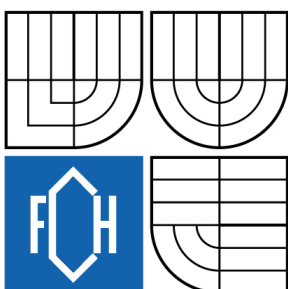


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

# EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY A JEJICH APLIKACE K HODNOCENÍ VEDLEJŠÍCH ENERGETICKÝCH PRODUKTŮ

ECOTOXICOLOGICAL TESTS AND THEIR APPLICATION  
FOR ECOTOXICITY EVALUATION OF ENERGETIC BYPRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

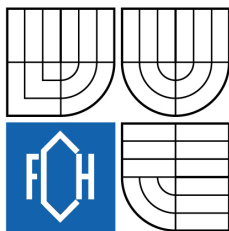
Ing. PETRA BALLNÉROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ  
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0272/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Student(ka): **Ing. Petra Ballnérová**  
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)  
Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**  
Konzultanti diplomové práce: prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

### Název diplomové práce:

Ekotoxikologické testy a jejich aplikace k hodnocení vedlejších energetických produktů

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Výběr vhodných testů pro ekotoxikologické hodnocení vedlejších energetických produktů
3. Posouzení ekotoxicity vedlejších energetických produktů

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Ing. Petra Ballnérová  
Student(ka)

-----  
MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Vedlejší energetické produkty představují část odpadů z energetických provozů, které jsou přímým zůstatkem spáleného paliva, popř. tuhé zbytky z čištění spalin. Jejich další materiálové využití může ovlivňovat terestrické a následně také akvatické ekosystémy. Z těchto důvodů je velmi potřebné zabývat se i jejich případnou ekotoxicitou. V rámci této diplomové práce byly ze vzorků vedlejších energetických produktů připraveny vodné výluhy, které byly podrobeny ekotoxikologickému testování. Byly použity tři alternativní testy ekotoxicity na vodních organismech: Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> a Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> na organismu *Thamnocephalus platyurus* a Daphtoxkit F<sup>TM</sup> na organismu *Daphnia magna*. Ekotoxicita byla také hodnocena pomocí standardních testů fytotoxicity, a to testem inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a testem inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*). Výsledkem těchto testů bylo stanovení hodnot EC50, LC50 a IC50, na jejichž základě byla posouzena ekotoxicita vedlejších energetických produktů.

## ABSTRACT

The energetic byproducts are a part of energetic wastes which are residues of fuels combustion or also the residues of flue-gas cleaning. Their following application can impact the terrestrial and subsequently also aquatic ecosystems. With respect to these reasons it is necessary to deal with their possible ecotoxicity. Within the framework of this diploma thesis water leaches from the byproducts' samples were prepared and subsequently ecotoxically tested. Three alternative toxicity tests on aquatic organisms were used: Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> and a Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> on sense organisms *Thamnocephalus platyurus* and Daphtoxkit F<sup>TM</sup> on sense organisms *Daphnia magna*. Standard tests of fytotoxicity were also used; *Sinapis alba* root growth inhibition test and *Lemna minor* growth inhibition test. The values of EC50, LC50 and IC50 were determined and ecotoxicity of energetic byproducts was evaluated.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Testy ekotoxicity, fytotesty, vedlejší energetické produkty

## KEYWORDS

Tests of ecotoxicity, phytotests, energetic byproducts

BALLNÉROVÁ, P. *Ekotoxikologické testy a jejich aplikace k hodnocení vedlejších energetických produktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 116 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem celou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé diplomové práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. a konzultantům za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce.

Motto:

*„Teď, když jsme se naučili létat v povětří jako ptáci a potápět se jako ryby, zbývá už jen jediné: Naučit se žít na Zemi jako lidé.“*

G. B. Shaw

## OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ÚVOD.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2. CÍL PRÁCE.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>   | <b>10</b> |
| 3.1. Toxikologie.....  | 10        |
| 3.2. Ekotoxikologie.....   | 10        |
| 3.3. Biotesty.....   | 10        |
| 3.3.1. Rozdělení ekotoxikologických testů .....                                    | 11        |
| 3.3.2. Princip ekotoxikologického testování .....                                  | 11        |
| 3.3.3. Standardní testy toxicity.....  | 14        |
| 3.3.3.1. Akutní imobilizační test na hroznatce velké ( <i>Daphnia magna</i> )..... | 14        |
| 3.3.3.2. Test akutní toxicity na rybách.....                                       | 15        |
| 3.3.3.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas.....                                | 16        |
| 3.3.3.4. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ).....      | 16        |
| 3.3.4. Testy fytoxicity .....  | 17        |
| 3.3.4.1. Test inhibice růstu okřehku menšího ( <i>Lemna minor</i> ).....           | 18        |
| 3.3.4.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i> .....                | 19        |
| 3.3.5. Test na žábřonozce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> ).....                | 19        |
| 3.3.6. Alternativní testy toxicity.....  | 20        |
| 3.3.6.1. Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....  | 21        |
| 3.3.6.2. Daphtoxkit F <sup>TM</sup> .....  | 21        |
| 3.3.6.3. Rotoxkit F <sup>TM</sup> .....  | 22        |
| 3.3.6.4. Algaltoxkit F <sup>TM</sup> .....   | 22        |
| 3.3.6.5. Rapidtoxkit F <sup>TM</sup> .....   | 23        |
| 3.4. Vedlejší energetické produkty.....  | 24        |
| 3.4.1. Vznik vedlejších energetických produktů.....                                | 24        |
| 3.4.1.1. Kotle roštové.....  | 24        |
| 3.4.1.2. Kotle fluidní.....  | 25        |
| 3.4.1.3. Kotle práškové.....   | 26        |
| 3.4.2. Související legislativní předpisy.....                                      | 26        |
| 3.4.2.1. Ekotoxicita odpadů.....   | 28        |
| <b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>   | <b>30</b> |
| 4.1. Vzorčky vedlejších energetických produktů.....                                | 30        |
| 4.2. Popis technologických postupů energetických provozoven.....                   | 30        |
| 4.2.1. Provozovna A.....   | 30        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.2.    | Provozovna B .....  | 31        |
| 4.2.3.    | Provozovna C .....  | 31        |
| 4.2.4.    | Provozovna D .....  | 32        |
| 4.2.5.    | Provozovna E .....  | 32        |
| 4.3.      | Odběr vzorků .....  | 32        |
| 4.4.      | Použité přístroje a zařízení .....  | 32        |
| 4.5.      | Příprava vodného výluhu .....   | 33        |
| 4.6.      | Ekotoxikologické testování vzorků .....                                       | 33        |
| 4.6.1.    | Test inhibice růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ) .....         | 34        |
| 4.6.2.    | Akutní imobilizační test na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) .....    | 35        |
| 4.6.3.    | Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> ) ..... | 36        |
| 4.6.4.    | Test inhibice růstu okřehku menšího ( <i>Lemna minor</i> ) .....              | 36        |
| 4.6.5.    | Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....  | 38        |
| 4.6.6.    | Rapidtoxkit F <sup>TM</sup> .....   | 39        |
| <b>5.</b> | <b>VÝSLEDKY .....</b>   | <b>40</b> |
| 5.1.      | Příprava vodného výluhu .....   | 40        |
| 5.2.      | Test inhibice růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ) .....         | 41        |
| 5.2.1.    | Úvodní test .....   | 41        |
| 5.2.2.    | Ověřovací test .....  | 41        |
| 5.3.      | Akutní imobilizační test na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) .....    | 42        |
| 5.3.1.    | Úvodní test .....   | 42        |
| 5.3.2.    | Ověřovací test .....  | 43        |
| 5.3.3.    | Předběžný test .....  | 43        |
| 5.3.4.    | Základní test .....   | 44        |
| 5.4.      | Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> ) ..... | 46        |
| 5.4.1.    | Úvodní test .....   | 46        |
| 5.4.2.    | Ověřovací test .....  | 46        |
| 5.4.3.    | Předběžný test .....  | 47        |
| 5.4.4.    | Základní test .....   | 48        |
| 5.5.      | Test inhibice růstu okřehku menšího ( <i>Lemna minor</i> ) .....              | 50        |
| 5.5.1.    | Úvodní test .....   | 50        |
| 5.5.2.    | Předběžný test .....  | 50        |
| 5.5.3.    | Základní test .....   | 52        |
| 5.6.      | Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....  | 56        |
| 5.7.      | Rapidtoxkit F <sup>TM</sup> .....   | 59        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. DISKUZE VÝSLEDKŮ .....</b>               | <b>60</b> |
| <b>7. ZÁVĚR .....</b>                          | <b>71</b> |
| <b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....</b>         | <b>73</b> |
| <b>9. SEZNAM ZKRATEK .....</b>                 | <b>77</b> |
| <b>10. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ .....</b>        | <b>78</b> |
| <b>11. SEZNAM TABULEK.....</b>                 | <b>79</b> |
| <b>12. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>                  | <b>80</b> |
| PŘÍLOHA 1 Shrnutí výsledků pro vzorek A1 ..... | 81        |
| PŘÍLOHA 2 Shrnutí výsledků pro vzorek A2 ..... | 84        |
| PŘÍLOHA 3 Shrnutí výsledků pro vzorek B1 ..... | 87        |
| PŘÍLOHA 4 Shrnutí výsledků pro vzorek B2 ..... | 91        |
| PŘÍLOHA 5 Shrnutí výsledků pro vzorek C1 ..... | 94        |
| PŘÍLOHA 6 Shrnutí výsledků pro vzorek C2 ..... | 98        |
| PŘÍLOHA 7 Shrnutí výsledků pro vzorek C3 ..... | 101       |
| PŘÍLOHA 8 Shrnutí výsledků pro vzorek D1 ..... | 105       |
| PŘÍLOHA 9 Shrnutí výsledků pro vzorek D2 ..... | 108       |
| PŘÍLOHA 10 Shrnutí výsledků pro vzorek E1..... | 111       |
| PŘÍLOHA 11 Probitová analýza.....              | 116       |

## 1. ÚVOD

Během posledních 100 let došlo k výraznému zvýšení spotřeby energií, především energie elektrické, ve všech průmyslových odvětvích i v domácnostech. Tato zvýšená energetická poptávka měla a stále má za následek intenzivnější využívání nejen fosilních paliv, ale i paliv získaných z obnovitelných energetických zdrojů.

Výroba elektrické energie je realizována převážně spalováním tuhých paliv v elektrárnách i v teplárnách s kombinovanou výrobou elektřiny a tepla. Tyto energetické provozovny tedy produkují nejen technologickou páru potřebnou k výrobě elektřiny, horkou a teplou vodu, ale v závislosti na způsobu spalování i tzv. vedlejší energetické produkty, mezi které patří primárně škváry, strusky, popel a podle způsobu čištění spalin i úletové popílký a produkty odsiřování. Všechny tyto produkty jsou považovány za odpady a jejich další materiálové využívání je podmíněno splněním určitých fyzikálních a chemických vlastností, včetně environmentálních požadavků. Veškeré tyto požadavky jsou konkretizovány evropskou i českou legislativou a normami ČSN EN, resp. normami ISO.

Jednou ze sledovaných vlastností je i hodnocení ekotoxicity, která představuje nebezpečnou vlastnost s označením H 14. Její hodnocení je dle platné legislativy prováděno na vodných výluzích odpadů, které jsou podrobeny testování na čtyřech organismech, kterými jsou tři zástupci vodních organismů a jedna kulturní plodina.



## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je ekotoxikologické hodnocení vodných výluhů vedlejších energetických produktů v souladu s platnou legislativou. Testované materiály pocházely z různých energetických provozoven na Moravě. Součástí práce je i volba vhodných alternativních a standardních ekotoxikologických testů, prostřednictvím kterých budou vodné výluhy vedlejších energetických produktů hodnoceny. Na základě výsledků těchto testů budou stanoveny ekotoxikologické hodnoty. Tyto hodnoty umožní posouzení testovaných vzorků z hlediska nebezpečné vlastnosti H 14 Ekotoxicita a slouží jako podklad pro případné další materiálové využití těchto vedlejších energetických produktů.

Pro splnění cílů bude provedeno:

- zhotovení vodných výluhů vedlejších energetických produktů,
- ekotoxikologické hodnocení těchto výluhů pomocí vybraných alternativních testů toxicity,
- ekotoxikologické hodnocení výluhů pomocí vybraných standardních testů toxicity,
- posouzení vybraných vzorků vedlejších energetických produktů z hlediska ekotoxicity v souladu s platnou legislativou.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Toxikologie

Toxikologie je samostatný vědní obor studující nepříznivé účinky cizorodých chemických látek nebo jejich směsí na živé organismy. Je oborem interdisciplinárním, protože při studiu toxických účinků a objasňování mechanismu jejich podstaty využívá výsledků ostatních věd, např. biologie, fyziologie a patofyziologie, farmakologie, genetiky, chemie, biochemie a dalších přírodovědných oborů.

Schopnost chemických látek působit nepříznivě na živé organismy je nazývána toxicita a chemická látka vykazující nepříznivé účinky je označována jako toxická látka, popř. toxin, jedovatá látka nebo jed.

Chemickou látkou rozumíme chemické prvky a jejich sloučeniny, resp. jejich směsi definovaného složení, přičemž jako jedovaté označujeme takové chemické látky, které již v malých dávkách nebo nízkých koncentracích vyvolávají těžké poškození organismu nebo vedou k jeho zániku. Již počátkem 16. století vyslovil Paracelsus (Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim, 1493-1548) jednu z nejstarších definic jedovaných látek: *Všechny látky jsou jedy a závisí jen na dávce, kdy látka přestává být jedem a stává se léčivem.*

Expozice je chápána jako kontakt chemické látky s vnějšími hranicemi živého organismu, při níž dojde k průniku chemické látky do vnitřních částí organismu.

Posouzení nebezpečnosti chemické látky spočívá ve sběru a vyhodnocování dat o jejím nepříznivém účinku na zdraví člověka a sledování podmínek, za jakých se tyto nepříznivé účinky mohou projevit. [1, 2, 3]

#### 3.2. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je součástí toxikologie životního prostředí a je zaměřena na studium vlivu toxických látek na dynamiku populace uvnitř specifických ekosystémů. Těmito ekosystémy mohou být jak malé uzavřené oblasti, tak celé kontinenty nebo dokonce celá planeta Země. [2]

Termín ekotoxikologie použil jako první roku 1969 člen francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut, který definoval tuto disciplínu jako studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva.

Ekotoxikologie se tedy zabývá studiem toxického působení látek lidského či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Kromě sledování účinků látek je předmětem zájmu ekotoxikologie i jejich pohyb v životním prostředí.

Cílem oboru je vyvíjet metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních a reprodukovatelných podmínek. Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří. [4, 5, 6]

#### 3.3. Biotesty

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek jsou používány biologické testy toxicity. Jejich význam spočívá v postizení souhrnu účinků všech přítomných látek a sloučenin v testovaném roztoku na testovací materiál, kterým může být organismus, kultura, tkáň nebo buňka. Testy toxicity slouží k rychlému a dostatečnému zjištění a zhodnocení chemických látek, přípravků i odpadů, na jejichž základě lze případně odhadnout negativní účinek těchto látek. Využívají se tedy k hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů ukládaných na skládky a havárií spojených s průnikem odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů. [7, 8]

### 3.3.1. Rozdělení ekotoxikologických testů

Ekotoxikologické testy je možné rozdělit z několika hledisek, z nichž nejvýznamnější je rozdělení dle doby expozice:

- testy akutní toxicity: jsou zaměřeny na toxické účinky látek, které se projevují v krátké době po jednorázovém podání látky, přičemž je účinkům látky vystaven testovací organismus přímo. Nejčastěji se stanovuje úmrtnost organismů měřená jako:
  - LD50 - letální dávka, při které uhynie 50 % testovacích organismů,
  - LC50 - letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovacích organismů,
  - EC50 - efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů,
  - IC50 - inhibiční koncentrace, která způsobí 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Doba trvání akutních testů toxicity se pohybuje v rozmezí 24 až 72 hodin. [9]

- testy subakutní (subchronické) toxicity: testovací organismy jsou vystaveny působení látky opakovaně, většinou jednou denně po dobu 28 - 90 dnů. Dávka testované látky je však nižší než v případě akutních testů. Tyto testy slouží k určení biologického účinku dané látky, k zjištění kumulativního účinku a možných patogenních změn organismů, přičemž lze získat i hodnoty:
  - NOAEL (*No Observed Adverse Effect level*) - dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek,
  - LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect level*) - nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek. [7, 10]
- testy chronické toxicity: se využívají k dlouhodobému testování účinků látek na organismy, zpravidla déle než 90 dní. K plánování testů chronické toxicity se využívají výsledky testů subakutní toxicity. Vliv toxické látky se projevuje především na dalších vývojových stádiích testovacích organismů, přičemž je velmi častý výskyt dědičných vad, které ovlivňují reprodukci testovacích organismů. Tyto změny jsou ověřovány patologickým a histologickým vyšetřením jak uhynulých organismů, tak i organismů, které testování přežily. Výsledky testů slouží k určení hodnot NOAEL a LOAEL. [10, 11, 12]

### 3.3.2. Princip ekotoxikologického testování

Ekotoxikologické testování se dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů i dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu provádí na vodném výluhu odpadu. Vodný výluh je možno připravit buď podle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů nebo podle normy ČSN EN 12457-4 (2003): Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním).

Vodný výluh je definován dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008, bod 2.3 jako výluh, který byl připraven ze vzorku odpadu podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě, tj. získaný při zkoušce vyluhovatelnosti vodou. K loužení odpadu se využívá destilovaná voda, popř. voda demineralizovaná nebo deionizovaná bez obsahu chloru a dalších toxických látek.

Vzorek odpadu, ze kterého se připraví vodný výluh, je nutno nejprve prosít sítem s velikostí oka 4 mm. V případě, že nadsítný podíl je více než 5 % hmotnosti vzorku, je nutné tento podíl rozdrtit a znovu prosít.

Tento vzorek odpadu, tzv. analytický, je možno použít pro vlastní loužení, kterému ale předchází stanovení podílu sušiny  $DR$  ve vzorku. Analytický vzorek se suší do konstantní hmotnosti při teplotě  $(105 \pm 5) ^\circ\text{C}$  podle postupu daným normou ISO 11465 a podíl sušiny se vypočte dle vztahu:

$$DR = 100 \cdot \frac{M_D}{M_W} \quad (1)$$

kde

- $DR$  je podíl sušiny v analytickém vzorku v [%],
- $M_D$  - hmotnost vysušeného analytického vzorku v [kg],
- $M_W$  - navážka nevysušeného analytického vzorku v [kg].

K přípravě 1 l vodného výluhu je potřeba vypočítat množství potřebného analytického vzorku dle vztahu:

$$M = 100 \cdot \frac{M_T}{DR} \quad (2)$$

kde

- $M$  je hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu v [kg],
- $M_T$  - teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg], (pro 1 l vody je  $M_T = 0,100$  kg),
- $DR$  - podíl sušiny v analytickém vzorku v [%].

Vypočtené množství analytického vzorku o hmotnosti  $M$  se vloží do vzorkovnice a přidá se k němu množství vody  $LA$  vypočtené dle rovnice (3):

$$LA = M_T \cdot \frac{(11 - 100) / DR}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (3)$$

kde

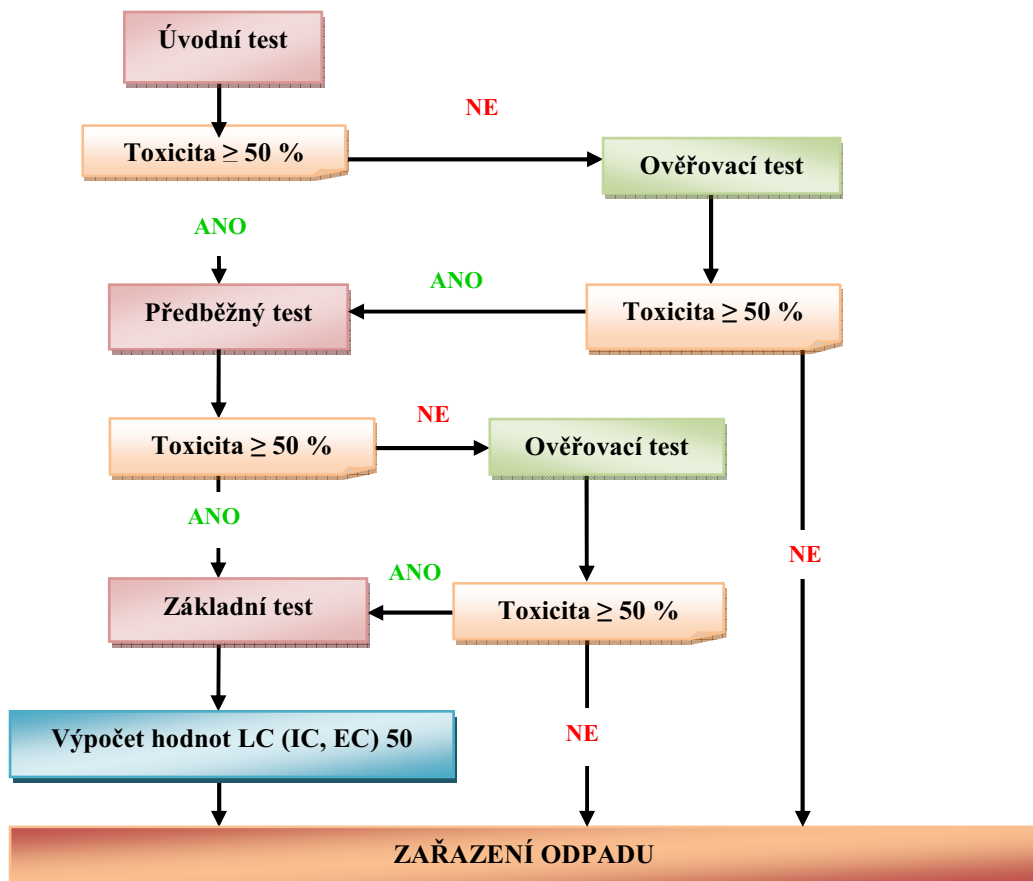
- $LA$  je množství přidané vyluhovací kapaliny v [l],
- $M_T$  - teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg] (pro 1 l vody je  $M_T = 0,100$  kg),
- $DR$  - podíl sušiny v analytickém vzorku v [%],
- $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$  - hustota vody v [kg/l] (pro účely stanovení rovna 1 kg/l).

Vlastní vyluhování odpadu vodou o teplotě 15 až 25 °C je prováděno plynulým otáčením vzorkovnice se vzorkem a vodou na třepače „hlava – pata“ po dobu  $(24 \pm 0,5)$  hod při rychlosti 5 - 10 otáček za minutu. Po uplynutí doby nutné k vyluhování odpadu se vzorkovnice vyjmou a vzorek se nechá sedimentovat po dobu  $(15 \pm 5)$  min. Následně se přefiltruje přes papírový filtr o velikosti pórů 5  $\mu\text{m}$ . Příprava vodného výluhu a jeho následná filtrace jsou znázorněny na *obrázku 1*. U získaného výluhu se změří jeho celkový objem  $V_E$  v [l], konduktivita v [mS/cm], hodnota pH a teplota výluhu v [°C]. Při dalších analýzách je na vodný výluh nahlíženo jako na vzorek vody. [13, 14, 15, 16]



Obr. 1 Příprava vodného výluhu

Vodné výluhy odpadů se podrobují ekotoxikologickému testování dle Metodického pokynu Ministerstva životního ZP 11/2007 ke stanovení ekotoxicity odpadů podle schématu uvedeného na obrázku 2.



Obr. 2 Schéma ekotoxikologického testování odpadů [17]

Testy ekotoxicity se zahajují **úvodním testem**, který slouží pro odhad ekotoxicity neředěného vodného výluhu nebo testovaného roztoku chemické látky na testovací organismus.

Vyplyne-li z výsledků úvodního testu, že je toxický účinek menší než 50 %, provede se **ověřovací test**. Ověřovací testy se provádějí s nejméně trojnásobným množstvím organismů oproti počtu organismů požadovaných při základních testech. Cílem ověřovacích testů je potvrzení, že neředěný vodný výluh nebo testovaný roztok chemické látky nevykazuje toxické účinky na předepsaných testovacích organismech.

Projeví-li se v průběhu úvodního testu toxický účinek pro více než 50 % testovacích organismů, provede se **předběžný test** s využitím vhodně zvolené škály koncentrací vodného výluhu. Za vhodně zvolenou koncentrační řadu vodného výluhu pro předběžný test se považuje řada zahrnující koncentrace s toxickým účinkem pro 0 - 100 % testovacích organismů.

**Základní test** se naplánuje na základě výsledků předběžného testu a slouží ke stanovení hodnoty LC(EC, IC)50.

V každém testu se nasazuje rovněž kontrola s počtem organismů, odpovídajícím metodice daného testu. Jako kontrola se využívá ředící voda, popř. živné médium, bez přídavku vodného výluhu odpadu a probíhá za stejných podmínek jako vlastní testy ekotoxicity, pro něž je kontrola využívána. [17]

### 3.3.3. Standardní testy toxicity

Existuje celá řada ekotoxikologických testů, které jsou standardizovány nejen dle postupů ISO (*International Organization for Standardization* - Mezinárodní organizace pro standardizaci), ale i podle postupů OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* - Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) či US-EPA (*United States Environmental Protection Agency* - Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států).

V České republice se, vzhledem k požadavkům legislativy, standardně provádí testování ekotoxicity vod, odpadních vod a vodných výluhů pevných matric na následujících organismech:

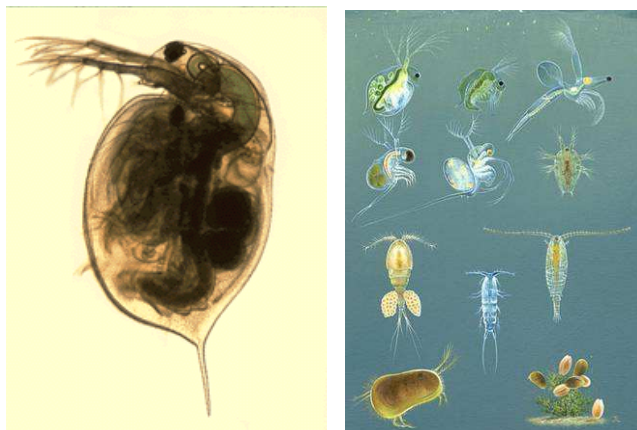
- **Hrotnatka velká** dle ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity;
- **Ryby** dle ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] - část 2: Obnovovací metoda;
- **Řasy** dle ČSN EN 28692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692; 1989);
- **Semena hořčice bílé** - zkouška inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ZP 11/2007 ke stanovení ekotoxicity odpadů. [17]

#### 3.3.3.1. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Hrotnatka druhu *Daphnia magna* (obr. 3) je součástí sladkovodního zooplanktonu. Patří do řádu perlooček, podtřídy lupenonožců, třídy koryšů. Je to drobný členovec o rozměrech 1 - 5 mm, který se žíví planktonem. Vývoj jedince je přímý, bez larválních stádií.

K ekotoxikologickému testování se využívají hrotnatky velké ve stáří do 24 hodin nejméně třetí generace, přičemž se účinkům různých koncentrací vystavují po dobu 24, popř. 48 hodin

při teplotě ( $20 \pm 2$ ) °C, bez krmení a osvětlení. Současně se stejné organismy nasadí do standardně připravené ředící vody bez testované látky, což slouží jako tzv. kontrola. Po 24 a 48 hodinách se zkontroluje stav hrotnatek a zaznamenají se uhynulí a imobilizovaní jedinci v jednotlivých koncentracích testované látky i v kontrolě. Získané hodnoty slouží ke stanovení efektivní koncentrace 24hEC50 a 48hEC50. [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]



Obr. 3 Hrotnatka velká (*Daphnia magna*), včetně vývojových stádií [22, 25]

### 3.3.3.2. Test akutní toxicity na rybách

Jako testovací organismy se většinou používají druhy danio pruhovaný (*Brachydanio rerio*) a živorodka duhová (*Poecilia reticulata*). Oba organismy jsou znázorněny na obrázku 4 a na obrázku 5.

Danio pruhovaný se k testům vybírá ve věku 2,5 až 3,5 měsíců s délkou těla 25 až 35 mm, zatímco živorodka duhová ve věku 3 až 4 měsíce s délkou těla 15 až 25 mm. Jedinci se k testování vybírají náhodně, avšak za dodržení poměru pohlaví 1:1.

Testovací jedinci se vystavují účinkům různých koncentrací testované látky po dobu 96 hodin při teplotě ( $23 \pm 2$ ) °C a osvětlení 12 až 16 hodin denně, přičemž se během testu sleduje jejich chování a stav a zaznamenává se počet uhynulých jedinců. Současně se nasazuje stejný počet organismů i do kontrolního akvária.

Vybraní jedinci se před testem 7 dní aklimatizují v ředící vodě při zachování stejných podmínek, tj. především při stejné teplotě a osvětlení, jako při vlastním testování. Během testu se zaznamenává teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po ukončení testu jsou jedinci, kteří testování přežili, usmrceni, ovšem mimo jedince, kteří byli v kontrolním akváriu.

Získané hodnoty slouží k určení letální koncentrace 96hLC50 . [17, 26]



Obr. 4 *Danio pruhovaný*  
(*Brachydanio rerio*) [27]



Obr. 5 *Živorodka duhová*  
(*Poecilia reticulata*) [28]

### 3.3.3.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas

Nejčastěji využívanými organismy pro test inhibice růstu sladkovodních řas bývají *Desmodesmus subspicatus* (obr. 6) a *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Scenedesmus quadricauda*) znázorněná na obrázku 7. Jsou to zástupci zelených řas, kteří se velmi často vyskytují v našich vodách a představují tak důležitý článek potravního řetězce.

Princip testu spočívá ve stanovení toxického účinku testovaných látek na inhibici růstu a rozmnožování řasy v jednotlivých koncentracích testované látky ve srovnání s kontrolami v čistém živném roztoku.

Před začátkem testu se řasy po několik generací kultivují při teplotě  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  za stálého osvětlení 6 000 lx v živném roztoku, který zároveň slouží jako ředící voda při přípravě koncentrační řady testované látky nebo vodného výluhu odpadu.

Řasy se inkubují po dobu 72 hodin v různých koncentracích testované látky a každých 24 hodin se v nich měří hustota buněk pomocí Bürkerovy počítací komůrky, přičemž se řasy cca 3x denně promíchávají. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice, čili snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur. Poté se vyhodnotí inhibiční koncentrace 72hIC<sub>50</sub>. V případě, že testovaná látka působí stimulačně, se stanovení 72hIC<sub>50</sub> neprovádí. [17, 18]



Obr. 6 Řasa *Desmodesmus subspicatus* [29]



Obr. 7 Řasa *Pseudokirchneriella subcapitata* [30]

### 3.3.3.4. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Testuje se vliv testované látky na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé (*Sinapis alba*) v počátečních stádiích vývoje (obr. 8). Test spočívá v kultivaci semen po dobu 72 hodin na podložkách nasycených roztoky zkoumané látky ve srovnání se semeny, které rostou na podložce nasycené ředící vodou. V testech toxicity představuje hořčice zástupce kulturních a vyšších rostlin.

Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a změří se délka kořenů. Z naměřených hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene podle rovnice (4) a určí se koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou, tzv. 72hIC<sub>50</sub> podle rovnice (5).

