

**Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta životního prostředí  
Aplikovaná ekologie**

**Ekotoxicita odpadních vod**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: MUDr. Magdalena Zimová, CSc.

Konzultant: Ing. Martina Wittlerová

Diplomant: Bc. Jana Hachová

**2016**

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jana Hachová

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Ekotoxicita odpadních vod**

Název anglicky

**Ecotoxicity of wastewater**

---

### **Cíle práce**

Cílem práce bude stanovení ekotoxicity u vybraných odpadních vod.

### **Metodika**

1. Výběr vhodných ekotoxikologických metod.
2. Odběr vzorků.
3. Provedení ekotoxikologických testů na vzorcích odpadních vod.
4. Vyhodnocení a zpracování výsledků.

**Doporučený rozsah práce**

cca 40

**Klíčová slova**

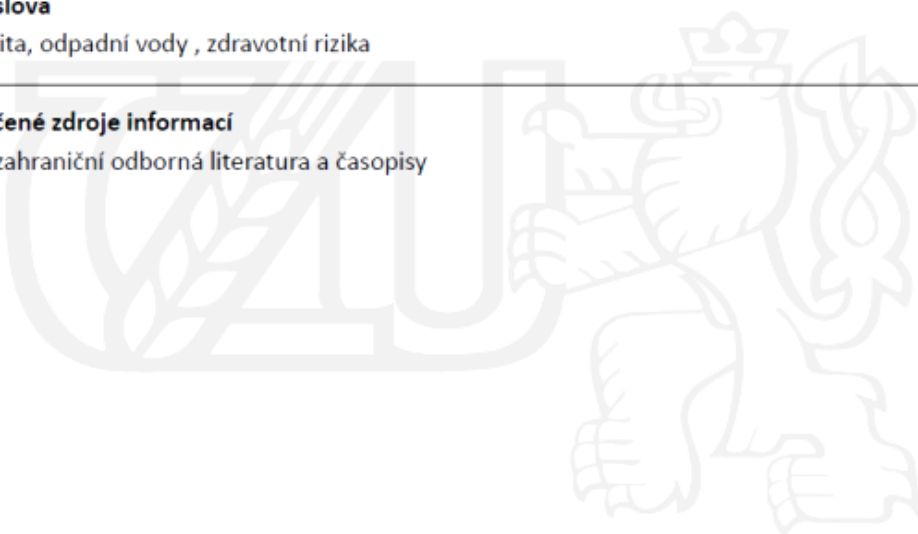
ekotoxicita, odpadní vody , zdravotní rizika

---

**Doporučené zdroje informací**

česká a zahraniční odborná literatura a časopisy

---



---

**Předběžný termín obhajoby**

2015/16 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

MUDr. Magdalena Zimová, CSc.

**Garantující pracoviště**

Katedra aplikované ekologie

---

Elektronicky schváleno dne 7. 1. 2016

**prof. Ing. Jan Vymazal, CSc.**

Vedoucí katedry

---

Elektronicky schváleno dne 22. 1. 2016

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Děkan

V Praze dne 08. 04. 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením vedoucí práce MUDr. Magdaleny Zimové, CSc. a konzultantky Ing. Marty Wittlerové s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Praze 15. 4. 2016

.....  
Bc. Jana Hachová

## **Poděkování**

Mé poděkování patří především vedoucí diplomové práce MUDr. Magdaleně Zimové, CSc. a konzultantce Ing. Martině Wittlerové za odborné vedení a za obrovskou trpělivost a Aleně Garbaczewské za pomoc při provádění testů. Dále bych ráda poděkovala mé rodině za podporu během studia.

## Abstrakt

Diplomová práce se zabývá ekotoxicitou odpadních vod se zaměřením na odpadní vody z Fakultní nemocnice v Motole.

FN Motol je největším zdravotnickým zařízením v republice a má tak největší produkci odpadních vod. Nemocniční odpadní vody obsahují řadu chemických látek, léčiv, dezinfekčních prostředků, těžkých kovů apod. a tyto látky nemusí být v procesu čištění vždy dokonale odstraněny. Takto kontaminované vody se dostávají do povrchových a podzemních vod a mohou představovat riziko pro životní prostředí.

V praktické části diplomové práce byly sledovány odpadní vody před dezinfekcí a odpadní vody po dezinfekci chlornanem sodným. Ekotoxikologické testy byly provedeny podle platných českých technických norem, metodického pokynu MŽP na zástupcích ryb (*Poecilia reticulata*), zooplanktonu (perloočka *Daphnia magna*), fytoplanktonu (zelená řasa *Desmodesmus subspicatus*), vyšších rostlin (hořčice bílá *Sinapis alba*) a bakterií (luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*).

**Klíčová slova:** ekotoxicita, odpadní vody, zdravotní rizika

# Abstract

This diploma thesis deals ecotoxicity wastewater with a focus on wastewater of Motol University Hospital.

Motol University Hospital is the largest hospital in the Czech Republic and has the largest production of wastewater.

Hospital wastewater contains many chemicals, pharmaceuticals, disinfectants, heavy metals etc.. And these substances cannot be completely eliminated during wastewater treatment. Such water is then taken into the surface and groundwater where it can be dangerous for the environment.

There were studied infectious wastewater before disinfection and discharged wastewater disinfected by solution of a sodium hypochloride.

Ecotoxicity was determined by acute toxicity tests which according to valid Czech technical standards, methodological guidelines and legislation. Tests were carried out to representatives of fish (aquarium fish *Poecilia reticulata*), zooplankton (daphnia *Daphnia magna*), phytoplankton (green algae *Desmodesmus subspicatus*), higher plants (white mustard *Sinapis alba*) and luminescent bacterium *Vibrio fischeri*.

**Keywords:** Ecotoxicity, wastewater, health risks

## Obsah

1.	Úvod.....	11
2.	Cíle práce .....	12
3.	Ekotoxikologie.....	13
3.1.	Význam ekotoxikologie .....	13
3.2.	Toxicita.....	13
3.3.	Testy ekotoxicity .....	14
3.4.	Ekotoxicita v české legislativě a v legislativě EU.....	17
4.	Odpadní vody.....	22
4.1.	Odpadní vody ze zdravotnických zařízení .....	22
4.2.	Odvádění a čištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení.....	23
4.3.	Ekotoxicita nemocničních odpadních vod .....	24
4.4.	Odpadní vody v legislativě ČR .....	27
5.	Metodika .....	28
5.1.	Odběr vzorků ve FN Motol .....	29
5.2.	Zpracování vzorků.....	29
5.2.1	Měření pH .....	30
5.2.2	Měření konduktivity .....	30
5.2.3	Stanovení volného chlóru .....	30
5.3.	Testy akutní toxicity .....	30
5.3.1	Příprava vzorků.....	31
5.3.2	Příprava ředící vody pro testy na akvarijních rybách, perloočkách a semenech, úprava vzorků.....	31
5.3.3	Příprava živného média pro test na zelených řasách .....	32



5.3.4	Příprava ředící vody pro test na bakteriích .....	33
5.3.5	Příprava koncentrační řady .....	33
5.3.6	Postup při testování toxicity .....	35
5.3.7	Test akutní toxicity na akvarijních rybách.....	36
5.3.8	Test akutní toxicity na perloočkách .....	39
5.3.9	Test inhibice růstu na sladkovodních zelených řasách .....	41
5.3.10	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé .....	44
5.3.11	Test inhibice světelné emise <i>Vibrio fischeri</i> .....	46
6.	Výsledky .....	53
6.1.	Výsledky testů akutní toxicity na akvarijních rybách .....	53
6.2.	Výsledky testů akutní toxicity na perloočkách.....	56
6.3.	Výsledky testů inhibice růstu na sladkovodních zelených řasách....	59
6.4.	Výsledky testů inhibice růstu kořene hořčice bílé.....	61
6.5.	Výsledky testů inhibice světelné emise <i>Vibrio fischeri</i> .....	61
6.6.	Výsledky testovaných odpadních vod na všech testovacích organismech.....	64
7.	Diskuze .....	65
8.	Závěr .....	69
9.	Literatura.....	70
10.	Přílohy.....	77

## Použité zkratky

ČOV	Čistírna odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
DP	Diplomová práce
EC <sub>50</sub>	(half maximal effective concentration)  Koncentrace, která negativně ovlivní 50 % testovaných jedinců v daném časovém úseku
FET	(Fish Embryo Acute Toxicity Test)
FN	Fakultní nemocnice
IC <sub>50</sub>	(half maximal inhibitory concentration)  Koncentrace, která způsobí 50 procentní inhibici růstu kořene <i>Sinapis alba</i> ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
ISO	The International Organization for Standardization
LC <sub>50</sub>	(lethal concentration)  Koncentrace, při které uhynie 50 % testovaných jedinců v daném časovém úseku.
LOEC	(Lowest Observed Effect Concentration)  Nejnižší testovaná koncentrace látky, při které bylo pozorováno statisticky významné nepříznivé působení na organismy ve srovnání s kontrolou.
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NOEC	(No Observed Effect Concentration)  Nejvyšší testovaná koncentrace látky, při které nedošlo ke statisticky významnému nepříznivému působení na organismy ve srovnání s kontrolou.
pH	Vodíkový exponent

## 1. Úvod

Voda je základní složkou životního prostředí. Ovlivňuje celou řadu organismů i procesů v přírodě. V civilizaci je voda ovlivňována působením člověka, který může svou činností výrazně toto prostředí výrazně poškodit.

S rostoucím počtem obyvatel se v civilizovaném světě rozšiřují i chemické látky - léčiva, která mají za úkol ochránit člověka před nemocemi. Jak uvádí Šídlová, Podlipná, Vaněk (2011), léčiva jsou zpravidla málo těkavé látky a šíří se vodním prostředím. Za pronikáním do prostředí stojí nejen vyšší spotřeba, ale často i nedokonalá likvidace. Léčiva, která nejsou degradována v ČOV, mohou následně kontaminovat všechna vodní prostředí - řeky, jezera, spodní vody i vody pitné. Tyto látky či jejich metabolity zde představují riziko pro organismy.

V EU je používáno v medicíně asi 3000 různých látek. Nejvíce analgetika, léčiva s protizánětlivým účinkem, kontraceptiva, antibiotika, betablokátory, neuroaktivní látky atd. (Šídlová, Podlipná, Vaněk, 2011). Zdravotnická zařízení mají na jejich vypouštění majoritní podíl.

## **2. Cíle práce**

Cílem diplomové práce bylo stanovení ekotoxicity vybraných odpadních vod. Za účelem dosažení tohoto cíle byly odebrány vzorky odpadních vod před ošetřením chlornanem sodným a vzorky odpadních vod ošetřené chlornanem sodným, se záměrem porovnat a vyhodnotit působení chlóru na testovací organismy.

Dalším cílem bylo srovnání výsledků testů na jednotlivých organismech a případné vytipování sady testů vhodné pro testování odpadních vod ze zdravotnictví.

Součástí této práce je i následné porovnání výsledků se závěry stejně zaměřených prací.

### **3. Ekotoxikologie**

Ekotoxikologie je interdisciplinární vědní obor, který kombinuje poznatky věd studujících ekosystémy (ekologie) a vědy studující interakce chemických látek s organismy (toxikologie) (Pavlíková a kol. 2008). V tomto se liší od klinické toxikologie, která se zabývá působením látek pouze na člověka. Součástí ekotoxikologie je i monitoring toxických látek v životním prostředí (Kočí, Mocová, 2009).

Termín ekotoxikologie poprvé použil dr. René Truhaut v roce 1969 a definoval ekotoxikologii jako vědu studující nepříznivé účinky chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva. Jejím cílem je sledovat, monitorovat, a předpovídat osud a vlivy cizorodých látek v prostředí (Moriarty, 1988).

#### **3.1. Význam ekotoxikologie**

Testování ekotoxických účinků je významné jak z hlediska ochrany životního prostředí, tak i z hospodářského hlediska. Poškození funkčnosti prostředí toxickými látkami má za následek i snížení schopnosti plnit důležité funkce, jako jsou např. kvalitní pitná voda a ovzduší, poskytování surovin atd. (Kočí, Mocová, 2009).

Hlavními cíli jsou poznání interakcí mezi živými organismy a chemickými/toxickými látkami v prostředí na všech úrovních a následné využití poznatků pro racionální ochranu živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů před chemickým znečištěním (Pavlíková a kol., 2008).

#### **3.2. Toxicita**

Toxicitou se rozumí účinek cizorodé látky na společenstva rostlin i živočichů. Toxicita se projevuje i bez vlivu člověka a to působením meziproductů při rozkladu těl organismů (látky jako  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$  a další). Tomuto jevu se říká přirozená toxicita (Štěpánek, 1979).

Toxicita se dělí podle rychlosti působení na organismus. Akutní toxicita je taková, u níž se působení látky projeví téměř okamžitě. Většinou v řádu minut až hodin. A to přímo na organismu, který je působení vystaven. Při tzv. chronické toxicitě se jedovatý účinek projeví v řádu týdnů až měsíců. Zde se účinek projeví až

na dalších vývojových generacích (problémy s plodností, změny na potomcích apod.) (Sládečková, Sládeček, 1997).

### **3.3. Testy ekotoxicity**

Pokud chceme hodnotit ekotoxikologické vlastnosti látek, používáme tzv. biologické testy toxicity (biotesty, bioassays, laboratorní zkoušky toxicity).

Principem biotestu je kontakt testované látky se zkušebním organismem. Z reakce organismu potom můžeme posoudit, jestli je testovaná látka toxická. Biotest většinou nedává informaci, která toxická látka je ve vzorku přítomná, k tomu je nutná chemická analýza (Hoffman a kol., 2003).

#### **Druhy testů**

Existují různé způsoby dělení ekotoxikologických testů. Mezi základní patří dělení:

- Podle doby expozice – akutní, semiakutní (semichronické) a chronické
- Podle pokročilosti testovacího systému (3 generace testů):
  - 1. generace – klasické (standardní) testy
  - 2. generace – mikrobiotesty
  - 3. generace – biosenzory, biosondy, biomarkery
- Podle trofické úrovně testovacích organismů – producenti, konzumenti a destruenti
- Podle testované matrice – voda, sediment, odpad, chemická látka, aj.
- Podle spektra testovacích organismů – jednodruhové, vícedruhové a to jak přírodní společenstva, tak i laboratorní směsi druhů
- Podle typu testovacího vzorku – přírodní vzorky, čisté chemické látky, směsi látek
- Podle způsobu přípravy vzorku – testování výluhů přírodních vzorků, definované koncentrace chemických látek
- Podle stupně komplexnosti zkoumaného systému – enzymy, biosondy, buňky a tkáně, živé organismy, populace, mikrokosmos a mezokosmos, terénní experimenty
- Podle způsobu vyhodnocování – letální efekt (mortalita, imobilizace), subletální efekt (chování organismu, např. rychlost pohybu), fyziologická aktivita (např. hodnocení přírůstku), reprodukční aktivita, teratogenita, malformace, aj. (Pavlíková a kol., 2008).

Dále můžeme testy rozdělit na testy akvatické (neboli výluhové) a testy terestrické (kontaktní).

Výluhové testy jsou takové, při kterých se pevné částice obsažené v testovaném vzorku převedou do kapalné formy. Tento způsob lze použít pouze u látek rozpustných ve vodě. U výluhu se případně upraví pH a přefiltruje se, následně je testován testem ekotoxicity na různých organismech. Testovacími organismy pro výluhové testy mohou být: bakterie, ryby, bezobratlí (koryši, měkkýši, prvoci), řasy, vodní rostliny (okřehek), suchozemské rostliny (hořčice). S cílem co nejvíce snížit množství obratlovců používaných pro testy ekotoxicity se zavádí tzv. alternativní metody. Příkladem alternativních metod je FET (Fish Embryo Acute Toxicity Test) – test využívající jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*; Hamilton-Buchanan 1922).

Při testech terestrických (kontaktních) dochází k přímému kontaktu testovaného vzorku s testovacími organismy. Není tedy nutné látky převádět do kapalného stavu. Terestrické testy se využívají především pro testování kontaminovaných zemín či odpadů. Mezi využívané organismy patří půdní bakterie (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* aj.), prvoci, hlísti, žížaly, roupice, chvostokoci. Pokud jsou testovacími organismy vyšší rostliny, pak jsou nejčastěji používané rody *Arabidopsis* a *Brassica* (Ratsch a kol., 1986; Shimabuku a kol., 1991; Matějů a kol., 2000).

Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování se u jednotlivých laboratoří, autorů, firem liší.

Testy zařazené do posuzovací sady by však měly splňovat alespoň některá z následujících kritérií:

- testovací organismy by měly být alespoň tří trofických úrovní – producent, konzument, destruent
- pro pevné materiály musí být vedle kontaktních testů použit alespoň jeden test s vodným výluhem testovaného materiálu, pokud to má smysl (není smysluplné použití vodného výluhu pro testování látek nerozpustných, či špatně rozpustných ve vodě)
- musí být vzata v úvahu časová náročnost provedení testů a časová dosažitelnost výsledků

- sada testů by měla být sestavena tak, aby postihla větší či menší citlivost testu na přítomný polutant (toto kritérium je nezbytné vzhledem k odlišné citlivosti bioindikátorů na polutant)
- výběr sady testů by měl být proveden s ohledem na to, k hodnocení jaké kontaminace mají výsledky sloužit (Pavlíková a kol., 2008).

### **Podstata testů**

Testy toxicity jsou založeny na zjištění  $EC_{50}$  (střední efektivní účinná koncentrace),  $LC_{50}$  (letální koncentrace) či  $IC_{50}$  (inhibiční koncentrace). Indexy představují koncentraci zkoušené látky, která má za následek 50 % úhyn, imobilizaci nebo inhibici růstu, a to ve vztahu ke kontrolnímu vzorku. Vliv toxické látky na inhibici klíčivosti ( $IC_{50}$ ) je zjišťován na semenech a vliv látky na úmrtnost či imobilizaci ( $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ) je zjišťován na akvarijních rybách, řasách, korýších či bakterii *Vibrio fischeri*. Hodnota efektivní koncentrace se doplňuje i dalšími hodnotami, např.  $EC_{20}$ ,  $EC_{10}$  nebo  $EC_5$  atd. Kde např.  $EC_5$  představuje koncentraci s 5 % úhynem testovaných jedinců v daném časovém úseku (Říhová, Ambrožová, 2009).

Dalšími údaji o akutní toxicitě jsou indexy popisující prahové hodnoty koncentrací NOEC (nejvyšší experimentální koncentrace, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek) a LOEC (nejnižší experimentální koncentrace, při které již byl pozorován škodlivý účinek) (Anděl, 2011).

### **Výhody testů**

Výhodou ekotoxikologických testů je jejich reprodukovatelnost, standardizace, možnost zpracování většího počtu vzorků a vytvoření základní informační srovnávací databáze, která slouží pro hodnocení vlivů různých nově vznikajících chemikálií na organismy (Anděl, 2011).

Kvalitativní a kvantitativní analýza testovaných vzorků může určit, jak nakládat s neznámým vzorkem, dále může sloužit i k odhadu budoucích toxických účinků (Kočí, Mocová, 2009).



## **Nevýhody testů**

Nevýhodou je, že výsledky ekotoxikologických testů většinou neodpovídají situaci v přírodě z hlediska účinků a chování chemické látky. Nejsou zahrnuty mezidruhové a vnitrodruhové interakce a další ekologické faktory, které mohou mít zásadní vliv na výsledný účinek (Anděl, 2011).

Za nevýhodu se dá do jisté míry považovat i náročné a pracné udržování chovů testovaných organismů, které se používají ve většině standardních ekotoxikologických testů (Anděl, 2011).

Zkoušky s vodným výluhem nepostihují toxicitu málo rozpustných a nerozpustných látek (např. polyaromatických uhlovodíků a hydrofobních organických látek typu chlorovaných pesticidů) (Matějů, Vosáhllová, Kyclet, 2005)

## **Sady testů**

Z důvodu přiblížení výsledků ekotoxikologických testů reálným podmínkám není zpravidla prováděn pouze jeden test na jednom organismu, ale používá se celá sada (neboli baterie) samostatných testů s různými druhy. Druhy jsou vybírány tak, aby reprezentovaly taxonomické i funkční složení ekosystému. Důležitou roli při výběru hraje postavení organismů v potravním řetězci (Anděl, 2011).

