

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA APLIKOVANÉ EKOLOGIE



**EKOTOXICITA ODPADNÍCH VOD ZE ZDRAVOTNICKÝCH ZAŘÍZENÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MUDr. Magdalena Zimová, CSc.

Konzultant: Ing. Ladislava Matějů

Diplomant: Bc. Petra Martišová

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra aplikované ekologie

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Martišová Petra

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Ekotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení**

Anglický název

**Ecotoxicity of wastewater from medical facilities**

---

### Cíle práce

Cílem práce bude stanovení ekotoxicity u vybraných odpadních vod z nemocničních zařízení.

### Metodika

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

### Harmonogram zpracování

1. Zpracování literární rešerše (říjen 2014)
2. Výběr vhodných ekotoxikologických metod (říjen 2014)
3. Odběr vzorků (říjen 2014)
4. Provedení ekotoxikologických testů na vzorcích odpadních vod (říjen 2014 - leden 2015)
5. Vyhodnocení a zpracování výsledků (únor 2015)
6. Vypracování konečného znění DP (duben 2015)

**Rozsah textové části**

cca 40 stran

**Klíčová slova**

ekotoxicita, odpadní vody, rizika pro životní prostředí

---

**Doporučené zdroje informací**

Vybrané normy ČSN  
Databáze: Current contents - Life science, Agricultural  
Odborné časopisy

---

**Vedoucí práce**

Zimová Magdaléna, MUDr., CSc.

---

Elektronicky schváleno dne 25.3.2014

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

---

Elektronicky schváleno dne 1.4.2014

**prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.**  
Děkan fakulty

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma “ekotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení“, jsem vypracovala samostatně a pod vedením vedoucího diplomové práce MUDr. Magdaleny Zimové, CSc. a konzultantky Ing. Ladislavy Matějů a za použití odborné literatury, která je citována v práci a uvedena v seznamu literatury na konci práce.

V Praze dne 22. 4. 2015

.....

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce MUDr. Magdaleně Zimové, CSc. a konzultantce Ing. Ladislavě Matějů za odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Martině Wittlerové a Aleně Garbaczewské za pomoc při provádění a vyhodnocování ekotoxikologických testů. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za morální podporu a pevné nervy.

V Praze dne 22. 4. 2015

.....

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá ekotoxicitou odpadních vod se zaměřením na odpadní vody ze zdravotnických zařízení. Nemocniční odpadní vody obsahují řadu chemických látek, léčiv, dezinfekčních prostředků, těžkých kovů a mnoho jiných faktorů, které nemusí být v procesu čištění odpadních vod zcela eliminovány. Takovéto vody se pak dostávají do povrchových a podzemních vod, kde mohou představovat riziko pro vodní ekosystémy a životní prostředí. Ekotoxicita se hodnotí pomocí ekotoxikologických testů, které jsou čím dál více využívány při hodnocení nepříznivých účinků toxických látek a jejich směsí na životní prostředí.

V praktické části diplomové práce byla hodnocena ekotoxicita odpadních vod z Fakultní nemocnice v Motole. Byly sledovány infekční odpadní vody před dezinfekcí a vypouštěné odpadní vody po dezinfekci roztokem chlornanu sodného. K hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod byly v diplomové práci použity ekotoxikologické testy podle platných českých technických norem, metodického pokynu a právních předpisů. Ekotoxicita se stanovuje pomocí testů akutní toxicity, kterým je podrobena testovaná odpadní voda. Testy se provádějí na zástupcích ryb, zooplanktonu, fytoplanktonu a vyšších rostlin. K provedení práce byla vybrána sada obsahující tyto testy toxicity: test akutní toxicity na akvarijních rybách (*Poecilia reticulata*), test akutní toxicity na perloočkách (*Daphnia magna*), test inhibice růstu zelené řasy (*Desmodesmus subspicatus*), test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a test na luminiscenční bakterii *Vibrio fischeri*.

## **Klíčová slova**

Ekotoxicita, odpadní vody, rizika pro životní prostředí

## **Abstract**

This diploma thesis deals ecotoxicity wastewater with a focus on wastewater from medical facilities. Hospital wastewater contains many chemicals, pharmaceuticals, disinfectants, heavy metals and many other substances that cannot be completely eliminated during wastewater treatment. Such water is then taken into the surface and groundwater where it can be dangerous for water ecosystems and the environment. Ecotoxicity is assessed using ecotoxicological tests, which are often used in the assessment of adverse effects of toxic substances and their mixtures on the environment.

In the practical part of the diploma thesis was evaluated ecotoxicity of Motol University Hospital wastewater. There were studied infectious wastewater before disinfection and discharged wastewater disinfected by solution of a sodium hypochlorite. In this thesis were used to evaluate the ecotoxicity of the hospital wastewater ecotoxicological tests according to valid Czech technical standards, methodological guidelines and legislation. Ecotoxicity is determined by acute toxicity tests which is subjected to testing wastewater. Tests were carried out on representatives of fish, zooplankton, phytoplankton and higher plants. In this work were used these ecotoxicity tests: acute toxicity test for aquarium fish (*Poecilia reticulata*), acute toxicity test on daphnia (*Daphnia magna*), growth inhibition test green algae (*Desmodesmus subspicatus*) test root growth inhibition of white mustard (*Sinapis alba*) and test for luminescent bacterium *Vibrio fischeri*.

## **Keywords**

Ecotoxicity, wastewater, risks to the environment

## Obsah

1. Úvod.....	12
2. Cíle diplomové práce .....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	14
3.1 Ekotoxikologie a ekotoxikologické testy .....	14
3.1.1 Podstata ekotoxikologických testů.....	14
3.1.2 Ekologická relevance .....	16
3.1.3 Parametry hodnocení ekotoxicity .....	17
3.1.4 Výhody a nevýhody ekotoxikologických testů.....	17
3.1.5 Přehled ekotoxikologických testů.....	18
3.2 Ekotoxicita v právních předpisech a normách.....	19
3.2.1 Hodnocení ekotoxicity v EU.....	19
3.2.2 Hodnocení ekotoxicity v ČR.....	21
3.2.3 Testy pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod.....	25
4. Odpadní vody .....	26
4.1 Znečištění odpadních vod.....	26
4.1.1 Ukazatele znečištění odpadních vod.....	27
4.1.2 Organické znečištění a jeho ukazatele .....	28
4.2 Rozdělení odpadních vod .....	28
4.2.1 Odpadní vody splaškové.....	28
4.2.2 Odpadní vody průmyslové.....	30
4.2.3 Odpadní vody srážkové .....	31
4.2.4 Vody balastní .....	31
4.2.5 Vody městské.....	31
4.2.6 Odpadní vody šedé.....	32
4.3 Právní předpisy v oblasti odpadních vod.....	32
4.4 Odpadní vody ze zdravotnických zařízení .....	34
4.4.1 Ekotoxicita nemocničních odpadních vod.....	34
4.4.2 Odvádění a čištění nemocničních OV .....	39
4.4.3 Rizika nemocničních OV.....	40
PRAKTICKÁ ČÁST.....	41
5. Metodika .....	41
5.1. Čistírna odpadních vod Fakultní nemocnice Motol .....	41



5.2 Výběr vhodných ekotoxikologických metod .....	43
5.3 Odběr vzorků .....	43
5.4 Zpracování vzorků v laboratoři .....	44
5.5 Provedení a vyhodnocení ekotoxikologických testů na vzorcích odpadní vody .....	45
5.5.1 Příprava ředící vody pro testy na akvarijských rybách, perloočkách a semenech.....	47
5.5.2 Příprava růstového média pro test na zelených řasách .....	48
5.5.3 Test akutní toxicity na akvarijských rybách.....	48
5.5.4 Test akutní toxicity na perloočkách .....	51
5.5.5 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé .....	53
5.5.6 Test inhibice růstu sladkovodních zelených řas .....	54
5.5.7 Test inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> ...	57
5.6 Vyhodnocení a zpracování výsledků v programu EKO-TOX verze 5.2.....	62
6. Výsledky .....	64
6.1 Výsledky testů akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i> .....	64
6.2 Výsledky testů akutní toxicity na perloočkách <i>Daphnia magna</i> .....	65
6.3 Výsledky testů inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i> .....	68
6.4 Výsledky testů inhibice růstu zelených řas <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	71
6.5 Výsledky testů inhibice luminiscence emitované bakteriemi <i>Vibrio fischeri</i> ..	74
7. Diskuse.....	75
7.1 Porovnání výsledků testů získaných metodami s různými organismy.....	76
7.2 Vliv chlorování na ekotoxicitu odpadních vod .....	82
7.3 Posouzení baterie ekotoxikologických testů .....	86
8. Závěr .....	91
9. Seznam literatury a dalších použitých zdrojů .....	93
10. Přílohy .....	100
Příloha č. 1 – Fotodokumentace .....	100
Příloha č. 2 – Výstupy z programu EKO-TOX 5.2 .....	103

## Seznam použitých zkratk

AOX	adsorbovatelné halogenované organické sloučeniny
ASTM	The American Society for Testing and Materials
BSK <sub>5</sub>	biochemická spotřeba kyslíku za 5 dní
CEN	Evropský výbor pro normalizaci
C <sub>org</sub>	organický uhlík
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
ČSÚ	Český statistický úřad
DOC	rozpuštěný organický uhlík
EC <sub>50</sub>	koncentrace, která negativně ovlivní 50 % testovaných jedinců v daném časovém úseku
EO	ekvivalentní obyvatel
FeS	sulfid železnatý
FN	Fakultní nemocnice
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
CHSK <sub>Cr</sub>	chemická spotřeba kyslíku za působení dichromanu draselného
CHSK <sub>Mn</sub>	chemická spotřeba kyslíku za působení manganistanu draselného
IC <sub>50</sub>	koncentrace, která způsobí 50 procentní inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50 procentní inhibici růstu kořene <i>Sinapis alba</i> ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
ISO	The International Organization for Standardization
LC <sub>50</sub>	koncentrace, při které uhyne 50 % testovaných jedinců v daném časovém úseku
LEF	látky extrahované fenolem
LOAEC	nejnižší experimentální koncentrace, při které byl pozorován negativní účinek
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
N <sub>celk</sub>	celkový obsah dusíku
NEL	nepolární extrahovatelné látky

NL	nerozpuštěné látky
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amonné ionty
NOAEC	nejvyšší experimentální koncentrace, při které nebyl pozorován negativní účinek
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	polychlorované dibenzodioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
P <sub>celk</sub>	celkový obsah fosforu
pH	vodíkový exponent
RAS	rozpuštěné anorganické soli
RL	rozpuštěné látky
SOP	standardní operační postup
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TOC	celkový organický uhlík
TU	jednotka toxicity
U. S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VL	veškeré látky
WHO	World Health Organization

## 1. Úvod

Ve zdravotnických zařízeních probíhá mnoho činností (léčba, užívání léčiv, chirurgie, radiologie, čištění a dezinfekce prostorů a ložního prádla, chemické a biologické analýzy v laboratořích, aj.), které jsou významným zdrojem emisí znečišťujících látek uvolňovaných do životního prostředí (zbytky léků, dezinfekční prostředky, prací prášky, aj.). Většinu z těchto znečišťujících látek lze nalézt v nemocničních odpadních vodách a i ve vodním prostředí. S ohledem na hodnocení dopadu těchto znečišťujících látek na vodní ekosystémy, je nezbytné charakterizovat jejich ekotoxicitu (Orias et Perrodin, 2013).

V odpadních vodách vypouštěných z ČOV, ve vodách povrchových i podzemních je evidováno asi 160 různých skupin léčiv (Kümmerer, 2009). Mimo jiné nemocniční odpadní vody obsahují toxické chemické sloučeniny, jako jsou antibiotika, cytostatika, dezinfekční a bělicí prostředky, chlorfenoly, kontrastní látky, těžké kovy, sedativa, analgetika a hormonální léčiva (Kümmerer, 2001). I přes zvyšující se zájem o problematiku výskytu léčiv v životním prostředí, je stále nedostatek informací, zejména o metabolitech léčiv (Kümmerer, 2009).

Ekotoxikologické testy mají důležité místo při monitoringu životního prostředí, protože podávají doplňující informace k chemickým analýzám a slouží k odhalení rizik spojených s výskytem testované látky v životním prostředí. Pro jejich účinné zapojení do monitoringu ŽP je potřeba vytvořit dokumenty nejen pro samotné testy, ale i pro jejich kontinuitu na chemické nebo ekonomické nástroje ochrany životního prostředí (Newman, 1998).

Ekotoxikologické testy jsou v posledních letech více využívány při hodnocení nepříznivých účinků škodlivých látek a jejich směsí na životní prostředí, pro hodnocení ekotoxicity znečištěných podzemních a povrchových vod, sedimentů a při hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a odpadních vod.

Na základě výsledků testu toxicity s jedním organismem je možné interpretovat výsledky pouze pro ekosystém, ze kterého byl testovací organismus odebrán. Různé sady testů ekotoxicity poskytují různé odpovědi o možném toxickém působení testovaných vzorků. Proto je klíčovým bodem ekotoxikologické práce správná volba vhodné sady testů.

Pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod nejsou stanoveny jednotné metody, podmínky testů či způsoby předúpravy vzorků. Problémem může být i nevhodná volba testovacího organismu. Tato situace komplikuje srovnání účinků různých látek mezi sebou i srovnání výsledků získaných z různých laboratoří (Kočí, 2006).

## **2. Cíle diplomové práce**

Cílem diplomové práce bylo stanovení ekotoxicity odpadních vod z nemocničních zařízení na základě provedení ekotoxikologických testů.

Na základě výsledků bylo provedeno posouzení vhodnosti vybraných metod pro testování ekotoxicity z důvodů nejednotných metodik pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod.

Během práce se ukázalo, že je třeba zjistit vliv chlorace, která se provádí na vodách z vybraných pracovišť, a proto bylo toto sledování zařazeno jako další cíl. Následně byly porovnávány výsledky ekotoxikologických testů odpadních vod mezi jednotlivými odběry a výsledky mezi odpadní vodou před dezinfekcí a vypouštěnou odpadní vodou po dezinfekci.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

#### **3.1 Ekotoxikologie a ekotoxikologické testy**

Ekotoxikologické testy mají důležité místo při monitoringu životního prostředí. Ekotoxikologické testy podávají doplňující informace k chemickým analýzám a slouží k odhalení rizik spojených s výskytem testované látky v životním prostředí. Pro jejich účinné zapojení do monitoringu ŽP je potřeba vytvořit dokumenty nejen pro samotné testy, ale i pro jejich kontinuitu na chemické nebo ekonomické nástroje ochrany životního prostředí (Newman, 1998).

Již v roce 1969 francouzský člen akademie věd René Truhaut, poprvé použil termín ekotoxikologie, který tak definoval disciplínu studující nepříznivé účinky chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva. Ekotoxikologie se zabývá studiem toxického působení látek lidského nebo přírodního původu na živé organismy, jejich populace, společenstva a jejich vzájemné vztahy s prostředím (Kočí et Mocová, 2009). Naopak toxikologie se zabývá pouze studiem vlivů jedovatých látek na člověka (Anděl, 2011). Cílem ekotoxikologie je vyvíjet metody, které umožňují sledovat a charakterizovat vliv látek na rostliny, živočichy a bakterie neboli obecně na živé organismy v životním prostředí. Základem určování jsou testy toxicity prováděné za standardních reprodukovatelných podmínek (Kočí, 2006).

Toxicita je chápána jako míra závažnosti škodlivého působení. Čím nižší koncentrace látky je schopná způsobit poškození, tím je látka toxičtější (Komínková, 2008). Toxicita látek, přípravků a odpadů je především ovlivněna jejich rozpustností ve vodě, chemickým složením, pH, citlivostí vodních organismů a i charakterem vodního prostředí. Podle rychlosti působení látky na organismy rozdělujeme toxicitu na akutní a chronickou. Toxický účinek se při akutní toxicitě projevuje velmi rychle, v řádu po několika minutách až hodinách a ovlivňuje organismus, který je vystaven toxickému působení. Podle délky života organismu se při chronické toxicitě účinek projeví po několika hodinách, týdnech či měsících a proto se její projevy zjišťují až na dalších vývojových generacích v podobě problému s plodností nebo projevy degenerace na potomcích (Říhová Ambrožová, 2009).

##### **3.1.1 Podstata ekotoxikologických testů**

Testy toxicity jsou prováděny po staletí a lékařská praxe se o testování toxicity zajímá od 17. století, ale vždy byl v centru zájmu toxikologie člověk. Ač byly testy toxicity prováděny na různých organismech, včetně savců a primátů, tak vždy byla snaha přenést výsledky na člověka. Až teprve v 60. letech 20. století začaly být vyvíjeny metody, které byly schopné popsat toxické účinky lidmi produkováných látek na životní prostředí a organismy. Významným zlomem bylo systematické zavádění metod testování toxicity na rybách Moutem a přehledně zpracovaných Spraguem (Kočí, 2006). Vedle přímých toxických účinků začaly být

předmětem zájmu jevy biokoncentrace a bioakumulace, tedy nárůst koncentrace cizorodých látek v tkáních organismů v důsledku expozice z prostředí, kde hraje roli i příjem z potravy a úbytek způsobený metabolickým vylučováním (Kočí et Mocová, 2009). Velké množství metod testování toxicity na vodních organismech s cílem odhadnout účinky látek na vodní ekosystémy bylo publikováno v 80. letech. Jednalo se o konkrétní jednoduché testy toxicity a až s rozvojem poznatků o komplexnosti možných účinků environmentálních polutantů začaly být vyvíjeny metody hodnocení na úrovni společenstev (Pavlíková et al., 2009).

Ekotoxikologické testy jsou základním nástrojem ekotoxikologické práce a slouží k odhadu či zjištění možného toxického vlivu testovaných látek nebo směsných vzorků na živé organismy a obecněji na životní prostředí (Kočí, 2006). Principem ekotoxikologických testů je kontakt (akutní nebo chronický) testované látky nebo přírodního vzorku za určitých a předem definovaných podmínek se zkušebním organismem, tkání, buňkou, populací nebo společenstvem. Z následné reakce usuzujeme, zda je testovaná látka toxická, zda vzorek vody obsahuje využitelné živiny nebo zda je za těchto podmínek sledovaná látka rozložitelná. Ekotoxikologickými testy nezískáme informaci o tom, která látka a v jakém množství se v příslušném vzorku nachází, to už je vyhrazeno chemické analýze. Mohou nám však rychle a jednoduše sdělit zda jsou látky ve vzorku biologicky aktivní, nebo zda je sledovaný jev ovlivňován danou látkou (Hoffman et al., 2003).

Jestliže mají ekotoxikologické testy sloužit k hodnocení negativního vlivu látek na ekosystémy, měla by být látka posuzována v takových koncentracích, v jakých se v prostředí může vyskytovat nebo v jakých do prostředí vstupuje. Výroba, užívání i konečné ukládání chemických látek, vede ke zvyšování jejich koncentrací v životním prostředí. Vlivem stále narůstající koncentrace různých látek může dojít k vyčerpání saturační kapacity ekosystému a k jeho následnému narušení. Riziko způsobené jednou látkou nebo směsí látek je pak závislé na jejich koncentraci v životním prostředí a na citlivosti organismů vůči dané látce nebo směsi (Hoffman et al., 2003).

Pro ekotoxikologické testy se používají další názvy jako testy toxicity biologické testy toxicity, biotesty, bioassays. Testy mimo jiné podávají i informace o biologické aktivitě a schopnosti toxických látek procházet biomembránami, jsou založené na fyziologických pochodech, biochemických změnách, dýchání a fotosyntéze. Hlavním cílem testů na biologickém materiálu je stanovit hraniční koncentrace, kde je ještě možný život vybraných testovaných organismů. Testy na organismech vodního prostředí jsou vhodné pro hodnocení odpadů ukládaných na skládky, nově vyvinutých chemických látek, havárií průniku odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů (Říhová Ambrožová, 2009).

Hlavním cílem ekotoxikologie je vyvíjet metody, které umožňují sledovat nepříznivé vlivy látek na živé organismy a jejich společenstva za standardních a reprodukovatelných podmínek. Zvolené metody by měly umožnit porovnání účinků

různých organismů nebo látek mezi sebou a také srovnání výsledků z různých laboratoří (Rand et Petrocelli, 1995).

### 3.1.2 Ekologická relevance

Aby výsledky odpovídaly skutečným vlivům, ke kterým by došlo v přírodě, je potřeba zajistit testování v reálných ekosystémech, kdy do hodnocení vstupují další biotické a abiotické faktory a je rovněž zohledněno časové hledisko. Splnit tento požadavek je možné pouze při dlouhodobém studiu skutečných ekosystémů (Anděl, 2011). Ekologicky relevantní nazýváme takovou metodu testování toxicity, která je vhodná pro popis účinků testovaných látek na konkrétní ekosystém, např. vodní toky, mokřady, mořské prostředí atd. Jsou-li hodnocena ekologická rizika látek na mořské vodní organismy, je ekologicky relevantní použít test s mořským organismem. Ekologická relevance testu uvádí, zda je možné zjištěnou toxicitu látek interpretovat pro námi sledovaný přírodní ekosystém. Při hodnocení toxicity vzorků na životní prostředí, např. odpadů, je důležité brát v úvahu i způsob a místo jejich možného environmentálního působení.

Ekologicky irelevantní, neboli nevhodnou, nazýváme takovou aplikaci testů toxicity, kdy pozbývá smyslu hodnotit toxicitu látek obsahujících toxické hydrofobní látky testováním toxicity jejich vodných výluhů, neboť hydrofobní látky se do vodního prostředí nemohou uvolnit a tudíž v něm ani nepříznivě působit (Kočí, 2006).

Za ekotoxikologickou studii není možné považovat výsledky testů toxicity pouze na jednom druhu organismu, anebo na jednom biochemickém signálním systému, tzv. biomarkeru. Ekotoxikologické studie by měly vždy zahrnovat výsledky testů toxicity na několika organismech z různých trofických pozic sledovaného ekosystému, jelikož se ekotoxikologie zabývá posuzováním toxických účinků látek na ekosystémy (Kočí et Mocová, 2009). Pro přiblížení výsledků testů reálným podmínkám lze dosáhnout tím, že se použije celá **sada** individuálních samostatných **testů** s různými druhy. Ty jsou vybírány tak, aby reprezentovaly taxonomické i funkční složení ekosystému a to především podle postavení v potravním řetězci (Anděl, 2011). Obvykle se navrhuje sada biotitů zahrnující producenty, konzumenty a destruenty (Kočí, 2006). Celková toxicita látky se posuzuje na základě všech výsledků získaných v dané sadě a je možné si vytvořit základní představu o koncentračním intervalu toxické látky, ve kterém se mohou objevit negativní vlivy. Sady testů se také označují jako baterie testů (Anděl, 2011).



### 3.1.3 Parametry hodnocení ekotoxicity

Podstatou testů toxicity je zjištění střední účinné (efektivní) koncentrace  $EC_{50}$  nebo  $LC_{50}$  (letální koncentrace) a nebo  $IC_{50}$  (inhibiční koncentrace). Tyto indexy představují koncentraci zkoušené látky mající za následek 50 % úhyn, imobilizaci nebo inhibici růstu ve vztahu ke kontrolnímu vzorku. Vliv toxické látky na inhibici růstu ( $IC_{50}$ ) je zjišťován při testech na řasách, inhibice klíčivosti ( $IC_{50}$ ) je zjišťována na semenech a vliv látky na úmrtnost nebo imobilizaci ( $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ) je zjišťován na akvarijských rybách a korýších (*Daphnia magna*) (Říhová Ambrožová, 2009). Čím je hodnota  $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$  nebo  $IC_{50}$  nižší, tím vyvolává hodnocená látka požadovaný účinek při nižší koncentraci a je tudíž toxičtější (Kočí, 2006).