Výpočet průměrné délky kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) pro jednotlivé koncentrace je prováděn dle vztahu:

$$\bar{L} = \frac{\sum L_i}{n} \quad (4)$$



kde

- $\bar{L}$  je průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci v [mm],  
 $L_i$  - délka i-tého kořene ve zvolené koncentraci v [mm],  
 $n$  - počet semen ve zvolené koncentraci.

Obdobně se provádí i výpočet průměrné délky kořene  $L_c$  v kontrolních stanoveních.

Výpočet inhibice růstu kořene v testované koncentraci ve srovnání s kontrolním stanovením lze určit dle rovnice:

$$\bar{I}_i = \frac{\bar{L}_c - \bar{L}_v}{\bar{L}_c} \cdot 100 \quad (5)$$

kde

- $\bar{I}_i$  je inhibice růstu kořene v dané koncentraci v [%], je-li  $\bar{I}_i < 0$  jedná se o stimulaci růstu,  
 $\bar{L}_c$  - průměrná délka kořene v kontrole v [mm],  
 $\bar{L}_v$  - průměrná délka kořene v testované koncentraci v [mm].

Koncentrace látky, při které došlo k inhibici růstu, se vyjádří v logaritmických hodnotách a vynesou se na osu  $x$ , zatímco na osu  $y$  se vynesou závisle proměnná inhibice v [%]. Jednotlivé body se spojí přímkou, v průsečíku přímkou s hodnotou inhibice 50 % se sestrojí kolmice, odečte se logaritmická hodnota koncentrace a následným odlogaritmováním této hodnoty se určí hledaná koncentrace IC50.

Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, tzn. že průměrná délka kořene v testované látce je větší než v kontrole, výpočet hodnoty 72hIC50 se neprovádí. [17, 31, 32]



Obr. 8 Květ hořčice bílé a její semena přichystaná k testování [33]

### 3.3.4. Testy fytotoxicity

Testy fytotoxicity, které jsou běžnou součástí environmentálního monitoringu a hodnocení rizik, se v současnosti využívají ke stanovování toxických účinků nových chemických látek, nebezpečných odpadů, výluhů a kontaminovaných sedimentů. Předností těchto testů je jejich jednoduchost, materiálová a ekonomická nenáročnost, které přímo souvisí s jejich snadným pěstováním. Naopak velkou nevýhodou je především časová náročnost testů spojená s nutností dlouhodobé expozice toxickou látkou.

Mezi používané testy fytotoxicity patří např. test klíčivosti semen, test elongace (prodlužování) kořene a test růstu klíčících rostlin. K testování se využívají nejen semena výše zmíněné hořčice bílé (*Sinapis alba*), ale i semena další rostlin, např. řeřichy seté (*Lepidium sativum*), ředkve seté (*Raphanus sativus*), salátu hlávkového (*Lactuca sativa*), kukuřice (*Zea mays*), pšenice (*Triticum sativum*) a ječmene (*Hordeum sativum*).

### 3.3.4.1. Test inhibice růstu okřešku menšího (*Lemna minor*)

Okřehek menší (*obr. 9*), lidově známý pod pojmem žabinec, porůstá hladiny stojatých vod a za příhodných podmínek vytváří ucelené porosty, které nepropouštějí světlo, což vede ke zhoršení kvality vodní plochy pod nimi.

Test na okřešku je standardizovaný jak dle ČSN EN ISO 20079 Jakost vod – stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřešku, tak i dle postupu vydaného organizací OECD jako Guidelines for The Testing of Chemicals, No. 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.

Testování je používáno k hodnocení toxicity roztoků a suspenzí, dále k testování odpadních a povrchových vod, a testuje se, obdobně jako u řas, inhibice růstu podle růstové křivky.

Rostliny okřešku menšího se nechají růst po dobu 7 až 24 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku označovaném jako modifikované Steinbergovo médium. Současně se nasadí testovací rostliny do živného roztoku bez testované látky a slouží jako kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet lístků.

Cílem testu je posouzení počtu lístků, rychlosti růstu a také zhodnocení hmotnosti biomasy, přičemž se srovnává růst v testovaných roztocích s růstem v kontrolách a stanovuje se inhibiční koncentrace 168hIC50.

Růstová rychlost se spočítá podle vztahu:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (6)$$

kde

- $\mu$  je růstová rychlost,
- $N_0$  - počet lístků na začátku testu,
- $N_n$  - počet lístků na konci testu,
- $t_n$  - doba trvání testu v [hod].

Z vypočítaných hodnot růstové rychlosti pro každou testovanou koncentraci i kontrolu se vypočítá inhibice, popř. stimulace růstu  $I_\mu$  v [%] dle rovnice:

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (7)$$

kde

- $I_\mu$  je inhibice pro danou koncentraci, je-li  $I_\mu < 0$ , jedná se o stimulaci růstu,
- $\mu_c$  - růstová rychlost v kontrole,
- $\mu_i$  - růstová rychlost v testované koncentraci.

Množství biomasy v kontrole i v testovaných koncentracích se určuje vážením a po dosazení do rovnice (8) a se vypočítá hodnota inhibice růstu:

$$I_B = \frac{B_c - B_i}{B_c} \cdot 100 \quad (8)$$

kde

- $I_B$  je procento redukce biomasy,
- $B_c$  - konečná biomasa v kontrole,
- $B_i$  - konečná biomasa v testované koncentraci.

K získání hodnoty IC50 je potřeba minimálně 5 hodnot koncentrací, při kterých došlo k inhibici růstu, které se následně vyjádří v logaritmických hodnotách a vynesou se na osu  $x$ . Hodnoty  $I_\mu$  a  $I_B$  se vynesou na osu  $y$  a získanými body se proloží přímka, přičemž se

v průsečíku přímky s 50% inhibicí růstu spustí kolmice, odečte se příslušná logaritmická hodnota koncentrace a jejím následným odlogaritmováním se určí hledaná hodnota  $168hIC_{50}$ . [34, 35, 36]

V některých případech se testovaná látka může projevit stimulačně a v tom případě se hodnota  $IC_{50}$  nestanovuje. [34, 35, 36]

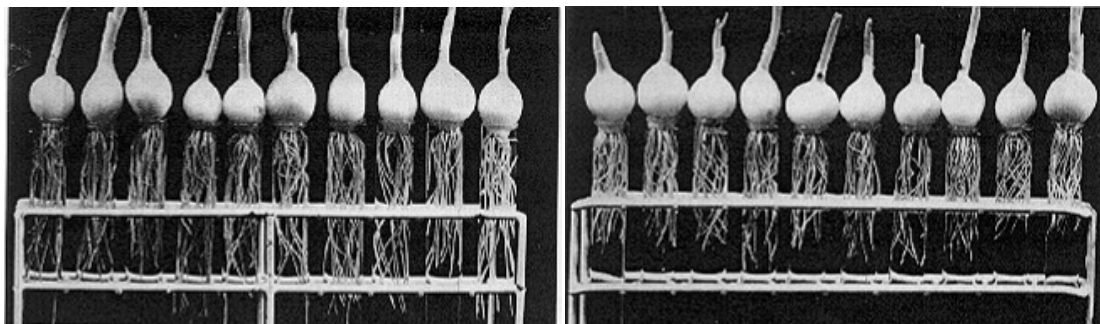


Obr. 9 Okřehek menší (*Lemna minor*) [37, 38]

#### 3.3.4.2. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

Využití cibule k testování (obr. 10) je vhodné především pro hodnocení toxicity vzorků přírodních vod, pitné vody, odpadních vod z domácností i z průmyslu, včetně hodnocení kalů a výluhů. Také se využívá k hodnocení toxických účinků chemických látek rozpustných ve vodě a v organických rozpouštědlech.

Sleduje se inhibice růstu kořínků v porovnání s kontrolou po dobu 48 nebo 72 hodin při teplotě cca 20 °C. V každé koncentraci i v kontrole je nasazeno 10 cibulí, přičemž se na konci testu změří délky kořínků a vypočítá se hodnota  $48hIC_{50}$ , popř.  $72hIC_{50}$ . [39]



Obr.10 *Allium cepa* - sada testovacích zkumavek [39]

#### 3.3.5. Test na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

Mimo klasických testů se využívají i další organismy, jejichž výsledky ekotoxikologických testů jsou srovnatelné s klasickými. Jedním z těchto organismů je i žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) znázorněná na obrázku 11. K ekotoxikologickému testování se využívá i v komerčně dodávané sadě Artoxkit M<sup>TM</sup>.

Žábřonožky se nacházejí ve stojatých slaných vodách, nikoliv však v mořích, nýbrž jen ve slaných jezerech, v přímořských tůňích a v solných dolech. Většinou se dováží ve formě vajíček v konzervách z USA, kde jsou vajíčka žábřonožek sbírána ve Velkém solném jezeře v Utahu. Běžně jsou využívány jako krmivo pro akvarijní rybičky.

Líhnutí vajíček probíhá v laboratorní slané vodě, přičemž se voda udržuje v mírném pohybu provzdušňováním. Při teplotě 27 až 29 °C dochází k vylíhnutí do 18 hodin, při teplotě 24 °C se vajíčka vylíhnou do 24 hodin. K testování jsou využíváni čerstvě vylíhnutí jedinci, tzv. nauplia, kteří se pipetou přenesou do Petriho misek s testovacími koncentracemi. Během testu se žábřonožky nekrmí a testovaný roztok se neprovzdušňuje. Petriho misky se s deseti kusy nauplií a koncentračním roztokem umístí do inkubátoru. Sleduje se úmrtnost nauplií po 24 a 48 hodinách a stanoví se 24hLC50 a 48hLC50. S testovanými koncentracemi se nasazují i kontroly. [40, 41, 42]



Obr. 11 Žábřonožka slánisková (*Artemia salina*) a konzerva s jejími vajíčky [43]

### 3.3.6. Alternativní testy toxicity

Mimo standardní testy se stále častěji využívají alternativní testy toxicity, které umožňují rychlé testování velkých sérií především nových chemických látek. Velkou výhodou těchto testů je jejich miniaturizace, zkrácení doby inkubace a zlevnění testování.

Velmi významným typem alternativních testů jsou mikrobiotesty, u nichž testování probíhá ve zkumavkách nebo v kyvetách, přičemž se doba vlastního testování zkracuje na 24 hodin, popř. 48 hodin v případě testu akutní toxicity. Konečným výstupem testu je určení mortality, popř. imobilizace organismů, změna absorbance, fluorescence nebo luminiscence.

Testovacími organismy v mikrobiotestech jsou např. bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí i zástupci ryb, přičemž se tyto organismy dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích (bezobratlí), lyofilizovaném stavu (bakterie) nebo v imobilizované formě (řasy) a podle potřeby se oživují až před vlastním testováním.

Jedním z nejčastěji používaných typů mikrobiotestu jsou tzv. toxkity, které využívají klidová stadia zooplanktonu. Toxkity jsou komerčně prodávány v baleních, která obsahují kultivační nádoby k oživení testovacích organismů z klidového stadia, pipety, testovací destičky, živné médium, testovací organismy v klidovém stadiu, protokol o provedené zkoušce a návod k použití. [44]

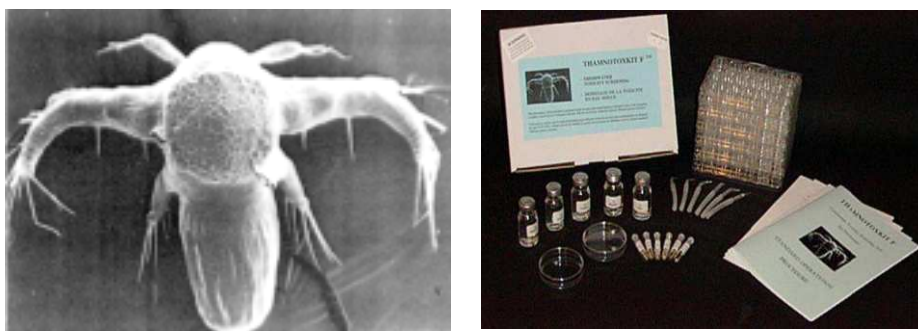
Výhodou toxkitů je jejich nízká cena v porovnání se standardními testy, neboť odpadají náklady spojené s chovem testovacích organismů. Mezi nejvýznamnější toxkity patří Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, Daphtoxkit F<sup>TM</sup>, Rotoxkit F<sup>TM</sup>, Algaltoxkit F<sup>TM</sup> a Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>. [44]

### 3.3.6.1. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

V tomto testu je jako testovací organismus využíván nižší korýš *Thamnocephalus platyurus* (obr. 12), který se používá ke zjištění toxicity nově zaváděných chemikálií i k hodnocení jakosti průmyslových odpadních vod, povrchových vod, pitné vody, podzemních vod a sedimentů.

Testovací organismus se uchovává ve „spící“ formě jako tzv. cysta. Do aktivního stádia se cysty uvádí hydratací ve standardním živném médiu, přičemž kultivace je prováděna v inkubátoru po dobu 24 hodin při teplotě ( $25 \pm 2$ ) °C při osvětlení 3 000 až 4 000 lx. Inkubační doba v testovaných roztocích trvá 24 hodin, přičemž jsou vzorky uchovávány v temnu při teplotě 25 °C. Po uplynutí doby testování se zaznamenají mrtví jedinci a vypočte se hodnota 24hLC50.

Tento organismus je značně citlivý a výsledky jsou srovnatelné s výsledky testování na organismu *Daphnia magna*. Tato metoda je popsána i v Technické normě vodního hospodářství Ministerstva zemědělství č. TNV 75 7754 – Mikrometoda stanovení akutní toxicity na korýši *Thamnocephalus platyurus*. [44, 45, 46]



Obr. 12 *Thamnocephalus platyurus* a testovací sada Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> [46]

### 3.3.6.2. Daphtoxkit F<sup>TM</sup>

Dalším testem toxicity vhodným pro testování ekotoxicity vodních vzorků a kontaminovaných zemin je Daphtoxkit F<sup>TM</sup> (obr. 13). Testování je založeno na pozorování pohyblivosti a následně mortality sladkovodního korýše *Daphnia magna* nebo *Daphnia pulex*. Zkušební organismy jsou opět uchovávány v klidovém stádiu a do aktivní formy mohou být uvedeni během 72 hodin. Sada Daphtoxkit F<sup>TM</sup> obsahuje veškeré materiály potřebné k provedení šesti akutních 48 hodinových testů pohybové inhibice a mortality testovacích jedinců. Výsledkem testu je hodnota 48hEC50 nebo 48hLC50. [47]



Obr. 13 Testovací sada Daphtoxkit F<sup>TM</sup> [47]

### 3.3.6.3. Rotoxkit F<sup>TM</sup>

Rotoxkit F<sup>TM</sup> je alternativní test ekotoxicity především pro sladkovodní prostředí. Testování se provádí na sladkovodním vířníku *Brachionus calyciflorus* (obr. 14), jenž tvoří významnou část sladkovodního zooplanktonu. Test slouží k prověřování toxicity směsí, průmyslových odpadních vod, sedimentů, povrchové a podzemní vody.

Tento test je možno zakoupit ve dvou variantách: akutní 24 hodinový test a subchronický 48 hodinový test. *Brachionus calyciflorus* je uchováván ve „spící“ formě jako tzv. cysta a v případě nutnosti je aktivován a do 24 hodin připraven k testování.

U akutního testu se sleduje úmrtnost v průběhu 24 hodin a výsledkem je 24hLC50.

U subchronického testu se u organismu sleduje možnost snížení jejich reprodukce po 48 hodinách vystavení toxické látky a stanovuje se hodnota 48hEC50. [48]

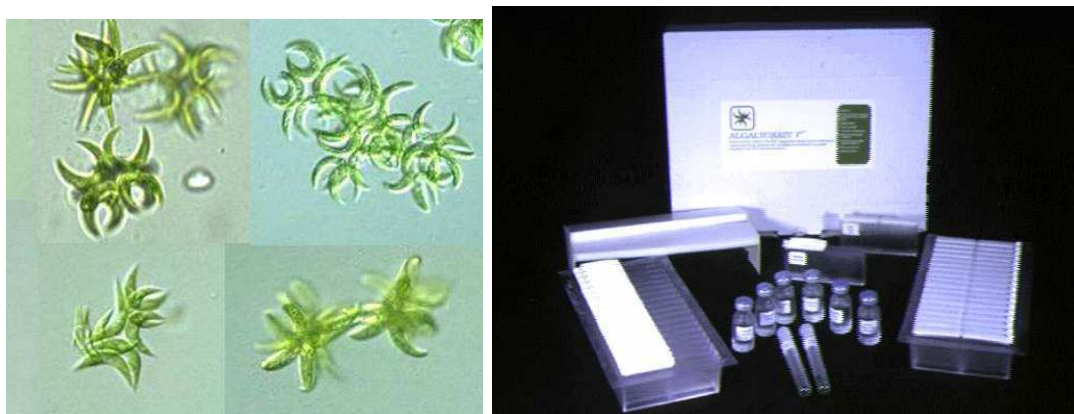


Obr. 14 *Brachionus calyciflorus* a testovací sada Rotoxkit F<sup>TM</sup> [48]

### 3.3.6.4. Algaltoxkit F<sup>TM</sup>

Tento test využívá jako testovací organismus zelené sladkovodní řasy mikroskopických rozměrů *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) znázorněné na obrázku 15. Klidová stádia řas vytvářejí zvláštní útvary, tzv. řasové korále o velikosti cca 2 mm. V jednom korálu se může nacházet až jeden milión řasových buněk.

Převedení řas z imobilizovaného stavu do aktivního trvá zhruba 30 minut a vlastní test trvá 72 hodin. Během testu se sleduje růstová inhibice řas a spektrofotometrem se měří optická hustota testovaného vzorku se zelenou řasou. Ze stanovené optické hustoty se následně zjistí koncentrace počtu řasových buněk ve vzorku, přičemž při vlnové délce 670 nm platí přibližně lineární vztah mezi optickou hustotou a koncentrací. Optická hustota se zaznamenává vždy po 24 hodinách a ze zjištěných hodnot se vypočítá 72hIC50. [49]



Obr. 15 *Selenastrum capricornutum* a sada k testování Algaltoxkit F<sup>TM</sup> [30, 49]

### 3.3.6.5. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

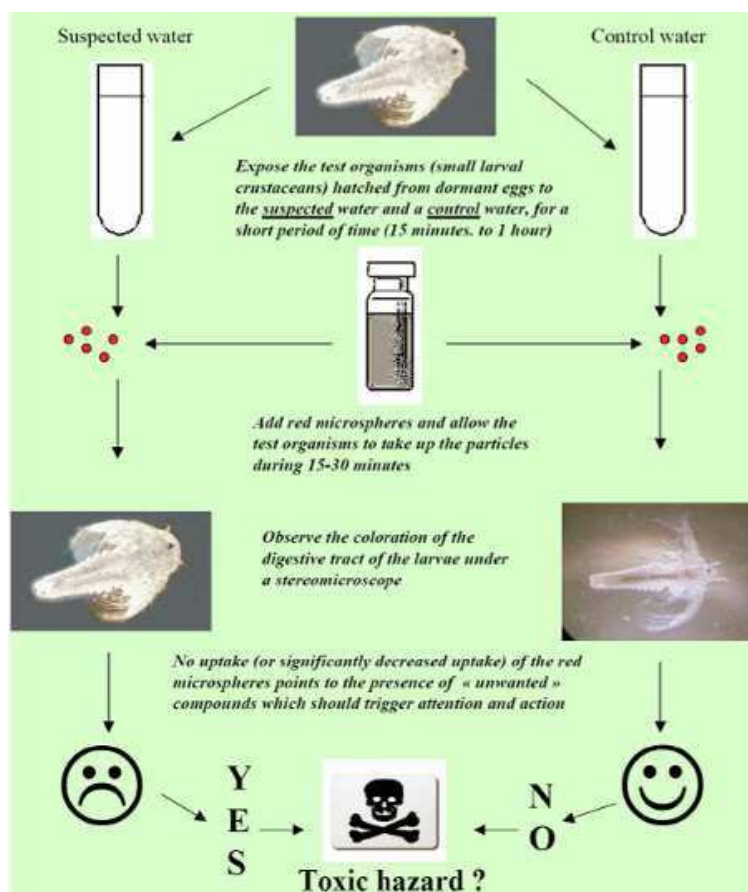
Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> představuje hodinový test toxicity na organismu *Thamnocephalus platyurus*. Sleduje se ovlivnění příjmu potravy organismem, který je vystavený účinkům testované látky, neboť intoxikovaný organismus přijme méně potravy než organismus zdravý (obr. 16).

*Thamnocephalus platyurus* je dodáván v cystách, které je nutné nejprve po dobu 1 hodiny hydratovat v 1 ml živného roztoku, poté se cysty nechají líhnout 30 až 45 hodin při teplotě 25 °C za stálého osvětlení 4 000 lx. Vylíhnuté organismy se následně přenesou do zkumavky s testovanou látkou i do paralelně nasazené kontroly a ponechají se v nich po dobu 15 až 60 minut. Poté se do všech zkumavek přidají červeně zbarvené mikrospory, které slouží jako potrava, a po 15 až 30 minutách se test vyhodnocuje. Sleduje se zbarvení trávicího traktu u exponovaných organismů v jednotlivých koncentracích i v kontrole za využití mikroskopu, přičemž toxický účinek je prokázán v případě, že je inhibice příjmu potravou větší než 30 %. Určuje se inhibice příjmu mikrospor organismem v porovnání s kontrolou podle rovnice:

$$I = \frac{A - B}{A} \cdot 100 \quad (9)$$

kde

- I* je inhibice příjmu potravou v [%],
- A* - počet zbarvených jedinců v kontrole,
- B* - počet zbarvených jedinců v jednotlivých vzorcích. [50]



Obr. 16 Princip testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> [50]

### 3.4. Vedlejší energetické produkty

Označení vedlejší energetický produkt se využívá pro odpady, které vznikají při spalování tuhých paliv a při následném čištění spalin. Jedná se primárně o strusky, škváry a popele a následně také o popílky, energosádrovce a produkty z odsíření.

#### 3.4.1. Vznik vedlejších energetických produktů

Spalování je chemický oxidační proces, při kterém se uvolňuje chemická energie navázaná na spalované palivo na energii tepelnou. Jedná se o nejjednodušší termickou přeměnu paliv za dostatečného přístupu kyslíku. Tepelná energie získaná při spalování se využívá k vytápění, k ohřevu vody i k výrobě elektrické energie.

Hlavní součástí spalovacích zařízení je kotel, ve kterém dochází k transformaci chemické energie paliva na tepelnou energii spalin. K následnému přenosu tepla spalin do pracovního média, kterým je ve většině případů voda, dochází v systému výměníků. Výstupem je pára, teplá voda o teplotě maximálně 110 °C a horká voda s teplotou nad 110 °C.

Podle způsobu spalování tuhých paliv se kotle dělí na:

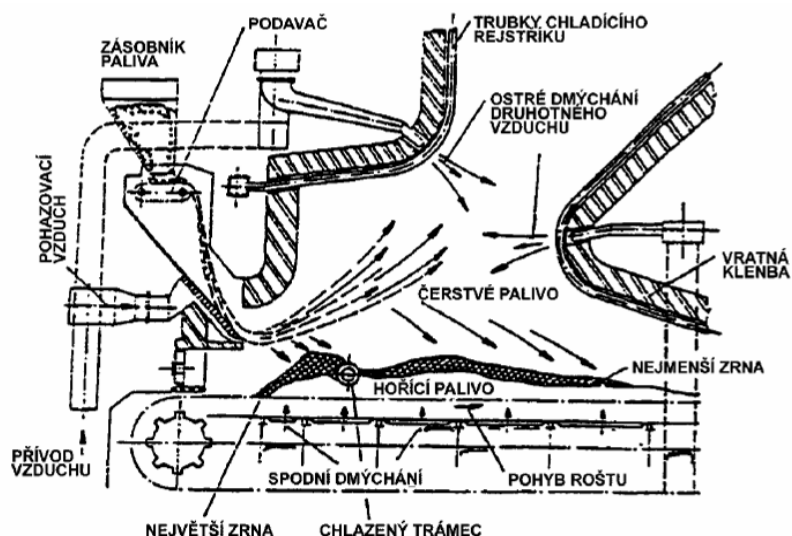
- roštové,
- fluidní,
- práškové - granulační nebo výtavné. [51]

##### 3.4.1.1. Kotle roštové

Slouží ke spalování kusových paliv v pevné vrstvě. Spalování u roštových ohnišť probíhá jednak ve vrstvě na roštu, jednak v prostoru nad vrstvou paliva, přičemž podíl hoření nad vrstvou paliva je tím větší, čím vyšší je obsah prchavé hořlaviny. V současné době se roštové kotle využívají ke spalování biomasy a odpadů. Schéma roštového kotle je znázorněno na obrázku 17.

Palivo na roštu prochází těmito charakteristickými fázemi:

- sušení - během této fáze se palivo ohřívá a vypuzuje se z něj voda,
- odplyňování - intenzivně probíhá při ohřátí nad 250 °C,
- hoření prchavé hořlaviny a zápal vrstvy tuhé hořlaviny,
- dohořívání tuhé fáze a chladnutí tuhých zbytků. [51]



Obr. 17 Schéma klasického roštového kotle [51]

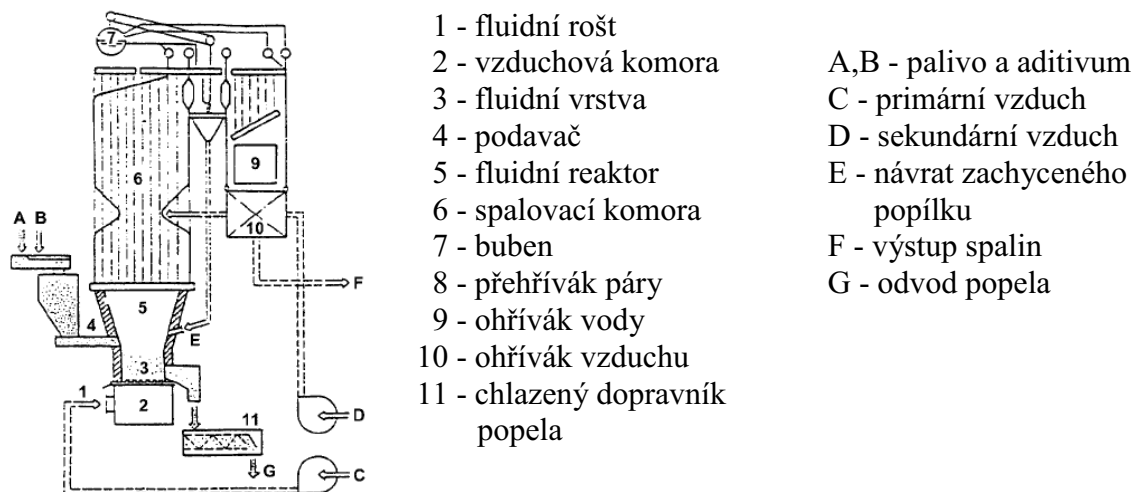


### 3.4.1.2. Kotle fluidní

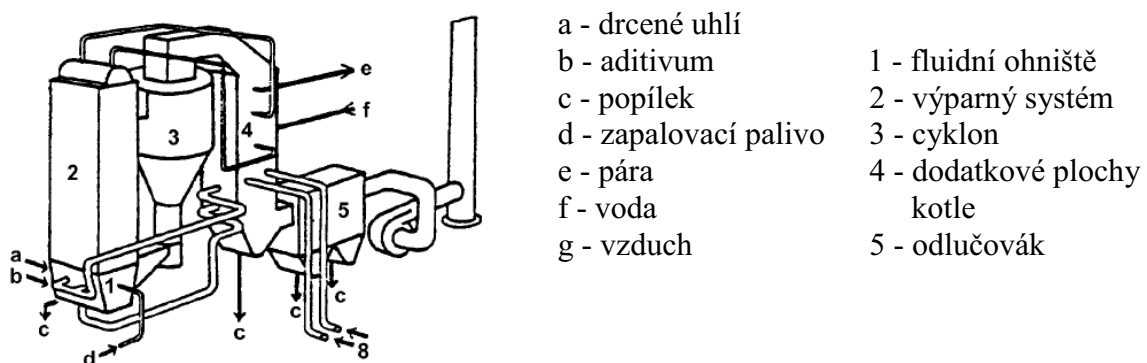
Podstatou tohoto spalování je, že se nahrubo umleté palivo v proudu vzduchu a ve vhodné zvoleném spalovacím prostoru, chová jako vroucí kapalina. Fluidní vrstva tvoří disperzní systém, který se vytváří průtokem plynu vrstvou částic nasypných pod pórovité dno - tzv. fluidní rošt. Částice paliva jsou obaleny vzduchem a proces hoření je tak velmi rychlý a poměrně snadno regulovatelný. Spalovací teploty jsou v rozsahu 700 - 900 °C, což potlačuje tvorbu NO<sub>x</sub> a vznikající oxid siřičitý lze navázat přímo v ohništi přidáním mletého vápence.

Rozlišujeme dva typy atmosférických fluidních kotlů:

- atmosférický fluidní kotel se stacionární (bublinkující) fluidní vrstvou (AFB): hlavním rysem tohoto kotle je bublinkující fluidní vrstva se zřetelnou hladinou, která cirkuluje mezi vlastním spalovacím prostorem a vně umístěným cyklónovým odlučovačem. Spaliny, zbavené v cyklonech popílku, jsou vedeny přes dodatkové plochy kotle do filtru za kotlem. Schéma kotle je znázorněno na *obrázku 18*.
- atmosférický fluidní kotel s cirkulující fluidní vrstvou (ACFB): vzniklé spaliny prostupují z ohniště přes cyklony, ve kterých se vlivem odstředivé síly odloučí největší částice, které se poté opět vrací do fluidního ohniště. Výhodou je delší pobyt částic ve spalovacím prostoru, který vede k lepšímu odsíření i vyhoření uhlíku. Schéma kotle je znázorněno na *obrázku 19*. [51]



Obr. 18 Schéma atmosférického fluidního kotle AFB [51]



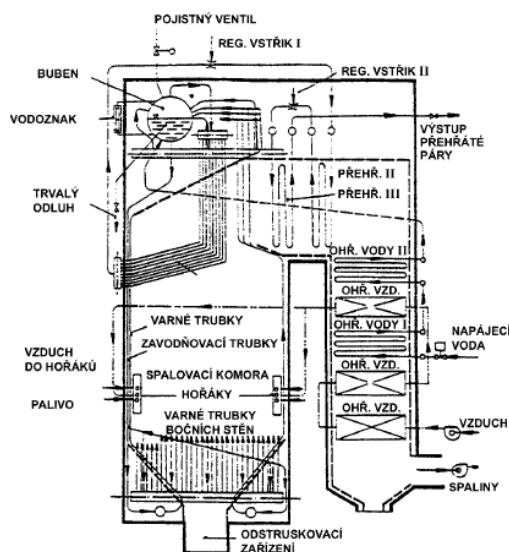
Obr. 19 Schéma atmosférického fluidního kotle ACFB [51]

### 3.4.1.3. Kotle práškové

V práškových kotlích se spaluje rozemleté palivo na prášek o velikost zrn cca 1 mm v letu v prostoru ohniště. Nosným médiem, které vnáší rozemleté palivo do ohniště, je většinou vzduch nebo spaliny, popř. jejich směs. Doba spalování je u práškových kotlů 1 až 3 sekundy, zatímco při spalování na roštu bývá v desítkách minut. Schéma práškového kotle je znázorněno na obrázku 20.

