Keďže existujú rôzne spôsoby plazmového aktivovania, vznikajú aj rôzne množstvá NO_2^- , H_2O_2 a H^+ a tým pádom sa môžu líšiť aj ich antimikrobiálne účinky [6].

2.2.1 Metódy prípravy plazmou aktivovaných roztokov

Plazmou aktivované roztoky je možné pripraviť hneď niekoľkými spôsobmi, ktoré boli v krátkosti spomenuté v podkapitole (2.2). Pre bližšie priblíženie boli vybraté tri najvýznamnejšie a najčastejšie spôsoby prípravy PAW.

Príprava PAW pomocou tryskového systému

V prípade tejto diplomovej práce bol na generáciu plazmy v roztokoch používaný tryskový systém. Hlavná elektróda (tryska) je tvorená izolovaným wolfrámovým drôtom v sklenenom držiaku, ktorého koniec tvorí dielektrická hlavica z neporéznej keramiky s malým otvorom. Samotný drôt končí niekoľko milimetrov od okraju keramiky, čím vo vnútri vzniká štrbina. Táto konfigurácia tak kombinuje klasický systém hrot-rovina so štrbinovým (diafragmovým) výbojom. Tyč môže byť vyrobená z keramiky prípadne kremenného skla. Tryskový systém sa ďalej skladá z plochej protielektródy. Následne sa tryska s protielektródou ponorí do kvapaliny a zapne sa zdroj elektrického prúdu. V otvore trysky sa vytvárajú mikrobubliny, ktorými sa do okolia šíri elektrický výboj a vzniká plazma (viď Obr. 1) [7].

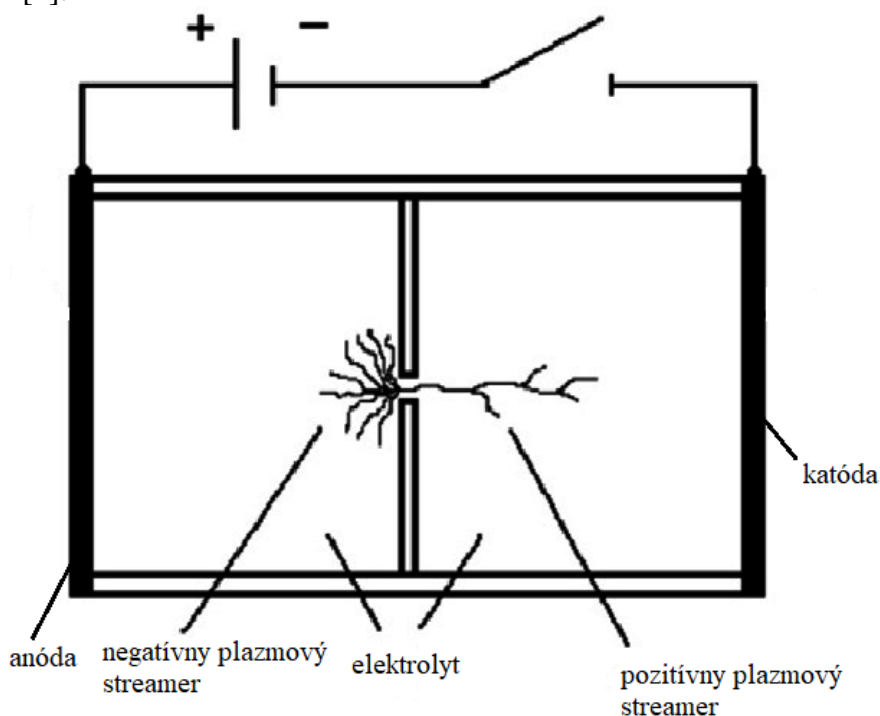


Obr. 1: Tryskový systém (vlastný zdroj)

Príprava PAW pomocou diafragmového výboja

Druhým spôsobom ako je možné pripraviť plazmou aktivované roztoky je použitie diafragmového výboja. Tento typ výboja je podobný korónovému výboju prebiehajúcemu v kvapaline. Pri korónovom výboji vzniká silné nehomogénne elektrické pole v okolí hrotov a hrán, v prípade diafragmového výboja je použitá membrána s malým otvorom oddelujúca dve planárne elektródy ponorené do roztoku. V okolí tohoto malého otvoru vzniká silné elektrické pole s vysokou hustotou elektrického prúdu, zahrieva sa kvapalina a vytvárajú sa bubliny. Akonáhle je prekonalá určitá hodnota intenzity elektrického poľa, na rozhraní bublín dochádza k vzniku elektrického výboja. Pri zapálení výboja vznikajú plazmové kanáliky

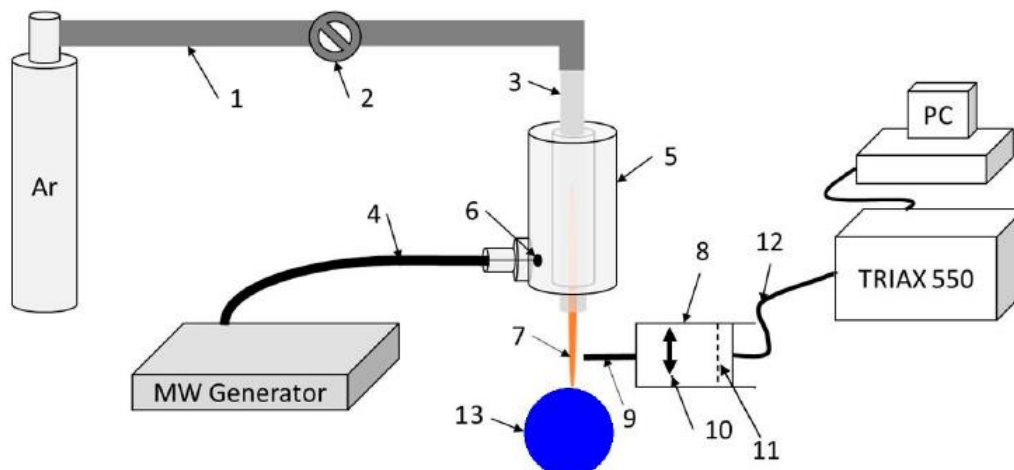
„streamery“ s odlišnými charakteristikami. V katódovom priestore sa vytvárajú málo rozvetvené pozitívne plazmové kanáliky a v anódovom priestore husto rozvetvené negatívne plazmové kanáliky (viď Obr. 2). Rýchlosť šírenia negatívnych plazmových kanálikov je menšia než kladných [4].



Obr. 2: Generácia plazmových „streamerov“ pôsobením diafragmového výboju [4]

Príprava PAW pomocou mikrovlnného jetu

Poslednou vybranou metódou prípravy plazmou aktivovaných roztokov je generácia pomocou mikrovlnnej trysky. Plazma je vytváraná pôsobením elektrického poľa na neutrálny plyn, napríklad argón. Keď dôjde k zrážke atómov a molekúl neutrálneho plynu s fotónmi alebo elektromagnetickým žiarením, vzniknú elektróny a ióny v plynnom skupenstve. Mikrovlnnou tryskou pôsobíme na hladinu roztoku, odkiaľ produkty výboja ďalej difundujú do objemu. Vzniknuté elektróny a ióny sú urýchľované elektrickým poľom a nabitú častice vytvárajú plazmu.



Obr. 3: Schéma experimentálneho zapojenia pri opracovaní povrchu malých bobúľ pomocou argónu. 1 – plynová trubica, 2 – prietokový ovládač, 3 – kremenná výbojová trubica, 4 – koaxiálny kábel, 5 – rezonátor sufatron, 6 – anténa, 7 – plazmový horák, 8 – vertikálne pohyblivá optická čiara, 9 – čierny obdĺžnikový svetlovod, 10 – kremenné šošovky, 11 – žltý optický filter, 12 – multimode optické vlákno, 13 – opracovávaná bobuľa [8]

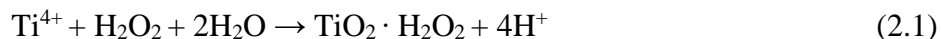
Pomocou mikrovlnného jetu môže byť opracované aj drobné ovocie. Takto opracované ovocie vydrží dlhšie čerstvé bez použitia nebezpečných chemikálií a zároveň je jeho povrch mikrobiálne dekontaminovaný. Tento spôsob opracovania je predovšetkým účinný na hladkom ovocí, ako napríklad čučoriedky. Jeho veľkou výhodou je, že nedochádza k zníženiu antioxidantnej aktivity ovocia. Celá schéma zapojenia je uvedená na Obr. 3 [8].

2.2.2 Metódy charakterizácie PAW

Veľmi dôležitou súčasťou generácie plazmy je jej charakterizácia. Stanovujú sa fyzikálne-chemické vlastnosti ako napríklad množstvo a stabilita peroxidu vodíku, vodivosť, pH, prípadne teplota kvapaliny.

Stanovenie koncentrácie peroxidu vodíka H₂O₂

Najdôležitejšou metódou charakterizácie plazmou aktivovanej vody je určenie celkovej koncentrácie peroxidu vodíka. Táto metóda spočíva vo využití selektívnej reakcii s titánovým činidlom, ktoré sa skladá z síranu titaničitého rozpusteného v zriedenej kyseline sírovej. Vznikajúci titanylový ión reaguje s peroxidom vodíka za vzniku komplexu kyseliny peroxotitaničitej:



Tento komplex je charakteristický svojím žltým zafarbením, ktorého intenzita je priamo úmerná koncentrácii peroxidu vodíka v roztoku. Z našich doterajších meraní vyplýva, že pri skladovaní PAW v tme a pri laboratórnej teplote je koncentrácia peroxidu vodíka stabilná po dobu niekoľkých dní (2 až 3 dni). Roztok s komplexom kyseliny peroxotitaničitej sa analyzuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 407 nm. Pomocou spektrofotometra sa zmeria absorbancia vzorky pri danej vlnovej dĺžke. Stanovenie koncentrácie H₂O₂ vychádza zo znalosti Lambert-Beerovho zákona, ktorý popisuje vzťah medzi koncentráciou látky v roztoku a jeho absorbanciou:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \quad (3.1)$$

kde A je absorbanca, ε je molárny absorpčný koeficient pre danú vlnovú dĺžku [$\text{dm}^{-3} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], l je hrúbka kyvety [cm] a c je koncentrácia [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$]. Zmeranú absorbanca sa následne dosadí do rovnice kalibračnej priamky:

$$y = 0,4596 \cdot x, \quad (3.2)$$

kde y je absorbanca pri vlnovej dĺžke 407 nm a x je koncentrácia H_2O_2 v vzorke [4].

Vodivosť a stanovenie hodnoty pH

Ďalším spôsobom, ktorým je možné charakterizovať PAW je stanovenie vodivosti roztoku a hodnoty pH . V procese opracovania roztoku plazmou vznikajú rôzne nabité častice a komplexy, a preto je vhodné určiť jeho vodivosť. Vodivosť roztoku elektrolytu vyjadruje schopnosť elektrolytu viesť elektrický prúd. Je závislá na teplote a počte nabitých častíc v systéme. Čím menší počet nabitých častíc, tým menšia vodivosť. Vodivosť je možné merať pomocou konduktometru, ktorého merná cela ponorená do roztoky vzorky je z pravidla doplnená tepelným čidlom. Vodivosť, ktorá je zobrazená na konduktometri je tak korigovaná na vplyv teploty. Vodivosť je prevrátenou hodnotou odporu, značí sa symbolom G a jej jednotku je siemens S [9]:

$$G = \frac{1}{R}. \quad (4.1)$$

Stanovovanie pH spočíva v meraní rovnovážneho elektromotorického napätia galvanického článku, ktorý je tvorený dvoma elektródami ponorenými do meranej vzorky roztoku. Prvá elektróda sa nazýva merná a jej potenciál je funkciou aktivity vodíkových iónov. Najčastejšie používaná je sklenená elektróda, ktorou je tenkostenná sklenená banička plnená vnútorným elektrolytom, ktorej stena funguje ako membrána. Po ponorení do meraného roztoku vzniká potenciálový rozdiel medzi vonkajším a vnútorným povrchom membrány, ktorý je úmerný rozdielu aktivít vodíkových iónov vo vonkajšom a vnútornom roztoku. Pretože vnútorný roztok je nemenný, závisí tento potenciálový rozdiel iba na pH vonkajšieho roztoku. Druhá elektróda je referenčná s konštantným elektródovým potenciálom [10, 11].

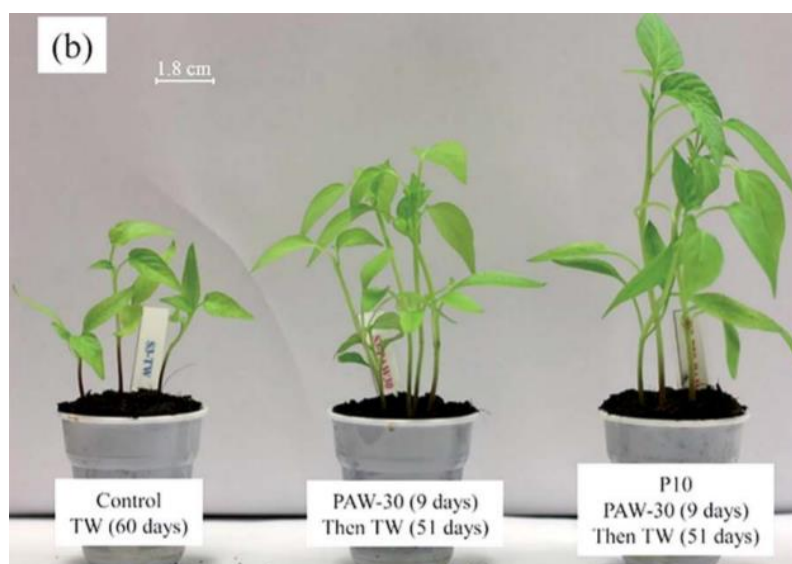
2.2.3 Možnosti využitia plazmou aktivovaných roztokov

Do roku 2050 sa odhaduje nárast populácie našej planéty až na 10 miliárd. Táto predikcia poukazuje na nutnosť využívania inovatívnych spôsobov produkcie a spracovania potravín aby vôbec bolo možné pokryť globálny dopyt po potravinách. Najväčšou výzvou je schopnosť produkovať bezpečné vysokokvalitné potraviny bez rizika vzniku patogénov pri procese výroby. Postupne sa čím ďalej tým viac zvyšujú nároky zákazníkov, ktorí požadujú minimálne spracované potraviny s malým množstvom konzervantov. Netepelné technológie spracovania potravín by mohli byť alternatívne metódy konzervácie, minimalizujúce negatívne účinky na nutričných hodnotách potravín. Jednými zo súčasných možností úpravy, spracovania a predĺženia trvanlivosti v potravinárskom priemysle sú ožarovanie, vysokotlakové spracovanie, spracovanie pomocou UV žiarenia a ozonácia. UV žiarenie je možné používať na ošetrovanie džúsov a jablkových štiav. Ďalšími možnými technológiami netepelného spracovania sú pulzné elektrické polia a ultrazvuk, ktoré sa používajú na zvýšenie extrakcie bioaktívnych látok z ovocia a zeleniny. V poslednej dobe sa stále viac do popredia dostáva nový progresívny

spôsob opracovania v potravinárskom priemysle, a to využitie neizotermickej plazmy pri atmosférických tlakoch [12].