Na základě výsledků v dané sadě testů lze získat informace o širším spektru reprezentativních druhů a vytvořit si základní představu, v jaké koncentraci toxikantu se mohou objevit negativní vlivy (Anděl, 2011).

### **3.4. Ekotoxicita v české legislativě a v legislativě EU**

Právní rámec pro nakládání s odpady stanoví směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/98/ES o odpadech a o zrušení některých směrnic.

Ekotoxicita jako nebezpečná vlastnost odpadů je uvedena a označena kódem HP 14 v Nařízení Komise (EU) č. 1357/2014, kterým se nahrazuje příloha III směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/98/ES o odpadech a o zrušení některých směrnic.

Podle tohoto dokumentu je „ekotoxický“ ten odpad, který představuje nebo může představovat bezprostřední nebo pozdější rizika pro jednu nebo více složek životního prostředí (Nařízení Komise (EU) č.1357/2014).

V rámci EU neexistuje jednotný přístup pro testování ekotoxicity odpadů.

Důležitým dokumentem přispívajícím ke sjednocení postupů je evropská norma EN 14735:2005, vypracovaná technickou komisí CEN/TC 292 „Charakterizace odpadů“, kterou ČR převzala jako ČSN EN 14735 : Charakterizace odpadů – příprava vzorků odpadu pro testy ekotoxicity.

Tato norma popisuje nezbytné kroky, které je třeba provést před provedením testů ekotoxicity odpadů v souvislosti s hodnocením ekotoxikologických vlastností používaných v klasifikačním systému (ČSN EN 14735).

V právních předpisech ČR je zařazování odpadů a hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadů obsaženo v části druhé zákona č. 229/2014 Sb., kterým se mění zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů. Klasifikace nebezpečného odpadu na základě nebezpečných vlastností je popsána ve vyhlášce č. 83/2016 Sb., kterou se mění vyhláška č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění pozdějších předpisů.

Hodnocení nebezpečné vlastnosti HP 14 Ekotoxický také popisuje vyhláška č. 94/2016 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.

### **Vyhláška č. 94/2016 Sb.**

Dle přílohy č. 1 této vyhlášky se jako nebezpečný odpad s nebezpečnou vlastností HP 14 Ekotoxický hodnotí odpad:

a) na základě výpočtové metody uvedené v části čtvrté přílohy I Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, v platném znění (sumační metoda), nebo

b) v případě, že výpočtovou metodu podle písmene a) nelze použít, protože znečišťující nebezpečné látky nejsou klasifikovány podle přímo použitelného předpisu Evropské unie o klasifikaci, označování a balení látek a směsí nebo nejsou známy, odpad, u něhož se provede zkouška způsobem uvedeným v tabulce č. 1. nebo 2. a u něhož dojde za podmínek zkoušky k překročení limitních hodnot uvedených v příslušné tabulce alespoň pro jeden zkušební organismus.

**Tab. 1 Požadavky na výsledky zkoušek ekotoxicity**

Zkušební organismus	Doba působení	Limitní hodnoty
Ryba <i>Poecilia reticulata</i> , nebo <i>Brachydanio rerio</i>	96 hodin	$LC_{50} \leq 10\text{ml.l}^{-1}$
Perloočka <i>Daphnia magna</i> Straus	48 hodin	$EC_{50} \leq 10\text{ml.l}^{-1}$
Řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 hodin	$IC_{50} \leq 10\text{ml.l}^{-1}$
Semeno <i>Sinapis alba</i>	72 hodin	$IC_{50} \leq 10\text{ml.l}^{-1}$

(Vyhláška č. 94/2016 Sb.)

**Tab. 2: Požadavky na výsledky zkoušek ekotoxicity**

Zkušební organismus	Doba působení	Limitní hodnoty
Bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	15 a 30 minut	neprokáže se ve zkoušce inhibice světelné emise bakterií větší než 20 % při expozici 15 minut ani při expozici 30 minut
Perloočka <i>Daphnia magna</i> Straus	48 hodin	procento imobilizace perlooček nesmí ve zkoušce přesáhnout 20 %
Řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 hodin	neprokáže se ve zkoušce inhibice nebo stimulace růstu řas větší než 20 % ve srovnání s kontrolou
Salát <i>Lactuca sativa</i>	120 hodin	neprokáže se ve zkoušce inhibice nebo stimulace růstu kořene salátu větší než 30 % ve srovnání s kontrolou

(Vyhláška č. 94/2016 Sb.)

## Vyhláška č. 294/2005 Sb.

V tabulce č 10.2 přílohy 10 vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu jsou stanoveny požadavky na výsledky ekotoxikologických testů, které musí být splněny, aby odpad mohl být využit na povrchu terénu.

Testy akutní toxicity se provádějí s neředěným vodným výluhem odpadu. Požadavky jsou uvedeny v tab.3.

**Tab. 3: Požadavky na výsledky ekotoxikologických testů**

<b>Organismus</b>	<b>Doba působení</b>	<b>I</b>	<b>II</b>
<i>Poecilia reticulata</i> nebo <i>Brachydanio rerio</i>	96 hod	ryby nesmí vykazovat v ověřovacím testu výrazné změny chování ve srovnání s kontrolními vzorky a nesmí uhynout ani jedna ryba	ryby nesmí vykazovat v ověřovacím testu výrazné změny chování ve srovnání s kontrolními vzorky a nesmí uhynout ani jedna ryba
<i>Daphnia magna</i> <i>Straus</i>	48 hod	procento imobilizace perlooček nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	procento imobilizace perlooček nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
<i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i> nebo <i>Desmodesmus</i> <i>subspicatus</i>	72 hod	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu řasy větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice nebo stimulace růstu řasy větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
semena <i>Sinapis alba</i>	72 hod	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice nebo stimulace růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky

(Vyhláška č. 294/2005 Sb.)

Pokud jsou splněny požadavky uvedené ve sloupci I., mohou být odpady využity při uzavírání skládky k vytváření ochranné vrstvy kryjící těsnící vrstvu skládky a svrchní rekultivační vrstvy skládky.

Pokud jsou splněny požadavky uvedené ve sloupci II. mohou být odpady využity k rekultivaci vytěžených povrchových důlních děl (povrchové doly, lomy, pískovny) a ve svrchní rekultivační vrstvě v mocnosti minimálně 1 m od povrchu terénu při splnění požadavků stanovených ve sloupci I.

Odpady mohou být využity na povrchu terénu k terénním úpravám nebo rekultivacím lidskou činností postižených pozemků (s výjimkou rekultivace skládek), jestliže ve zkouškách akutní toxicity, prováděných ekotoxikologickými testy jsou splněny požadavky stanovené ve sloupci II. (Vyhláška č. 294/2005 Sb.).

### **Vyhláška č. 257/2009 Sb.**

Ekotoxikologické testy jsou uvedeny i ve vyhlášce č. 257/2009 Sb. o používání sedimentů na zemědělské půdě. Příloha č. 4 této vyhlášky stanovuje ekotoxikologické testy pro testování sedimentů (tab. 4)

**Tab. 4: Stanovení ekotoxikologických testů pro testování sedimentů.**

<b>Metoda</b>	<b>Kritérium toxicity</b>
Test toxicity půd a půdních materiálů na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i> (ČSN EN ISO 16387)	Sediment je ekotoxický pokud počet juvenilů ve směsném vzorku je významně nižší minimálně o 50 % v porovnání s kontrolou
Test toxicity půd a půdních materiálů na chvostoskoka <i>Folsomia candida</i> (ČSN EN ISO 11267)	Sediment je ekotoxický pokud počet juvenilů ve směsném vzorku je významně nižší minimálně o 50 % v porovnání s kontrolou
Stanovení inhibice nitrifikace v půdách a půdních materiálech (ISO 15685)	Sediment je ekotoxický, pokud nitrifikační aktivita směsi je významně nižší minimálně o 25 % než vypočítaná aditivní aktivita sedimentu a referenční půdy
Test inhibice růstu vyšších rostlin (ČSN EN ISO 11269-1)	Sediment je ekotoxický, pokud je průměrná délka kořene rostlin ve směsném vzorku významně nižší minimálně o 30 % v porovnání s kontrolou

(Vyhláška č. 257/2009Sb.)

V současné době probíhá novelizace vyhlášky č. 257/2009 Sb..

## 4. Odpadní vody

Jak definuje Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), odpadní vody jsou vody použité v obytných, průmyslových, zemědělských, zdravotnických a jiných stavbách, zařízeních nebo dopravních prostředcích, pokud mají po použití změněné vlastnosti (složení nebo teplotu).

Odpadními vodami jsou:

- všechny druhy vod odváděné stokovou sítí
- odčerpávané vody podzemní z hydraulické ochrany u průmyslových objektů – rafinérie, sklady ropných látek, odkaliště z rudných, energetických nebo chemických výrob, průzkumy těžební činnosti
- vody z drenážních systémů jako součástí k odvodnění podzemních staveb
- vody jakkoliv znečištěné z výrobního provozu
- tekuté odpady (kejda,...)

(Zákon č. 254/2001 Sb.)

Druhy odpadních vod

1. Splaškové odpadní vody (z kuchyní, koupelen, prádelen, WC, technické občanské vybavenosti)
2. Infekční vody (odpadní vody z infekčních oddělení nemocnic, tuberkulózních sanatorií, mikrobiologických laboratoří, výroben očkovacích látek z infikovaných zvířat, přidružených provozů apod.)
  - vody obsahující choroboplodné zárodky takového druhu a v takové míře, že vyžadují zvláštní opatření před vypuštěním do stokové sítě
3. Průmyslové odpadní vody (vody použité při výrobním procesu v průmyslových závodech)
4. Odpadní vody ze zemědělství a zemědělské výroby (kejda)
5. Dešťové vody

(Zákon č. 254/2001 Sb.)

### 4.1. Odpadní vody ze zdravotnických zařízení

V rámci této diplomové práce se zaměřuji na odpadní vody ze zdravotnických zařízení, jejichž jakost může být změněna hlavně dvěma skupinami látek – chemickými látkami a patogenními organismy a parazity.

Ve zdravotnických zařízeních jsou ve velké míře využívány chemické látky jako léčiva, desinfekční prostředky, radionuklidy a rozpouštědla (Emmanuel a kol., 2005).

Další rizikovou skupinou přítomnou v odpadních vodách ze zdravotnických zařízení jsou rezistentní druhy mikroorganismů, především různé druhy bakterií. Jejich riziko spočívá mj. v případném šíření rezistence vůči antibiotikům (Pauwels a Verstraete, 2006).

## **4.2. Odvádění a čištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení**

Odváděním a čištěním odpadních vod ze zdravotnických zařízení se zabývá norma ČSN 75 6406. Norma platí pro navrhování, výstavbu, sanaci a provoz samostatných čistíren odpadních vod, kanalizačních přípojek a stokových sítí pro zdravotnická zařízení produkující radioaktivní anebo infekční odpadní vody.

Z hlediska předpokládaného výskytu choroboplodných zárodků v odpadních vodách se dle normy ČSN 75 6406 zdravotnická zařízení dělí do dvou kategorií:

- Do I. kategorie se zařazují zdravotnická zařízení určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění a k manipulaci nebo zpracování infekčního materiálu, který obsahuje vodou přenosné původce chorob. Odcházející odpadní vody ze zařízení I. kategorie je nutno čistit a dezinfikovat, i když jsou v souladu s kanalizačním řádem vypouštěny do veřejné stokové sítě napojené na ČOV
- Do II. kategorie se zařazují zdravotnická zařízení, která nejsou určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění a manipulaci nebo zpracování infekčního materiálu, který obsahuje vodou přenosné původce chorob a kde se nepředpokládá významný výskyt těchto zárodků (např. neinfekční lůžková oddělení, zdravotnická střediska, lékařské ordinace, lázeňská zařízení, či nemocniční prádelny). Odcházející odpadní vody ze zařízení II. kategorie mohou být v souladu s kanalizačním řádem vypouštěny přímo a bez čištění do veřejné stokové sítě napojené na ČOV. Není-li stoková síť napojena na ČOV, musí být pro odpadní vody vybudována samostatná čistírna.

(ČSN 75 6406)

### **4.3. Ekotoxicita nemocničních odpadních vod**

Nemocniční odpadní vody jsou až patnáctkrát toxičtější než městské odpadní vody. Příčinou je pravděpodobně přítomnost dezinfekčních a pracích prostředků. (Panouilleres a kol., 2007).

Toxické látky se mohou hromadit v buňkách testovaného organismu, případně vyvolat synergický či antagonistický účinek s dalšími toxickými látkami (Zgórska a kol., 2011).

Jednotlivé sloučeniny obsažené v odpadních vodách se často vzájemně ovlivňují a fyzikální a chemické vlastnosti odpadních vod tak neodrážejí skutečné riziko pro životní prostředí. Skutečný účinek směsí různých sloučenin je možné zhodnotit jen pomocí baterie ekotoxikologických testů (Zgórska a kol., 2011).

Odpadní vody ze zdravotnických zařízení mají oproti jiným odpadním vodám své specifické znečišťovatele. Nejvýraznějšími jsou 3 skupiny látek - léčiva, dezinfekční prostředky a těžké kovy.

#### **Léčiva**

Léčiva používaná v humánní medicíně vstupují do prostředí většinou prostřednictvím vypouštěných odpadních vod z čistíren do vodních toků, což může vést k dlouhodobé expozici v nízkých dávkách (Matějů a kol., 2012).

Léčiva jsou vylučována pacienty do odpadních vod a někdy jsou nepoužitá léky dokonce likvidované spláchnutím do kanalizace. Tím léky vstupují do vodního prostředí a v případě, že nejsou biodegradovány nebo odstraněny v průběhu čištění odpadních vod, mohou se dostat až do pitné vody. Antibiotika a dezinfekční prostředky mohou narušovat proces čištění odpadních vod a mikrobiální ekologii v povrchových vodách (Kümmerer, 2001).

Léčiva jsou z organismu vyloučena z 30 – 60 % v nezměněné formě nebo jako metabolity a s exkrementy se prostřednictvím odpadních vod dostanou do prostředí. Léčiva nejsou snadno degradována v ČOV a mohou způsobovat kontaminaci povrchových i podzemních vod a dokonce i vod pitných (Šídlová a kol., 2011). Účinnost ČOV při odstranění léčiv z odpadních vod je 10-90% (Verlicchi, 2010)



Některá léčiva mohou být biodegradací či adsorpcí na kal v ČOV odstraněna, převážná většina však proniká dál do životního prostředí (Verlicchi a kol., 2012b).

Antibiotika jsou velmi obtížně biodegradovatelná. Jak uvádí XU a kol., 2007 až 16 skupin antibiotik bylo nalezeno v tocích, kalech i zeminách.

Další skupinou léčiv vyskytujících se v životním prostředí jsou hormony, které jsou vylučovány močí lidí i zvířat. Běžné procesy v ČOV odstraní až 85% estradiolu, estriolu a ethynylestradiolu. Evropské čistírny s krátkou dobou zadržení (14 h) ale hormony nedokážou úspěšně odstranit. (Matějů a kol., 2012).

Cytostatická léčiva jsou používána při terapii nádorových onemocnění. Problémem cytostatik pro životní prostředí je jejich neselektivita a tedy i potenciální karcinogenita, mutagenita a teratogenita pro všechny eukaryotické organismy (Šídlová, Podlipná, Vaněk, 2011).

Dalším problémem spojeným s léčivy je šíření patogenů rezistentních vůči antibiotikům (De Souza, 2005).

### **Dezinfekční prostředky**

V nemocnicích je používáno velké množství dezinfekčních prostředků. K dezinfekci prostředí, nástrojů, dezinfekci kůže apod. U dezinfekčních prostředků využívaných k dezinfekci prostředí hrozí, že se zbytky dezinfekce dostanou do odpadních vod. Hlavními složkami těchto prostředků jsou aldehydy, alkohol a chlór (Kümmerer, 2001).

Chlór ve vodním prostředí reaguje s organickými látkami, a vznikají tak halogenované organické sloučeniny (AOX), které jsou perzistentními kontaminanty životního prostředí a jsou toxické pro vodní organismy (Emmanuel a kol., 2004).

### **Těžké kovy**

Další skupinou látek vyskytujících se v odpadních vodách jsou těžké kovy. Problémy s touto skupinou látek tkví hlavně v prevenci jejich vnikání do vody, dále v kontrole a identifikaci jejich výskytu ve vodě a v určení, v jakém množství je jejich působení škodlivé.

Z těžkých kovů jsou za prioritní znečišťující látky zjištěné v nemocničních

odpadních vodách považovány chrom, měď, olovo, rtuť, nikl, stříbro a zinek (Emmanuel a kol., 2009).

Goullé a kol., 2012 zkoumali odpadní vody a pomocí ICP-MS analyzovali v odpadních vodách 34 různých kovů. Jako znečišťující látky spojené s odpadními vodami se zdravotnických zařízení označili platinu, rtuť a gadolinium. Ve svém výzkumu prokázali, že koncentrace těchto kovů je ve všedních dnech ve srovnání s komunálními odpadními vodami až 27 krát vyšší.

Za nejvíce toxické jsou považovány komplexy dvoumocných iontů rtuti a kadmia a jednomocných iontů stříbra, které jsou pro fyziologické funkce nebezpečné již při nízké koncentraci. Mají schopnost se v buňkách vázat na sulfhydrylové skupiny enzymů a tím poškozovat jejich aktivitu (Nies, 1999).

Všechny těžké kovy se při vyšších koncentracích vážou na buněčnou stěnu mikroorganismů a vytváří nespecifické struktury, které mohou brzdit růst či dělení. Toxicitu kovu určuje mnoho faktorů - například forma kovu ve vodě. Zda je anorganická, nebo organická, její rozpustnost apod. Dalším faktorem může být přítomnost jiných kovů nebo iontů a jejich vzájemná interakce. Dále fyzikální faktory (teplota, pH, salinita, světlo a přítomnost kyslíku). Tyto faktory ovlivňují, v jaké formě se těžký kov vyskytuje (Greenwood a Earnshaw, 1993).

Jak uvedli Greenwood a Earnshaw (1993), nebezpečí chromu spočívá v tom, že šestimocný chromový kation vytváří chromáty. Ty jsou snadno mobilizovatelné ve vodě i půdě, odtud pak pronikají do buněk, kde způsobují oxidativní poškození.

Olovo způsobuje poškození CNS, jater, ledvin, krve, anoxii, zácpu a křeče v břiše a poruchy krvetvorby, hromadí se v kostní tkáni, je i potenciální karcinogen (Šrámek a Kosina, 1996; Nies, 1999).

Rtuť inhibuje různé enzymy, způsobuje poruchy funkce ledvin a poškozuje mozek – dochází k poruchám zraku, sluchu, řeči i rovnováhy, objevují se i mentální poruchy (Nies, 1999).

Stříbro je pro organismus esenciální prvek, ve větším množství se ukládá do kostí a jater, kde tvoří sloučeniny s proteiny. Tato schopnost má za následek degradaci tkání. Některé sloučeniny stříbra jsou karcinogenní (Greenwood a Earnshaw, 1993).

Dle prací Greenwood a Earnshaw (1993) a Nies (1999) je zinek rizikovým prvkem z toho důvodu, že při vyšších koncentracích inhibuje transport elektronů v dýchacím řetězci.

Těžké kovy jsou rizikové i proto, že mikroorganismy vyvíjejí kvůli přítomnosti kovů v prostředí různé mechanismy, které jim umožňují přežít (Adarsh a kol., 2007). Toto zvýšení odolnosti pak může způsobovat i rezistenci mikroorganismů vůči antibiotikům (Sarma a kol., 2010).

#### **4.4. Odpadní vody v legislativě ČR**

Postupem pro určování znečištění odpadních vod, provádění odečtů množství znečištění a měření objemu se zabývá nařízení vlády č. 143/2012 Sb. o postupu pro určování znečištění odpadních vod, provádění odečtů množství znečištění a měření objemu.

Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), v platném znění se zabývá obecnou úpravou vod včetně vod odpadních. V tomto zákoně je vymezen pojem odpadní vody, zákon dále upravuje nakládání s odpadními vodami, jsou jím určeny podmínky pro vydávání povolení k vypouštění odpadních vod.

Poplatky za vypouštění odpadních vod do vod povrchových se zabývá vyhláška č. 123/2012 Sb. o poplatcích za vypouštění odpadních vod do vod povrchových, v platném znění.

Nakládání s odpadními vodami odváděnými do kanalizace upravuje zákon č. 275/2013 Sb., kterým se mění zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích).

Norma ČSN 75 7300 Jakost vod - Chemický a fyzikální rozbor - Všeobecná ustanovení a pokyny - určuje všeobecné zásady a požadavky pro stanovení hodnot chemických a fyzikálních ukazatelů jakosti vod. Uvádí kritéria pro výběr metody a pro posouzení její vhodnosti pro daný účel. Pozornost je věnována i některým zásadám nového chemického názvosloví, výpočtu a vyjadřování výsledků a prokazování a řízení jakosti (ČSN 75 7300).

## 5. Metodika

V návaznosti na práci Laboratoře hygieny půdy a odpadů ve Státním zdravotním ústavu byly testy prováděny na odpadních vodách z Fakultní nemocnice v Motole. Akutní toxicita byla testována na odpadních vodách před chlorováním a na vodách, které byly upraveny chlornanem sodným.

### ČOV ve FN Motol

Zkušební provoz čistírny odpadních vod FN Motol byl zahájen 24. 10. 1972. Trvalý provoz čistírny byl pak schválen od 4. února 1994 a byly pro něj stanoveny podmínky dle kanalizačního řádu. Celková denní skutečná produkce odpadních vod nepřevyšuje  $100 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  a vody jsou vypouštěny do splaškové kanalizace.

Splaškové kanalizace a odpadní vody jsou v areálu děleny do dvou skupin.

- Infekční splaškové odpadní vody – Vody z objektů zařazených dle ČSN 756406 jako zařízení I. kategorie. Vody jsou zpracovávány odděleně v biologické čistírně. Denní produkce v rozmezí  $50 - 100 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ . Voda je v ČOV předčištěna, desinfikována a vypuštěna samostatnou stokou (stoka č. 1) do městské kanalizace.
- Prosté splaškové vody – Vody předčištěny pouze mechanicky a jsou dále z objektu nemocnice (stoka č. 2) vypouštěny do městské kanalizace.

Hlavní technologické soubory čistírny

- česlovna infekčních splaškových vod
- měření přítoku infekčních splaškových vod
- štěrbínové nádrže
- biologický filtr
- dosazovací nádrže
- chlorovna s chlorační jímkou a jímkou zdržení
- zařízení na pasterizaci kalu
- strojovna čerpadel
- česlovna neinfekčních splaškových vod

(Provozní řád ČOV FN Motol, 2001)

## 5.1. Odběr vzorků ve FN Motol

Odpadní vody byly odebírány na odtoku z ČOV ve Fakultní nemocnici Motol. Byla odebírána voda z dosazovací nádrže před chlorací a voda na odtoku z ČOV, která již byla ošetřena roztokem chlornanu sodného. Vzorky byly odebírány mezi 11 a 12 hodinou ve třech termínech (čtvrtek 17. 9. 2015, středa 18. 11. 2015 a čtvrtek 11. 2. 2016). Odběry byly prováděny pověřeným zaměstnancem ČOV ve FN Motol a při odběru byly dodrženy pokyny pro odběr vzorků odpadních vod uvedené v ČSN ISO 5667-10.

Vzorky byly odebírány do 6 označených plastových kanystrů (pro každý vzorek 3 kanystry) o objemu 5 litrů. Před samotným odběrem byl stanoven obsah volného chlóru pomocí přenosného kolorimetru HACH.

Označení, data odběrů vzorků a jejich druhy jsou uvedeny v tab. 5.

**Tab. 5 Přehled odebraných vzorků, data odběrů a druhy vzorků**

Označení vzorku	Odběr	Místo odběru vzorku
2.3/15/857	Čtvrtek 17. 9. 2015	ČOV ve FN Motol - dosazovací nádrž
2.3/15/858	Čtvrtek 17. 9. 2015	ČOV ve FN Motol - odtok z ČOV
2.3/15/1135	Středa 18. 11. 2015	ČOV ve FN Motol - dosazovací nádrž
2.3/15/1136	Středa 18. 11. 2015	ČOV ve FN Motol - odtok z ČOV
2.3/16/235	Čtvrtek 11. 2. 2016	ČOV ve FN Motol - dosazovací nádrž
2.3/16/236	Čtvrtek 11. 2. 2016	ČOV ve FN Motol - odtok z ČOV

Odebrané vzorky odpadních vod byly převezeny do laboratoře Státního zdravotního ústavu, kde ihned probíhalo jejich další zpracování.

## 5.2. Zpracování vzorků

Vzorky byly zpracovávány v Laboratoři hygieny půdy a odpadů ve Státním zdravotním ústavu.

V laboratoři bylo u vzorků změřeno pH, změřena konduktivita a opět byl stanoven volný chlor pomocí přenosného kolorimetru HACH.

Vzorky byly rozlity do předem označených plastových vzorkovnic o objemu 500 ml a umístěny v mrazáku, kde byly konzervovány zmrazením pod  $-18^{\circ}\text{C}$ . Konzervace byla provedena dle ČSN EN ISO 5667-16.

### **5.2.1 Měření pH**

K měření pH odpadních vod byl použit pH metr inoLab pH Level 2 P se skleněnou elektrodou SenTix 61. Před samotným měřením pH probíhala kalibrace přístroje za pomoci dvou kalibračních roztoků firmy Hamilton. Jako první kalibrační roztok byl použit pufr o  $\text{pH } 7,00 \pm 0,01$  a poté pufr o  $\text{pH } 4,00 \pm 0,01$ . pH vzorků bylo měřeno při teplotě  $20,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **5.2.2 Měření konduktivity**

Měření konduktivity (elektrické vodivosti) bylo provedeno pomocí konduktometru inoLab Cond Level 2 P s platinovou elektrodou. Stanovení konduktivity je obvyklá součást chemického rozboru vod a umožňuje odhad koncentrace celkové mineralizace a iontově rozpuštěných látek ve vodách. Jednotkou konduktivity je  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  (či  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Konduktivita byla měřena při teplotě  $20,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **5.2.3 Stanovení volného chlóru**

Měření obsahu volného chlóru bylo provedeno pomocí přenosného kolorimetru HACH. Stanovení volného a celkového chlóru se provádí podle ČSN ISO 7393-2. Stanovení volného chlóru probíhá reakcí testovaného vzorku s N,N-diethyl-1,4-fenylendiaminem (DPD).

Reakční činidlo DPD v přítomnosti chlóru, kyseliny chlorné a chlornanů oxiduje za tvorby růžové sloučeniny. Množství obsahu chlóru odpovídá intenzitě zbarvení a je kolorimetricky měřeno při vlnové délce 510 nm.

## **5.3. Testy akutní toxicity**

Testování akutní toxicity odpadních vod z Fakultní nemocnice v Motole bylo prováděno pomocí následujících testů: test inhibice růstu sladkovodních zelených řas (*Desmodesmus subspicatus*), test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*),

luminiscenční test na bakterii *Vibrio fischeri*, test akutní toxicity na perloočkách (*Daphnia magna*), test akutní toxicity na rybách (*Poecilia reticulata*).

Metody testování akutní toxicity na těchto organismech byly vybrány s ohledem na zkušenosti pracoviště SZÚ. V ČR běžně používaná sada akvatických testů na čtyřech organismech byla rozšířena o luminiscenční test na bakterii *Vibrio fischeri*. Výhodou testování na tomto organismu je, že není založen na mortalitě. Lze tedy sledovat i slabé toxické účinky vzorků. Další výhodou je jeho rychlost. Výsledky jsou v řádu hodin. K testování stačí malý objem testovaného vzorku.

Testy akutní toxicity byly prováděny podle platných českých technických norem: ČSN EN ISO 8692 pro testy na *Desmodesmus subspicatus*, ČSN EN ISO 11348-2 pro testy s *Vibrio fischeri*. ČSN EN ISO 6341 pro testy na *Daphnia magna* a ČSN EN ISO 7346-2 pro testy na *Poecilia reticulata*.

Testy na semenech *Sinapis alba* byly prováděny dle Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů MŽP ČR 2007.

### **5.3.1 Příprava vzorků**

Potřebný objem vzorku byl za občasného mírného protřepávání rozmražen ve vodní lázni o maximální teplotě 25 °C. Po rozmražení a vytemperování na teplotu 20 ± 2°C byly vzorky obohaceny solemi či živinami.

### **5.3.2 Příprava ředící vody pro testy na akvarijských rybách, perloočkách a semenech, úprava vzorků**

Pro přípravu ředící vody a úpravu vzorků pro testy na akvarijských rybách, perloočkách a semenech byly používány čtyři zásobní roztoky solí, na jejichž přípravu bylo potřebné následující množství chemikálií (navážky na 1 litr zásobního roztoku). Konečné koncentrace odpovídají požadavkům Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (MŽP ČR, 2007), ČSN EN ISO 7346-2 a ČSN EN ISO 6341:

- Zásobní roztok č. 1: 117,6 g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O
- Zásobní roztok č. 2: 49,3 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O
- Zásobní roztok č. 3: 25,9 g NaHCO<sub>3</sub>
- Zásobní roztok č. 4: 2,3 g KCl

Obohacení zásobními roztoky spočívá v přidání potřebného množství výše uvedených zásobních roztoků solí do destilované vody (nebo do vzorku odpadní vody). Na 1 litr destilované vody (nebo vzorku odpadní vody) se dává 2,5 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků. Používaná destilovaná voda odpovídá 3. stupni jakosti podle ČSN ISO 3696.

Hodnota pH připravené ředící vody by měla být v rozmezí  $7,8 \pm 0,2$  pro testy na rybách a na semenech nebo  $7,8 \pm 0,5$  pro testy na perloočkách. Ředící voda byla případně upravena přidáním roztoku hydroxidu sodného (NaOH) s koncentrací  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  v případě nízkého pH a nebo přidáním roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) s koncentrací  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  v případě vysokého pH.

### 5.3.3 Příprava živného média pro test na zelených řasách

Pro přípravu ředící vody a úpravu vzorků pro test na zelených řasách se používají následující zásobní roztoky živin (navážky na 1 litr zásobního roztoku). Jejich konečné koncentrace odpovídají požadavkům ČSN EN ISO 8692.

- Zásobní roztok č. 1 – živiny:

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g

- Zásobní roztok č. 2 – Fe-EDTA:

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	64 mg
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O*)	100 mg

\*) sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

- Zásobní roztok č. 3 – stopové prvky:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> *)	185 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	415 mg
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7 mg

\*) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> může být rozpuštěna přidáním 0,1 mol/l NaOH



- Zásobní roztok č. 4 – NaHCO<sub>3</sub>:

NaHCO<sub>3</sub>

50 g

(ČSN EN ISO 8692)

Navážky chemikálií pro jednotlivé zásobní roztoky se rozpustí ve vodě a roztoky se doplní do 1 litru vodou. Zásobní roztoky č. 1 – č. 3 se sterilizují membránovou filtrací nebo v autoklávu. Roztok č. 4 se sterilizuje pouze filtrací přes membránový filtr. Po sterilizaci se roztoky skladují ve tmě při teplotě 4 °C.

Hodnota pH živného média by měla být 8,1± 0,2.

Testovaný vzorek se obohacuje uvedenými zásobními roztoky následovně. Odměrná nádoba potřebného objemu se částečně naplní vzorkem, poté se do ní dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml zásobních roztoku č. 2, 3, a 4 na 1 litr požadovaného objemu testovaného vzorku. Na tento požadovaný objem se nádoba doplní testovaným vzorkem.

#### **5.3.4 Příprava ředící vody pro test na bakteriích**

Ředící voda pro test na bakteriích *Vibrio fischeri* se připraví rozpuštěním 20g chloridu sodného (NaCl) v destilované vodě a následným doplněním destilovanou vodou do 1000 ml.

Hodnota pH připravené ředící vody by měla být v rozmezí 7,0± 0,2. Ředící voda byla případně upravena přidáním roztoku hydroxidu sodného (NaOH) s koncentrací 1 mol.l<sup>-1</sup> v případě nízkého pH a nebo roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) s koncentrací 1 mol.l<sup>-1</sup> v případě vysokého pH.

#### **5.3.5 Příprava koncentrační řady**

Koncentrační řada pro testování toxicity pomocí ryb, dafnií, řas a semen je odstupňovaná řada několika koncentrací odpadní vody. Koncentrační řadu tvoří geometrická řada s koeficientem nepřesahujícím hodnotu 3,2. Vhodná koncentrační řada se stanovuje na základě výsledků předběžného či úvodního testu.

Příprava koncentrační řady se provádí smícháním příslušných objemů testovaného vzorku s ředící vodou (viz kapitola 5.3.2) či se živným médiem (kapitola 5.3.3).

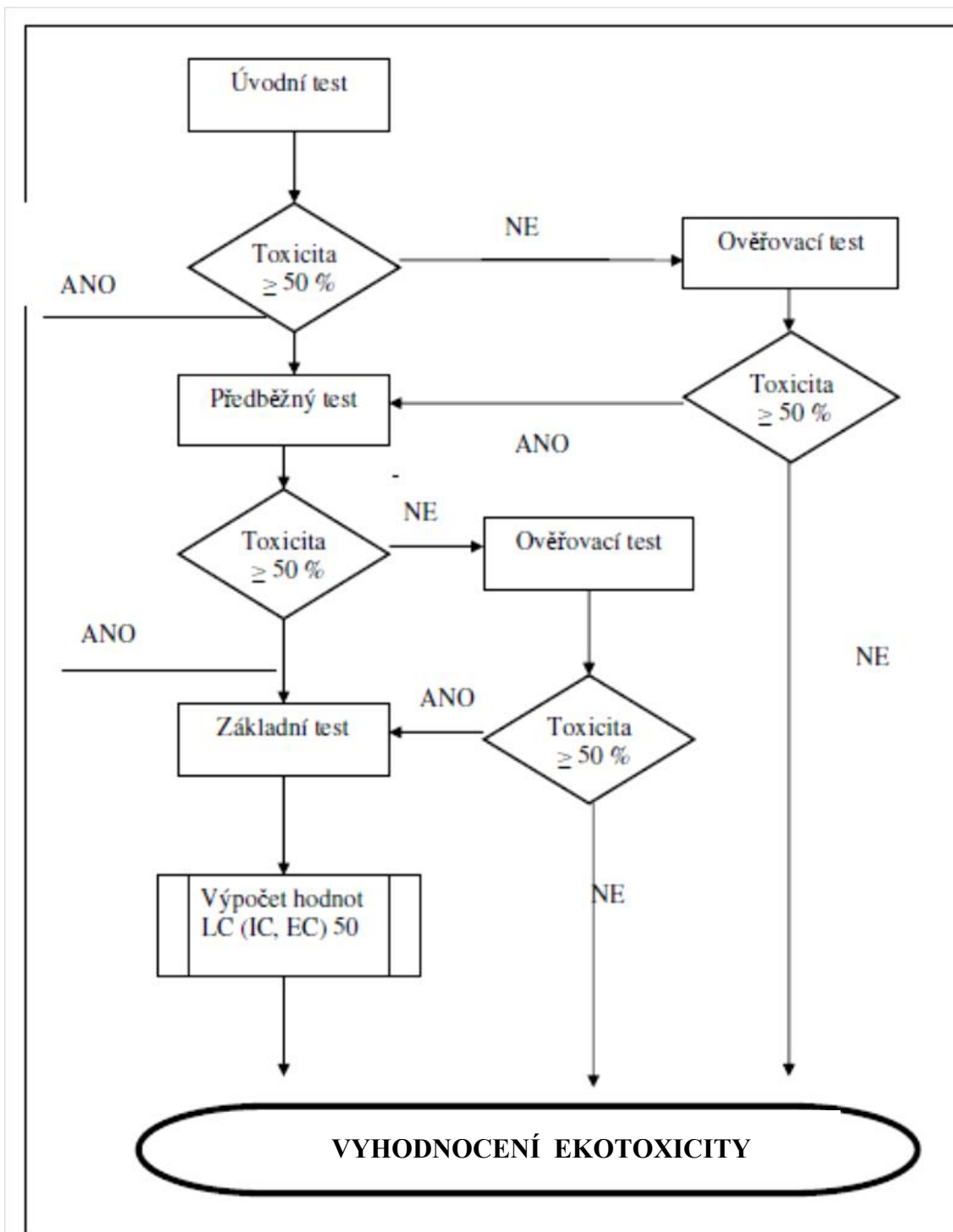
**Tab. 6: Příklad koncentrační řady pro předběžný či základní test**

<b>Koncentrace [ml.l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Množství vzorku [ml]</b>	<b>Množství ředící vody [ml]</b>
200	200	800
260	260	740
338	338	662
439	439	561
571	571	429

Koncentrační řada pro testy na bakteriích je uvedena v kap. 5.3.11.

### 5.3.6 Postup při testování toxicity

Postup testování toxicity je stejný u všech druhů testovacích organismů a je znázorněn na obr. 1.



Obr. 1: Znázornění postupu při testování toxicity na organismech (MŽP ČR, 2007)

U odebraných vzorků byl proveden úvodní test. Úvodní test se provádí s neředěnou odpadní vodou, která je obohacena o dané množství solí či živin. Pokud při úvodním testu dojde k inhibici či úhynu méně jak 50% jedinců, provádí se ověřovací test. Ověřovací test se provádí s neředěným vzorkem na větším množství jedinců.

Pokud při ověřovacím testu opět došlo k inhibici či úhynu méně než 50% jedinců, nedá se u testovaných vzorků stanovit hodnota  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ).

Pokud při úvodním testu dojde k inhibici či úhynu 50% a více jedinců, následuje předběžný test.

Předběžný test se provádí na menším počtu jedinců, vytváří se však vhodně zvolená koncentrační řada. V případě inhibice či úhynu méně než 50% jedinců se provádí ověřovací test. Pokud test potvrdí toxicitu menší než 50%, nelze stanovit  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ).

Pokud předběžný test ukáže toxicitu větší nebo rovnu 50%, provádí se test základní. Základní test se provádí s užším rozsahem koncentrací a větším počtem jedinců.

Z výsledku základního testu se stanoví hodnota  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ).

V každém testu se nasazuje kontrola se stejným počtem organismů. Počet odpovídá metodice daného testu.

Ověření citlivosti použitých organismů a správnost postupu je v pravidelných intervalech kontrolována pomocí základního testu se standardem  $K_2Cr_2O_7$ .

### **5.3.7 Test akutní toxicity na akvarijních rybách**

Testy byly prováděny dle ČSN EN ISO 7346-2. Expoziční doba byla 96 hodin. Perioda výměny roztoků 48 h.

#### **Testovací organismus**

Testy akutní toxicity byly provedeny na akvarijní rybě živorodce duhové (*Poecilia reticulata*). Práce s pokusnými rybami podléhá zvláštním pravidlům dle zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a prováděcí vyhlášky č. 299/2014 Sb. o ochraně pokusných zvířat.

Testovací ryby pocházejí z určeného chovatelského zařízení. Testovací ryby by měly mít celkovou délku  $30 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$ , což odpovídá hmotnosti  $0,3 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ . Pro testy jsou používána obě pohlaví v poměru 1:1. Testovací ryby musí být bez zjevných nemocí nebo viditelných malformací a alespoň 14 dní před testováním nesmí být léčeny či ošetřovány (ČSN EN ISO 7346-2).

Po dodání byly ryby umístěny do zásobních akvárií. Zde byly minimálně po dobu 14 dní ponechány aklimatizaci.

Ryby, které byly použity k testu, se ze zásobního akvária přemístily do akvária s ředící vodou o teplotě  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Zde se po dobu minimálně 72 hodin před zahájením testu adaptovaly a po tuto dobu nebyly krmeny.