Rozeznáváme dva základní typy práškových kotlů:

- granulační - se suchým odvodem tuhých zbytků z ohniště v podobě škváry; spalování probíhá při relativně nízkých teplotách; vhodné především pro hnědá uhlí,
- výtavné - s tekutým odvodem tuhých zbytků z ohniště v podobě tekuté strusky, tj. nad bodem tečení popela; vhodné hlavně pro uhlí s vyšší spalovací teplotou, tj. pro kvalitní černá uhlí. [51]



Obr. 20 Schéma práškového kotle [51]

### 3.4.2. Související legislativní předpisy

Jak již bylo řečeno, označení vedlejší energetický produkt se využívá pro odpady, které vznikají při spalování tuhých paliv a při následném čištění spalin. Jedná se tedy primárně o strusky, škváry a popele a následně také o popílky, energosádrovce a produkty z odsíření.

Příloha 1, vyhlášky č. 381/2001 Sb. Katalog odpadů, ve znění pozdějších předpisů, přiděluje všem odpadům kódové označení. Výjimkou nejsou ani vedlejší energetické produkty, jejichž kódová označení jsou uvedena v tabulce 1. [52]

Tab. 1 Zařazení odpadů dle vyhlášky č. 381/2001 Sb.

| Kód       | Název  |
|-----------|--|
| <b>10</b> | <b>Odpady z tepelných procesů</b>  |
| 10 01     | Odpady z elektráren a jiných spalovacích zařízení (kromě odpadů uvedených v podskupině 19) |
| 10 01 01  | Škvára, struska a kotelní prach (kromě kotelního prachu uvedeného pod číslem 10 01 04)     |
| 10 01 02  | Popílek ze spalování uhlí  |
| 10 01 05  | Pevné reakční produkty na bázi vápníku z odsířování spalin                                 |

Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech, ve znění pozdějších předpisů, definuje, v §3 odpad jako každou movitou věc, které se osoba zbavuje nebo má úmysl nebo povinnost se jí zbavit a přísluší do některé ze skupin odpadů uvedených v příloze č. 1 k tomuto zákonu. Součástí výše zmíněného zákona je i povinnost přednostního využívání odpadů definována v §11 - každý má při své činnosti nebo v rozsahu své působnosti povinnost v mezích daných tímto zákonem zajistit přednostně využití odpadů před jejich odstraněním. Materiálové využití odpadů má přednost před jiným využitím odpadů. [53]

Materiálové využívání vedlejších energetických produktů je podmíněno jejich certifikací na stavební výrobky. Stavební výrobek je definován v Nařízení vlády č. 163/2002 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na vybrané stavební výrobky, v §1a jako každý výrobek určený výrobcem nebo dovozcem pro trvalé zabudování do staveb, pokud jeho vlastnosti mohou ovlivnit alespoň jeden ze základních požadavků na stavby uvedených v příloze č. 1 k tomuto nařízení, (dále jen "výrobek"), kdy trvalým zabudováním výrobku do stavby je takové zabudování, při kterém se vyjmutím nebo výměnou výrobku trvale mění vlastnosti stavby, přičemž vyjmutí nebo výměna výrobku je stavební prací.

Certifikace odpadů na stavební výrobky je prováděna v souladu s platnou legislativou a na základě technických návodů, které vytváří Technický a zkušební ústav stavební, s.p.. [54]

Vydání Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek označované jako REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) určilo povinnost registrovat všechny látky, přípravky a předměty, které jsou na území Evropské unie vyráběny, popř. na její území dováženy. Tato povinnost se týká i vedlejších energetických produktů, které jsou certifikovány na stavební výrobky, neboť hlava 1, kapitola 2, článek 3, bod 1 výše zmíněného Nařízení stanoví látku jako chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem, včetně všech přídatných látek nutných k uchování jeho stability a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, avšak s vyloučením všech rozpouštědel, která lze oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení.

Nařízení REACH stanovilo termín pro tzv. předregistraci látek, přípravků a předmětů od 01. 06. do 01. 12. 2008. Bez předregistrace nebylo možné látky nadále vyrábět a k jejich výrobě je nutná následná registrace. Vlastní předregistrace spočívala v bezplatném ohlášení látek u Evropské chemické agentury ECHA se sídlem v Helsinkách, přičemž předregistrací získali výrobci prodloužený termín, tzv. přechodné období, k následné registraci. Předregistrací vznikla fóra, tzv. SIEF, pro vzájemnou výměnu informací mezi výrobci, kteří předregistrovali stejnou látku. Smyslem SIEFů je shromáždit a předložit Agentuře ECHA veškeré podklady nutné pro registraci látek.

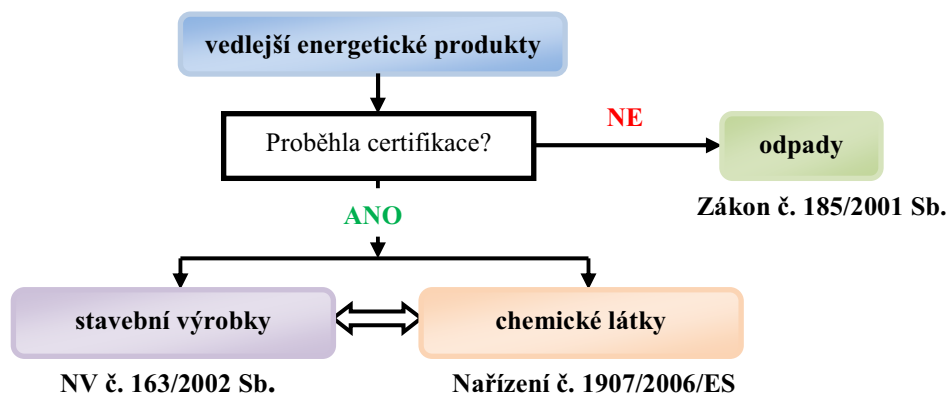
K registraci látky je nutno Agentuře ECHA předložit:

- **technickou dokumentaci - tzv. dossier**, který bude obsahovat předepsané informace o registrantovi, identifikaci látky, včetně jejich vlastností a další informace potřebné pro posouzení rizikovosti látky. Informace o vlastnostech budou požadovány v různém rozsahu, v závislosti na množství vyráběné, popř. dovážené látky. Doloženy budou muset být protokoly o zkouškách nebo přístupové právy k těmto protokolům. Akceptovatelné budou i kvalitní informace z dalších zdrojů.
- **zprávu o chemické bezpečnosti** - v ní bude předepsaným způsobem dokumentováno hodnocení rizik všech registrantovi známých nebo určených expozičních scénářů výroby, používání a odstraňování látky. Pro látky vyráběné nebo dovážené v množství do 10 t/rok nebude zpracování zprávy o chemické bezpečnosti látky požadováno.

Po předložení všech podkladů nutných k registraci provede Agentura ECHA následné prozkoumání příslušné dokumentace a přidělí látce registrační číslo, které bude povinně obsaženo v bezpečnostním listu dané látky.

Registrace je již zpoplatněna a výše poplatků závisí na velikosti podniku a na tom, zda danou látku bude výrobce registrovat sám nebo společně s ostatními členy SIEFu. Výše registračních poplatků je stanovena v Nařízení Komise (ES) č. 340/2008 o poplatcích a platbách Evropské agentury pro chemické látky a dosahuje řádově tisíce EUR pro každého výrobce za každou látku, kterou hodlá registrovat. [55, 56, 57, 58]

Na základě výše zmíněné legislativy lze sestavit schéma znázorňující zařazení vedlejších energetických produktů v souvislosti s jejich certifikací. (obr. 21)



Obr. 21 Schéma zařazení vedlejších energetických produktů dle legislativy

### 3.4.2.1. Ekotoxicita odpadů

Ekotoxicita se u odpadů stanovuje na základě přílohy 1 vyhlášky Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Dle této přílohy mají nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicita odpady, které představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí.

Jako nebezpečný se hodnotí odpad, jehož vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity uvedených v bodě 7 přílohy č. 3 vyhlášky č. 376/2001 Sb. alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus:

- Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod),
- Daphnia magna* (doba působení 48 hod),
- Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* (doba působení 72 hod),
- semeno *Sinapis alba* (doba působení 72 hod) tyto hodnoty:

$$LC(EC, IC)50 \leq 10 \text{ ml/l}$$

kde

*LC50* je koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku,

*EC50* - koncentrace, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů *Daphnia magna*,

*IC50* - koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50% inhibici růstu kořene *Sinapis alba* ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku. [17]

Hodnocením ekotoxikologických vlastností se zabývá i vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu. Tato vyhláška stanoví v příloze č. 10, tabulce 10.2 ekotoxikologické limitní požadavky, přičemž organismy i doba působení, na kterých jsou prováděna ekotoxikologická stanovení, jsou shodná s vyhláškou č. 376/2001 Sb..

Ekotoxikologické i toxikologické testování je také součástí Nařízení č. 1907/2006/ES REACH. Jelikož produkce vedlejších energetických produktů z většiny energetických zařízení je větší než 1 000 t/rok, vztahují se na certifikované vedlejší energetické produkty přílohy č. VII, VIII, IX a X Nařízení č. 1907/2006/ES REACH. Dle těchto příloh bude nutné provádět ekotoxikologické a toxikologické testování v následujícím rozsahu:

1. Toxicita pro vodní prostředí

- a) Zkoušky subakutní toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*)
- b) Studie inhibice růstu vodních rostlin (upřednostňují se řasy)
- c) Studie subakutní toxicity na rybách
- d) Zkoušky inhibice respirace aktivovaného kalu
- e) Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*)
- f) Zkoušky chronické toxicity na rybách
  - Zkouška toxicity u ryb v raných vývojových stádiích
  - Zkouška subakutní toxicity na rybích embryích a plůdcích se žloutkovým váčkem
  - Růstová zkouška na nedospělých rybách

2. Rozklad

- a) Biotický
  - Snadná biologická rozložitelnost
  - Simulační zkoušky konečného rozkladu v povrchových vodách
  - Simulační zkoušky půdy (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na půdu)
  - Simulační zkoušky sedimentu (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na sediment)
- b) Abiotický
  - Hydrolýza jako funkce pH
- c) Určení produktů rozkladu

3. Osud a chování v životním prostředí

- a) Screening adsorpce nebo desorpce
- b) Bioakumulace ve vodních druzích, přednostně u ryb
- c) Další informace o adsorpci nebo desorpci
- d) Další informace o osudu a chování látky nebo produktů rozkladu

4. Účinky na suchozemské organismy

- a) Subakutní toxicita u bezobratlých
- b) Účinky na půdní mikroorganismy
- c) Subakutní toxicita u rostlin
- d) Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých
- e) Zkoušky chronické toxicity na rostlinách

5. Chronická toxicita u organismů v sedimentu

6. Chronická nebo reprodukční toxicita u ptáků [56]

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Ekotoxikologické posuzování vodných výluhů bylo prováděno na deseti vzorcích, které poskytlo pět různých energetických společností. Většina energetických společností si dala podmínku, že název jejich provozovny nebude zveřejněn.

### 4.1. Vzorky vedlejších energetických produktů

Přehled označení jednotlivých provozoven i vzorků je uveden v tabulce 2.

Tab. 2 Přehled provozoven, včetně označení vzorků

| Označení provozoven | Palivo                              | Spalovací zařízení            | VEP                        | Označení vzorku |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|
| A                   | hnědé uhlí<br>biomasa               | atmosférický<br>fluidní kotel | ložový popel               | A1              |
|                     |                                     |                               | úletový popílek            | A2              |
| B                   | černé uhlí<br>biomasa               | práškový kotel<br>granulační  | úletový popílek            | B1              |
|                     |                                     |                               | hydrosměs popílku a škváry | B2              |
| C                   | hnědé uhlí<br>biomasa               | práškový kotel<br>granulační  | škvára                     | C1              |
|                     |                                     |                               | úletový popílek            | C2              |
|                     |                                     |                               | produkt z odsíření         | C3              |
| D                   | černé uhlí<br>hnědé uhlí<br>biomasa | atmosférický<br>fluidní kotel | ložový popel               | D1              |
|                     |                                     |                               | úletový popílek            | D2              |
| E                   | sláma                               | nízkotlaký<br>roštový kotel   | úletový popílek            | E1              |

### 4.2. Popis technologických postupů energetických provozoven

Provozovny A až D jsou definovány dle zákona č. 86/2001 Sb. o ochraně ovzduší, ve znění pozdějších předpisů, jako zvláště velké spalovací zdroje o jmenovitém tepelném příkonu 50 MW a vyšším. Výstupem z těchto provozoven je nejen technologická pára používaná k výrobě elektrické energie, ale i teplá a horká voda využívaná v teplárenství. Provozovna E představuje malou obecní kotelnu, která zásobuje domácnosti teplou užitkovou vodou. [59]

#### 4.2.1. Provozovna A

V provozovně A je spoluspalováno hnědé uhlí a biomasa ve dvou atmosférických fluidních kotlích s cirkulující vířivou vrstvou při teplotě 820 až 850 °C. Po shoření paliva ve spalovacím prostoru je ložový popel odváděn z ohniště ve dnu spalovací komory, je chlazen a po vytrídění na vibračním síti, je pneumaticky dopravován do sila ložového popele na míchacím centru.

Úletový popílek je zachytáván ve sběracích výsypkách pod dodatkovými plochami kotlů, pod kouřovody a ve dvou elektrostatických odlučovačích. Následně je pneumaticky dopravován do dvou sil na míchacím centru.

Součástí spalovacího zařízení je i technologie sloužící ke snižování emisí oxidů síry přidáváním vápence přímo do fluidního lože ve spalovací komoře. Produkty reakce, sádra a nezreagovaný vápenec, se odstraňují z lože částečně s ložovým popelem a částečně s úletovým popílkem z elektrostatického odlučovače.

Míchací centrum popelovin zajišťuje meziuskladnění, plynulou vykládku, dopravu a úpravu tuhých zbytků po fluidním spalování, přičemž jeho technologie umožňuje výrobu koncentrované popílkové suspenze s volitelnou konzistencí bez přebytku vody, kterou lze použít např. k rekultivaci skládek. [60]

Provozovna A poskytla dva vzorky:

- ložový popel označen jako **A1** (minerální tuhý zbytek obsahující hrubší části nespalitelných látek s obsahem vápna),
- úletový popílek označen jako **A2** (jemný prášek z kulovitých sklovitých částic s obsahem vápna).

#### 4.2.2. Provozovna B

V provozovně B je spoluspalováno černé uhlí a biomasa ve čtyřech granulačních kotlích, přičemž podíl biomasy může být maximálně 10 až 15 hm. % spalovací směsi.

Škvára je pomocí vynašeče dopravována na přepadovou hranu, odkud padá do drtiče, který ji rozdrtí na požadovanou velikost potřebnou pro splavování na odkaliště popelovin.

Popílek zachycený ve výsypkách elektroodlučovačů je veden pseudopravou do mezisila a dále pak může být buď splavován na odkaliště popelovin, nebo dopravován do expedičních sil, odkud je následně stáčen do autocisteren či železničních vagónů. Expediční sila jsou součástí míchacího centra popelovin, které slouží k míchání stabilizátu, který je poté využíván k rekultivaci a zajišťování skládek.

Odkaliště popelovin slouží jako dočasné úložiště popílku a škváry, přičemž po odloučení vody je tato hydrosměs odtěžena do trvalého úložiště, popř. předávána externím firmám jako surovina k dalšímu využití. [61]

Provozovna B poskytla dva vzorky:

- úletový popílek označen jako **B1** (jemný prášek z kulovitých sklovitých částic bez obsahu vápna),
- hydrosměs popílku a škváry označena jako **B2** (zvlhčená směs popílku a škváry bez obsahu vápna).

#### 4.2.3. Provozovna C

V provozovně C je spoluspalováno hnědé uhlí s biomasou ve třech granulačních kotlích, přičemž podíl biomasy může být maximálně 10 hm. % spalovací směsi.

Pod každým kotlem je umístěn vynašeč škváry, který ji po ochlazení ve vodě dopravuje do zásobníku, odkud je následně dopravována na manipulační plochu v blízkosti míchacího centra.

Za každým kotlem je zařazen elektrostatický odlučovač tuhých znečišťujících látek obsažených ve spalínách, ve kterých je zachycován popílek. Ten je následně pneumaticky dopravován do mezisil a pak do dvou expedičních sil na míchacím centru.

Spaliny jsou poté odsiřovány polosuchou metodou za pomoci vápenné suspenze, tzv. vápenného mléka, které se připravuje z páleného vápna, recyklované části produktu z odsíření a vody. Po odsíření prochází spaliny přes tkaninové filtry, ve kterých je zachycován produkt z odsíření, který je následně pneumaticky dopravován do expedičních sil na míchacím centru. Vzniklé vedlejší energetické produkty jsou předávány externím společností k dalšímu materiálovému využití. [62]

Provozovna C poskytla tři vzorky:

- škváru označenou jako **C1** (hrubší spečené části nespalitelných látek bez obsahu vápna),

- úletový popílek označený jako **C2** (jemný prášek z kulovitých sklovitých částic bez obsahu vápna),
- produkt z odsíření označený jako **C3** (jemný prášek vznikající při čištění spalin s obsahem vápna).

#### 4.2.4. Provozovna D

V provozovně D je spalováno hnědé i černé uhlí a biomasa ve dvou fluidních kotlích, přičemž ložový popel je pneumaticky dopravován do expedičních sil u míchacího centra. Úletový popílek je zachytáván v elektrostatických odlučovačích a tkaninových filtrech a následně je opět pneumaticky dopravován do expedičních sil u míchacího centra. Z míchacího centra je ložný popel i úletový popílek dále expedován ve formě stabilizátu k dalšímu využití. Vlastní odsířování je realizováno přímým dávkováním vápence do spalovací komory. [63]

Provozovna D poskytla dva vzorky:

- ložový popel označen jako **D1** (minerální tuhý zbytek obsahující hrubší části nespalitelných látek s obsahem vápna),
- úletový popílek označen jako **D2** (jemný prášek z kulovitých sklovitých částic s obsahem vápna).

#### 4.2.5. Provozovna E

Provozovna E slouží k vytápění obce s cca 200 domácnostmi, přičemž k centrálnímu zásobování teplem je připojeno 154 domácností, základní škola, mateřská škola, objekt Sokolovny, budova obecního úřadu s poštou, kostel a koupaliště. V této provozovně je spalována pouze balíková sláma v nízkotlakém kotli s vodorovným, vodou chlazeným roštem o jmenovitém výkonu 4 MW. Součástí provozu je i akumulční nádrž o objemu 150 m<sup>3</sup>, která pokrývá krátkodobé výpadky provozu hlavního kotle. Za hlavním kotlem je nainstalovaný odlučovač pevných částic Multicyklon a hadicový tryskový filtr, v nichž je zachytáván úletový popílek, který je poté volně skladován v přilehlé části provozovny. [64]

Provozovna E poskytla jeden vzorek:

- úletový popílek s označením **E1** (jemný prášek z kulovitých sklovitých částic bez obsahu vápna).

### 4.3. Odběr vzorků

Odběr vzorků z jednotlivých provozoven byl proveden jejich proškolenými pracovníky v souladu s platnými normami a legislativou. Odběrnými místy byly buď výsypky elektrostatických odlučovačů, vzorkovací místa na míchacích centrech a plocha odkaliště, popř. plocha volně loženého úletového popílku.

Všechny vzorky byly odebrány do plastových pytlů, pevně zavázány a následně skladovány při laboratorní teplotě, která byla dodržena i během dopravy vzorků osobním automobilem do laboratoře FCH VUT Brno.

### 4.4. Použité přístroje a zařízení

K přípravě vodných výluhů, testovaných a ředících roztoků bylo použito nejen standardní laboratorní sklo, ale i následující přístroje a zařízení:

- váhy SCALTEC SPB 31,
- sušárna Binder,



- překlopná třepačka Heidolph REAX 20,
- konduktometr typu WTW series inoLab, cond 720,
- pHmetr typu Stirrer type OP – 951,
- laboratorní teploměr,
- inkubátor Nüve Cooled Incubator ES 110 – inkubace bez osvětlení,
- inkubátor typu Novital *CO Vatutto 20* – inkubace s osvětlením.

#### 4.5. Příprava vodného výluhu

Ekotoxikologické testování odpadů se provádí na jejich vodných výluzích. Vodný výluh lze připravit dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů nebo dle normy ČSN EN 12457-4 (2003): Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním).

Vzhledem k tomu, že zrnitost všech vzorků je menší než 4 mm, byl k přípravě vodných výluhů použit postup v Metodickém pokynu Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vychovatelnosti odpadů.

Vodný výluh byl připraven podle postupu, který je popsán v kapitole 3.3.2. této diplomové práce. [15, 16]

#### 4.6. Ekotoxikologické testování vzorků

Ekotoxikologické testování jednotlivých vzorků bylo provedeno na následujících organismech:

- semena hořčice bílé (*Sinapis alba*),
- hrotnatka velká (*Daphnia magna*) – k testování byla využita testovací destička z testovací sady Daphtoxkit F<sup>TM</sup>,
- žábbronožka slanisková (*Artemia salina*) - k testování byla využita testovací destička z testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>,
- okřehek menší (*Lemna minor*),
- organismus *Thamnocephalus platyurus* pomocí testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> i testovací sadou Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>.

Výše zmíněné organismy byly k testování zvoleny na základě platné legislativy, popř. jako vhodná alternativa k těmto testům.

Stanovení ekotoxicity odpadů probíhalo podle schématu uvedeného na *obrázku 2*, přičemž výjimkou bylo stanovení ekotoxicky pomocí testovacích sad Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> a rovněž Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>, kdy bylo testování prováděno podle Standardních operačních manuálů pro jednotlivé sady.

Součástí ekotoxikologického testování je provádění vnitřní kontroly s danými standardy; s dichromanem draselným K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, který je standardní látkou pro všechny zmíněné organismy, vyjma okřešku menšího, kde se jako standardní látka používá chlorid draselný KCl. Vzhledem k tomu, že byla tato kontrola v Ekotoxikologické laboratoři FCH VUT Brno prováděna s vyhovujícími výsledky, nebyla součástí této diplomové práce.

#### 4.6.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

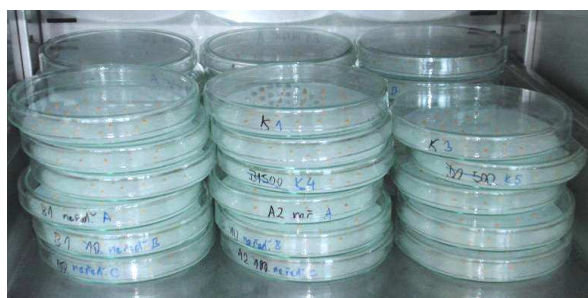
K testování byla využita semena hořčice bílé okrově žluté barvy o velikosti 1,5 až 2 mm s klíčivostí minimálně 90 %.

**Příprava ředící vody:** před vlastním testováním byly připraveny 4 zásobní roztoky, které slouží k přípravě vlastní ředící vody. K přípravě zásobního roztoku č. 1 bylo naváženo 11,76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , převedeno do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněno destilovanou vodou po rysku. Podobně byly připraveny i ostatní zásobní roztoky s navážkami 4,93 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  a 0,23 g  $\text{KCl}$ . Ředící voda byla následně připravena odpipetováním 25 ml každého zásobního roztoku do 1 l odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

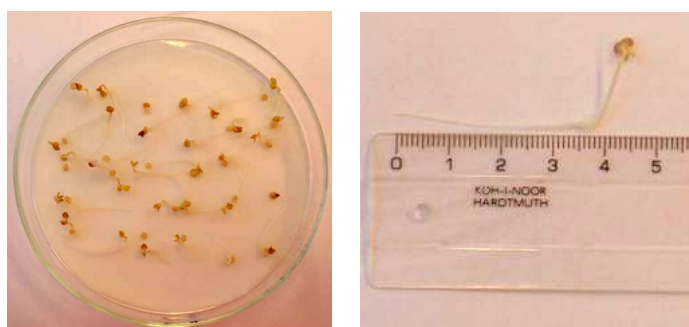
**Příprava roztoků vodných výluhů:** k úvodnímu testu byly využity neředěné vodné výluhy, které byly obohaceny stejnými, výše zmíněnými solemi ve stejném poměru. U předběžného testu byla vytvořena koncentrační řada vodných výluhů: 0 (kontrola), 10, 100 a 500 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla stanovena na základě výsledků předběžného testu. K ředění byla používána standardně připravená ředící voda.

**Nasazení testu:** na dno Petriho misky s průměrem 140 mm byl vložen filtrační papír a na něj bylo odpipetováno 5 ml roztoku testovaného výluhu. Na tento filtrační papír bylo rovnoměrně umístěno 30 semen, misky byly zakryty víčky a umístěny po dobu 72 hodin do zatemněného inkubátoru s teplotou  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$  (obr. 22). Stejným způsobem byla nasazena i kontrola.

**Vyhodnocení testu:** po 72 hodinách inkubace se v jednotlivých koncentracích i v kontrole změřila délka vyklíčených kořenů (obr. 23), z naměřených hodnot se vypočítala průměrná délka kořene a určila se koncentrace látky, která způsobila 50% inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou, tj. hodnota 72hIC50. Koncentrace látky, při které došlo k inhibici růstu, se vyjádřila v logaritmických hodnotách a vynesla se na osu  $x$ , zatímco na osu  $y$  se vynesla závisle proměnná inhibice v [%]. Jednotlivé body se spojily přímkou, v průsečíku přímkou s hodnotou inhibice 50 % se sestrojila kolmice, odečetla se logaritmická hodnota koncentrace a následným odlogaritmováním této hodnoty se určila hledaná koncentrace IC50.



Obr. 22 Testovací misky se semeny *Sinapis alba* v inkubátoru



Obr. 23 Vyklíčená semena *Sinapis alba* a jejich měření

#### 4.6.2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Test na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) byl proveden za využití testovací destičky z testovací sady Daphtoxkit F<sup>TM</sup>.

**Příprava ředící vody:** ředící voda byla připravena podle postupu uvedeného ve Standardní operační příručce pro Daphtoxkit F<sup>TM</sup>; do odměrné baňky o objemu 2 l se nalil 1 l destilované vody a poté byl přidán obsah 4 lahviček obsahujících roztoky solí – NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> a KCl (obr. 24), a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Před použitím byla ředící voda 15 minut provzdušňována, mezi jednotlivými testy byla uchovávána v chladničce.

**Příprava roztoků vodných výluhů:** k úvodnímu testu byly použity neředěné vodné výluhy, které byly obohaceny stejnými solemi a ve stejném poměru jako v případě přípravy neředěných výluhů použitých k testování na hořčici bílé (*Sinapis alba*) v kapitole 4.6.1. této diplomové práce. U předběžného testu byla vytvořena koncentrační řada vodných výluhů: 0 (kontrola), 10, 100 a 500 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla stanovena na základě výsledků předběžného testu. K ředění byla používána standardně připravená ředící voda.

**Inkubace vajíček *Daphnia magna*:** před inkubací byla vajíčka na mikrosítku promývána vodou k odstranění skladovacího média. Vlastní inkubace byla provedena v inkubační misce s 15 ml ředící vody v inkubátoru při teplotě 20 až 22 °C za kontinuálního osvětlení 6 000 lx. Doba inkubace byla 72 hodin. Po vylíhnutí byl testovací organismus nakrmen řasami *Spirulina microalgae* cca 2 hodiny před začátkem testování (obr 25).

**Nasazení testu:** do každé šachty v kontrolním řádku bylo odpipetováno 10 ml ředící vody, do ostatních řádků bylo odpipetováno 10 ml testované látky různých koncentrací v pořadí podle stoupající koncentrace. Poté bylo do promývacích šachet pomocí mikropipety přeneseno 20 jedinců, kteří byli z těchto šachet vždy po 5 ks přemísťováni do každé šachty s testovanými koncentracemi i do šachet určených ke kontrole. Zaplněné testovací destičky byly přikryty parafilmem a víčkem a umístěny v temnu v inkubátoru při teplotě 20 °C po dobu 48 hodin.

**Vyhodnocení testu:** po 24 a 48 hodinách byli spočítáni uhynulí a imobilizovaní jedinci a bylo vypočítáno procento mortality v jednotlivých koncentracích. Stanovení výsledných hodnot 24hEC<sub>50</sub> a 48hEC<sub>50</sub> bylo provedeno graficky, tzv. probitovou analýzou. Tato metoda spočívá ve vyjádření koncentrací látky, při kterých došlo k mortalitě a imobilizaci organismu, v logaritmických hodnotách na osu *x*. Mortalita a imobilizace se vyjádří v procentech, která se následně převedou na tzv. probity dle tabulky v Příloze 11 a vynesou na osu *y*. Jednotlivé body se spojí přímkou a v průsečíku přímkou s probitovou hodnotou 5, která odpovídá mortalitě 50 %, se sestrojí kolmice, odečte se logaritmická hodnota koncentrace a následným odlogaritmováním této hodnoty se určí hledané koncentrace 24hEC<sub>50</sub> a 48hEC<sub>50</sub>. [21, 47]



Obr. 24 Sada roztoků solí k přípravě ředící vody – Daphtoxkit F<sup>TM</sup>



Obr. 25 Zkumavky s vajíčky *Daphnia magna* a zkumavky s řasou

#### 4.6.3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

Test na organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) byl proveden za využití testovací destičky ze sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>.

**Příprava ředící vody:** ředící voda byla připravena navážením níže uvedeného množství chemikálií:

|                        |                                       |           |
|------------------------|---------------------------------------|-----------|
| ▪ krystalické soli:    | NaCl                                  | 23,9600 g |
|                        | MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O | 10,3460 g |
| ▪ zásobní roztok č. 1: | MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O | 6,5000 g  |
|                        | NaBr                                  | 1,0290 g  |
|                        | KCl                                   | 0,5960 g  |
| ▪ zásobní roztok č. 2: | CaCl <sub>2</sub>                     | 0,2998 g  |
|                        | NaHCO <sub>3</sub>                    | 0,2010 g  |
|                        | SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O  | 0,0027 g  |
|                        | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 0,0006 g  |
|                        | NaF                                   | 0,0042 g  |

Veškeré chemikálie byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněny po rysku destilovanou vodou.

**Příprava roztoků vodných výluhů:** k úvodnímu testu byly využity neředěné vodné výluhy, které byly obohaceny stejnými, výše zmíněnými solemi ve stejném poměru. U předběžného testu byla vytvořena koncentrační řada vodných výluhů: 0 (kontrola), 10, 100 a 500 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla stanovena na základě výsledků předběžného testu. K ředění byla používána standardně připravená ředící voda.

**Inkubace vajíček *Artemia salina*:** k líhnutí žábřonožek byla použita ředící voda, líhnutí probíhalo při teplotě 21 °C za mírného kontinuálního provzdušňování vzduchem po dobu 24 hodin.

**Nasazení testu:** do každé šachty v kontrolním řádku byly odpipetovány 2 ml ředící vody, do ostatních řádků byly odpipetovány 2 ml testované látky různých koncentrací v pořadí podle stoupající koncentrace. Do mycích šachet bylo mikropipetou přemístěno 50 jedinců, kteří byli následně v počtu deseti kusů přemístěni do každé šachty s testovanými roztoky i do šachet určených pro kontrolu. Naplněné testovací destičky byly zakryty víčkem a umístěny po dobu 48 hodin v inkubátoru s konstantním osvětlením a teplotou 22 až 25 °C.