Táto diplomová práca je predovšetkým zameraná na ekotoxické účinky roztokov aktivovaných plazmou. Prostredníctvom experimentov skúma ich dopad na malé sladkovodné organizmy, vybraní zástupcovia kôrovcov *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus*, a na zástupcu poľnohospodárskej plodiny *Lactuca sativa*. Predpokladaný účinok na mikroorganizmy je toxický a pri rastlinách by mala byť pozorovaná pozitívna stimulácia rastu koreňa.

Podľa doterajších výskumov sa PAW javí ako veľmi efektívne riešenie pri podpore klíčivosti semien a rastu rastlín. V rámci experimentov sa plazmou aktivovaná voda používa ako zálievka a je možné opracovať aj samotné semená. Týmto spôsobom je možné zmaximalizovať účinnosť PAW a takto ošetrovaným rastlinám sa darí lepšie ako klasicky, kohútikovou vodou zalievaným rastlinám [13].



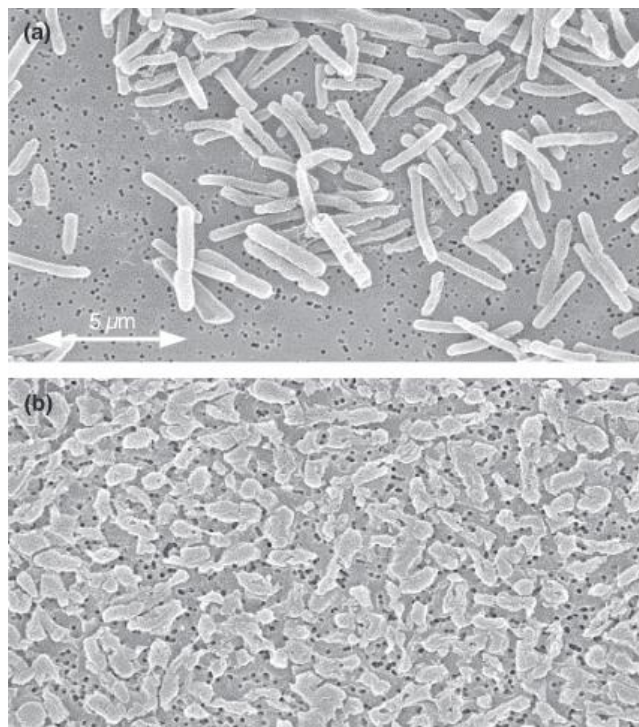
Obr. 4: Dlhodobé účinky PAW a plazmou opracovaných semien na rast papriky [14]

Na Obr. 4 je znázornený experiment, kedy bol porovnávaný rast troch rastlín po uplynutí 60 dní. Prvá rastlina je kontrolná vzorka, ktorá bola zalievaná bežnou dostupnou kohútikovou vodou. Druhá rastlina bola spočiatku zalievaná PAW (po dobu 9 dní) a následne už iba kohútikovou vodou. Nakoniec bola zasadená tretia rastlina, ktorej semená boli opracované plazmou, prvých 9 dní bola zalievaná PAW a do konca experimentu bola zalievaná už iba kohútikovou vodou. Závěry experimentu hovoria, že opracovaním semien rastliny bola zvýšená rýchlosť klíčenia až o 80 % oproti použitiu kohútikovej vody [13, 14].

Veľmi zaujímavou vlastnosťou PAW je jej antimikrobiálny účinok, ktorý je možné využiť v medicínskych odvetviach. Príkladom je ovplyvnenie planktonických a adherentných buniek *Staphylococcus epidermidis*, *Leuconostoc mesenteroides* (ako model gram-pozitívnej baktérie), *Hafnia alvei* (gram-negatívna baktéria) a *Saccharomyces cerevisiae* (model kvasinky) destilovanou vodou, ktorá je aktivovaná kĺzavými elektrickými výbojmi. V prípade baktérií bolo opracovanie adherentných buniek menej účinné ako pri planktonických bunkách,

výnimkou v danom experimente bola iba *S. cerevisiae*. Pri porovnaní účinnosti PAW medzi baktériami a kvasinkami, bola inaktivácia efektívnejšia u baktérií. Týmto spôsobom je možné dosiahnuť výrazné zníženie mikrobiálnych populácií a to len s použitím plazmou aktivovanej destilovanej vody. Použitie PAW pri dekontaminácii zariadení, pomôcok a rôznych povrchov sa preto javí ako veľmi sľubná náhrada bežných dezinfekčných prostriedkov na báze chlóru [15].

Podobným príkladom je použitie neizotermickej plazmy na inaktiváciu rastu buniek *Escherichia coli*. Bunky *E. coli* K12 sa deponujú na povrch z membránových filtrov a vystavia sa prúdu studenej plynnej plazmy v prostredí atmosférického tlaku. Po opracovaní buniek sú pomocou metódy elektrónovej mikroskopie pozorované závažné poškodenia štrukturálnej integrity. Schopnosť buniek prežiť závisí na ich povrchovej bunečnej hustote a fyziologickom stave bunky. Čím vyššia povrchová koncentrácia, tým sú bunky odolnejšie voči preniknutiu PAW do vnútra buniek a znižuje sa účinnosť inaktivačnej úpravy požadovaných materiálov [16].



Obr. 5: Záznam *E. coli* zo skenovacieho elektrónového mikroskopu (a) pred plazmatickým opracovaním a (b) po 2 min opracovaní [16]

Pri výbere možnosti opracovania roztokov by sme mali myslieť aj na ich negatívny účinok na necieľové organizmy a pokúsiť sa ho znížiť čo v najväčšej miere. Je preto vhodné vybrať také techniky, ktoré sú čo najekologickejšie ale zároveň účinné. Takýmto porovnávaním sa zaoberal J. Hayes a kolektív, ktorí skúmali vplyv pulzného plazmového tlejivého výboja (PPGD) a pulzného UV svetla (PUV) s cieľom zneškodnenia vodného endoparazita *C. parvum*. Pri použití PPGD bola vysokonapäťovými pulzmi opracovaná voda, do ktorej bol privádzaný N_2 alebo O_2 . Okrem akustických vln a UV svetla vznikali aj voľné radikály, ktoré pôsobili na skúmaného endoparazita cytotoxicky, genotoxicky a ekotoxicky. V rámci ekotoxikologických testov boli použité kity ThamnotoxTM a DaphtoxTM. Na základe výberu plynu, ktorý bol vstrekaný do vody, sa PPGD-opracovaná voda stala zásaditá (použitie O_2) alebo kyslá

(použitie N₂). V PAW vznikli viaceré reaktívne voľné radikály ako ozón, disociovaná kyselina dusičná a kyselina dusitá, ktoré prispeli k pozorovanej dezinfekcii a toxicite. Na základe experimentov autori vyhodnotili, že v prípade PUV-opracovanej vody nebola u organizmov *D. magna*, *T. platyurus* a *V. fischeri* pozorovaná detekovateľná toxicita. Tento fakt podporuje ďalší vývoj PUV ako ekologicky šetrnej a efektívnej technológie na dekontamináciu vody obsahujúcu nežiadúce parazity rodu *Cryptosporidium*. Naopak pri použití PPGD-opracovanej vody boli pozorované značné toxikologické účinky, a teda touto metódou aktivovaná voda pôsobila toxicky nielen na nežiadúce parazity ale aj na iné organizmy. Najsenzitívnejším bol organizmus *T. platyurus*. Výsledky prevedených ekotoxikologických testov hovoria, že aj zriedenie 1 : 8 PPGD-opracovanej vody má silné ekotoxikologické účinky, a preto by bolo vhodné zvážiť potenciálne riziko PPGD- oppracovanej vody [17].

2.3 Ekotoxikológia a vybrané ekotoxikologické biotesty

Ekotoxikológia je interdisciplinárny vedný obor, ktorý kombinuje poznatky vedy zaoberajúcej sa ekosystémami (ekológia) a vedy študujúcej interakcie chemických látok s živými organizmami (toxikológia). Ekotoxikológia skúma pôsobenia škodlivých látok na ekosystém, študuje toxické vplyvy v prírode, v organizmoch, predovšetkým vplyvy v populáciách a spoločenstvách, monitoruje a predpovedá osud a vplyvy cudzorodých látok v prostredí [18].

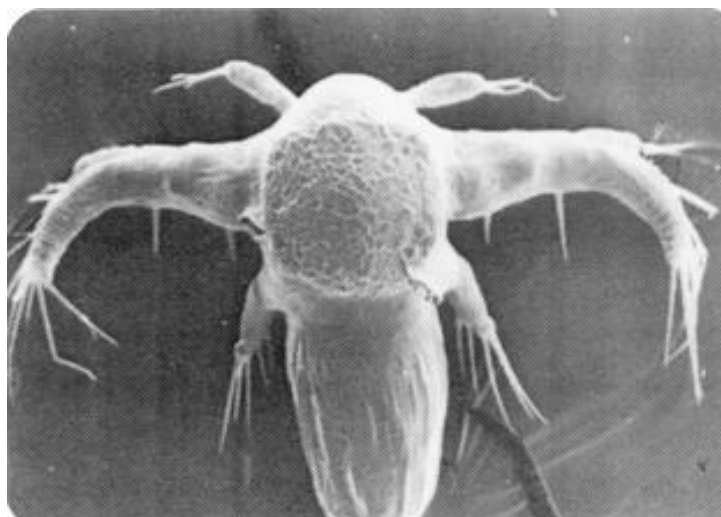
Ďalej budú vysvetlené princípy vybraných použitých ekotoxikologických biotestov na akvatických a terestrických organizmoch.

Testy ekotoxicity na zástupcoch akvatických organizmov

2.3.1 Test toxicity Thamnotoxkit F™

Testovací organizmus je *Thamnocephalus platyurus*, sladkovodný kôrovec, ktorý sa používa na rýchle stanovenie kontaminácie vody. Patrí do druhu žiabronôžok (*Anostraca*) a triedy lupeňonôžok (*Branchipoda*). *T. platyurus* je charakteristický drobnými rozmermi s množstvom opakujúcich sa telových článkov a lupeňovitými končatinami.

Dĺžka liahnutia *T. platyurus* je približne 20 hodín, doba inkubácie testovacích organizmov je 24 hodín následne sa sleduje ich mortalita. Z výsledkov mortality sa vypočíta hodnota 24hLC₅₀ (letálna koncentrácia, pri ktorej dôjde k úhynu 50 % testovacích organizmov). Testovací organizmus sa vo forme cyst 20 až 22 hodín pred začiatkom testu uvedie do aktívneho štádia. Cysty sa kultivujú v inkubátore pri teplote 25 °C a pri osvetlení 3 000 až 4 000 Lux. V rámci testu sa používa päť rôznych koncentrácií testovanej látky v troch paralelných opakovaníach pre každú koncentráciu, pričom do každej šachty testovacej doštičky je nasadených 10 jedincov. Pri vyhodnocovaní výsledkov nesmie mortalita jedincov v kontrolnej skupine presiahnuť 10 % [19, 20].



Obr. 6: *Thamnocephalus platyurus* [21]

2.3.2 Test inhibície rastu Žaburinky menšej (*Lemna minor*)

Žaburinku menšiu radíme do čeľade rastlín *Lemnaceae*. *Lemna minor* je malá vodná rastlina s plochými lístkami, ktorých počet v zdravej kolónii je dva až päť lístkov na jedného jedinca. Vyskytuje sa v stojatých sladkých vodách, kde je potravou pre ryby a vodné vtáctvo [22, 23].

Testy inhibície rastu *L. minor* slúžia k vyhodnocovaniu toxicity suspenzií, roztokov, odpadných a povrchových vôd. Lístky žaburinky menšej sú ponechané rásť v rôznych koncentráciách testovanej látky, ktorá je pripravená riedením živného roztoku a danej toxickéj látky. Súčasne sú lístky nasadené do živného roztoku, ktorý je kontrolou. Rastliny žaburinky menšej sú inkubované po dobu 7 dní (168 hod) pri laboratórnej teplote a pod zdrojom svetla o intenzite 6500 až 10 000 Lux. Po siedmych dňoch je spočítaný počet lístkov a určí sa biomasa. Cieľom testu je zistenie hodnoty 168hIC₅₀. Vyhodnotenie testu sa robí podľa rastovej rýchlosti a podľa množstva biomasy, ktorá sa určí podľa vzťahu pre výpočet 168hIC₅₀ [23, 24].



Obr. 7: *Lemna minor* [22]

Vzťahy na výpočet 168hIC50

Vzťah pre výpočet rastovej rýchlosti:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_o}{t_n} \quad (5.1)$$

kde μ je rastová rýchlosť;

N_n je počet lístkov na konci testu;

N_o je počet lístkov na začiatku testu (9);

t_n je doba trvania testu v hodinách.

Vzťah pre výpočet inhibície:

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (5.2)$$

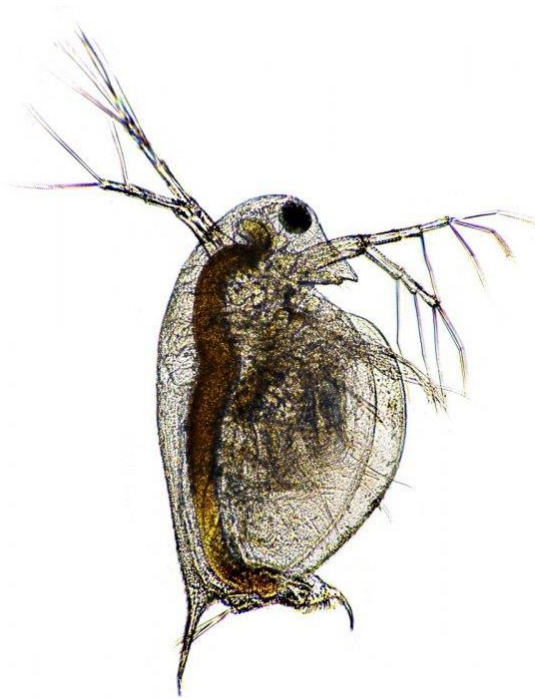
kde I_μ je inhibícia *L. minor* pre danú koncentráciu;

μ_c je rastová rýchlosť v kontrole;

μ_i je rastová rýchlosť v danej koncentrácii [25].