### **Postup**

Testy byly prováděny při normálním laboratorním osvětlení s denní fotoperiodou od 12 do 16h. Voda v testovacích nádobách byla udržována při teplotě  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Při testování se předcházelo jakémukoliv rušení ryb.

Podstatou testu bylo určení  $LC_{50}$  ve stanovené koncentrační řadě.

Po 48 hodinách byly připraveny nové roztoky ředící vody i nové testované neředěné odpadní vody obohacené solemi, nebo testované koncentrace odpadní vody. U těchto vzorků byla změřena teplota, rozpuštěný kyslík a pH a do těchto připravených roztoků byly přemístěny živé ryby z předešlého testování.

Nejdříve byl proveden úvodní test. Při úvodním testu byly použity kádinky o objemu 600 ml. Do jedné kádinky bylo nalito 300 ml ředící vody (jako kontrolní vzorek), do další 300 ml neředěné odpadní vody, která byla obohacena solemi. U obou vzorků byla změřena koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a hodnota pH. Poté byly do každé kádinky umístěny tři ryby z adaptace.

Jestliže došlo během úvodního testu k úhynu více jak jedné ryby, prováděly se testy k určení  $LC_{50}$  – předběžný a základní.

Pokud uhynula maximálně 1 ryba, byl proveden ověřovací test.

V ověřovacím testu bylo použito 1 000 ml ředící vody a 1 000 ml testované neředěné odpadní vody obohacené solemi. V tomto případě bylo do testu umístěno 10 ryb.

Pokud byla při ověřovacím testu mortalita nižší než 50 %, pak nelze stanovit LC50. Pokud byla mortalita vyšší nebo rovna 50 %, byl proveden předběžný test. V předběžném testu byla stanovena koncentrační řada pěti koncentrací a kontrolního vzorku. Každá z koncentrací i kontrolní vzorek byly o objemu 300 ml. Do každé z koncentrací a kontrolního vzorku byly umístěny tři ryby. V případě, že mortalita ryb byla méně než 50 %, byl opět proveden test ověřovací.

Pokud mortalita ryb u předběžného testu byla vyšší nebo rovna než 50 %, provedl se test základní. Na základě výsledků předběžného testu bylo určeno užší rozmezí koncentrací pro test základní. U základního testu bylo použito 1000 ml ředící vody pro kontrolu a 1000 ml testované odpadní vody v každé z koncentrací. Do každého testu bylo umístěno 10 ryb.

### **Vyhodnocování testů**

Po celou dobu testování se ryby nejméně 2x denně kontrolovaly, zaznamenával se počet uhynulých ryb a uhynulé ryby se z testu odstraňovaly.

Vždy po 24h, 48h, 72h a 96h byla změřena teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH a byla zaznamenána mortalita ryb v každé testovací nádobě.

Výsledné hodnoty byly zaneseny do programu Microsoft Office Excel 2007, kde byla spočítána mortalita v procentech. Stanovení hodnoty LC<sub>50</sub> bylo provedeno pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2.

### **Kritéria platnosti testu**

Výsledky jsou považovány za platné, jestliže byly splněny následující požadavky:

- a) Koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích během testu byla nejméně 60 % nasycení.
- b) O koncentraci testované látky není známo (nebo se nepředpokládá), že by během testu významně poklesla.
- c) Mortalita kontrolních ryb nepřekročila 10 % nebo jednu rybu na nádrž.
- d) Část kontrolních ryb, vykazujících nezvyklé chování, nepřekročila 10 % nebo jednu rybu na nádrž.

- e) Hodnota  $LC_{50}$  standardní látky ( $K_2Cr_2O_7$ ) zásobní populace ryb je v rozmezí 95-190mg/l.

### **5.3.8 Test akutní toxicity na perloočkách**

Testy akutní toxicity byly provedeny podle ČSN EN ISO 6341. Expoziční doba byla 48 hodin.

#### **Testovací organismus**

Testy akutní toxicity byly provedeny na koryši z podtřídy lupenonožců, perloočce *Daphnia magna* Straus.

Perloočky využívané k testům pocházejí z laboratorního chovu, jedinci používaní pro test musí být mladší než 24h. Tito jedinci jsou nejvíce citliví k toxickým látkám

Den před provedením testu je chov perlooček přelit přes dvě sítká s rozdílnou velikostí ok. Přelití slouží k oddělení mladých jedinců. V den testu se stejným způsobem získají jedinci mladší než 24 h, kteří se následně používají při testování.

#### **Postup**

Vzorky byly při testování umístěny v klimatizované laboratoři při požadované teplotě  $20 \pm 2$  °C po dobu 48h. Jedinci nebyli v průběhu testu krmeni.

Na začátku a na konci každého testu byla v kontrolních vzorcích a v testovaném neředěném vzorku či ve stanovených koncentracích změřena teplota, množství rozpuštěného kyslíku a pH.

Při úvodním testu bylo do předem označených kádinek odměrným válcem nalito 50 ml ředící vody (kontrolní vzorek) a 50 ml testované neředěné odpadní vody obohacené solemi. Při úvodním testu byly použity 4 kádinky s ředící vodou (kontrola) a 4 kádinky s obohaceným neředěným vzorkem odpadní vody. Do každé z testovacích nádob bylo pipetou umístěno 5 jedinců. Celkem tedy 20 jedinců.

Pokud imobilizace jedinců *Daphnia magna* v testované odpadní vodě byla méně než 50 %, následoval po úvodním testu test ověřovací. Postup při ověřovacím testu je obdobný jako u testu úvodního. Bylo však použito větší množství testovacích nádob. Šest nádob s kontrolním vzorkem a šest nádob neředěné odpadní vody. Do každé nádoby bylo opět umístěno pět jedinců *Daphnia magna*. Celkem 30 jedinců v kontrolním vzorku a 30 jedinců v neředěné odpadní vodě.

Pokud při úvodním testu imobilizace jedinců byla rovna či přesáhla 50 %, byl proveden test předběžný, který je tvořen koncentrační řadou z pěti či šesti koncentrací. Kontrolní vzorek i každá z koncentrací byla ve dvou kádinkách. Do každé kádinky bylo pipetou umístěno 5 jedinců. Celkem 10 dafnií v kontrolním vzorku a 10 dafnií v každé koncentraci.

Podle výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí pěti nebo šesti koncentrací pro základní test. Základní test byl složen ze čtyř nádob pro každou z koncentrací testované odpadní vody a ze 4 kontrol. Do každé kádinky bylo umístěno 5 jedinců. Celkem 20 jedinců v kontrolním vzorku a 20 jedinců v každé z koncentrací.

### **Vyhodnocení testů**

Po 48 hodinách byli spočítáni pohybliví jedinci ve všech testovacích nádobách. Jedinci neschopní se rozplavat do 15 s od mírného promíchání roztoku jsou považováni za imobilizované. A to i v případě, že pohybují tykadly.

Dále byla změřena koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádobách s kontrolním vzorkem a v nádobě s nejvyšší testovanou koncentrací odpadní vody. V případě, že by koncentrace rozpuštěného kyslíku v nejvyšší testované koncentraci odpadní vody klesla pod  $2 \text{ mg.l}^{-1}$ , musela by být změřena koncentrace kyslíku u všech testovaných koncentrací odpadní vody. Při konečném výpočtu se pracuje pouze s koncentracemi, ve kterých množství rozpuštěného kyslíku neklesne pod  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  (ČSN EN ISO 6341).

Výsledky byly zaneseny do programu Microsoft Office Excel 2007 a bylo vypočítáno procento imobilizace.

Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena probitovou analýzou v programu EKO-TOX 5.2.

### **Kritéria platnosti testu**

Výsledky jsou považovány za platné, pokud byly na konci testu dodrženy následující podmínky.

- a) Procento imobilizace kontrolních vzorků bylo menší, nebo se rovnalo 10 %.
- b) 24 h  $EC_{50}$  pro dichroman draselný byla v rozsahu od 0,6 do 2,1  $\text{mg.l}^{-1}$ .

(ČSN EN ISO 6341)



### **5.3.9 Test inhibice růstu na sladkovodních zelených řasách**

Testy byly provedeny podle ČSN EN ISO 8692. Expoziční doba byla 72 hodin.

#### **Testovací organismus**

Testy byly provedeny na zelené řase *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*)

Zásobní kultura řas využívaných k testování pochází z BÚ AVČR Třeboň ze sbírky CCALA (Culture Collection of Autotrophic Organisms).

Podstatou zkoušky toxicity na sladkovodních zelených řasách je kultivace inokula rostoucích řasových buněk v příslušném objemu růstového média a zkoušeného vzorku odpadní vody. Testované sady jsou inkubovány po dobu  $72 \pm 2$  hod. Inhibice je měřena jako snížení specifické růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním kulturám rostoucím za stejných podmínek (ČSN EN ISO 8692).

#### **Příprava inokula**

Řasové inokulum pro test se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury (předkultivace), která se připraví následujícím způsobem: ke 100 ml standardního živného roztoku (viz kapitola 5.3.3) se přidá 1 ml zásobní řasové kultury a po dobu 4 dnů se inkubuje za podmínek testu a poté se použije pro inokulaci.

#### **Postup**

Byla spočítána hustota buněk v předkultivaci. Z předkultivace byly naočkovány Erlenmayerovy baňky tak, aby počáteční koncentrace byla dostatečně nízká (přibližně  $10^4$  buněk. ml<sup>-1</sup>) a byl umožněn exponenciální růst v kontrolních vzorcích (ČSN EN ISO 8692).

Do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml bylo napipetováno 25 ml růstového média či 25 ml testovaného roztoku odpadní vody a byl přidán daný objem řasového inokula.

Obsah baňky byl promíchán a hrdlo bylo částečně překryto parafilmem. Tím se zabránilo vzdušné kontaminaci a snížilo se odpařování roztoku, ale nebylo zabráněno přístupu CO<sub>2</sub> pro zajištění fotosyntézy.

Erlenmayerovy baňky byly umístěny do termoboxu s kontinuálním bílým osvětlením (rozsah 6 000 lx - 10 000 lx) při teplotě  $23 \pm 2$  °C a byly inkubovány po dobu  $72 \pm 2$  hodin.

Kultury v termoboxu byly kvůli udržení buněk ve volné suspenzi a usnadnění přestupu CO<sub>2</sub> ze vzduchu do vody několikrát denně promíchávány.

Při úvodním testu bylo naočkováno 6 Erlenmayerových baněk s kontrolním vzorkem a 3 baňky s neřaděným testovaným vzorkem.

Pokud inhibice byla menší než 50%, byl proveden test ověřovací, při kterém bylo naočkováno 6 Erlenmayerových baněk s kontrolním vzorkem a 6 baněk s neřaděným testovaným vzorkem.

Pokud byla inhibice vyšší nebo rovna 50%, následoval po úvodním testu test předběžný, který byl tvořen koncentrační řadou. Byla naočkována 1 Erlenmayerova baňka pro každou z koncentrací a 6 baněk s kontrolními vzorky. Výsledky z tohoto testu sloužily jako podklad pro test základní.

Pro základní test byla stanovena koncentrační řada a pro každou z koncentrací byly naočkovány 3 baňky. Při základním testu bylo opět šest kontrol.

Na začátku testu bylo změřeno pH v jedné baňce každé zkoušené sady a v jedné baňce kontrolního stanovení. Na konci testu bylo změřeno pH v jedné baňce každé koncentrace a ve všech baňkách kontroly.

### **Vyhodnocování testů**

Množství narostlých řas bylo zjištěno počítáním řas v Bürkerově komůrce (Mikroskopické sklíčko se dvěma vybroušenými poli hlubokými 0,1 mm, na jejichž dně je síťovitý obrazec) pod světelným mikroskopem.

Řasy se počítaly ve sto velkých čtvercích v obou polích a výsledná hodnota se násobila číslem 2 500. Tím se získal počet buněk (průměr obou polí) v 1 ml řasové suspenze. Výsledek se použil k výpočtu specifické růstové rychlosti.

Výpočet specifické růstové rychlosti byl prováděn dle vzorce:

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0}$$

kde

- no počáteční hustota buněk,  
 nL hustota buněk měřená v době tL,  
 t0 doba začátku zkoušky,  
 tL doba ukončení zkoušky (nebo doba posledního měření během období exponenciálního růstu v kontrolních kulturách).

a inhibice růstové rychlosti v procentech byla vypočtena pro každou zkoušenou sadu replikátů podle vzorce:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} * 100$$

kde

- $I_{\mu i}$  inhibice růstové rychlosti v procentech  
 $\mu_i$  růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i,  
 $\mu_c$  střední růstová rychlost u kontrolního vzorku

(ČSN EN ISO 8692)

Výpočet specifické růstové rychlosti se dle vzorců provádí v programu Microsoft Office Excel 2007.

Inhibice, případně stimulace růstu byla stanovena porovnáním růstových rychlostí řasové kultury v testovaných vzorcích a v kontrole.

Výsledky byly vyhodnoceny počítačovým programem EKO-TOX v. 5.2.

### **Kritéria platnosti testu**

Jsou stanovena kritéria, podle kterých se určuje, zda je test platný či nikoliv. Pro test akutní toxicity na sladkovodních řasách jsou to tyto požadavky:

- a) průměrná růstová rychlost u kontrolního vzorku musí být nejméně 1,4 d<sup>-1</sup>, to odpovídá přírůstku hustoty buněk 67 krát za 72h.
- b) var. koeficient růstové rychlosti v kontrolních replikátech nesmí překročit 5%
- c) pH v kontrolním vzorku se nemá změnit během testu o více než 1,5 jednotky.
- d) kontrola LC50 standardní látky (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) se pohybuje v rozmezí 0,6 – 1,03 mg/l (průměrně 0,84 mg/l)

(ČSN EN ISO 8692)

### **5.3.10 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé**

Testy byly provedeny podle Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů MŽP ČR, 2007. Expoziční doba byla 72 hodin.

#### **Testovací organismus**

Testy byly provedeny na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*), pocházejících z OSEVA UNI a.s.. Semena o střední velikosti (1,5 až 2,5 mm), okrově žlutá (MŽP ČR, 2007), s klíčivostí minimálně 90 %.

#### **Postup**

Před testováním bylo u kontrolního vzorku i u testovaného vzorku změřeno pH, následně byly vystřiženy filtrační papíry tak, aby odpovídaly velikosti Petriho misek (Ø 140 mm), vložily se na jejich dno a nasýtily se 10 ml ředící vody (kontrolní vzorek) či testované odpadní vody. Do každé Petriho misky s filtračním papírem pak bylo pinzetou rovnoměrně umístěno 30 semen *Sinapis alba*. Petriho misky byly následně umístěny do termostatu s teplotou  $20 \pm 2$  °C bez osvětlení.

Úvodní test byl proveden s jednou Petriho miskou pro kontrolní vzorek a jednou Petriho miskou s testovanou odpadní vodou. Celkem 30 semen pro kontrolu a 30 semen pro testovaný vzorek.

Předběžný test byl proveden na koncentrační řadě. Celkem 30 semen pro kontrolní vzorek a 30 v každé koncentraci.

Na základě výsledku úvodního či předběžného testu byl proveden test ověřovací. Ověřovací test se provedl za stejných podmínek jako test úvodní, ale pro neředěný vzorek odpadní vody byly použity tři Petriho misky (celkem 90 semen). Do kontrolního vzorku bylo při ověřovacím testu také nasazeno 90 semen (tři Petriho misky).

Na základě výsledku předběžného testu byla stanovena koncentrační řada vhodná pro základní test, která se skládala z minimálně pěti koncentrací. Pro každou z koncentrací i pro kontrolní vzorek byly použity dvě Petriho misky. Celkem tedy 60 semen pro každou koncentraci.

U všech testů byla po 72 hodinách změřena a zapsána délka kořenů testovaných semen.

## Vyhodnocení testu

Při hodnocení testu na semenech hořčice bílé byla základním parametrem průměrná délka kořene. Průměrná délka kořene naměřená v koncentrovaném vzorku či v miskách s koncentrační řadou se porovnávala s průměrnou délkou naměřenou v kontrole a následně se vypočítávalo procento inhibice či stimulace.

Při měření byl zaznamenáván i počet nevyklíčených semen. Nevyklíčená semena byla do aritmetického průměru započítávána jako semena s nulovou délkou kořene. V případě, že semeno vyklíčilo, ale nevytvořilo kořínek, se tato hodnota započítala do aritmetického průměru také jako nulová.

U testů s více než 30 semeny na testovanou koncentraci odpadní vody nebo kontroly, by neměla být variabilita výsledků v jednotlivých miskách větší než 30 %. U ověřovacích testů byl vypočítán variační koeficient naměřených délek kořenů ve vzorcích odpadní vody i v kontrole.

Výsledky byly zaneseny do Microsoft Office Excel 2007 a byly zde následně provedeny i výpočty variačních koeficientů a aritmetických průměrů délek kořenů. Výpočty inhibice či stimulace byly provedeny dle vzorce:

$$x = \frac{\emptyset K - \emptyset VZ}{\emptyset K} * 100$$

kde

$\emptyset K$  průměrná délka kořenů v kontrole

$\emptyset VZ$  průměrná délka kořenů ve vzorku

Stanovení hodnoty  $IC_{50}$  bylo provedeno pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2.

## Platnost testu

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

- a) klíčivost semen v kontrole je nejméně 90%
- b) stanovená hodnota  $72IC_{50}$  standardu dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ) pro testovaná semena je v rozmezí 10 - 50  $mg.l^{-1}$

- c) v testech, kdy se nasazují semena do více Petriho misek, nemá být variabilita výsledků v jednotlivých miskách u příslušného vzorku a kontroly větší než 30%.

(MŽP ČR, 2007)

### 5.3.11 Test inhibice světelné emise *Vibrio fischeri*

Testy inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* byly provedeny dle ČSN EN ISO 11348-2.

#### Testovací organismus

Testy byly provedeny na luminiscenční mořské gramnegativní bakterii *Vibrio fischeri* NRRL B-11177.

Bakterie *Vibrio fischeri* přirozeně vyzařují světlo, které v organismu vzniká organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferasou.

Podstatou zkoušky toxicity je měření snížení luminiscence v koncentrační řadě po expozici 15 min nebo 30 min. V úvahu se bere korekční faktor, který je měřítkem změn intenzity kontrol v průběhu expozice. Výsledkem jsou hodnoty EC20 a EC50 (ČSN EN ISO 11348-2).

Bakteriální suspenze se připravuje z komerčně dostupných sušených bakterií firmy Hach Lange GmbH, označení LCK 482, podle návodu výrobce. Bakterie se uchovávají při teplotě  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Pro rehydrataci bakterií výrobce dodává médium, ve kterém se bakterie reaktivují.

#### Složení a příprava média pro reaktivaci

Monohydrát D(+)-glukózy ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	8,0 g
Chlorid sodný (NaCl)	20,0 g
Hexahydrát chloridu hořečnatého ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2,035 g
Chlorid draselný (KCl)	0,30 g
Kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonová)	11,9 g

Látky se rozpustí ve vodě. Roztok se míchá cca 30 min. Pomocí NaOH či HCl se upraví hodnota pH na  $7,0 \pm 0,2$ . (ČSN EN ISO 11348-2)

Roztok je možné v malých dávkách skladovat při teplotě  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ .

### **Příprava zkušební suspenze sušených bakterií**

Z mrazáku se vyjme reaktivační médium a po rozmrazení se vytemperuje na teplotu  $15\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Z mrazáku s teplotou  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  se vyjme ampule s kulturou. Asi na 1 min se vloží pod proud studené vody a následně se do ampule pipetou přidá 0,5 ml reaktivačního média. Po 30 – 60 min se do ampule přidá 4,5 ml reaktivačního média a tato suspenze se použije pro zkoušku při ředění  $D=1$ . Pro ostatní ředění se obsah ampule přelije do zkumavky s reaktivačním médiem a pomalým opakovaným převrácením se promíchá.

### **Referenční látky**

s roztokem chloridu sodného jako ředícím roztokem, bez úpravy pH

Heptahydrát síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	25 mg/l $\text{Zn}^{2+}$
Dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )	4,0 mg/l $\text{Cr}^{6+}$
Chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ )	75,0 g/l

(ČSN EN ISO 11348-2)

Každá šarže bakterií se zkouší se všemi referenčními látkami. Každá nová rozmražená zkumavka s bakteriemi se zkouší alespoň s jednou referenční látkou.