**Vyhodnocení testu:** po 24 a 48 hodinách byli spočítáni uhynulí jedinci a bylo vypočítáno procento mortality v jednotlivých koncentracích. Logaritmická hodnota koncentrace se vynesla na osu x, zatímco hodnota procentuální mortality se zaznamenala na ose y. Získané body se proložily přímkou a v průsečíku přímkou s 50% mortalitou se spustila kolmice, která určila logaritmickou hodnotu koncentrace, při které byla stanovena 50% mortalita. Následným odlogaritmováním této koncentrace byly stanoveny hodnoty 24hLC50 a 48hLC50. [27, 28]

#### 4.6.4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

Test na okřehku menším (*Lemna minor*) byl proveden podle normy ČSN EN ISO 20079 Jakost vod - stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) - Zkouška inhibice růstu okřehek.

**Příprava ředící vody:** nejprve byly připraveny zásobní roztoky makrosložek a mikrosložek, které slouží k přípravě modifikovaného Steinbergova média. Makrosložky představují zásobní roztoky č. 1, 2 a 3, mikrosložky roztoky č. 4 až 8.

Zásobní roztok č. 1 byl připraven navážením 17,5 g  $\text{KNO}_3$ ; 4,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,63 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , jejich kvantitativním převedením do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Zásobní roztok č. 2 byl připraven navážením 5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , kvantitativním převedením do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Obdobně byly připraveny i zásobní roztoky č. 3 až 7 s navážkami 14,75 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 120 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 180 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 44 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 180 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

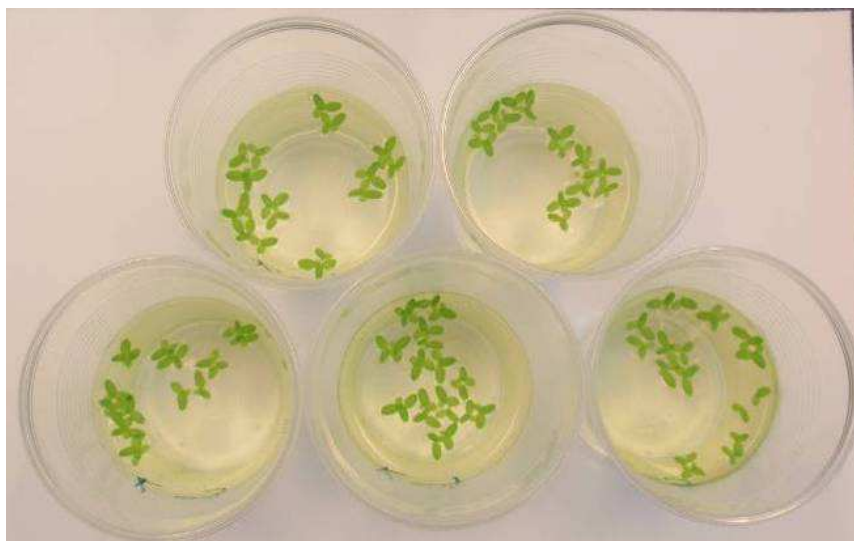
Zásobní roztok č. 8 byl připraven navážením 760 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 1 500 mg EDTA, disodné soli, dihydrátu. Obě složky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněny destilovanou vodou po rysku.

Roztoky byly následně upraveny autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut (norma připouští jako alternativu i sterilizaci filtrací na filtru s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ ). Pro přípravu modifikovaného Steinbergova média bylo do odměrné baňky o objemu 1 l odpipetováno 20 ml každého ze zásobních roztoků č. 1, 2 a 3, poté byly přidány po 1 ml zásobní roztoky č. 4, 5, 6, 7 a 8 a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

**Příprava roztoků vodných výluhů:** k úvodnímu testu byly využity neředěné vodné výluhy, které byly obohaceny stejnými, výše zmíněnými solemi ve stejném poměru. U předběžného testu byla vytvořena koncentrační řada vodných výluhů: 0 (kontrola), 10, 100 a 500 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla stanovena na základě výsledků předběžného testu. K ředění byla používána standardně připravená ředící voda.

**Nasazení testu:** před vlastním testováním byl po dobu cca 7 dní okřehek kultivován v připraveném modifikovaném Steinbergově médiu. Testování bylo prováděno v plastových kelímcích o objemu 200 ml, které byly naplněny testovanými výluhy a ředící vodou, která slouží jako kontrola, na objem 100 ml. Do každého kelímku byly přeneseny pomocí skleněné tyčinky 2 - 4 lístkové kolonie s celkovým počtem 10-ti lístků v každém kelímku. Kelímky byly zakryty potravinářskou fólií a ponechány v laboratoři při osvětlení 6 000 lx (obr. 26).

**Vyhodnocení testu:** během testování byl sledován a zaznamenáván stav lístků. Vyhodnocení bylo provedeno podle růstové rychlosti a podle množství biomasy. K získání hodnoty  $\text{IC}_{50}$  je potřeba minimálně 5 hodnot koncentrací, při kterých došlo k inhibici růstu, které se následně vyjádří v logaritmických hodnotách a vynesou se na osu  $x$ . Hodnoty  $I_\mu$  a  $I_B$  se vynesou na osu  $y$  a získanými body se proloží přímka, přičemž se v průsečíku přímky s 50% inhibicí růstu spustí kolmice, odečte se příslušná logaritmická hodnota koncentrace a jejím následným odlogaritmováním se určí hledaná hodnota 168h $\text{IC}_{50}$ . [34, 35, 36]



Obr. 26 Kolonie okřešku menšího (*Lemna minor*) v kontrole po 168 hodinách

#### 4.6.5. Thamnotoxkit F™

Testování bylo provedeno za použití růstového stadia larev sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* právě vylíhnutých z cyst (obr. 27).



Obr. 27 Cysty s organismem *Thamnocephalus platyurus*

**Příprava ředící vody:** před začátkem testu byla připravena ředící voda. Do odměrné baňky o objemu 1 l byly přidány 4 roztoky solí NaHCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> a KCl, které jsou součástí testovací sady. Odměrná baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku a protřepána. Před každým následným použitím byla ředící voda cca 15 min provzdušňována.

**Příprava roztoků vodných výluhů:** vodné výluhy byly připraveny podle Standardního operačního postupu pro odpadní vody, který je součástí tohoto mikrobiotestu. Byla vytvořena koncentrační řada s následujícími koncentracemi:

- kádinka č. 5 6,25 %, resp. 62,5 ml/l
- kádinka č. 4 12,5 %, resp. 125 ml/l
- kádinka č. 3 25 %, resp. 250 ml/l
- kádinka č. 2 50 %, resp. 500 ml/l
- kádinka č. 1 100 %, resp. 1 000 ml/l.

**Inkubace cyst organismu *Thamnocephalus platyurus*:** inkubace byla provedena 24 hodin před testováním. Do kádinky bylo odpipetováno 2,5 ml ředící vody a 17,5 ml destilované vody. Poté byl odpipetován 1 ml této zředěné standardní vody a přidán do ampule s cystami, která byla následně uzavřena a protřepávána po dobu 30 minut. Po hydrataci byly cysty přeneseny do Petriho misky a bylo přidáno 10 ml zředěné standardní vody. Petriho miska byla zavičkována a vložena do inkubátoru o teplotě (25 ± 2) °C za stálého osvětlení 3 000 až 4 000 lx.

**Nasazení testu:** do každé šachty sloupce 1 byl odpipetován 1 ml ředící vody, přičemž tato šachta sloužila jako kontrola. Do každé šachty sloupce 2 byl následně odpipetován 1 ml z kádinky č. 5, přičemž bylo obdobně postupováno i se zbývajících kádinkami. Testovací organismy byly nejprve v počtu 50 jedinců přemístěny do každé šachty řádku D, které slouží jako tzv. mycí šachty. Odtud bylo následně přeneseno do každé testované koncentrace po deseti kusech testovacího organismu. Po zaplnění všech šachet byla testovací destička překryta parafilmovou páskou, plastovým krytem a umístěna v temnu v inkubátoru s teplotou 25 °C po dobu 24 hodin. Po skončení doby inkubace byli spočítáni uhynulí jedinci a určila se mortalita testovacího organismu. Hodnota LC50 byla následně stanovena graficky vynesím zlogaritmovaných koncentrací na osu *x* a mortality na osu *y*. Body byly následně spojeny přímkou, přičemž její průsečík s 50% mortalitou a následně vynesení kolmice na osu *x*, určili hledanou koncentraci 24hLC50. [44, 45, 46]

#### 4.6.6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

Testování pomocí sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> bylo opět prováděno na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

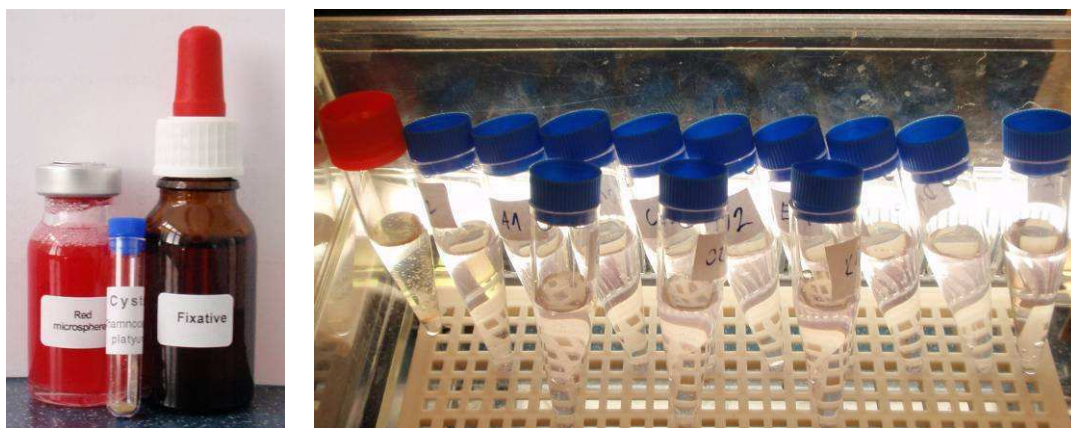
**Příprava ředící vody:** připravená ředící voda je již součástí testovací sady.

**Příprava vodných výluhů:** jednotlivé výluhy byly naředěny ředící vodou na koncentraci 10 ml/l a doplněny v testovacích zkumavkách ředící vodou po rysku. Ředěním nastala odchylka od Standardního operačního postupu, neboť dle něj se testování provádí na neředěných vodných výluhách. Avšak vzhledem k tomu, že výsledky testování pomocí sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> vykazovaly pro neředěné výluhy ve většině případů 100% mortalitu, bylo zvoleno výše zmíněné ředění.

**Inkubace cyst organismu *Thamnocephalus platyurus*:** cysty byly nejprve hydratovány v 1 ml ředící vody po dobu 1 hodiny za občasného třepání při laboratorní teplotě. Poté byly cysty pomocí 1 ml ředící vody přeneseny do líhnuoucí vaničky, která byla doplněna dalšími 8 ml této vody. Líhnuoucí vanička byla umístěna do inkubátoru a testovací organismus byl inkubován po dobu 30 až 45 hodin při teplotě 25 °C s osvětlením 3 000 až 4 000 lx (obr. 28).

**Nasazení testu:** vylíhnuté organismy, včetně inkubačního média, byly přeneseny do tzv. předvzorkovací zkumavky. Z ní bylo pomocí mikropipety přeneseno 0,5 ml suspenze obsahující organismy do každé testovací zkumavky obsahující naředěné vodné výluhy, i do zkumavky obsahující ředící vodu, která slouží jako kontrola. Uzavřené zkumavky byly opět vloženy do inkubátoru a při teplotě 25 °C inkubovány po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby, bylo do každé testovací zkumavky přidáno 0,2 ml tzv. červených mikrospor, které slouží jako potrava. Obsah zkumavek byl zhomogenizován třepáním a zkumavky byly opět umístěny do inkubátoru při teplotě 25 °C po dobu 15 minut. Následně byla v každé zkumavce provedena fixace organismů přidáním 3 kapek fixativa, přičemž po uplynutí 5 minut došlo ke klesnutí všech organismů na dno zkumavky.

**Vyhodnocení testu:** pomocí mikropipety s nastaveným objemem 0,3 ml byly veškeré organismy z každé zkumavky přeneseny na pozorovací sklíčko a pod mikroskopem byli spočítáni všichni jedinci i jedinci s potravou, tj. ti, kteří měli v trávicím traktu červené mikrospory. Určila se inhibice příjmu mikrospor organismem v porovnání s kontrolou. [50]



Obr. 28 Základní chemikálie Rapidtoxkitu F<sup>TM</sup> a inkubace organismu v testovacích zkumavkách

## 5. VÝSLEDKY

Veškeré výsledky experimentálního měření byly pro větší přehlednost shrnuty do tabulek a následně i do grafů.

### 5.1. Příprava vodného výluhu

V tabulce 3 jsou uvedeny navážky vzorků, ze kterých byl spočítán podíl sušiny *DR*, hmotnost analytického vzorku *M* a množství vody *LM*, které je nutné k přípravě 1 l vodného výluhu.

Tab. 3 Základní veličiny potřebné k přípravě 1 l vodného výluhu

| Označení vzorku | Podíl sušiny | Hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny | Množství přidané vody |
|-----------------|--------------|---|-----------------------|
|                 | DR           | M   | LA                    |
|                 | %            | g   | ml                    |
| A1              | 99,8556      | 100,1447  | 999,8553              |
| A2              | 99,8719      | 100,1282  | 999,8718              |
| B1              | 99,9063      | 100,0938  | 999,9062              |
| B2              | 76,4453      | 130,8125  | 969,1875              |
| C1              | 63,5423      | 157,3754  | 942,6246              |
| C2              | 99,9163      | 100,0838  | 999,9162              |
| C3              | 98,8907      | 101,1217  | 998,8783              |
| D1              | 99,7058      | 100,2951  | 999,7049              |
| D2              | 99,9052      | 100,0949  | 999,9051              |
| E1              | 98,5432      | 101,4783  | 998,5217              |

U vodných výluhů byly změřeny základní charakteristiky, tj. celkový objem, konduktivita, hodnota pH a teplota vodného výluhu, které jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4 Změřené charakteristiky vodného výluhu

| Označení vzorku | Celkový objem | Konduktivita | pH    | Teplota výluhu | Charakteristika výluhu      |
|-----------------|---------------|--------------|-------|----------------|-----------------------------|
|                 | ml            | mS/cm        | -     | °C             |                             |
| A1              | 999           | 11,00        | 12,27 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| A2              | 999           | 9,260        | 12,35 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| B1              | 999           | 2,770        | 11,84 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| B2              | 969           | 0,156        | 9,81  | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| C1              | 942           | 0,838        | 9,26  | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| C2              | 999           | 0,714        | 10,25 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| C3              | 998           | 9,940        | 12,42 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| D1              | 999           | 10,310       | 12,52 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| D2              | 999           | 8,290        | 12,43 | 21,2           | bezbarvý, bez zápachu       |
| E1              | 998           | 6,91         | 11,67 | 21,2           | nažloutlý, organický zápach |



## 5.2. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Test byl proveden na základě postupu uvedeného v kapitole 3.3.3.4. a 4.6.1. této diplomové práce, přičemž princip testování byl prováděn dle schématu na *obrázku 2*.

### 5.2.1. Úvodní test

Úvodní test byl proveden s neřaděnými vodnými výluhy vedlejších energetických produktů obohacenými solemi, a s ředící vodou, která se používá jako kontrola. Výsledky úvodního testu jsou uvedeny v tabulce 5. V rámci testu byly provedeny dvě kontroly, přičemž průměrná délka kořene v kontrole byla  $L = 26,7642$  mm.

Tab. 5 Výsledky úvodního testu na hořčici bílé (*Sinapis alba*)

| Označení vzorku | Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|-----------------|----------------|------------|------------|
|                 | mm             | %          |            |
| <b>kontrola</b> | 26,7642        | -          | -          |
| A1              | 27,3448        | -2,1696    | stimulace  |
| A2              | 25,1333        | 6,0933     | inhibice   |
| B1              | 27,4828        | -2,6849    | stimulace  |
| B2              | 35,3678        | -32,1461   | stimulace  |
| C1              | 30,6429        | -14,4921   | stimulace  |
| C2              | 27,4643        | -2,6159    | stimulace  |
| C3              | 28,3448        | -5,9059    | stimulace  |
| D1              | 23,9643        | 10,4613    | inhibice   |
| D2              | 19,9630        | 25,4116    | inhibice   |
| E1              | 19,8462        | 25,8480    | inhibice   |

Z výsledku úvodního testu je zřejmé, že inhibice nedosáhla ani u jednoho vzorku 50 %, tudíž byl proveden ověřovací test.

### 5.2.2. Ověřovací test

Na základě výsledků úvodního testu byl proveden ověřovací test, jehož výsledky jsou shrnuty do tabulky 6. Bylo nasazeno celkem pět kontrol. Výsledná průměrná délka kořene v kontrole činila  $L = 24,6740$  mm. Současně byl testován neřaděný výluh každého vzorku, a to ve třech paralelních nasazeních. Byla stanovena průměrná délka kořene pro každý vzorek a vypočítána inhibice růstu kořene.

Tab. 6 Výsledky ověřovacího testu na hořčici bílé (*Sinapis alba*)

| Označení vzorku | Délka kořene   |                |                |         | Inhibice        | Zhodnocení       |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------|-----------------|------------------|
|                 | L <sub>A</sub> | L <sub>B</sub> | L <sub>C</sub> | øL      | I               |                  |
|                 | mm             | mm             | mm             | mm      | %               |                  |
| <b>kontrola</b> | -              | -              | -              | 24,6740 | -               | -                |
| <b>A1</b>       | 25,5926        | 25,6786        | 23,7308        | 25,0006 | <b>-1,3240</b>  | <b>stimulace</b> |
| <b>A2</b>       | 22,1034        | 20,1429        | 29,1379        | 23,7947 | <b>3,5634</b>   | <b>inhibice</b>  |
| <b>B1</b>       | 25,0000        | 25,8889        | 29,4483        | 26,7791 | <b>-8,5316</b>  | <b>stimulace</b> |
| <b>B2</b>       | 31,7143        | 31,6508        | 31,9765        | 31,7805 | <b>-28,8018</b> | <b>stimulace</b> |
| <b>C1</b>       | 32,5357        | 32,5556        | 30,3953        | 31,8289 | <b>-28,9977</b> | <b>stimulace</b> |
| <b>C2</b>       | 26,9564        | 25,4268        | 24,8012        | 25,7281 | <b>-4,2724</b>  | <b>stimulace</b> |
| <b>C3</b>       | 25,9286        | 27,4400        | 25,1154        | 26,1613 | <b>-6,0280</b>  | <b>stimulace</b> |
| <b>D1</b>       | 22,8400        | 22,1111        | 22,8889        | 22,6133 | <b>8,3515</b>   | <b>inhibice</b>  |
| <b>D2</b>       | 21,7853        | 21,4502        | 21,5814        | 21,6056 | <b>12,4355</b>  | <b>inhibice</b>  |
| <b>E1</b>       | 19,1481        | 21,2222        | 19,1600        | 19,8435 | <b>19,5774</b>  | <b>inhibice</b>  |

Výsledky ověřovacího testu potvrdily výsledky úvodního testu, a to, že žádný vzorek neprokázal inhibici, resp. stimulaci větší než 50 %. Vzhledem k této skutečnosti nebylo možné stanovit hodnotu 72hIC<sub>50</sub>.

Podle vyhlášky č. 376/2001 Sb., která stanoví limit 72hIC<sub>50</sub> ≤ 10 ml/l, nevykazuje ani jeden vzorek nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická.

Podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. nevykázal ani jeden vzorek inhibici, resp. stimulaci větší než 30 %, tudíž ani dle této vyhlášky nevykazují vzorky nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická. Všechny vzorky lze tedy využít k rekultivaci vytěžených povrchových důlních děl, jako jsou povrchové doly, lomy, pískovny, ale i na povrchu terénu k terénním úpravám nebo rekultivacím lidskou činností postižených pozemků, avšak s výjimkou rekultivace skládek. [14]

### 5.3. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Test byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3.1. a 4.6.2. této diplomové práce, přičemž princip testování byl prováděn dle schématu znázorněném na obrázku 2.

#### 5.3.1. Úvodní test

Úvodní test byl proveden ve čtyřech paralelních stanoveních pro každý neředěný vodný výluh, přičemž tyto výluhy byly obohaceny solemi podle požadavků metodiky. Současně byla provedena kontrola. Výsledky úvodního testu jsou uvedeny v tabulce 7.

Vzhledem k nedostatečnému počtu testovacích organismů byly k testování vybrány pouze čtyři vzorky a to:

- vzorek B2 hydrosměs popílku a škváry
- vzorek C1 škvára
- vzorek C3 produkt z odsíření
- vzorek E1 úletový popílek

Tab. 7 Výsledky úvodního testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

| Označení vzorku | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-----------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                 | ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| <b>kontrola</b> | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| <b>B2</b>       | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| <b>C1</b>       | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| <b>C3</b>       | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |
| <b>E1</b>       | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

Na základě úvodního testu bylo zjištěno, že vzorky B2 a C1 nevykazují pro organismus *Daphnia magna* toxický účinek a z toho důvodu bylo přistoupeno k ověřovacím testům pro tyto vzorky. Naopak vzorky C3 a E1 prokázaly 100% mortalitu, tudíž u nich byly provedeny předběžné testy.

### 5.3.2. Ověřovací test

Ověřovací test byl proveden pro neřaděné výluhy vzorků B2 a C1, přičemž testování bylo provedeno ve čtyřech paralelních stanoveních pro každý vzorek. Současně byla provedena kontrola s ředící vodou opět ve čtyřech paralelních stanoveních. Výsledky ověřovacího testu jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8 Výsledky ověřovacího testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

| Označení vzorku | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|-----------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                 | ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| <b>kontrola</b> | 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| <b>B2</b>       | 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| <b>C1</b>       | 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Výsledky ověřovacího testu potvrdily, že vzorky B2 a C1 nevykazují u organismu *Daphnia magna* toxický účinek, tudíž je nebylo třeba dále testovat a nebylo možno stanovit hodnoty 24hEC50 a 48hEC50. Vzhledem k této skutečnosti, a v porovnání s vyhláškou č. 376/2001 Sb., která stanoví limit  $48hEC50 \leq 10$  ml/l, nevykazují vzorky B2 a C1 nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicita.

Podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. nevykázaly vzorky mortalitu větší než 30 % a lze je využít k rekultivaci na povrchu terénu.

### 5.3.3. Předběžný test

Na základě úvodního testu byl pro vzorky C3 a E1 proveden předběžný test s výluhy o koncentracích 10, 100 a 500 ml/l. Jednotlivé koncentrace každého vzorku byly testovány

ve čtyřech paralelních provedeních. Kontrola byla provedena ve stejném počtu opakování jako testované výluhy vzorků. Výsledky předběžného testu jsou shrnuty v tabulce 9.

Tab. 9 Výsledky předběžného testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| C3              | 10          | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 100         | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |
|                 | 500         | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |
| E1              | 10          | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 100         | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 500         | 20                         | 40                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |

Předběžný test potvrdil mortalitu větší než 50 % u obou vzorků, tudíž bylo stanoveno užší koncentrační rozmezí a proveden základní test.

#### 5.3.4. Základní test

Základní test pro vzorek C3 byl proveden ve čtyřech paralelních stanoveních s koncentračním rozhraním 10, 20, 40, 60, 80 a 100 ml/l. Kontrola byla provedena ve stejném počtu opakování jako testované výluhy vzorků. Výsledky základního testu jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10 Výsledky základního testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*) pro vzorek C3

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| C3              | 10          | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 20          | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 3                   | <b>15</b>  |
|                 | 40          | 20                         | 1                   | <b>5</b>   | 4                   | <b>20</b>  |
|                 | 60          | 20                         | 8                   | <b>40</b>  | 8                   | <b>40</b>  |
|                 | 80          | 20                         | 10                  | <b>50</b>  | 11                  | <b>55</b>  |
|                 | 100         | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |

Výsledky základního testu potvrdily u vzorku C3 toxický účinek a byly pro něj stanoveny hodnoty 24hEC50 a 48hEC50.

Pro vzorek C3 byly vypočítány hodnoty efektivní koncentrace:

- 24hEC50 = 70,8342 ml/l,
- 48hEC50 = 41,9459 ml/l.

Základní test pro vzorek E1 byl proveden ve čtyřech paralelních stanoveních s koncentračním rozhraním 100, 200, 300, 350, 400 a 500 ml/l. Součástí testování bylo nasazení čtyř paralelních kontrolních stanovení. Výsledky základního testu jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11 Výsledky I. základního testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*) pro vzorek E1

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>E1</b>       | <b>100</b>  | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 2                   | <b>10</b>  |
|                 | <b>200</b>  | 20                         | 15                  | <b>75</b>  | 19                  | <b>95</b>  |
|                 | <b>300</b>  | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>350</b>  | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>400</b>  | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>  | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |

Výsledky základního testu potvrdily u vzorku E1 mortalitu větší než 50 % již u druhé koncentrace, tudíž byl pro tento vzorek proveden ještě druhý základní test s užším koncentračním rozmezím 100, 120, 140, 160 180 a 200 ml/l. Stanovení bylo provedeno opět 4x pro každou koncentraci i pro kontrolní stanovení. Výsledky druhého základního testu pro vzorek E1 jsou uvedeny v tabulce 12.

Tab. 12 Výsledky II. základního testu na hrotnatce velké (*Daphnia magna*) pro vzorek E1

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>E1</b>       | <b>100</b>  | 20                         | 0                   | <b>0</b>   | 2                   | <b>10</b>  |
|                 | <b>120</b>  | 20                         | 11                  | <b>55</b>  | 19                  | <b>95</b>  |
|                 | <b>140</b>  | 20                         | 11                  | <b>55</b>  | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>160</b>  | 20                         | 18                  | <b>90</b>  | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>180</b>  | 20                         | 19                  | <b>95</b>  | 20                  | <b>100</b> |
|                 | <b>200</b>  | 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |

Výsledky druhého základního testu pro vzorek E1 potvrdily mortalitu větší než 50 %, tudíž byly stanoveny hodnoty 24hEC50 a 48hEC50.

Pro vzorek E1 byly vypočítány hodnoty efektivní koncentrace:

- pro základní test II: **24hEC50 = 115,8273 ml/l**,
- pro základní test II: **48hEC50 = 101,3363 ml/l**.

Podle vyhlášky č. 376/2001 Sb., která stanoví limit  $48hEC50 \leq 10 \text{ ml/l}$ , nevykazují vzorky C3 a E1 nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxicita.

Podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. vykazují neřaděné výluhy obou vzorků (tab. 7) mortalitu větší než 30 % a nelze je využít k rekultivacím na povrchu terénu.

#### 5.4. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

Test byl proveden na základě postupu uvedeném v kapitole 3.3.5. a 4.6.3. této diplomové práce, přičemž princip testování byl prováděn dle schématu znázorněném na obrázku 2.

##### 5.4.1. Úvodní test

Úvodní test byl proveden s čtyřmi s neřaděnými výluhy, současně byla také ve čtyřech stanoveních nasazena kontrola. Výsledky úvodního testu jsou shrnuty v tabulce 13.

Tab. 13 Výsledky úvodního testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

| Označení vzorku | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-----------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                 | ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| <b>kontrola</b> | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| A1              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| A2              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| B1              | 40                         | 10                  | 100 | 40                  | 100 |
| B2              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| C1              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| C2              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| C3              | 40                         | 32                  | 80  | 32                  | 80  |
| D1              | 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |
| D2              | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| E1              | 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

Z výsledků úvodního testu je zřejmé, že vzorky A1, A2, B2, C1, C2 a D2 vykazují nulovou mortalitu, tudíž u nich byly provedeny ověřovací testy. Naopak vzorky B1, C3, D1 a E1 vykazují mortalitu větší než 50 %, tudíž u nich byly provedeny testy předběžné.

##### 5.4.2. Ověřovací test

Ověřovací test byl proveden s neřaděnými výluhy ve čtyřech paralelních stanoveních. Souběžně byly nasazeny čtyři kontrolní stanovení. Výsledky ověřovacího testu jsou uvedeny v tabulce 14.

Tab. 14 Výsledky ověřovacího testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

| Označení vzorku | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|-----------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                 | ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| <b>kontrola</b> | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| A1              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| A2              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| B2              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| C1              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| C2              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| D2              | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Výsledky ověřovacího testu potvrdily pro všechny vzorky, tj. pro vzorky A1, A2, B2, C1, C2 i D2, nulovou mortalitu organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*). Z těchto důvodů nebylo třeba vzorky dále testovat a nemohly být stanoveny hodnoty 24hLC50 a 48hLC50.

#### 5.4.3. Předběžný test

Na základě úvodního testu byl pro vzorky B1, C3, D1 a E1 proveden předběžný test s výluhy o koncentracích 10, 100 a 500 ml/l. Test byl proveden ve čtyřech paralelních stanoveních. Kontrola byla provedena ve stejném počtu paralelních stanovení jako testované výluhy odpadů. Výsledky předběžného testu jsou shrnuty v tabulce 15.

Tab. 15 Výsledky předběžného testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                 | ml/l        | ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| B1              | 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 500         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| C3              | 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 100         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 500         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| D1              | 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 100         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 500         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| E1              | 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 100         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
|                 | 500         | 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

Na základě výsledků předběžného testu byly pro všechny čtyři vzorky provedeny základní testy s užším koncentračním rozhraním.

#### 5.4.4. Základní test

Na základě úvodního a předběžného testu byly stanoveny koncentrace pro test základní následovně:

- vzorky B1, C3 a D1: koncentrační rozhraní 500, 600, 700, 800, 900 a 950 ml/l
- vzorek E1: koncentrační rozhraní 100, 200, 300, 350, 400 a 500 ml/l.

Základní test byl proveden opět ve čtyřech paralelních stanoveních, včetně čtyř provedení kontrol.

Výsledky základního testu jsou uvedeny v tab. 16 až 19. Na základě výsledků základního testu mohly být pro vzorky B1, C3, D1 a E1 stanoveny hodnoty letální koncentrace 24hLC50 a 48hLC50.

Tab. 16 Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*) pro vzorek B1

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |           | Mortalita po 48 hod |           |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %         | ks                  | %         |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>  | 0                   | <b>0</b>  |
| <b>B1</b>       | <b>500</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>  | 0                   | <b>0</b>  |
|                 | <b>600</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>  | 0                   | <b>0</b>  |
|                 | <b>700</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>  | 0                   | <b>0</b>  |
|                 | <b>800</b>  | 40                         | 8                   | <b>20</b> | 8                   | <b>20</b> |
|                 | <b>900</b>  | 40                         | 16                  | <b>40</b> | 18                  | <b>45</b> |
|                 | <b>950</b>  | 40                         | 30                  | <b>75</b> | 32                  | <b>80</b> |

Pro vzorek B1 byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 947,0625 ml/l,
- 48hLC50 = 914,6314 ml/l.

Tab. 17 Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*) pro vzorek C3

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>C3</b>       | <b>500</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>600</b>  | 40                         | 4                   | <b>10</b>  | 6                   | <b>15</b>  |
|                 | <b>700</b>  | 40                         | 8                   | <b>20</b>  | 32                  | <b>80</b>  |
|                 | <b>800</b>  | 40                         | 36                  | <b>90</b>  | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>900</b>  | 40                         | 40                  | <b>100</b> | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>950</b>  | 40                         | 40                  | <b>100</b> | 40                  | <b>100</b> |



Pro vzorek C3 byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 710,3801 ml/l,
- 48hLC50 = 661,2812 ml/l.