2.3.3 Test toxicity Daphtoxkit FTM

Perloočka veľká alebo *Daphnia magna* je malý sladkovodný vodný kôrovec, nazývaný tiež vodná blcha, tvoriaci veľmi dôležitú súčasť potravného reťazca vo vodnom ekosystéme. Sú korisťou pre ryby a súčasne najpočetnejšími filtrátormi planktonných rias. S ich prítomnosťou, prípadne neprítomnosťou vo vodnej nádrži sa mení jej charakter. Hlavnú zložku potravy pre perloočky tvorí fytoplanktón. Okrem fytoplanktónu je to ďalej detrit, ktorého súčasťou sú aj ich vlastné zvlčené chitínové schránky. Z dlhodobého hľadiska perloočky udržujú matriarchát, samce produkujú iba v prípade zhoršenia životných podmienok. Až potom sa perloočky začínajú rozmnožovať pohlavne. Perloočky sú teda schopné partenogenetického a pohlavného rozmnožovania. V prípade partenogenézy v zárodočnom priestore dospelých samíc dozrieva až 60 diploidných vajíčok, z ktorých sa vyliahnú ďalšie samice. Ak dôjde k zhoršeniu podmienok v nádrži, niektoré vajíčka vo vaječníku samičky sa začnú diferencovať a liahnú sa z nich samci. Takouto krízovou situáciou môže byť napríklad zmena v zložení vody, nedostatok potravy, skrátenie dňa, atď. [26].



Obr. 8: *Daphnia magna* [27]

Podobne ako v prípade ekotoxického testu na *T. platyurus*, bol použitý mikrobiotest v podobe „kitu“. Balenie obsahuje testovacie organizmy v pokojovom štádiu vo forme ehippií a štyri ampulky s roztokmi presne definovaných koncentrácií, potrebné na prípravu živného média. Organizmy je nutné vyliahnúť tri až štyri dni pred nasadením testu. Test akútnej toxicity sa prevádza v testovacích doštičkách a skladovanie prebieha v inkubátore pri teplote 20 °C. Po uplynutí 24 a 48 hodín sa zaznamená počet uhynutých organizmov v testovanej koncentračnej rade a v kontrole, vyhodnotí sa mortalita a vypočíta sa hodnota 24hLC50 a 48hLC50 [28].

Testy ekotoxicity na zástupcoch terestrických organizmov

2.3.4 Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (*Lactuca sativa*)

Šalát siaty patrí do rozsiahlej skupiny kvitnúcich rastlín z čeľade astrovité, *Asteraceae*, a rodu *Lactuceae*. Je to jednoročná aj dvojročná listová zelenina pôvodom z Ázie, charakteristická zelenými, niekedy až červenými listami. Tvorí ružice hlávkovitého tvaru s hladkými alebo kučeravými listy. Pestuje sa ako listová zelenina a je rozšírená takmer po celom svete [29].

Test na šaláte siatom patrí medzi pôdne kontaktné testy, ktoré sú používané na hodnotenie fyto toxického účinku na rast koreňa. Princípom testu je porovnanie dĺžky koreňov šalátu v kontrole s koreňmi vyklíčenými v pôde s testovanou toxickou látkou. Pripravená artificiálna pôda alebo LUFA 2.3 sa zvlhčuje na 70 % vodnej kapacity pôdy, do každej nádoby sa nasadí 15 vopred vyklíčených semienok a prikryje sa potravinárskou fóliou. Takto pripravené nádoby sa inkubujú 120 ± 2 hod v termostate pri teplote 24 °C. Z výsledkov testu sa vyhodnocuje inhibícia, respektíve stimulácia rastu koreňa podľa vzťahu (16):

$$I = \frac{L_c - L_v}{L_c} \cdot 100 \quad (6.1)$$

kde I je inhibícia (stimulácia) rastu koreňa (%), L_c je priemerná dĺžka koreňa v kontrole (mm), L_v je priemerná dĺžka koreňa v testovanej matrici. Ak je $I < 0$, ide o stimuláciu rastu koreňa [30].

2.3.5 Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej (*Eisenia fetida*)

Dážd'ovka hnojná patrí do kmeňa obrúčkavcov, *Annelida*, triedy máloštetinavcov, *Oligochaeta*, a čeľade dážd'ovkovité, *Lumbriculidae*. Je to stredne veľký červ žijúci v hnijúcej vegetácii, komposte alebo v hnoji. Žije vo vlhkom prostredí ale nikdy nie priamo vo vode [31].

Dážd'ovky sú vystavené toxickým účinkom látok dermálnym aj orálnym spôsobom, prostredníctvom priameho kontaktu citlivej pokožky s okolitou pôdou a prijímaním potravy. Vďaka tomuto sa môžu využívať na stanovenie toxicity pôdy. Polovica pôdy LUFA 2.2 v testovacej nádobe bola ovlhčená destilovanou vodou na 50 % vodnej kapacity pôdy a do druhej polovice pôdy sa pridáva testovaná toxická látka tiež v takom množstve, aby vodná kapacita pôdy bola 50 %. Nádoby s pripravenou pôdou a 10 organizmami na jednu nádobu sa uchovávajú v klimatizovanej miestnosti prikryté potravinárskou fóliou, za stáleho svetelného režimu a teploty 24 °C. Po 48 hodinách sa hodnotí miera únikovosti na základe vzťahu (15):

$$A = \frac{N_0 - N_x}{N_0} \cdot 100 \quad (7.1)$$

kde A je únikovosť (%), N_0 je predpokladaný počet jedincov v kontrole a N_x je počet jedincov nájdených v kontaminovanej matrici. Pre výpočet bolo predpokladané, že distribúcia jedincov je homogénna, teda 50% podiel jedincov v kontrole a 50% podiel v kontaminovanej matrici [32].

2.3.6 Test únikového správania na chvostoskokoch (*Folsomia candida*)

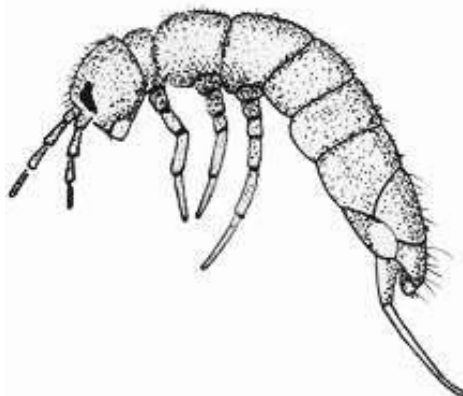
Organizmus *Folsomia candida* je pôdny bezstavovec patriaci do kmeňa článkonožcov a do skupiny šesťnožcov s podlhovastým telom, článkovanými tykadlami a jeho hlavným znakom je unikátny skákací aparát. Môžu sa vyskytovať v humuse, odpadoch, niekedy aj na vodnej hladine a okrajoch ľadovcov. Chvostoskoky sú rozšírené po celej planéte a sú odolné voči výkovom podmienok životného prostredia. Väčšina z nich sú saprofágy, živia sa rozloženým odpadom, detritom, hubami a riasami. Niektoré môžu byť dokonca aj predátori žiaviaci sa pôdnymi organizmami [33].

Tento experiment prebieha v súlade s normou ISO 17512-2:2011 a jeho výhodou je časová nenáročnosť a veľká citlivosť. Pre test sa používajú dospelé jedince. Do Petriho misiek sa vloží prepážka, do jednej polovice sa umiestni artificálna pôda alebo LUFA 2.2 a do druhej pôda artificálna pôda, prípadne LUFA 2.2. kontaminovaná toxikantom. Petriho misky s organizmami sú ďalej uchovávané v inkubátore pri teplote 20 ± 2 °C. Po 48 hodinách je medzi tieto dve časti opäť vložená prepážka, organizmy sú z každej časti prevedené na flotačné misky a sú spočítané. Na záver je vyhodnotený vplyv kontaminovanej pôdy na únikové správanie *F. candida*.

Únikovosť sa vypočíta na základe vzorca (15):

$$NR(\%) = \frac{C - T}{N} \cdot 100, \quad (8.1)$$

kde NR (%) je čistá odpoveď vyjadrená v percentách, C je počet organizmov v referenčnej pôde, T je počet organizmov v testovanej pôde a N je celkový počet organizmov [34].



Obr. 9: *Folsomia candida* [33]

2.3.7 Test inhibície elongácie koreňa cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.)

Cibuľa kuchynská alebo cesnak cibul'ový je dvojročná rastlina, ktorá sa radí do čeľade cesnakovité. Je rozšírená po celom svete a využíva sa predovšetkým ako kultúrna plodina pestovaná na poliach a záhradách. Okrem jej kulinárskeho uplatnenia treba spomenúť, že vďaka jej baktericídnym a fungicídnym účinkom bola používaná aj v tradičnej medicíne [35].

Cieľom testu je stanovenie inhibičných účinkov roztoku toxického látky na rast koreňa. Cibulky sú 24 hodín pred nasadením testu zbavené vrchnej šupky a namočené do vody. Nasledujúci deň sú cibulky jednotlivito umiestnené na vrchnú časť skúmaviek tak, aby sa koreňovou časťou jemne dotýkali hladiny roztoku. Minimálny počet cibuliek je 12 na jedno opakovanie. Ako referenčná vzorka je použitá kohútiková voda a testovaná vzorka je toxická látka. Skúmavky s cibulkami sú umiestnené na miesto so stálou teplotou okolo 25 ± 1 °C a svetelným cyklom 16 h/8 h (svetlo/tma). Za štandardných podmienok kultivácia prebieha po dobu 72 hodín a po jej uplynutí sa zmeria priemerná dĺžka koreňov a stanoví sa hodnota IC50. V prípade tejto diplomovej práce bola doba kultivácie predĺžená na sedem dní (168 hodín).

Výpočet priemernej dĺžky koreňa cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.) pre jednotlivé koncentrácie:

$$\bar{L} = \frac{\sum L_i}{n} \quad (9.1)$$

\bar{L} je priemerná dĺžka koreňa vo zvolenej koncentrácii v [mm],

L_i je dĺžka i -tého koreňa vo zvolenej koncentrácii v [mm],

n je počet cibuliek vo zvolenej koncentrácii.

Podobne sa prevádza aj výpočet priemernej dĺžky koreňa L_c v kontrolných stanoveniach. Výpočet inhibície rastu koreňa v testovanej koncentrácii v zrovnaní s kontrolným stanovením sa určuje podľa rovnice:

$$\bar{I}_i = \frac{\bar{L}_c - \bar{L}_v}{\bar{L}_c} \cdot 100 \quad (9.2)$$

kde

\bar{I}_i je inhibícia rastu koreňa v danej koncentrácii v [%], ak je $I < 0$ hovoríme o stimulácii rastu,

\bar{L}_c je priemerná dĺžka koreňa v kontrole v [mm],

\bar{L}_v – priemerná dĺžka koreňa v testovanej koncentrácii v [mm].

Ak nastane situácia, kedy priemerná dĺžka koreňa v testovanej látke je väčšia ako v kontrole, teda testovaná látka pôsobí na rast koreňa stimulačne, výpočet hodnoty IC50 sa neprevádza [36].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Úlohou mojej diplomovej práce bolo prostredníctvom vhodnej batérie ekotoxikologických testov posúdiť ekotoxicitu plazmou aktivovaných roztokov. V experimentoch boli plazmou opracované živné média a obyčajná kohútiková voda dostupná v laboratóriách. Boli použité živné média pre organizmy *T. platyurus*, *L. minor* a *D. magna*. V prípade screeningového testu klíčivosti šalátu siateho bolo použité živné médium rovnaké ako pre organizmus *D. magna*. U zvyšných testov bola používaná kohútiková voda.

Pred začatím každého experimentu bolo nutné pripraviť plazmou aktivované roztoky. Pred a po opracovaní bola zmeraná teplota, vodivosť a pH roztokov.

3.1 Príprava vzoriek a ekotoxikologické biotesty

Ako prvé boli vykonané predbežné testy, kedy boli 100% roztoky PAW rozriedené príslušným živným médiom na výslednú koncentračnú radu 0, 25, 50 a nezriedených 100 %. Na prípravu riedených roztokov boli používané odmerné banky 50 ml. Koncentrácia 100 % bola pripravená odobratím 50,0 ml zo zásobného roztoku PAW, koncentrácia 50 % bola pripravená odobratím 25,0 ml zo zásobného roztoku a doplnením po rysku príslušným živným médiom, koncentrácia 25 % bola pripravená odobratím 12,5 ml zo zásobného roztoku a doplnením po rysku príslušným živným médiom.

Na základe výsledkov predbežných testov bolo potrebné pozmeniť predchádzajúcu koncentračnú radu, a preto bola stanovená jej finálna podoba pre základné testy, 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 %. Boli použité odmerné banky 50 ml. Na prípravu 6,25% roztoku bol pipetovaný objem 3,125 ml zo zásobného roztoku a zvyšný objem bol doplnený po rysku príslušným živným médiom. Na prípravu 12,5% roztoku bolo pipetovaných 6,25 ml zo zásobného roztoku, na 25% roztok 12,5 ml, na 50% roztok 25,0 ml a na 100% roztok bol pipetovaný objem 100,0 ml. Vo všetkých prípadoch, okrem 100% roztoku, bola odmerná banka vždy doplnená po rysku príslušným médiom.

Ekotoxikologické testy prevedené v akvatickom usporiadaní:

- Test toxicity Thamnotoxkit FTM
- Test inhibície rastu Žaburinky malej (*Lemna minor*)
- Test toxicity Daphtoxkit FTM
- Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.)
- Test inhibície rastu koreňa *Lactuca sativa* (obdoba testu s *Sinapis alba*).

Ekotoxikologické testy prevedené v terestrickom usporiadaní:

- Screeningový test klíčivosti šalátu siateho *Lactuca sativa*
- Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej *Eisenia fetida*
- Test únikového správania na chvostoskokoch (*Folsomia candida*).

3.1.1 Testy ekotoxicity v akvatickom usporiadaní

3.1.1.1 Test toxicity *Thamnotoxkit FTM*

Test toxicity *Thamnotoxkit FTM* patrí medzi alternatívne ekotoxikologické biotesty. Sú to mikrobiotesty, ktoré produkuje a predáva spoločnosť MicroBioTests Inc vo forme kitov, Ide o veľmi citlivý test na sladkovodnom kôrovcovi *T. platyurus*, ktorý žije vo veľmi čistých a špecifických vodách.

Predávaný kit obsahuje kompletný potrebný materiál na prevedenie šiestich testov, zahŕňajúcich organizmy vo forme cýst, multišachtové doštičky, sadu zásobných roztokov solí, informačný materiál, pipety, parafilm na prekrytie multišachtovej doštičky a Petriho misky. Trvanie samotného testu je 24 hodín, po ktorých je potrebné stanoviť mortalitu v rôznych koncentráciách a následne vypočítať hodnotu 24hLC50 [37].



Obr. 10: *Thamnotoxkit FTM* [37]

Príprava riediacej vody

Sada piatich ampuliek so zásobnými roztokmi solí NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄ a KCl bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky 1 000 ml a zvyšný objem bol doplnený po rysku destilovanou vodou.