Pro posouzení odezvy testovaného organismu na možný toxický účinek se hodnota efektivní koncentrace doplňuje dalšími hodnotami, např.  $EC_{20}$ ,  $EC_{10}$  nebo  $EC_5$  a další. Např.  $EC_5$  představuje koncentraci s 5 % úhynem testovaných jedinců v daném časovém úseku, dříve označovaná také jako minimální letální koncentrace (Říhová Ambrožová, 2009).

Indexy, které popisují prahové hodnoty, při nichž je koncentrace účinná jsou NOAEC – nejvyšší experimentální koncentrace, při které nebyl pozorován negativní účinek a LOAEC – nejnižší experimentální koncentrace, při které byl pozorován negativní účinek (Anděl, 2011).

Další možnou veličinou, dnes méně používanou, je jednotka toxicity TU. Udává koncentraci (nebo množství) toxikantu vyjádřené jako  $LC_{50}$  (nebo  $LD_{50}$ ). TU je poměr koncentrace toxikantu ku  $LC_{50}$  (nebo resp. množství ku  $LD_{50}$ ) a používá se k vzájemnému porovnání možného rizika jednotlivých toxikantů ve směsích.  $TU = (mg.l^{-1} / mg.l^{-1})$  (Anděl, 2011).

### 3.1.4 Výhody a nevýhody ekotoxikologických testů

Znalost chemické struktury nebo složení testovaného vzorku není k provedení testu toxicity nutná. Avšak kvalitativní a kvantitativní analýza testovaných vzorků může určit jak s neznámým vzorkem nakládat a může sloužit i k odhadu budoucích toxických účinků. Chemická analýza však nemůže plnohodnotně nahradit ekotoxikologické testy a naopak (Kočí et Mocová, 2009).

Hlavní výhodou ekotoxikologických testů je komplexnost vzájemného působení jednotlivých složek testované matrice. Ekotoxikologické testy jsou většinou finančně méně náročné a nepotřebují drahé standardy jako při stanovení některých analytických metod např. organických sloučenin.

Ekotoxikologické testy poskytují rychlé a dostatečně informativní a ekonomické zhodnocení daných vzorků, například během havarijních případů (Kočí et Mocová, 2009). Další výhodou testů je jejich reprodukovatelnost, standardizace,

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

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

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

### 3.1.5 Přehled ekotoxikologických testů

V mezinárodních publikacích, které se zabývají touto problematikou, je možné nalézt různé způsoby dělení ekotoxikologických testů. K základním způsobům nejčastěji patří následující dělení:

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

testovací organismus. Biotesty např. pro stanovení parametrů jako trofie, embryotoxicita, mutagenita, genotoxicita na rostlinách nebo volně žijících zvířatech aj. (Maršálek, 2002).

### 3.2 Ekotoxicita v právních předpisech a normách

Ekotoxicita je ukazatelem využívaným k hodnocení **odpadů** z hlediska hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadu H14 Ekotoxicita a jejich ukládání na skládky či využití na povrchu terénu. Dále je ekotoxicita ukazatelem využívaným k hodnocení **sedimentů** a jejich využití na zemědělské půdě a pro hodnocení a stanovení akutní toxicity **chemických látek** a chemických přípravků.

Mezi nejrozšířenější mezinárodní organizace, které vydávají, aktualizují a nabízí standardizované metodiky a normy v oblasti ekotoxikologických testů patří ISO a OECD. Mezi další patří ASTM, WHO, CEN, U. S. EPA.

Informace o platných normách lze získat např. od Českého normalizačního institutu. V platnosti jsou ČSN (České státní normy) nebo převzaté evropské normy ČSN EN nebo převzaté ISO normy ČSN ISO nebo ČSN EN ISO.

#### 3.2.1 Hodnocení ekotoxicity v EU

Základní rámec politiky EU v oblasti odpadového hospodářství pro hodnocení nebezpečných odpadů je dán směrnicí 91/689/EHS o nebezpečných odpadech a směrnicí 2008/98/ES o odpadech a o zrušení některých směrnic. Směrnice 2008/98/ES byla novelizována nařízením komise (EU) č. 1357/2014, kterým se nahrazuje příloha III směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/98/ES. Příloha III udává vlastnosti odpadů, které je činí nebezpečnými. Mezi patnácti uvedenými nebezpečnými vlastnostmi je definována i ekotoxicita. HP14 „Ekotoxický“: odpad, který představuje nebo může představovat bezprostřední nebo pozdější rizika pro jednu nebo více složek životního prostředí (Nařízení komise EU č. 1357/2014).

Stanovení ekotoxicity odpadů v rámci Evropské unie není jednotné a pro její hodnocení používají jednotlivé státy EU jiné metody a kritéria. Proto byla ve snaze o sjednocení metod v roce 2005 vydána evropská norma EN 14735: Characterization of waste - Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. Česká republika evropskou normu převzala jako ČSN EN 14735: Charakterizace odpadů – Příprava vzorků pro testy ekotoxicity.

Tato evropská norma popisuje kroky, které je nutné provést před provedením ekotoxikologických testů. Účelem normy je dát návod na odběr vzorku, jeho přepravu, skladování a definovat přípravu pro stanovení ekotoxikologických vlastností jednotlivých matric biologickými zkouškami (ČSN EN 14735).

V příloze B normy ČSN EN 14735 jsou uvedeny testy ekotoxicity, které jsou zpravidla používány pro hodnocení rizik chemických látek, kvality půdy nebo jakosti vod. V následujícím přehledu jsou vypsány metody pro terestrické a akvatické ekotoxikologické testy z přílohy B dané normy (ČSN EN 14735).

Metody terestrických testů:

- žížaly - akutní toxicita (ISO 11268-1; OECD Test No. 207)
- žížaly - účinek na rozmnožování (ISO 11268-2)
- chvostoskok - účinek na rozmnožování (ČSN EN ISO 11267)
- brouci - akutní test (ČSN EN ISO 20963)
- roupice - test rozmnožování (ČSN ISO 16387; OECD Test No. 220)
- půdní rostlinstvo - inhibice růstu kořene (ČSN EN ISO 11269-1)
- vliv na vývoj a růst (ČSN EN ISO 11269-2)
- oxidace amoniakálního dusíku - rychlý test (ISO 15685)
- mineralizace a nitrifikace (ISO 14238)
- nedospělí půdní hlemýždi (*Helix aspersa*) (ČSN EN ISO 15952)

Metody akvatických testů:

- *Daphnia magna* - inhibice pohyblivosti (ČSN EN ISO 6341)
- *Daphnia magna* - inhibice rozmnožování (ČSN ISO 10706, OECD Test No. 211)
- *Ceriodaphnia dubia* - rozmnožovací test (ČSN ISO 20665)
- *Brachionus calyciflorus* - rozmnožovací test (ČSN ISO 20666)
- *Vibrio fischeri* - test na luminiscenčních bakteriích (ČSN EN ISO 11348-1,2,3)
- *Pseudomonas putida* - test inhibice růstu (ČSN EN ISO 10712)
- test inhibice růstu sladkovodních řas (ČSN EN ISO 8692; OECD Test No. 201)
- *Lemna minor* - test inhibice růstu (ČSN EN ISO 20079; OECD Test No. 221)
- test akutní toxicity pro sladkovodní ryby (ČSN EN ISO 7346-2; OECD Test No. 203)
- mořští korýši - akutní test toxicity (ISO 14669)
- test inhibice růstu mořských řas (ČSN EN ISO 10253)
- salmonela / mikrosomální test (ISO 16240)
- test UMU (ISO 13829)

Po vydání normy EN 14735 proběhl v roce 2006 mezinárodní okružní test, který měl tuto normu zhodnotit. Cílem mezinárodního okružního testu bylo ověření vhodnosti baterie testů pro hodnocení ekotoxicity odpadů. Okružního testu se zúčastnilo 67 laboratoří z patnácti zemí. Testované látky byly vybrány po konzultaci s výborem CEN. Byly testovány tři druhy odpadů (popel komunálního odpadu; půdy kontaminované PAU; dřevo ošetřované mědí ze zpracovatelských závodů). Základní sadu testů tvořily tři akvatické a dva terestrické ekotoxikologické testy. Testovanými organismy u akvatických testů byly řasy, dafnie, luminiscenční bakterie a u terestrických testů žížaly a rostliny. Doplnková sada testů se skládala z pěti terestrických a pěti akvatických testů ekotoxicity. Výsledky této studie prokázaly, že pro hodnocení ekotoxicity odpadů je norma CEN 14735 vhodná (Becker et al., 2007).

Další normou je CEN/TR 16110: 2010 Characterization of waste - Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste (Charakterizace odpadů – Pravidla pro použití testů ekotoxicity aplikovaných na odpady). V dokumentu jsou uvedeny doporučené testy pro charakterizaci ekotoxikologických odpadů, pro uložení odpadu na skládky nebo pro opětovné využití odpadu. Tento dokument byl vypracovaný technickou komisí CEN/TC 292, která se zabývá charakterizací odpadů a jejich chováním (CEN/TR 16110).

### **3.2.2 Hodnocení ekotoxicity v ČR**

Ekotoxicita jako nebezpečná vlastnost označená kódem H14 je uvedena v seznamu nebezpečných vlastností odpadů v příloze 2 zákona č. 229/2014, kterým se mění zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů.

Ekotoxicita je ukazatelem využívaným k hodnocení odpadů z hlediska hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadu H14 Ekotoxicita podle vyhlášky č. 376/2001 Sb. nebo z hlediska možnosti jejich ukládání na skládky či využití na povrchu terénu podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. a z hlediska využití sedimentů na zemědělské půdě dle vyhlášky č. 257/2009 Sb.

Pro hodnocení a stanovení akutní toxicity chemických látek a chemických přípravků slouží zákon č. 350/2011 Sb. o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon) a vyhláška č. 402/2011 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí.

### **Vyhláška č. 376/2001 Sb.**

Nebezpečná vlastnost označená kódem H14 – Ekotoxicita je definována v příloze 1 vyhlášky č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Tuto nebezpečnou vlastnost mají 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 této vyhlášky alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus hodnoty  $LC_{50}/EC_{50}/IC_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$ .

V příloze 3 k vyhlášce č. 376/2001 Sb. jsou v bodě 7 předepsány metody zkoušek akutní toxicity, které se použijí pro hodnocení vlastnosti H14 Ekotoxicita (v závorce je uvedena doba trvání testu):

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Zkouška akutní toxicity (48 hod.)
- ČSN EN ISO 8692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu zelených sladkovodních řas (72 hod.)
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] - část 2: Obnovovací metoda (96 hod.)
- Metodický pokyn MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů – Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapsis alba* (72 hod.)

(Vyhláška č. 376/2001 Sb.).

### **Vyhláška č. 294/2005 Sb.**

Tabulka č 10.2 přílohy 10 vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu stanovuje požadavky na výsledky ekotoxikologických testů, které musí splňovat, aby odpad mohl být využit na povrchu terénu. Testy akutní toxicity se provádějí s neředěným vodným výluhem odpadu. Dané požadavky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

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

Tab. č. 1: Požadavky na výsledky ekotoxikologických testů

Při splnění požadavků uvedených ve sloupci I. mohou být odpady využity při uzavírání skládky k vytváření ochranné vrstvy kryjící těsnící vrstvu skládky a svrchní rekultivační vrstvy skládky.

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

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

## **Vyhláška č. 257/2009 Sb.**

Ekotoxikologické testy jsou uvedeny i ve vyhlášce č. 257/2009 Sb. o používání sedimentů na zemědělské půdě. Na rozdíl od vyhlášky č. 376/2001 Sb. a 294/2005 Sb., kde jsou testy založeny na testování vodného výluhu odpadu je vyhláška č. 257/2009 Sb. zaměřena na terestrické testy. Příloha č. 4 vyhlášky č. 257/2009 Sb. stanovuje následující ekotoxikologické testy pro testování sedimentů:

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

(Vyhláška č. 257/2009 Sb.).

## **Vyhláška č. 402/2011 Sb.**

Kritéria pro klasifikaci látek a označení nebezpečnosti ekotoxicity jsou uvedena i ve vyhlášce č. 402/2011 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí. Látky jsou dle tohoto zákona vysoce toxické pro vodní organismy, pokud je akutní toxicita  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ,  $IC_{50} \leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$  (Vyhláška č. 402/2011 Sb.).

V současné době probíhá v rámci novely zákona o odpadech příprava novelizace zde uvedených právních předpisů.



### 3.2.3 Testy pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod

Pro ekotoxikologické hodnocení odpadních vod lze použít testy toxicity na vodních organismech. Stejně jako jsou různé metodiky pro hodnocení ekotoxicity odpadů, existuje i řada metodik pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod. Nejsou však stanoveny jednotné postupy ani testovací organismy pro hodnocení ekotoxicity a to komplikuje porovnatelnost a mezilaboratorní srovnání výsledků. Mezi metody, které mohou být použity pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod, řadíme např.:

ČSN EN ISO 11348-1 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi

ČSN EN ISO 11348-2 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi

ČSN EN ISO 11348-3 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi

ČSN EN ISO 15088 Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*)

ČSN EN ISO 20079 Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) - Zkouška inhibice růstu okřešku

ČSN ISO 10229 Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*)

ČSN ISO 10706 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea)

ČSN ISO 12890 Jakost vod - Stanovení toxicity pro embryonální a larvální stadia sladkovodních ryb - Semistatická metoda

ČSN EN ISO 8692 Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas

Nejčastěji používanými testovacími organismy pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod jsou *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, zástupci ryb a jejich vývojová stadia a zelené řasy, např. *Pseudokirchneriella subcapitata*.

## 4. Odpadní vody

Odpadní vody jsou podle § 38 zákona č. 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) definovány jako vody použité v obytných, průmyslových, zemědělských, zdravotnických a jiných stavbách, zařízeních nebo dopravních prostředcích, pokud mají po použití změněnou jakost (složení nebo teplotu), jakož i jiné vody z těchto staveb, zařízení nebo dopravních prostředků odtékající, pokud mohou ohrozit jakost povrchových nebo podzemních vod. Odpadní vody jsou i průsakové vody z odkališť, s výjimkou vod, které jsou zpětně využívány pro vlastní potřebu organizace, a vod, které odtékají do vod důlních, a dále jsou odpadními vodami průsakové vody ze skládek odpadu (Zákon č. 254/2001 Sb.).

### 4.1 Znečištění odpadních vod

Ke znečištění odpadních vod dochází řadou látek nejrůznějších vlastností. Látky se zejména rozdělují na rozpuštěné anorganické a organické a na nerozpuštěné anorganické a organické. Přehled látek, které znečišťují odpadní vody je uveden v tabulce č. 2. Jedním z nejzávažnějších druhů znečištění odpadních vod jsou nerozpuštěné látky a zejména organické, které se usazují a tvoří kal. Organické látky v kalcích bez přístupu kyslíku vyhnívají za vzniku plynů a při jejich rozvíření mohou způsobit kalamitní situaci (úhyn ryb a živočichů) z důvodů náhlé spotřeby kyslíku.

Množství znečištění se určuje z hodnoty celkového množství znečištění a počtu připojených obyvatel na veřejnou kanalizaci. Normované hodnoty znečištění od jednoho obyvatele (populační ekvivalent) se používají pro stanovení tzv. počtu ekvivalentních obyvatel (EO). Počet EO se stanoví jako podíl celkového a specifického znečištění, které je nejčastěji vyjádřeno jako BSK<sub>5</sub> (Pošta et al., 2005). 1 EO je zatížení vyjádřené jako produkce organického biologicky rozložitelného znečištění, která odpovídá pětidenní biochemické spotřebě kyslíku (BSK<sub>5</sub>) 60g O<sub>2</sub> za den (Směrnice 91/271/EHS).

rozpuštěné	organické	biologicky rozložitelné	cukry, mastné kys.
		biologicky nerozložitelné	barviva
	anorganické		těžké kovy, sulfidy
nerozpuštěné	organické	biologicky rozložitelné	škrob, bakterie
		biologicky nerozložitelné	plasty, papír
		usaditelné	celulosová vlákna
		neusaditelné - koloidní	bakterie
		plavoucí	papír
	anorganické	usaditelné	písek, hlína
	neusaditelné	brusný prach	

Tab. č. 2: Přehled znečišťujících látek v odpadních vodách  
(Pošta et al., 2005).

#### 4.1.1 Ukazatele znečištění odpadních vod

Ukazatelů znečištění existuje celá řada a rozdělují se do různých skupin. Např. ukazatele fyzikální, chemické, mikrobiologické, ekologické atd., a proto se pro daný účel volí ty nejvhodnější. Pro každé vody, např. pro pitnou vodu, splaškové nebo průmyslové odpadní vody jsou používány ukazatele odlišné.

Skupiny ukazatelů znečištění odpadních vod:

- Chemické ukazatele – pH, chemické složení, tvrdost vody
- Fyzikální ukazatele – teplota, zákal, barva, vodivost, průhlednost, Redox potenciál
- Biologické ukazatele – saprobní index
- Mikrobiologické ukazatele – koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, enterokoky, mezofilní a psychofilní bakterie
- Ekologické ukazatele – neporušená samočisticí schopnost, podmínky pro život ryb pstruhovitých (vodárenské vody) a kaprovitých (ostatní vody)
- Radiologické ukazatele – celková aktivita alfa a beta, aktivita radonu
- Skupinové technologické ukazatele
  - BSK<sub>5</sub> biochemická spotřeba kyslíku
  - CHSK chemická spotřeba kyslíku
  - C<sub>org</sub> organický uhlík
  - NL nerozpuštěné látky
  - RL rozpuštěné látky
  - VL veškeré látky
  - NEL nepochybně extrahované látky
  - Formy N, P, Cl, S, Fe, Mn, Ca, Mg
  - Toxické kovy Hg, Cd, Pb, As, Cu, Cr, Ni, Zn, Ag, aj.
  - PCB polychlorované bifenyly
  - PAU polyaromatické uhlovodíky
  - RAS rozpuštěné anorganické soli
  - AOX adsorbované organické vázané halogeny
  - LEF látky extrahované fenolem (ropné látky, tuky) (Pošta et al., 2005).

#### 4.1.2 Organické znečištění a jeho ukazatele

Organické látky, které jsou obsažené v odpadních vodách, tvoří velmi pestrú směs. K jejich stanovení slouží ukazatele chemické spotřeby kyslíku (CHSK), biochemické spotřeby kyslíku (BSK<sub>5</sub>) nebo organický uhlík (C<sub>org</sub>).

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanovuje jako množství kyslíku, které je potřebné na chemickou oxidaci všech organických látek. Udává se jako množství O<sub>2</sub> v mg na litr analyzované odpadní vody tj. mg.l<sup>-1</sup>. Oxidaci organických látek je možné provést působením oxidačního činidla, jako je dichroman draselný (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) nebo manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>). Při analýzách odpadních vod se používá dichroman a při analýzách pitných vod manganistan (Pošta et al., 2005).

Biochemická spotřeba kyslíku BSK<sub>5</sub> se stanovuje jako množství kyslíku potřebné na biochemickou oxidaci organických látek. Stejně jako CHSK se udává v mg.l<sup>-1</sup>. K rozkladu organických látek za přítomnosti kyslíku se využívá schopnosti některých mikroorganismů. Při stanovení BSK<sub>5</sub> se vzorek odpadní vody smíchá s ředící vodou nasycenou kyslíkem a stanoví se obsah kyslíku ve vzorku. Po pěti dnech uchování vzorku ve tmě a při teplotě 20°C se vyhodnotí úbytek rozpuštěného kyslíku (Pošta et al., 2005).

Poměr BSK<sub>5</sub>/CHSK je vhodným ukazatelem biologické rozložitelnosti organických látek v odpadních vodách. Organické znečištění odpadní vody je dobře biologicky rozložitelné, pokud je tento poměr větší než 0,5. Biologicky dokonale vyčištěné vody mají tento poměr obvykle menší než 0,1 (Pošta et al., 2005).

#### 4.2 Rozdělení odpadních vod

Za odpadní vody jsou považovány vody, které po použití změny svoje chemické nebo fyzikální vlastnosti (třeba se jen změny teplota vody). Podle svého původu se odpadní vody rozdělují na splaškové, průmyslové, srážkové a vody balastní (Malý et Malá, 1996). Hlavínek et al. (2003) uvádějí ještě vody infekční, zemědělské a odpadní vody ostatní. Dále existují odpadní vody šedé. Šedou vodou je nazývána splašková odpadní voda neobsahující fekálie a moč.

##### 4.2.1 Odpadní vody splaškové

Splaškové odpadní vody jsou odpadní vody vypouštěné do veřejné kanalizace z domácností, škol, restaurací, hotelů, nemocnic a kulturních zařízení. Množství splaškových vod je shodné se spotřebou pitné vody. Jak uvádí Malý et Malá (1996) průměrná produkce splaškových vod je 150 l/osobu za den. Vypouštěné splaškové vody do veřejné kanalizace tvořily v roce 1960 59 % z celkového počtu vypouštěných odpadních vod do veřejné kanalizace, zbylých 41 % tvořily vody

průmyslové a ostatní. V roce 2011 bylo vypouštěno 67,5% splaškových a 32,5% průmyslových a ostatních vod do veřejné kanalizace (ČSÚ, 2012).

V příloze č. 1 k nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod jsou uvedeny emisní standardy ukazatelů přípustného znečištění odpadních vod pro městské odpadní vody. Mezi ukazatele znečištění odpadních vod patří  $CHSK_{Cr}$ ,  $BSK_5$ ,  $NL$ ,  $N-NH_4^+$ ,  $N_{celk}$ ,  $P_{celk}$  (Nařízení vlády č. 61/2003 Sb.).

Organické a anorganické látky obsažené ve splaškových vodách mají původ v a) pitné vodě, b) produktech metabolismu (exkrementech) živých organismů, c) produktech lidské činnosti v domácnostech (např. kuchyňská odpadní voda, prací a čisticí prostředky aj.). Z organických látek jsou zastoupeny tři hlavní skupiny, které jsou obsažené v přírodních materiálech. Jsou to proteiny, lipidy a sacharidy (Malý et Malá, 1996). Přírůstek anorganických látek pochází z moče – chloridy, z pracích a čisticích prostředků – sloučeniny fosforu. Dále se v průmyslových vodách nacházejí sloučeniny síry, sloučeniny dusíku – amoniakální dusík, močovina, volné a vázané aminokyseliny. Obsah biologických látek se stanovuje ukazatelem chemické spotřeby kyslíku  $CHSK$  (Hlavínek et al., 2003).

Splaškové odpadní vody jsou silně zakalené a mají šedou až šedohnědou barvu. Splašková voda nemá hned po vzniku příliš intenzivní zápach, ale po několika hodinách po vyčerpání rozpuštěného kyslíku začnou probíhat anaerobní biologické pochody. Odpadní voda začíná silně zapáchat a intenzivně tmavnout, protože reakcí sulfidické síry se sloučeninami železa se vylučuje černý sulfid železnatý  $FeS$ . Teplota splaškových vod závisí na ročním období, kdy v zimě má teplotu 8 – 12°C a v létě okolo 20°C. Hodnota pH se pohybuje v rozmezí 6,5 – 8,5 (Hlavínek et al., 2003). Orientační složení splaškových odpadních vod je patrné z tabulky č. 3.