Tab. 18 Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*) pro vzorek D1

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>D1</b>       | <b>500</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 4                   | <b>10</b>  |
|                 | <b>600</b>  | 40                         | 4                   | <b>10</b>  | 8                   | <b>20</b>  |
|                 | <b>700</b>  | 40                         | 8                   | <b>20</b>  | 24                  | <b>60</b>  |
|                 | <b>800</b>  | 40                         | 38                  | <b>95</b>  | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>900</b>  | 40                         | 40                  | <b>100</b> | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>950</b>  | 40                         | 40                  | <b>100</b> | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek D1 byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 704,6049 ml/l
- 48hLC50 = 650,6676 ml/l.

Tab. 19 Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*) pro vzorek E1

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>E1</b>       | <b>100</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>200</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>300</b>  | 40                         | 2                   | <b>5</b>   | 4                   | <b>10</b>  |
|                 | <b>350</b>  | 40                         | 4                   | <b>10</b>  | 8                   | <b>20</b>  |
|                 | <b>400</b>  | 40                         | 12                  | <b>30</b>  | 16                  | <b>40</b>  |
|                 | <b>500</b>  | 40                         | 40                  | <b>100</b> | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek E1 byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 490,9587 ml/l,
- 48hLC50 = 429,0607 ml/l.

## 5.5. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

Test byl proveden na základě postupu uvedeného v kapitole 3.3.4.1. a 4.6.4. této diplomové práce, přičemž princip testování byl prováděn dle schématu na obrázku 2.

### 5.5.1. Úvodní test

Úvodní test byl proveden s neřaděnými vodnými výluhy, přičemž bylo současně nasazeno pět paralelních kontrolních stanovení.

Byly spočítány růstové rychlosti  $\mu$  a následně inhibice, resp. stimulace růstu  $I_\mu$ . Dále bylo spočítáno procento redukce biomasy  $I_B$ .

Výsledné průměrné hodnoty pro kontrolní stanovení byly následující:

- růstová rychlost v kontrole  $\mu_c = 0,0126$ ,
- konečná biomasa v kontrole  $B_c = 0,0075$  g.

Výsledky úvodního testu inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*) jsou shrnuty v tabulce 20.

Tab. 20 Výsledky úvodní test na okřehku menším (*Lemna minor*)

| Označení vzorku | $\mu$  | $I_\mu$         | B      | $I_B$          | Zhodnocení      |
|-----------------|--------|-----------------|--------|----------------|-----------------|
|                 | -      | %               | g      | %              |                 |
| <b>kontrola</b> | 0,0102 | -               | 0,0073 | -              | -               |
| <b>A1</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0006 | <b>91,7808</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>A2</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0005 | <b>93,1507</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>B1</b>       | 0,0027 | <b>73,5294</b>  | 0,0015 | <b>79,4521</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>B2</b>       | 0,0049 | <b>51,9608</b>  | 0,0024 | <b>67,1233</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>C1</b>       | 0,0041 | <b>59,8039</b>  | 0,0026 | <b>64,3836</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>C2</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0003 | <b>95,8904</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>C3</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0002 | <b>97,2603</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>D1</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0001 | <b>98,6301</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>D2</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0002 | <b>97,2603</b> | <b>inhibice</b> |
| <b>E1</b>       | 0,0000 | <b>100,0000</b> | 0,0001 | <b>98,6301</b> | <b>inhibice</b> |

Z výsledků úvodního testu je zřejmé, že všechny vzorky vykazují inhibici větší než 50 %. Z tohoto důvodu byl u nich proveden předběžný test.

### 5.5.2. Předběžný test

Pro předběžný test bylo zvoleno koncentrační rozhraní 10, 100 a 500 ml/l. Kontrolní test byl prováděn v pěti paralelních stanovení.

Výsledné průměrné hodnoty pro pět kontrolních stanovení jsou následující:

- růstová rychlost v kontrole  $\mu_c = 0,0103$ ,
- konečná biomasa v kontrole  $B_c = 0,0075$  g.

Výsledky předběžného testu inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*) jsou shrnuty v tabulce 21.

Tab. 21 Výsledky předběžného testu na okřehku menším (*Lemna minor*)

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|-----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %         | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0103 | -         | 0,0075 | -       | -          |
| A1              | 10          | 0,0080 | 22,3301   | 0,0073 | 1,3514  | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0045 | 56,3107   | 0,0027 | 63,5135 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000  | 0,0017 | 77,0270 | inhibice   |
| A2              | 10          | 0,0084 | 18,4466   | 0,0048 | 35,1351 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0072 | 30,0971   | 0,0044 | 40,5405 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000  | 0,0008 | 89,1892 | inhibice   |
| B1              | 10          | 0,0090 | 12,6214   | 0,0059 | 20,2703 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0079 | 23,3010   | 0,0050 | 32,4324 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0045 | 56,3107   | 0,0026 | 64,8649 | inhibice   |
| B2              | 10          | 0,0079 | 23,3010   | 0,0049 | 33,7838 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0077 | 25,2427   | 0,0046 | 37,8378 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0070 | 32,0388   | 0,0042 | 43,2432 | inhibice   |
| C1              | 10          | 0,0101 | 1,9417    | 0,0065 | 12,1622 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0091 | 11,6505   | 0,0062 | 16,2162 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0081 | 21,3592   | 0,0052 | 29,7297 | inhibice   |
| C2              | 10          | 0,0093 | 9,7087    | 0,0069 | 6,7568  | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0072 | 30,0971   | 0,0056 | 24,3243 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0037 | 64,0777   | 0,0033 | 55,4054 | inhibice   |
| C3              | 10          | 0,0085 | 17,4757   | 0,0060 | 18,9189 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0068 | 33,9806   | 0,0051 | 31,0811 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000  | 0,0008 | 89,1892 | inhibice   |
| D1              | 10          | 0,0076 | 26,2136   | 0,0045 | 39,1892 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0059 | 42,7184   | 0,0040 | 45,9459 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000  | 0,0016 | 78,3784 | inhibice   |
| D2              | 10          | 0,0085 | 17,4757   | 0,0062 | 16,2162 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0061 | 40,7767   | 0,0047 | 36,4865 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000  | 0,0003 | 95,9459 | inhibice   |
| E1              | 10          | 0,0096 | 6,7961    | 0,0056 | 24,3243 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0089 | 13,5922   | 0,0045 | 39,1892 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0024 | 76,6990   | 0,0028 | 62,1622 | inhibice   |

Na základě předběžného testu, který potvrdil inhibiční účinky pro všechny vzorky, byl proveden test základní s užším koncentračním rozhranním.

### 5.5.3. Základní test

Koncentrační rozhraní základního testu bylo zvoleno na základě předběžného testu následovně:

- koncentrační rozhraní pro vzorek A1: 10, 40, 60, 80, 90 a 100 ml/l,
- koncentrační rozhraní pro vzorky A2, B1, C2, C3, D1, D2 a E1: 100, 200, 300, 350, 400, 500 ml/l,
- koncentrační rozhraní pro vzorky B2 a C1: 500, 600, 700, 800, 900 a 950 ml/l.

Testování bylo provedeno ve dvou paralelních stanoveních pro každou koncentraci pro každý řaděný výluh, přičemž bylo zároveň stanoveno pět paralelních kontrolních stanovení.

Výsledné průměrné hodnoty pro pět kontrolních stanovení jsou následující:

- růstová rychlost v kontrole  $\mu_c = 0,0126$ ,
- konečná biomasa v kontrole  $B_c = 0,0034$  g.

Výsledky základního testu inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*) jsou uvedeny v tabulkách 22 až 31. Na základě výsledků základního testu mohly být pro všechny vzorky stanoveny hodnoty inhibiční koncentrace pomocí růstové rychlosti  $168hI_{\mu}C50$  a určením množství biomasy  $168hI_B C50$ .

Tab. 22 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek A1

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|-----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %         | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -         | 0,0034 | -       | -          |
| A1              | 10          | 0,0083 | 33,6735   | 0,0024 | 28,9941 | inhibice   |
|                 | 40          | 0,0063 | 37,8670   | 0,0018 | 46,7456 | inhibice   |
|                 | 60          | 0,0057 | 44,2395   | 0,0016 | 52,6627 | inhibice   |
|                 | 80          | 0,0048 | 52,6768   | 0,0015 | 55,6213 | inhibice   |
|                 | 90          | 0,0044 | 56,7030   | 0,0012 | 64,4970 | inhibice   |
|                 | 100         | 0,0040 | 61,0277   | 0,0010 | 70,4142 | inhibice   |

Pro vzorek A1 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 62,6794$  ml/l,
- $168hI_B C50 = 41,8161$  ml/l.

Tab. 23 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek A2

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|-----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %         | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -         | 0,0034 | -       | -          |
| A2              | 100         | 0,0069 | 32,1224   | 0,0021 | 37,8698 | inhibice   |
|                 | 200         | 0,0057 | 44,2395   | 0,0020 | 40,8284 | inhibice   |
|                 | 300         | 0,0043 | 58,1093   | 0,0016 | 52,6627 | inhibice   |
|                 | 350         | 0,0037 | 64,0998   | 0,0015 | 55,6213 | inhibice   |
|                 | 400         | 0,0026 | 74,4249   | 0,0013 | 61,5385 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0018 | 82,4869   | 0,0009 | 73,3728 | inhibice   |

Pro vzorek A2 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 203,6913 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 229,7067 \text{ ml/l}$ .

Tab. 24 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek B1

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|-----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %         | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -         | 0,0034 | -       | -          |
| B1              | 100         | 0,0096 | 6,0786    | 0,0025 | 26,0355 | inhibice   |
|                 | 200         | 0,0075 | 26,8929   | 0,0023 | 31,9527 | inhibice   |
|                 | 300         | 0,0063 | 37,8670   | 0,0020 | 40,8284 | inhibice   |
|                 | 350         | 0,0055 | 46,5283   | 0,0019 | 43,7870 | inhibice   |
|                 | 400         | 0,0046 | 55,3298   | 0,0016 | 52,6627 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0037 | 64,0998   | 0,0012 | 64,4970 | inhibice   |

Pro vzorek B1 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 367,8484 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 371,1204 \text{ ml/l}$ .

Tab. 25 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek B2

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|-----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %         | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -         | 0,0034 | -       | -          |
| B2              | 500         | 0,0084 | 17,6595   | 0,0024 | 28,9941 | inhibice   |
|                 | 600         | 0,0084 | 17,6595   | 0,0023 | 31,9527 | inhibice   |
|                 | 700         | 0,0079 | 22,0938   | 0,0021 | 37,8698 | inhibice   |
|                 | 800         | 0,0052 | 48,9106   | 0,0016 | 52,6627 | inhibice   |
|                 | 900         | 0,0050 | 51,3942   | 0,0013 | 61,5385 | inhibice   |
|                 | 950         | 0,0044 | 56,7030   | 0,0011 | 67,4556 | inhibice   |

Pro vzorek B2 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 892,8708 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 762,3836 \text{ ml/l}$ .

Tab. 26 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek C1

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_\mu$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|---------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %       | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -       | 0,0034 | -       | -          |
| C1              | 500         | 0,0095 | 7,2575  | 0,0029 | 14,2012 | inhibice   |
|                 | 600         | 0,0091 | 10,9444 | 0,0024 | 28,9941 | inhibice   |
|                 | 700         | 0,0074 | 27,7326 | 0,0018 | 46,7456 | inhibice   |
|                 | 800         | 0,0067 | 33,9751 | 0,0014 | 58,5799 | inhibice   |
|                 | 900         | 0,0060 | 40,9663 | 0,0013 | 64,4970 | inhibice   |
|                 | 950         | 0,0044 | 56,7030 | 0,0011 | 70,4142 | inhibice   |

Pro vzorek C1 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_\mu C50 = 960,8268$  ml/l,
- $168hI_B C50 = 746,6696$  ml/l.

Tab. 27 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek C2

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_\mu$ | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|---------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %       | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -       | 0,0034 | -       | -          |
| C2              | 100         | 0,0088 | 13,5385 | 0,0028 | 17,1598 | inhibice   |
|                 | 200         | 0,0064 | 36,8694 | 0,0021 | 37,8698 | inhibice   |
|                 | 300         | 0,0058 | 43,1279 | 0,0017 | 49,7041 | inhibice   |
|                 | 350         | 0,0053 | 47,7073 | 0,0015 | 55,6213 | inhibice   |
|                 | 400         | 0,0048 | 52,6768 | 0,0014 | 58,5799 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0043 | 58,1093 | 0,0013 | 61,5385 | inhibice   |

Pro vzorek C2 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_\mu C50 = 367,4662$  ml/l,
- $168hI_B C50 = 306,4881$  ml/l.

Tab. 28 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek C3

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_\mu$  | B      | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------------|-------------|--------|----------|--------|---------|------------|
|                 | ml/l        | -      | %        | g      | %       |            |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -        | 0,0034 | -       | -          |
| C3              | 100         | 0,0075 | 26,0651  | 0,0019 | 43,7870 | inhibice   |
|                 | 200         | 0,0048 | 52,6768  | 0,0014 | 58,5799 | inhibice   |
|                 | 300         | 0,0040 | 61,0277  | 0,0011 | 67,4556 | inhibice   |
|                 | 350         | 0,0018 | 82,4869  | 0,0008 | 76,3314 | inhibice   |
|                 | 400         | 0,0011 | 89,3603  | 0,0007 | 79,2899 | inhibice   |
|                 | 500         | 0,0000 | 100,0000 | 0,0006 | 82,2485 | inhibice   |

Pro vzorek C3 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 183,1506 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 133,4856 \text{ ml/l}$ .

Tab. 29 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek D1

| Označení vzorku | Koncentrace ml/l | $\mu$ - | $I_{\mu}$ %     | B g    | $I_B$ %        | Zhodnocení      |
|-----------------|------------------|---------|-----------------|--------|----------------|-----------------|
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>         | 0,0126  | -               | 0,0034 | -              | -               |
| <b>D1</b>       | <b>100</b>       | 0,0081  | <b>20,5779</b>  | 0,0026 | <b>23,0769</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>200</b>       | 0,0051  | <b>50,1392</b>  | 0,0018 | <b>46,7456</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>300</b>       | 0,0037  | <b>64,0998</b>  | 0,0016 | <b>52,6627</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>350</b>       | 0,0030  | <b>70,7764</b>  | 0,0014 | <b>58,5799</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>400</b>       | 0,0018  | <b>82,4869</b>  | 0,0010 | <b>70,4142</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>500</b>       | 0,0000  | <b>100,0000</b> | 0,0006 | <b>82,2485</b> | <b>inhibice</b> |

Pro vzorek D1 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 199,5262 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 231,6903 \text{ ml/l}$ .

Tab. 30 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek D2

| Označení vzorku | Koncentrace ml/l | $\mu$ - | $I_{\mu}$ %    | B g    | $I_B$ %        | Zhodnocení      |
|-----------------|------------------|---------|----------------|--------|----------------|-----------------|
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>         | 0,0126  | -              | 0,0034 | -              | -               |
| <b>D2</b>       | <b>100</b>       | 0,0069  | <b>32,1224</b> | 0,0021 | <b>37,8698</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>200</b>       | 0,0050  | <b>51,3942</b> | 0,0015 | <b>55,6213</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>300</b>       | 0,0032  | <b>69,0343</b> | 0,0013 | <b>61,5385</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>350</b>       | 0,0022  | <b>78,3168</b> | 0,0010 | <b>70,4142</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>400</b>       | 0,0008  | <b>91,8440</b> | 0,0008 | <b>76,3314</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>500</b>       | 0,0003  | <b>97,1528</b> | 0,0004 | <b>88,1657</b> | <b>inhibice</b> |

Pro vzorek D2 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 169,4912 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 164,2646 \text{ ml/l}$ .

Tab. 31 Výsledky základního testu na okřehku menším (*Lemna minor*) pro vzorek E1

| Označení vzorku | Koncentrace | $\mu$  | $I_{\mu}$      | B      | $I_B$          | Zhodnocení      |
|-----------------|-------------|--------|----------------|--------|----------------|-----------------|
|                 | ml/l        | -      | %              | g      | %              |                 |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 0,0126 | -              | 0,0034 | -              | -               |
| <b>E1</b>       | <b>100</b>  | 0,0081 | <b>20,5779</b> | 0,0025 | <b>26,0355</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>200</b>  | 0,0069 | <b>32,1224</b> | 0,0018 | <b>46,7456</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>300</b>  | 0,0047 | <b>53,9882</b> | 0,0017 | <b>49,7041</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>350</b>  | 0,0044 | <b>56,7030</b> | 0,0015 | <b>55,6213</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>400</b>  | 0,0038 | <b>62,5435</b> | 0,0014 | <b>58,5799</b> | <b>inhibice</b> |
|                 | <b>500</b>  | 0,0006 | <b>94,4380</b> | 0,0012 | <b>64,4970</b> | <b>inhibice</b> |

Pro vzorek E1 byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- $168hI_{\mu}C50 = 251,386 \text{ ml/l}$ ,
- $168hI_B C50 = 265,728 \text{ ml/l}$ .

### 5.6. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Test byl proveden na základě postupu uvedeného v kapitole 3.3.6.1. a 4.6.5. této diplomové práce, přičemž princip testování byl prováděn postupem pro odpadní vody dle Standardního operačního manuálu. [45]

Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce 32 až 36. Pro většinu vzorků byly vypočítány hodnoty letálních koncentrací 24hLC50.

Tab. 32 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* pro vzorky A1 a A2

| Označení vzorku | Koncentrace  | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            |
|-----------------|--------------|----------------------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l         |                            | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>     | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>A1</b>       | <b>62,5</b>  | 40                         | 8                   | <b>20</b>  |
|                 | <b>125</b>   | 40                         | 30                  | <b>75</b>  |
|                 | <b>250</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>1 000</b> | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
| <b>A2</b>       | <b>62,5</b>  | 40                         | 14                  | <b>35</b>  |
|                 | <b>125</b>   | 40                         | 26                  | <b>65</b>  |
|                 | <b>250</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>1 000</b> | 40                         | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek A1 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- $24hLC50 = 84,3421 \text{ ml/l}$ .

Pro vzorek A2 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- $24hLC50 = 70,8922 \text{ ml/l}$ .



Tab. 33 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* pro vzorky B1 a B2

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>B1</b>       | 62,5        | 40                         | 4                   | <b>10</b>  |
|                 | 125         | 40                         | 8                   | <b>20</b>  |
|                 | 250         | 40                         | 16                  | <b>40</b>  |
|                 | 500         | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | 1 000       | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
| <b>B2</b>       | 62,5        | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 125         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 250         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 500         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 1 000       | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |

Pro vzorek **B1** byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 224,7122 ml/l.

Pro vzorek **B2** nemohla být hodnota 24hLC50 určena, neboť mortalita nedosáhla 50%.

Tab. 34 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* pro vzorky C1, C2 a C3

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l        |                            | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>C1</b>       | 62,5        | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 125         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 250         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 500         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 1 000       | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>C2</b>       | 62,5        | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 125         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 250         | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 500         | 40                         | 16                  | <b>40</b>  |
|                 | 1 000       | 40                         | 30                  | <b>75</b>  |
| <b>C3</b>       | 62,5        | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | 125         | 40                         | 16                  | <b>40</b>  |
|                 | 250         | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | 500         | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | 1 000       | 40                         | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek C1 nemohla být hodnota 24hLC50 určena, neboť mortalita nedosáhla 50%.

Pro vzorek C2 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 669,4292 ml/l.

Pro vzorek C3 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 154,7153 ml/l.

Tab. 35 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* pro vzorky D1 a D2

| Označení vzorku | Koncentrace  | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            |
|-----------------|--------------|----------------------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l         |                            | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>     | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>D1</b>       | <b>62,5</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>125</b>   | 40                         | 38                  | <b>95</b>  |
|                 | <b>250</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>1 000</b> | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
| <b>D2</b>       | <b>62,5</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>125</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>250</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>1 000</b> | 40                         | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek D1 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 93,7461 ml/l.

Pro vzorek D2 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 88,3867 ml/l.

Tab. 36 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* pro vzorek E1

| Označení vzorku | Koncentrace  | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            |
|-----------------|--------------|----------------------------|---------------------|------------|
|                 | ml/l         |                            | ks                  | %          |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>     | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
| <b>E1</b>       | <b>62,5</b>  | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>125</b>   | 40                         | 0                   | <b>0</b>   |
|                 | <b>250</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>500</b>   | 40                         | 40                  | <b>100</b> |
|                 | <b>1 000</b> | 40                         | 40                  | <b>100</b> |

Pro vzorek E1 byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- 24hLC50 = 198,4073 ml/l.

## 5.7. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

Test byl proveden na základě postupu uvedeného v kapitole 3.3.6.5. a 4.6.6. této diplomové práce. Bylo však přihlédnuto k výsledkům testů získaných pomocí testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, neboť testovacím organismem sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> i sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> je stejný organismus a to *Thamnocephalus platyurus*. Výsledky získané sadou Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> určily, že neředěné výluhy vykazovaly u všech vzorků, kromě vzorků B2 a C1, mortalitu vyšší než 100 %, tudíž byly jednotlivé výluhy nařazeny na koncentraci 10 ml/l. Součástí testování byly i dvě kontrolní stanovení ve standardní vodě. Výsledky testování, včetně průměrného kontrolního stanovení, jsou uvedeny v tabulce 37.

Tab. 37 Výsledky testování sadou Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

| Označení vzorku | Koncentrace | Počet všech organismů | Počet organismů s mikrosporami |      | I    |
|-----------------|-------------|-----------------------|--------------------------------|------|------|
|                 | ml/l        |                       | ks                             | ks   |      |
| <b>kontrola</b> | <b>0</b>    | 15                    | 11                             | 73,3 | -    |
| A1              | 10          | 12                    | 6                              | 50,0 | 31,8 |
| A2              | 10          | 7                     | 3                              | 42,9 | 41,6 |
| B1              | 10          | 11                    | 6                              | 54,5 | 25,6 |
| B2              | 10          | 30                    | 21                             | 70,0 | 4,5  |
| C1              | 10          | 19                    | 13                             | 68,4 | 6,7  |
| C2              | 10          | 22                    | 13                             | 59,1 | 19,4 |
| C3              | 10          | 18                    | 9                              | 50,0 | 31,8 |
| D1              | 10          | 7                     | 3                              | 42,9 | 41,6 |
| D2              | 10          | 14                    | 7                              | 50,0 | 31,8 |
| E1              | 10          | 11                    | 7                              | 54,5 | 25,6 |

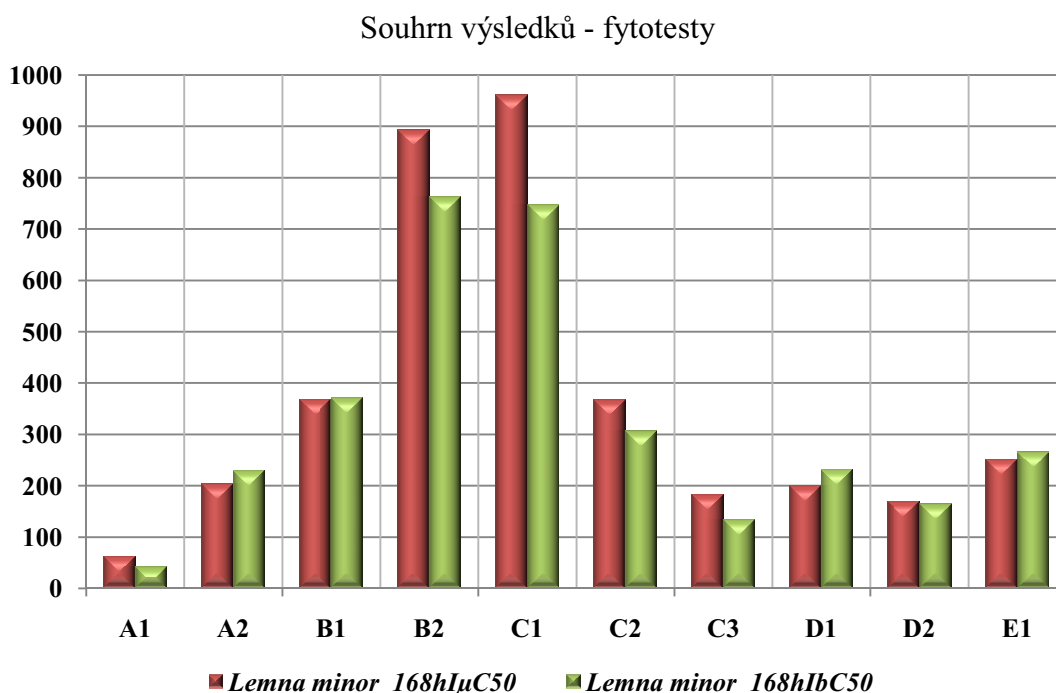
Z výsledků je patrné, že všechny vzorky vykazovaly inhibici příjmu potravy, avšak limitní hodnota 30% inhibice, byla překročena u vzorků A1, A2, C3, D1 a D2, které projevíly toxický účinek.

## 6. DISKUZE VÝSLEDKŮ

Ekotoxikologické hodnocení vzorků vedlejších energetických produktů bylo provedeno na jejich vodných výluzích, prostřednictvím alternativních a standardních testů ekotoxicity, které zahrnovaly jak testy na vodních bezobratlých, tak i testy fytoxicity na okřehku menším (*Lemna minor*) a na hořčici bílé (*Sinapis alba*). Pro lepší porovnání a zhodnocení výsledků byly veškeré naměřené údaje graficky znázorněny. V *grafech 1 a 2* jsou znázorněny výsledky testování všech vzorků; v *grafu 1* jsou uvedeny výsledky testů fytoxicity, v *grafu 2* jsou uvedeny výsledky testů na vodních bezobratlých. Z grafického znázornění byly vyjmuty výsledky testu Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>, protože výsledkem tohoto testu není určení hodnot LC(EC, IC)50.

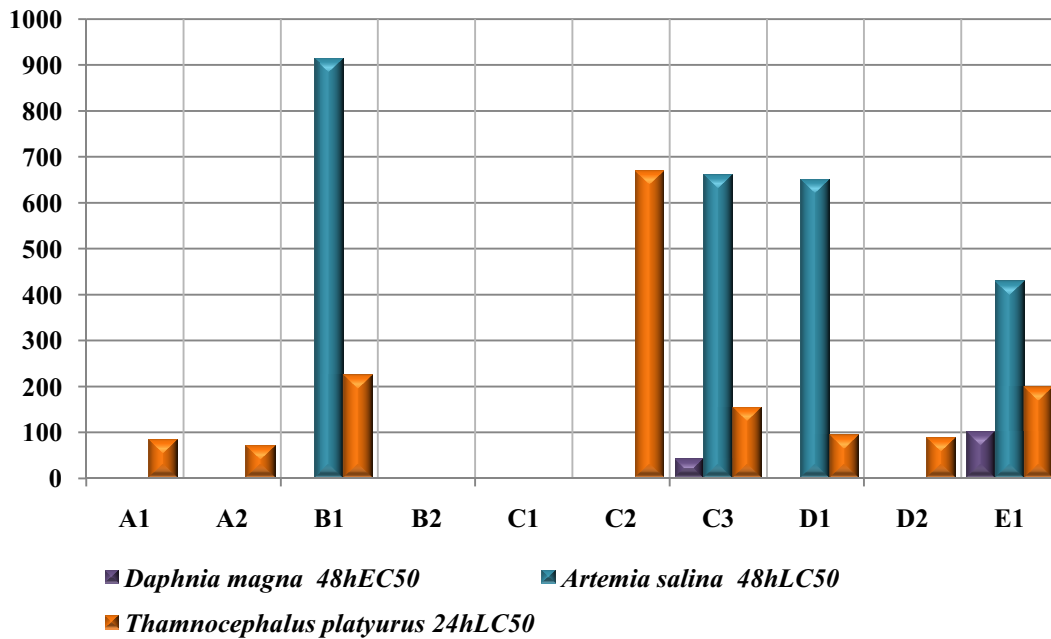
Testování na organismu *Thamnocephalus platyurus* pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> bylo provedeno na všech výluzích, které byly naředěny na jednotnou koncentraci 10 ml/l. Testováním bylo zjištěno, že nejvyšší toxický účinek na organismus *Thamnocephalus platyurus* prokázaly vzorky A2 a D1, pro něž činila inhibice příjmu potravou v obou případech I = 41,6 %, dále následovaly vzorky A1, C3 a D2 s hodnotou I = 31,8 %. Výsledky výše zmíněných vzorků navíc překročily limitní hodnotu 30 % a můžeme je považovat pro organismus *Thamnocephalus platyurus* za toxické. Vzorky B1, E1, C2, C1 i B2 prokázaly také inhibiční účinky, avšak limitní hodnotu nepřekročily, tudíž neprokázaly toxické účinky. Nejnižší hodnota inhibice příjmu potravou byla naměřena u vzorku B2 a měla hodnotu 4,5 %.

Porovnáme-li výsledky stanovené testovací sadou Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, lze konstatovat, že výsledky získané pomocí obou testů navzájem korespondují. Toto tvrzení potvrzuje skutečnost, že letální koncentrace získaná testovací sadou Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> 24hLC50 pro vzorek A2 měla hodnotu 70,8922 ml/l a pro vzorek D1 24hLC50 = 93,7461 ml/l, naopak pro vzorky B2 a C1 nebylo možno hodnotu 24hLC50 stanovit. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> tedy můžeme považovat za test sloužící k prvnímu varování, že testovaný vzorek vykazuje ekotoxické účinky.