Príprava nariadenej riediacej vody

Na prípravu nariadenej riediacej vody bolo potrebné do čistej kadičky odobrať objem 2,5 ml riediacej vody a pridať 17,5 ml destilovanej vody. Táto nariadená riediacia voda bola následne pred každým použitím (oživením cýst) 15 minút okysličovaná prúdom vzduchu z akváriového čerpadla.

Liahnutie cýst

Z pripravenej nariadenej riediacej vody bol pipetovaný objem 1,0 ml do ampulky s cystami, ktorá bola následne pretrepávaná po dobu 10 minút. Po pretrepávaní bol obsah

ampulky vyliaty do novej čistej kadičky spolu so zvyšnou nariadenou riediacou vodou. Kadička bola umiestnená pod zdroj svetla a ponechaná inkubácii po dobu 24 hodín.

Nasadenie testu

Do multišachtovej doštičky boli postupne po 1,0 ml pipetované jednotlivé koncentrácie, vždy od najmenej koncentrovanej PAW po najkoncentrovanejšiu. Koncentračná rada bola 0, 25, 50, 100 %. Následne bolo pomocou pipety prenesených 30 oživených jedincov do rozplavovacej šachty, z ktorej boli postupne prenesené po 10 jedincoch do testovacích šacht. Multišachtová doštička bola teda naplnená tak, že v prvom stĺpci bola kontrola a v ďalších stĺpcoch jednotlivé koncentrácie roztokov, pričom prvý riadok boli rozplavovacie šachty a šachty B, C a D boli testovacie. Nakoniec bola multišachtová doštička prekrytá parafilmom a vložená do inkubátoru nastaveného na 25 °C. Po 24 hodinách bol test vyhodnotený spočítaním mŕtvych jedincov v jednotlivých šachtách a bola vypočítaná percentuálna mortalita.

3.1.1.2 Test inhibície rastu Žaburinky menšej (*Lemna minor*)

Princípom tohto ekotoxikologického testu je nasadenie žaburinky menšej do koncentračnej rady a to vždy v rovnakom počte lístkov. V nasledujúcich testovaniach bolo vždy nasadených 9 lístkov na jednu kadičku.

Skúmané sú nielen akútne účinky testovanej látky na organizmus ale aj účinky na budúce generácie. Ide o 7 dňový test, v ktorom sú do kadičiek s roztokmi o určitých koncentráciách testovanej látky nasadené testovacie rastliny a ako kontrola slúži kadička s živným médiom. Na konci testu sa stanovuje hodnota 168hIC50 [38].

Podobne ako v predchádzajúcom teste bola vytvorená koncentračná rada 0, 25, 50 a 100 %. Prostredníctvom tohto organizmu bolo testované neopracované živné médium, plazmou opracované živné médium a neopracovaná a opracovaná kohútiková voda. Každá koncentrácia bola testovaná v dvoch opakovaniach. Do kadičiek bolo naliatych približne 100 ml roztoku a bolo nasadených 9 lístkov rastliny *L. minor*.

Test vychádza z normy ISO 20079:2005 Kvalita vody. Stanovenie toxických účinkov zložiek vody a odpadovej vody na *L. minor* (žaburinku). Skúška inhibície rastu [38].

Príprava riediacej vody

Z vopred pripravených zásobných roztokov na prípravu Steinbergerovho média boli pipetované potrebné objemy, a to z roztokov I, II a III bolo pipetovaných 20,0 ml a z roztokov IV, V, VI, VII a VIII po 1,0 ml. Zvyšný objem bol doplnený destilovanou vodou po rysku 1000ml odmernej banky (vid' Tab. 1).

Tab. 1: Zásobné roztoky na prípravu Steinbergerovho média

č. roztoku	makrozložky		č. roztoku	mikrozložky	
	zlúčenina	koncentrácia [g/l]		zlúčenina	koncentrácia [mg/l]
I	KNO ₃	17,5	IV	H ₃ BO ₃	120
I	KH ₂ PO ₄	4,5	V	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180
I	K ₂ HPO ₄	0,63	VI	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	VII	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
III	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75	VIII	FeCl ₃ ·6H ₂ O	760
			VIII	EDTA	1500

Nasadenie testu

Do pripravených kadičiek o objeme 250 ml boli naliate roztoky o jednotlivých koncentráciách a to vždy tak, že jednej koncentrácii prislúchali vždy dve opakovania. Do každej kadičky bolo pomocou sklenenej tyčinky prenesených 9 lístkov a následne boli umiestnené pod zdroj svetla po dobu 7 dní.

3.1.1.3 Test toxicity Daphtoxkit FTM

Podobne ako v prípade testu toxicity s organizmom *T. platyurus*, i DaphtoxkitTM patrí medzi alternatívne ekotoxikologické biotesty, ktoré sú dodávané firmou MicroBioTests Inc vo forme kitov. Ide to drobného sladkovodného kôrovca, ktorý je veľmi citlivý na zmeny svojho životného prostredia a práve preto je vhodným kandidátom na ekotoxické biotesty.

Dodávaný kit obsahuje sadu zásobných roztokov solí, multišachtové doštičky, pipety, mikrositko, organizmy vo forme epphipií, informačný materiál a Petriho misky. Dĺžka testu je 48 hodín, no mortalita je stanovovaná nielen po 48 hodinách ale aj po 24. To nám umožňuje vypočítať hodnoty 24hLC50 a 48hLC50 [39].



Obr. 11: DaphtoxkitTM [39]

V predbežnom testovaní bola vytvorená koncentračná rada 25, 50 a 100 %. Neskôr bola vytvorená aj rozšírená koncentračná rada základného testu s koncentraciami plazmou aktivovaného živného média 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 %.

Príprava riediacej vody

Sada štyroch ampuliek so zásobnými roztokmi solí NaHCO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a KCl bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky 2 000 ml a zvyšným objem bol doplnený destilovanou vodou.

Liahnutie epphipií

Prípravená riediacia voda bola prevzdušňovaná po dobu 15 minút. Do ampulky s epphipiami bol napipetovaný približne 1 ml riediacej vody a ampulka bola mierne pretrepaná. Obsah ampulky bol následne prevedený na mikrositko tak, aby v ampulke nezostali žiadne organizmy. Následne boli epphipiá jemne prepláchnuté kohútikovou vodou a pomocou riediacej vody preliate do Petriho misky. Petriho misky boli spolu s nevyliahnutými organizmami inkubované po dobu 72 hodín, pri teplote 20-22 °C a stáleho osvetlenia 6 000 Lux.

Nasadenie testu

Do multišachtovej doštičky boli postupne po 10,0 ml pipetované jednotlivé koncentrácie, vždy od najmenej koncentrovanej PAW po najkoncentrovanejšiu. Koncentračná rada bola 25, 50, 100 % v porovnaní s kontrolou, kde sa nachádzala čistá riediacia voda. Následne bolo pomocou pipety prenesených 15 oživených jedincov do rozplavovacej šachty, z ktorej boli postupne po 5 jedincoch rozdelované do testovacích šacht. Multišachtová doštička bola v konečnom dôsledku naplnená tak, že v prvom riadku bola kontrola a v riadkoch pod ňou jednotlivé koncentrácie roztokov, pričom prvý stĺpec boli rozplavovacie šachty a šachty B, C a D boli testovacie. Nakoniec bola multišachtová doštička prekrytá parafilmom a vložená do inkubátoru nastaveného na 20-22 °C. Po 24 a 48 hodinách bol test vyhodnotený spočítaním mŕtvych jedincov v jednotlivých šachtách a bolo vypočítaná percentuálna mortalita [39].

3.1.1.4 Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.)

A. cepa L. ako terestrický zástupca rastlinnej ríše je využívaný v testoch fytotoxicity, ktoré slúžia k testovaniu ekotoxicity v akvatickom usporiadaní. Pre testovanie sa používajú približne rovnako veľké cibulky, 15 až 22 mm veľké a 2 až 4 g vážiace.

Testovanie prebieha v skúmavkách naplnených kontrolným a testovaným roztokom. V rámci mojej diplomovej práce bola ako kontrola používaná kohútiková voda a ako testovaná látka, plazmou opracovaná kohútiková voda. Koncentračná rada nebola vytváraná a bola porovnávaná iba 100 % PAW oproti kontrole. Toto rozhodnutie bolo uskutočnené na základe výsledkov testov na *Lactuca sativa* (viď nasledujúca kapitola), kedy rozdiely v dĺžke koreňkov v jednotlivých koncentraciách koncentračnej rady neboli nijak významné. Test bol modifikovaný a to tak, že zo štandardných 72 hodín predĺžený na 168 hodín (7 dní) a to z toho dôvodu, že pri kratšom pôsobení PAW na organizmy nebol badateľný rozdiel v dĺžke koreňkov oproti kontrole.

Príprava riediacej vody

Ako riediaca voda bola použitá kohútiková voda, ktorá bola opracovaná plazmou.

Nasadenie testu

24 hodín pred nasadením testu boli vybrané vhodné cibulky v počte 12 kusov na kontrolu a 12 kusov na testovaný 100% roztok. Opatrne bola ošúpaná vrchná vrstva, boli ponechané vo vode a skladované pri teplote 7 °C, aby sa oživilí zárodočné bunky korenkov. Nasledujúci deň boli cibulky umiestnené na vrchnú časť skúmaviek tak, aby sa spodnou časťou dotýkali hladiny vody a boli presunuté na okno s prirodzeným svetelným režimom. Po 7 dňoch bola zmeraná dĺžka korenkov.



Obr. 12: Nasadený test *Allium cepa* L.

3.1.1.5 Test inhibície rastu koreňa *Lactuca sativa* (obdoba testu s *Sinapis alba*)

Tento test je variantou testu inhibície rastu koreňa horčice bielej. Test a aj vyhodnocovanie prebieha rovnako, len testovacím organizmom je šalát siaty. V rámci testu bola použitá neopracovaná kohútiková voda KV (kontrola), plazmou aktivovaná KV, neopracovaná riediaca voda RV (kontrola) a opracovaná RV. Spočiatku bola vytvorená koncentračná rada 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 % ale rozdiely v dĺžkach korenkov v kontrole a jednotlivých koncentráciách boli nepatrné. Z toho dôvodu bola v ďalších testoch používaná iba 100% koncentrácia opracovaných testovaných kvapalín (riediaca voda alebo kohútiková voda), neopracovaná riediaca a kohútiková voda boli použité ako kontrola. Vďaka týmto výsledkom bolo možné podobne postupovať aj s *A. cepa* L (viď kapitola 3.1.1.5 Test inhibície elongácie koreňa cibule kuchynskej). 24 hodín pred samotným nasadením testu je potrebné semenka šalátu nechať predklíčiť.

Príprava riediacej vody

Riediacia voda je pripravovaná podľa normy ISO 6341, teda rovnaká ako pre *D. magna*. Skladá sa zo štyroch zložiek: 2,59 g/l NaHCO₃, 11,76 g/l CaCl₂·2H₂O, 4,93 g/l MgSO₄·7H₂O a 0,23 g/l KCl.

Nasadenie testu

Do Petriho misiek boli vložené vystrihnuté kruhové filtračné papiere, na ktoré bol pipetou nadávkovaný testovaný roztok v množstve 6 ml. Na ovlhčený filtračný papier bolo opatrne umiestnených 30 semienok šalátu siateho. Petriho misky boli prekryté vrchným dielom a inkubované v termostate pri teplote 20-22 °C po dobu 7 dní. V prípade testu s koncentračnou radou 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 % mala každá koncentrácia 2 opakovania (60 semienok na jednu koncentráciu). V teste, kde boli testované koncentrácie zredukované na 0 a 100 % bolo vykonaných 5 opakovaní (150 semienok na jednu koncentráciu). Po uplynutí 7 dní bola zmeraná dĺžka koreňov a ak to bolo možné, bola spočítaná hodnota IC50. Výpočet priemernej dĺžky koreňa je rovnaký ako pri *A. cepa L.* (viď kapitolu 2.3.7 Test inhibície elongácie koreňa cibule kuchynskej (*A. cepa L.*)).

3.1.2 Testy ekotixicity v terestrickom usporiadaní

Príprava pôdy

V rámci testov v kontaktnom usporiadaní bola používaná prírodná štandardná pôda LUFA 2.2 a LUFA 2.3. Najskôr boli zhomogenizované, vysušené a nakoniec zvážené. LUFA 2.2 a 2.3, sú vhodným prostredím na prevedenie testov v kontaktnom usporiadaní na pôdnych organizmoch. LUFA 2.2 bola použitá v testoch na živočíšnych organizmoch *E. fetida* a *F. candida*. LUFA 2.3 je vhodná pre rastlinné organizmy a preto bola použitá iba v screeningovom teste klíčivosti na šaláte siatom *L. sativa*.

Stanovenie maximálnej vodnej kapacity pôdy (VKP_{max})

Pred tým ako bola LUFA 2.2 a 2.3 v jednotlivých testoch ovlhčená, bolo nutné stanoviť maximálnu vodnú kapacitu pôdy. VKP_{max} je údaj predstavujúci množstvo kvapaliny, ktoré je pôda schopná maximálne udržať vo svojich póroch.

Pre jej stanovenie je v prvom rade potrebné vypočítať sušinu pôdy. Suché prázdne sklenené valčeky boli zvážené na analytických váhach a bola zapísaná ich hmotnosť. Následne bolo do valčekoch nasýpaných 50,0 g štandardnej prírodnej pôdy. Valčeky boli presunuté do nádoby s vodou tak, aby hladina vody siahala do výšky nasypanej pôdy. Po uplynutí 3 hodín boli valčeky presunuté na piesok, kde boli ponechané ďalšie 3 hodiny. Na záver boli v polhodinových intervaloch zvážené naplnené nasiaknuté valčeky. Vážené boli do toho momentu, dokiaľ sa ich hmotnosť neustálila. Následne sa vypočíta percentuálne zastúpenie sušiny podľa vzťahu :

$$VKP_{max} = \frac{S - T - D}{D} \cdot 100 \quad (10.1)$$

kde VKP_{max} je vodná kapacita pôdy (%), *S* je hmotnosť valca s nasýtenou pôdou (g), *T* je hmotnosť vysušeného valca (g) a *D* je hmotnosť suchej vzorky (50,0 g) [30].

VKP_{max} LUFA-i 2.2 bola stanovená na 16,12 ml na 100 g pôdy a LUFA-i 2.3 na 13,68 ml na 100 g pôdy [40].

3.1.2.1 Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (*Lactuca sativa*)

Veľkou výhodou screeningového testu klíčivosti šalátu siateho je ľahká dostupnosť semien, nenáročné prevedenie testu a cenová dostupnosť.