<b>Ukazatel</b>	<b>Rozmezí hodnot</b>
Nerozpuštěné látky	200 – 700 mg/l
Rozpuštěné látky	600 – 800 mg/l
pH	6,5 – 8,5
$CHSK_{Cr}$	250 – 800 mg/l
$BSK_5$	100 – 400 mg/l
TOC (DOC)	cca 250 mg/l
$N-NH_4^+$	20 – 45 mg/l
$N_{celk}$	30 – 70 mg/l
$P_{celk}$	5 – 15 mg/l

Tab. č. 3: Orientační složení splaškových odpadních vod

(Hlavínek et al., 2003).

#### 4.2.2 Odpadní vody průmyslové

Jsou to odpadní vody z průmyslových závodů a technologických procesů výroby, z chlazení, z mytí výrobního zařízení. Jsou to např. vody mlékárenské, pivovarské a z jiných odvětví průmyslu (Pošta et al., 2005). Mezi průmyslové odpadní vody se řadí i odpadní vody ze zemědělství. Odpadní vody průmyslové jsou vypouštěny do vodních recipientů samostatně nebo dohromady s vodami splaškovými prostřednictvím veřejné kanalizace (Malý et Malá, 1996). Je snahou, aby průmyslové odpadní vody (např. vody z kalíren, galvanizačních linek, lakoven, dolů, textilního průmyslu atd.), které jsou od vod splaškových odlišné svým charakterem, byly čištěny přímo u zdroje svého vzniku, v čistírnách uzpůsobených pro dané znečištění vod (Pošta et al., 2005). V roce 1863 byly provedeny první testy akutní toxicity u průmyslových odpadních vod (Hoffman et al., 2003).

Příčinou značné rozmanitosti složení průmyslových odpadních vod je různorodost průmyslové výroby. Vody v první řadě obsahují látky, které nacházíme i ve vodách splaškových, jsou však často přítomny ve výrazně rozdílných koncentracích. S nimi ale bývají přítomny i látky, které byly vyrobeny synteticky a v přírodě se přirozeně nevyskytují (Malý et Hlavínek, 1996). Vždy je nutné posoudit, zda průmyslové odpadní vody neobsahují v nepřipustných koncentracích látky toxické, výbušné, hořlavé a jinak škodlivé pro provoz čistírny a kanalizace (Malý et Malá, 1996).

Jen výjimečně se v odpadních vodách sledují jednotlivé organické sloučeniny. Běžnější je stanovení skupiny látek určitého chemického složení nebo vlastností, majících význam z hlediska toxikologického, hygienického nebo obecně ekologického (Malý et Hlavínek, 1996).

K běžným anorganickým látkám, které jsou obsaženy ve vodách, patří soli disociované do různých stupňů na anionty a kationty (Malý et Hlavínek, 1996). Další běžně se vyskytující látkou jsou tenzidy, které se vyskytují jak v průmyslových, tak i ve splaškových vodách, do nichž se dostávají s pracími prostředky. Jsou-li v průmyslových vodách přítomny nadměrné koncentrace toxických látek, musí být před vypuštěním do veřejné kanalizace odstraněny. K výrazně toxickým látkám patří sulfidy a kyanidy. Maximální přípustné množství kyanidů je  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  (Malý et Malá, 1996).

Velice významné z ekologického hlediska jsou těžké kovy, což jsou prakticky všechny kovové prvky, vyjímaje alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Některé z nich (Zn, Ni, Cu, Cr aj.) jsou ve vyšších koncentracích toxické a proto jsou jejich přípustné koncentrace přísně limitované (Malý et Hlavínek, 1996).

### 4.2.3 Odpadní vody srážkové

Odpadní vody srážkové jsou vody odváděné z urbanizovaného povodí, tj. z ulic, veřejných prostranství, nezpevněných ploch i parkovišť a střech do jednotné veřejné kanalizace (Pošta et al., 2005). Jejich množství je závislé na velikosti odvodňované plochy, kvalitě jejího povrchu a sklonu a na intenzitě srážek. Krátkodobé působení srážek dosahuje v maximech hodnot, které převyšují průtok průmyslových a splaškových odpadních vod a tak musí být pro srážkové odpadní vody dimenzována kanalizace (Malý et Malá, 1996).

Kvalita srážkových vod je proměnlivá a závisí na mnoha okolnostech. Nečistoty z povrchu vozovek jsou splachovány dešťovou vodou a uvádí se, že koncentrace organického znečištění je v těchto vodách obdobná jako v odpadních vodách splaškových. Je tedy snaha tyto vody zachytit a čistit. Při tání sněhu se do srážkových vod dostává velké množství posypových solí, což způsobí přechodné zvýšení koncentrace chloridů (Malý et Malá, 1996). Do dešťových vod se také dostávají částice prachu, písku, popílku a to buď přímo z atmosféry, nebo splachem z povrchu vozovek. Ze střech dochází k odnosu a následnému znečištění různými částicemi, ale zejména těžkými kovy (Hlavínek et al., 2003).

Znečištění dešťových vod tvoří široké spektrum různých látek anorganického i organického původu. Anorganické látky v nerozpuštěné i rozpuštěné formě tvoří především sloučeniny dusíku, fosforu, těžké kovy, anionty silných minerálních kyselin ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) a další. Organické látky v nerozpuštěné i rozpuštěné formě jsou zastoupeny především ropnými látkami, pesticidy, dioxiny, chlorovanými uhlovodíky, PAU, PCB, PCDD, PCDF a další (Hlavínek et al., 2003).

### 4.2.4 Vody balastní

Vody balastní jsou podzemní vody, které se do veřejné kanalizace dostávají díky jejím netěsnostem nebo jsou do ní svedené úmyslně (Pošta et al., 2005). Balastní vody ve skutečnosti nejsou odpadními vodami. Jedná se pouze o průnik vod do kanalizace, který svým objemovým množstvím tvoří významný podíl. Balastní vody jsou převážně málo znečištěné a jejich přítomnost v městských odpadních vodách způsobuje zředování (Malý et Malá, 1996).

### 4.2.5 Vody městské

Jsou směsí vod splaškových, průmyslových, srážkových a někdy vod podzemních. Převládající podíl u velkých měst tvoří vody splaškové. Složení odpadních vod měst malých je závislé na podílu průmyslu (Pošta et al., 2005).

Průměrná koncentrace BSK<sub>5</sub> pro městské odpadní vody bývá 150 až 400 mg.l<sup>-1</sup>. Přibližně dvojnásobné koncentrace má složka CHSK<sub>Cr</sub> (Malý et Malá, 1996).

#### **4.2.6 Odpadní vody šedé**

Podle normy ČSN EN 12056-1 (Vnitřní kanalizace – Gravitační systémy) je šedou vodou nazývána splašková odpadní voda neobsahující fekálie a moč, které odtékají z umyvadel, van, sprch, dřezů apod. Šedou vodu, hlavně z koupelen, je možné po úpravě použít jako vodu provozní, tzv. bílou vodu pro splachování záchodů či zalévání zahrad, čímž vzniká výrazná úspora nákladů na stočné a zejména úspora samotné vody. Šedé vody se dělí do několika hlavních kategorií: neseparované šedé vody; šedé vody z kuchyní a myček; šedé vody z umyvadel, van a sprch; ostatní šedé vody.

Produkce šedé vody se pohybuje od 55 do 100 l/EO za den. Jejich opětovným využitím se dá uspořit přibližně 50 % denní spotřeby pitné vody. Čištění šedých vod znamená obranu proti neustálému nárůstu cen pitné vody. Šedé vody se také dají využívat jako tepelný zdroj, jelikož je v nich obsaženo více tepla než v jiných vodách a jsou relativně čisté (Asio, 2015).

### **4.3 Právní předpisy v oblasti odpadních vod**

#### **Evropská unie**

Směrnice evropského parlamentu a rady 2000/60/ES z roku 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky má za účel stanovit rámec pro ochranu vnitrozemských povrchových vod, brakických vod, pobřežních vod a vod podzemních. Jedná se o jednu z nejsložitějších směrnic vytvořenou Evropskou komisí, která pokrývá celou oblast životního prostředí.

Směrnice 2000/60/ES má několik cílů, mezi něž patří prevence a omezování znečištění, podpora udržitelného užívání vod, zlepšení stavu vodních ekosystémů, ochrana životního prostředí. Konečným cílem této směrnice je dosáhnout eliminace a postupného odstranění vypouštění prioritních nebezpečných látek. Komise předloží specifická opatření proti znečišťování vod jednotlivými znečišťujícími látkami, které představují významné riziko pro vodní prostředí a to včetně rizik pro vody užívané k odběru pitné vody. Členské státy mají usilovat o dosažení přinejmenším dobrého chemického a ekologického stavu vod prostřednictvím stanovení a zavedení nezbytných opatření v rámci integrovaných programů opatření (Směrnice 2000/60/ES).

Směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod se týká odvádění, čištění a vypouštění městských odpadních vod a čištění a vypouštění odpadních vod z určitých průmyslových odvětví. Cílem této směrnice je ochrana životního prostředí před nepříznivými účinky vypouštěných odpadních vod (Směrnice 91/271/EHS).



## Česká republika

Obecnou úpravou vod včetně vod odpadních se zabývá zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), v platném znění. Tento zákon vymezuje pojem odpadní vody, upravuje nakládání s nimi, podmínky pro vydávání povolení k vypouštění odpadních vod a stanovuje poplatky za vypouštění odpadních vod do vod podzemních a povrchových (Zákon č. 254/2001 Sb.).

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

Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k **vypouštění odpadních vod do vod povrchových** a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. a nařízení vlády č. 23/2011 Sb. upravuje náležitosti k vypouštění odpadních vod do vod povrchových nebo kanalizací, stanovuje emisní limity, měření objemu vypouštěných odpadních vod a míry jejich znečištění aj. V příloze č. 1 k tomuto nařízení jsou uvedeny emisní standardy ukazatelů přípustného znečištění městských a průmyslových odpadních vod (Nařízení vlády č. 61/2003 Sb.).

Právní předpis, který upravuje **vypouštění odpadních vod do vod podzemních** je nařízení vlády č. 416/2010 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod podzemních. V příloze č. 1 k tomuto nařízení jsou uvedeny ukazatele přípustného znečištění odpadních vod vypouštěných do vod podzemních (Nařízení vlády č. 416/2010 Sb.).

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

Vyhláška č. 123/2012 o poplatcích za vypouštění odpadních vod do vod povrchových udává poplatek za objem vypouštění odpadních vod.

#### **4.4 Odpadní vody ze zdravotnických zařízení**

Jelikož byla v diplomové práci řešena odpadní voda ze zdravotnických zařízení, byla do teoretické části umístěna samostatná podkapitola k dané problematice.

Zdravotnická zařízení spotřebovávají velké množství vody a to až 1 200 l na jedno lůžko za den. Odpadní vody, které z těchto zařízení odcházejí, obsahují mimo jiné mikroorganismy a radioaktivní prvky (Gautam et al., 2007).

V odpadních vodách ze zdravotnických zařízení se dále vyskytují toxické chemické sloučeniny, jako jsou antibiotika, cytostatika, dezinfekční a bělicí prostředky, chlorfenoly, kontrastní látky, těžké kovy, sedativa, analgetika, hormonální léčiva a mnoho jiných látek a léčiv. Tyto látky se později mohou objevit ve vodách podzemních a povrchových (Kümmerer, 2001). Mnoho vypouštěných chemikálií a mikrobiálních látek z nemocnic odolává běžnému čištění odpadních vod a skončí ve vodách povrchových, kde mohou ovlivnit vodní ekosystémy a mohou zasáhnout do potravinového řetězce organismů. Lidé jsou tomuto riziku vystaveni zejména z pitné vody, která je vyrobená z vody povrchové (Pauwels et Verstraete, 2006).

Potenciální rizika spojená s úniky léčiv do životního prostředí se stávají stále významnějším problémem. Přírodní a syntetické hormony představují pro ŽP značné riziko (Crane et al., 2006). Proto by všechny nemocniční odpadní vody měly být před vypouštěním čištěny v místě jejich vzniku. Problematika nemocničních odpadních vod a jejich vypouštění do životního prostředí by měla být řešena v průmyslových i v rozvojových zemích (Pauwels et Verstraete, 2006).

##### **4.4.1 Ekotoxicita nemocničních odpadních vod**

Případná ekotoxicita nemocničních odpadních vod (OV) může být způsobena mnoha faktory:

##### **Těžké kovy v nemocničních OV**

Jedním z faktorů, které mohou způsobit zvýšenou ekotoxicitu nemocničních odpadních vod, jsou těžké kovy. V nemocničních odpadních vodách se běžně vyskytují rtuť a stříbro (Gautam et al., 2007). V odpadních vodách z nemocnic se také vyskytuje platina, která pochází z cytostatik. Koncentrace platiny se v nemocničních odpadních vodách mohou pohybovat v rozmezí 110 – 176 ng/l během dne a přibližně 38 ng/l u vzorků odebraných v noci. Emise platiny z nemocničních odpadních vod je nižší než z jiných zdrojů, ale i tak by jejich vypouštěné koncentrace měly být kontrolovány (Kümmerer et Helmers, 1997).

Ze skupiny těžkých kovů jsou za prioritní znečišťující látky zjištěné v nemocničních odpadních vodách považovány chrom, měď, olovo, rtuť, nikl, stříbro a zinek (Emmanuel et al., 2009).

Dle studie prováděné ve Francii byly v nemocničních i městských odpadních vodách nejčastěji zjištěny prvky stříbra (Ag), gadolinia (Gd) a platiny (Pt). Bylo zjištěno, že Gd a Pt jsou mimořádně toxické. Průměrné koncentrace těchto kovů jsou v nemocničních odpadních vodách přibližně 13 až 27 krát vyšší než v odpadních vodách městských (Goullé et al., 2012). Ve své studii Goullé et al. (2012) analyzovali vzorky odpadních vod z nemocnice s 2 500 lůžky. Cílem bylo zjistit koncentrace stříbra, gadolinia a platiny v odpadních vodách na výstupu z nemocnice a na výstupu z nemocniční ČOV. Koncentrace jednotlivých prvků v odpadních vodách na výstupu z nemocnice byly Ag 1,87  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Gd 2,44  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Pt 0,35  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a na výstupu z ČOV Gd 0,17  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Pt 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace Ag byly pod mezí detekce. Velké procento těchto kovů není zachycováno v ČOV (88 % gadolinia a 69 % platiny) a tak více než 4 kg gadolinia a 350 g platiny je ročně vypouštěno do řeky Seiny (Goullé et al., 2012).

### **Léčiva v nemocničních OV**

Dalším faktorem, který může způsobit zvýšenou ekotoxicitu odpadních vod, jsou léčiva. V posledních letech vzrostl zájem o problematiku možných negativních dopadů léčiv a jejich působení na životní prostředí. Přispívá k tomu nejen vysoká produkce a spotřeba léčiv, ale i jejich nedostatečné odstranění v zařízeních zpracovávající odpady a následné vyloučení do prostředí. Uvolněná léčiva nebo jejich metabolity mohou pro organismy představovat ekotoxikologické riziko (Šídlová et al., 2011).

Spotřeba léčiv se stále zvyšuje. V humánní medicíně v Evropské unii je používáno přibližně 3000 různých látek, zejména kontraceptiva, protizánětlivá léčiva, analgetika, antibiotika, betablokátory, neuroaktivní látky a další. Léčiva jsou z organismu vyloučena z 30 – 60 % v nezměněné formě nebo jako metabolity a s exkrementy se prostřednictvím odpadních vod dostanou do životního prostředí. Značné koncentrace léčiv také obsahují nemocniční odpadní vody, odpadní vody z průmyslové výroby a průsaky skládek odpadních vod. Léčiva, která nejsou snadno degradována v ČOV mohou způsobovat kontaminaci povrchových i podzemních voda a dokonce i vody pitné (Šídlová et al., 2011). Nemocniční odpadní vody způsobují problémy v oblasti životního prostředí, protože jsou 5 – 15 krát ekotoxičtější než odpadní vody městské (Boillot et Perrodin, 2008). Nemocnice jsou jedním z hlavních zdrojů těchto znečišťujících látek, které jsou vypouštěny na ČOV a vzhledem k jejich nedokonalé technologii k odbourávání některých sloučenin se tyto látky šíří do životního prostředí (Orias et Perrodin, 2014).

Nejsou dostatečně prozkoumány ekotoxické účinky léčiv na suchozemské a vodní organismy a jejich okolí, zejména chybí jejich komplexní zhodnocení. Znalosti ze současné doby vypovídají o tom, že léčiva v životním prostředí představují jen malé riziko akutní toxicity. I přes to, že standardní data o akutní toxicitě byla získána pro celou škálu léčiv, tak tyto informace neodrážejí skutečnou toxicitu v reálných podmínkách různých ekosystémů. Přes značné množství uvolňovaných léčiv do životního prostředí prozatím chybí příslušné předpisy či regulace pro komplexní zhodnocení ekotoxikologických rizik. O tom jak by léčiva měla být hodnocena z hlediska možných nežádoucích účinků na životní prostředí, vydaly regulační instituce jen v několika málo případech detailní metodické pokyny. Např. Evropská léková agentura (EMA) uděluje v Evropě licence pro cytotoxické látky. V roce 1995 bylo ustanoveno první doporučení pro testování ekotoxicity, jako nezbytného předpokladu pro registraci léčiv a to podle Směrnice Evropské unie 92/18/EEC. Evropská komise následně vydala specifikuující směrnici 2001/83/EC (O kodexu Společenství týkající se humánních léčivých přípravků), která nařizuje, že povolení pro humánní léky musí být doprovázeno zhodnocením možných rizik pro ŽP (Šídlová et al., 2011).

Orias et Perrodin (2014) zkoumali ve své studii podíl nebezpečnosti pro farmaceutické sloučeniny, které se vyskytují v nemocničních odpadních vodách. Patnáct sloučenin zhodnotili jako zvláště nebezpečné. Léčiva představují hrozbu pro vodní organismy již při velmi nízkých koncentracích. Je nutné charakterizovat míru nebezpečnosti odpadních vod s cílem snížit jejich vypouštění množství do ŽP. Ke stanovení koncentrace vypouštěných léčiv existují tři metody i) teoretický přístup – je zahrnuto množství léčiv, které se v nemocnici používá, ii) experimentální – měření koncentrace léčiv přímo v nemocničních odpadních vodách, iii) stanovení ekotoxicity odpadních vod. Bylo zjištěno, že se v odpadních vodách nejvíce vyskytují antibiotika, antivirotika, antidepresiva a léčiva na anestezii.

Řada studií v průběhu několika posledních let prokázala přítomnost léčiv ve vodním prostředí v měřitelných koncentracích. Mezi zjištěné látky vyskytující se ve vodním prostředí patří nesteroidní protizánětlivé léky, včetně sloučenin používaných jako analgetika. Tyto látky patří k jedné z nejdůležitějších skupin léčiv na celém světě s odhadovanou roční produkcí několika kilotun. Během průzkumu vod v Berlíně se prokázal jako významný kontaminant vodního cyklu především diklofenak, ibuprofen a propyphenazon. V Německu se průměrně spotřebuje 180 tun diklofenaku a ibuprofenu za rok. Nálezy těchto látek ve vodách byly hlášeny i z jiných zemí, ale hodnotící studie jejich možných ekotoxikologických účinků a toxicity směsí, jsou vzácné. Tyto látky byly testovány v 6 koncentracích. Test akutní toxicity neprokázal toxicitu testovaných látek. Pouze diklofenak vykazoval při testech s dafniemi hodnotu  $EC_{50}$  68,0 mg.l<sup>-1</sup> a hodnot  $IC_{50}$  71,9 mg.l<sup>-1</sup> při testování na řasách. Výsledné hodnoty této studie jsou autorem považovány jen za škodlivé a nikoli toxické pro vodní organismy (Cleavers, 2004).

Antibiotika jsou používána ve velkém množství po dobu již několika desítek let a přesto studie o jejich vstupu, výskytu a účincích v životním prostředí a zejména ve vodním prostředí jsou nedostatečné. Předpokládaná spotřeba antibiotik ve světě je okolo 100 000 až 200 000 tun za rok. V roce 1996 bylo v EU použito zhruba 10 200 tun antibiotik a z toho přibližně 50 % bylo aplikováno ve veterinární medicíně a jako stimulatory růstu. (Denní dávka ATB na jednoho člověka v Evropě je 8,3 – 36). Expozice antibiotik v životním prostředí může mít nepříznivé účinky na reprodukci v raných fázích života různých organismů. Vyhodnocení ekotoxikologickými testy prokázalo citlivost sinic, zelených řas i vyšších rostlin na antibiotika. Prokázány byly i ekotoxické účinky na reprodukci *Daphnia magna*. Hodnoty LC<sub>50</sub> pod 1 mg.l<sup>-1</sup> prokázaly toxicitu u larvy komára pisklavého, žábřonožky solné. Testy ekotoxicity s různými druhy ryb neprokázaly žádný toxický účinek vůči testovaným antibiotikům (Kümmerer, 2009).

### **Dezinfekční prostředky v nemocničních OV**

Dalším faktorem, který může způsobit zvýšenou ekotoxicitu nemocničních odpadních vod, jsou dezinfekční prostředky.

Zdravotnická zařízení používají širokou škálu dezinfekčních prostředků, z nichž jsou nejčastěji používány výrobky na bázi chlóru, jako je chlornan sodný a výrobky obsahující aldehydy a jejich deriváty (včetně glutaraldehydu). Glutaraldehyd (GA) je vysoce toxický pro lidi i životní prostředí. Dalším dezinfekčním prostředkem využívaným v nemocnicích je kyselina peroctová. Kyselina peroctová je méně využívána než GA, ale je stejně účinným dezinfekčním prostředkem při nižších koncentracích a je jen mírně toxická pro životní prostředí (Panouilléres et al., 2007).

Chlorování je běžná praxe pro dezinfekci odpadních vod z ČOV, které jsou vypouštěny do recipientů vodních útvarů. Jsou-li chlorované odpadní vody vypouštěny do ŽP, mohou být škodlivé pro vodní organismy i při nízkých koncentracích zbytkového chlóru. Chlorace může vést ke tvorbě vedlejších produktů dezinfekce, které mohou být genotoxické, mutagenní nebo karcinogenní. Jedním z neúčinnějších dezinfekčních prostředků byl prokázán ozon, který je široce používán na neaktivní patogeny v pitné vodě. Při ozonizaci je nebezpečí vzniku toxických vedlejších produktů. UV záření je efektivní dezinfekční technologie odpadních vod, protože je účinná proti řadě patogenních mikroorganismů. Kyselina peroctová se stále více používá jako dezinfekční prostředek pro čištění odpadních vod, ale je o jejím použití nedostatek informací o ekotoxicitě dezinfikovaných odpadních vod (Berninger da Costa et al., 2014).

Některé studie ekotoxicity nemocničních odpadních vod označují čisticí a dezinfekční prostředky jako hlavní příčinu ekotoxicity. Glutaraldehyd (GA) (látkou používanou k dezinfekci předmětů) a povrchově aktivní látky (tenzidy) používané v nemocnicích byly zjištěny v městských kanalizačních sítích a v povrchových vodách.