Graf 1. Souhrn výsledků - fytotesty

### Souhrn výsledků - organismy



Graf 2 Souhrn výsledků - organismy

Z výsledků znázorněných v grafech 1 a 2 je možno provést následující konstatování:

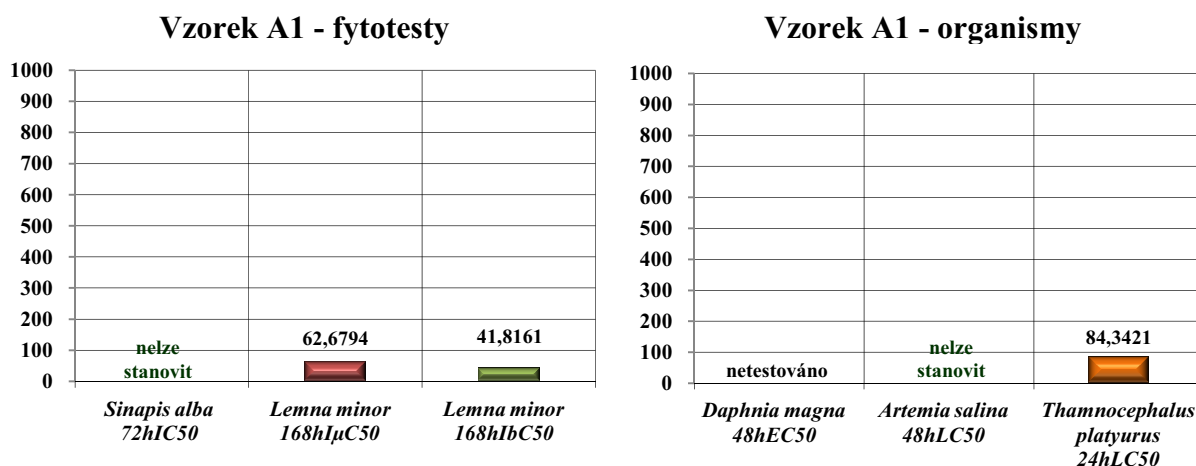
- vodný výluh žádného vzorku neprokázal na semenech **hořčice bílé (*Sinapis alba*)** toxický účinek větší než 50 %, tudíž nemohla být u žádného vzorku určena hodnota inhibiční koncentrace 72hIC50 a vzorky tedy, podle vyhlášky č. 376/2001 Sb., nevykazují nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická. Vzhledem k tomu, že ověřovací testy nepotvrdily inhibici, resp. stimulaci větší než 30 %, lze všechny vzorky, v souladu s vyhláškou č. 294/2005 Sb., použít k rekultivacím na povrchu terénu.
- testování na organismu **hrotnatka velká (*Daphnia magna*)** bylo z důvodu nedostatečného množství testovacích organismů provedeno pouze u vodných výluhů vzorků B2, C1, C3 a E1. Vodné výluhy vzorků B2 a C1 neprokázaly během testování na daném organismu toxické účinky větší než 50 %, tudíž pro ně nemohla být stanovena hodnota 48hEC50 a v porovnání s limitní hodnotou stanovenou ve vyhlášce č. 376/2001 Sb. nevykazují tyto vzorky nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická. Podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. nevykázaly neředitelné výluhy těchto vzorků na organismu *Daphnia magna* imobilizaci větší než 30 % a lze je využít k rekultivacím na povrchu terénu. Naopak vzorky C3 i E1 prokázaly toxické účinky, avšak hodnoty efektivní koncentrace, tj. 48hEC50 = 41,9459 ml/l pro vzorek C3, ani 48hEC50 = 101,3363 ml/l pro vzorek E1, nevykazují ve srovnání s limitní hodnotou 48hEC50 ≤ 10 ml/l vyhlášky č. 376/2001 Sb. nebezpečnou vlastnost H 14 Ekotoxická. V porovnání s vyhláškou č. 294/2005 Sb. však jejich neředitelné vodné výluhy překračují povolenou hodnotu 30% imobilizace, tudíž je není možno využívat k rekultivacím na povrchu terénu. Na základě těchto skutečností lze konstatovat, že nejvyšší toxický účinek na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) vykazoval vzorek C3, nižší toxický účinek prokázal vzorek E1.
- testování na organismu **žábřonážka slanisková (*Artemia salina*)** bylo provedeno u všech vzorků, přičemž vzorky A1, A2, B2, C1, C2 a D2 nevykázaly toxické účinky, tudíž pro ně nemohla být stanovena hodnota 48hLC50. Vzorky B1, C3, D1 a E1 toxické účinky vykazovaly, a proto pro ně byla stanovena hodnota 48hLC50. Nejnižší koncentraci, při které došlo k mortalitě 50 % organismů, vykázal vzorek E1, a to

48hLC50 = 429,0607 ml/l. Naopak nejvyšší hodnota letální koncentrace byla u vzorku B1 a to 48hLC50 = 914,6314 ml/l. Lze tedy zkonstatovat, že nejvyšší toxický účinek na organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) prokázal vodný výluh vzorku E1, poté následovaly dle klesajícího toxického účinku vzorky D1, C3 a B1.

- testování na **okřešku menším (*Lemna minor*)** bylo opět provedeno na všech vzorcích, přičemž výsledky byly vyhodnoceny pomocí inhibice růstu  $I_{\mu}$  a určením redukce biomasy  $I_B$ . Nejvyšší toxický účinek na okřehek menší (*Lemna minor*) projevil na vzorek A1, pro který byly stanoveny hodnoty inhibičních koncentrací 168h $I_{\mu}$ C50 = 62,6794 ml/l, resp. 168h $I_B$ C50 = 41,8161 ml/l. Naopak vzorek C1 s hodnotami inhibičních koncentrací 168h $I_{\mu}$ C50 = 960,8268 ml/l, resp. 168h $I_B$ C50 = 746,6696 ml/l se projevil jako nejméně toxický. Jednotlivé vzorky můžeme seřadit dle získaných toxických účinků na okřehek menší (*Lemna minor*) od nejvyššího toxického účinku po nejnižší následovně: A1, C3, D2, D1, A2, E1, C2, B1, B2 a C1.
- testování na organismu *Thamnocephalus platyurus* pomocí testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> bylo provedeno na všech vzorcích. Vzorky B2 a C1 neprojevily toxické účinky, tudíž pro ně nemohla být určena hodnota letální koncentrace 24hLC50. Vzorek A2 vykazoval nejvyšší toxický účinek s hodnotou letální koncentrace 24hLC50 = 70,8922 ml/l. Oproti tomu nejnižší toxicitu vykázal vzorek C2, jehož letální koncentrace dosáhla hodnoty 24hLC50 = 669,429 ml/l. Jednotlivé vzorky můžeme seřadit dle stanovených toxických účinků na organismus *Thamnocephalus platyurus* od nejvyššího toxického účinku po nejnižší následovně: A2, A1, D2, D1, C3, E1, B1 a C2.

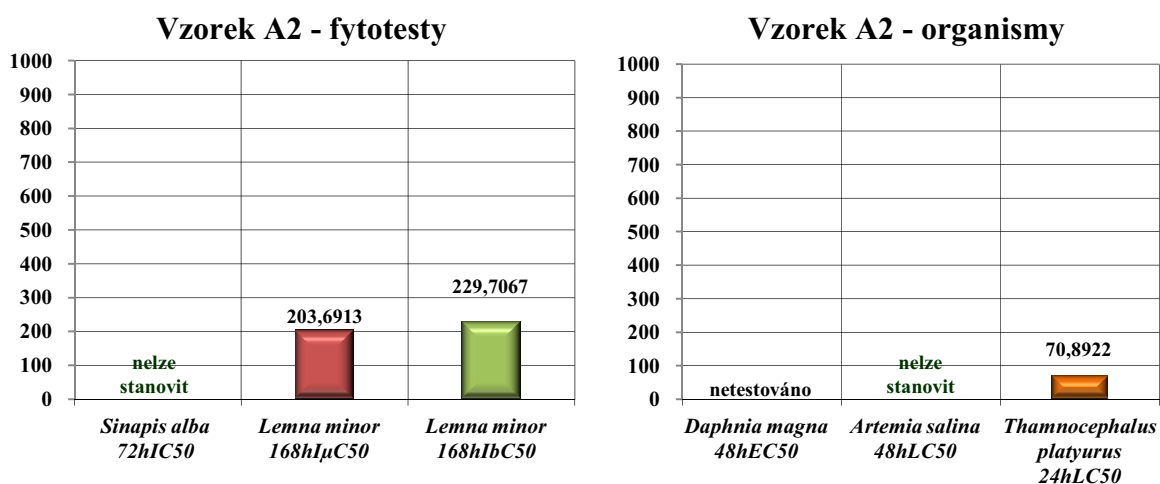
Pro lepší přehlednost jsou výsledky všech testování znázorněny pro každý vzorek zvlášť v *grafech 3 až 12* a shrnuty do Příloh 1 až 10. Vzorky, u kterých nebylo možno určit hodnoty LC(EC, IC)50, nebyly při určování pořadí vzorků z hlediska toxicity uvažovány.

**Vzorek A1** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou znázorněny v *grafu 3*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Naopak u okřešku menšího (*Lemna minor*) prokázal vzorek inhibiční účinky, přičemž byly stanoveny hodnoty inhibičních koncentrací 168h $I_{\mu}$ C50 = 62,6794 ml/l a 168h $I_B$ C50 = 41,8161 ml/l. Dle výsledků znázorněných v *grafu 1* je patrné, že tyto koncentrace byly ze všech testovaných vzorků nejnižší a vzorek A1 tak vykázal na okřešku menším (*Lemna minor*) nejvyšší toxicitu ze všech testovaných vzorků. Na organismu hroznatka velká (*Daphnia magna*) nebyl tento vzorek pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) nebylo možno stanovit hodnotu 48hLC50, protože v úvodním i v ověřovacím testu daný vzorek neprokázal toxický účinek. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota letální koncentrace 24hLC50 = 84,3421 ml/l a dle výsledků znázorněných v *grafu 2* se vzorek projevil na daném testovacím organismu jako druhý nejvíce toxický. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 31,8 %, přičemž byla překročena limitní hodnota 30% inhibice a vzorek se, společně se vzorky C3 a D2, které vykazovaly stejnou hodnotu inhibice, projevil jako druhý nejvíce toxický ze všech.



Graf 3 Souhrn výsledků pro vzorek A1

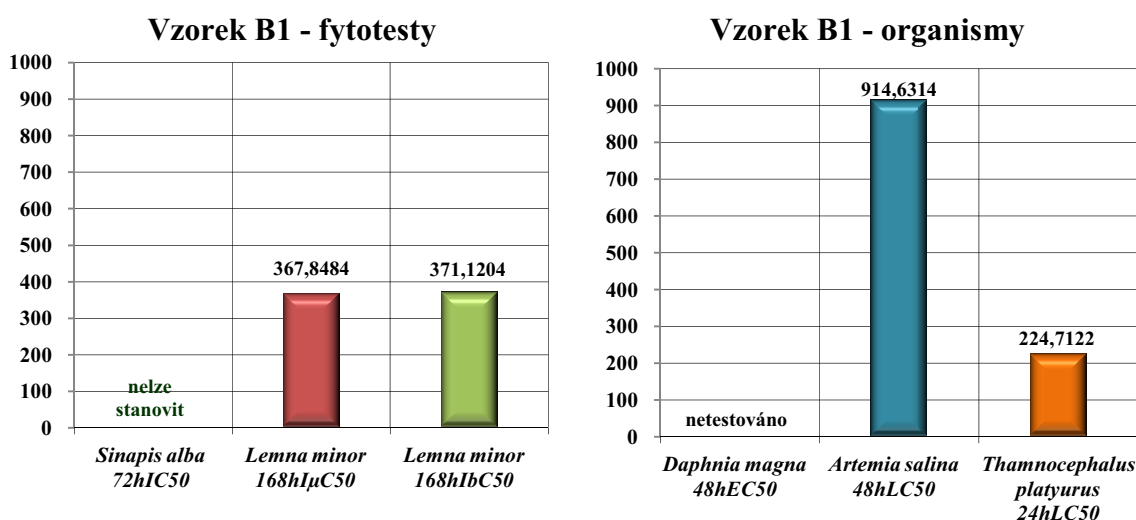
**Vzorek A2** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou znázorněny v *grafu 4*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek neprojevil v úvodním ani v ověřovacím testu stimulaci, resp. inhibici větší než 50 %. U okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky s hodnotami 168hI<sub>μ</sub>C50 = 203,6913 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 229,7067 ml/l a v porovnání s výsledky znázorněnými v *grafu 1* se vzorek projevil jako pátý nejvíce toxický. Na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) nebyl tento vzorek pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) nebylo možno stanovit hodnotu 48hLC50, protože v úvodním i v ověřovacím testu daný vzorek neprokázal toxický účinek. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota letální koncentrace 24hLC50 = 70,8922 ml/l, která byla nejnižší ze všech vzorků, a dle výsledků znázorněných v *grafu 2* vzorek projevil nejvyšší toxický účinek ze všech. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 41,6 %, která překročila limitní hodnotu 30% inhibice a vzorek se projevil, společně se vzorkem D1, který vykázal stejnou hodnotu inhibice, jako nejvíce toxický ze všech testovaných vzorků.



Graf 4 Souhrn výsledků pro vzorek A2

**Vzorek B1** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou znázorněny v *grafu 5*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*)

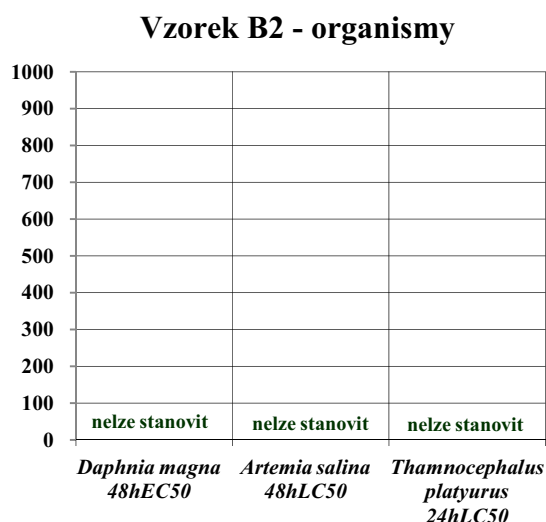
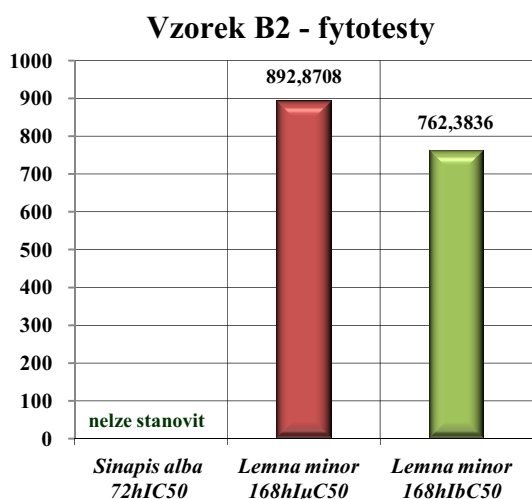
nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC<sub>50</sub>, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Naopak u okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C<sub>50</sub> = 367,8484 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C<sub>50</sub> = 371,1204 ml/l. V porovnání s výsledky znázorněnými v *grafu 1* se vzorek projevil jako osmý nejméně toxický. Na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) nebyl tento vzorek pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) byla stanovena hodnota 48hLC<sub>50</sub> = 914,6314 ml/l, která byla u nejvyšší ze všech vzorků a dle výsledků uvedených v *grafu 2* prokázal vzorek B1 nejnižší toxický účinek ze všech. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC<sub>50</sub> = 224,7122 ml/l a vzorek projevil, v porovnání s výsledky znázorněnými v *grafu 2* sedmý nejnižší toxický účinek ze všech vzorků. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 25,6 %, přičemž nedošlo k překročení limitní hodnoty 30% inhibice a vzorek se neprojevil, společně se vzorkem E1, který vykázal shodnou inhibici, jako toxický.



Graf 5 Souhrn výsledků pro vzorek B1

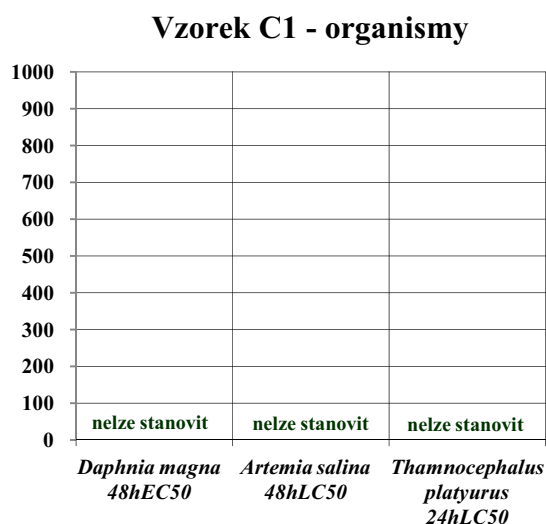
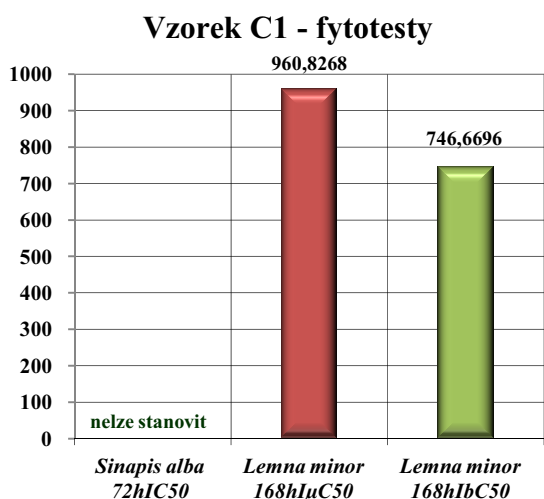
**Vzorek B2** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a třemi testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou znázorněny v *grafu 6*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC<sub>50</sub>, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Naopak u okřehku menšího (*Lemna minor*) vykázal vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C<sub>50</sub> = 892,8708 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C<sub>50</sub> = 762,3836 ml/l. V porovnání s výsledky uvedenými v *grafu 1* se vzorek projevil jako devátý nejméně toxický. U všech dalších testovacích organismů, tj. u organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*), žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) a *Thamnocephalus platyurus* při testování pomocí testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, nebylo možno stanovit hodnoty 48hEC<sub>50</sub>, 24hLC<sub>50</sub> a 48hLC<sub>50</sub>, neboť vzorek neprokázal v úvodních ani v ověřovacích testech toxický účinek. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 4,5 % a nebyla překročena limitní hodnota 30% inhibice. Vzorek B2 se tak projevil jako nejméně toxický ze všech vzorků.





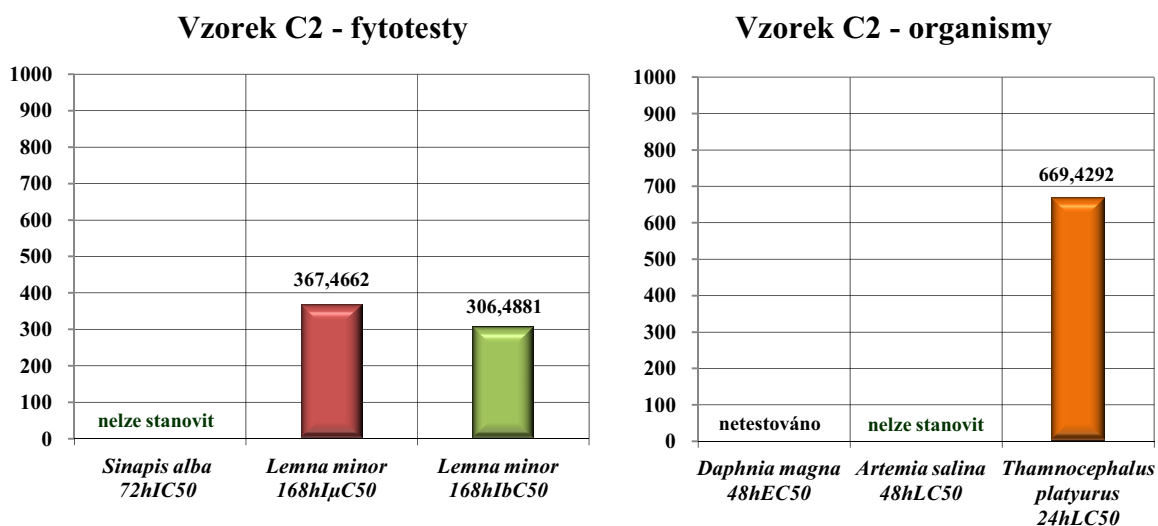
Graf 6 Souhrn výsledků pro vzorek B2

**Vzorek C1** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a třemi testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou znázorněny v *grafu 7*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Opačný efekt vykázal okřehek menší (*Lemna minor*), který inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI $\mu$ C50 = 960,8268 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 746,6696 ml/l. Dle výsledků znázorněných v *grafu 1* se vzorek projevil jako nejméně toxický ze všech vzorků. U všech dalších testovacích organismů, tj. u organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*), žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) a *Thamnocephalus platyurus* při testování pomocí testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, nebylo možno stanovit hodnoty 48hEC50, 24hLC50 a 48hLC50, neboť vzorek neprokázal v úvodních ani v ověřovacích testech toxický účinek. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 6,7 %, přičemž nebyla překročena limitní hodnota 30% inhibice a vzorek C1 se projevil jako druhý nejméně toxický.



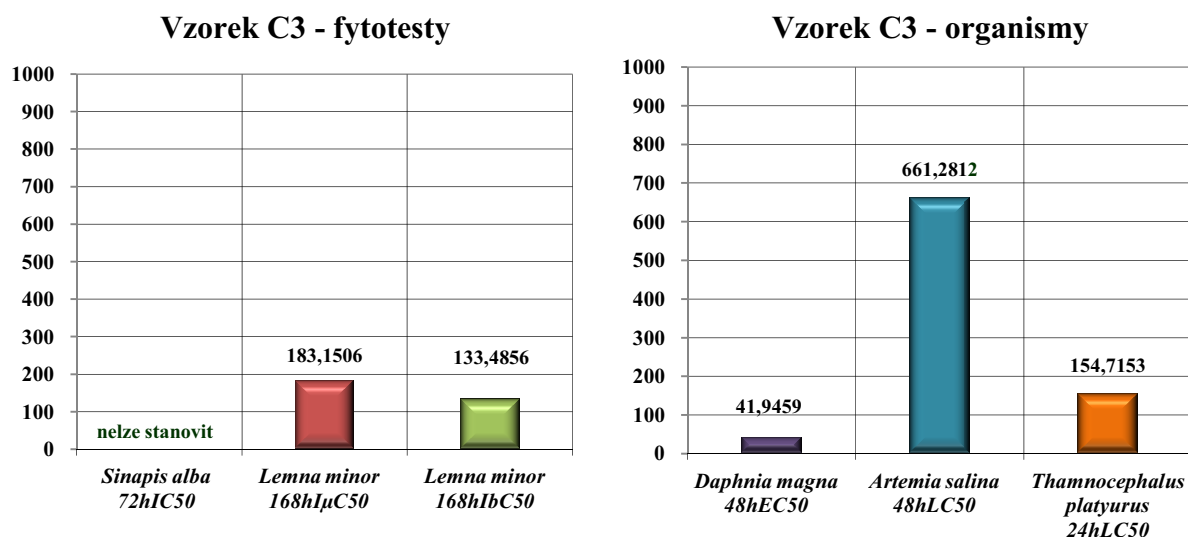
Graf 7 Souhrn výsledků pro vzorek C1

**Vzorek C2** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou shrnuty v *grafu 8*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Oproti tomu u okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C50 = 367,4662 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 306,4881 ml/l, přičemž se vzorek, v porovnání s výsledky uvedenými v *grafu 1*, projevil jako sedmý nejméně toxický. Na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) vzorek nebyl pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) nebylo možno stanovit hodnotu 48hLC50, protože v úvodním i v ověřovacím testu daný vzorek neprokázal toxický účinek. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC50 = 669,4292 ml/l, která byla nejvyšší ze všech vzorků, a vzorek v porovnání s výsledky uvedenými v *grafu 2*, projevil nejnižší toxický účinek. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 19,4 %, došlo k překročení limitní hodnoty 30% inhibice a vzorek neprojevil toxický účinek.



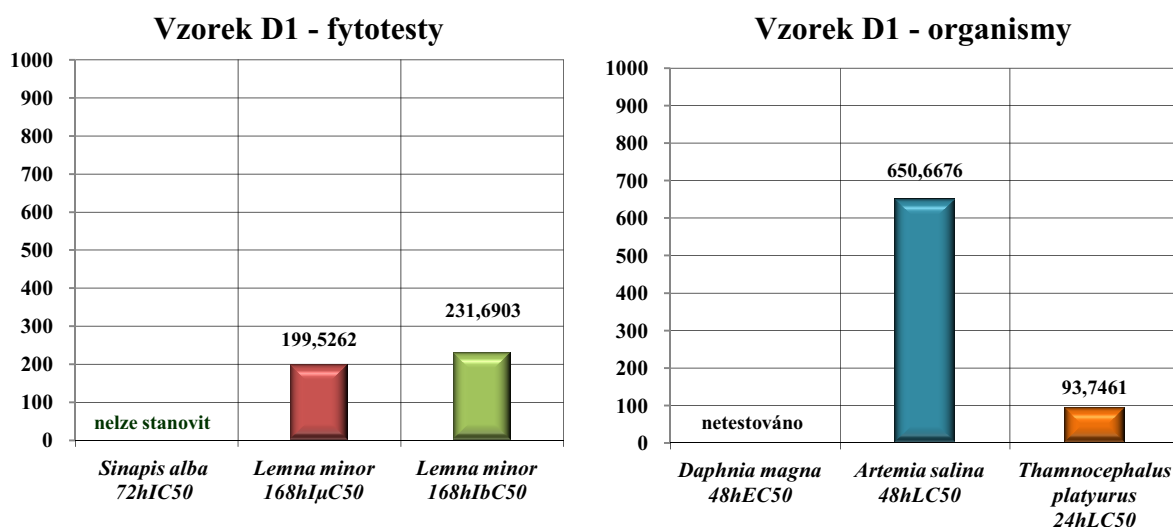
*Graf 8* Souhrn výsledků pro vzorek C2

**Vzorek C3** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a třemi testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou shrnuty v *grafu 9*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek projevil v úvodním i v ověřovacím testu stimulační účinky. Naopak u okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C50 = 183,1506 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 133,4856 ml/l. Znázorněním těchto hodnot v *grafu 1*, bylo zjištěno, že se vzorek projevil jako druhý nejméně toxický. U organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) byla stanovena hodnota 48hEC50 = 41,9459 ml/l, která byla nejnižší ze všech vzorků, a na základě výsledků uvedených v *grafu 2* se vzorek projevil jako nejméně toxický a nelze jej využít k rekultivacím na povrchu terénu. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) byla stanovena hodnota 48hLC50 = 661,2812 ml/l a vzorek v porovnání s výsledky znázorněných v *grafu 2* projevil třetí nejnižší toxický účinek. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC50 = 154,7153 ml/l a podle výsledků uvedených v *grafu 2* vzorek se projevil jako pátý nejméně toxický. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 31,8 % a byla překročena limitní hodnota 30% inhibice. Vzorek se tak projevil, společně se vzorky A1 a D2, které vykazaly stejnou hodnotu inhibice, jako druhý nejméně toxický ze všech.



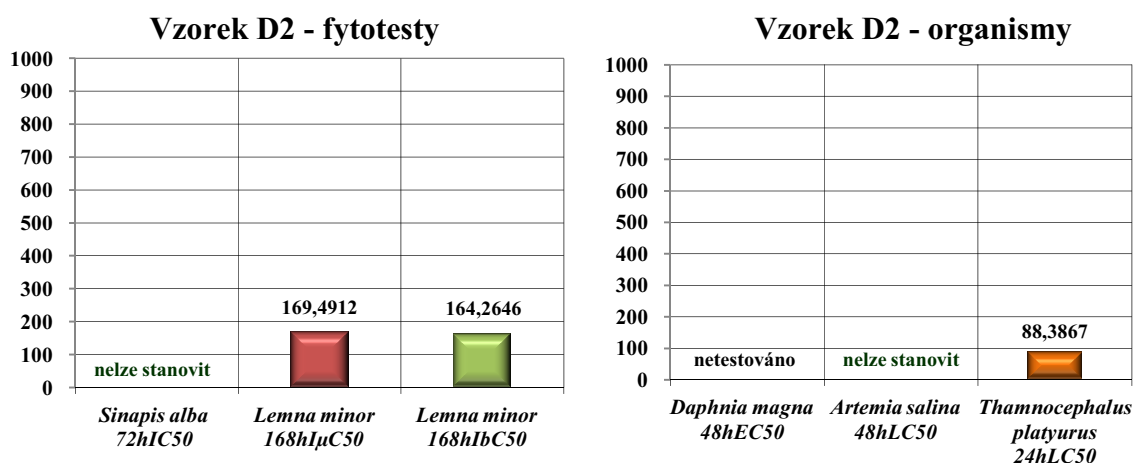
Graf 9 Souhrn výsledků pro vzorek C3

**Vzorek D1** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou shrnuty v *grafu 10*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek neprojevil v úvodním ani v ověřovacím testu inhibici, resp. stimulaci vyšší než 50 %. U okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C50 = 199,5262 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 231,6903 ml/l. Na základě grafického znázornění těchto hodnot v *grafu 1* lze konstatovat, že se vzorek D1 projevil jako čtvrtý nejvíce toxický. Na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) nebyl vzorek pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) byla stanovena hodnota letální koncentrace 48hLC50 = 650,6676 ml/l a v porovnání s výsledky uvedenými v *grafu 2* se vzorek projevil jako druhý nejvíce toxický. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC50 = 93,7461 ml/l a vzorek se projevil dle výsledků uvedených v *grafu 2* jako čtvrtý nejvíce toxický. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 41,6 %, byla překročena limitní hodnota 30% inhibice a vzorek vykázal, společně se vzorkem A2, u něhož byla stanovena stejná hodnota, nejvyšší toxický účinek ze všech testovaných vzorků.



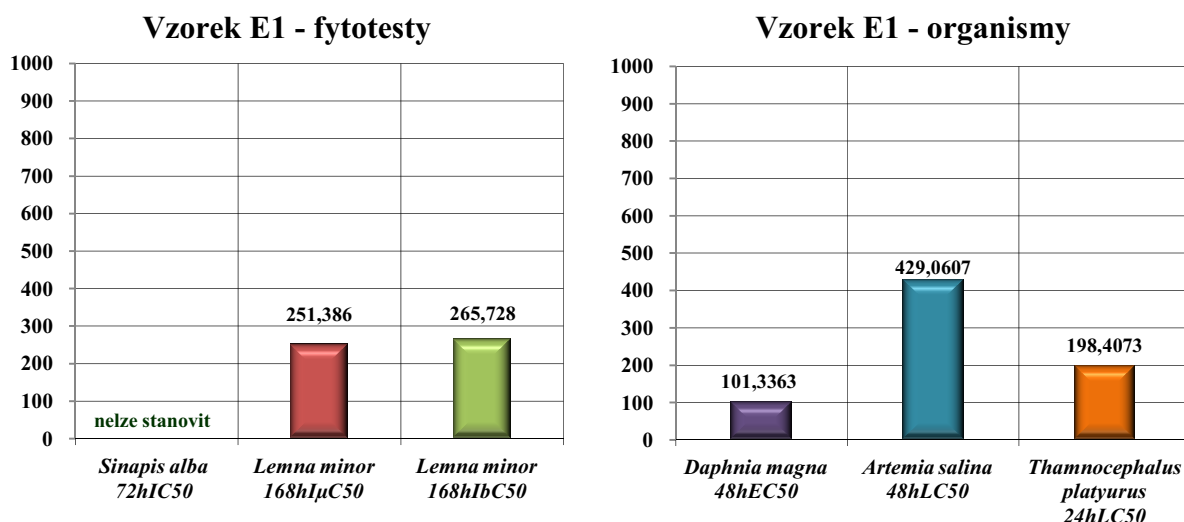
Graf 10 Souhrn výsledků pro vzorek D1

**Vzorek D2** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a dvěma testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou shrnuty v *grafu 11*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek neprojevil v úvodním ani v ověřovacím testu inhibici, resp. stimulaci větší než 50 %. U okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C50 = 169,4912 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 164,2646 ml/l a dle výsledků znázorněných v *grafu 1* se vzorek projevil jako třetí nejvíce toxický. Na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) nebyl tento vzorek pro nedostatek testovacích organismů testován. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) nebylo možno stanovit hodnotu 48hLC50, protože v úvodním i v ověřovacím testu daný vzorek neprokázal toxický účinek. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC50 = 88,3867 ml/l a vzorek se, v porovnání s výsledky uvedenými v *grafu 2*, projevil jako třetí nejvíce toxický. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 31,8 %, přičemž byla překročena limitní hodnota 30% inhibice a vzorek se projevil, společně se vzorkem A1 a C3, které vykazaly shodné hodnoty inhibice, jako nejvíce toxický ze všech testovaných vzorků.