Predklíčenie semien a nasadenie testu

Pred nasadením testu bolo potrebné nechať semienka šalátu predklíčiť. Semienka boli predklíčené na filtračnom papieri ovlhčenom destilovanou vodou v Petriho miske a boli ponechané klíčiť 22 až 24 hodín v tme za laboratórnej teploty. Po vyklíčení boli vybrané také semená, ktorých koreň nepresiahol 2 mm.

Pred samotným nasadením testu boli pripravené plastové nádoby s pôdou nasýtenou na 70 % VKP_{max}. Do každej nádoby bolo navážených 400 g pôdy LUFA 2.3 a pravidelne rozložených 15 semienok šalátu do vyhlbených jamiek. Plastové nádoby boli prikryté potravinárskou fóliou a vložené do termostatu vyhriateho na 24 °C. Takýmto spôsobom bola pripravená kontrola, ktorá bola nasýtená destilovanou vodou a nádoby s testovanou opracovanou kohútikovou vodou, v 3 opakovaniach pre PAW a 4 opakovaniach pre kontrolu. Test bol vyhodnotený po 120 ± 2 hodinách [41].



Obr. 13: Nádoba na začiatku nasadenia testu s predklíčenými semenami *Lactuca sativa* (vlastný zdroj).

3.1.2.2 Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej (*Eisenia fetida*)

Test únikového správania na dážd'ovkách hnojných je rýchly screeningový test, ktorý odráža biologickú dostupnosť kontaminantu v pôde. Jeho princípom je vystavenie určitého počtu dospelých jedincov *E. fetida* pôde, ktorá je kontaminovaná testovanou toxickou látkou a pôde kontrolnej, ktorá je nasýtená kohútikovou vodou [23].

Príprava pôdy a nasadenie testu

V pripravenej miske bolo zmiešaných 250 g pôdy LUFA 2.2 s takým množstvom plazmou opracovanej kohútikovej vody, aby VKP nepresiahlo 50 %. Pôda bola dôkladne premiešaná a vložená do jednej polovice plastovej nádoby, ktorá bola predelená vystuženou papierovou priehradkou. Do druhej polovice bola vložená rovnako pripravená pôda ale ovlhčená iba kohútikovou vodou. Týmto spôsobom bol pripravený test s výslednou hmotnosťou 500 g. Podobne bola pripravená kontrola, ale miesto PAW bola v oboch poloviciach nádoby čistá kohútiková voda.

Po vybratí priehradky, bolo do vzniknutej priehlbiny vložených 10 jedincov s hmotnosťou 300 ± 10 mg a nádoba bola prikrytá potravinárskou fóliou. Všetky nádoby boli uchovávané v klimatizovanej miestnosti za stáleho svetelného režimu po dobu 48 hodín pri teplote $24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na záver bola vypočítaná miera únikovosti. Kontrola bola nasadená v 2 opakovaníach a testovaná látka v počte 6 opakovaní.



Obr. 14: Jedince *Eisenia fetida* vložené do plastovej nádoby a následne prekryté potravinárskou fóliou (vlastný zdroj).

3.1.2.3 Test únikového správania na chvostoskokoch (*Folsomia candida*)

Test prebieha veľmi podobne ako Test únikového správania na dážďovke hnojnej. Pracuje sa však s oveľa menším množstvom pôdy, a preto sú ako nádoby postačujúce Petriho misky.

Príprava pôdy a nasadenie testu

Do Petriho misiek bolo navážené také množstvo pôdy, aby pôda siahala približne 5 mm od okraju misky. Pôda LUFA 2.2 bola navlhčená takým množstvom roztoku, aby bolo ľahké vytvoriť priehradku a aby sa povrch pôdy príliš neleskol. Do stredu Petriho misky bola vložená papierová priehradka, prvá polovica pôdy navlhčená testovaným roztokom (plazmou opracovaná KV), druhá kohútikovou vodou a boli opatrne nasýpané do Petriho misky. Po vytvorení dostatočnej medzery, bola papierová priehradka vybraná. Pomocou detskej nosovej odsávačky bolo chytených 10 dospelých jedincov a prenesených do vzniknutej medzery. Petriho misky boli prekryté vrchným dielom a vložené do inkubátoru pri teplote $20\text{-}22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 48 hodinách bola do medzery opäť vložená papierová priehradka, pôda spolu s organizmami

bola opatrne prevedená na flotačné misky a boli spočítané jedince. Na záver je vyhodnotený vplyv kontaminovanej pôdy na únikové správanie *F. candida* a je vypočítaná únikovosť [34].

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci tejto diplomovej práce boli testované ekotoxické účinky plazmou aktivovaných roztokov a to prostredníctvom ôsmich vybraných testov ekotoxicity. Päť z nich bolo vykonaných v akvatickom usporiadaní a zvyšné tri v kontaktnom usporiadaní. V akvatickom usporiadaní to boli testy toxicity Daphtoxkit FTM a Thamnotoxkit FTM, testy inhibície rastu koreňa *L.sativa* a inhibície rastu *L.minor*, a test inhibície elongácie koreňa *A.cepa* L. Pre kontaktné usporiadanie boli vybrané testy na organizmoch *E.fetida*, *F.candida* a *L.sativa*. Predmetom práce a experimentov bolo posúdenie ekotoxického pôsobenia rôznych roztokov, ktoré boli aktivované plazmou.

Akvatické usporiadanie testov ekotoxicity

4.1 Test toxicity Thamnotoxkit FTM

Pre účely testu na organizme *T. platyurus* bola riediaci voda ošetrovaná plazmou a následne nariadená neošetrovanou riediacou vodou tak, aby testovaná koncentračná rada bola 25 %, 50 % a 100 %. Na základe mortalít príslušných danej koncentrácii bola vypočítaná hodnota 24hLC50, a to **185,72 ml/l**. Výsledky tohto testu sú uvedené v Tab. 2. Z výsledkov je zrejmé, že už pri 25% zriedení bola mortalita testovacích organizmov vysoká, dokonca pri 50% zriedení bola mortalita už 100 %. Koncentrácia peroxidu vodíka bola stanovená na 0,41 mmol/l a vodivosť na 300 μ S/cm.

Tab. 2: Výsledky testu na organizme *T. platyurus* – opracované živné médium

opakovanie	počet mŕtvych jedincov			
	koncentrácia [ml/l]			
	kontrola	250	500	1000
A	0	10	10	10
B	0	3	10	10
mortalita celkom	0/20	13/20	20/20	20/20
mortalita [%]	0	65	100	100

Ďalšie testovania boli opäť vykonané na opracovanom médiu avšak po uplynutí niekoľkých hodín až dní od opracovania. Dôvodom pre toto testovanie bol fakt, že v opracovanom médiu postupom času klesá množstvo H₂O₂ a preto bol predpoklad, že rovnako klesá jeho toxicita. Avšak z našich výsledkov, vyplýva, že i po 24 hodinách bolo opracované médium stále veľmi toxické. Ako je zrejmé z výsledkov uvedených v Tab. 3. v tomto opracovanom živnom médiu umreli všetky jedince, nielen v 100% koncentrácií, ale aj vo všetkých riedeniach.

Pre nedostatočný počet parciálnych mortalít nebolo možné vypočítať hodnotu LC50. Nie je úplne jasné, čo spôsobilo taký nárast mortality, keďže koncentrácia H₂O₂ sa zmenila len minimálne, a to 0,56 mmol/l s vodivosťou 290 μ S/cm.

Tab. 3: Výsledky testu na organizme *T. platyurus* – 24 hodín od opracovania média

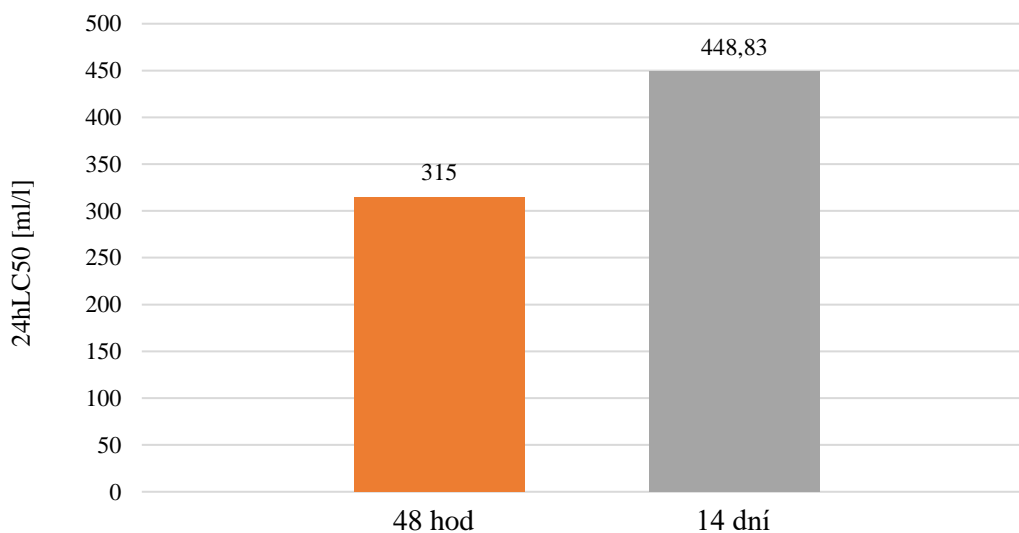
opakovanie	počet mŕtvych jedincov			
	koncentrácia [ml/l]			
	kontrola	250	500	1000
A	1	10	10	10
B	0	10	10	10
C	0	10	10	10
celkovo	1/30	30/30	30/30	30/30
mortalita [%]	3,33	100	100	100

Pre zaujímavosť bolo toto isté živné médium uchované v tme pri laboratórnej teplote a bolo použité na ďalšie testovanie v rôznych časových intervaloch. Ďalšie testy na organizme *T. platyurus* bol nasadené po 48 hodinách, po 14 dňoch a 18 dňoch.

Tab. 4: Výsledky testu na organizme *T. platyurus* v rôznych časových intervaloch od ošetrenia

po uplynutí	mortalita [%]					
	koncentrácia [ml/l]				24hLC50 [ml/l]	c H ₂ O ₂ [mmol/l]
	kontrola	250	500	1000		
24 hod	3,33	100	100	100	*	0,56
48 hod	0	25	100	100	315,0	0,57
14 dní	0	0	73,33	100	448,83	0,53
18 dní	0	0	10	55	*	0,32

* Hodnoty 24hLC50 nebolo možné vypočítať.



Obr. 15: Graf znázorňujúci výsledky testov na organizme TP s časovým rozostupom

Z Tab. 4 je možné vyvodit' záver, že s časom toxicita plazmou aktivovaných roztokov klesá. V prvých troch testovaniach (24, 48 hod a 14 dní) sa koncentrácia H₂O₂ líši iba minimálne, výrazný pokles je badateľný až po uplynutí 18 dní, kedynsa koncentrácia H₂O₂ ustálila na hodnote 0,32 mmol/l. Z týchto výsledkov je možné konštatovať, že toxicitu opracovaného média ovplyvňuje nie len vznikajúci peroxid vodíku ale aj iné látky, ktoré neboli sledované.

4.2 Test inhibície rastu Žaburinky menšej (*Lemna minor*)

Ako prvý bol vykonaný predbežný test na plazmou opracovanom živnom médiu, plazmou opracovanej kohútikovej vode ako kontrola slúžila neopracovaná riediaci voda/médium. V tomto prípade nebola vytvorená koncentračná rada - koncentrácie všetkých vzoriek boli 100 % . Z tohto dôvodu nebola hodnota $168hIC_{50}$ počítaná ale boli iba porovnané efekty jednotlivých roztokov na testovací organizmus.

Tab. 5: Výsledky predbežného testu na organizme *L. minor* – 100% roztoky

roztok	č. kadičky	počet lístkov	priemer	μ	$I\mu$	počet. nekrot. lístkov
RV	1	188	152	0,0168	0	4
	2	121				1
	3	147				1
Oprac. RV	1	138	90	0,0137	18,4	7
	2	53				3
	3	80				4
Oprac. KV	1	31	32	0,0075	55,5	24
	2	32				25
	3	32				29

Z Tab. 5 vyplýva, že najmenej sa žaburinke menšej darilo v opracovanej kohútikovej vode a to najmä pravdepodobne z toho dôvodu, že roztok neobsahoval dostatok živín. Hodnota inhibície rastu pri opracovanej kohútikovej vode bola stanovená na **55,5 %**, roztok teda na organizmus vplýval inhibične. I počet nekrotických lístkov bol u opracovanej kohútikovej vode najvyšší. V opracovanej riediacej vode bola inhibícia rastu stanovená na **18,4 %**. Rastline sa teda darilo lepšie v opracovanej riediacej vode než v opracovanej kohútikovej vode, no aj tak bol pozorovaný toxický účinok tohoto roztoku. Koncentrácia H_2O_2 v prípade opracovanej KV bola stanovená na 0,34 mmol/l a v prípade opracovanej RV na 0,40 mmol/l.

V ďalšom kroku bolo testovanie rozšírené o neopracovanú kohútikovú vodu. Pre všetky testované roztoky bola vytvorená základná koncentračná rada 0 %, 25 %, 50 a 100 %. Výsledky získané na organizme *L. minor* zhrňuje Tab. 6

Tab. 6: Výsledky testu na organizme *L. minor* – koncentračná rada

č.opakovania	kontrola/neopracovaná RV			
	počet lístkov	priemer	μ	$I\mu$
1	241	260	0,0200	0
2	278			
č.opakovania	opracovaná RV			
	c [ml/l]			
	250	500	1000	
1	234	256	150	
2	238	215	121	
priemer	236	236	136	
μ	0,0194	0,0194	0,0161	
$I\mu$ [%]	2,8	2,9	19,3 *	
č.opakovania	opracovaná KV			
	c [ml/l]			
	250	500	1000	
1	104	86	45	
2	93	74	44	
priemer	99	80	45	
μ	0,0142	0,0130	0,0095	
$I\mu$ [%]	28,8	35,0	52,5	
č.opakovania	neopracovaná KV			
	c [ml/l]			
	250	500	1000	
1	115	82	47	
2	78	72	41	
priemer	97	77	44	
μ	0,0141	0,0128	0,0094	
$I\mu$ [%]	29,4	36,1	52,8	

Keďže v tomto teste už bola vytvorená koncentračná rada, bolo možné vypočítať hodnotu 168hIC50. Výsledné hodnoty inhibičných koncentrácií sú uvedené v Tab. 7.

Tab. 7: Výsledné hodnoty 168hIC50

typ roztoku	168hIC50 [ml/l]
O - RV	*
O - KV	964,6
KV	935,0

*Keďže inhibícia rastu pri použití upravenej riediacej vody dosiahla v koncentrácii 1000 ml/l necelých 20 %, nebolo možné vypočítať hodnotu 168hIC50.