Ve studii Boillota et Perrodina (2008) byly zkoumány účinky glutaraldehydu a tři povrchově aktivních látek na *Daphnia magna*. Byl pozorován aditivní účinek mezi glutaraldehydem a povrchově aktivními látkami. Jako nejcitlivější a tudíž nejvhodnější testovací organismus pro hodnocení vlivů nemocničních odpadních vod se prokázala *Daphnia magna*. Akutní test s *Daphnia magna* je velice citlivý na čisticí a dezinfekční prostředky. V této studii byl nejtoxičtější látkou GA (24 h EC<sub>50</sub> = 20,03 mg.l<sup>-1</sup>). GA je pro *Daphnia magna* akutně toxický již při nízkých dávkách. Jeho toxicita se při opakované dlouhodobé expozici znatelně nezvyšuje. GA se v nemocničních odpadních vodách vyskytuje v rozmezí 0,5 – 3,72 mg.l<sup>-1</sup>. V kombinaci s jinými chemickými látkami může toxický GA představovat velký environmentální problém (Boillot at Perrodin, 2008).

K dezinfekci nemocničních odpadních vod se často používá chlornan sodný (NaClO). Používá se k omezení šíření patogenních mikroorganismů a původců nozokomiálních infekčních onemocnění. Dezinfekční prostředky na bázi chlóru reagují v odpadních vodách s organickými látkami za vzniku organických sloučenin chlóru jako AOX (halogenované organické sloučeniny), které jsou toxické pro vodní organismy a jsou perzistentní v životním prostředí (Emmanuel et al., 2004). Emmanuel et al. (2004) ve své studii hodnotili toxicitu nečištěných nemocničních odpadních vod na vodní organismy. Byly testovány vzorky odpadní vody z oddělení infekčních a tropických nemocí z nemocnice nacházející se v jihovýchodní Francii. Test byl prováděn po dobu na 24 hodin a sledovala se EC<sub>50</sub>. Testovacími organismy byla *Daphnia magna* a *Vibrio fischeri*. Výsledky z testovacího systému Microtox jsou vyjadřovány v jednotkách toxicity TU. Pro převod TU na ml.l<sup>-1</sup> byl použit vzorec:  $TU = (100 \text{ ml.l}^{-1}) / (IC_{50} \text{ ml.l}^{-1})$ . Průměrná hodnota 24 h EC<sub>50</sub> na *Daphnia magna* byla 44 TU (2,27 ml.l<sup>-1</sup>). Průměrný výsledek 15 min testu EC<sub>50</sub> s *Vibrio fischeri* byl 3,4 TU (29,41 ml.l<sup>-1</sup>). Dále byla provedena fyzikálně-chemická analýza, kde byl stanoven celkový organický uhlík, chloridy, AOX, celkové nerozpuštěné látky a chemická spotřeba kyslíku. Chloridy se ve vzorcích nečištěné nemocniční odpadní vody pohybovaly v rozmezí 63 - 359 mg.l<sup>-1</sup> a AOX byly v rozmezí 0,38 - 1,24 mg.l<sup>-1</sup>.

Výsledky testu na *Daphnia magna* prokázaly vysokou toxicitu nemocničních OV na tomto druhu a korelují s koncentracemi chloridů a AOX. Výsledky této studie také prokázaly, že přidání NaClO do nemocničních odpadních vod, může snížit bakteriální znečištění, ale zároveň může vyvolat toxické účinky na vodní organismy (Emmanuel et al., 2004).

V jiné studii se Emmanuel et al. (2005) zabývali hodnocením ekologických rizik v oblasti nemocničních odpadních vod z oddělení infekčních a tropických nemocí z nemocnice v jihovýchodní Francii. K hodnocení organického znečištění byly stanovovány hodnoty CHSK, BSK<sub>5</sub>. Dále byly měřeny koncentrace halogenovaných organických sloučenin AOX, těžkých kovů (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) a množství fekální bakterie. Pro posuzování toxicity byly použity testy

s *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Daphnia magna*. Měřené hodnoty fyzikálně chemických vlastností se pohybovaly v následujících koncentracích: BSK<sub>5</sub> 200 – 1 559 mg.l<sup>-1</sup>, CHSK 362 – 2 664 mg.l<sup>-1</sup>, nerozpuštěné látky 155 - 298 mg.l<sup>-1</sup>, organický uhlík 160 - 3 095 mg.l<sup>-1</sup>, chloridy 47 – 359 mg.l<sup>-1</sup>, AOX 0,17 – 1,61 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrace většiny sledovaných těžkých kovů nebylo možné stanovit anebo se pohybovaly v tisícinách mg.l<sup>-1</sup>. Prahové hodnoty byly překročeny u BSK<sub>5</sub>, CHSK, AOX.

Výsledky ekotoxikologických testů s *Vibrio fischeri* se lišily v závislosti na délce trvání expozice. Patrné byly rozdíly získaných výsledků 5 min EC<sub>50</sub> (1,54 TU) oproti EC<sub>50</sub> (15 a 30 min). Mezi výsledky získanými z testů po 15 min a 30 min EC<sub>50</sub> nejsou významné rozdíly. Jejich maximální koncentrace byly v rozmezí 4,2 – 4,6 TU. Pro *Vibrio fischeri* byly nemocniční odpadní vody považovány za netoxické. Akutní toxicita nemocničních odpadních vod byla prokázána ve všech testovaných vzorcích na *Daphnia magna* (všechny hodnoty EC<sub>50</sub> byly větší než 2 TU). Hodnoty pro *Pseudokirchneriella subcapitata* 72h EC<sub>50</sub> byly v rozmezí 9 – 56 TU (Emmanuel et al., 2005).

#### 4.4.2 Odvádění a čištění nemocničních OV

Odvádění a čištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení je v České republice upraveno českou technickou normou ČSN 75 6406. Tato norma platí pro navrhování, výstavbu, sanaci a provoz stokových sítí, kanalizačních přípojek a samostatných čistíren odpadních vod pro zdravotnická zařízení produkující infekční a/nebo radioaktivní odpadní vody.

Způsob čištění a zneškodňování odpadních vod a kalů ze zdravotnických zařízení se navrhuje podle výskytu, charakteru a množství choroboplodných zárodků a/nebo radioaktivních látek v těchto odpadních vodách a kalech podle místních podmínek (ČSN 75 6406).

Pro čištění nemocničních odpadních vod lze představit čtyři scénáře:

- 1) přímé vypouštění do životního prostředí,
- 2) čištění v komunálních ČOV,
- 3) čištění v ČOV dané nemocnice a následné vypouštění do životního prostředí,
- 4) čištění v ČOV dané nemocnice a následně v komunální ČOV.

Při třetím způsobu čištění je dosaženo 90 % účinnosti vyčištění. U způsobu čtvrtého je díky dvojitému čištění dosaženo maximálního efektu čištění (Pauwels et Verstraete, 2006).

#### 4.4.3 Rizika nemocničních OV

Ekotoxikologická rizika lze na základě výše uvedeného shrnout následovně. Nemocniční odpadní vody mohou vykazovat rizika pro ekologickou rovnováhu a lidské zdraví. Odpadní vody z nemocnic mohou být toxické, radioaktivní, infekční a mohou obsahovat chemické a farmaceutické odpady a léky. Odpadní vody z nemocnic obsahují znečišťující látky, které jsou nebezpečné a vyžadují ošetření v místě nemocnice, aby se zabránilo kontaminace městských kanalizačních systémů a řek (Gautam et al., 2007).

Některé látky obsažené v odpadních vodách jsou genotoxické a existuje podezření, že jsou možnou příčinou vzniku rakoviny, která je v posledních desetiletích více pozorovaná (Gautam et al., 2007).

Vypouštěné nemocniční odpadní vody, které obsahují halogenované organické sloučeniny (AOX), (rozpouštědla, čisticí a dezinfekční prostředky, léky obsahující chlór a rentgenové kontrastní látky) se dostanou do životního prostředí a mohou ohrozit zdraví a život některých druhů a tím i celé ekosystémy. Některé z těchto látek patřících do AOX jsou vysoce toxické pro ryby a ostatní vodní organismy. Jedná se o látky bioakumulativní (IRZ, 2014).



## PRAKTICKÁ ČÁST

### 5. Metodika

V praktické části diplomové práce byla hodnocena ekotoxicita odpadních vod z Fakultní nemocnice v Motole. Sledovány byly odpadní vody před chlorováním a odpadní vody vypouštěné z čistírny odpadních vod po dezinfekci roztokem chlornanu sodného.

Ekotoxikologické testy byly prováděny v Laboratoři hygieny půdy a odpadů ve Státním zdravotním ústavu v souladu s platnými právními předpisy, českými technickými normami, metodickým pokynem (MŽP ČR 2007) a platným ověřeným SOP laboratoře. Laboratoř hygieny půdy a odpadů běžně provádí mikrobiologické rozborů a ekotoxikologické testy v oblasti nakládání s odpady. Předmětem zkoušení jsou odpady, upravené odpady, vybrané stavební materiály, složky životního prostředí (pískoviště, kaly, sedimenty, rekultivační materiály a venkovní ovzduší), substráty, zeminy, organominerální hnojiva, enzymatické a bakteriální prostředky užívané v životním prostředí a chemické látky (SZÚ, 2015).

K hodnocení ekotoxicity odebraných nemocničních odpadních vod byla použita následující baterie testů: test akutní toxicity na perloočkách (*Daphnia magna*), test akutní toxicity na rybách (*Poecilia reticulata*), test inhibice růstu sladkovodních zelených řas (*Desmodesmus subspicatus*), test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a luminiscenční test na bakterii *Vibrio fischeri*.

V celé praktické části diplomové práce, pokud se uvádí odpadní vody, myslí se pouze odpadní vody ze zdravotnických zařízení, pokud není uvedeno jinak.

#### 5.1. Čistírna odpadních vod Fakultní nemocnice Motol

Odpadní vody byly odebírány z Fakultní nemocnice Motol, která má svou vlastní čistírnu odpadních vod, dále jen ČOV. Trvalý provoz ČOV byl schválen dne 4. 2. 1994 a byly pro něj stanoveny podmínky dle kanalizačního řádu. Celková denní skutečná produkce odpadních vod činí maximálně 100 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>. Pro laboratorní kontrolu se vzorky odebírají ze šachty za jímkou zdržení.

V areálu nemocnice jsou splašková kanalizace a odpadní vody děleny do dvou skupin:

- Infekční splaškové odpadní vody
- Prosté splaškové vody

#### Infekční splaškové odpadní vody

Infekční splaškové odpadní vody jsou zpracovávány v samostatné biologické čistírně a jejich denní produkce se pohybuje mezi 50 – 100 m<sup>3</sup>/den. Čistírna slouží k čištění infekčních splaškových vod z těch objektů nemocnice, které jsou zařazeny

dle ČSN 756406 jako zdravotnická zařízení I. kategorie. Průměrné složení infekčních splaškových odpadních vod je patrné z tabulky č. 4.

Objekty, které jsou napojené na infekční kanalizaci:

- Patologie
- Pavilon infekčních hepatitid
- Infekční část pavilonu TRN (oddělení tuberkulózy a respiračních nemocí)
- Pitevna
- LDN II. (léčebna drogově závislých)
- Vymírací jímky kliniky nukleární medicíny
- Komplex laboratoří dětské části nemocnice a laboratoře II. Lékařské fakulty UK

	<b>Přítok [mg.l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Odtok [mg.l<sup>-1</sup>]</b>
BSK <sub>5</sub>	350	25
CHSK	720	97
Rozp. zbytek po žihání	350	200
Sušina	550	350
pH	-	6 – 8,5
Zbytkové množství Cl	-	0,5 – 5

Tab. č. 4: Průměrné složení infekčních splaškových odpadních vod

ČOV je situována v hospodářské části nemocnice na dvou výškových úrovních. Jedná se o čistírnu dvojstupňovou se samospádem. Česlovna infekčních splaškových vod je umístěna v samostatném objektu na vstupu vod a ostatní technologické soubory jsou umístěny na volné ploše. V hlavní budově ČOV je umístěna chlorovna s chlorační jímkou, jímkou zdržení, zařízení na pasterizaci kalu, strojovna a ovládání čerpadel a dále sociální a technické zázemí a denní místnost obsluhy. Předčištěné a dezinfikované odpadní vody jsou samostatnou stokou vedeny do městské kanalizace.

### **Chlorovna s chlorační jímkou a jímkou zdržení**

V chlorovně se provádí vlastní dezinfekce vody v chlorační jímce smísením přitékající vyčištěné vody s vodou obsahující roztok chlornanu sodného (obsah aktivního chlóru je cca 12-14 %). Z chlorační jímky odtéká voda do jímky zdržení, kde je dostatečně dlouhou dobu zdržení, aby došlo k inaktivaci bakterií chlórem. Na konci toku za jímkou zdržení je sonda pro měření volného chlóru. Obsah volného chlóru je měřen dvakrát denně a jeho obsah se udržuje v rozmezí 0,5-5,0 mg.l<sup>-1</sup>.

## **Prosté splaškové vody z Fakultní nemocnice Motol**

Prosté splaškové vody jsou z nemocnice vedeny samostatně a jsou pouze mechanicky předčištěny a dále vypouštěny do městské kanalizace. Česlovna neinfekčních splaškových vod se nachází v samostatném objektu před hlavní budovou ČOV.

Do česlovny jsou zaústěny neinfekční splaškové vody z dětské části nemocnice, z nemocnice pro dospělé, z kuchyní, prádelny, ubytovny sester, ředitelství a polikliniky (Fuka, 2010).

### **5.2 Výběr vhodných ekotoxikologických metod**

Na základě literární rešerše a zkušeností pracoviště SZÚ byla ekotoxicita nemocničních odpadních vod hodnocena na základě výsledků testů akutní toxicity, které byly prováděny na pěti testovacích organismech: ryby (*Poecilia reticulata*), sladkovodní zelené řasy (*Desmodesmus subspicatus*), perloočky (*Daphnia magna*), semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) a luminiscenční bakterii (*Vibrio fischeri*).

Všechny zde uvedené testy akutní toxicity byly prováděny podle aktuálně platných českých technických norem: ČSN EN ISO 6341 pro testy na perloočkách, ČSN EN ISO 8692 pro testy na sladkovodních zelených řasách, ČSN EN ISO 7346-2 pro testy na sladkovodních rybách, ČSN EN ISO 11348-2 pro testy s *Vibrio fischeri*. Pro semena hořčice bílé byl použit Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů MŽP ČR 2007.

### **5.3 Odběr vzorků**

Vzorky odpadních vod pro diplomovou práci byly odebírány z Fakultní nemocnice v Motole. Odběry vzorků odpadních vod se prováděly ve čtyřech termínech: 24. 9. 2014, 11. 11. 2014, 16. 12. 2014 a 4. 2. 2015. Odběr byl uskutečněn z dosazovací nádrže před chlorací a na odtoku z čistírny odpadních vod po dezinfekci roztokem chlornanu sodného (foto č. 1 v příloze č. 1). Schéma ČOV s vyznačenými místy odběru je na obrázku č. 1 v příloze č. 1.

Odběr vzorků byl proveden pracovníkem z ČOV nemocnice a byly dodrženy pokyny pro odběr vzorků odpadních vod uvedené v ČSN ISO 5667-10. Tato část normy obsahuje podrobné údaje o vzorkování splaškových a průmyslových odpadních vod, k návrhu vzorkovacích programů a způsobů odběru vzorků. Předmětem jsou všechny druhy odpadních vod, tj. průmyslové odpadní vody, surové i vyčištěné splašky (ČSN ISO 5667-10).

Vzorky odpadních vod byly odebírány do pětilitrových plastových kanystrů, které byly označeny místem a hodinou odběru, datem a identifikačním číslem. Před samotným odběrem do kanystrů byl změřen obsah volného chlóru pomocí přenosného kolorimetru HACH. Obsah volného chlóru byl následně znovu změřen v laboratoři. Vzorky odebraných odpadních vod byly převezeny do laboratoře Státního zdravotního ústavu, kde probíhalo jejich další zpracování. Během převozu byly vzorky odpadní vody umístěny v termotaškách s mrazíci vložkami při teplotě cca 8°C.

#### 5.4 Zpracování vzorků v laboratoři

Odebrané vzorky odpadních vod byly ihned po převezení do laboratoře zpracovány. Byl znovu změřen obsah volného chlóru, konduktivita a pH. Dále byly vzorky nemocniční odpadní vody převedeny do plastových lahví o objemu 0,5 l a byly opatřeny čísly, pod kterými byly dále zpracovávány. Přehled vzorků nemocničních odpadních vod s číslem, datem a místem jejich odběru je uveden v tabulce č. 5. Před zahájením testů byly všechny lahve označené číslem vzorku uchovávány v mrazáku při teplotě  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ , aby nedocházelo ke změnám vzorku vlivem biochemických procesů a fyzikálních podmínek.

Číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru
2.3/14/965	24. 9. 2014	FN v Motole – dosazovací nádrž/před chlorací
2.3/14/966	24. 9. 2014	FN v Motole – odtok z ČOV/po chloraci
2.3/14/1096	11. 11. 2014	FN v Motole – dosazovací nádrž/před chlorací
2.3/14/1097	11. 11. 2014	FN v Motole – odtok z ČOV/po chloraci
2.3/14/1141	16. 12. 2014	FN v Motole – dosazovací nádrž/před chlorací
2.3/14/1142	16. 12. 2014	FN v Motole – odtok z ČOV/po chloraci
2.3/15/34	4. 2. 2015	FN v Motole – dosazovací nádrž/před chlorací
2.3/15/35	4. 2. 2015	FN v Motole – odtok z ČOV/po chloraci

Tab. č. 5: Přehled odebraných vzorků nemocničních odpadních vod

#### Měření obsahu volného chlóru

Měření obsahu volného chlóru bylo provedeno pomocí přenosného kolorimetru HACH. Stanovení volného a celkového chlóru se provádí podle ČSN ISO 7393-1. Stanovení volného chlóru probíhá přímou reakcí testovaného vzorku nemocniční odpadní vody s N,N-diethyl-1,4-fenylendiaminem (DPD) při pH 6,2-6,5.

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

## Měření konduktivity

Měření konduktivity neboli elektrické vodivosti bylo provedeno pomocí konduktometru inoLab Cond Level 2 P s vodivostní platinovou elektrodou. Stanovení konduktivity je obvyklou součástí chemického rozboru vod, které umožňuje odhad koncentrace celkové mineralizace a iontově rozpuštěných látek ve vodách. Jednotkou konduktivity je Siemens  $S.m^{-1}$  (nebo  $mS.m^{-1}$ ). Dříve užívaná jednotka  $\mu S.cm^{-1}$  může být převedena podle vztahu:  $1 mS.m^{-1} = 10 \mu S.cm^{-1}$ . Konduktivita závisí na koncentraci iontů, jejich náboji a teplotě roztoku.

## Měření pH

K měření pH odpadních vod byl použit pH metr inoLab pH Level 2 P se skleněnou elektrodou SenTix 61. Před samotným měřením pH probíhala kalibrace přístroje za pomoci dvou kalibračních roztoků firmy Hamilton. Jako první kalibrační roztok byl použit pufr o pH  $7,0 \pm 0,1$  a poté pufr o pH  $4,0 \pm 0,1$ . Měření pH vzorků bylo při teplotě  $21,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5.5 Provedení a vyhodnocení ekotoxikologických testů na vzorcích odpadní vody

Ekotoxicita nemocničních odpadních vod byla hodnocena na základě výsledků testů akutní toxicity, které byly prováděny na pěti testovacích organismech: ryby (*Poecilia reticulata*), sladkovodní zelené řasy (*Desmodesmus subspicatus*), semena hořčice bílé (*Sinapis alba*), perloočky (*Daphnia magna*) a luminiscenční bakterii (*Vibrio fischeri*).

Testy ekotoxicity odebraných vzorků nemocniční odpadní vody se prováděly na všech testovacích organismech, podle postupu uvedeného na obrázku č. 2.

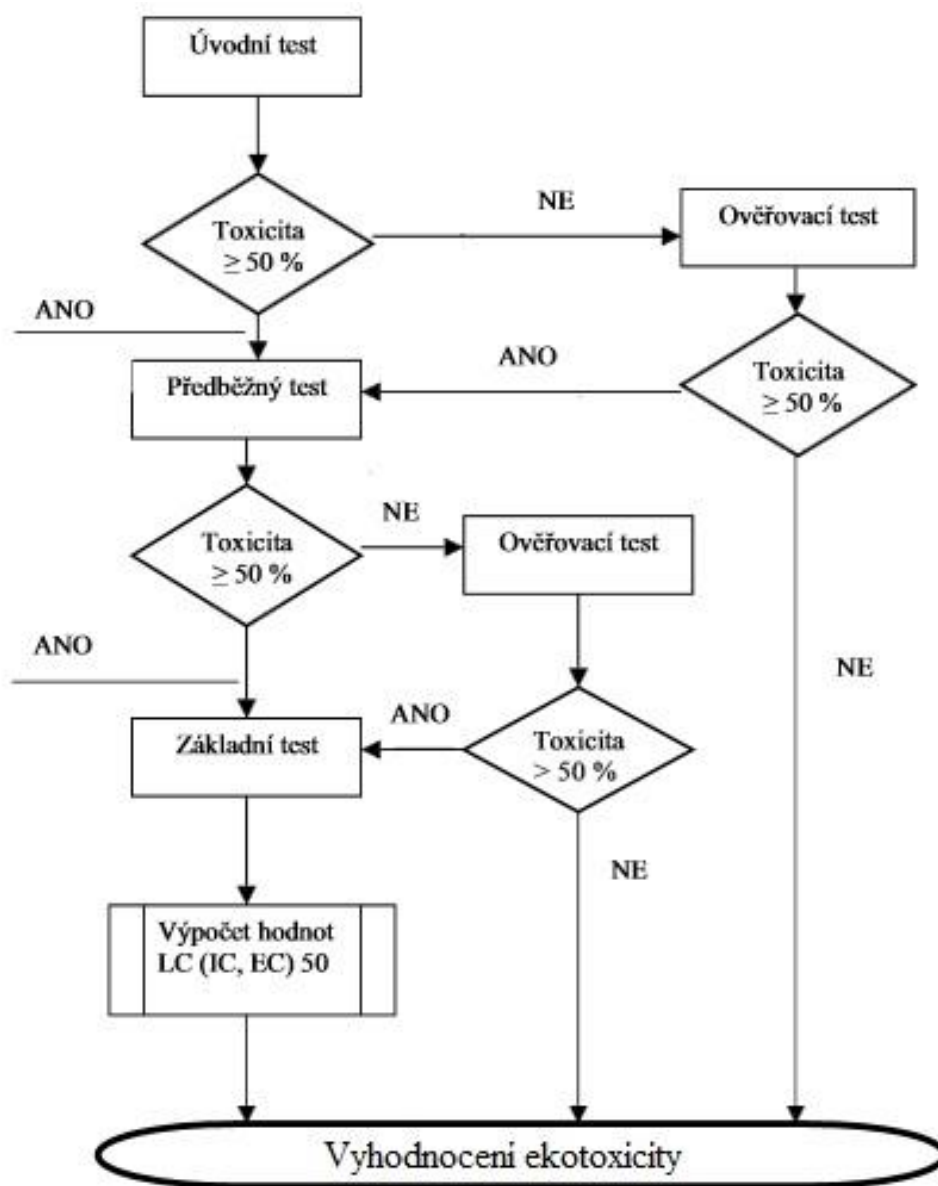
Správnost postupů a ověření citlivosti použitých testovacích organismů je v pravidelných intervalech kontrolována pomocí základního testu se standardem  $K_2Cr_2O_7$ .