Graf 11 Souhrn výsledků pro vzorek D2

**Vzorek E1** byl testován prostřednictvím dvou testů fytotoxicity a třemi testy na vodních bezobratlých. Výsledky testování jsou shrnuty v *grafu 12*. U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možno stanovit hodnotu 72hIC50, neboť vzorek neprojevil v úvodním ani v ověřovacím testu, inhibici resp. stimulaci větší než 50 %. U okřehku menšího (*Lemna minor*) projevil vzorek inhibiční účinky a byly stanoveny hodnoty 168hI<sub>μ</sub>C50 = 251,3860 ml/l a 168hI<sub>b</sub>C50 = 265,7280 ml/l, přičemž se vzorek, na základě výsledků znázorněných v *grafu 1* projevil jako šestý nejméně toxický. U organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) byla stanovena hodnota 48hEC50 = 101,3363 ml/l, která byla nejvyšší ze všech vzorků. V návaznosti na výsledky uvedené v *grafu 2* se vzorek projevil jako nejméně toxický, nicméně jej nelze využít k rekultivacím na povrchu terénu. U organismu žábřonožka slanisková (*Artemia salina*) byla stanovena hodnota 48hLC50 = 429,0607 ml/l, která byla nejnižší ze všech vzorků, a vzorek E1 se podle výsledků uvedených v *grafu 2*, projevil jako nejvíce toxický ze všech vzorků. U organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena hodnota 24hLC50 = 198,4073 ml/l a vzorek prokázal, dle grafického znázornění v *grafu 2*, šestý nejnižší toxický účinek. Při testování pomocí testovací sady Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> byla stanovena inhibice příjmu potravy I = 25,6 %, přičemž nebyla překročena limitní hodnota 30% inhibice a vzorek se, společně se vzorkem B1, pro který byla stanovena stejná hodnota inhibice, neprojevil jako toxický.



Graf 12 Souhrn výsledků pro vzorek E1

Na základě výše uvedených výsledků testů ekotoxicity lze sestavit pořadí testovaných vzorků podle prokázaných toxických účinků od nejvíce toxického vzorku po nejméně toxický. Pořadí vzorků bylo stanoveno zvlášť na základě výsledků testů fytotoxicity a zvlášť na základě testů na vodních bezobratlých.

Podle výsledků fytotestů znázorněných v *grafu 1* lze vodné výluhy jednotlivých vzorků seřadit následovně:

- A1 - ložový popel vzniklý spálením hnědého uhlí a biomasy ve fluidním kotli,
- C3 - produkt z odsíření vzniklý při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- D2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého a černého uhlí s biomasou ve fluidním kotli,
- D1 - ložový popel vzniklý spálením hnědého a černého uhlí s biomasou ve fluidním kotli,
- A2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy ve fluidním kotli,
- E1 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením balíkové slámy v roštovém kotli,
- C2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- B1 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením černého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- B2 - hydrosměs popílku a škváry vzniklá spálením černého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- C1 - škvára vzniklá spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli.

Z výsledků testů na vodních bezobratlých znázorněných v *grafu 2* lze sestavit obdobnou řadu, bylo přihlédnuto především k výsledkům testování na organismu *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>. Tento organismus se projevil vůči vodným výluhům vedlejších energetických produktů jako velmi citlivý a byl použitý při testování vodných výluhů všech vzorků. Sestavená řada na základě výsledků testů na vodních bezobratlých je tedy následující:

- A2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy ve fluidním kotli,
- A1 - ložový popel vzniklý spálením hnědého uhlí a biomasy ve fluidním kotli,
- D2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého a černého uhlí s biomasou ve fluidním kotli,
- D1 - ložový popel vzniklý spálením hnědého a černého uhlí s biomasou ve fluidním kotli,
- C3 - produkt z odsíření vzniklý při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- E1 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením balíkové slámy v roštovém kotli,
- B1 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením černého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- C2 - úletový popílek zachycený při čištění spalin, které vznikly spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- B2 - hydrosměs popílku a škváry vzniklá spálením černého uhlí a biomasy v granulačním kotli,
- C1 - škvára vzniklá spálením hnědého uhlí a biomasy v granulačním kotli.

## 7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce hodnotila ekotoxikologický vliv vodných výluhů vedlejších energetických produktů na vodní organismy a zástupce vyšších rostlin.

K testování byly, v návaznosti na platnou legislativu, tj. vyhlášku č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a vyhlášku č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu, zvoleny testy na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*) a organismus hrotnatka velká (*Daphnia magna*). Tyto testy byly dále doplněny nejen alternativními, komerčně prodáványými mikrobiotesty Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> a Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> s testovacím organismem *Thamnocephalus platyurus*, ale i testy na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*) a na okřehek menším (*Lemna minor*), přičemž okřehek menší byl zvolen z toho důvodu, že testování na této rostlině je standardizováno nejen normou ČSN EN ISO 20079, ale i postupem organizace OECD. Lze tedy očekávat, že bude ekotoxikologické testování na tomto organismu v budoucnu začleněno i do české, popř. evropské legislativy.

Výsledky testování lze zhodnotit jako velmi příznivé, neboť nebezpečná vlastnost H 14 Ekotoxicita dle vyhlášky č. 376/2001 Sb. nebyla prokázána ani u jednoho vzorku. Pouze u vzorků C3 a E1 byl prokázán, v porovnání s vyhláškou č. 294/2005 Sb., toxický účinek na organismu hrotnatka velká (*Daphnia magna*) a tyto vzorky nelze využít k rekultivacím na povrchu terénu. Všechny ostatní vzorky lze k povrchovým rekultivacím využít.

Porovnáním citlivosti testovacích organismů v testech ekotoxicity, lze konstatovat, že hořčice bílá (*Sinapis alba*) vykazovala mnohem menší citlivost vůči testovaným vodným výluhům vedlejších energetických produktů než okřehek menší (*Lemna minor*). U hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebylo možné stanovit hodnotu 72hIC<sub>50</sub> ani u jednoho vzorku, oproti tomu na okřehek menší (*Lemna minor*) působily inhibičně výluhy všech vzorků a byly pro ně stanoveny hodnoty 168hI<sub>a</sub>C<sub>50</sub> a 168hI<sub>b</sub>C<sub>50</sub>.

Při porovnání citlivosti vodních bezobratlých lze vyvodit závěr, že nejméně citlivým organismem vůči vodným výluhům vedlejších energetických produktů, je žábřonožka slanisková (*Artemia salina*). Stanovení letální koncentrace 48hLC<sub>50</sub> bylo možno provést jen u vzorků B1, C3, D1 a E1, přičemž však tyto hodnoty nebyly nižší než 400 ml/l. Velkou citlivost projevíly organismy *Thamnocephalus platyurus* při použití testovací sady Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> a hrotnatka velká (*Daphnia magna*). Všechny vzorky, kromě vzorků B2 a C1, působily na oba organismy toxicky, avšak výsledné hodnoty 24hLC<sub>50</sub>, resp. 48hEC<sub>50</sub> neklesly u žádného vzorku pod hodnotu 10 ml/l.

Z výsledků získaných výsledky prostřednictvím fytotestů i testů na vodních bezobratlých lze říci, že výsledky testů spolu navzájem korespondují. U vzorků B2, C1 a C3 byla shoda pořadí vzorků sestavená na základě stanovených hodnot LC(EC, IC)<sub>50</sub> obou testů absolutní, u vzorků A2, B1 a C2 byly odchylky minimální, naopak u ostatních vzorků nebyla shoda pořadí potvrzena.

Na základě výsledků testování lze zkonstatovat, že vedlejší energetické produkty, vznikající při spalování v granulačních kotlích, resp. při následném čištění spalin, které neobsahují sloučeniny vápna, tj. vzorky B1, B2, C1 a C2, nevykazují negativní vliv na životní prostředí. Součástí spalování v granulačních kotlích není dávkování vápence do spalovací komory a proces odsiřování spalin je většinou realizován dodatečným odsiřovacím zařízením umístěným až za elektrostatickými odlučovači. Nepřítomnost sloučenin vápna v těchto vzorcích byla potvrzena i naměřenými hodnotami pH a konduktivity, které byly nejnižší ze všech vzorků. Vzorek E1, který vzniká pouze při spalování balíkové slámy, projevil vyšší negativní vliv na životní prostředí než předešlé vzorky, ale i přesto lze spalování biomasy považovat za vhodnou náhradu, popř. alternativu ke spalování fosilních paliv. Oproti tomu největší negativní vliv na životní prostředí prokázaly vzorky, u kterých je přítomnost

vápna dána technologií spalování a následným čištěním spalin. Jedná se o vzorky vznikající při spalování ve fluidních kotlích s dávkováním vápence přímo do spalovací komory, tj. o vzorky A1, A2, D1 a D2, a o vzorek C3, který vzniká při odsiřování spalin vzniklých spalováním v granulačním kotli dávkováním vápenné suspenze do proudu spalin v odsiřovacím zařízení.



## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 *Toxiology* [online]. 2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupné z www: <http://en.wikipedia.org/wiki/Toxicology>.
- 2 PATOČKA, J.: Úvod do obecné toxikologie [online]. [cit. 2009-01-20]. Dostupné z www: [http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/radio/informace-pro-studenty/ucebni\\_texty/obec\\_toxi/obecna\\_toxikologie\\_i.htm/](http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/radio/informace-pro-studenty/ucebni_texty/obec_toxi/obecna_toxikologie_i.htm/).
- 3 *Toxikology* [online]. 2009 [cit. 2009-04-15]. Dostupné z www: <http://www.thefreedictionary.com/toxicology>.
- 4 Kočí, V: Ekotoxikologie - nauka o účincích toxických látek na životní prostředí. *Sborník přednášek podzimní školy Astra* [online]. Praha 2003 [cit. 2009-01-19]. Dostupné z www: <http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2003.pdf>.
- 5 *Environmental toxicology* [online]. 2009 [cit. 2009-04-19]. Dostupné z www: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=34092>.
- 6 *Ecotoxicology* [online]. 2009 [cit. 2009-04-21]. Dostupné z www: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ecotoxicology>.
- 7 ŘÍHOVÁ - AMBROŽOVÁ, J. *Biologické testy toxicity. Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-01-21]. Dostupné z www: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=B023](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B023).
- 8 *Bioassay* [online]. 2009 [cit. 2009-04-23]. Dostupné z www: <http://wordnetweb.princeton.edu/perl/webwn?s=bioassay>.
- 9 PALEČEK, J., LINHART I., HORÁK, J. *Toxikologie a bezpečnost práce v chemii*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1996. 189 s. ISBN 80-7080-266-9.
- 10 BALOG, K., ZAPLETALOVÁ - BARTLOVÁ, I. *Základy toxikologie*. Edice SPBI Spektrum č. 15. 1. vyd. SPBI. VŠB-TU Ostrava. 1998. 107 s. ISBN 80-86111-29-6.
- 11 HODGSON, E., *A textbook of Modern Toxikology*, 3rd. edition, John Wiley & Sons, New Jersey 2004, 557 p., ISBN 9780471265085.
- 12 ČABALA, R. *Ekotoxikologie: Hranice mezi ekologií a toxikologií?* [online]. 2007 [cit. 2009-03-19]. Dostupné z www: <http://www.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/20070806NH1.pdf>.
- 13 Vyhláška Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zemědělství č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.
- 14 Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu.
- 15 Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ZP 28/2008 k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů.
- 16 ČSN EN 12457-4: Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním). Praha: Český normalizační institut, červenec 2003. 32 s.
- 17 Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ZP 11/2007 ke stanovení ekotoxicity odpadů.
- 18 AMBROŽOVÁ, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd., VŠCHT Praha, Praha 2003, 198 s., ISBN 80-70808-521-8.

- 19 Test akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*. [online]. [cit. 2009-03-25]. Dostupné z www: [http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni\\_materialy/Ekotox-Labo/CZverze/05\\_Daphnia.pdf](http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/CZverze/05_Daphnia.pdf).
- 20 OECD Guideline for Testing of chemicals, No. 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test. [online]. 1984 [cit. 2009-04-05]. Dostupné z www: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/21/1948249.pdf>.
- 21 ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. Praha: Český normalizační institut, prosinec 1997. 16 s.
- 22 *Daphnia magna* [online]. [cit. 2009-04-03]. Dostupné z www: <http://www.bioweb.dk/figurer/magna.gif>.
- 23 *Daphnia magna* [online]. [cit. 2009-04-23]. Dostupné z www: [http://cfb.unh.edu/CFBkey/html/Organisms/CCLadocera/FDaphnidae/GDaphnia/Daphnia\\_magna/daphniamagna.html](http://cfb.unh.edu/CFBkey/html/Organisms/CCLadocera/FDaphnidae/GDaphnia/Daphnia_magna/daphniamagna.html).
- 24 *Daphnia magna* [online]. [cit. 2009-04-23]. Dostupné z www: <http://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia>.
- 25 LATIMER, J.: Galleries – Fieldguides – Freshwater life. [online]. [cit. 2009-03-29]. Dostupné z www: [http://www.jonathanlatimer.com/freshwater\\_life.htm](http://www.jonathanlatimer.com/freshwater_life.htm).
- 26 ČSN EN ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*) – část 2: Obnovovací metoda. Praha: Český normalizační institut, únor 1999. 16 s.
- 27 *Brachydanio rerio*. [online]. [cit. 2009-04-07]. Dostupné z www: <http://parisaramahiti.kar.nic.in/fish/imagefm/12.gif>.
- 28 *Poecilia reticulata*. [online]. [cit. 2009-04-07]. Dostupné z www: <http://www.dkimages.com/discover/previews/857/20201098.JPG>.
- 29 *Desmodesmus subspicatus*. [online]. [cit. 2009-04-07]. Dostupné z www: [http://www.butbn.cas.cz/ccala/col\\_images/688.jpg](http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/688.jpg).
- 30 *Pseudokirchneriella subcapitata*. [online]. [cit. 2009-04-07]. Dostupné z www: <http://www.kbfi.ee/upl/pildid/ecotox/selenastrum.jpg>.
- 31 KOČÍ, V., RAKOVNICKÝ, T., ŠVAGR, A.. *Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba* [online]. VŠCHT Praha, 2001 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm>.
- 32 *Sinapis alba* [online]. [cit. 2009-02-23]. Dostupné z www: [http://en.wikipedia.org/wiki/White\\_Mustard](http://en.wikipedia.org/wiki/White_Mustard).
- 33 *Sinapis alba* [online]. [cit. 2009-02-23]. Dostupné z www: [http://www.marz-kreations.com/WildPlants/CRUC/Pics/SNPAL/SNPAL-Sinapis\\_alba\\_t.jpg](http://www.marz-kreations.com/WildPlants/CRUC/Pics/SNPAL/SNPAL-Sinapis_alba_t.jpg).
- 34 ŠVAGR, A., JIRKŮ, J.. *Test při semichronické expozici vůči okřešku menšímu (Lemna minor)* [online]. VŠCHT v Praze, 2003 [cit. 2009-03-26]. Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Okrehek.htm>.
- 35 OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, No. 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. July 2002 [online] Dostupné z www: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/21/1948054.pdf>.
- 36 ČSN EN ISO 20079 Jakost vod – stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřešku. Praha: Český normalizační institut, květen 2007. 16 s.

- 37 *Lemna minor*. [online]. [cit. 2009-04-18]. Dostupné z www: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Lemna\\_minor.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Lemna_minor.jpg).
- 38 *Lemna minor*. [online]. [cit. 2009-04-18]. Dostupné z www: <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/4473.jpg>.
- 39 Technical Methods Section, A 2-3 Day Plant Test for Toxicity – Measuring the Mean Root Growth of Onions[online]. [cit. 2009-04-21]. Dostupné z www: <http://archive.idrc.ca/aquatox/fr/resources/allium.html>.
- 40 *Brine shrimp* [online]. [cit. 2009-04-23]. Dostupné z www: [http://en.wikipedia.org/wiki/Brine\\_shrimp](http://en.wikipedia.org/wiki/Brine_shrimp).
- 41 Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*. [online]. [cit. 2009-04-21]. Dostupné z www: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Artemia.htm>.
- 42 Žábřonožka solná. [online]. [cit. 2009-04-21]. Dostupné z www: [http://rybicky.net/atlasostatnich/zabronozka\\_solna](http://rybicky.net/atlasostatnich/zabronozka_solna).
- 43 *Artemia salina*. [online]. [cit. 2009-04-21]. Dostupné z www: <http://www.wfu.edu/biology/faculty/brownera/artemia.jpg>.
- 44 *Toxkit microbiotests* [online]. 2006 [cit. 2009-03-16]. Dostupné z www: <http://www.microbiotests.be>.
- 45 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> – Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard Operational Procedure. 2009. 28 p.
- 46 *Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>. Microbiotests*. [online]. [cit. 2009-04-12]. Dostupné z www: <http://www.microbiotests.be/toxkits/thamnotoxkitf.pdf>.
- 47 Daphtoxkit F<sup>TM</sup> Magna – Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard Operational procedure, 27 p.
- 48 Rotoxkit F<sup>TM</sup> – 24h Acute and 48h ShortChronic Microbiotests For Toxicity Screening of Pure Compunds – Effluents – Sediments – Surface and Ground Waters – Wastewaters. Standard Operational Procedure, 27 p.
- 49 Algatoxkit F<sup>TM</sup> – Freshwater Toxicity Test with Microalgae. Bench protocol [online]. 2006 [cit. 2009-03-17]. Dostupné z www: <http://microbiotests.be/toxkits/AlgatoxkitFstp.pdf>.
- 50 Rapidtoxkit F<sup>TM</sup> – Microbiotest for Rapid Detection of Water Contamination. Standard Operational Procedure, 19 p.
- 51 KOLEKTIV AUTORŮ. *Topenářská příručka - 120 let topenářství v Čechách a na Moravě*. 1. vyd. Praha: Gas s.r.o., 2001. 2432 s. ISBN 80-96176-83-5.
- 52 Vyhláška MŽP č. 381/2001 Sb., kterou se stanoví Katalog odpadů, Seznam nebezpečných odpadů a seznam odpadů a států pro účely vývozu, dovozu a tranzitu odpadů (Katalog odpadů).
- 53 Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech.
- 54 Nařízení vlády č. 163/2002 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na vybrané stavební výrobky.
- 56 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek REACH.
- 57 Nařízení Komise (ES) č. 340/2008 o poplatcích a platbách Evropské agentury pro chemické látky.
- 58 Commission Recommendation concerning the definition of micro, small and medium-sized enterprises 2003/361/EC.
- 59 Zákon č. 86/2001 Sb. o ochraně ovzduší.

- 60 Osobní sdělení zaměstnance provozovny A, 2009.
- 61 Osobní sdělení zaměstnance provozovny B, 2009.
- 62 Osobní sdělení zaměstnance provozovny C, 2009.
- 63 Osobní sdělení zaměstnance provozovny D, 2009.
- 64 Osobní sdělení zaměstnance provozovny E, 2009.

## 9. SEZNAM ZKRATEK

|                 |  |
|-----------------|--|
| ČSN             | Česká státní norma   |
| ČSN EN          | Harmonizovaná evropská norma   |
| ISO             | <i>International Organization for Standardization</i> - Mezinárodní organizace pro normalizaci   |
| LD50            | letální dávka, při které uhynie 50 % testovacích organismů   |
| LC50            | letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovacích organismů   |
| EC50            | efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů  |
| IC50            | inhibiční koncentrace, která způsobí 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolním vzorkem   |
| NOAEL           | <i>No Observed Adverse Effect level</i> - dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek   |
| LOAEL           | <i>Lowest Observed Adverse Effect level</i> - nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek  |
| OECD            | <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> - Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (angl.)   |
| US-EPA          | <i>United States Environmental Protection Agency</i> - Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států (angl.)  |
| 24hEC50         | koncentrace testovaného výluhu, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů hrotnatka velká ( <i>Daphnia magna</i> ), resp. žábřonožka slanisková ( <i>Artemia salina</i> ) za 24 hod |
| 48hEC50         | koncentrace testovaného výluhu, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů hrotnatka velká ( <i>Daphnia magna</i> ), resp. žábřonožka slanisková ( <i>Artemia salina</i> ) za 48 hod |
| 24hLC50         | koncentrace testovaného výluhu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb, resp. testovacího organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> za 24 hod   |
| 48hLC50         | koncentrace testovaného výluhu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb, resp. testovacího organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> za 48 hod   |
| 72hIC50         | koncentrace testovaného výluhu, která způsobí inhibici růstu řas, resp. kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ) v porovnání s kontrolou za 72 hod  |
| TNV             | Technická norma vodní hospodářství Ministerstva zemědělství  |
| NO <sub>x</sub> | oxidy dusíku   |
| AFB             | atmosférický fluidní kotel se stacionární fluidní vrstvou  |
| ACFB            | atmosférický fluidní kotel s cirkulující fluidní vrstvou   |
| REACH           | Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek ( <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> )      |
| ECHA            | <i>European Chemicals Agency</i> - Evropská chemická agentura  |
| SIEF            | <i>Substance Information Exchange Fora</i> - Fórum pro vzájemnou výměnu informací  |
| FCH VUT         | Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně  |

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

|   |    |
|---|----|
| <i>Obr. 1 Příprava vodného výluhu</i>   | 13 |
| <i>Obr. 2 Schéma ekotoxikologického testování odpadů</i>  | 13 |
| <i>Obr. 3 Hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>), včetně vývojových stádií</i>                        | 15 |
| <i>Obr. 4 Danio pruhovaný (<i>Brachydanio rerio</i>)</i>  | 15 |
| <i>Obr. 5 Živorodka duhová (<i>Poecilia reticulata</i>)</i>   | 15 |
| <i>Obr. 6 Řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i></i>   | 16 |
| <i>Obr. 7 Řasa <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i></i>   | 16 |
| <i>Obr. 8 Květ hořčice bílé a její semena přichystaná k testování</i>                                 | 17 |
| <i>Obr. 9 Okřehek menší (<i>Lemna minor</i>)</i>  | 19 |
| <i>Obr. 10 <i>Allium cepa</i> - sada testovacích zkumavek</i>   | 19 |
| <i>Obr. 11 Žábřonožka slanisková (<i>Artemia salina</i>) a konzerva s jejími vajíčky</i>              | 20 |
| <i>Obr. 12 <i>Thamnocephalus platyurus</i> a testovací sada <i>Thamnotoxkit F<sup>TM</sup></i></i>    | 21 |
| <i>Obr. 13 Testovací sada <i>Daphtoxkit F<sup>TM</sup></i></i>  | 21 |
| <i>Obr. 14 <i>Brachionus calyciflorus</i> a testovací sada <i>Rotoxkit F<sup>TM</sup></i></i>         | 22 |
| <i>Obr. 15 <i>Selenastrum capricornutum</i> a sada k testování <i>Algaltoxkit F<sup>TM</sup></i></i>  | 22 |
| <i>Obr. 16 Princip testování pomocí testovací sady <i>Rapidtoxkit FTM</i></i>                         | 23 |
| <i>Obr. 17 Schéma klasického roštového kotle</i>  | 24 |
| <i>Obr. 18 Schéma atmosférického fluidního kotle AFB</i>  | 25 |
| <i>Obr. 19 Schéma atmosférického fluidního kotle ACFB</i>   | 25 |
| <i>Obr. 20 Schéma práškového granulačního kotle</i>   | 26 |
| <i>Obr. 21 Schéma zařazení vedlejších energetických produktů dle legislativy</i>                      | 28 |
| <i>Obr. 22 Testovací misky se semeny <i>Sinapis alba</i> v inkubátoru</i>                             | 34 |
| <i>Obr. 23 Vyklíčená semena <i>Sinapis alba</i> a jejich měření</i>                                   | 34 |
| <i>Obr. 24 Sada roztoků solí k přípravě ředící vody – <i>Daphtoxkit F<sup>TM</sup></i></i>            | 35 |
| <i>Obr. 25 Zkumavky s vajíčky <i>Daphnia magna</i> a zkumavky s řasou</i>                             | 35 |
| <i>Obr. 26 Kolonie okřešku menšího (<i>Lemna minor</i>) v kontrole po 168 hodinách</i>                | 37 |
| <i>Obr. 27 Cysty s organismem <i>Thamnocephalus platyurus</i></i>                                     | 38 |
| <i>Obr. 28 Základní chemikálie <i>Rapidtoxkitu F<sup>TM</sup></i> a inkubace testovacích zkumavek</i> | 39 |
| <br>  |    |
| <i>Graf 1 Souhrn výsledků - fytotesty</i>   | 60 |
| <i>Graf 2 Souhrn výsledků - organismy</i>   | 61 |
| <i>Graf 3 Souhrn výsledků pro vzorek A1</i>   | 63 |
| <i>Graf 4 Souhrn výsledků pro vzorek A2</i>   | 63 |
| <i>Graf 5 Souhrn výsledků pro vzorek B1</i>   | 64 |
| <i>Graf 6 Souhrn výsledků pro vzorek B2</i>   | 65 |
| <i>Graf 7 Souhrn výsledků pro vzorek C1</i>   | 65 |
| <i>Graf 8 Souhrn výsledků pro vzorek C2</i>   | 66 |
| <i>Graf 9 Souhrn výsledků pro vzorek C3</i>   | 67 |
| <i>Graf 10 Souhrn výsledků pro vzorek D1</i>  | 67 |
| <i>Graf 11 Souhrn výsledků pro vzorek D2</i>  | 68 |
| <i>Graf 12 Souhrn výsledků pro vzorek E1</i>  | 69 |

## 11. SEZNAM TABULEK

|         |   |    |
|---------|---|----|
| Tab. 1  | Zařazení odpadů dle vyhlášky č. 381/2001 Sb.  | 26 |
| Tab. 2  | Přehled provozoven, včetně označení vzorků  | 30 |
| Tab. 3  | Základní veličiny potřebné k přípravě 1 l vodného výluhu                                      | 40 |
| Tab. 4  | Změřené charakteristiky vodného výluhu  | 40 |
| Tab. 5  | Výsledky úvodního testu na hořčici bílé ( <i>Sinapis alba</i> )                               | 41 |
| Tab. 6  | Výsledky ověřovacího testu na hořčici bílé ( <i>Sinapis alba</i> )                            | 42 |
| Tab. 7  | Výsledky úvodního testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> )                           | 43 |
| Tab. 8  | Výsledky ověřovacího testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> )                        | 43 |
| Tab. 9  | Výsledky předběžného testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> )                        | 44 |
| Tab. 10 | Výsledky základního testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) pro vzorek C3           | 44 |
| Tab. 11 | Výsledky I. základního testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) pro vzorek E1        | 45 |
| Tab. 12 | Výsledky II. základního testu na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) pro vzorek E1       | 45 |
| Tab. 13 | Výsledky úvodního testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )                    | 46 |
| Tab. 14 | Výsledky ověřovacího testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )                 | 47 |
| Tab. 15 | Výsledky předběžného testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )                 | 47 |
| Tab. 16 | Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )<br>pro vzorek B1 | 48 |
| Tab. 17 | Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )<br>pro vzorek C3 | 48 |
| Tab. 18 | Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )<br>pro vzorek D1 | 49 |
| Tab. 19 | Výsledky základního testu na žábřonožce slaniskové ( <i>Artemia salina</i> )<br>pro vzorek E1 | 49 |
| Tab. 20 | Výsledky úvodní test na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> )                                 | 50 |
| Tab. 21 | Výsledky předběžného testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> )                           | 51 |
| Tab. 22 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek A1              | 52 |
| Tab. 23 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek A2              | 52 |
| Tab. 24 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek B1              | 53 |
| Tab. 25 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek B2              | 53 |
| Tab. 26 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek C1              | 54 |
| Tab. 27 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek C2              | 54 |
| Tab. 28 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek C3              | 54 |
| Tab. 29 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek D1              | 55 |
| Tab. 30 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek D2              | 55 |
| Tab. 31 | Výsledky základního testu na okřehku menším ( <i>Lemna minor</i> ) pro vzorek E1              | 56 |
| Tab. 32 | Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> pro vzorky A1 a A2                | 56 |
| Tab. 33 | Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> pro vzorky B1 a B2                | 57 |
| Tab. 34 | Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> pro vzorky C1, C2 a C3            | 57 |
| Tab. 35 | Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> pro vzorky D1 a D2                | 58 |
| Tab. 36 | Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> pro vzorek E1                     | 58 |
| Tab. 37 | Výsledky testování sadou Rapidtoxkit F <sup>TM</sup>  | 69 |

## **12. SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA 1 Shrnutí výsledků pro vzorek A1

PŘÍLOHA 2 Shrnutí výsledků pro vzorek A2

PŘÍLOHA 3 Shrnutí výsledků pro vzorek B1

PŘÍLOHA 4 Shrnutí výsledků pro vzorek B2

PŘÍLOHA 5 Shrnutí výsledků pro vzorek C1

PŘÍLOHA 6 Shrnutí výsledků pro vzorek C2

PŘÍLOHA 7 Shrnutí výsledků pro vzorek C3

PŘÍLOHA 8 Shrnutí výsledků pro vzorek D1

PŘÍLOHA 9 Shrnutí výsledků pro vzorek D2

PŘÍLOHA 10 Shrnutí výsledků pro vzorek E1

PŘÍLOHA 11 Probitová analýza



## PŘÍLOHA 1 Shrnutí výsledků pro vzorek A1

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny:  $DR = 99,8556 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,1447 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,8553 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $11,00 \text{ mS/cm}$
- pH =  $12,27$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 27,3448        | -2,1696    | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |            | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|------------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\sigma L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm         | %        |            |
| 25,5926      | 25,6786 | 23,7308 | 25,0006    | -1,3240  | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonozce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- nulová mortalita ⇒ nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 91,7808 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 22,3301   | 1,3514  | inhibice   |
| 100         | 56,3107   | 63,5135 | inhibice   |
| 500         | 100,0000  | 77,0270 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 33,6735   | 28,9941 | inhibice   |
| 40          | 37,8670   | 46,7456 | inhibice   |
| 60          | 44,2395   | 52,6627 | inhibice   |
| 80          | 52,6768   | 55,6213 | inhibice   |
| 90          | 56,7030   | 64,4970 | inhibice   |
| 100         | 61,0277   | 70,4142 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 62,6794 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 41,8161 \text{ ml/l}$

### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet nasazených<br>organismů<br>ks | Mortalita<br>po 24 hod |     |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------|-----|
|                     |                                     | ks                     | %   |
| 62,5                | 40                                  | 8                      | 20  |
| 125                 | 40                                  | 30                     | 75  |
| 250                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 500                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 1 000               | 40                                  | 40                     | 100 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - $24hLC50 = 84,3421 \text{ ml/l}$

### 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet všech<br>organismů<br>ks | Počet organismů s<br>mikrosporami |    | I    |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----|------|
|                     |                                | ks                                | %  | %    |
| 10                  | 12                             | 6                                 | 20 | 31,8 |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou překročen  $\Rightarrow$  prokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 2 Shrnutí výsledků pro vzorek A2