Z výsledkov vyplýva, že najväčší inhibičný účinok má neopracovaná kohútiková voda s hodnotou 168hIC50 **935 ml/l**. Tento fakt je pripisovaný neprítomnosti esenciálnych živín v roztoku kohútikovej vody. O niečo väčšiu hodnotu inhibičnej koncentrácie a to **964,6 ml/l**, má upravovaná kohútiková voda, čo značí väčší ekotoxický účinok než v predchádzajúcom prípade V upravenej riediacej vode sa *L. minor* celkom darí, v porovnaní s kontrolou je však

vidieť miernu inhibíciu rastu. Najhoršie podmienky boli v neopracovanej kohútikovej vode, čo je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené nedostatkom potrebných živín v roztoku.

Z výsledkov je zrejmé, že PAW na malé akvatické rastliny vplyva negatívne. V poľnohospodárstve sa PAW používa na zlepšenie rastu rastlín a má za cieľ zabíjať škodné organizmy a plesne. V tomto sa výsledky testu na *L. minor* rozchádzajú s výsledkami pokusov na terestrických rastlinách, kedy závlaha touto vodou mala za následok väčšiu prosperitu rastlín vzhľadom ku kontrolnej skupine [14].

4.3 Test toxicity Daphtoxkit F™

Ako prvý bol na organizme *D. magna* vykonaný predbežný test s koncentračnou radou 0 %, 25 %, 50 a 100 % opracovanej riediacej vody, kedy boli jednotlivé koncentrácie pripravené prostredníctvom riediacej vody.

Tab. 8: Výsledky predbežného testu na organizme *D. magna*

počet mŕtvych jedincov 24 hod				
koncentrácia [ml/l]				
opakovanie	kontrola	250	500	1000
A	0	3	5	5
B	0	3	5	5
C	0	2	5	5
mortalita celkom	0/15	8/15	15/15	15/15
mortalita [%]	0	53,33	100	100
počet mŕtvych jedincov 48 hod				
koncentrácia [ml/l]				
opakovanie	kontrola	250	500	1000
A	0	3	5	5
B	0	3	5	5
C	0	3	5	5
mortalita celkom	0/15	9/15	15/15	15/15
mortalita [%]	0	60	100	100

Z výsledku predbežného testu vyplýva, že úmrtnosť bola vysoká už pri 25% zriedení a z toho dôvodu bola vytvorená rozšírená koncentračná rada pre základný test 0 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 a 100 % opracovanej riediacej vody. Navyše bola opäť takto opracovaná riediacia voda ponechaná v tme pre testovanie s časovým rozstupom. Jednotlivé testy boli nasadené 24, 48 a 96 hodín od opracovania roztoku riediacej vody. Namerané hodnoty peroxidu vodíka, ako aj mortalita prevedená na probitové hodnoty pre jednotlivé časové intervaly sú uvedené v Tab. 9 a 10.

Tab. 9: Hodnoty testu na *D. magna* nasadeného s časovým rozstupom od opracovania testovaného roztoku (po 24 hodinách od nasadenia testu)

c [ml/l]	mortalita [%]			probity		
	24 hod	48 hod	96 hod	24 hod	48 hod	96 hod
62,5	20	30	45	4,158	4,476	4,874
125	20	15	30	4,158	3,964	4,476
250	85	95	15	6,036	6,645	3,964
500	100	100	40	7,894	7,894	4,747
1000	100	100	100	7,894	7,894	7,894
c H₂O₂ [mmol/l]	0,26	0,19	0,19	0,26	0,19	0,19

Tab. 10: Hodnoty testu na *D. magna* nasadeného s časovým rozstupom od opracovania testovaného roztoku (po 48 hodinách od nasadenia testu)

c [ml/l]	mortalita [%]			probity		
	24 hod	48 hod	96 hod	24 hod	48 hod	96 hod
62,5	35	45	85	4,615	4,874	6,036
125	50	40	75	5	4,747	5,674
250	85	95	70	6,036	6,645	5,524
500	100	100	85	7,894	7,894	6,036
1000	100	100	100	7,894	7,894	7,894
c H₂O₂ [mmol/l]	0,26	0,19	0,19	0,26	0,19	0,19

Z výsledkov testov je zrejmé, že plazmou opracovaná riediaci voda pôsobí na organizmus *D. magna* značne toxicky. Už pri nižších koncentráciách je mortalita testovacích organizmov pomerne veľká. Aj napriek časovému odstupu medzi testovaním, bola hodnota koncentrácie H₂O₂ takmer nemenná. To znamená, že peroxid vodíka je stály a dokáže sa v roztoku udržať po dobu niekoľkých dní. Ako vyplýva z tabuľky, k miernemu zníženiu ekotoxicity došlo až pri znížení testovanej koncentrácie na 50 %, a to iba u roztoku, ktorý bol testovaný 96 hodín od ošetrovania. Keďže mortalita nenarastala úmerne, nebolo možné stanoviť hodnoty. Podobne ako na organizmus *T. platyurus*, tak a ďalšieho zástupcu kôrovcov *D. magna* má PAW značné ekotoxické účinky a mortalita je vysoká už aj pri nízkych koncentráciách.

4.4 Test inhibície rastu koreňa *Lactuca sativa* (obdoba testu s *Sinapis alba*)

Ďalším z testov v akvatickom usporiadaní bol test na organizme *L. sativa*, ktorý už bol využitý v testoch v kontaktnom usporiadaní. V rámci tohto testu boli pozorované ekotoxické účinky nielen u opracovanej riediacej vody ale aj opracovanej kohútikovej vody. Ako kontrola bola použitá neopracovaná riediaci voda a neopracovaná kohútiková voda. Najprv bola vytvorená koncentračná rada 0 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 a 100 %. Táto koncentračná rada bola otestovaná celkovo v dvoch opakovaníach. Výsledky testu, v ktorom bola testovaná opracovaná riediaci voda a kontrolou bola neopracovaná RV sú uvedené v Tab. 11 a výsledky testu s testovanou opracovanou kohútikovou vodou v Tab. 12.

Tab. 11: Výsledky testu na *L. sativa* – opracovaná riediacá voda

koncentrácia	K		6,25 %		12,50 %		25 %		50 %		100 %	
č. opakovania	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
dĺžka koreňu [mm]	83	87	45	98	92	89	84	84	80	55	78	84
	69	71	84	46	82	85	71	85	27	68	92	62
	62	78	60	100	63	94	74	102	74	59	85	79
	81	76	27	74	46	70	70	80	91	84	70	80
	96	51	42	51	90	95	24	60	78	61	55	79
	70	66	76	92	55	66	90	68	95	75	40	71
	70	77	85	66	71	58	92	72	80	80	83	76
	95	73	85	85	45	87	96	80	51	64	77	71
	84	90	83	70	85	76	80	46	69	76	50	85
	95	73	76	90	95	50	62	71	78	76	65	70
	83	85	75	89	81	61	78	41	70	70	62	86
	86	81	67	76	51	68	75	77	89	84	63	82
	80	78	93	49	54	60	60	74	81	72	85	58
	69	74	57	38	82	85	45	73	82	84	65	66
	61	67	90	66	86	66	80	70	80	79	85	82
	80	81	79	70	75	50	73	61	81	72	95	74
	55	80	86	86	54	91	70	77	75	76	80	68
	60	90	78	74	22	70	97	67	94	65	61	70
	67	87	78	76	20	83	52	48	81	64	75	66
	75	29	60	80	12	74	65	64	72	70	80	70
	61	58	32	73	5	66	70	80	86	90	70	51
	80	18	69	45	57	75	35	82	90	75	38	52
	30	89	70	11	65	26	50	77	75	88	80	14
	66	25	31	74	64	7	13	70	75	74	78	10
	0	56	12	81	55	2	9	25	27	45	70	3
	0	86	10	0	0	2	6	10	11	2	60	0
	0	23	14	0	0	0	3	3	5	2	50	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	61	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	12	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	
priemer [mm]	58,6	61,63	55,47	58,67	50,23	55,2	54,13	58,23	63,43	60,33	65,93	53,63
priemer [mm]	60,12		57,07		52,72		56,18		61,88		59,78	

Tab. 12: Výsledky testu na *L. sativa* – opracovaná kohútiková voda

koncentrácia	K		6,25 %		12,50 %		25 %		50 %		100 %	
č. opakovania	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
dĺžka koreňu [mm]	76	80	70	77	66	70	77	63	55	52	67	65
	79	52	57	75	56	64	74	55	63	57	52	60
	54	58	65	54	75	59	70	70	75	59	77	51
	60	54	60	63	58	71	65	60	61	55	84	41
	53	56	43	50	63	56	64	53	74	13	53	60
	65	41	50	66	63	67	85	71	58	57	65	64
	61	60	65	60	59	50	62	57	69	65	45	56
	52	62	66	61	70	69	72	66	61	48	72	61
	55	52	62	52	42	62	73	45	50	74	56	50
	57	58	52	74	52	50	60	53	55	63	74	57
	56	68	63	69	61	69	79	47	58	50	54	62
	50	66	50	58	53	46	56	45	41	50	69	61
	60	69	60	47	55	67	57	37	56	57	69	58
	55	56	68	70	63	63	50	64	70	50	63	48
	36	56	58	57	61	49	73	51	57	62	56	53
	50	60	64	60	60	60	69	38	50	35	70	33
	56	62	71	60	62	51	76	58	50	55	85	49
	76	57	65	66	51	66	40	67	73	40	77	50
	60	57	53	76	66	70	57	47	82	57	68	55
	71	49	65	70	62	60	71	62	68	75	55	63
	70	65	61	65	60	63	63	24	38	56	41	60
	48	66	57	53	55	50	57	49	27	68	26	24
	64	54	58	70	53	51	44	54	18	50	38	31
	60	29	70	32	55	37	55	18	15	45	81	29
	50	25	51	26	26	30	50	8	32	45	18	27
	31	14	11	2	30	10	38	3	17	75	17	0
	12	10	12	0	21	1	22	2	3	25	13	0
	25	7	2	0	8	0	9	2	0	0	4	0
0	2	2	0	10	0	7	1	0	0	3	0	
0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
priemer [mm]	51,4	48,17	51,03	50,43	50,6	48,7	55,83	42,33	45,87	47,93	51,73	42,27
priemer [mm]	49,78		50,73		49,65		49,08		46,90		47,00	

Výsledky boli spracované prostredníctvom dvojvýberového Študentovho t-testu v programe Excel. Najskôr bol vykonaný test na homogenitu rozptylu výsledkov a následne bol zvolený vhodný variant t-testu pro porovnanie výsledkov daného riedenia oproti kontrole. Dĺžky korenkov žiadnej koncentrácie príslušnej riediacej rady sa neukázali štatisticky významne odlišné od kontroly na hladine významnosti $\alpha = 0,05$, preto v ďalších testoch bol zvýšený počet opakovaní a pracovalo sa už iba so 100% koncentráciou testovanej vody. Tieto testy boli vždy rovnako vykonané pre opracovanú kohútikovú vodu ako aj pre opracovanú riediacu vodu.

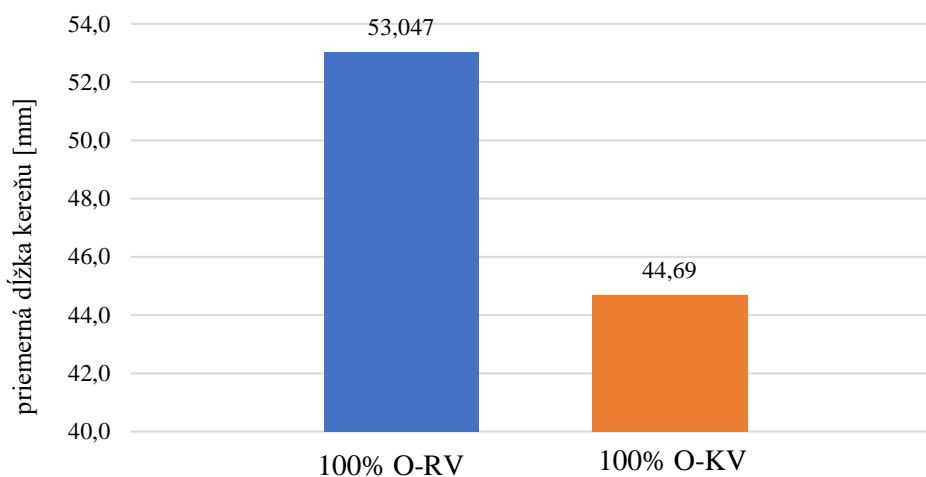
V ďalšom testovaní bola teda porovnávaná 100% opracovaná riediaci voda oproti kontrole (neopracovanej riediacej vode) a 100% opracovaná kohútiková voda oproti kontrole

(neopracovanej kohútikovej vode). V teste bol každý roztok testovaný v piatich opakovaniach, pričom na jedno opakovanie/jednu Petriho misku pripadlo 30 semienok šalátu siateho, tzn. pre testovaný roztok bolo získaných 150 dielčích výsledkov – dĺžok koreňkov, ktoré boli následne spriemerované.

V teste, ktorý bol vykonaný ešte na pôvodnej koncentračnej rade, bola dĺžka pôsobenia toxického roztoku ponechaná na 98 hodín. Keďže po 98 hodinách bol pozorovaný iba minimálny rozdiel v dĺžke koreňkov u testovaného roztoku oproti kontrole, bola doba pôsobenia predĺžená na finálnych sedem dní. V Tab 13 sú uvedené už iba priemerné hodnoty dĺžok koreňkov pre dané opakovania. Dielčie hodnoty sú uvedené v prílohe 2 a 3.

Tab. 13: *Namerané a vypočítané hodnoty priemerných dĺžok koreňka u L. sativa*

opracovaná riediaci voda										
konzentrácia	kontrola					100 %				
č.opakovania	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
priemer. dĺžka	49,63	50,8	46,6	42,3	57,47	54,53	53,1	57,03	47,83	52,73
koreňku [mm]	49,36					53,05				
opracovaná kohútiková voda										
konzentrácia	kontrola					100 %				
č.opakovania	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
priemer. dĺžka	37,1	41,33	42,7	41,8	31,83	45,83	53,9	38,57	39,37	45,8
koreňku [mm]	38,95					44,69				



Obr. 16: *Porovnanie priemerných dĺžok koreňov L.sativa pri použití upravovanej RV a KV*

Konzentrácia H₂O₂ v prípade upravovanej KV bola stanovená na 0,45 mmol/l a v prípade upravovanej RV na 0,14 mmol/l.

Z Tab. 13 vyplýva, že plazmou aktivované roztoky vplývajú na rastlinu šalát siaty stimulačne, keďže je oproti kontrole pozorovaný nárast priemernej dĺžky koreňku. Rovnako aj v tomto prípade boli výsledky spracované pomocou dvojitýberového t-testu, ktorý potvrdil, že rozdiel v dĺžke koreňkov v oboch prípadoch ošetrených roztokov je oproti kontrole štatisticky významný na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. V tomto sa výsledky meraní zhodujú so

spomínaným článkom autorov L. Sivachandiran a A. Khacef, ktorí uviedli, že opracovanie semien plazmou a zalievanie PAW je pre rastlinu prospešné [14]. V našom prípade sa stimulačný účinok preukázal až po tom, ako bola doba testovania predĺžená oproti požiadavkám metodiky testu na 7 dní.