U každého odebraného vzorku odpadní vody byl proveden úvodní test s neředěnou odpadní vodou obohacenou o příslušné množství živin. V případě že došlo k úhynu nebo inhibici u méně než 50 % testovacích jedinců, byl proveden test ověřovací s větším počtem jedinců. Pokud ověřovací test potvrdil toxicitu nižší než 50 %, nelze u těchto testovaných vzorků stanovit hodnotu  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ).

Pokud však v úvodním testu vyšla toxicita rovna nebo vyšší než 50 %, tak se dále pokračovalo testem předběžným. Předběžný test se provádí v širokém rozsahu koncentrací s malým počtem testovacích jedinců. Výsledek předběžného testu s toxicitou nižší než 50 % vedl k ověřovacímu testu. Pokud ověřovací test opět potvrdil toxicitu  $< 50 \%$ , nelze u těchto testovaných vzorků stanovit hodnotu  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ). Na základě výsledku předběžného testu s toxicitou  $\geq 50 \%$  byl proveden

základní test. Základní test se provádí s užším rozsahem koncentrací a s větším počtem testovacích organismů. Dle výsledku základního testu byla určena hodnota  $LC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ).

Kontrolní stanovení, které slouží k ověření správnosti podmínek testů a fyziologického stavu testovacích organismů je součástí každého testu ekotoxicity. Jako kontrolní vzorek ve všech testech ekotoxicity se používá ředící voda, do které je přidáván stejný počet organismů jako do testovaných vzorků odpadní vody obohacené živinami. Ředící voda má také využití pro přípravu koncentračních řad s odpadní vodou.



Obr. č. 2: postupový diagram testů k hodnocení ekotoxicity (MŽP ČR, 2007).

## Příprava vzorků

Vzorky odpadní vody byly uchovávány při teplotě  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ . V den nasazení testu se vzorky nechaly rozmrazit ve vodní lázni o teplotě  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Po rozmrazení a dosažení požadované teploty  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , byl vzorek převeden do Erlenmeyerovy baňky (500 ml) a byl obohacen stejnými živinami ve stejném poměru jako destilovaná voda při přípravě ředící vody.

### 5.5.1 Příprava ředící vody pro testy na akvarijských rybách, perloočkách a semenech

Pro testy na rybách, perloočkách a semenech byla připravována ředící voda. Pro přípravu ředící vody byly používány čtyři zásobní roztoky solí, na jejichž přípravu bylo potřebné následující množství chemikálií, které bylo naváženo na analytických vahách (navážky na 1 litr zásobního roztoku):

- Zásobní roztok č. 1: 117,6 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok č. 2: 49,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok č. 3: 25,9 g  $\text{NaHCO}_3$
- Zásobní roztok č. 4: 2,3 g  $\text{KCl}$

Pro přípravu zásobních roztoků byly použity čtyři odměrné baňky o objemu 1 l. Navážené množství bylo vždy přidáno do odměrných baněk, kde bylo přibližně 200 ml destilované vody. Obsah každé baňky byl opatrně promícháván do úplného rozpuštění solí a poté byly všechny odměrné baňky doplněny destilovanou vodou po rysku. Zásobní roztoky byly převedeny do tmavých skleněných lahví opatřených dávkovačem a byly uchovávány při laboratorní teplotě.

Ředící voda byla pro provedení testů vždy připravována čerstvá a jen v takovém množství, které bylo potřebné. Příprava ředící vody (nebo obohacování vzorku odpadní vody) spočívá v přidání potřebného množství výše uvedených zásobních roztoků solí do destilované vody (nebo do vzorku odpadní vody). Na 1 litr destilované vody (nebo vzorku odpadní vody) se dávkuje 2,5 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků.

Hodnota pH čerstvě připravené ředící vody by měla být v rozmezí  $7,8 \pm 0,2$  pro testy na rybách a na semenech nebo  $\text{pH } 7,8 \pm 0,5$  pro testy na perloočkách. V případě potřeby, byla ředící voda upravena přidáním 1M nebo 10 % roztoku hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ) v případě nízkého pH a nebo 1M nebo 10 % roztoku kyseliny chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ ) v případě vysokého pH.

### 5.5.2 Příprava růstového média pro test na zelených řasách

Pro přípravu růstového média pro test se zelenými řasami byly používány následující zásobní roztoky solí (navážky na 1 litr zásobního roztoku):

- Zásobní roztok č. 1 – živiny: 1,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  
1,8 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,16 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- Zásobní roztok č. 2 – Fe-EDTA: 64 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
100 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok č. 3 – stopové prvky: 185 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
415 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 3 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 1,5 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
0,01 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok č. 4 –  $\text{NaHCO}_3$ : 50 g  $\text{NaHCO}_3$

Navážky chemikálií pro jednotlivé zásobní roztoky se rozpustí v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 1 litr a doplní se destilovanou vodou po rysku. Zásobní roztoky byly uchovávány v lednici.

Růstové médium se připraví přidáním příslušného objemu zásobních roztoků živin k destilované vodě v odměrné baňce o požadovaném množství. Odměrná baňka o objemu 1 litr, se částečně naplní destilovanou vodou a poté se do ní dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml zásobních roztoků č. 2, 3 a 4. Odměrná baňka byla téměř po rysku doplněna destilovanou vodou. Před samotným použitím se médium uvedlo do rovnováhy ponecháním přes noc v kontaktu se vzduchem. V případě přípravy v den použití se médium probublávalo filtrovaným vzduchem po dobu 30 minut. Teprve v den přípravy se odměrná baňka doplnila destilovanou vodou po rysku a bylo změřeno pH. Hodnota pH růstového média pro test na řasách by měla být  $8,1 \pm 0,2$ . Pokud se v tomto rozmezí hodnota pH nepohybovala, byla upravena podle potřeby 1M nebo 10 % roztokem NaOH nebo HCl.

### 5.5.3 Test akutní toxicity na akvarijních rybách

Test akutní toxicity byl prováděn na živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) podle metody určené normou ČSN EN ISO 7346-2.

Norma ČSN EN ISO 7346-2 popisuje metody stanovení akutní letální toxicity látek pro danio pruhované (*Brachydanio rerio*), avšak není vyloučeno použití i jiných druhů sladkovodních ryb jako zkušební organismy (*Oryzias latipes*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas*, *Poecilia reticulata*).



Podstatou zkoušky bylo stanovení takové koncentrace, ve které jsou látky letální pro 50 % testovací populace živorodky duhové, vystavené této látce ve vodním prostředí po dobu 24 h, 48 h, 72 h, 96 hodin.

Jako testovací organismus byla používána *Poecilia reticulata*. Laboratoř nemá svůj vlastní chov ryb, a proto jsou dodávány chovatelem akvarijských ryb. Po dodání byly ryby umístěny do zásobních akvárií, kde byly ponechány aklimatizaci po dobu 14 dní. Testovací ryby by měly mít celkovou délku  $30 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$ , což odpovídá hmotnosti  $0,3 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ . Pro testy byla používána obě pohlaví. Testovací ryby musely být bez zjevných nemocí nebo viditelných malformací (ČSN EN ISO 7346-2).

Při každém dodání nových ryb byla zjišťována jejich kvalita pomocí testu provedeného na standardu dichromanu draselného ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

Minimálně 48 hodin před provedením samotného testu akutní toxicity byl potřebný počet ryb (navýšený o několik jedinců) přemístěn ze zásobního akvária do akvária s ředící vodou, která byla nepřetržitě provzdušňována. Tato zásobní populace byla aklimatizována ve stejných podmínkách, jako probíhaly jednotlivé testy. Ryby v adaptaci již nebyly krmeny.

Ředící voda pro kontrolní stanovení a přípravu koncentračních řad byla připravována postupem uvedeným v podkapitole 5.5.1. V případě potřeby bylo pH čerstvě připravené ředící vody pro *Poecilia reticulata* upravováno na hodnotu  $7,8 \pm 0,2$  (ČSN EN ISO 7346-2).

Všechny testy byly prováděny při střídavém osvětlení (12 hodin světlo, 8 hodin tma). Voda v testovacích nádobách byla díky klimatizované laboratoři udržována při teplotě  $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

U všech prováděných testů byla po 24 h, 48 h, 72 hodinách kontrolována teplota vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnota pH. Dále byl zaznamenáván úhyn ryb a mrtvé ryby byly odstraňovány. Po 48 hodinách byly připraveny nové roztoky ředící vody a nové testované neředěné odpadní vody obohacené živinami nebo testované koncentrace odpadní vody do nových testovacích nádob. Ihned po změření teploty, rozpuštěného kyslíku a pH byly do nových roztoků přeneseny živé ryby.

V úvodním testu byly použity kádinky o objemu 600 ml. Na 100 ml roztoku byla použita jedna ryba. Do kádinky bylo nalito 300 (400 nebo 500) ml ředící vody (kontrolní vzorek) a do druhé 300 (400 nebo 500) ml testované neředěné odpadní vody obohacené živinami. U kontrolního vzorku i testované odpadní vody byla změřena koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a hodnota pH. Poté byly do každé kádinky za pomoci síťky umístěny tři (4 nebo 5) ryby z adaptace. Pokud nedošlo k úhynu všech ryb v neředěné odpadní vodě dříve, byl test ukončen po 96 hodinách.

Pokud v průběhu úvodního testu uhynulo v neředěné odpadní vodě více jak 50 % jedinců, byl proveden test ověřovací. V ověřovacím testu bylo použito 1 000 ml ředící vody a 1 000 ml testované neředěné odpadní vody obohacené živinami a do každé testovací nádoby bylo umístěno deset ryb.

Na základě výsledků ověřovacího testu (mortalita vyšší než 50 %) byl proveden test předběžný. V předběžném testu byla zvolena koncentrační řada, která se skládala z pěti koncentrací a kontrolního vzorku. Po změření teploty, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH byly do každé z pěti zkoušených koncentrací a kontrolního vzorku umístěny tři ryby. V případě mortality ryb nižší než 50 % byl proveden test ověřovací.

V případě, že mortalita ryb u předběžného testu byla vyšší než 50 %, provedl se test základní, kde na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro test základní.

### **Vyhodnocování testů**

Na konci testu po 96 hodinách byla zaznamenána mortalita ryb v každé testovací nádobě. Dále byla opět změřena teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH. Teplota testovaných roztoků by neměla kolísat o více než  $\pm 1$  °C a hodnota pH by se neměla změnit o 0,2 jednotek pH (ČSN EN ISO 7346-2).

Na konci každého testu bylo vypočteno procento celkové mortality ryb v neředěné odpadní vodě (úvodní a ověřovací test), ve všech testovaných koncentracích (předběžný test) a v kontrolním vzorku.

Zjištěné a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu Microsoft Office Excel 2007.

Stanovení hodnoty LC<sub>50</sub> se provádí pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2.

### **Kritéria platnosti**

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

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

- e) Hodnota LC<sub>50</sub> referenční látky K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> pro zásobní populaci ryb byla v přiměřené shodě s výsledky dříve dosaženými ve stejné laboratoři (ČSN EN ISO 7346-2).

#### 5.5.4 Test akutní toxicity na perloočkách

Test akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna Straus* byl prováděn podle metody určené normou ČSN EN ISO 6341. Test uvedený v této normě obsahuje stanovení imobilizace vodního korýše *Daphnia magna Straus* po expozici testovanému roztoku po dobu 24 nebo 48 hodin. Imobilizace je definovaná jako neschopnost jedinců plavat do 15 sekund po mírném promíchání kontrolního a zkušebního roztoku, i když stále ještě mohou pohybovat tykadly (anténami) (ČSN EN ISO 6341).

Podstatou zkoušky bylo určení koncentrace, která za 48 hodin imobilizuje 50 % jedinců *Daphnia magna*. Tato koncentrace nazývaná účinná inhibiční koncentrace, se označuje 48 h EC<sub>50</sub>.

Jako testovací organismus byla používána *Daphnia magna* pocházející z laboratorního chovu. Jedinci používaní pro test musí být mladší než 24 h.

Ředící voda pro kontrolní stanovení a přípravu koncentračních řad byla připravována postupem uvedeným v podkapitole 5.5.1. V případě potřeby bylo pH ředící vody pro *Daphnia magna* upravováno na hodnotu  $7,8 \pm 0,5$ .

Den před provedením testu bylo nutné přelit laboratorní chov perlooček přes dvě sítka s rozdílnou velikostí pro oddělení dospělých jedinců od mladých. Přelitím bylo zajištěno, že v den provedení testu, budou jedinci maximálně 24 hodin staří.

Do označených testovacích nádob (skleněné kádinky) bylo odměrným válcem přidáno 50 ml ředící vody (kontrolní vzorek) nebo 50 ml testované neředěné odpadní vody obohacené živinami nebo 50 ml každé testované koncentrace odpadní vody. Do všech testovacích nádob bylo plastovou pipetou vneseno pět jedinců *Daphnia magna* s co nejmenším objemem ředící vody.

Na začátku a na konci testu byla změřena hodnota pH, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku v testované odpadní vodě a v kontrolním vzorku. Testovací nádoby s nasazenými testy byly umístěny v šeru a díky stálé teplotě v laboratoři byla zajištěna požadovaná teplota ( $20 \pm 2$  °C) testovaných i kontrolních roztoků. Během testu nebyly testovací organismy krmeny.

V úvodním testu byly použity čtyři testovací nádoby každá s 50 ml testované neředěné odpadní vody obohacené živinami a čtyři testovací nádoby s 50 ml ředící vody (kontrolní vzorek). Do všech testovacích nádob bylo plastovou pipetou vneseno pět jedinců *Daphnia magna* s co nejmenším objemem ředící vody.

Pokud vyšla imobilizace jedinců *Daphnia magna* v testované odpadní vodě nižší než 50 %, pokračovalo se dále testem ověřovacím. Postup při ověřovacím testu byl stejný jako při testu úvodním. Jen bylo použito šest testovacích nádob neřaděné odpadní vody a šest testovacích nádob s kontrolním vzorkem.

Pokud ovšem vyšla imobilizace jedinců vyšší než 50 %, byl nasazen test předběžný. Předběžný test byl tvořen koncentrační řadou, která se skládala z šesti koncentrací. V každé testované koncentraci má být exponováno pět jedinců a nejsou požadovány žádné replikáty (ČSN EN ISO 6341). V rámci diplomové práce bylo pro zpřesnění výsledků použito deset jedinců ve dvou testovacích nádobách pro každou testovanou koncentraci odpadní vody a pro kontrolní vzorek.

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro test základní. Základní test se skládal ze čtyř testovacích nádob pro každou testovací koncentraci odpadní vody a replikáty kontrolního stanovení. Průběh základního testu byl stejný jako u testu předběžného. I zde koncentrační řadu tvořilo šest koncentrací.

### **Vyhodnocování testů**

Na konci testu po 48 hodinách byli spočítáni pohybliví jedinci *Daphnia magna* v každé testované nádobě. Jedinci, kteří nebyli schopni se rozplavat během 15 sekund po mírném promíchání roztoku, se považovali za imobilizované, i když pohybovali tykadly. Bezprostředně po spočítání imobilizovaných jedinců *Daphnia magna* se změřil koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádobách s kontrolním stanovením a s nejvyšší testovanou koncentrací odpadní vody. Pokud by koncentrace rozpuštěného kyslíku v nejvyšší testované koncentraci odpadní vody klesla pod  $2 \text{ mg.l}^{-1}$ , musela by se změřit koncentrace kyslíku ve všech testovaných koncentracích odpadní vody (ČSN EN ISO 6341).

Na konci každého testu bylo stanoveno procento imobilizovaných jedinců *Daphnia magna* v neřaděné odpadní vodě (úvodní a ověřovací test), ve všech testovaných koncentracích (předběžný a základní test) a v kontrolním vzorku ve vztahu k celkovému počtu použitých jedinců.

Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Office Excel 2007. Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  bylo provedeno pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2.

### **Kritéria platnosti**

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

- a) Procento imobilizace kontrolních vzorků bylo menší než nebo se rovnalo 10 %.
- b) 24 h  $EC_{50}$  pro dichroman draselný byla v rozsahu od 0,6 do 2,1  $\text{mg.l}^{-1}$  (ČSN EN ISO 6341).

### 5.5.5 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé

Test inhibice růstu kořene hořčice bílé byl prováděn podle postupu uvedeného v příloze č. 1 metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (MŽP ČR, 2007). Předmětem testu bylo stanovení ekotoxického účinku odpadních vod na klíčivost semen a růst kořene v počátečních stádiích vývoje rostliny.

Testovacím organismem byla semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) s klíčivostí minimálně 90 %, střední velikosti (1,5 – 2,5 mm), okrově žlutá. Správnost postupu a kvalita semen byla průběžně ověřována pomocí testu provedeného na standardu dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Ředící voda pro kontrolní stanovení a přípravu koncentračních řad byla připravována postupem uvedeným v podkapitole 5.5.1. Hodnota pH ředící vody pro semena hořčice bílé, byla upravována na  $7,8 \pm 0,2$ .

Před provedením každého testu bylo změřeno pH ředící vody (kontrolní vzorek) a pH testované neředěné odpadní vody. Na dna Petriho misek byl vložen vystřižený kruh filtračního papíru, který byl nasycen 10 ml ředící vody nebo 10 ml testované odpadní vody. Na navlhčené filtrační papíry se pinzetou rovnoměrně rozmístilo 30 semen (do 5 řad po 6 semenech). Takto připravené Petriho misky byly opatřeny popiskem s informací, o jaký vzorek se jedná, a byly umístěny do termostatu s teplotou 20 °C bez přístupu světla. Po 72 hodinách byla změřena a zaznamenána délka všech kořenů semen testovaných v odpadní vodě i nasazených v kontrole.

Úvodní test se prováděl s jednou Petriho miskou s 10 ml ředící vody (kontrola) a s jednou Petriho miskou s 10 ml neředěné odpadní vody. V každé Petriho misce bylo rovnoměrně rozmístěno 30 semen.

Předběžný test byl tvořen koncentrační řadou, která se skládala z pěti koncentrací a neředěné odpadní vody. Pro každou testovanou koncentraci odpadní vody a kontrolní vzorek byla použita jedna Petriho miska s 30 semeny.

Na základě výsledku úvodního nebo předběžného testu byl proveden test ověřovací. Ověřovací test se provádí s neředěnou odpadní vodou za podmínek stejných jako u úvodního testu. Do neředěné odpadní vody bylo nasazováno 90 semen (ve třech Petriho miskách) a do kontroly bylo také nasazováno 90 semen (ve třech Petriho miskách).

Na základě výsledku předběžného testu se stanovila vhodná koncentrační řada odpadní vody, která byla tvořena pěti nebo šesti koncentracemi. Pro testování každé koncentrace a pro kontrolu bylo použito 60 semen (ve dvou Petriho miskách).

## Vyhodnocování testů

Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu byla průměrná délka kořene. Byla změřena a zaznamenána délka všech kořenů semen v testované odpadní vodě a v kontrolním vzorku (foto č. 2 a 3 v příloze č. 1). Byl také zaznamenán počet nevyklíčených semen, který se do arytmičského průměru započítával jako semena s nulovou délkou kořene. V případě, že semeno vyklíčilo, ale nevytvořilo kořínek, se tato hodnota započítala do arytmičského průměru rovněž jako nulová. Aritmetický průměr délky kořene stanovený v neřaděné odpadní vodě či testovaných koncentracích odpadní vody byl porovnán s aritmetickým průměrem délky kořene kontrolního vzorku a bylo vypočítáno procento inhibice (zkrácení). V testech s více než 30 semeny na testovanou koncentraci odpadní vody nebo kontroly, by neměla být variabilita výsledků v jednotlivých miskách větší než 30 %. U ověřovacích testů byl vypočítán variační koeficient naměřených délek kořenů ve vzorcích odpadní vody i v kontrole.

Pro výpočty variačních koeficientů a aritmetických průměrů délek kořenů byl použit Microsoft Office Excel 2007. Stanovení hodnoty  $IC_{50}$  bylo provedeno pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2.

### Kritéria platnosti

Výsledky testů se považují za platné, jestliže byly splněny následující požadavky.

- a) Klíčivost semen v kontrole je nejméně 90 %.
- b) Stanovená hodnota  $72 IC_{50}$  standardu dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ) pro testovaná semena je v rozmezí 10 – 50 mg.l-1 (MŽP ČR, 2007).

### 5.5.6 Test inhibice růstu sladkovodních zelených řas

Metoda stanovení inhibice růstu jednobuněčných zelených řas látkami a směsmi obsaženými v odpadních vodách byla určena normou ČSN EN ISO 8692. Podstatou zkoušky byla kultivace inokula rostoucích řasových buněk v příslušném objemu růstového média a zkoušeného vzorku odpadní vody. Zkoušené sady byly inkubovány po dobu  $72 \pm 2$  hod. Inhibice byla měřena jako snížení specifické růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním kulturám rostoucím za stejných podmínek (ČSN EN ISO 8692).

Jako testovací organismus byla používána planktonní sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus* (zásobní řasové kultury). Ve všech testech bylo pracováno s kulturami standardních kmenů pocházejícími z Botanického ústavu akademie věd České republiky v Třeboni.

Příprava růstového média pro přípravu předkultivace, koncentrační řady a kontrolního stanovení je podrobně popsána v podkapitole 5.5.2. pH čerstvého růstového média bylo v případě potřeby upraveno na hodnotu  $8,1 \pm 0,2$ .

Před provedením samotného testu bylo nutné provést předkultivaci, která sloužila jako inokulum pro testy. Předkultivace byla započata 3 dny (72 hodin) před začátkem testu. Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml bylo přidáno 100 ml růstového média a 0,1 ml zásobní řasové kultury. Objem baňky byl promíchán a její hrdlo bylo překryto parafilmem, do kterého bylo preparační jehlou uděláno několik otvorů. Předkultivace byla inkubována v termoboxu za stejných podmínek jako vlastní test. Bezprostředně před použitím předkultivace byla změřena hustota buněk, aby se spočítal potřebný objem inokula pro samotný test. Podle vzorce 1 byl zjištěný počet buněk přepočítán na 1 ml.

$$X = \frac{V \cdot c}{a} \quad (1)$$

kde je

- X      potřebný objem inokula v ml,
- c      požadovaný počet buněk v 1 ml na začátku testu (c = 10 000 buněk),
- V      množství testovaného vzorku v ml (V = 25 ml),
- a      počet buněk v 1 ml řasové kultury z předkultivace (SOP č. 3/2.3 2013).

Počáteční hustota buněk musí být dostatečně nízká, aby umožnila exponenciální růst v kontrolní kultivaci v průběhu testu. Počáteční hustota buněk by proto neměla přesahovat  $10^4$  buněk/ml (ČSN EN ISO 8692).

Každý úvodní test se skládal ze tří replikátů kontrolního stanovení (růstové médium) a tří replikátů neředěné testované odpadní vody obohacené živinami.

V ověřovacím testu bylo používáno šest replikátů kontrolního stanovení a šest replikátů neředěné testované odpadní vody obohacené živinami.