Pro platnost zkoušky způsobují referenční látky síran zinečnatý a dichroman draselný při 30min expozici inhibici 20% - 80% a chlorid sodný inhibici 40% - 60%.

### **Úprava vzorku**

Úprava vzorku se provádí bezprostředně před zkouškou.

Změří se  $\text{O}_2$ , požadavek je min. 3 mg/l. Je-li nutné, provede se okysličení provzdušňováním nebo mícháním.

Požadavek na pH je 6,0 – 8,5. Je-li nutné, upraví se pomocí HCl nebo NaOH.

U vzorku s konduktivitou  $< 10 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  se přidá 20 g NaCl/l výsledná koncentrace solí nesmí přesahovat 35g/l NaCl.

U silně zakalených vzorků se vzorek buď nechá usazovat po dobu 1 h, nebo se provede odstředění či filtrace.

## Postup

Byla připravena bakteriální suspenze a první sada zkumavek (zkumavky vhodné pro termoblok a luminometr) s řadou ředění vzorku + referenční vzorek + 2 kontroly (1 kontrola pro  $D = 1$  a 1 kontrola pro  $D \geq 2$ ).

Ředění se vyjadřuje jako reciproká hodnota objemového podílu vzorku ve zkoušeném roztoku. Pokud se zkouší téměř neředěný vzorek, přidá se 800 $\mu$ l vzorku k 200 $\mu$ l bakteriální suspenze. Ředění vzorku je potom 1:1,25, hodnota D může být považována za  $D=1$ .

Na základě zkušeností laboratoře se vzorky z FN Motol byl zvolen k testování přímo základní test se sadou ředění  $D = 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12$  či  $D = 2, 3, 4, 6, 8, 12$ .

**Tab. 7: Řada ředění vzorku při testování na *Vibrio fischeri***

Ředění D		Vzorek [ $\mu$ l]	Ředící roztok NaCl [ $\mu$ l]
1	1 v 1,25	800	0
2	1 ve 2	500	0
3	1 ve 3	333,3	166,7
4	1 ve 4	250	250
6	1 v 6	166,7	333,3
8	1 v 8	125	375
12	1 ve 12	83,3	416,7
kontrola pro $D=1$		0	800
kontrola pro $D \geq 2$		0	500



## Příprava druhé sady zkumavek s bakteriální suspenzí

**Tab. 8: Množství bakteriální suspenze pro daná ředění**

Ředění D	Bakteriální suspenze [ $\mu$ l]
1	200
2	500
3	500
4	500
6	500
8	500
12	500
kontrola pro D=1	200
kontrola pro D $\geq$ 2	500

Obě sady zkumavek se vytemperovaly na  $15\pm 2^{\circ}\text{C}$  pomocí termobloku s řízenou teplotou. Měření se provádí pomocí luminometru SIRIUS (Berthold Detection Systems) a pomocí softwaru FB12 Sirius Software.

Připravila se druhá sada zkumavek s bakteriální suspenzí – v každé zkumavce se změřila počáteční intenzita luminiscence  $I_0$  v intervalech 30s. Ihned po změření se každá zkumavka doplnila na objem 1 ml zředěnými vzorky (první sada zkumavek) nebo NaCl (kontroly) nebo referenčním vzorkem a promíchala se opakovaným nasátím pipetou. Po 15min a 30min (příp. 5min) se opět změřila intenzita luminiscence  $I_k$  v intervalech 30s.

Pro zkoušku se zvolí doba expozice, při které bylo dosaženo nejvyšší inhibice.

## Inhibiční účinek na luminiscenční bakterie

Ze změřené intenzity luminiscence byl v Microsoft Office Excel 2007 podle vzorce vypočten korekční faktor ( $f_{kt}$ ), který slouží ke korekci počátečních hodnot  $I_0$  všech zkoušených vzorků před jejich použitím jako referenčních hodnot pro stanovení snížení luminiscence, závislém na zkoušeném vzorku.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}$$

( $t = 30$  min)

kde

$f_{kt}$  korekční faktor po expozici 30 min,

$I_{kt}$  intenzita luminiscence kontrolního vzorku po 30 min, v relativních jednotkách luminiscence,

$I_0$  intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředícího roztoku, v relativních jednotkách luminiscence.

Dále byl vypočítán průměr hodnot  $f_{kt}$  kontrolních vzorků.

Podle vzorce  $I_{ct} = I_0 * \overline{f_{kt}}$  byla vypočtena hodnota  $I_{ct}$ ,

kde

$I_{ct}$  korigovaná hodnota  $I_0$  pro zkumavky se zkoušeným vzorkem bezprostředně před přidáním zkoušeného vzorku,

$\overline{f_{kt}}$  průměr hodnot  $f_{kt}$ ,

$I_0$  intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředícího roztoku, v relativních jednotkách luminiscence.

Inhibiční účinek zkoušeného vzorku odpadní vody byl vypočten podle vzorce:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} * 100$$

kde

$H_t$  inhibiční účinek zkoušeného vzorku po expozici 15 nebo 30 min, v %,

$I_{ct}$  korigovaná hodnota  $I_0$  pro zkumavky se zkoušeným vzorkem bezprostředně před přidáním zkoušeného vzorku

$I_t$  intenzita luminiscence zkoušeného vzorku po expozici 15 nebo 30 min, v relativních jednotkách luminiscence.

Pro každé ředění byl vypočten průměrný inhibiční účinek  $\overline{Ht}_v$  % podle vzorce:

$$\overline{Ht} = \frac{H_{t,1} + H_{t,2}}{2}$$

V paralelních stanoveních byla vypočtena směrodatná odchylka s hodnot  $H_t$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^k (H_i - \overline{H_t})^2}{k - 1}}$$

od příslušných průměrů duplikátů a variační koeficient VK (v %) podle vzorce

$$CV = \frac{s}{H_t} * 100$$

kde

$\overline{H_t}$  průměrná inhibice luminiscence při době expozice t min., (%)

$H_{t,1}$  inhibice luminiscence v paralelním stanovení 1, při době expozice t min, (%)

$H_{t,2}$  inhibice luminiscence v paralelním stanovení 2, při době expozice t min, (%)

$H_i$  inhibice luminiscence v i-tém paralelním stanovení (%),

$I_k$  inhibice luminiscence v k-tém paralelním stanovení (%),

k počet paralelních stanovení,

s směrodatná odchylka (%).

Pro vyhodnocení závislosti účinku na koncentracích byla pro každé ředění vypočtena hodnota gama:

$$\Gamma_{30} = \frac{\overline{H_t}}{100 - \overline{H_t}}$$

kde

$\Gamma_{30}$  hodnota gama zkoušeného vzorku po expozici 30 min,

$\overline{Ht}$  průměr hodnot  $H_t$

Pomocí lineární regrese se pro každou expozici stanoví závislost účinku na koncentraci.

Závislost účinku na koncentraci byla popsána lineární rovnicí:

$$\log c_{30} = b \log \Gamma_{30} + \log a$$

kde

$c_{30}$  podíl vzorku odpadní vody ve zkoušeném roztoku v procentech,

$\Gamma_{30}$  hodnota gama zkoušeného vzorku v procentech,

$b$  směrnice popisované přímky,

$\log a$  úsek na ose y vymezený popisovanou přímkou.

Metodou nejmenších čtverců byly vypočítány hodnoty  $EC_{50}$  s odpovídajícími mezemi, v kterých:

$$c_{30} = EC_{50}/30\text{min pro } \Gamma_{30} = 1,00$$

(ČSN EN ISO 11348-2)

Výsledky se vyjadřují v % nebo ml/l nebo mg/l.

### **Kritéria platnosti**

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

a) hodnota  $f_{kt}$  pro 30 min inkubaci je v rozsahu 0,6 až 1,3,

b) paralelní stanovení pro kontroly i pro zkoušené vzorky, z nichž se určuje hodnota  $EC_{50}$  se neodchyluje od svých průměrů o více než 3 %,

c) dichroman draselný způsobuje při 30 min expozici inhibici 20 % až 80 % v následující koncentraci: 4 mg.l<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> (ekvivalentní 0,0057 g dichromanu draselného)

(ČSN EN ISO 11348-2)

## 6. Výsledky

V této kapitole diplomové práce jsou uvedeny výsledky ekotoxikologických testů odpadních vod z FN v Motole na pěti testovacích organismech. Na rybách *Poecilia reticulata*, perloočkách *Daphnia magna* Straus, sladkovodní zelené řase *Desmodesmus subspicatus*, kořenech hořčice bílé (*Sinapis alba*) a na bakterii *Vibrio fischeri*.

V den odběru odpadní vody byly změřeny fyzikální ukazatele, jako je pH, konduktivita a obsah volného chlóru. Konduktivita a pH byly měřeny pouze v laboratoři, množství volného chlóru bylo měřeno při samotném odběru na ČOV ve FN Motol a následně i v laboratoři, aby se zjistilo, zda má převoz vzorků a manipulace s nimi vliv na jeho množství. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 9.

**Tab. 9: Fyzikální ukazatele vzorků odpadních vod**

Číslo vzorku	pH	Konduktivita [mS.cm <sup>-1</sup> ]	Volný chlór [mg.Γ <sup>-1</sup> ]	
			Místo odběru	Laboratoř
2.3/15/857	7,95	2,40	0,05	0,03
2.3/15/858	8,02	1,94	0,50	0,11
2.3/15/1135	7,92	2,37	0,04	0,04
2.3/15/1136	8,05	1,53	0,16	0,12
2.3/16/235	7,93	2,49	0,09	0,13
2.3/16/236	7,98	2,05	0,10	0,02

Odpadní vody byly testovány podle postupového diagramu uvedeného v kapitole 5.3.6.. Úvodní a ověřovací testy byly prováděny s neředěnou odpadní vodou obohacenou o soli (kapitola 5.3.2. a 5.3.11) či o živiny (kapitola 5.3.3.). Předběžné a základní testy pak byly tvořeny koncentrační řadou (kapitola 5.3.5.).

### 6.1. Výsledky testů akutní toxicity na akvarijních rybách

V tabulce č. 10 jsou uvedeny výsledky testů akutní toxicity všech odebraných vzorků na testovacím organismu *Poecilia reticulata*.

**Tab. 10: Výsledky testů akutní toxicity na rybě *Poecilia reticulata***

<b>Testovací organismus: <i>Poecilia reticulata</i></b>			
<b>Číslo vzorku</b>	<b>Druh testu</b>	<b>Mortalita [%]</b>	<b>LC<sub>50</sub> [ml.l<sup>-1</sup>]</b>
<b>2.3/15/857</b>	úvodní	100	
	předběžný		<b>735,4</b>
	základní		<b>481,6</b>
<b>2.3/15/858</b>	úvodní	100	
	předběžný	<50	
	ověřovací	60	
	základní		<b>968,1</b>
<b>2.3/15/1135</b>	úvodní	100	
	předběžný	<50	
	ověřovací	10	<b>N*</b>
<b>2.3/15/1136</b>	úvodní	100	
	předběžný	<50	
	ověřovací	40	<b>N*</b>
<b>2.3/16/235</b>	úvodní	100	
	předběžný	<50	
	ověřovací	10	<b>N*</b>
<b>2.3/16/236</b>	úvodní	20	
	ověřovací	20	<b>N*</b>
* označení N znamená, že pro testovanou odpadní vodu nebylo možné stanovit hodnotu LC <sub>50</sub>			

Pouze u vzorku E/236 byla mortalita po 96 hodinách testování nižší než 50%, byl u něj tedy proveden pouze ověřovací test, kterým se potvrdila mortalita 20%. U ostatních vzorků byla mortalita po 96 hodinách 100% a byly nasazeny testy předběžné, případně základní.

Na základě výsledků předběžných testů byly u vzorků E/857 a E/858 stanoveny koncentrační stupnice pro základní testy a pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2. byly stanoveny hodnoty LC<sub>50</sub>.

U vzorků E/1135, E/1136 a E/235 byly provedeny testy předběžné, při nichž po 96h došlo k mortalitě menší než 50%. Na základě tohoto výsledku byly provedeny

testy ověřovací. Při ověřovacích testech byla mortalita nižší než 50% a tudíž nelze u těchto vzorků odpadních vod stanovit hodnota  $LC_{50}$ .

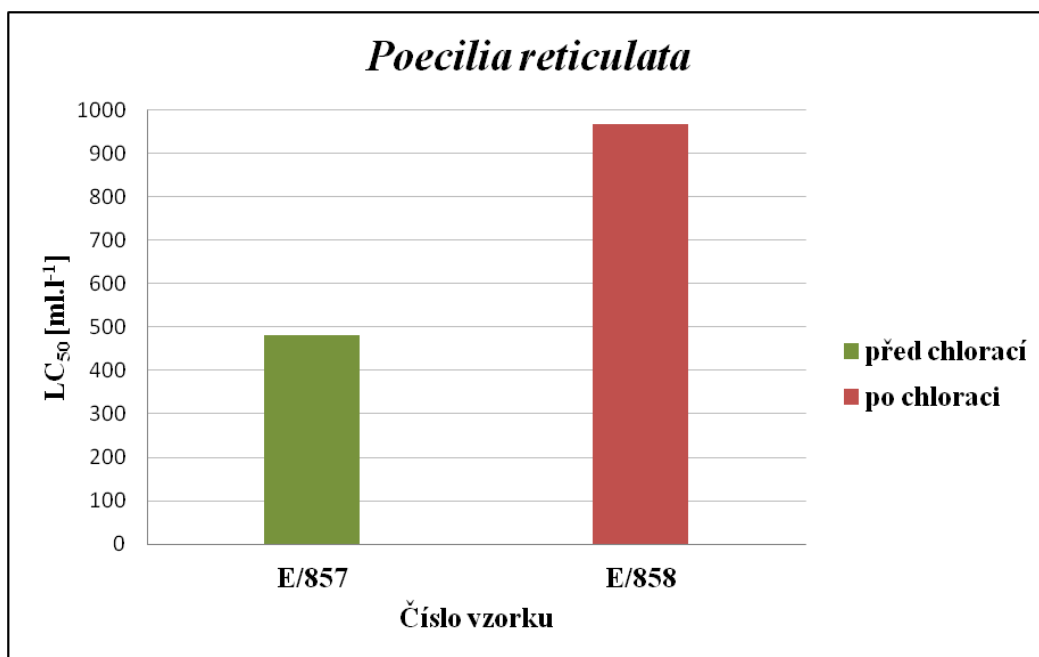
### Výsledky v závislosti na chloraci

V tabulce č. 11 je uvedeno porovnání výsledků testů vzorků E/857 (vzorek před chlorací) a E/858 (vzorek po chloraci). U vzorků E/1134, E/1136, E/235 a E/236 nebylo možné stanovit hodnotu  $LC_{50}$ .

**Tab. 11: Porovnání výsledků testů na rybě *Poecilia reticulata* v závislosti na chloraci (barevně je zvýrazněn vzorek před chlorací)**

Testovací organismus: <i>Poecilia reticulata</i>	
Číslo vzorku	$LC_{50}$ [ $ml.l^{-1}$ ]
E/857	481,6
E/858	968,1

Výsledky z tabulky jsou znázorněné na obr. 1.



**Obr. 1: Porovnání výsledků testů na rybě *Poecilia reticulata* v závislosti na chloraci**

## 6.2. Výsledky testů akutní toxicity na perloočkách

Dalším testovacím organismem byla perloočka *Daphnia magna* Straus.

V tabulce č. 12 jsou uvedeny výsledky testů všech testovaných vzorků.

**Tab. 12: Výsledky testů akutní toxicity na perloočce *Daphnia magna* Straus**

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>			
Číslo vzorku	Druh testu	Imobilizace [%]	EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/15/857	úvodní	85	
	předběžný		843,0
	základní		745,5
2.3/15/858	úvodní	55	
	předběžný	<50	
	ověřovací	45	N*
2.3/15/1135	úvodní	100	
	předběžný		596,4
	základní		681,7
2.3/15/1136	úvodní	35	
	ověřovací	76	
	předběžný	<50	
	ověřovací	62,5	
	základní	<50	N*
2.3/16/235	úvodní	100	
	předběžný		651,0
	základní		769,1
2.3/16/236	úvodní	75	
	předběžný		815,6
	základní		870,0
* označení N znamená, že pro testovanou odpadní vodu nebylo možné stanovit hodnotu EC <sub>50</sub>			

U všech testovaných vzorků s výjimkou vzorku E/1136 došlo při úvodním testu k imobilizaci více než 50% jedinců. U vzorku E/1136 byl proveden ověřovací test, při kterém však došlo k imobilizaci 76% jedinců a proto byl také proveden test předběžný.



U vzorku E/858 došlo při úvodním testu k imobilizaci 55% jedinců, u ověřovacího testu však imobilizace klesla na 45 %. U tohoto vzorku tedy nelze stanovit hodnotu  $EC_{50}$  a vzorek odpadní vody je tak považován za netoxický.

Vzhledem k vysoké imobilizaci perlooček v úvodních testech byly provedeny předběžné testy a základní testy u všech testovaných vzorků s výjimkou vzorku E/858.

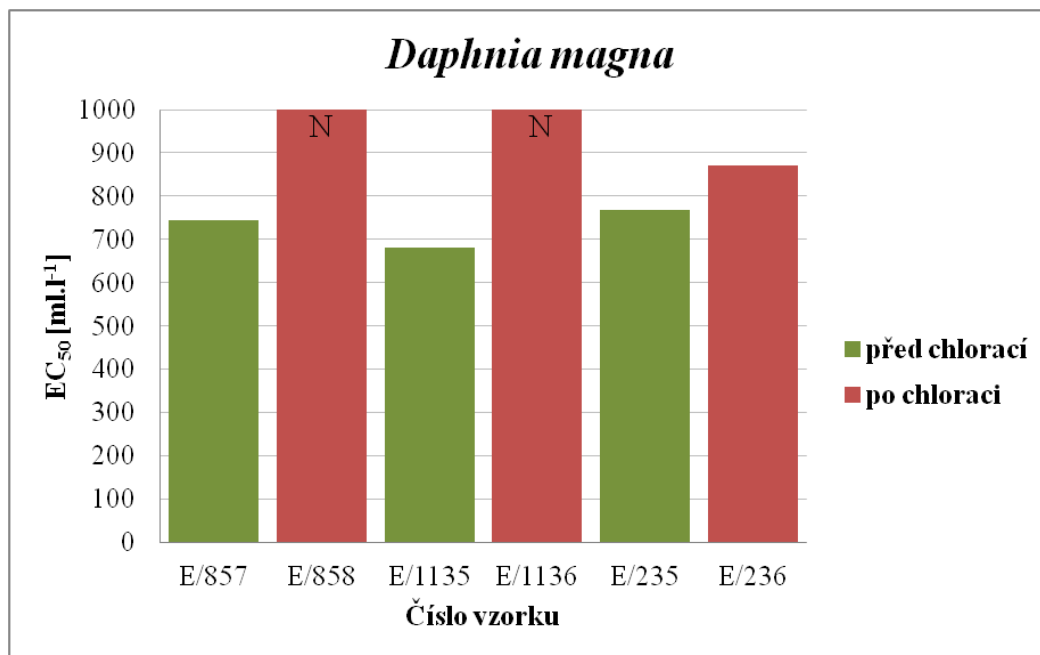
### Výsledky v závislosti na chloraci

V tabulce č. 13 je uvedeno porovnání výsledků testů v závislosti na chloraci všech testovaných vzorků. U vzorků E/858 a E/1136 nebylo možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$

**Tab. 13: Porovnání výsledků testů akutní toxicity na perloočce *Daphnia magna* v závislosti na chloraci (barevně jsou zvýrazněny vzorky před chlorací)**

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>	
Číslo vzorku	$EC_{50}$ [ml.l <sup>-1</sup> ]
E/857	745,5
E/858	N*
E/1135	681,7
E/1136	N*
E/235	769,1
E/236	870,0
* označení N znamená, že pro testovanou odpadní vodu nebylo možné stanovit hodnotu $EC_{50}$	

Výsledky z tabulky jsou znázorněné na obr. 2.