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny:  $DR = 99,8719 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,1282 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,8718 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $9,260 \text{ mS/cm}$
- pH =  $12,35$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I    | Zhodnocení      |
|----------------|---------------|-----------------|
| mm             | %             |                 |
| 25,1333        | <b>6,0933</b> | <b>inhibice</b> |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |            | Inhibice      | Zhodnocení      |
|--------------|---------|---------|------------|---------------|-----------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\sigma L$ | I             |                 |
| mm           | mm      | mm      | mm         | %             |                 |
| 22,1034      | 20,1429 | 29,1379 | 23,7947    | <b>3,5634</b> | <b>inhibice</b> |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **inhibice** menší než 50 %  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze použít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonozce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- nulová mortalita ⇒ nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 93,1507 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace ml/l | $I_{\mu}$ % | $I_B$ % | Zhodnocení |
|------------------|-------------|---------|------------|
| 10               | 18,4466     | 35,1351 | inhibice   |
| 100              | 30,0971     | 40,5405 | inhibice   |
| 500              | 100,0000    | 89,1892 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace ml/l | $I_{\mu}$ % | $I_B$ % | Zhodnocení |
|------------------|-------------|---------|------------|
| 100              | 32,1224     | 37,8698 | inhibice   |
| 200              | 44,2395     | 40,8284 | inhibice   |
| 300              | 58,1093     | 52,6627 | inhibice   |
| 350              | 64,0998     | 55,6213 | inhibice   |
| 400              | 74,4249     | 61,5385 | inhibice   |
| 500              | 82,4869     | 73,3728 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 203,6913 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 229,7067 \text{ ml/l}$

### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet nasazených<br>organismů<br>ks | Mortalita<br>po 24 hod |     |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------|-----|
|                     |                                     | ks                     | %   |
| 62,5                | 40                                  | 14                     | 35  |
| 125                 | 40                                  | 26                     | 65  |
| 250                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 500                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 1 000               | 40                                  | 40                     | 100 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - $24hLC50 = 70,8922 \text{ ml/l}$

### 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet všech<br>organismů<br>ks | Počet organismů s<br>mikrosporami |      | I    |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------|------|
|                     |                                | ks                                | %    | %    |
| 10                  | 7                              | 3                                 | 42,9 | 41,6 |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou překročen  $\Rightarrow$  prokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 3 Shrnutí výsledků pro vzorek B1

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny:  $DR = 99,9063 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,0938 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,9062 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $2,770 \text{ mS/cm}$
- pH =  $11,84$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 27,4828        | -2,6849    | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |          | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|----------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\phi L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm       | %        |            |
| 25,0000      | 25,8889 | 29,4483 | 26,7791  | -8,5316  | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
| ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 40                         | 10                  | 100 | 40                  | 100 |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|-------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| ml/l        | ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 500         | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

c) základní test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |    | Mortalita po 48 hod |    |
|-------------|----------------------------|---------------------|----|---------------------|----|
| ml/l        | ks                         | ks                  | %  | ks                  | %  |
| 500         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 600         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 700         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 800         | 40                         | 8                   | 20 | 8                   | 20 |
| 900         | 40                         | 16                  | 40 | 18                  | 45 |
| 950         | 40                         | 30                  | 75 | 32                  | 80 |

- byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 947,0625 ml/l
- 48hLC50 = 914,6314 ml/l



#### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 73,5294   | 79,4521 | inhibice   |

b) předběžný test:

| konzentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 12,6214   | 20,2703 | inhibice   |
| 100         | 23,3010   | 32,4324 | inhibice   |
| 500         | 56,3107   | 64,8649 | inhibice   |

c) základní test

| konzentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 100         | 6,0786    | 26,0355 | inhibice   |
| 200         | 26,8929   | 31,9527 | inhibice   |
| 300         | 37,8670   | 40,8284 | inhibice   |
| 350         | 46,5283   | 43,7870 | inhibice   |
| 400         | 55,3298   | 52,6627 | inhibice   |
| 500         | 64,0998   | 64,4970 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 367,8484 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 371,1204 \text{ ml/l}$

#### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| konzentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   |
| 62,5        | 40                         | 4                   | 10  |
| 125         | 40                         | 8                   | 20  |
| 250         | 40                         | 16                  | 40  |
| 500         | 40                         | 40                  | 100 |
| 1 000       | 40                         | 40                  | 100 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - $24hLC50 = 224,7122 \text{ ml/l}$

## 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |          | <b>I</b> |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                    | <b>ks</b>                             | <b>%</b> | <b>%</b> |
| 10                 | 11                           | 6                                     | 54,5     | 25,6     |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou nepřekročen ⇒ neprokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 4 Shrnutí výsledků pro vzorek B2

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny:  $DR = 76,4453 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 130,8125 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 969,1875 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $0,156 \text{ mS/cm}$
- pH =  $9,81$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 35,3678        | -32,1461   | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |          | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|----------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\phi L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm       | %        |            |
| 31,7143      | 31,6508 | 31,9765 | 31,7805  | -28,8018 | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze použít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

a) úvodní test

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. - **nulová mortalita** ⇒ nelze stanovit hodnotu efektivní koncentrace 48hEC50 ⇒ neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% imobilizace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen ⇒ vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

### 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- **nulová mortalita** ⇒ nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 51,9608   | 67,1233 | inhibice   |

b) předběžný test:

| <b>koncentrace</b> | <b>I<sub>μ</sub></b> | <b>I<sub>B</sub></b> | <b>Zhodnocení</b> |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>%</b>             | <b>%</b>             |                   |
| 10                 | <b>23,3010</b>       | <b>33,7838</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 100                | <b>25,2427</b>       | <b>37,8378</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 500                | <b>32,0388</b>       | <b>43,2432</b>       | <b>inhibice</b>   |

c) základní test

| <b>koncentrace</b> | <b>I<sub>μ</sub></b> | <b>I<sub>B</sub></b> | <b>Zhodnocení</b> |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>%</b>             | <b>%</b>             |                   |
| 500                | <b>17,6595</b>       | <b>28,9941</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 600                | <b>17,6595</b>       | <b>31,9527</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 700                | <b>22,0938</b>       | <b>37,8698</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 800                | <b>48,9106</b>       | <b>52,6627</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 900                | <b>51,3942</b>       | <b>61,5385</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 950                | <b>56,7030</b>       | <b>67,4556</b>       | <b>inhibice</b>   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 892,8708 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 762,3836 \text{ ml/l}$

## 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet nasazených organismů</b> | <b>Mortalita po 24 hod</b> |          |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                         | <b>ks</b>                  | <b>%</b> |
| 62,5               | 40                                | 0                          | <b>0</b> |
| 125                | 40                                | 0                          | <b>0</b> |
| 250                | 40                                | 0                          | <b>0</b> |
| 500                | 40                                | 0                          | <b>0</b> |
| 1 000              | 40                                | 0                          | <b>0</b> |

Zhodnocení:

- **nulová mortalita** ⇒ nelze spočítat hodnotu letální koncentrace 24hLC50

## 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |             | <b>I</b>   |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                    | <b>ks</b>                             | <b>%</b>    | <b>%</b>   |
| 10                 | 30                           | 21                                    | <b>70,0</b> | <b>4,5</b> |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou nepřekročen ⇒ neprokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 5 Shrnutí výsledků pro vzorek C1

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 63,5423 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 157,3754 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 942,6246 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 942 \text{ ml}$
- konduktivita =  $0,838 \text{ mS/cm}$
- pH =  $9,26$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 30,6429        | -14,4921   | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |                 | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|-----------------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\varnothing L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm              | %        |            |
| 32,5357      | 32,5556 | 30,3953 | 31,8289         | -28,9977 | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

## 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

a) úvodní test

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| 20                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. - **nulová mortalita**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu efektivní koncentrace 48hEC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxická
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% imobilizace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

## 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| ks                         | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- **nulová mortalita**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

#### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 59,8039   | 64,3836 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 1,9417    | 12,1622 | inhibice   |
| 100         | 11,6505   | 16,2162 | inhibice   |
| 500         | 21,3592   | 29,7297 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 500         | 7,2575    | 14,2012 | inhibice   |
| 600         | 10,9444   | 28,9941 | inhibice   |
| 700         | 27,7326   | 46,7456 | inhibice   |
| 800         | 33,9751   | 58,5799 | inhibice   |
| 900         | 40,9663   | 64,4970 | inhibice   |
| 950         | 56,7030   | 70,4142 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 960,8268 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 746,6696 \text{ ml/l}$

#### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   |
|-------------|----------------------------|---------------------|---|
| ml/l        | ks                         | ks                  | % |
| 62,5        | 40                         | 0                   | 0 |
| 125         | 40                         | 0                   | 0 |
| 250         | 40                         | 0                   | 0 |
| 500         | 40                         | 0                   | 0 |
| 1 000       | 40                         | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- **nulová mortalita**  $\Rightarrow$  nelze spočítat hodnotu letální koncentrace 24hLC50



## 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |          | <b>I</b> |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                    | <b>ks</b>                             | <b>%</b> | <b>%</b> |
| 10                 | 19                           | 13                                    | 68,4     | 6,7      |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou nepřekročen ⇒ neprokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 6 Shrnutí výsledků pro vzorek C2

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 99,9163 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,0838 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,9162 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $0,714 \text{ mS/cm}$
- pH =  $10,25$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 27,4643        | -2,6159    | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |            | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|------------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\sigma L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm         | %        |            |
| 26,9564      | 25,4268 | 24,8012 | 25,7281    | -4,2724  | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- nulová mortalita ⇒ nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 95,8904 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace ml/l | $I_{\mu}$ % | $I_B$ % | Zhodnocení |
|------------------|-------------|---------|------------|
| 10               | 9,7087      | 6,7568  | inhibice   |
| 100              | 30,0971     | 24,3243 | inhibice   |
| 500              | 64,0777     | 55,4054 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace ml/l | $I_{\mu}$ % | $I_B$ % | Zhodnocení |
|------------------|-------------|---------|------------|
| 100              | 13,5385     | 17,1598 | inhibice   |
| 200              | 36,8694     | 37,8698 | inhibice   |
| 300              | 43,1279     | 49,7041 | inhibice   |
| 350              | 47,7073     | 55,6213 | inhibice   |
| 400              | 52,6768     | 58,5799 | inhibice   |
| 500              | 58,1093     | 61,5385 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 367,4662 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 306,4881 \text{ ml/l}$

### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |    |
|-------------|----------------------------|---------------------|----|
|             |                            | ks                  | %  |
| ml/l        | ks                         | ks                  | %  |
| 62,5        | 40                         | 0                   | 0  |
| 125         | 40                         | 0                   | 0  |
| 250         | 40                         | 0                   | 0  |
| 500         | 40                         | 16                  | 40 |
| 1 000       | 40                         | 30                  | 75 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - $24hLC50 = 669,4292 \text{ ml/l}$

### 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace | Počet všech organismů | Počet organismů s mikrosporami |      | I    |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|------|------|
|             |                       | ks                             | %    | %    |
| ml/l        | ks                    | ks                             | %    | %    |
| 10          | 22                    | 13                             | 59,1 | 19,4 |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou nepřekročen  $\Rightarrow$  neprokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 7 Shrnutí výsledků pro vzorek C3

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 98,8907\%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 101,1217\text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 998,8783\text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 998\text{ ml}$
- konduktivita =  $9,94\text{ mS/cm}$
- pH =  $12,42$
- teplota výluhu:  $t = 21,2\text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I | Zhodnocení |
|----------------|------------|------------|
| mm             | %          |            |
| 28,3448        | -5,9059    | stimulace  |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |          | Inhibice | Zhodnocení |
|--------------|---------|---------|----------|----------|------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\phi L$ | I        |            |
| mm           | mm      | mm      | mm       | %        |            |
| 25,9286      | 27,4400 | 25,1154 | 26,1613  | -6,0280  | stimulace  |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **stimulace**  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 10          | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 100         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |
| 500         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

c) základní test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 10          | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 20          | 20                         | 0                   | 10  | 3                   | 15  |
| 40          | 20                         | 1                   | 20  | 4                   | 80  |
| 60          | 20                         | 8                   | 90  | 8                   | 100 |
| 80          | 20                         | 10                  | 100 | 11                  | 100 |
| 100         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

- byly vypočítány hodnoty efektivní koncentrace:

- 24hEC50 = 70,8342 ml/l
- 48hEC50 = 41,9459 ml/l

Zhodnocení:

- a) vyhláška č. 376/2001 Sb. - limit 48hEC50 ≤ 10 ml/l nedosažen ⇒ neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxická
- b) vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% imobilizace v úvodním testu překročen ⇒ vzorek nelze použít k rekultivacím na povrchu terénu

### 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |    | Mortalita po 48 hod |    |
|----------------------------|---------------------|----|---------------------|----|
|                            | ks                  | %  | ks                  | %  |
| 40                         | 32                  | 80 | 32                  | 80 |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|-------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|             |                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 500         | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

c) základní test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |    | Mortalita po 48 hod |    |
|-------------|----------------------------|---------------------|----|---------------------|----|
|             |                            | ks                  | %  | ks                  | %  |
| 500         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 600         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 700         | 40                         | 0                   | 0  | 0                   | 0  |
| 800         | 40                         | 8                   | 20 | 8                   | 20 |
| 900         | 40                         | 16                  | 40 | 18                  | 45 |
| 950         | 40                         | 30                  | 75 | 32                  | 80 |

- byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:
  - 24hLC50 = 710,3801 ml/l
  - 48hLC50 = 661,2812 ml/l

#### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 97,2603 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 17,4757   | 18,9189 | inhibice   |
| 100         | 33,9806   | 31,0811 | inhibice   |
| 500         | 100,0000  | 89,1892 | inhibice   |

c) základní test

| <b>koncentrace</b> | <b>I<sub>μ</sub></b> | <b>I<sub>B</sub></b> | <b>Zhodnocení</b> |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>%</b>             | <b>%</b>             |                   |
| 100                | <b>26,0651</b>       | <b>43,7870</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 200                | <b>52,6768</b>       | <b>58,5799</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 300                | <b>61,0277</b>       | <b>67,4556</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 350                | <b>82,4869</b>       | <b>76,3314</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 400                | <b>89,3603</b>       | <b>79,2899</b>       | <b>inhibice</b>   |
| 500                | <b>100,0000</b>      | <b>82,2485</b>       | <b>inhibice</b>   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

- **168hI<sub>μ</sub>C50 = 183,1506 ml/l**
- **168hI<sub>B</sub>C50 = 133,4856 ml/l**

### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet nasazených organismů</b> | <b>Mortalita po 24 hod</b> |            |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------|
|                    |                                   | <b>ks</b>                  | <b>%</b>   |
| 62,5               | 40                                | 0                          | <b>0</b>   |
| 125                | 40                                | 16                         | <b>40</b>  |
| 250                | 40                                | 40                         | <b>100</b> |
| 500                | 40                                | 40                         | <b>100</b> |
| 1 000              | 40                                | 40                         | <b>100</b> |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

- **24hLC50 = 154,7153 ml/l**

### 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |             | <b>I</b>    |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
|                    |                              | <b>ks</b>                             | <b>%</b>    |             |
| 10                 | 18                           | 9                                     | <b>50,0</b> | <b>31,8</b> |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou překročen ⇒ prokázán toxický účinek



## PŘÍLOHA 8 Shrnutí výsledků pro vzorek D1

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 99,7058 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,2951 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,7049 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $10,31 \text{ mS/cm}$
- pH =  $12,52$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I     | Zhodnocení      |
|----------------|----------------|-----------------|
| mm             | %              |                 |
| 23,9643        | <b>10,4613</b> | <b>inhibice</b> |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |            | Inhibice      | Zhodnocení      |
|--------------|---------|---------|------------|---------------|-----------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\sigma L$ | I             |                 |
| mm           | mm      | mm      | mm         | %             |                 |
| 22,8400      | 22,1111 | 22,8889 | 22,6133    | <b>8,3515</b> | <b>inhibice</b> |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **inhibice** menší než 50 %  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonozce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|-------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|             |                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 10          | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |
| 500         | 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

c) základní test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 500         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 10  |
| 600         | 40                         | 0                   | 10  | 0                   | 20  |
| 700         | 40                         | 0                   | 20  | 0                   | 60  |
| 800         | 40                         | 8                   | 95  | 8                   | 100 |
| 900         | 40                         | 16                  | 100 | 18                  | 100 |
| 950         | 40                         | 30                  | 100 | 32                  | 100 |

- byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- 24hLC50 = 704,6049 ml/l
- 48hLC50 = 650,6676 ml/l

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 98,6301 | inhibice   |

b) předběžný test:

| <b>koncentrace</b> | <b>I<sub>μ</sub></b> | <b>I<sub>B</sub></b> | <b>Zhodnocení</b> |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>%</b>             | <b>%</b>             |                   |
| 10                 | 26,2136              | 39,1892              | inhibice          |
| 100                | 42,7184              | 45,9459              | inhibice          |
| 500                | 100,0000             | 78,3784              | inhibice          |

c) základní test

| <b>koncentrace</b> | <b>I<sub>μ</sub></b> | <b>I<sub>B</sub></b> | <b>Zhodnocení</b> |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>%</b>             | <b>%</b>             |                   |
| 100                | 20,5779              | 23,0769              | inhibice          |
| 200                | 50,1392              | 46,7456              | inhibice          |
| 300                | 64,0998              | 52,6627              | inhibice          |
| 350                | 70,7764              | 58,5799              | inhibice          |
| 400                | 82,4869              | 70,4142              | inhibice          |
| 500                | 100,0000             | 82,2485              | inhibice          |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - 168hI<sub>μ</sub>C50 = 199,5262 ml/l
  - 168hI<sub>B</sub>C50 = 231,6903 ml/l

## 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet nasazených organismů</b> | <b>Mortalita po 24 hod</b> |          |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                         | <b>ks</b>                  | <b>%</b> |
| 62,5               | 40                                | 0                          | 0        |
| 125                | 40                                | 40                         | 95       |
| 250                | 40                                | 40                         | 100      |
| 500                | 40                                | 40                         | 100      |
| 1 000              | 40                                | 40                         | 100      |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - 24hLC50 = 93,7461 ml/l

## 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |          | <b>I</b> |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                    | <b>ks</b>                             | <b>%</b> | <b>%</b> |
| 10                 | 7                            | 3                                     | 42,9     | 41,6     |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou překročen ⇒ prokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 9 Shrnutí výsledků pro vzorek D2

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 99,9052 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 100,0949 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 999,9051 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 999 \text{ ml}$
- konduktivita =  $8,29 \text{ mS/cm}$
- pH =  $12,43$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: bezbarvý, bez zápachu

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I     | Zhodnocení      |
|----------------|----------------|-----------------|
| mm             | %              |                 |
| 19,9630        | <b>25,4116</b> | <b>inhibice</b> |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |          | Inhibice       | Zhodnocení      |
|--------------|---------|---------|----------|----------------|-----------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\phi L$ | I              |                 |
| mm           | mm      | mm      | mm       | %              |                 |
| 21,7853      | 21,4502 | 21,5814 | 21,6056  | <b>12,4355</b> | <b>inhibice</b> |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **inhibice** menší než 50 %  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním ani v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

- vzorek nebyl na daném organismu testován

### 3. Test akutní toxicity na žábřonozce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

b) ověřovací test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |   | Mortalita po 48 hod |   |
|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
|                            | ks                  | % | ks                  | % |
| 40                         | 0                   | 0 | 0                   | 0 |

Zhodnocení:

- nulová mortalita ⇒ nelze stanovit hodnoty 24hLC50 a 48hLC50

### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 97,2603 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 17,4757   | 16,2162 | inhibice   |
| 100         | 40,7767   | 36,4865 | inhibice   |
| 500         | 100,0000  | 95,9459 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 100         | 32,1224   | 37,8698 | inhibice   |
| 200         | 51,3942   | 55,6213 | inhibice   |
| 300         | 69,0343   | 61,5385 | inhibice   |
| 350         | 78,3168   | 70,4142 | inhibice   |
| 400         | 91,8440   | 76,3314 | inhibice   |
| 500         | 97,1528   | 88,1657 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:
  - $168hI_{\mu}C50 = 169,4912 \text{ ml/l}$
  - $168hI_B C50 = 164,2646 \text{ ml/l}$

### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet nasazených<br>organismů<br>ks | Mortalita<br>po 24 hod |     |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------|-----|
|                     |                                     | ks                     | %   |
| 62,5                | 40                                  | 0                      | 0   |
| 125                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 250                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 500                 | 40                                  | 40                     | 100 |
| 1 000               | 40                                  | 40                     | 100 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:
  - $24hLC50 = 88,3867 \text{ ml/l}$

### 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace<br>ml/l | Počet všech<br>organismů<br>ks | Počet organismů s<br>mikrosporami |      | I    |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------|------|
|                     |                                | ks                                | %    | %    |
| 10                  | 14                             | 7                                 | 50,0 | 31,8 |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou překročen  $\Rightarrow$  prokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 10 Shrnutí výsledků pro vzorek E1

### Stanovení vodného výluhu:

- podíl sušiny  $DR = 98,5432 \%$
- hmotnost analytického vzorku obsahujícího 0,100 kg sušiny:  $M = 101,4783 \text{ g}$
- množství přidané vody:  $LA = 998,5217 \text{ ml}$

### Parametry vodného výluhu:

- celkový objem:  $V_E = 998 \text{ ml}$
- konduktivita =  $6,91 \text{ mS/cm}$
- pH =  $11,67$
- teplota výluhu:  $t = 21,2 \text{ }^\circ\text{C}$
- charakteristika výluhu: nažloutlý, organický zápach

### Výsledky testování:

#### 1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

a) úvodní test:

| Délka kořene L | Inhibice I     | Zhodnocení      |
|----------------|----------------|-----------------|
| mm             | %              |                 |
| 19,8462        | <b>25,8480</b> | <b>inhibice</b> |

b) ověřovací test:

| Délka kořene |         |         |          | Inhibice       | Zhodnocení      |
|--------------|---------|---------|----------|----------------|-----------------|
| $L_A$        | $L_B$   | $L_C$   | $\phi L$ | I              |                 |
| mm           | mm      | mm      | mm       | %              |                 |
| 19,1481      | 21,2222 | 19,1600 | 19,8435  | <b>19,5774</b> | <b>inhibice</b> |

Zhodnocení:

- vyhláška č. 376/2001 Sb. – **inhibice** menší než 50 %  $\Rightarrow$  nelze stanovit hodnotu 72hIC50  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% inhibice, resp. stimulace v úvodním a v ověřovacím testu nepřekročen  $\Rightarrow$  vzorek lze využít k rekultivacím na povrchu terénu

#### 2. Akutní imobilizační test na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |            | Mortalita po 48 hod |            |
|----------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                            | ks                  | %          | ks                  | %          |
| 20                         | 20                  | <b>100</b> | 20                  | <b>100</b> |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 10          | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 100         | 20                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 500         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

c) základní test I:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 100         | 20                         | 0                   | 0   | 2                   | 10  |
| 200         | 20                         | 15                  | 75  | 19                  | 95  |
| 300         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |
| 350         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |
| 400         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |
| 500         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

- byly vypočítány hodnoty efektivní koncentrace:

- 24hEC50 = 124,5015 ml/l
- 48hEC50 = 113,4384 ml/l

d) základní test II:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
|             |                            | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 100         | 20                         | 0                   | 0   | 2                   | 10  |
| 120         | 20                         | 11                  | 55  | 19                  | 95  |
| 140         | 20                         | 11                  | 55  | 20                  | 100 |
| 160         | 20                         | 18                  | 90  | 20                  | 100 |
| 180         | 20                         | 19                  | 95  | 20                  | 100 |
| 200         | 20                         | 20                  | 100 | 20                  | 100 |

- byly vypočítány hodnoty efektivní koncentrace:

- 24hEC50 = 115,8273 ml/l
- 48hEC50 = 101,3363 ml/l



Zhodnocení:

- a) vyhláška č. 376/2001 Sb. - limit  $48hEC_{50} \leq 10 \text{ ml/l}$  nedosažen  $\Rightarrow$  neprokázána nebezpečná vlastnost H 14 ekotoxicita
- b) vyhláška č. 294/2005 Sb. – limit 30% imobilizace v úvodním testu překročen  $\Rightarrow$  vzorek nelze využít k rekultivacím na povrchu terénu

### 3. Test akutní toxicity na žábřonožce slaniskové (*Artemia salina*)

a) úvodní test:

| Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
| ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

b) předběžný test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
| ml/l        | ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 10          | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 500         | 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

c) základní test:

| Koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     | Mortalita po 48 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|
| ml/l        | ks                         | ks                  | %   | ks                  | %   |
| 100         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 200         | 40                         | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| 300         | 40                         | 2                   | 5   | 4                   | 10  |
| 350         | 40                         | 4                   | 10  | 8                   | 20  |
| 400         | 40                         | 12                  | 30  | 16                  | 40  |
| 500         | 40                         | 40                  | 100 | 40                  | 100 |

Zhodnocení: byly vypočítány hodnoty letální koncentrace:

- $24hLC_{50} = 490,9587 \text{ ml/l}$
- $48hLC_{50} = 429,0607 \text{ ml/l}$

#### 4. Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

a) úvodní test:

| $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-----------|---------|------------|
| %         | %       |            |
| 100,0000  | 98,6301 | inhibice   |

b) předběžný test:

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 10          | 6,7961    | 24,3243 | inhibice   |
| 100         | 13,5922   | 39,1892 | inhibice   |
| 500         | 76,6990   | 62,1622 | inhibice   |

c) základní test

| koncentrace | $I_{\mu}$ | $I_B$   | Zhodnocení |
|-------------|-----------|---------|------------|
| ml/l        | %         | %       |            |
| 100         | 20,5779   | 26,0355 | inhibice   |
| 200         | 32,1224   | 46,7456 | inhibice   |
| 300         | 53,9882   | 49,7041 | inhibice   |
| 350         | 56,7030   | 55,6213 | inhibice   |
| 400         | 62,5435   | 58,5799 | inhibice   |
| 500         | 94,4380   | 64,4970 | inhibice   |

- byly vypočítány hodnoty inhibičních koncentrací:

-  $168hI_{\mu}C50 = 251,386 \text{ ml/l}$

-  $168hI_B C50 = 265,728 \text{ ml/l}$

#### 5. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| koncentrace | Počet nasazených organismů | Mortalita po 24 hod |     |
|-------------|----------------------------|---------------------|-----|
| ml/l        | ks                         | ks                  | %   |
| 62,5        | 40                         | 0                   | 0   |
| 125         | 40                         | 0                   | 0   |
| 250         | 40                         | 40                  | 100 |
| 500         | 40                         | 40                  | 100 |
| 1 000       | 40                         | 40                  | 100 |

- byla vypočítána hodnota letální koncentrace:

-  $24hLC50 = 198,4073 \text{ ml/l}$

## 6. Rapidtoxkit F<sup>TM</sup>

- výsledek testu

| <b>koncentrace</b> | <b>Počet všech organismů</b> | <b>Počet organismů s mikrosporami</b> |             | <b>I</b>    |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
| <b>ml/l</b>        | <b>ks</b>                    | <b>ks</b>                             | <b>%</b>    | <b>%</b>    |
| 10                 | 11                           | 7                                     | <b>54,5</b> | <b>25,6</b> |

Zhodnocení:

- limit 30% inhibice příjmu potravou nepřekročen ⇒ neprokázán toxický účinek

## PŘÍLOHA 11 Probitová analýza

| <b>%</b>   | <b>probit</b> | <b>%</b>  | <b>probit</b> | <b>%</b>  | <b>probit</b> | <b>%</b>  | <b>probit</b> | <b>%</b>  | <b>probit</b> | <b>%</b>    | <b>probit</b> |
|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-------------|---------------|
| <b>0,2</b> | 2,122         | <b>10</b> | 3,718         | <b>30</b> | 4,476         | <b>50</b> | 5,000         | <b>70</b> | 5,524         | <b>90,0</b> | 6,282         |
| <b>0,4</b> | 2,348         | <b>11</b> | 3,773         | <b>31</b> | 4,504         | <b>51</b> | 5,025         | <b>71</b> | 5,553         | <b>91,0</b> | 6,341         |
| <b>0,6</b> | 2,488         | <b>12</b> | 3,825         | <b>32</b> | 4,532         | <b>52</b> | 5,05          | <b>72</b> | 5,583         | <b>92,0</b> | 6,405         |
| <b>0,8</b> | 2,591         | <b>13</b> | 3,874         | <b>33</b> | 4,560         | <b>53</b> | 5,075         | <b>73</b> | 5,613         | <b>93,0</b> | 6,476         |
| <b>1,0</b> | 2,574         | <b>14</b> | 3,92          | <b>34</b> | 4,588         | <b>54</b> | 5,100         | <b>74</b> | 5,643         | <b>94,0</b> | 6,585         |
| <b>1,2</b> | 2,743         | <b>15</b> | 3,964         | <b>35</b> | 4,615         | <b>55</b> | 5,126         | <b>75</b> | 5,674         | <b>95,0</b> | 6,645         |
| <b>1,4</b> | 2,803         | <b>16</b> | 4,006         | <b>36</b> | 4,642         | <b>56</b> | 5,151         | <b>76</b> | 5,706         | <b>95,5</b> | 6,695         |
| <b>1,6</b> | 2,856         | <b>17</b> | 4,046         | <b>37</b> | 4,668         | <b>57</b> | 5,176         | <b>77</b> | 5,739         | <b>96,0</b> | 6,751         |
| <b>1,8</b> | 2,903         | <b>18</b> | 4,085         | <b>38</b> | 4,695         | <b>58</b> | 5,202         | <b>78</b> | 5,772         | <b>96,5</b> | 6,812         |
| <b>2,0</b> | 2,946         | <b>19</b> | 4,122         | <b>39</b> | 4,722         | <b>59</b> | 5,228         | <b>79</b> | 5,806         | <b>97,0</b> | 6,881         |
| <b>2,5</b> | 3,040         | <b>20</b> | 4,158         | <b>40</b> | 4,747         | <b>60</b> | 5,253         | <b>80</b> | 5,842         | <b>97,5</b> | 6,966         |
| <b>3,0</b> | 3,123         | <b>21</b> | 4,194         | <b>41</b> | 4,772         | <b>61</b> | 5,278         | <b>81</b> | 5,878         | <b>98,0</b> | 7,054         |
| <b>3,5</b> | 3,188         | <b>22</b> | 4,228         | <b>42</b> | 4,798         | <b>62</b> | 5,305         | <b>82</b> | 5,915         | <b>98,2</b> | 7,096         |
| <b>4,0</b> | 3,249         | <b>23</b> | 4,261         | <b>43</b> | 4,824         | <b>63</b> | 5,332         | <b>83</b> | 5,954         | <b>98,4</b> | 7,144         |
| <b>4,5</b> | 3,305         | <b>24</b> | 4,294         | <b>44</b> | 4,849         | <b>64</b> | 5,358         | <b>84</b> | 5,994         | <b>98,6</b> | 7,197         |
| <b>5,0</b> | 3,355         | <b>25</b> | 4,326         | <b>45</b> | 4,874         | <b>65</b> | 5,385         | <b>85</b> | 6,036         | <b>98,8</b> | 7,257         |
| <b>6,0</b> | 3,445         | <b>26</b> | 4,357         | <b>46</b> | 4,900         | <b>66</b> | 5,412         | <b>86</b> | 6,080         | <b>99,0</b> | 7,326         |
| <b>7,0</b> | 3,524         | <b>27</b> | 4,387         | <b>47</b> | 4,925         | <b>67</b> | 5,440         | <b>87</b> | 6,126         | <b>99,2</b> | 7,409         |
| <b>8,0</b> | 3,595         | <b>28</b> | 4,417         | <b>48</b> | 4,950         | <b>68</b> | 5,468         | <b>88</b> | 6,175         | <b>99,4</b> | 7,512         |
| <b>9,0</b> | 3,659         | <b>29</b> | 4,447         | <b>49</b> | 4,975         | <b>69</b> | 5,496         | <b>89</b> | 6,227         | <b>99,6</b> | 7,652         |
|            |               |           |               |           |               |           |               |           |               | <b>99,8</b> | 7,878         |