4.5 Test inhibície elongácie koreňu cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.)

Posledným testom ekotoxicity v akvatickom usporiadaní je test inhibície elongácie koreňu *A. cepa* L. Toto testovanie bolo vykonané výhradne na opracovanej kohútikovej vode oproti kontrole (neopracovaná kohútiková voda) a to z praktického dôvodu. Je veľmi pravdepodobné, že by sa pri bežnej veľkoplošnej spotrebe PAW (no polia a sady) používala kohútiková voda, prípadne voda dažďová.

Keďže sa pri predchádzajúcom teste na organizme *L. sativa* ukázalo, že koncentračná rada nebola potrebná a rozdiely v dĺžke koreňov v jednotlivých koncentráciách boli minimálne a neboli štatisticky významné, boli vykonané testy iba so 100% PAW oproti kontrole.

Z časových dôvodov bol tento test vykonaný iba jedenkrát v počte 12 cibuliek na jednu koncentráciu. Podobne ako pri teste na *L. sativa*, bola doba pôsobenia testovanej toxikologickej látky predĺžená na sedem dní.

Koncentrácia H₂O₂ opracovanej KV bola stanovená na 0,27 mmol/l.

Tab. 14: Namerané a vypočítané priemerné dĺžky koreňov *A. cepa* L.

dĺžka koreňu [mm]	kontrola		100% PAW	
		75	34	79
	36	0	55	65
	49	41	34	52
	38	74	63	60
	40	44	59	62
	50	68	14	63
\bar{L} [mm]	45,75		53,0	

Na základe nameraných výsledkov bola vypočítaná hodnota inhibície rastu koreňa v danej koncentrácii, a to na **-15,85 %**. Zo zápornej hodnoty inhibičného účinku vyplýva, že plazmou aktivovaná riediaci voda pôsobí na rastlinu cibule kuchynskej stimulačne. Tento výsledok opäť potvrdil, že PAW pôsobí na rastliny prospešne. Ako aj v predchádzajúcom teste na *L. sativa*, pri predĺžení doby pôsobenia PAW a navýšení počtu opakovaní, by bol pravdepodobne pozorovaný ešte väčší stimulačný účinok.

Terestrické usporiadanie testov ekotoxicity

4.6 Screeningový test klíčivosti šalátu siateho (*Lactuca sativa*)

Screeningový test klíčivosti šalátu siateho bol vykonaný ako prvý test v terestrickom kontaktnom usporiadaní. Test bol vykonaný na kohútikovej vode. Ako kontrola bola znovu použitá neopracovaná kohútiková voda. Na základe predchádzajúcich skúseností testov v akvatickom usporiadaní, nebola vytvorená koncentračná rada, ale test bol nasadený do 100%

roztoku oproti kontrole. Do jednej misky bolo nasadených 15 semienok *L. sativa*, v prípade kontroly v štyroch opakovaní a v prípade 100% PAW tri opakovania. Test bol prevedený v štandardnej dĺžke pôsobenia toxickej látky, teda 120 hodín (5 dní).

V Tab. 15 sú znázornené namerané a vypočítané hodnoty dĺžok korieňkov. Z výsledku testu je možné povedať, že medzi kontrolou a 100% PAW nebol pozorovaný a ani prostredníctvom Študentovho t-testu potvrdený štatisticky významný rozdiel. Ak by bola opäť predĺžená doba pôsobenia PAW, bol by pravdepodobne pozorovaný stimulačný účinok PAW na semienka šalátu. Rovnako ako to bolo v prípade nášho testu na *L. sativa* v akvatickom usporiadaní, alebo už v spomínanom článku autorov L. Sivachandiran a A. Khacef. Tieto predpoklady budú predmetom ďalšieho skúmania.

Koncentrácia H₂O₂ opracovanej KV bola stanovená na 0,24 mmol/l.

Tab. 15: Namerané hodnoty dĺžok korieňkov a vypočítané priemerných dĺžok korieňkov *L. sativa*

koncentrácia	kontrola				100 %		
č.opakovania	1	2	3	4	1	2	3
dĺžka koreňu [mm]	25	30	25	35	49	38	28
	54	39	42	22	37	40	42
	53	36	40	40	13	42	37
	53	42	36	35	27	36	34
	51	17	12	30	24	21	29
	32	53	33	39	39	29	45
	40	31	11	38	28	34	43
	52	46	35	42	43	36	40
	25	35	40	32	35	46	35
	35	50	32	27	24	18	16
	18	38	23	27	55	37	43
	45	21	25	50	50	33	43
	34	45	43	35	28	30	37
	31	55	26	34	57	31	37
	15	40	42	45	58	20	34
priemer. dĺžka korieňku [mm]	37,53	38,53	31	35,4	37,8	32,73	36,2
	35,62				35,58		

4.7 Test únikového správania na dážd'ovke hnojnej (*Eisenia fetida*)

V tomto ekotoxickom teste bol z priestorových dôvodov prevedený iba jeden základný test. Testovaným roztokom bola opracovaná kohútiková voda. Koncentrácia v únikovom teste bola 100 % oproti kontrole (neopracovaná kohútiková voda). Do jednej testovacej nádoby bolo nasadených 10 jedincov. V kontrolných meraniach, kedy bola v obidvoch poloviciach nádoby pôda, LUFA 2.2, ovlhčená neopracovanou kohútikovou vodou, bol celkový počet opakovaní dva. V meraniach, kedy bola do jednej polovice nádoby vložená pôda ovlhčená opracovanou KV a do druhej pôda ovlhčená neopracovanou KV, bol celkový počet opakovaní šesť. Testovacie organizmy boli vystavené účinku testovaného roztoku po dobu 48 hodín.

Tab. 16: Počty jedincov v jednotlivých pôdach únikového testu *E. fetida*

číslo opakovania	LUFA	testovaná matrica	priemer v LUFA	priemer test. matrica
PAW 100 %	1	6	3	7
	2	2		
	3	1		
	4	7		
	5	1		
	6	1		
kontrola	4	6	5	5
	6	4		

Z nameraných hodnôt bolo možné vypočítať mieru únikovosti testovaných organizmov v kontaminovanej pôde PAW, a to na **-40 %**. Zo zápornej hodnoty únikovosti vyplýva preferencia testovanej pôdy. Koncentrácia H₂O₂ opracovanej KV bola stanovená na 0,27 mmol/l. Z výsledkov vyplýva, že opracovaná kohútiková voda nepôsobí na jedince *E. fetida* negatívne. Kvôli presnejším a spoľahlivejším výsledkom by však v budúcnosti bolo potrebné vykonať ďalšie testy nielen únikového správania *E. fetida* s väčším počtom opakovaní, , ale rovnako aj testy, ktoré sú zamerané na dlhodobejšie pôsobenie, tzn. 14 dňový test akútnej toxicity a test chronický, ktorý je 2 mesačný a sú v ňom sledované aj iné endpointy ako je samotná únikovosť či mortalita, a to úbytok hmotnosti a úbytok počtu novo narodených jedincov na rodičovský organizmus.

4.8 Test únikového správania na chvostoskokoch (*Folsomia candida*)

Posledným testom ekotoxicity, ktorý bol vykonaný v rámci tejto diplomovej práce, bol test únikového správania na *F. candida*. Tento ten test bol vykonaný predovšetkým na podporenie výsledkov únikového testu na *E. fetida*. Rovnako ako pri únikovom teste na dážd'ovke hnojnej, bola aj v tomto teste použitá opracovaná kohútiková voda a neopracovaná kohútiková voda ako kontrola. Do jednej testovacej Petriho misky bolo nasadených 10 jedincov chvostoskokov. V referenčnej pôde LUFA 2.2 boli obidve polovice misky naplnené pôdou ovlhčenou neopracovanou kohútikovou vodou a táto slúžila ako kontrola. Do Petriho misiek, ktoré slúžili ako testovacia matrica, bola do jednej polovice vložená pôda ovlhčená opracovanou KV a do druhej polovice bola vložená pôda ovlhčená neopracovanou KV. Výsledky tohto testu sú uvedené v Tab.17.

Tab. 17: Počty jedincov v jednotlivých pôdach únikového testu *F. candida*

číslo opakovania	LUFA	testovaná matrica	priemer v LUFA	priemer test. matrica	
PAW 100 %	1	3	7	4	6
	2	4	6		
	3	5	5		
	4	4	6		
	5	3	7		
	6	5	5		
kontrola	1	5	5	4,5	5,5
	2	4	6		
	3	5	5		
	4	6	4		
	5	3	7		
	6	4	6		

Z nameraných hodnôt bolo možné vypočítať mieru únikovosti testovaných organizmov v kontaminovanej pôde PAW, a to na **-20 %**. Koncentrácia H₂O₂ opracovanej KV bola stanovená na 0,27 mmol/l. Výsledok tohto testu potvrdil, že organizmy majú tendenciu presúvať sa do tej polovice testovacej nádoby, kde sa nachádza opracovaná KV.

Na základe testu únikovosti *E. fetida* a *F. candida* môžeme usúdiť, že PAW nepôsobí na väčšie organizmy v pôdnom prostredí pri krátkodobom pôsobení (48 hodín) negatívne, tak ako to bolo pozorované pri menších vodných kôrovcoch *D. magna* a *T. platyurus* v akvatickom usporiadaní.

V prípade zástupcov rastlinnej ríše bola pozorovaná inhibícia rastu u malej sladkovodnej rastliny *L. minor* a stimulácia rastu koreňa u *L. sativa* testu v akvatickom usporiadaní. *L. minor* je na základe pozorovaní oveľa citlivejšia na zmenu životných podmienok než šalát siaty, ktorý je odolnejší. Je pravdepodobné, že na organizmy akvatického ekosystému bude PAW pôsobiť negatívnejšie ako na poľnohospodárske plodiny.

5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo načrtnúť teoretickú problematiku fyzikálnej plazmy a PAW s ohľadom na jej ekotoxické účinky. Na posúdenie týchto toxických účinkov boli využité ekotoxikologické biotesty s využitím zástupcov vodných a terestrických organizmov. Pomocou týchto ekotoxikologických biotestov je skúmaný negatívny vplyv rôznorodých chemických látok, v tomto prípade plazmou aktivovaných roztokov, na vodný a pôdny ekosystém, ktorý môže byť zasiahnutý pri používaní PAW ako postrekov alebo zálievok v poľnohospodárstve. Ako ukazujú doterajšie výsledky, plazmou aktivované roztoky môžu byť pre organizmy nie len prospešné ale aj toxické a ich ďalšie testovanie bude prínosné nie len pre organizmy žijúce v okolí poľnohospodárskych plôch (polí a sádov), ale v konečnom dôsledku aj pre ľudí.

Za zástupcov vodného ekosystému boli vybraté kôrovce *T. platyurus*, *D. magna* a rastlina žaburinka menšia *L. minor*. Zástupcami pôdneho ekosystému bol obrúčkavec dážďovka hnojná *E. fetida*, pôdny článkonožec *F. candida*, vyššia rastlina šalát siaty *L. sativa*, kuchynská plodina *A. cepa L.*

Testy boli prevedené podľa príslušných noriem. V prípade žaburinky menšej a *D. magna* boli vykonané predbežné aj základné testy. U ostatných organizmov boli vykonané iba základné testy. Z výsledkov testov vyplýva, že medzi najcitlivejšie organizmy patria drobné vodné kôrovce *T. platyurus* a *D. magna*, ktorých hodnoty mortalít boli vysoké aj pri veľkých zriedeniach PAW. Naopak na rastliny ako *L. sativa* a *A. cepa L.* pôsobila PAW stimulačne, čo je v súlade s výsledkami podobne zameraných štúdií a rovnako s poznatkami vychádzajúcich z praktického využitia takto opracovanej vody, kedy sa začína používať v poľnohospodárstve ako zálievka rastlín rastúcich na poliach, skleníkoch a v sadoch. Na pôdne organizmy *E. fetida* a *F. candida* taktiež nepôsobí toxicky, dokonca bolo v rámci testovania pozorované presúvanie sa testovacích jedincov do kontaminovanej pôdy. Je nutné však tieto výsledky brať iba ako predbežné, pretože sa jednalo o krátkodobé testy. Pre objektívne posúdenie je potrebné na týchto organizmoch vykonať dlhodobejšie testy, a to nielen akútne, kedy sa po 14 dňoch pozoruje nielen úmrtnosť, ale aj váhové rozdiely, oproti východiskovým stavom, ale rovnako i testy chronické, v ktorých sa okrem uvedených endpointov sleduje aj reprodukčná úspešnosť. Napriek tomu, však bolo dokázané, že PAW pôsobí toxicky predovšetkým na vodné organizmy. Naskytá sa teda otázka, do akej miery môže zalievanie polí a sádov plazmou aktivovanou vodou ohroziť necieľové organizmy žijúce v okolitých podzemných a povrchových vodách. Je preto potrebné túto otázku objektívne vyriešiť, kým sa využitie PAW v poľnohospodárskej praxi stane plošnou záležitosťou.

Aj napriek týmto otáznikom, sa PAW javí ako omnoho ekologickejšia a ekonomickejšia verzia postrekov a zálievok súčasne používaných v poľnohospodárstve. Na jej prípravu postačuje obyčajná kohútiková voda a zdroj elektrického výboju. Jej príprava je finančne dostupná a časovo nenáročná. V budúcnosti by mohla úplne nahradiť škodlivé pesticídy a hnojivá, ktoré ohrozujú nie len prírodu ale aj ľudský organizmus.