**Obr. 2: Porovnání výsledků testů akutní toxicity na perloočce *Daphnia magna* v závislosti na chloraci**

Jak je z těchto výsledků patrné, u všech testovaných vzorků ošetřených chlornanem sodným byla při testech na perloočce *Daphnia magna* zjištěna nižší toxicita ve srovnání se vzorky neošetřenými.

### 6.3. Výsledky testů inhibice růstu na sladkovodních zelených řasách

Výsledky testů inhibice růstu na sladkovodní zelené řase *Desmodesmus subspicatus* jsou uvedeny v tabulce č. 14.

**Tab. 14:** Výsledky testů inhibice růstu na sladkovodní zelené řase *Desmodesmus subspicatus*

<i>Testovací organismus: Desmodesmus subspicatus</i>			
Číslo vzorku	Druh testu	Inhibice [%]	EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/15/857	úvodní	95,4	
	předběžný		408,4
	základní		407,9
2.3/15/858	úvodní	91,2	
	předběžný		421,6
	základní		433,3
2.3/15/1135	úvodní	80,7	
	předběžný		259,6
	základní		291,7
2.3/15/1136	úvodní	100,0	
	předběžný		393,1
	základní		415,7
2.3/16/235	úvodní	34,5	
	ověřovací	55,5	
	předběžný		484,1
	základní		535,5
2.3/16/236	úvodní	43,3	
	ověřovací	100,0	
	předběžný		309,2
	základní		708,7

U vzorků E/857, E/858, E/1135 a E/1136 byla při úvodním testu inhibice vyšší než 50% a byly tak provedeny testy předběžné a základní. V případě vzorků E/235 a E/236 byla inhibice nižší než 50 % a následovaly ověřovací testy. Při nich došlo k inhibici vyšší než 50% a proto i u těchto vzorků byly provedeny testy předběžné a základní.

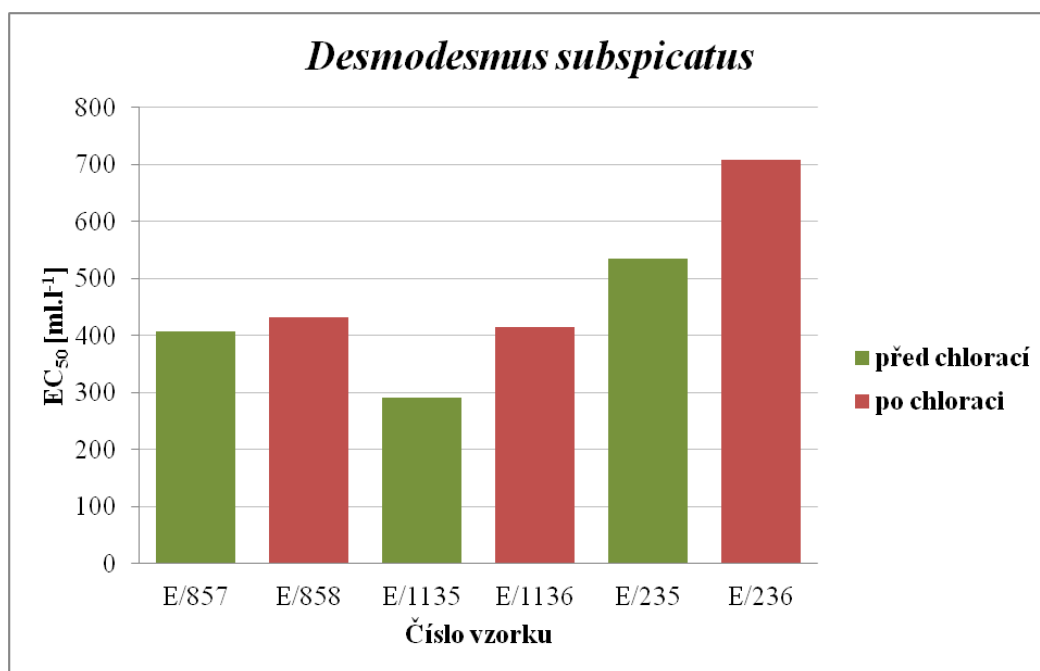
## Výsledky v závislosti na chloraci

V tabulce č. 15 a na obr. 3 je uvedeno porovnání výsledků testů v závislosti na chloraci všech testovaných vzorků.

**Tab. 15: Porovnání výsledků testů akutní toxicity na zelené řase *Desmodesmus subspicatus* v závislosti na chloraci (barevně jsou zvýrazněny vzorky před chlorací)**

Testovací organismus: <i>Desmodesmus subspicatus</i>	
Číslo vzorku	EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
E/857	407,9
E/858	433,3
E/1135	291,7
E/1136	415,7
E/235	535,5
E/236	708,7

Výsledky uvedené v tabulce jsou znázorněné na obr. 3.



**Obr. 3: Porovnání výsledků testů akutní toxicity na řase *Desmodesmus subspicatus* v závislosti na chloraci**

Jak je z výsledků uvedených v tabulce č. 15 a na obr. 3 patrné, u všech testovaných vzorků ošetřených chlornanem sodným byla při testech na řase *Desmodesmus subspicatus* zjištěna nižší toxicita ve srovnání se vzorky neošetřenými.

## 6.4. Výsledky testů inhibice růstu kořene hořčice bílé

V tabulce č. 16 jsou uvedeny výsledky úvodních a ověřovacích testů inhibice růstu kořene hořčice bílé. U všech testovaných vzorků odpadní vody byla v úvodním i ověřovacím testu inhibice růstu kořene po 72 hodinách nižší než 50 % a vzorky tak nejsou považovány za ekotoxické.

**Tab. 16: Výsledky úvodních a ověřovacích testů inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)**

Testovací organismus: <i>Sinapis alba</i>			
Číslo vzorku	Druh testu	Inhibice/ stimulace	IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/15/857	úvodní	2,7	N*
	ověřovací	-9,6	
2.3/15/858	úvodní	10,9	N*
	ověřovací	11,6	
2.3/15/1135	úvodní	-40,9	N*
	ověřovací	9,7	
2.3/15/1136	úvodní	-7,1	N*
	ověřovací	-37,6	
2.3/16/235	úvodní	-17,2	N*
	ověřovací	-11,2	
2.3/16/236	úvodní	-13,8	N*
	ověřovací	2,9	
* označení N znamená, že pro testovanou odpadní vodu nebylo možné stanovit			
* * stimulace je vyjádřena jako záporné číslo			

U vzorků E/857, E/1135, E/1136, E/235 i E/236 došlo k stimulaci růstu kořene hořčice bílé.

## 6.5. Výsledky testů inhibice světelné emise *Vibrio fischeri*

Na základě zkušeností laboratoře se vzorky z FN Motol byl zvolen k testování přímo základní test.

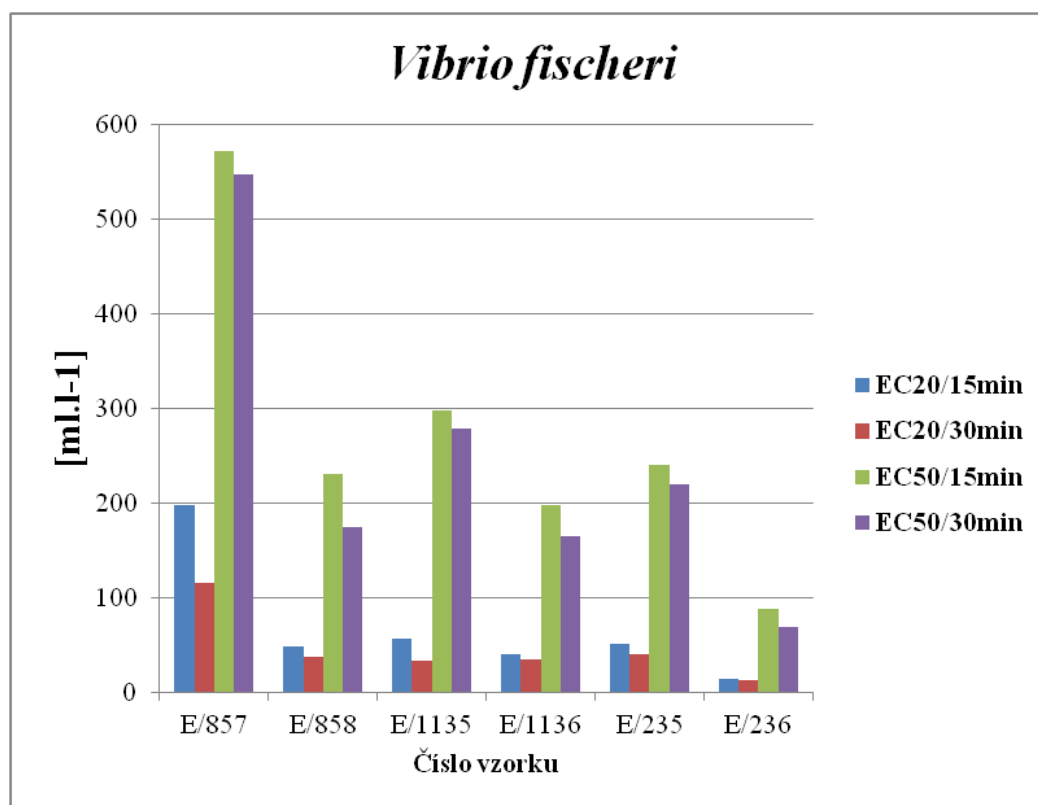
V základním testu inhibičního účinku na světelnou emisi *Vibrio fischeri* bylo stanoveno procento inhibice luminiscence v různých koncentracích a byla určena hodnota EC<sub>20</sub> a EC<sub>50</sub> ve srovnání s kontrolou. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí softwaru Microsoft Office Excel.

Výsledky testů inhibice světelné emise bakterií *Vibrio fischeri* po expozici 15 a 30 min provedených se vzorky testovaných odpadních vod jsou uvedeny v tabulce č. 17.

**Tab. 17:** Výsledky základních testů inhibičního účinku vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri*

Testovací organismus: <i>Vibrio fischeri</i>				
Číslo vzorku	Základní test [ml.l <sup>-1</sup> ]		Základní test [ml.l <sup>-1</sup> ]	
	EC <sub>20/15min</sub>	EC <sub>20/30min</sub>	EC <sub>50/15min</sub>	EC <sub>50/30min</sub>
2.3/15/857	197,9	116,2	571,0	547,1
2.3/15/858	48,25	37,3	230,2	174,4
2.3/15/1135	56,96	33,32	298,1	279,0
2.3/15/1136	40,28	34,22	197,4	165,5
2.3/16/235	51,32	40,92	240,1	220,0
2.3/16/236	14,37	12,47	87,6	69,7

Hodnoty EC<sub>20/15min</sub>, EC<sub>20/30min</sub>, EC<sub>50/15min</sub> a EC<sub>50/30min</sub> jsou patrné i z obr. č. 4.



**Obr. 4:** Výsledky základních testů inhibičního účinku vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Hodnoty EC<sub>20/15min</sub>, EC<sub>20/30min</sub>, EC<sub>50/15min</sub> a EC<sub>50/30min</sub>)

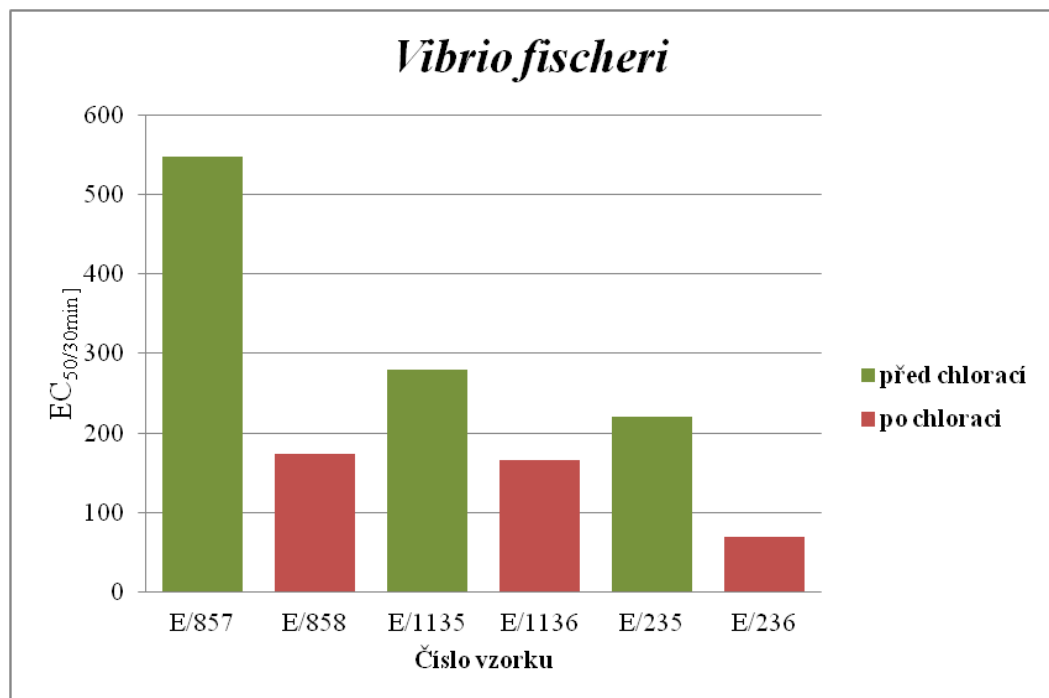
## Výsledky v závislosti na chloraci

Všechny testované vzorky odpadních vod byly pro bakterii *Vibrio fischeri* toxické. Z tabulky č. 18 i z obrázku č. 5 vyplývá, že vzorky odpadních vod po ošetření chlornanem sodným jsou pro bakterii více toxické, než vody neošetřené.

**Tab. 18: Porovnání výsledků testů inhibičního účinku vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* v závislosti na chloraci (barevně jsou zvýrazněny vzorky před chlorací)**

Testovací organismus: <i>Vibrio fischeri</i>	
Číslo vzorku	EC <sub>50/30min</sub>
E/857	547,1
E/858	174,4
E/1135	279,0
E/1136	165,5
E/235	220,0
E/236	69,7

Výsledky uvedené v tabulce jsou znázorněné na obr. 5.



**Obr. 5: Porovnání výsledků testů inhibičního účinku vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* v závislosti na chloraci**

## 6.6. Výsledky testovaných odpadních vod na všech testovacích organismech

V tabulce č. 19 jsou uvedeny výsledky testů na všech testovacích organismech. Označení N v tabulce znamená, že pro testovaný vzorek nemocniční odpadní vody nebylo možné stanovit hodnotu LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> nebo IC<sub>50</sub>, tedy že v neřaděné odpadní vodě byl úhyn ryb, imobilizace perlooček, inhibice růstu a inhibice luminiscence menší než 50 %.

**Tab. 19: Výsledky ekotoxicity testovaných odpadních vod na *Poecilia reticulata*, *Daphnia magna*, *Sinapis alba*, *Desmodesmus subspicatus* a *Vibrio fischeri***

Číslo vzorku	Testovací organismus - hodnoty LC <sub>50</sub> , EC <sub>50</sub> a IC <sub>50</sub>				
	<i>Poecilia reticulata</i> LC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Daphnia magna</i> EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Sinapis alba</i> IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Desmodesmus subspicatus</i> EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Vibrio fischeri</i> EC <sub>50/15min</sub> / EC <sub>50/30min</sub>
2.3/15/857	481,6	745,5	N*	407,9	571,0 / 547,1
2.3/15/858	968,1	N*	N*	433,3	230,2 / 174,4
2.3/15/1135	N*	681,7	N*	291,7	298,1 / 279,0
2.3/15/1136	N*	N*	N*	415,7	197,4 / 165,5
2.3/16/235	N*	769,1	N*	535,5	240,1 / 220,0
2.3/16/236	N*	870,0	N*	708,7	87,6 / 69,7

\* označení N znamená, že pro testovanou odpadní vodu nebylo možné stanovit hodnotu LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>



## 7. Diskuze

V rámci diplomové práce byla testována ekotoxicita šesti vzorků odpadních vod z FN Motol. Vzorky byly odebírány ve 3 termínech. Vzorky s označením E/857, E/1135 a E/235 jsou vzorky před dezinfekcí pomocí chlornanu sodného, vzorky E/858, E/1136 a E/236 jsou po dezinfekci chlornanem sodným.

Ve FN v Motole se kromě jiných nachází i infekční a onkologické oddělení. Tato oddělení jsou významným zdrojem látek s prokázanými ekotoxickými účinky (jako např. cytostatika a další léčiva) a zdrojem mikrobiálního znečištění.

Pro hodnocení ekotoxicity byly použity ekotoxikologické testy na pěti organismech: na rybách (*Poecilia reticulata*), perloočkách (*Daphnia magna*), zelených řasách (*Desmodesmus subspicatus*), hořčici bílé (*Sinapis alba*) a luminiscenčních bakteriích (*Vibrio fischeri*).

### Ekotoxicita

Výsledky provedených ekotoxikologických testů se lišily pro jednotlivé organismy. Nejcitlivějším organismem byla bakterie *Vibrio fischeri* (nejnižší  $EC_{50/30min} = 69,7 \text{ ml.l}^{-1}$ ), dále zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* (nejnižší  $EC_{50} = 291,7 \text{ ml.l}^{-1}$ ) společně s perloočkou *Daphnia magna* (nejnižší  $EC_{50} = 681,7$ ). Málo citlivým organismem při testování odpadních vod byla ryba *Poecilia reticulata*. Vůbec nejmenší citlivost vykazovala semena hořčice bílé *Sinapis alba*.

Chrobáková (2014) došla v rámci své diplomové práce ke zjištění, že nejvíce citlivé jsou při testování odpadních vod z FN v Motole perloočky *Daphnia magna* a zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* prokázala citlivost menší.

Odpadní vody neměly ekotoxické účinky na semena hořčice bílé (*Sinapis alba*). Ani v jednom případě nebylo možné stanovit hodnotu  $IC_{50}$ . U vzorků E/857, E/1135, E/1136, E/235 i E/236 došlo při testování dokonce ke stimulaci růstu kořene.

Při testování na organismu *Poecilia reticulata* nelze u vzorků E/1135, E/1136, E/235 a E/236 stanovit hodnotu  $LC_{50}$ . Testované odpadní vody tak nejsou pro tento organismus toxické. Ekotoxicita byla při testování na organismu *Poecilia reticulata* prokázána u vzorků E/857 ( $LC_{50} = 481,6 \text{ ml.l}^{-1}$ ) a E/858 ( $LC_{50} = 968,1 \text{ ml.l}^{-1}$ ). V případě E/858 je tato hodnota nejvyšší zjištěná vůbec. U vzorku E/857 došlo

k velkému rozdílu mezi hodnotou  $LC_{50}$  u předběžného testu ( $LC_{50}=735,4 \text{ ml.l}^{-1}$ ) a hodnotou  $LC_{50}$  u základního testu ( $LC_{50} = 481,6 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Tento fakt je pravděpodobně způsoben příliš velkým rozdílem v počtu použitých pokusných ryb.

Byla prokázána ekotoxicita všech testovaných odpadních vod na organismus *Desmodesmus subspicatus*. Nejvíce toxický byl pro řasy vzorek E/1135, u kterého bylo zjištěna hodnota  $EC_{50} = 291,7 \text{ ml.l}^{-1}$ .

Zgórska a kol. (2011) testovali ekotoxický účinek neošetřených odpadních vod z nemocnice St. Joseph's ve městě Pilchowice v jihozápadním Polsku, která produkuje přibližně  $105 \text{ m}^3$  odpadních vod za den. Ve své práci zjistila, že nejvyšší ekotoxický účinek byl pozorován u *Pseudokirchneriella subcapitata*. V rámci její studie byla pro tento organismus zjištěna nejnižší hodnota  $EC_{50} = 187,7 \text{ ml.l}^{-1}$ , ekotoxicita neošetřených odpadních vod tedy byla pro zelené řasy v porovnání se závěry této diplomové práce větší (nejnižší  $EC_{50} = 291,7 \text{ ml.l}^{-1}$ ).