Předběžný test byl tvořen koncentrační řadou (foto č. 4 v příloze č. 1), která se skládala zhruba z šesti koncentrací a sloužila pro stanovení rozmezí koncentrací pro test základní. V předběžném testu nejsou požadovány replikáty zkoušených koncentrací a tak byla pro každou testovanou koncentraci odpadní vody použita jedna Erlenmeyerova baňka. Pro kontrolní vzorek byly použity tři Erlenmeyerovy baňky.

Základní test se skládal z šesti replikátů kontrolního stanovení (růstové médium) a ze tří replikátů pro každou testovanou koncentraci odpadní vody. Zde se koncentrační řada skládala z pěti koncentrací.

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml bylo napipetováno 25 ml růstového média (u kontrolních vzorků) nebo 25 ml testovaného roztoku odpadní vody a k tomu byl přidán vypočítaný objem řasového inokula. Objem baňky byl

promíchán a její hrdlo bylo částečně překryto parafilmem, aby se zabránilo vzdušné kontaminaci a snížilo se odpařování roztoku, ale nesmí se zabránit vstupu CO<sub>2</sub>.

Zkušební nádoby (Erlenmeyerovy baňky) se inkubovaly v termoboxu s kontinuálním bílým osvětlením (rozsah od 6 000 lx do 10 000 lx) při teplotě 23 ± 2 °C po dobu 72 ± 2 hodin. Řasové suspenze v termoboxu byly kontinuálně protřepávány za účelem udržení buněk ve volné suspenzi a usnadnění přestupu CO<sub>2</sub> ze vzduchu do vody, a tím i snížení odchylky pH.

Před odečítáním buněk byl obsah Erlenmeyerových baněk důkladně promíchán. U vzorků odpadních vod může být hustota buněk měřena pouze na začátku a na konci testu. Na začátku i na konci testu byla měřena hodnota pH v jednom replikátu každé zkoušené sady a v jednom replikátu kontrolního stanovení.

### Vyhodnocování testů

Počet narostlých buněk řas byl určen v Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem. K vyhodnocení testu byl použit průměrný počet buněk po 72 hodinách na konci testu napočítaný v Bürkerově komůrce v kontrole, neřaděné testované odpadní vodě nebo v jednotlivých koncentracích odpadní vody. Průměrný počet buněk byl vynásoben přepočtením koeficientem 2 500 a tím byl získán počet buněk v 1 ml, který byl použit pro výpočet specifické růstové rychlosti podle vzorce 2. Specifická růstová rychlost  $\mu$  se vypočítala pro každý replikát testované a kontrolní sady.

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0} \quad (2)$$

kde je

- $n_0$  počáteční hustota buněk,
- $n_L$  hustota buněk měřená v době  $t_L$ ,
- $t_0$  doba začátku zkoušky,
- $t_L$  doba ukončení zkoušky (nebo doba posledního měření během období exponenciálního růstu v kontrolních kulturách).

Inhibice růstové rychlosti v procentech byla vypočtena pro každou zkoušenou sadu replikátů podle vzorce 3.

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} * 100 \quad (3)$$

kde je

- $I_{\mu i}$  inhibice růstové rychlosti v procentech,



- $\mu_i$       růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci  $i$ ,
- $\mu_c$       střední růstová rychlost u kontrolního vzorku (ČSN EN ISO 8692).

Výpočty podle vzorců 2 a 3 byly prováděny v programu Microsoft Office Excel 2007 a EKO-TOX 5.2. U základních testů s inhibicí vyšší než 50 %, byla pomocí probitové analýzy v programu EKO-TOX 5.2 určena hodnota  $IC_{50}$ .

### **Kritéria platnosti**

Test se považuje za platný, pokud jsou splněny následující podmínky.

- a) Průměrná růstová rychlost v kontrolních replikách musí být nejméně  $1,4 \text{ d}^{-1}$ . Tato růstová rychlost odpovídá přírůstků hustoty buněk 67krát za 72 hodin.
- b) Variační koeficient růstové rychlosti v kontrolních replikátech nesmí překročit 5 %.
- c) Hodnota pH v kontrole nesmí během zkoušky vzrůst o více než 1,5 jednotky v porovnání s hodnotou pH růstového média (ČSN EN ISO 8692).

### **5.5.7 Test inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri***

Metoda stanovení inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri* v odpadních vodách byla určena normou ČSN EN ISO 11348-2. Tato část určuje metodu používající sušené bakterie. Podstatou zkoušky bylo stanovení inhibice emise světla kultur *Vibrio fischeri* v koncentrační řadě. Testované objemy vzorku odpadní vody byly ve zkumavkách smíchány se suspenzí luminiscenčních bakterií.

Kritériem testování bylo snížení luminiscence, měřené po 15 a 30 minutách. Pomocí koncentračních řad bylo možné stanovit inhibiční účinek vzorku odpadní vody jako hodnotu  $EC_{50}$ . Bylo stanoveno ředění, které vyvolalo méně než 20 % inhibice emise světla.

Jako testovací organismus byly používány luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri* značky LUMISTox LCK482. Bakteriální suspenze, které se používaly pro stanovení toxicity, se připravují z komerčně dostupných bakterií. Suspenze byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Test byl prováděn na luminometru Sirius (Berthold) a pomocí softwaru FB12 Sirius Software (foto č. 5 v příloze č. 1).

K ověření celého postupu se pravidelně stanovuje  $EC_{50}$  dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ) při expozici 30 min. se standardním roztokem  $8,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cr}^{6+}$ . Hodnota  $EC_{50} \text{ Cr}^{6+}$  by měla být v rozsahu  $2,35 - 4,65 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Jako **ředící roztok** se používal roztok chloridu sodného, který se připravil rozpuštěním 20 g NaCl v destilované vodě a byl doplněn po rysku odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Hodnota pH se podle potřeby upravila na  $7,0 \pm 0,2$ .

Dále bylo používáno **reaktivační médium** pro sušené bakterie, které bylo dodáno s bakteriemi a skládá se z následujících složek:

- 8 g Monohydrát D(+)-glukózy ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )
- 20 g Chlorid sodný (NaCl)
- 2,035 g Hexahydrát chloridu hořečnatého ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )
- 0,30 g Chlorid draselný (KCl)
- 11,9 g Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES)

Složky byly zhruba po 30 minutovém míchání rozpuštěny v destilované vodě a roztok a byl doplněn po rysku odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Hodnota pH byla upravena na  $7,0 \pm 0,2$ . Tento roztok byl uchováván v malých dávkách při teplotě  $-18 \pm 2$  °C (ČSN EN ISO 11348-2).

### Postup zkoušky

Před zahájením zkoušky byla u všech testovaných vzorků změřena koncentrace kyslíku. Pro test byla nutná koncentrace kyslíku větší jak  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Dále byla změřena hodnota pH, která by měla být v rozmezí 6,0 až 8,5. Pro dosažení osmolarity bylo ke vzorkům přidáno  $20 \text{ g.l}^{-1}$  chloridu sodného.

**Suspenze sušených bakterií** byla připravována následující způsobem. Reaktivační médium se po rozmražení vytemperovalo na  $15$  °C  $\pm$   $2$  °C. Ampule s kulturou bakterií se bezprostředně před dehydratací vloží asi na 1 minutu pod tekoucí studenou vodu. Do ampule bylo nepipetováno 0,5 ml reaktivačního média. Po 30 až 60 minutách reaktivace se do ampule nepipetovalo dalších 4,5 ml reaktivačního média. Takto připravená suspenze byla použita pro test při ředění  $D=1$ . Pro ostatní ředění byl celý obsah ampule přelit do zkumavky s reaktivačním médiem. Připravená suspenze je dále pipetována do zkušebních zkumavek v množství 200  $\mu\text{l}$  nebo 500  $\mu\text{l}$ .

Příprava řad ředění je patrná z tabulky č 6. Při testování odpadní vody pomocí odstupňovaných ředění (D) je nejkonzentrovanejší zkoušený roztok, ve kterém není pozorována žádná inhibice, nebo jen malý účinek nepřesahující specifickou variabilitu testu, nazýván „nejnižší neúčinné ředění“.

Množství vzorku: 0,8 ml pro ředění  $D = 1$ ; 0,5 ml pro ostatní ředění

Množství suspenze bakterií: 0,2 ml pro ředění  $D = 1$ ; 0,5 ml pro ostatní ředění

Ředění D	Vzorek odp. vody [μl]	Ředící roztok [μl]	Suspenze bakterií [μl]
1 (D = 1)	800	-	200
D ≥ 2			
2	500	-	500
3	333,3	166,7	500
4	250	250	500
6	166,7	333,3	500
8	125	375	500
12	83,3	416,7	500
16	62,5	437,5	500
24	41,7	458,3	500
<b>Kontroly</b>			
pro D=1	-	800	200
pro D ≥ 2	-	500	500

Tab. č. 6: Příprava řad ředění.

Po minimálně 15-ti minutové temperaci byla luminometrem změřena a zaznamenána intenzita luminiscence zkušební suspenze  $I_0$  ve zvoleném časovém intervalu 30ti sekund. Tento časový interval byl pro všechny vzorky stejný. Ihned po změření luminiscence byla zkušební suspenze doplněna vzorky odpadní vody nebo v případě kontroly roztokem chloridu sodného (ředící roztok) na celkový objem 1 ml. Vzorek byl před odebráním promíchán nasátím a vypuštěním pipetou s čistou špičkou pro každý vzorek. Ihned poté se postupně umisťovaly zkumavky do termostatu s teplotou  $15\text{ °C} \pm 2$  při zachování intervalu 30s mezi jednotlivými vzorky. Intenzita luminiscence ve všech zkumavkách včetně kontrol byla stanovena a zaznamenána po 30 minutách ( $I_{30}$ ).

Základní test byl tvořen koncentrační řadou, která se skládala z osmi koncentrací testovaného vzorku odpadní vody. V základním testu bylo stanoveno procento inhibice luminiscence v jednotlivých koncentracích k určení hodnoty  $EC_{50}$  ve srovnání s kontrolou.

K ověření provedení zkoušky byla s každým vzorkem stanovena inhibice svítivosti luminiscenčních bakterií při ředění  $D = 1$  s  $4,0\text{ mg.l}^{-1}\text{ Cr}^{6+}$  (jako  $0,0057\text{ g}$  dichromanu draselného). Roztok dichromanu draselného při expozici 30 min. způsoboval inhibici 20 až 80 %.

## Vyhodnocování testů

### Inhibiční účinek na luminiscenční bakterie

Ze změřené intenzity luminiscence byl podle vzorce 4 vypočten korekční faktor ( $f_{kt}$ ), který slouží ke korekci počátečních hodnot  $I_0$  všech zkoušených vzorků před jejich použitím jako referenčních hodnot pro stanovení snížení luminiscence, závislém na zkoušeném vzorku.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0} \quad (t = 30 \text{ min}) \quad (4)$$

kde je

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

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

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

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

Podle vzorce 5 byla vypočtena hodnota  $I_{ct}$ :

$$I_{ct} = I_0 * \overline{f_{kt}} \quad (5)$$

kde je

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

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

$I_0$  viz vzorec (4).

Inhibiční účinek zkoušeného vzorku odpadní vody byl vypočten podle vzorce 6:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} * 100 \quad (6)$$

kde je

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

$I_{ct}$  viz vzorec (5),

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

Pro každé ředění byl vypočten průměrný inhibiční účinek  $\overline{H}_t$  v % podle vzorec 7.

V paralelních stanoveních byla vypočtena směrodatná odchylka  $s$  (vzorec 8) hodnot  $H_t$  od příslušných průměrů duplikátů a variační koeficient VK (v %) podle vzorce 9:

$$\overline{H}_t = \frac{H_{t,1} + H_{t,2}}{2} \quad (7)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (H_i - \overline{H}_t)^2}{k-1}} \quad (8)$$

$$CV = (s/\overline{H}_t) * 100 \quad (9)$$

kde je

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

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

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

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

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

k počet paralelních stanovení,

s směrodatná odchylka (%).

Pro vyhodnocení závislosti účinku na koncentracích byla pro každé ředění vypočtena hodnota gama podle rovnice 10:

$$\Gamma_{30} = \frac{\overline{H}_t}{100 - \overline{H}_t} \quad (10)$$

kde je

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

$\overline{H}_t$  průměr hodnot  $H_t$ , viz rovnice 6.

## Stanovení hodnot EC

Pomocí vhodné lineární regresní analýzy byla pro expozici 30 min. vypočtena závislost účinku na koncentraci. Závislost účinku na koncentraci byla popsána touto lineární rovnicí:

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

kde je:

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

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

$b$  směrnice popisované přímky,

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

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

$$c_{30} = EC_{50/30\min} \text{ pro } \Gamma_{30} = 1,00 \quad (\text{ČSN EN ISO 11348-2}).$$

## Kritéria platnosti

Zkouška je platná, jestliže:

- hodnota  $\bar{f}_{kt}$  pro 30 min inkubaci byla v rozsahu 0,6 až 1,3,
- paralelní stanovení pro kontroly i pro zkoušené vzorky, z nichž se určovala hodnota  $EC_{50}$  se neodchylovala od svých průměrů o více než 3 %,
- dichroman draselný způsobuje při 30 min expozici inhibici 20 % až 80 % v následující koncentraci:  
4 mg.l<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> (ekvivalentní 0,0057 g dichromanu draselného) (ČSN EN ISO 11348-2).

## 5.6 Vyhodnocení a zpracování výsledků v programu EKO-TOX verze 5.2

Pro určení hodnot  $IC_{50}$  a  $EC_{50}$  byla v programu EKO-TOX 5.2 použita probitová analýza.

Postup při vyhodnocování výsledků byl následující. Do programu EKO-TOX bylo zadáno číslo vzorku, typ testovaného vzorku (vody, standardizace), testovací organismus a doba expozice.

Při vyhodnocování výsledků z testů na řasách byla ještě volena metoda výpočtu (růstová rychlost), počet dnů (3), počáteční hustota buněk (10 000) a přepočtení koeficient počtu buněk na hustotu buněk (2 500).

Dále byly zadávány vstupní hodnoty. U testů **na řasách** to jsou jednotlivé testované koncentrace odpadní vody, počet buněk v kontrolním testu a počet buněk v jednotlivých koncentracích odpadní vody na konci testu. Na základě těchto hodnot byl programem vypočítán počet buněk v 1 ml a inhibice růstu řas v jednotlivých koncentracích, uvedená v procentech.

Při vyhodnocování výsledků z testů **na perloočkách** se zadávaly jednotlivé testované koncentrace odpadní vody v  $\text{ml.l}^{-1}$  a výsledná imobilizace jedinců *Daphnia magna* v každé testované koncentraci, uvedená v procentech.

Podobně tomu bylo i při vyhodnocování výsledků z testů **na semenech**. I zde se zadávaly jednotlivé testované koncentrace odpadní vody v  $\text{ml.l}^{-1}$  a výsledná inhibice *Sinapis alba* v každé testované koncentraci, uvedená v procentech.

Po zadání vstupních hodnot byla zvolena metoda analýzy a způsob aproximace. Všechny hodnoty  $\text{IC}_{50}$  a  $\text{EC}_{50}$  byly vyhodnoceny pomocí probitové analýzy. U všech testů byla zvolena lognormální aproximace. Výstupem je vypočtená hodnota  $\text{IC}_{50}$  a  $\text{EC}_{50}$  a grafické znázornění daného výsledku.

## 6. Výsledky

V této kapitole jsou uvedeny výsledky ekotoxikologických testů ze vzorků nemocničních odpadních vod odebíraných z Fakultní nemocnice v Motole. Dále jsou zde uvedeny základní fyzikální ukazatele vzorků odpadních vod, které byly naměřeny po převezení do laboratoře. Ukazatele jsou uvedeny v tabulce č. 7. Výjimku tvoří stanovení volného chlóru, který byl u všech vzorků měřen hned po odběru a následně i v laboratoři. Účelem dvojího měření bylo zjistit, zda převoz vzorků nemá vliv na obsah volného chlóru. Ekotoxicita odpadní vody byla stanovována pomocí testů akutní toxicity, které byly prováděny na pěti testovacích organismech, kterými byly *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Sinapis alba* a *Vibrio fischeri*.

V úvodních a ověřovacích testech byla testována ekotoxicita neředěných odpadních vod. U předběžných a základních testů byly testovány toxické účinky jednotlivých koncentrací odpadních vod. Pro kontrolní stanovení byla u všech testů použita ředící voda.

Číslo vzorku	Volný chlór [mg.l <sup>-1</sup> ]		Konduktivita [μS.cm <sup>-1</sup> ]	pH
	Při odběru	V laboratoři		
2.3/14/965	0,1	0,0	25,2	7,47
2.3/14/966	0,25	0,19	1 710	7,35
2.3/14/1096	0,2	0,0	25,6	8,00
2.3/14/1097	0,24	0,18	1 958	8,05
2.3/14/1141	0,04	0,02	24,5	8,27
2.3/14/1142	0,27	0,21	1749	8,25
2.3/15/34	0,1	0,06	25,4	7,86
2.3/15/35	0,29	0,23	1983	8,03

Tab. č. 7: Základní fyzikální ukazatele vzorků odpadních vod

### 6.1 Výsledky testů akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

V tabulce č. 8 jsou uvedeny výsledky úvodních a ověřovacích testů akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*. U všech testovaných vzorků, kromě vzorku E/966 a E/1141 byla mortalita po 96 hodinách v úvodních i ověřovacích testech nižší než 50 %. U vzorku E/966 byla mortalita v úvodním testu nulová, ale ověřovací test potvrdil přesně 50 % mortalitu. Na základě tohoto výsledku byl proveden test předběžný. U vzorku E/1141 byla v úvodním testu mortalita 60 %. Ověřovací test však výsledek nepotvrdil a mortalita jedinců byla menší než 50 %.



Testovací organismus: <i>Poecilia reticulata</i>				
Číslo vzorku	Úvodní test		Ověřovací test	
	Mortalita [%]		Mortalita [%]	
	Odpadní voda	kontrola	Odpadní voda	kontrola
2.3/14/965	25	0	20	0
2.3/14/966	0	0	50	0
2.3/14/1096	20	0	30	0
2.3/14/1097	20	0	40	0
2.3/14/1141	60	0	40	0
2.3/14/1142	20	0	40	0
2.3/15/34	33,3	0	10	0
2.3/15/35	0	0	0	0

Tab. č. 8: Výsledky úvodních a ověřovacích testů akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

Výsledek předběžného a ověřovacího testu provedeného se vzorkem E/966 je uveden v tabulce č. 9. Výsledek předběžného testu byl potvrzen testem ověřovacím, ve kterém byla mortalita testovaných jedinců po 96 hodinách nižší než 50 %, proto nebylo možné u tohoto vzorku stanovit hodnotu LC<sub>50</sub>.

Testovací organismus: <i>Poecilia reticulata</i>				
Číslo vzorku	Předběžný test		Ověřovací test II.	
	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	
2.3/14/966	200	33,3	Odpadní voda	kontrola
	400	33,3	12,5	0
	600	33,3		
	800	0		
	1000	33,3		
	kontrola	0	LC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	Nelze stanovit

Tab. č. 9: Výsledky předběžného a ověřovacího testu akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

## 6.2 Výsledky testů akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

V tabulce č. 10 jsou uvedeny výsledky úvodních a ověřovacích testů akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*. U vzorků odpadní vody E/965, E/1096, E/1141 a E/34 v úvodním i ověřovacím testu byla po 48 hodinách od začátku testu imobilizace testovaných jedinců nižší než 50 %.

Naopak u vzorků E/1097, E/1142, E/35 došlo v úvodním testu k imobilizaci 100 % jedinců do 48 hodin. U testovaného vzorku E/966 došlo v ověřovacím testu k imobilizaci 53,3 % testovaných jedinců do 48 hodin. Na základě výsledků byl u těchto vzorků proveden předběžný test.

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>				
Číslo vzorku	Úvodní test		Ověřovací test	
	Imobilizace [%]		Imobilizace [%]	
	Odpadní voda	kontrola	Odpadní voda	kontrola
2.3/14/965	5	0	10	0
2.3/14/966	35	0	53,3	0
2.3/14/1096	0	5	23,3	3,3
2.3/14/1097	100	5	-	-
2.3/14/1141	40	0	16,7	0
2.3/14/1142	100	0	-	-
2.3/15/34	0	0	3,3	0
2.3/15/35	100	0	-	-

Tab. č. 10: Výsledky úvodních a ověřovacích testů akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

Výsledky předběžných a základních testů akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna* provedených se vzorky E/966 E/1097, E/1142 a E/35 jsou uvedeny v tabulce č. 11. U vzorku E/966 byla u všech testovaných koncentrací odpadní vody imobilizace 0 %. Z tohoto důvodu nelze u vzorku E/966 stanovit EC<sub>50</sub>. Vzorek odpadní vody je považován za netoxický.

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>				
Číslo vzorku	Předběžný test		Základní test	
	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace [%]	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace [%]
2.3/14/966	100	0	500	0
	200	10	590	0
	400	0	696	0
	600	0	822	0
	800	10	970	0
	1000	50		
	kontrola	0	kontrola	0
				EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/14/1097	100	0	150	15
	200	30	218	10
	400	70	316	25
	600	80	458	30
	800	80	664	45
	1000	100	963	70
	kontrola	10	kontrola	0
				EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/14/1142	100	10	50	0
	250	60	80	15
	400	100	128	15
	600	100	205	40
	800	100	328	50
	1000	100	525	90
	kontrola	0	kontrola	0
				EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/15/35	100	0	100	5
	250	10	150	10
	400	70	225	25
	600	100	338	20
	800	90	507	75
	1000	100	761	85
	kontrola	0	kontrola	5
				EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]

Tab. č. 11: Výsledky předběžných a základních testů akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

Hodnoty v základním testu u vzorku E/35 byly velice rozdílné, a proto byl základní test proveden znovu (tabulka č. 12).

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>		
Číslo vzorku	Základní test II.	
	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace [%]
2.3/15/35	152	5
	230	20
	348	35
	527	55
	798	100
EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]		<b>341,1</b>

Tab. č. 12: Výsledky základního testu akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

Na základě vyhodnocení základních testů byla vypočtena koncentrace EC<sub>50</sub> v programu EKO-TOX 5.2 pomocí probitové analýzy. Výstupy z tohoto programu, podle kterých byly určeny hodnoty EC<sub>50</sub> jsou uvedeny v příloze č. 2 na obrázcích č. I (vzorek E/1097), II (vzorek E/1142) a III (vzorek E/35).

### 6.3 Výsledky testů inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

V tabulce č. 13 jsou zaznamenány výsledky úvodních, předběžných a ověřovacích testů inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*. U testovaných vzorků odpadní vody E/965, E/966, E/1096, E/1141 a E/34 byla v úvodním i ověřovacím testu inhibice růstu kořene po 72 hodinách nižší než 50 %.

V úvodním testu došlo u vzorku E/1097 k 51,2 % inhibice růstu kořene. Na základě tohoto výsledku byl proveden test předběžný. Výsledek předběžného testu u vzorku E/1097 byl potvrzen testem ověřovacím (tab. č. 13), ve kterém byla inhibice růstu kořene hořčice bílé po 72 hodinách pod 50 %.