6 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] F. Judee, S. Simon, C. Bailly, T., Dufour *Plasma-activation of tap water using DBD for agronomy applications: Identification and quantification of long lifetime chemical species and production/consumption mechanisms*. Water research, Elsevier [online]. 2017, č. 47-59 [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.035>
- [2] *Plazma* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/s4r/plazma/?p=0>
- [3] Y. Xu, Y. Tian, R. Ma, Q. Liu, and J. Zhang, *Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, Agaricus bisporus*, Food Chem., vol. 197, pp. 436–444, 2016.
- [4] KOZÁKOVÁ, Zdenka, c 2006. *Study of chemical processes in electrical discharges in liquids: Studium chemických procesů v elektrických výbojích v kapalinách*: short version of Ph.D. Thesis. V Brně: Vysoké učení technické. ISBN 80-214-3224-1.
- [5] JOSHI, A.A., B.R. LOCKE, P. ARCE a W.C. FINNEY, 1995. *Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution*. Journal of Hazardous Materials [online]. 41(1), 3-30 [cit. 2019-01-17]. DOI: 10.1016/0304-3894(94)00099-3. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304389494000993>
- [6] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova and M. Clupek. *Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂*. Plasma Sources Science and Technology 23 (2014) 015019 (15pp) <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/1/015019>
- [7] VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. *Systém trysky pro generování plazmatu v kapalinách*. Původce vynálezu: doc. RNDr. František Krěma, Ph.D. Česká republika. Patentový spis CZ 305304 B6. Uděleno 10.06.2015.
- [8] T. Bogdanov a kol. *Microwave Plasma Torch Generated in Argon for Small Berries Surface Treatment*. Appl. Sci. 2018, 8(10), 1870; <https://doi.org/10.3390/app8101870>
- [9] KLOUDA, Pavel, 2017. *Fyzikální chemie*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko. ISBN 978-80-86369-24-2.
- [10] *A GUIDE TO pH MEASUREMENT - the theory and practice of laboratory pH applications* [online]. [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: https://www.mt.com/mt_ext_files/Editorial/Generic/1/Guides_to_Electrochemical_Analysis_0x000248ff00025c9a00093c4a_files/guideph.pdf
- [11] *Introduction to pH measurement*. National Instruments [online]. 2015, [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: <http://www.ni.com/white-paper/2870/en/>
- [12] R. Thirumdas a kol. *Plasma activated water (PAW): Chemistry, psysicho-chemical properties, applications in food and agriculture*. Trends in Food Science & Technology 77 (2018) 21-31; doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007

- [13] P. Vanraes, A. Bogaerts, *Plasma physics of liquids—A focused review*. Applied Physics Reviews **5**, 031103 (2018); doi: 10.1063/1.5020511
- [14] L. Sivachandiran , A. Khacef, *Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment*. RSC Advances, 2017, 7, 1822; doi: 10.1039/c6ra24762h
- [15] G. Kamgang-Youbi a kol. *Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges*. Letters in Applied Microbiology [online] č. 48, 2008, doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02476. [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2008.02476.x>
- [16] H. Yu a kol. *Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of Escherichia coli K12*. Journal of Applied Microbiology [online] č. 101, 2006, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03033.x [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2006.03033.x>
- [17] J. Hayes a kol. *Disinfection and toxicological assessments of pulsed UV and pulsed-plasma gas-discharge treated-water containing the waterborne protozoan enteroparasite Cryptosporidium parvum*. Journal of Microbiological Methods 94 (2013) 325-337. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.012. [cit. 2019-02-08]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213002297?via%3Dihub>
- [18] BELISOVÁ, M. *Ekotoxická pěnových hasebních prostředků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 35 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D..
- [19] *Experimentální modely ekotoxicity pro bezobratlé živočichy* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Bi5620/um/Ekotoxbiotesty-Bezobratli.pdf>
- [20] *Standard operational procedure: Thamnotoxkit FTM: Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Belgium: Microbiotests Inc., 1995.28 p.
- [21] *Thamnocephalus platyurus* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: http://www.ebpi.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=68
- [22] *LEMNA MINOR – okřehek menší/žaburinka menšia* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/lemna-minor/>
- [23] SVOBODOVÁ Z.: *Ekotoxikologie, praktická část cvičení I.*, Brno 2000, 70 stran, ISBN 80-85114-95-X
- [24] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Skriptum VŠCHT Praha, 2003. 226s.
- [25] ČSN EN ISO 20079 (757745). *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor)- Zkouška inhibice růstu okřehku*. Český normalizační institut, 2007.
- [26] T. Koláček. *Využití hrotnatky Daphnia magna v ekotoxikologických biotestech*. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR, 2015. [online] [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vyuziti-hrotnatky-daphnia-magna-v-ekotoxikologicky.pdf>

- [27] V. Motyčka. *Daphnia magna*. BioLib, 2017. [online] [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/en/image/id317104/>
- [28] MICROBIOTESTS INC. *DAPHTOXKIT FTM: Microbiotests*. Belgium, 2p. [online] [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <http://www.microbiotests.be/toxkits/daphtoxkitf.pdf>
- [29] *Lactuca sativa* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://eol.org/pages/468144/overview>
- [30] ISO 17126:2005. *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screenig test for emergence of lettuce seedlings (Lactuca sativa)*.
- [31] FRANC, Valerián.: *Systém a fylogenéza živočichov – bezchordáty* [online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <http://web.archive.org/web/20070410070650/http://www.fpv.umb.sk/kat/kb/text/knihy/Skripta/Scr.pdf>
- [32] ISO 17512-1: 2008. *Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*.
- [33] DOMENE, Xavier; ALCANIZ, Josep M. a ANDRÉS, Pilar. *Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan Folsomia candida*. Applied Soil Ecology. Vol. 35, Issue 3, March 2007, s. 461–472. doi: 10.1016/j.apsoil.2006.10.004
- [34] ISO 17512-2: 2011. *Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior – Part 2: Test with collembolans (Folsomia candida)*
- [35] Chun-Li Ye, De-Hui Dai, Wei-Lian Hu. *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (Allium cepa L.)*. Food Control. Vol. 30, Issue 1, March 2013, s. 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.033>
- [36] KOČÍ, V., RAKOVNICKÝ, T., ŠVAGR, A.. *Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba* [online]. VŠCHT v Praze, 2001 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/15r/Test%20semichronick%E9%20toxicity.htm>
- [37] *THAMNOTOXKIT F MICROBIOTESTS* [online]. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <http://www.microbiotests.be/toxkits/thamnotoxkitf.pdf>
- [38] ČSN EN ISO 20079 (757745). *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor)- Zkouška inhibice růstu okřehek*. Český normalizační institut, 2007.
- [39] *DAPHTOXKIT F MAGNA Test procedure* [online]. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <http://www.microbiotests.be/toxkits/Daphtoxkit%20F%20magna%20slide%20show.pdf>
- [40] ISO 11269-2:2012. *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effect of contaminated soil on the emergence and early growth of the higher plants*.
- [41] ISO 17126:2005. *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screenig test for emergence of lettuce seedlings (Lactuca sativa)*.
- [42] KOČÍ, V., MOCOVARÁ, K. *Ekotoxikologie pro chemiky*. 1st ed. Praha: VŠCHT Praha,

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PAW	<i>Plasma Activated Water</i> – Plazmou aktivovaná voda
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Reaktívne formy kyslíku
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> – Reaktívne formy dusíku
TP	<i>Thamnocephalus Platyurus</i>
DBD	<i>dielectric-barrier discharge</i> – Dielektrický bariérový výboj
PUV	<i>Pulsed-Ultraviolet light</i> – Pulzné ultrafialové svetlo
PPGD	<i>Pulsed-Plasma Gas Discharge</i> – Pulzný plazmový tlejivý výboj
KV	kohútiková voda
RV	riediaca voda
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> – Medzinárodná organizácia pre normalizáciu
LC50	letálna koncentrácia, pri ktorej umrie 50 % testovacích organizmov
IC50	inhibičná koncentrácia, ktorá spôsobí 50% zníženie rastu alebo rastovej rýchlosti v porovnaní s kontrolnou vzorkou
<i>A</i>	absorbancia
ϵ	molárny absorpčný koeficient pre danú vlnovú dĺžku [$\text{dm}^{-3} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
<i>l</i>	hrúbka kyvety [cm]
<i>c</i>	koncentrácia [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$]
<i>G</i>	vodivosť [S]
<i>R</i>	odpor [Ω]
μ	rastová rýchlosť
N_n	počet lístkov na konci testu
N_o	počet lístkov na začiatku testu
t_n	doba trvania testu v hodinách
I_μ	inhibícia <i>L. minor</i> pre danú koncentráciu
μ_c	rastová rýchlosť v kontrole
μ_i	rastová rýchlosť v danej koncentrácii
<i>I</i>	inhibícia (stimulácia) rastu koreňa [%]

L_c	priemerná dĺžka koreňa v kontrole [mm]
L_v	priemerná dĺžka koreňa v testovanej matrici [mm]
A	únikovosť [%]
N_0	predpokladaný počet jedincov v kontrole
N_x	počet jedincov nájdených v kontaminovanej matrici
NR	čistá odpoveď vyjadrená [%]
C	počet organizmov v referenčnej pôde
T	počet organizmov v testovanej pôde
N	celkový počet organizmov
\bar{L}	priemerná dĺžka koreňa vo zvolenej koncentrácii [mm]
L_i	dĺžka i-tého koreňa vo zvolenej koncentrácii [mm]
n	počet cibuliek vo zvolenej koncentrácii
\bar{I}_i	inhibícia rastu koreňa v danej koncentrácii [%]
\bar{L}_c	priemerná dĺžka koreňa v kontrole [mm]
\bar{L}_v	priemerná dĺžka koreňa v testovanej koncentrácii [mm]
VKP_{max}	vodná kapacita pôdy [%]
S	hmotnosť valca s nasýtenou pôdou [g]
T	hmotnosť vysušeného valca [g]
D	hmotnosť suchej vzorky [g]

PRÍLOHA 1 PROBITOVÁ TABUĽKA [42]

%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	30,0	4,476	70,0	5,524
0,4	2,348	31,0	4,504	71,0	5,553
0,6	2,488	32,0	4,532	72,0	5,583
0,8	2,591	33,0	4,560	73,0	5,613
1,0	2,574	34,0	4,588	74,0	5,643
1,2	2,743	35,0	4,615	75,0	5,674
1,4	2,803	36,0	4,642	76,0	5,706
1,6	2,856	37,0	4,668	77,0	5,739
1,8	2,903	38,0	4,695	78,0	5,772
2,0	2,946	39,0	4,722	79,0	5,806
2,5	3,040	40,0	4,747	80,0	5,842
3,0	3,123	41,0	4,772	81,0	5,878
3,5	3,188	42,0	4,798	82,0	5,915
4,0	3,249	43,0	4,824	83,0	5,954
4,5	3,305	44,0	4,849	84,0	5,994
5,0	3,355	45,0	4,874	85,0	6,036
6,0	3,445	46,0	4,900	86,0	6,080
7,0	3,524	47,0	4,925	87,0	6,126
8,0	3,595	48,0	4,950	88,0	6,175
9,0	3,659	49,0	4,975	89,0	6,227
10,0	3,718	50,0	5,000	90,0	6,282
11,0	3,773	51,0	5,025	91,0	6,341
12,0	3,825	52,0	5,050	92,0	6,405
13,0	3,874	53,0	5,075	93,0	6,476
14,0	3,920	54,0	5,100	94,0	6,555
15,0	3,964	55,0	5,126	95,0	6,645
16,0	4,006	56,0	5,151	95,5	6,695
17,0	4,046	57,0	5,176	96,0	6,751
18,0	4,085	58,0	5,202	96,5	6,812
19,0	4,122	59,0	5,228	97,0	6,881
20,0	4,158	60,0	5,253	97,5	6,966
21,0	4,194	61,0	5,278	98,0	7,054
22,0	4,228	62,0	5,305	98,2	7,096
23,0	4,261	63,0	5,332	98,4	7,144
24,0	4,294	64,0	5,358	98,6	7,197
25,0	4,326	65,0	5,385	98,8	7,257
26,0	4,357	66,0	5,412	99,0	7,326
27,0	4,387	67,0	5,440	99,2	7,409
28,0	4,417	68,0	5,468	99,4	7,512
29,0	4,447	69,0	5,496	99,6	7,652
				99,8	7,878

PRÍLOHA 2 Test na *L. sativa* – opracovaná riediaca voda (5 opakovaní)

koncentrácia	kontrola					100%				
č.opakovania	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
dĺžka koreňu [mm]	47	82	67	63	64	74	73	50	58	74
	56	74	54	72	62	81	60	38	65	58
	66	56	67	79	66	40	54	61	41	77
	40	61	79	75	50	63	71	64	57	66
	55	75	54	57	61	65	60	52	54	72
	64	63	65	70	56	65	50	69	67	60
	77	61	58	79	64	68	73	81	70	69
	64	52	72	78	62	65	65	56	62	65
	62	54	51	74	72	73	73	69	76	68
	65	49	39	66	64	80	77	70	64	58
	74	53	28	65	61	51	60	60	64	69
	40	60	68	72	64	67	70	74	80	85
	72	53	65	57	54	75	76	55	84	65
	50	42	67	70	56	34	67	67	65	70
	75	56	71	78	57	59	47	64	63	76
	50	33	86	78	73	56	55	70	70	60
	59	63	60	40	74	68	64	50	73	63
	56	65	61	21	79	60	70	74	50	71
	59	68	56	31	66	64	67	83	52	76
	52	55	63	10	55	68	65	79	61	57
	67	51	52	10	44	77	55	52	41	77
	63	62	21	17	61	78	39	55	36	43
	70	53	41	7	57	69	71	67	32	23
	69	55	20	0	71	31	73	69	25	25
	25	55	12	0	65	47	17	80	15	21
	10	73	12	0	41	21	18	51	8	11
2	0	9	0	74	25	19	26	2	16	
0	0	0	0	51	12	2	15	0	5	
0	0	0	0	0	0	2	10	0	2	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
priemer [mm]	49,63	50,8	46,6	42,3	57,47	54,53	53,1	57,03	47,83	52,73
priemer [mm]	49,36					53,05				

PRÍLOHA 3 Test na *L. sativa* – opracovaná kohútiková voda (5 opakovaní)

koncentrácia	kontrola					100%				
č.opakovania	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
dĺžka koreňu [mm]	68	53	56	66	61	32	55	74	58	53
	45	44	53	63	47	63	75	55	53	60
	54	55	56	65	50	70	68	55	55	51
	71	47	47	62	54	68	63	48	48	66
	50	57	58	56	59	74	45	54	55	55
	50	44	59	68	53	63	48	57	51	44
	65	44	27	60	50	69	76	60	61	55
	47	56	61	53	60	77	77	57	60	60
	54	53	69	58	56	38	77	54	57	60
	58	42	58	52	40	66	65	50	55	59
	52	38	46	57	57	43	70	36	75	55
	57	53	53	53	44	68	67	47	59	61
	52	46	55	45	57	44	75	53	47	64
	50	41	50	63	56	71	71	66	64	53
	45	46	57	51	52	48	62	51	58	61
	46	51	44	67	43	60	72	51	65	56
	41	45	54	58	20	70	56	56	60	58
	45	46	46	52	25	40	66	38	43	65
	40	51	51	51	23	60	60	42	56	47
	24	47	57	51	22	54	65	30	55	63
	27	40	55	49	10	72	57	39	19	37
	8	62	54	39	12	45	52	25	27	56
	17	50	46	8	2	46	59	30	0	53
	14	53	34	7	2	17	63	25	0	32
	16	11	35	0	0	10	14	2	0	48
	17	30	0	0	0	5	16	2	0	2
	0	19	0	0	0	2	15	0	0	0
	0	10	0	0	0	0	13	0	0	0
0	6	0	0	0	0	15	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
priemer [mm]	37,1	41,33	42,7	41,8	31,83	45,83	53,9	38,57	39,37	45,8
priemer [mm]	38,95					44,69				