Stejný závěr lze pozorovat ve srovnání s výsledky studie Zgórska a kol. (2011) při testování ekotoxicity na perloočce *Daphnia magna* (nejnižší  $EC_{50} = 207,6 \text{ ml.l}^{-1}$ ). V rámci této diplomové práce byla při testech na neošetřených odpadních vodách zjištěna nejnižší hodnota  $EC_{50} = 681,7 \text{ ml.l}^{-1}$ .

Dalším testovaným organismem byla u Zgórska a kol. (2011), stejně jako v této diplomové práci, luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*. U tohoto organismu autoři Zgórska a kol. (2011) uvádějí nejmenší ekotoxický účinek odpadních vod ze všech testovacích organismů.

### **Vliv chlorace**

Z výsledků testů na bakterii *Vibrio fischeri* uvedených v této diplomové práci vyplývá, že vzorky odpadních vod po ošetření chlomanem sodným vykazují pro bakterii větší toxicitu, než vody neošetřené.

Jak uvádí Berto a kol. (2009), je nutné používat pro testování toxicity baterie testů na organismech z různých trofických úrovní. Zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* stojí ve spodní části potravního řetězce a vypouštění odpadních vod ze zdravotnických zařízení by mohlo vést k inhibici nebo stimulaci jejího růstu.

Berto a kol. (2009) provedli testy ekotoxicity nemocničních odpadních vod vstupujících do ČOV a vystupujících z ČOV. Testy ekotoxicity prováděli na řasách

(*Desmodesmus subspicatus*) a perloočkách (*Daphnia magna*), tzn. na dvou testovacích organismech, které byly použity pro hodnocení ekotoxicity i v rámci této diplomové práce.

V případě testů na *Daphnia magna* bylo výzkumem Berto a kol. (2009) prokázáno, že nedezinfikované odpadní vody jsou pro perloočky více toxické než dezinfikované odpadní vody. Ke stejnému závěru se došlo i při testování ekotoxicity v rámci této diplomové práce. Neošetřené odpadní vody byly pro perloočku *Daphnia magna* ve všech případech toxické ( $EC_{50E/857} = 745,5 \text{ ml.l}^{-1}$ ,  $EC_{50E/1135} = 681,7 \text{ ml.l}^{-1}$  a  $EC_{50E/235} = 769,1 \text{ ml.l}^{-1}$ ), oproti tomu dva vzorky ošetřených odpadních vod (E/858 a E/1136) nebyly pro perloočku toxické a u vzorku E/236 ( $EC_{50} = 870,0 \text{ ml.l}^{-1}$ ) došlo ke snížení toxicity.

Dále bylo ze srovnání ekotoxicity odpadních vod bez ošetření chlornanu sodného a odpadních vod ošetřených chlornanem sodným na řase *Desmodesmus subspicatus* prokázáno, že neošetřené odpadní vody ( $EC_{50E/857} = 407,9 \text{ ml.l}^{-1}$ ,  $EC_{50E/1135} = 291,7 \text{ ml.l}^{-1}$  a  $EC_{50E/235} = 535,5 \text{ ml.l}^{-1}$ ) jsou pro tento organismus více toxické než ošetřené odpadní vody ( $EC_{50E/858} = 433,3 \text{ ml.l}^{-1}$ ,  $EC_{50E/1136} = 415,7 \text{ ml.l}^{-1}$  a  $EC_{50E/236} = 708,7 \text{ ml.l}^{-1}$ ).

Studie Berto a kol. (2009) dále ukázala, že dezinfikované odpadní vody jsou pro zelenou řasu *Desmodesmus subspicatus* až 4 krát méně toxické než neošetřené odpadní vody. V této diplomové práci byla pro tento organismus také prokázána menší toxicita ošetřených odpadních vod.

Berto a kol. (2009) uvádí, že při testech ekotoxicity s ošetřenými odpadními vodami nebyl prokázán žádný inhibiční účinek na řasy a nedošlo ani k imobilizaci jedinců *Daphnia magna*. Výsledek studie Berto a kol. (2009) je v rozporu s výsledky této práce, protože zde byly toxické účinky odpadních vod na tyto dva organismy prokázány.

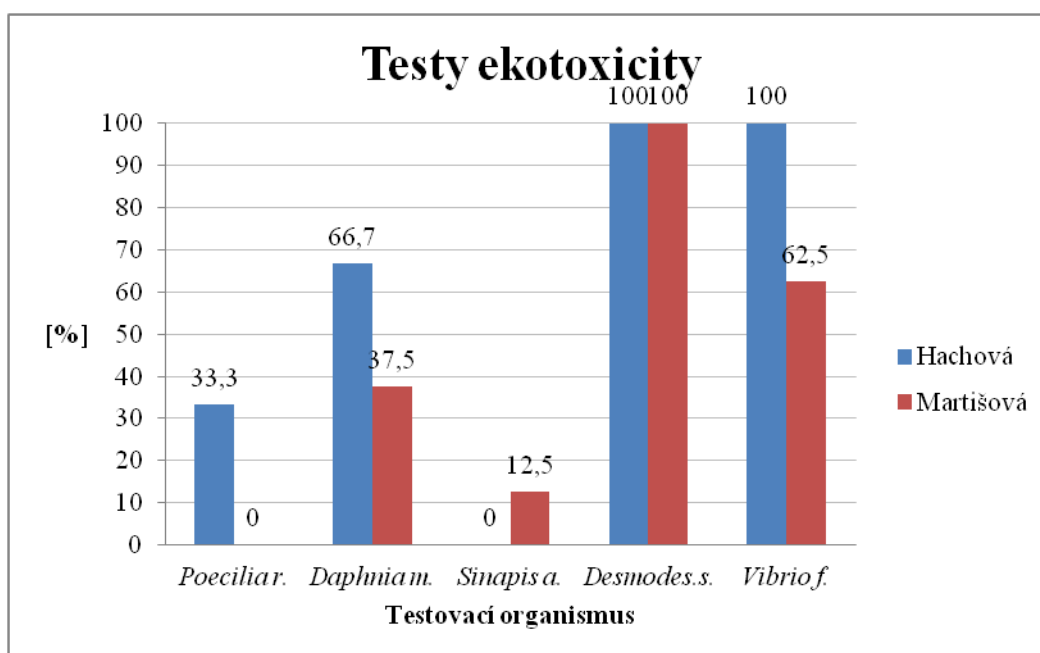
Vliv dezinfekčních prostředků a volného chlóru na ekotoxicitu vod nepřímo potvrdily některé studie. Výsledky studie Emmanuel a kol., (2004), zaměřené na hodnocení toxického účinku chlornanu sodného, který je používán k dezinfekci odpadních vod, ukázaly, že přidáním chlornanu sodného do nemocničních odpadních vod dojde ke snížení bakteriálního znečištění vody, ale chlornan sodný zároveň působí toxicky na vodní organismy.

Martišová (2015) ve své diplomové práci testovala ekotoxicitu osmi vzorků odpadních vod z FN v Motole. Čtyři vzorky byly odebírány před samotnou dezinfekcí odpadních vod a čtyři vzorky po dezinfekci roztokem chlornanu sodného.

Citlivost testovacích organismů v ekotoxikologických testech, provedených v rámci její DP, klesala v řadě: řasa *Desmodesmus subspicatus* ( $EC_{50} = 175,6 - 743,5 \text{ ml.l}^{-1}$ ), perloočka *Daphnia magna* ( $EC_{50} = 251,1 - 687,7 \text{ ml.l}^{-1}$ ), bakterie *Vibrio fischeri* ( $EC_{50/30\text{min}} = 319,1 - 790,4 \text{ ml.l}^{-1}$ ), hořčice bílá *Sinapis alba* ( $IC_{50} = 815,2 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Žádný ze vzorků odpadních vod nebyl toxický pro rybu *Poecilia reticulata*.

V rámci méj diplomové práce byla však prokázána největší citlivost odpadních vod pro bakterii *Vibrio fischeri* ( $EC_{50/30\text{min}} = 69,7 - 574,1 \text{ ml.l}^{-1}$ ), následovala zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* s hodnotami v rozmezí  $EC_{50} = 291,7 - 708,7 \text{ ml.l}^{-1}$ , dále perloočka *Daphnia magna* s rozmezím hodnot  $EC_{50} = 681,7 - 870,0 \text{ ml.l}^{-1}$  a ryba *Poecilia reticulata*  $LC_{50} = 481,6 - 968,1 \text{ ml.l}^{-1}$ . Pro *Sinapis alba* nevykazovala toxicitu žádná z testovaných odpadních vod.

Na obr. 6 je vyjádřen procentický podíl vzorků odpadních vod z FN v Motole, které vykazovaly toxický účinek na testovací organismy. Jsou porovnávány výsledky této diplomové práce a diplomové práce Martišové (2015).



**Obr. 6: Procentický podíl vzorků odpadních vod z FN v Motole vykazujících toxický účinek na testovací organismy ve srovnání s diplomovou prací Martišová (2015)**

## 8. Závěr

V diplomové práci byla testována ekotoxicita šesti vzorků odpadních vod z Fakultní nemocnice v Motole, odebraných ve třech termínech. Vzorky E/857, E/1135 a E/235 byly odebrány z dosazovací nádrže před dezinfekcí chlornanem sodným a vzorky E/858, E/1136 a E/236 byly odebrány na odtoku z čistírny odpadních vod po dezinfekci chlornanem sodným.

Testování ekotoxicity bylo provedeno s neřaděnými vzorky odpadních vod na pěti organismech: na rybách (*Poecilia reticulata*), perloočkách (*Daphnia magna*), zelených řasách (*Desmodesmus subspicatus*), hořčici bílé (*Sinapis alba*) a luminiscenčních bakteriích (*Vibrio fischeri*). Na základě tohoto testování byly stanoveny koncentrační řady a byla zjišťována hodnota  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$ .

Tyto výsledné hodnoty se lišily nejen mezi jednotlivými vzorky odpadní vody, ale rozdílné hodnoty byly zjištěny i při testování ekotoxicity jednoho vzorku na různých organismech.

Nejcitlivějším organismem byla bakterie *Vibrio fischeri*, dále zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* společně s perloočkou *Daphnia magna*. Málo citlivým organismem při testování odpadních vod byla ryba *Poecilia reticulata*. Vůbec nejmenší citlivost vykazovala semena hořčice bílé *Sinapis alba*.

Bylo prokázáno, že odpadní vody ošetřené chlornanem sodným jsou pro *Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna* a *Poecilia reticulata* méně toxické než vody neošetřené. Naopak pro bakterii *Vibrio fischeri* jsou více toxické vody ošetřené chlornanem sodným.

Na základě výsledků provedených ekotoxikologických testů lze za organismy vhodné pro testování ekotoxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení považovat řasy *Desmodesmus subspicatus*, perloočky *Daphnia magna* a bakterie *Vibrio fischeri*. Za méně vhodné testovací organismy považují kvůli jejich nízké citlivosti a velkým rozdílům mezi výsledky předběžných a základních testů ryby *Poecilia reticulata* a semena hořčice bílé *Sinapis alba*.

## 9. Literatura

ADARSH V. K., MISHRA M., CHOWDHURY S., SUDARSHAN M., THAKUR A. R., RAY C. S., 2007: Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from east Calcutta wetland. *J. Biol. Sci.* 7: 80–88.

ANDĚL P., 2011: Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring. Evernia s.r.o., Liberec, 265 s.

AMBROŽOVÁ J., 2003: Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vydavatelství VŠCHT Praha, 226 s.

BERTO J., ROCHENBACH G. C., BARREIROS M. A. B., CORREA A. X. R., PELUSO-SILVA S. et RADETSKI C. M., 2009: Physico-chemical, microbiological and ekotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1076 - 1081.

DE SOUZA S. M., VASCONCELOS E. C., DZIEDZIC M. & DE OLIVEIRA C. M., 2009: Environmental risk assessment of antibiotics: an intensive care unit analysis. *Chemosphere*, 77(7): 962-967.

EMMANUEL E., KECK G., BLANCHARD J. - M., VERMANDE P., PERRODIN Y., 2004: Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organism and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International* 30: 891 - 900.

EMMANUEL E., PERRODIN Y., KECK G., BLANCHARD J. - M., VERMANDE P., 2005: Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials A117*: 1 - 11.

GOULLÉ J.- P., SAUSSEREAU E., MAHIEU L., CELLIER D., SPIROUX J., GUERBET M., 2012: Importance of Anthropogenic Metals in Hospital and Urban Wastewater: Its Significance for the Environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(6), 1220-1224.

GREENWOOD N, N.; EARNSHAW, A., 1993: Chemie prvků: svazek II. Praha: INFORMATORIUM, 842 s.

- HÄUSLER J., 1978: Sledování toxicity a fyziologické aktivity mikroorganismů ve vodním prostředí. – VTEJ č. 7-8: 267-274.
- HOFFMAN D. J., RATTNER B.A., BURTON, G.A., CAIRNS, J., 2003: Handbook of ecotoxicology, Lewis Publishers, New York, 1290 s.
- KOČÍ V., MOCO VÁ K., 2009: Ekotoxikologie pro chemiky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 199 s.
- KÜMMERER K., 2001: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere 45: 957 - 969.
- MATĚJŮ V., VOSÁHLOVÁ S., KYCLT R., 2005: Stanovení ekotoxicity. Odpadové fórum 4/2005: 18-19.
- MATĚJŮ V., VOSÁHLOVÁ S., KYCLT R., ŠEDIVCOVÁ G., MAZALOVÁ M., 2012: Ekotoxicita antibiotik a hormonů. Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava) 20/2: 54 - 63.
- MARŠÁLEK B., 2002: Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. Sborník pracovní konference - Ekotoxikologické biotesty 1, Seč u Chrudimi, 8 - 24.
- NIES D.H., 1999: Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol.
- PANOUILLÉRES M., BOILLOT C., PERRODIN Y., 2007: Study of the combined effects of peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. Ecotoxicology 16: 327 - 340.
- PAUWELS B., VERSTRAETE W., 2006: The treatment of hospital wastewater: an appraisal. Journal of Water and Health 04.4: 405 – 416
- PAVLÍKOVÁ D., PAVLÍK M., MATĚJŮ L., BALÍK J., 2008: Ekotoxikologie. ČZU v Praze, 171 s.
- PITTER P., 2009: Hydrochemie. 4. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 579 s.
- RATSCH H. C., JOHNDRO D. J. AND MCFARLANE J. C., 1986: Growth inhibition and morphological effects of several chemicals in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Environmental Toxicology and Chemistry, 5: 55–60.
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., 2009: Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 226 s.

- SARMA B., ACHARYA C., JOSHI S. R., 2010: Pseudomonads: a versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:2828–2835.
- SHIMABUKURO R. H., HOFFER B. L., 1991: Metabolism of diclofop-methyl in susceptible and resistant biotypes of *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 251-260.
- SLÁDEČKOVÁ A., SLÁDEČEK V., 1997: Hydrobiologie. Vydavatelství ČVUT, Praha, 141 s.
- ŠÍDLOVÁ P., PODLIPNÁ R., VANĚK T., 2011: Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chem. Listy* 105, 8–14.
- ŠRÁMEK V., KOSINA L., 1996: Obecná a anorganická chemie. FIN, Olomouc.
- ŠTĚPÁNEK M. a kol., 1979: Hygienický význam životních dějů ve vodách. Avicenum Zdravotnické nakladatelství, Praha, 580 pp.
- VERLICCHI P., GALLETTI A., PETROVIC M., BARCELÓ D., 2010: Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3), 416-428.
- VERLICCHI P., AL AUKIDY M., GALLETTI A., PETROVIC M., BARCELO D., 2012a. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 430, 109–118.
- VERLICCHI P., AL AUKIDY M., ZAMBELLO E., 2012b: Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment — a review. *Sci. Total Environ.*, 429, 123–155.
- XU W., ZHANG G., LI X., ZOU S., LI P., HU Z., LI J., 2007: Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Res.*: 4526 – 4534
- ZIMOVÁ M. a kol., 2008: Dílčí zpráva úkolu SP-2f3/227/07: Hodnocení a minimalizace negativních vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s odpady ze zdravotnických zařízení, SZÚ.



ZGÓRSKA A., ARENDARYCZYK A., GRABINSKA-SOTA E., 2011: Toxicity assessment of hospital wastewater by the use of biotest battery. Archives of environmental Protection 37/3: 55 - 61.

### **Právní předpisy**

MŽP ČR, 2007: Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Věstník MŽP, ročník XVII, částka 4, 17 s.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1357/2014 ze dne 18. prosince 2014, kterým se nahrazuje příloha III směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/98/ES o odpadech a o zrušení některých směrnic.

NAŘÍZENÍ VLÁDY č. 143/2012 Sb. ze dne 28. března 2012, o postupu pro určování znečištění odpadních vod, provádění odečtů množství znečištění a měření objemu vypouštěných odpadních vod do povrchových vod.

SMĚRNICE 2000/60/ES Evropského parlamentu a Rady z 23. října 2000 ustavující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky.

SMĚRNICE Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 98/2008 ze dne 19. listopadu 2008 o odpadech a o zrušení některých směrnic.

SMĚRNICE Rady ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod (91/271/EHS).

VYHLÁŠKA č. 83/2016 Sb. ze dne 14. března 2016, kterou se mění vyhláška č. 383/2001 sb., o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění pozdějších předpisů.

VYHLÁŠKA č. 94/2016 Sb. ze dne 23. března 2016 o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.

VYHLÁŠKA č. 123/2012 Sb. ze dne 30. března 2012 o poplatcích za vypouštění odpadních vod do vod povrchových, v platném znění.

VYHLÁŠKA č. 257/2009 Sb. ze dne 5. srpna 2009 o používání sedimentů na zemědělské půdě, v platném znění.

VYHLÁŠKA č. 294/2005 Sb. ze dne 11. července 2005 o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, v platném znění.

VYHLÁŠKA č. 376/2001 Sb., ze dne 17. října 2001 o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, v platném znění.

VYHLÁŠKA č. 383/2001 Sb. ze dne 17. října 2001, o podrobnostech nakládání s odpady

VYHLÁŠKA č. 402/2011 Sb. ze dne 8. prosince 2011 o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí, v platném znění.

VYHLÁŠKA č. 499/2014 Sb. ze dne 11. prosince 2014, kterou se mění vyhláška č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat

ZÁKON č. 185/2001 Sb. ze dne 15. května 2001 o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů.

ZÁKON č. 229/2014 Sb. ze dne 23. září 2014, kterým se mění zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů.

ZÁKON č. 246/1992 Sb. ze dne 15. dubna 1992 na ochranu zvířat proti týrání.

ZÁKON č. 254/2001 Sb. ze dne 28. června 2001 o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), v platném znění.

ZÁKON č. 275/2013 Sb. ze dne 21. srpna 2013, kterým se mění zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích), ve znění pozdějších předpisů.

ZÁKON č. 350/2011 Sb. ze dne 27. října 2011 o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon), v platném znění.

## České technické normy a jiné standardy

CEN/TR 16110. Characterization of waste - Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste. 2010.

ČSN 75 7300. Jakost vod - Chemický a fyzikální rozbor - Všeobecná ustanovení a pokyny. Český normalizační institut, Praha, 2007, 20 s. Třídící znak: 75 7300.

ČSN 75 6406. Odvádění a čištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení. Český normalizační institut, Praha, 1996, 20 s. Třídící znak 75 6406.

ČSN EN 14735. Charakterizace odpadů - Příprava vzorků odpadu pro testy ekotoxicity. Český normalizační institut, Praha, 2007, 44 s. Třídící znak 83 8004.

ČSN ISO 3696 (684051). Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody. Český normalizační institut, Praha, 1994, 8s. Třídící znak 684051.

ČSN EN ISO 6341. Kvalita vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Zkouška akutní toxicity. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2013, 28 s. Třídící znak 75 7751.

ČSN EN ISO 7346-2. Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Část 2: Obnovovací metoda. Český normalizační institut, Praha, 1999, 16 s. Třídící znak 75 7761.

ČSN EN ISO 8692. Kvalita vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2012, 24 s. Třídící znak 75 7740.