U vzorku E/1142 došlo v úvodním testu k inhibici 54,8 % a tak se podle postupového diagramu pokračovalo testem předběžným. Předběžný test ovšem prokázal toxicitu nižší než 50 % a tak byl proveden test ověřovací, v kterém byla inhibice 63,5 %.

Z tabulky č. 13 je dále patrné, že u vzorku E/35 došlo v úvodním testu k inhibici 69,6 %.

Testovací organismus: <i>Sinapis alba</i>						
Číslo vzorku	Úvodní test	Předběžný test		Ověřovací test	VK* [%]	
	Inhibice [%]	koncentrace [ml/l <sup>-1</sup> ]	Inhibice [%]	Inhibice [%]	Kontr.	OV
2.3/14/965	44,7	-	-	18,5	22,5	7,1
2.3/14/966	48,2	-	-	37,4	22,5	7,9
2.3/14/1096	31,4	-	-	44,0	6,3	3,9
2.3/14/1097	51,2	100	10	39,8	3,1	25,0
		200	13,2			
		400	14,9			
		600	16,8			
		800	6,8			
		1000	21,9			
		kontrola	-			
2.3/14/1141	26,0	-	-	19,6	9,4	7,8
2.3/14/1142	54,8	100	1,4	63,5	17,4	28,2
		250	15,4			
		400	9,4			
		600	4,3			
		800	13,1			
		1000	11,6			
		kontrola	-			
2.3/15/34	42,2	-	-	32,9	10,9	12,3
2.3/15/35	69,6	100	22,1	-	-	-
		250	29,9			
		400	1,8			
		600	44,3			
		800	41,6			
		1000	59,9			
		kontrola	-			

Tab. č. 13: Výsledky úvodních, předběžných a ověřovacích testů inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

\*Variační koeficient v testovaném vzorku a kontrolním stanovení s více replikáty by neměl být větší než 30 % (MŽP ČR, 2007).

V tabulce č. 14 jsou zaznamenány výsledky předběžných, ověřovacích a základních testů inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) provedených se vzorky E/1142 a E/35.

Z důvodů výsledku předběžného testu pod 50 % (ověřovací test 63,5 %) byl u vzorku E/1142 proveden předběžný test znovu (tab. č. 14 - Předběžný test II.). Inhibice v předběžném testu II. byla opět pod 50 % a ověřovací test II. prokázal inhibici 63,6 %. V základním testu vyšla inhibice růstu kořene hořčice bílé nižší než 50 %, a proto nebylo možné hodnotu  $IC_{50}$  u tohoto vzorku stanovit.

Na základě výsledku předběžného testu provedeného se vzorkem E/35 byl proveden test základní (tab. č. 14).

Testovací organismus: <i>Sinapis alba</i>					
Číslo vzorku	Předběžný test II.		Ověřovací test II.	Základní test	
	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice [%]	Inhibice [%]	koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice [%]
2.3/14/1142	100	10		300	5
	250	20,4		405	1,4
	400	29,8		547	18,9
	600	6,1		738	31,7
	800	19,7		996	47,3
	100	45,5		63,6	$IC_{50}$ [ml.l <sup>-1</sup> ]
2.3/15/35	-	-	-	400	14,1
				480	20,3
				576	27,7
				691	32,3
				829	46,3
				995	70,5
				$IC_{50}$ [ml.l <sup>-1</sup> ]	815,2

Tab. č. 14: Výsledky předběžného, ověřovacího a dvou základních testů inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Hodnota  $IC_{50}$  byla u vzorku E/35 vypočtena na základě vyhodnocení základního testu v programu EKO-TOX 5.2 pomocí probitové analýzy. Výstup z tohoto programu, na jehož základě byla určena hodnota  $IC_{50}$  je uveden v příloze č. 2 na obrázku č. XII.

#### 6.4 Výsledky testů inhibice růstu zelených řas *Desmodesmus subspicatus*

U všech testovaných vzorků odpadní vody došlo v úvodním testu k inhibici růstu zelených řas větší než 50 %. Variační koeficienty růstové rychlosti v kontrolách nepřekročily v žádném z úvodních testů 5 % (tab. č. 15).

Testovací organismus: <i>Desmodesmus subspicatus</i>		
Číslo vzorku	Úvodní test	
	Inhibice [%]	VK růstové rychlosti [%]
2.3/14/965	81,82	2,9
2.3/14/966	72,09	2,9
2.3/14/1096	93,08	1,9
2.3/14/1097	89,86	1,9
2.3/14/1141	93,38	2,5
2.3/14/1142	96,23	2,5
2.3/15/34	79,26	1,9
2.3/15/35	99,11	1,9

Tab. č. 15: Výsledky úvodního testu inhibice růstu řas *Desmodesmus subspicatus*

Výsledky předběžných a základních testů inhibice růstu zelených řas (*Desmodesmus subspicatus*) provedených se vzorky odpadní vody E/965, E/966, E/1096 a E/1097 jsou uvedeny v tabulce č. 16. Variační koeficient růstové rychlosti v kontrolních replikátech (tab. č. 16) nesmí překročit 5 % (ČSN EN ISO 8692).

Výsledky předběžných a základních testů inhibice růstu zelených řas (*Desmodesmus subspicatus*) provedených se vzorky E/1141, E/1142, E/34 a E/35 odpadní vody jsou uvedeny v tabulce č. 17. Variační koeficienty růstové rychlosti jsou uvedeny ve stejné tabulce.

Testovací organismus: <i>Desmodesmus subspicatus</i>					
Číslo vzorku	Předběžný test		Základní test		
	Koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice/ Stimulace* [%]	Koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice/ Stimulace* [%]	
2.3/14/965	50	-3,0	kontrola	-	
	100	8,9	200	-23,0	
	250	18,2	296	-16,5	
	400	32,0	438	4,1	
	600	60,7	648	38,7	
	800	70,2	959	78,4	
	1000	88,0			
	VK [%]	4,8	VK [%]	4,0	
				IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<b>736,6</b>
2.3/14/966	50	-6,9	kontrola	-	
	100	1,0	200	1,6	
	250	6,0	296	4,7	
	400	15,6	438	12,2	
	600	32,0	648	40,1	
	800	60,3	959	75,6	
	1000	83,0			
	VK [%]	1,5	VK [%]	3,3	
				IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<b>721,3</b>
2.3/14/1096	100	-10,0	kontrola	-	
	250	11,4	200	0,4	
	400	40,6	296	14,3	
	600	71,4	438	40,0	
	800	88,4	648	91,4	
	1000	91,6	959	95,3	
	VK [%]	1,4	VK [%]	4,2	
				IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<b>467,3</b>
	2.3/14/1097	100	20,7	kontrola	-
	200	34,7	200	25,7	
	400	65,0	296	48,0	
	600	81,2	438	67,7	
	800	>100	648	80,3	
	1000	>100	959	85,1	
	VK [%]	1,1	VK [%]	4,0	
				IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<b>323,7</b>

Tab. č. 16: Výsledky předběžných a základních testů inhibice růstu zelených řas *Desmodesmus subspicatus*; \*Záporná hodnota je vyjádřena jako stimulace



Testovací organismus: <i>Desmodemus subspicatus</i>				
Číslo vzorku	Předběžný test		Základní test	
	Koncentrace [ml/l <sup>-1</sup> ]	Inhibice/ Stimulace* [%]	Koncentrace [ml/l <sup>-1</sup> ]	Inhibice/ Stimulace* [%]
2.3/14/1141	100	6,6	kontrola	-
	250	6,2	300	0,6
	400	11,6	405	15,3
	600	54,2	547	37,3
	800	79,7	738	70,4
	1000	86,1	996	85,8
	VK [%]	3,9	VK [%]	4,6
	IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]			<b>637,8</b>
2.3/14/1142	100	35,5	kontrola	-
	250	57,5	70	32,8
	400	63,4	112	50,7
	600	69,0	179	56,4
	800	88,0	286	61,1
	1000	91,3	458	61,8
	VK [%]	3,2	VK [%]	2,5
	IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]			<b>151,5</b>
2.3/15/34	100	-12,9	kontrola	-
	250	-11,2	400	12,1
	400	5,3	500	27,7
	600	28,1	625	38,1
	800	56,2	781	54,4
	1000	75,9	976	66,6
	VK [%]	3,4	VK [%]	3,7
	IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]			<b>743,5</b>
2.3/15/35	100	35,3	kontrola	-
	250	55,2	50	15,4
	400	65,9	93	35,2
	600	80,0	173	53,0
	800	95,1	323	66,0
	1000	100,0	602	80,6
	VK [%]	4,2	VK [%]	4,7
	IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]			<b>175,6</b>

Tab. č. 17: Výsledky předběžných a základních testů inhibice růstu zelených řas *Desmodemus subspicatus*; \*Záporná hodnota je vyjádřena jako stimulace

Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočteny na základě vyhodnocení výsledků základních testů v programu EKO-TOX verze 5.2 pomocí probitové analýzy. Výstupy z tohoto programu, podle kterých byly určeny hodnoty EC<sub>50</sub> jsou uvedeny v příloze č. 2 na obrázcích č. IV (vzorek E/965), V (vzorek E/966) a VI (vzorek E/1096), VII (vzorek E/1097), VIII (vzorek E/1141), IX (vzorek E/1142), X (vzorek E/34), XI (vzorek E/35).

### 6.5 Výsledky testů inhibice luminiscence emitované bakteriemi *Vibrio fischeri*

V základním testu bylo stanoveno procento inhibice luminiscence v různých koncentracích k určení hodnoty EC<sub>50</sub> ve srovnání s kontrolou. Naměřené hodnoty se vyhodnocovaly pomocí softwaru Excel.

Během vyhodnocování luminiscenčního testu s *Vibrio fischeri* se musí korekční faktor po dobu expozice 30 min. pohybovat v rozmezí 0,6 až 1,8 a variační koeficient paralelních stanovení musí být menší než 3 % (ČSN EN ISO 11348-2). Tato kritéria byla u všech testovaných vzorků nemocniční odpadní vody splněna.

Pomocí jednoduché lineární regresní analýzy byla pro expozici 30 min. vypočtena závislost účinku na koncentraci a metodou nejmenších čtverců byly vypočítány hodnoty EC<sub>50</sub>,

v kterých EC<sub>50/30min</sub> pro  $\Gamma_{30} = 1,00$  (ČSN EN ISO 11348-2).

Výsledky testů inhibice luminiscenčních bakterií *Vibrio fischeri* po expozici 30 min. provedených se vzorky odpadní vody jsou uvedeny v tabulce č. 18.

Testovací organismus: <i>Vibrio fischeri</i>	
Číslo vzorku	Základní test [ml.l <sup>-1</sup> ]
	EC <sub>50/30min</sub>
2.3/14/965	790,4
2.3/14/966	NS *
2.3/14/1096	NS
2.3/14/1097	626,2
2.3/14/1141	NS
2.3/14/1142	319,1
2.3/15/34	419,3
2.3/15/35	391,6

Tab. č. 18: Výsledky testů inhibice luminiscenčních bakterií *Vibrio fischeri* po expozici 30 min

\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnotu EC<sub>50</sub>, protože inhibice bakterií byla nižší než 50 %.

## 7. Diskuse

V diplomové práci byla testována a hodnocena ekotoxicita osmi vzorků nemocničních odpadních vod, které byly odebírány ve čtyřech termínech z Fakultní nemocnice v Motole. Čtyři vzorky odpadní vody (E/965, E/1096, E/1141, E/34) byly odebírány před samotnou dezinfekcí odpadních vod a čtyři vzorky (E/966, E/1097, E/1142, E/35) na odtoku z čistírny odpadních vod po dezinfekci roztokem chlornanu sodného.

Fakultní nemocnice v Motole je největším zdravotnickým zařízením v ČR. V nemocnici se mimo jiné nachází i onkologické a infekční oddělení, které jsou zdrojem mikrobiálního znečištění a látek s prokazatelnými ekotoxickými účinky jako jsou cytostatika, hormonální léčiva a další.

Cílem diplomové práce bylo stanovení ekotoxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení na základě provedení ekotoxikologických testů. Během práce se ukázalo, že je třeba zjistit vliv chlorace, která se provádí na vodách z vybraných pracovišť, a proto bylo toto sledování zařazeno jako další cíl. Na základě získaných výsledků bude diskutována případná ekotoxicita odpadních vod. Vzhledem k tomu, že ani neexistují jednotné metodiky pro posuzování ekotoxicity odpadních vod z nemocničních zařízení, je složité jak vyhodnocení ekotoxicity, tak posouzení samotné baterie vybraných testů.

Pro hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod byla použita sada ekotoxikologických testů s následujícími testovacími organismy: perloočky *Daphnia magna*, zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*, semena hořčice bílé *Sinapis alba*, akvarijní ryby *Poecilia reticulata*, luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*.

Způsob hodnocení ekotoxicity odpadních vod se u různých autorů liší, stejně jako limity v některých právních předpisech. Někteří autoři považují za ekotoxické vzorky, u kterých se dá stanovit  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$  (Kern et al., 2015; Emmanuel et al., 2004; Boillot et Perrodin, 2008). Jiní autoři, např. Berninger da Costa et al. (2014), hodnotí ekotoxicitu na základě změn účinku působení odpadních vod na organismy v % u neřaděných vzorků. Za toxické se považují změny vyšší než 20-30 % dle druhu organismu a testu.

V České republice nejsou závazně stanoveny žádné limitní hodnoty pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod. Je proto obtížné určit, kdy považovat účinek testovaných odpadních vod za ekotoxický a kdy ještě ne.

V české legislativě je dán limit pro odpady. Odpad se považuje za ekotoxický, když jeho vodný výluh vykazuje hodnoty  $LC (EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$ .

Pro ukládání odpadu na skládky je ekotoxicita hodnocena na základě změn účinku působení výluhu na organismy v % (neřaděných vzorků). Právě vyhláška č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využití na

povrchu terénu stanovuje požadavky na výsledky ekotoxikologických testů, které musí splňovat, aby odpad mohl být využit na povrchu terénu. Pro hodnocení ekotoxicity se nevyužívají hodnoty LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub>, ale hodnotí účinky neředěného výluhu (%) v porovnání s kontrolou. Podobně jsou postavena kritéria pro stanovení ekotoxicity sedimentů dle vyhlášky č. 257/2009 Sb.

### 7.1 Porovnání výsledků testů získaných metodami s různými organismy

U odpadních vod byla testována toxicita pro neředěné vzorky a dále pak byla zjišťována hodnota LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub>.

V tabulce č. 19 jsou uvedeny hodnoty EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> pro testovací organismy *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus*, *Sinapis alba* a *Vibrio fischeri*. EC<sub>50</sub> nebo IC<sub>50</sub> bylo možné stanovit pouze u vzorků odpadních vod, které vykazovaly ekotoxicitu ≥ 50 % pro neředěnou odpadní vodu. Hodnota EC<sub>50</sub> byla stanovována u vzorků odpadní vody, které způsobily minimálně 50 % úhyn či imobilizaci perlooček (*Daphnia magna*) a hodnota IC<sub>50</sub> u vzorků, které způsobily minimálně 50 % inhibici růstu řas (*Desmodesmus subspicatus*), kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) nebo inhibici luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri*.

Mortalita testovacích jedinců ryb (*Poecilia reticulata*) byla u všech testovaných vzorků odpadní vody nižší než 50 % a proto nebylo možné stanovit hodnoty LC<sub>50</sub>. Ryby (*Poecilia reticulata*), stejně jako semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) byly nejméně citlivé k testovaným odpadním vodám.

Číslo vzorku	Testovací organismus			
	<i>Daphnia magna</i> EC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Desmodesmus subspicatus</i> IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Sinapis alba</i> IC <sub>50</sub> [ml.l <sup>-1</sup> ]	<i>Vibrio fischeri</i> EC <sub>50/30min</sub>
2.3/14/965	NS*	736,6	NS	790,4
2.3/14/966	NS	721,3	NS	NS
2.3/14/1096	NS	467,3	NS	NS
2.3/14/1097	687,7	323,7	NS	626,2
2.3/14/1141	NS	637,8	NS	NS
2.3/14/1142	251,1	151,5	NS	319,1
2.3/15/34	NS	743,5	NS	419,3
2.3/15/35	341,1	175,6	815,2	391,6

\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnoty EC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>, protože mortalita, inhibice nebo imobilizace jedinců u neředěného vzorku odpadní vody byla nižší než 50 %.

Tab. č. 19: Výsledné hodnoty EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> testovaných odpadních vod u jednotlivých organismů, mimo ryb, u kterých tyto hodnoty nebyly stanoveny; Barevně jsou označeny vzorky po chloraci

Z výsledků uvedených v tabulce č. 19 se ukazuje, že hodnoty ekotoxikologických testů provedených s jednotlivými vzorky odpadní vody se u jednotlivých metod lišily, viz graf č. 1. Různé hodnoty byly zaznamenány i u metod s různými organismy u jednoho vzorku, viz graf č. 2.

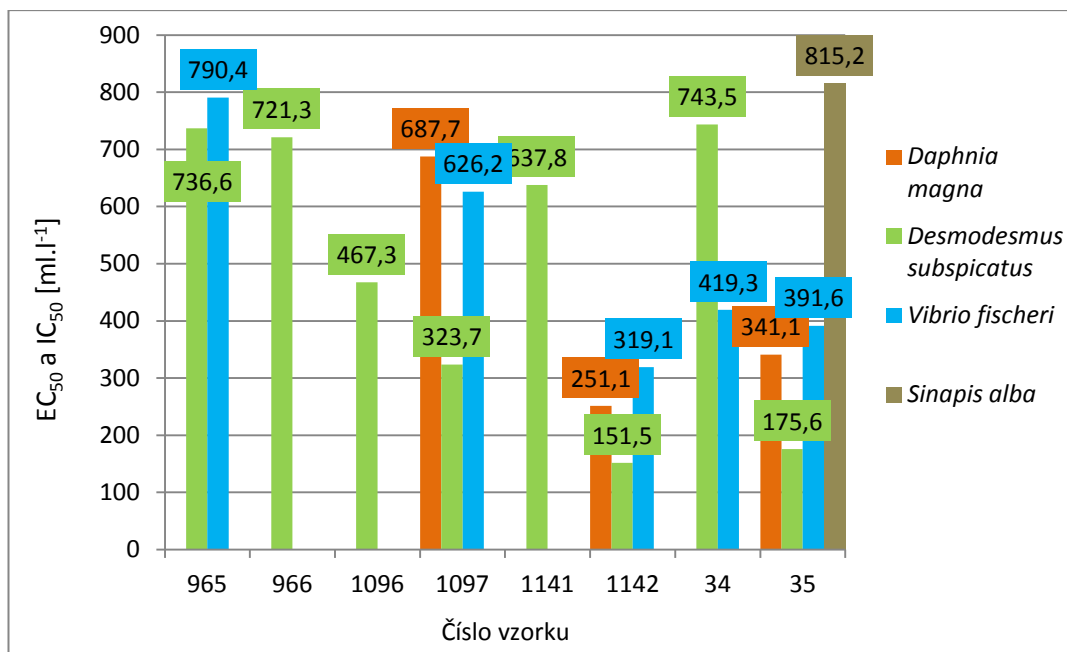
Nejnižší hodnota  $IC_{50}$  byla zjištěna na základě výsledku testu akutní toxicity **na řasách** a to u vzorku E/1142 ( $IC_{50} = 151,5 \text{ ml.l}^{-1}$ ) a E/35 ( $IC_{50} = 175,6 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Tyto vzorky měly na řasy největší ekotoxický účinek.

Nejnižší hodnota  $EC_{50}$ , která byla vypočtena na základě výsledků akutní toxicity **na perloočkách** byla  $251,1 \text{ ml.l}^{-1}$  a to u vzorku E/1142.

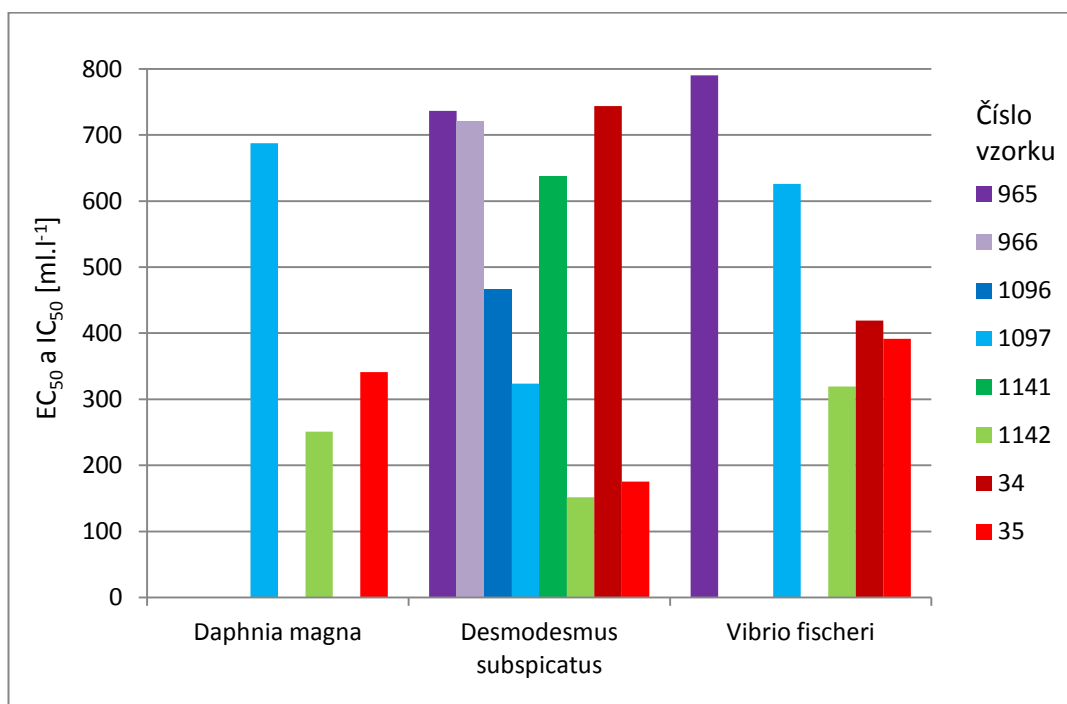
Nejnižší hodnota  $EC_{50}$ , která byla vypočtena na základě výsledků akutní toxicity **na bakteriích** byla  $319,1 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku E/1142.

Nejcitlivějším testovacím organismem byla ve všech provedených ekotoxikologických testech s odpadní vodou řasa *Desmodesmus subspicatus*. Jako méně citlivý testovací organismus se prokázaly perloočky *Daphnia magna* a následně bakterie *Vibrio fischeri*. Nejméně citlivým testovacím organismem vůči testovaným odpadním vodám byly semena hořčice bílé *Sinapis alba* a ryby *Poecilia reticulata*. Lze tedy konstatovat, že citlivost testovacích organismů v provedených ekotoxikologických testech klesala v řadě: řasy (*Desmodesmus subspicatus*), perloočky (*Daphnia magna*), bakterie (*Vibrio fischeri*), ryby (*Poecilia reticulata*) a semena hořčice bílé (*Sinapis alba*).