ČSN EN ISO 11269-1. Kvalita půdy - Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru - Část 1: Metoda měření inhibice růstu kořene. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2013, 20 s. Třídící znak 83 6446.

ČSN EN ISO 11269-2. Kvalita půdy - Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru - Část 2: Účinky znečištěných půd na vzházení a růst vyšších rostlin. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2013, 24 s. Třídící znak 83 6446.

ČSN EN ISO 11348-1. Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: 76

Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009, 28 s. Třídící znak 75 7734.

ČSN EN ISO 11348-2. Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009, 24 s. Třídící znak 75 7734.

ČSN EN ISO 11348-3. Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009, 24 s. Třídící znak 75 7734.

ČSN ISO 5667-10. Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod. Český normalizační institut, Praha, 1996, 16 s. Třídící znak 75 7051.

ČSN ISO 10706. Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*). Český normalizační institut, Praha, 2001, 20 s. Třídící znak 75 7752.

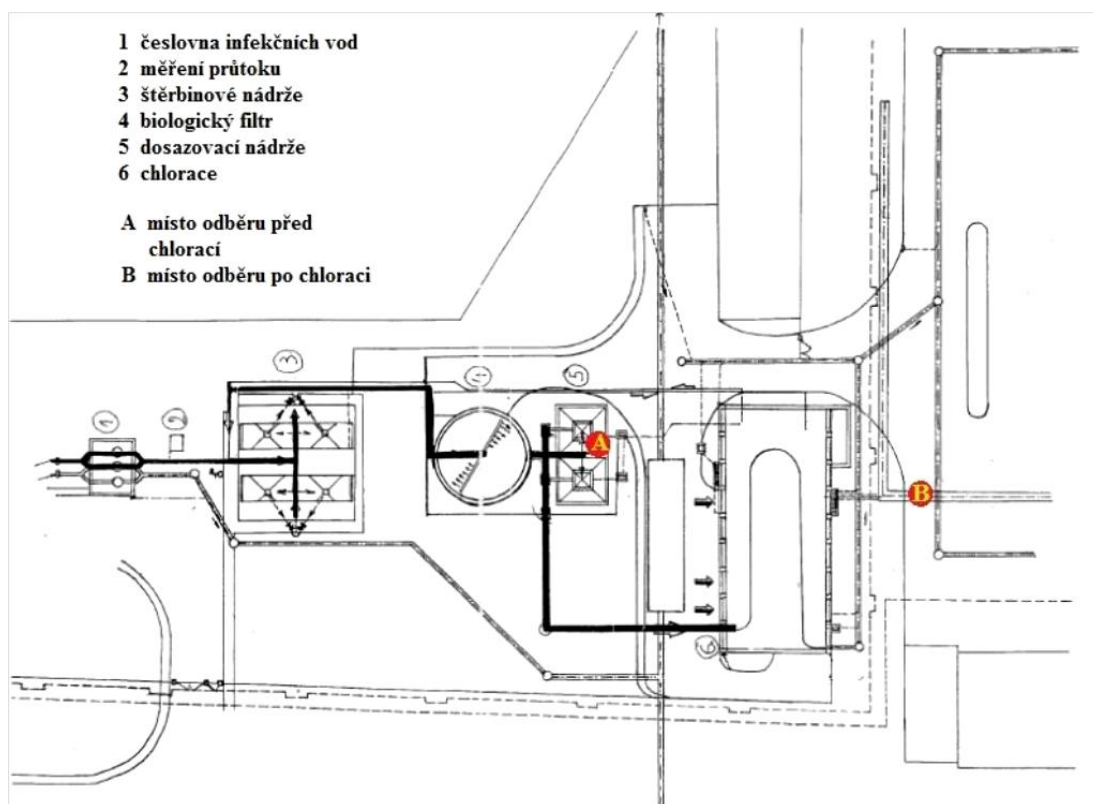
### **Software**

EKO-TOX, verze 5.2. INISOFT s.r.o.: Liberec, 27. 4. 2000.

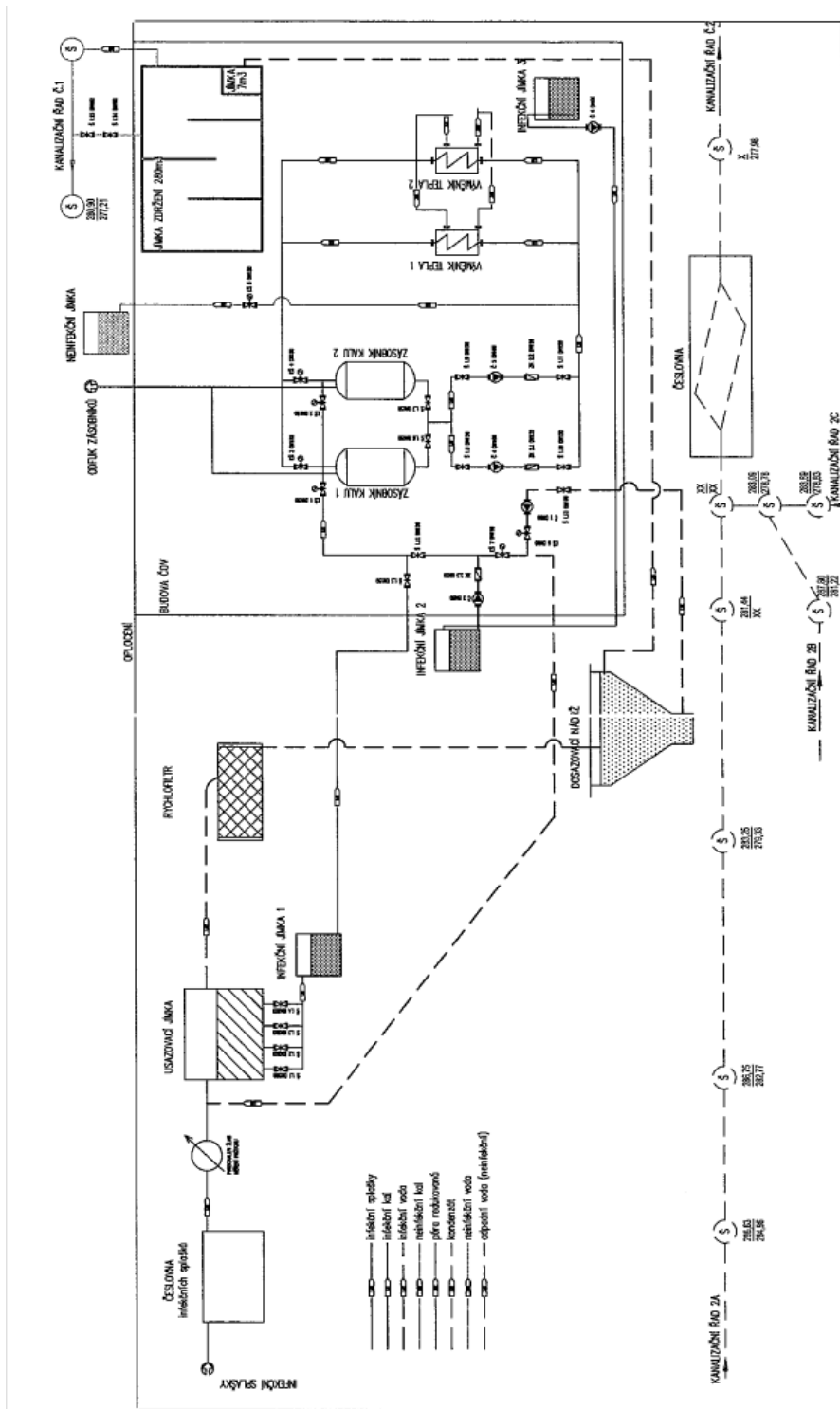
Microsoft Office Excel 2007

## 10. Přílohy

### Fotodokumentace




Obr. I: Schéma ČOV FN Motol s vyznačenými místy odběru vzorků (zdroj: Fuka T., 2010: Provozní řád ČOV FN Motol. Techneco, Praha, 38 s.)



Obr. II: Schéma ČOV FN Motol (zdroj: Fuka T., 2010: Provozní řád ČOV FN Motol. Techneco, Praha, 38 s.)

### TEST AKUTNÍ TOXICITY


Druh testu: **ověřovací**  
 Pořadové č. vzorku: 2/16 Datum nasazení testu: 29.2.2016  
 Číslo vzorku: **2.3/16/236** Datum ukončení testu: 4.3.2016  
 Firma: ČZU Praha  
 Druh organismu: **Poecilia reticulata**  
 Počet organismů v test. nádobě: 10 Test nasadil: A.Garbaczewská  
 Celkový počet organismů v kontrole: 10 Test odečetl: G.Čárová  
 Celkový počet organismů ve vzorku: 10 Za správnost odpovídá M.Wittlerová  
 Roztok vyměněn po 48 hodinách. podpis: 

označení vzorku	teplota [°C]						O <sub>2</sub> [% nasycení]						pH						mortalita [ks]				celková	celková
	hodiny						hodiny						hodiny						hodiny				mortalita	mortalita
	0	24	48	48	72	96	0	24	48	48	72	96	0	24	48	48	72	96	24	48	72	96	[ks]	[%]
kontrola	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	100	61	60	98	71	61	7,71	7,23	7,39	7,88	7,30	7,34	0	0	0	0	0	0,0%
vzorek	21,0	21,0	21,0	20,5	21,0	21,0	83	36	79	85	87	84	8,18	8,10	8,37	8,27	8,30	8,33	1	1	1	2	2	20,0%

Obr. III: Microsoft Office Excel 2007 – tabulka s výsledky ověřovacího testu na rybách *Poecilia reticulata*, vzorek E/236

### TEST INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS

#### Základní

Druh testu: **Základní**  
 Pořadové č. vzorku: 26/15 Datum nasazení testu: 19.1.2016  
 Číslo vzorku: **2.3/15/1136** Datum ukončení testu: 22.1.2016  
 Firma: ČZU Test nasadil: A.Garbaczewská  
 Druh organismu: **Desmodesmus subspicatus** Test odečetl: M.Wittlerová  
 Úvodní hustota buněk v 1ml: 10 000 Za správnost odpovídá: M.Wittlerová  
 podpis: 

označení vzorku	počet buněk v Bürker.komůrce		průměr 24 hod.	počet buněk v Bürker.komůrce		průměr 48 hod.	počet buněk v Bürker.komůrce		průměr 72 hod.	hustota 72 hod. [buněk/ml]	pH		pH zvýšení max.	průměrná růst.rychlost za den	VK růst.rychlosti
	I	II		I	II		I	II			začátek testu	konec testu			
K 1							359	398				8,85			
K 2							413	369				8,73			
K 3			#####			#####	466	485	424,1	1 060 208		8,56	1,3	1,55	1,9%
K 4							479	424				8,32			
K 5							404	444				8,75			
K 6							428	420			8,18	9,48			
150 ml/l							199	211							
"			#####			#####	220	240	229,8	574 583	8,21	8,61			
"							234	275							
210 ml/l							139	120							
"			#####			#####	125	112	124,0	310 000	8,22	8,56			
"							119	129							
294 ml/l							68	51							
"			#####			#####	95	100	71,3	178 333		8,60			
"							56	58							
412 ml/l							35	43							
"			#####			#####	52	68	51,7	129 167	8,19	8,59			
"							42	70							
577 ml/l							19	19							
"			#####			#####	26	25	20,8	52 083	8,24	8,69			
"							18	18							

Obr. IV: Tabulka s výsledky základního testu na sladkovodní zelené řase *Desmodesmus subspicatus*, vzorek E/1136. Microsoft Office Excel 2007.

### Vyhodnocení testů toxicity na organismu *Daphnia magna*

Zkouška: ODPADY  
Číslo vzorku: 2.3/15/857  
Označení vzorku: dafnie

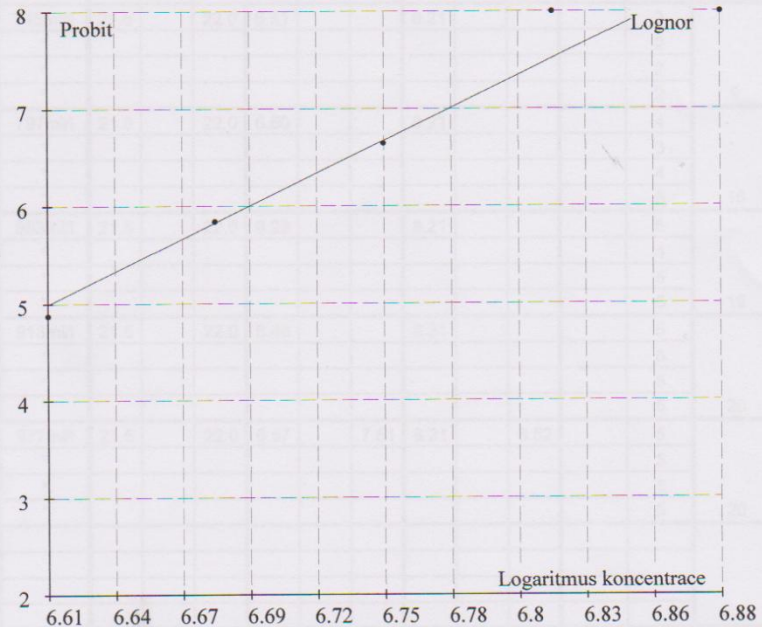
Datum měření: 15.10.2015  
Příloha: 1

#### Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace ml/l	Imobilizace %
745	45.0
797	80.0
853	95.0
913	100.0
977	100.0

48hIC50 = 745.5 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-51.8, +48.4)  
TU = 0.13

IC0 = 585.3 ml/l  
IC100 = 949.5 ml/l




Obr. V: Vyhodnocení základního testu toxicity na perloočce *Daphnia magna*. Vzorek E/857. Program EKO-TOX 5.2.



## TEST AKUTNÍ TOXICITY

Druh testu: **základní**

Pořadové č.vzorku: 18/15 Datum nasazení testu: 13.10.2015  
 Číslo vzorku: **2.3/15/857** Datum ukončení testu: 15.10.2015  
 Firma: CIUR,s.r.o.  
 Druh organismu: **Daphnia magna**  
 Počet organismů v test. nádobě: 5 Test nasadil: A.Garbaczewská  
 Celkový počet organismů v kontrole: 20 Test odečetl: M.Wittlerová  
 Celkový počet organismů v 1 koncentraci: 20 Za správnost odpovídá: M.Wittlerová  
 podpis: 

označení vzorku	teplota [°C]			O <sub>2</sub> [mg/l]			pH			úhyn, imobilizace			
	hodiny			hodiny			hodiny			v 1 test.nádobě		celkem	celkem
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	24	48	[ks]	[%]
K1	21.5		22.0	8.65		7.97	7.95		7.77			0	
K2												0	
K3												0	
K4												0	0.0
745ml/l	21.5		22.0	6.51			8.21					3	
"												2	
"												2	
"												2	45.0
797ml/l	21.5		22.0	6.60			8.21					4	
"												3	
"												4	
"												5	80.0
853ml/l	21.5		22.0	6.23			8.21					5	
"												4	
"												5	
"												5	95.0
913ml/l	21.5		22.0	6.46			8.21					5	
"												5	
"												5	
"												5	100.0
977ml/l	21.5		22.0	6.57		7.51	8.21		8.52			5	
"												5	
"												5	
"												5	100.0

Obr. VI: Tabulka s výsledky základního testu na perloočce *Daphnia magna*, vzorek E/857. Microsoft Office Excel 2007.

### Vyhodnocení testů toxicity na organismu *Scenedesmus subspicatus*

Zkouška: ODPADY  
Číslo vzorku: 2.3/15/1136  
Označení vzorku: řasy

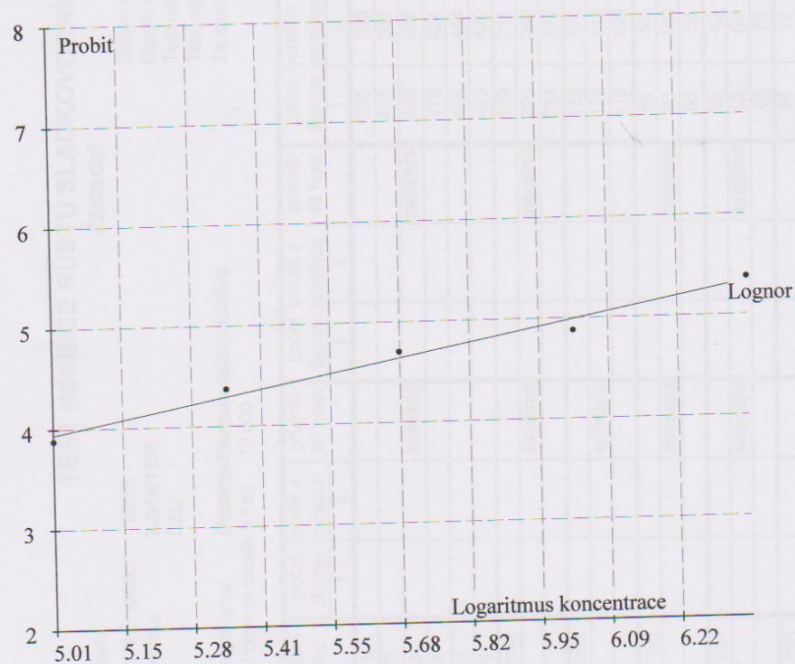
Datum měření: 22.1.2016  
Příloha: 1

Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace ml/l	Hustota buněk	Inhibice %
kontrola	1060250	
150	574500	13.1
210	310000	26.4
294	178250	38.2
412	129250	45.1
577	52000	64.6

72hIC50 = 415.7 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-72.0 , +61.4)  
TU = 0.24

IC0 = 23.2 ml/l  
IC100 > 1000 ml/l



Obr. VII: Vyhodnocení základního testu inhibice na sladkovodní zelené řase *Desmodesmus subspicatus*. Vzorek E/1136. Program EKO-TOX 5.2.

### TEST INHIBICE RŮSTU KOŘENE *SINAPIS ALBA*

Druh testu: **ověřovací**

Pořadové č. vzorku: 25/15  
 Číslo vzorku: **2.3/15/1135**  
 Firma: ČZU Praha

Datum nasazení: 27.11.2015  
 Datum ukončení: 30.11.2015  
 Test nasadil: J.Hachová  
 Test odečet: J.Hachová  
 Za správnost odpov.: J.Hachová  
 podpis: *J.Hachová*

Kontrolní vzorek			
počet vyklíčených semen			
	30	30	30
délka kořene [mm]			
1	25	52	22
2	39	52	27
3	25	30	36
4	21	23	52
5	35	37	26
6	22	41	53
7	31	34	31
8	43	50	22
9	37	46	7
10	26	17	25
11	21	31	30
12	26	30	13
13	41	46	25
14	38	38	18
15	18	10	13
16	34	16	19
17	32	36	44
18	27	22	18
19	46	32	31
20	31	29	27
21	41	37	18
22	32	21	29
23	17	24	9
24	34	41	36
25	10	24	31
26	21	34	9
27	18	27	12
28	20	31	6
29	4	20	2
30	4	4	10
průměr			
	27,3	31,2	23,4

průměr.délka kořene : 27,3  
 VK : 11,7%

Testovaný vzorek			
počet vyklíčených semen			
	30	30	30
délka kořene [mm]			
1	26	31	38
2	35	41	31
3	38	35	42
4	36	42	17
5	28	20	34
6	29	22	42
7	20	27	37
8	27	30	23
9	30	27	30
10	41	27	32
11	23	26	26
12	34	22	13
13	34	33	16
14	30	41	24
15	26	27	28
16	28	24	27
17	29	31	32
18	26	27	20
19	27	34	12
20	14	36	15
21	19	10	24
22	19	24	22
23	29	22	25
24	34	10	20
25	14	10	18
26	7	8	32
27	16	12	15
28	10	15	16
29	23	10	17
30	0	3	11
průměr			
	25,1	24,2	24,6

průměr.délka kořene : 24,6  
 VK : 1,4%

**inhibice: 9,7%**

**Obr. VIII: Tabulka s výsledkem ověřovacího testu inhibice kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*), vzorek E/1135. Microsoft Office Excel 2007.**