Magdaleno et al. (2014) ve své práci zkoumali ekotoxicitu odpadních vod veřejné nemocnice v Argentině. Testována byla nečištěná nemocniční odpadní voda a odpadní voda na odtoku z ČOV. Nemocniční odpadní vody byly bez předběžné úpravy vypouštěny přímo do městské kanalizace a spolu s městskými odpadními vodami byly čištěny v ČOV. Studie byla provedená v období od dubna do září 2012. Testovacím organismem byla řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*. Test toxicity nečištěné odpadní vody prokázal, že 55 % vzorků bylo pro řasy toxických. Ekotoxicita byla pro řasy prokázána i ve vzorku z ČOV (41 %). Výsledky této práce jsou v souladu s výsledky uvedenými v diplomové práci, a proto lze konstatovat, že řasy je možné považovat za nejcitlivější testovací organismus.



Graf č. 1: Porovnání hodnot  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$  mezi jednotlivými testovanými vzorky odpadní vody



Graf č. 2: Porovnání hodnot  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$  testovaných vzorků pro jednotlivé testovacími organismy

## Hodnocení vzorků odpadních vod na základě hodnocení hodnot LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub>

Všechny vzorky, u kterých bylo možné stanovit hodnoty LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> a nebo IC<sub>50</sub> je možné považovat za ekotoxické. Z tabulky č. 19 lze konstatovat, že pro *Daphnia magna* lze považovat za ekotoxické vzorky E/1097, E/1142 a E/35, pro *Desmodesmus subspicatus* byly všechny vzorky ekotoxické, pro *Sinapis alba* vykazoval toxicitu pouze vzorek E/35, pro *Vibrio fischeri* vykazovaly toxicitu vzorky odpadních vod s čísly E/965, E/1097, E/1142, E/34 a E/35. Pro *Poecilia reticulata* nevykazoval ekotoxicitu žádný vzorek.

### Hodnocení vzorků odpadní vody dle změn účinku v ověřovacím testu

#### Test s *Daphnia magna*

V případě, že budeme ekotoxicitu hodnotit podobně jako vyhláška 294/2005 Sb., a ekotoxické budou vzorky, které budou vykazovat změnu imobilizace větší než 30%, pak pro *Daphnia magna* lze považovat za ekotoxický pouze vzorky E/966, E/1097, E/1142 a E/35 (viz tabulka č. 20).

Ověřovací test pro vzorek E/966 vykazoval ekotoxicitu vyšší než 50 %, proto byl proveden test základní, v kterém se ale potvrdil výsledek úvodního testu a to, že vzorek nevykazoval ekotoxicitu při hodnocení podle EC<sub>50</sub>. V případě hodnocení % účinku proti kontrole, však vzorek ekotoxicitu vykázal.

Testovací organismus: <i>Daphnia magna</i>		
Číslo vzorku	Úhyn, imobilizace* [%]	EC <sub>50</sub>
2.3/14/965	10	NS**
2.3/14/966	35; 53,3	NS
2.3/14/1096	23,3	NS
2.3/14/1097	100	687,7
2.3/14/1141	16,7	NS
2.3/14/1142	100	251,1
2.3/15/34	3,3	NS
2.3/15/35	100	341,1

\*úvodní nebo ověřovací test

\*\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnotu EC<sub>50</sub>, protože imobilizace jedinců u neřaděného vzorku odpadní vody byla nižší než 50 %.

Tab. č. 20: Zjištěné hodnoty změn imobilizace u *Daphnia magna*

#### Test s řasami *Desmodesmus subspicatus*

Pro řasy *Desmodesmus subspicatus*, dle stejného způsobu hodnocení, lze považovat ekotoxické ty vzorky, které by prokázaly při ověřovacím testu inhibici růstu řas větší než 20 % ve srovnání s kontrolou. Všechny testované vzorky odpadní vody vykázaly inhibici růstu vyšší než 50 % již při úvodním testu a mohla být

stanovena hodnota EC<sub>50</sub>, a protože všechny vykázaly vyšší hodnoty inhibice než 20%, lze tudíž všechny vzorky považovat za ekotoxické (tab. č. 21). Při porovnání způsobů hodnocení, počet vzorků vykazující či nevykazující ekotoxicitu, se významně neliší.

Testovací organismus: <i>Desmodesmus subspicatus</i>		
Číslo vzorku	Inhibice* [%]	IC <sub>50</sub>
2.3/14/965	81,8	736,6
2.3/14/966	72,1	721,3
2.3/14/1096	93,1	467,3
2.3/14/1097	89,9	323,7
2.3/14/1141	93,4	637,8
2.3/14/1142	96,23	151,5
2.3/15/34	79,3	743,5
2.3/15/35	99,1	175,6

\*úvodní test

Tab. č. 21: Zjištěné hodnoty změn inhibice u *Desmodesmus subspicatus*

#### Test s hořčicí bílou *Sinapis alba*

Testy s hořčicí byly hodnoceny stejně jako předcházející organismy a ekotoxicitu vykazují vzorky E/966, E/1096, E/1097, E/1142, E/34 a E/35. Ve srovnání s hodnocením podle hodnot IC<sub>50</sub> vykazuje ekotoxicitu 75% kontrolovaných vzorků. V tomto případě se způsoby hodnocení výrazně liší v počtech vzorků způsobujících ekotoxicitu (tab. č. 22).

Testovací organismus: <i>Sinapis alba</i>		
Číslo vzorku	Inhibice [%]*	IC <sub>50</sub>
2.3/14/965	18,5	NS**
2.3/14/966	37,4	NS
2.3/14/1096	44	NS
2.3/14/1097	39,8	NS
2.3/14/1141	19,6	NS
2.3/14/1142	63,5	NS
2.3/15/34	32,9	NS
2.3/15/35	69,6	815,2

\*úvodní a nebo ověřovací test

\*\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnotu IC<sub>50</sub>, protože inhibice jedinců u neřaděného vzorku odpadní vody byla nižší než 50 %.

Tab. č. 22: Zjištěné hodnoty změn růstu kořene u *Sinapis alba*

Ověřovací test pro vzorek E/1142 vykazoval ekotoxicitu vyšší než 50 %, proto byl proveden test základní, v kterém se ale nepotvrdil výsledek ověřovacího testu. Hodnota IC<sub>50</sub> v základním testu byla nižší než 50 % a tak vzorek nevykazoval



ekotoxicitu při hodnocení podle  $IC_{50}$ . V případě hodnocení % účinku proti kontrole, však vzorek ekotoxicitu vykázal.

### Test s rybami *Poecilia reticulata*

Testy s rybami *Poecilia reticulata* při hodnocení v souladu s limity uvedenými ve vyhlášce 294/2005Sb., vykázaly ekotoxicitu u všech vzorků odpadních vod, protože dle kritérií nesmí uhynout ani jedna ryba v testovaném vzorku. Mortalita byla prokázána u všech testovaných vzorků. Při porovnání s hodnocením podle  $LC_{50}$  z tabulky č. 23 jasně vyplývá, že výsledky nejsou ve shodě, protože dle hodnocení podle  $LC_{50}$  vzorky odpadních vod nevykazovaly ekotoxicitu.

Testovací organismus: <i>Poecilia reticulata</i>		
Číslo vzorku	Mortalita* [%]	$LC_{50}$
2.3/14/965	20	NS**
2.3/14/966	50	NS
2.3/14/1096	30	NS
2.3/14/1097	40	NS
2.3/14/1141	40	NS
2.3/14/1142	40	NS
2.3/15/34	10	NS
2.3/15/35	0	NS

\*úvodní a nebo ověřovací test

\*\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnotu  $LC_{50}$ , protože mortalita jedinců u neřaděného vzorku odpadní vody byla nižší než 50 %.

Tab. č. 23: Zjištěné hodnoty u ryb *Poecilia reticulata*

### Luminiscenční test s bakteriemi *Vibrio fischeri*

Testovací organismus: <i>Vibrio fischeri</i>		
Číslo vzorku	Inhibice* [%]	$EC_{50/30 \text{ min}}$
2.3/14/965	49,9	790,4
2.3/14/966	42,7	NS **
2.3/14/1096	35,4	NS
2.3/14/1097	55,8	626,2
2.3/14/1141	20,9	NS
2.3/14/1142	70,0	319,1
2.3/15/34	69,5	419,3
2.3/15/35	70,2	391,6

\*test s neřaděným vzorkem (80 %)

\*\*u těchto organismů nebylo možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$ , protože inhibice jedinců u neřaděného vzorku odpadní vody byla nižší než 50 %.

Tab. č. 24: Zjištěné hodnoty změn inhibice u *Vibrio fischeri*

Pro bakterie *Vibrio fischeri*, dle stejného způsobu hodnocení, lze považovat ekotoxické ty vzorky, které by prokázaly inhibici světelné emise bakterií větší než 25 % ve srovnání s kontrolou. Všechny testované vzorky odpadní vody, kromě vzorku E/1141, vykázaly vyšší hodnoty inhibice než 25%, lze tudíž tyto vzorky považovat za ekotoxické (tab. č. 24). Při porovnání způsobů hodnocení, počet vzorků vykazující či nevykazující ekotoxicitu, se významně neliší.

Závěrem lze konstatovat, že pokud budeme výsledky ekotoxikologických testů odpadních vod ze zdravotnických zařízení hodnotit podle Vyhlášky č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, kdy nebezpečnou vlastnost má odpad, jehož vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus (*Poecilia reticulata*, *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus*, *Sinapis alba*) hodnoty:  $LC (EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$ , můžeme konstatovat, že všechny testované vzorky nemocniční odpadní vody nemají nebezpečnou vlastnost ekotoxicitu. Jelikož nejnižší stanovená koncentrace při ekotoxikologických testech byla  $IC_{50} 151,5 \text{ ml.l}^{-1}$  a to s testem s řasami.

Pokud se hodnotí inhibice/stimulace v % neředěných vzorků ve srovnání s limitními hodnotami vyhlášky č. 294/2005 Sb., pak můžeme konstatovat, že všechny vody byly ekotoxické minimálně pro jeden organismus.

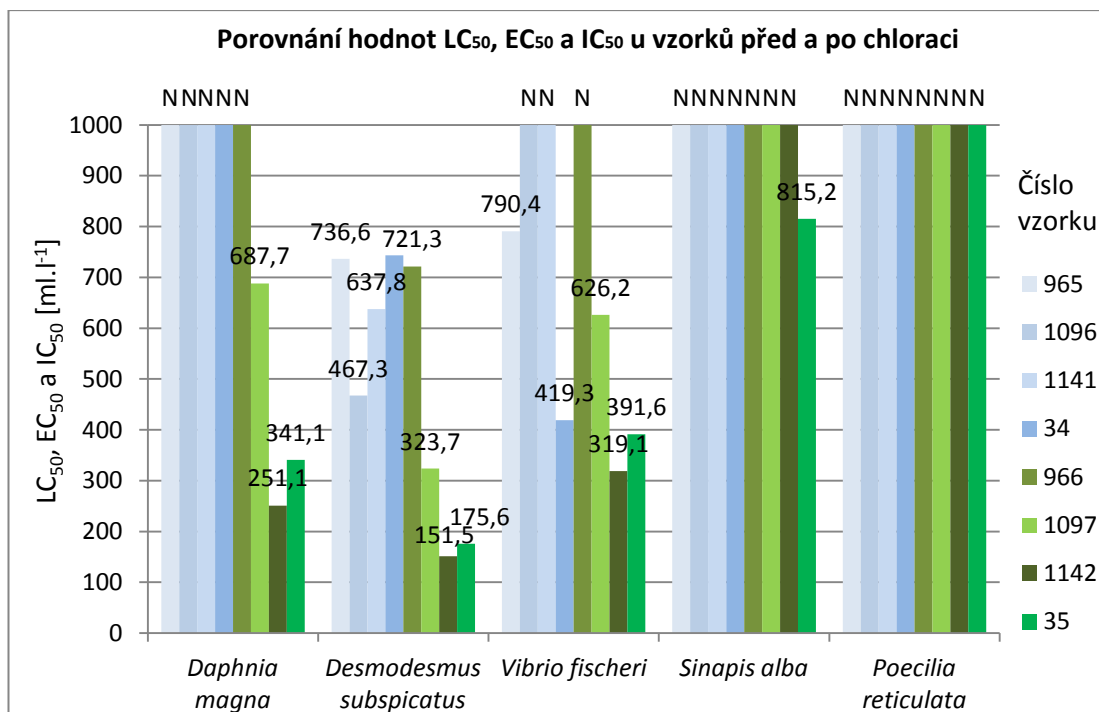
## 7.2 Vliv chlorování na ekotoxicitu odpadních vod

Vysoké koncentrace chlóru v nemocničních odpadních vodách mohou být způsobené používáním dezinfekčních prostředků na bázi chlóru, které slouží k dezinfekci odpadních vod vypouštěných z infekčních oddělení a omezují tak šíření patogenních mikroorganismů a původců nozokomiálních infekčních onemocnění. Chlór v odpadních vodách může mít původ i z prostorů nemocnic, kde se dezinfekční prostředky na bázi chlóru používají při úklidu nebo výzkumných aktivitách v laboratořích.

První použití chlóru v medicíně se datuje do roku 1826 a první použití chloroformu v anestezii bylo již v roce 1847. V současné době se použití chlornanu sodného v medicíně týká zejména dezinfekce, vzhledem k jeho širokému spektru biocidních účinků proti bakteriím, virům a houbám (Emmanuel et al., 2004).

V následující části jsou porovnávány výsledky ekotoxikologických testů odpadních vod před chlorací a vypouštěných odpadních vod po chloraci a je hodnocen vliv chlorování na ekotoxicitu odpadních vod.

Z výsledků uvedených v předcházejících tabulkách, zejména v tabulce č. 19 a z následujícího grafu č. 3 lze konstatovat, že výsledky ekotoxikologických testů provedených se vzorky před dezinfekcí a po dezinfekci roztokem chlornanu sodného vykazovaly významné rozdíly.

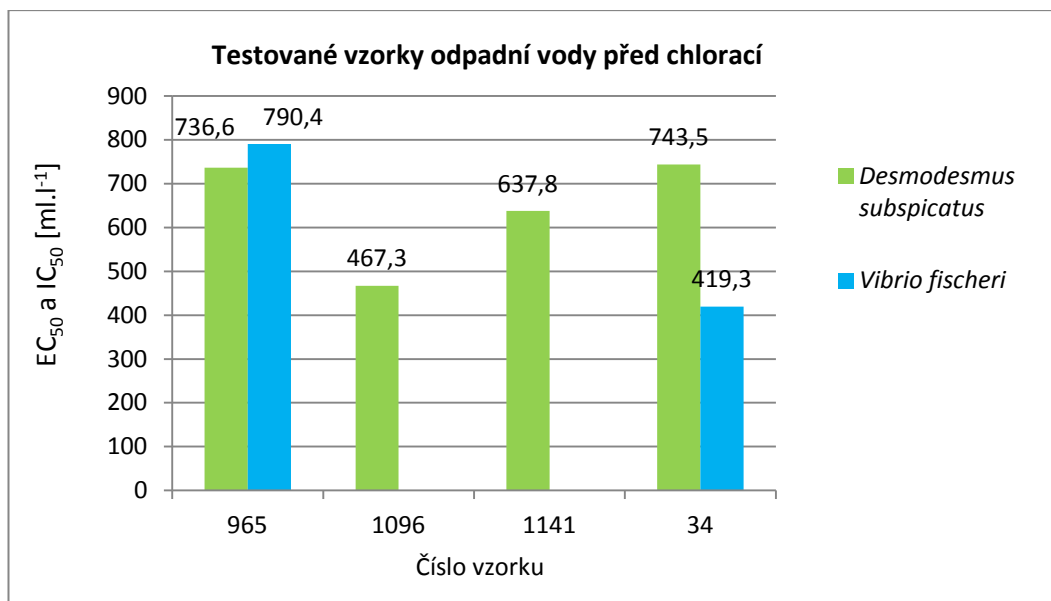


Graf č. 3: Porovnání hodnot LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> mezi jednotlivými testovacími organismy u vzorků před a po chloraci

N = pro vzorky nebylo možné stanovit hodnotu LC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> nebo EC<sub>50</sub>, protože mortalita, inhibice nebo imobilizace jedinců byla nižší než 50 %.

Vzorky před chlorací – odstíny modré barvy; Vzorky po chloraci – odstíny zelené b.

Následující graf č. 4 znázorňuje hodnoty EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> testovaných vzorků odpadní vody před chlorací. Výsledky ekotoxikologických testů provedených se vzorky odpadní vody E/965, E/1096, E/1141, E/34, které byly odebírány před samotnou dezinfekcí roztokem chlornanu sodného, vykazovaly rozdíly i v testech s jednotlivými organismy (viz tab. č. 19). Nejcitlivějším testovacím organismem byla u těchto vzorků odpadní vody řasa *Desmodesmus subspicatus*. Nejnižší hodnota IC<sub>50</sub>, která byla vypočtena na základě výsledků akutní toxicity na řasách byla 467,3 ml.l<sup>-1</sup> a to u vzorku E/1096. Méně citlivým testovacím organismem byly bakterie *Vibrio fischeri*, kde nejnižší vypočítaná hodnota EC<sub>50</sub> byla 419,3 ml.l<sup>-1</sup> u vzorku E/34. Další testovací organismy (ryby, perloočky, semena hořčice bílé) nevykazovaly citlivost na znečištění testovaných odpadních vod.



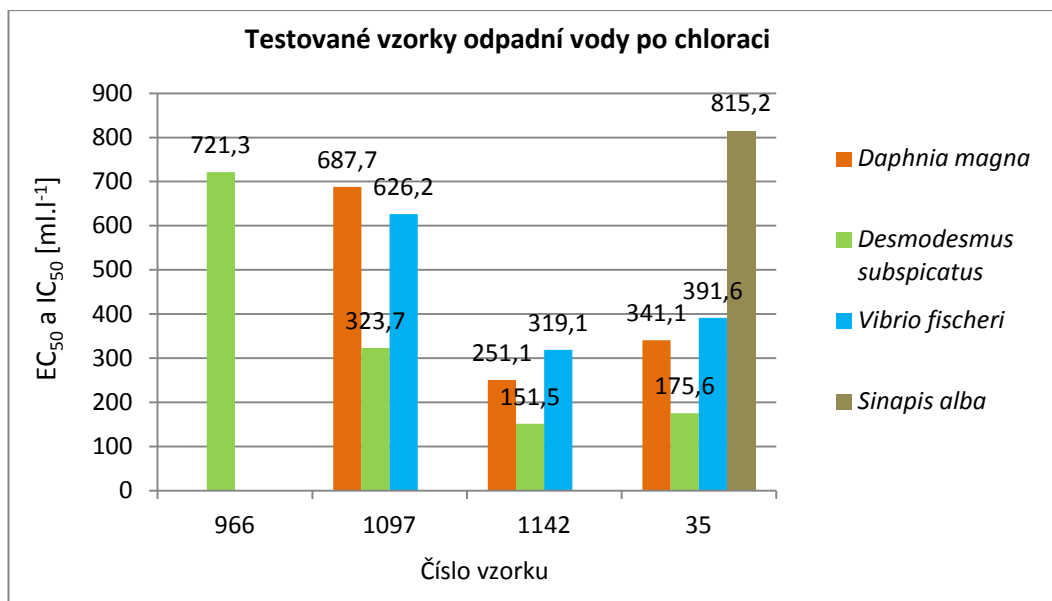
Graf č. 4: Porovnání hodnot EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> testovaných vzorků odpadní vody před chlorací

V následujícím grafu č. 5 jsou názorně zpracovány výsledky zjištěné u odpadních vod po chloraci. Vzhledem k tomu, že chlorování je nutná součást technologie vypouštění infekčních vod, je potřeba znát, jak významně se samotná chlorace podílí na ekotoxicitě odpadních vod.

Nejvyšší ekotoxicita byla zjištěna u vzorku E/1142. Vypočtené hodnoty byly na základě výsledků testů akutní toxicity na perloočkách EC<sub>50</sub> = 251,1 ml.l<sup>-1</sup>, na řasách IC<sub>50</sub> = 151,5 ml.l<sup>-1</sup> a na bakteriích EC<sub>50</sub> = 319,1 ml.l<sup>-1</sup>.

Jedná se o vzorek, který byl odebírán po dezinfekci roztokem chlornanu sodného. Úhyn či imobilizace perlooček, inhibice růstu řas nebo inhibice luminiscenčních bakterií je zřejmě způsobena přítomností chlornanu sodného, který je pro vodní organismy toxický. Obsah volného chloru byl u vzorku E/1142 0,27 mg.l<sup>-1</sup> (při odběru) a 0,21 mg.l<sup>-1</sup> (v laboratoři).

Druhé nejnižší naměřené hodnoty vykazoval vzorek E/35. Vypočtené hodnoty byly na základě výsledků testů akutní toxicity na perloočkách EC<sub>50</sub> = 341,1 ml.l<sup>-1</sup>, na řasách IC<sub>50</sub> = 175,6 ml.l<sup>-1</sup> a na bakteriích EC<sub>50</sub> = 391,6 ml.l<sup>-1</sup>. Obsah volného chloru byl u vzorku E/1142 0,29 mg.l<sup>-1</sup> (při odběru) a 0,23 mg.l<sup>-1</sup> (v laboratoři).



Graf č. 5: Porovnání hodnot EC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> testovaných vzorků odpadní vody po chloraci

Z výše uvedených výsledků a grafů č. 3, 4 a 5 je zřejmé, že chlorování má vliv na hodnoty ekotoxicity a hodnoty volného chlóru vyšší než 0,20 mg.l<sup>-1</sup> se významně podílí na zvýšení ekotoxicity odpadních vod.

Vliv dezinfekčních prostředků na ekotoxicitu odpadních vod potvrdily některé zahraniční studie, které byly zaměřené na zjišťování ekotoxicity samotných dezinfekčních prostředků (Emmanuel et al., 2004; Panouillères et al., 2007; Boillot et Perrodin, 2008). Studie zaměřená na hodnocení ekotoxického účinku chlornanu sodného (NaClO), který je používán k dezinfekci nemocničních odpadních vod, ukázala, že přidání NaClO do odpadních vod ze zdravotnických zařízení, může snížit bakteriální znečištění, ale zároveň může vyvolat toxické účinky na vodní organismy (Emmanuel et al., 2004). Ve studii Emmanuela et al. (2004) byly testovacími organismy *Daphnia magna* a *Vibrio fischeri*. Průměrná hodnota 24 h EC<sub>50</sub> při ekotoxikologických testech na *Daphnia magna* byla 2,27 ml.l<sup>-1</sup> a průměrná hodnota 15 min EC<sub>50</sub> při testech s *Vibrio fischeri* byla 29,41 ml.l<sup>-1</sup>.

Boillot et Perrodin (2008) zkoumali ekotoxické účinky glutaraldehydu (GA), který se v nemocničních zařízeních používá k dezinfekci předmětů. Testovacím organismem byla *Daphnia magna*. Akutní imobilizační test s *Daphnia magna* je velice citlivý na čisticí a dezinfekční prostředky. Hodnota 24 h EC<sub>50</sub> při ekotoxikologických testech na *Daphnia magna* byla 20,03 mg.l<sup>-1</sup>. GA lze považovat za toxický pro *Daphnia magna*.

Panouillères et al. (2007) hodnotili ekotoxicitu kyseliny peroctové a tří detergentů (kationtový, aniontový a neiontový), které se často vyskytují v nemocničních odpadních vodách. Ekotoxický účinek těchto látek a jejich směsí byl testován na testovacím organismu *Daphnia magna*. Účinná koncentrace inhibující

50 % populace *Daphnia magna* byla  $EC_{50}$  116,6 ml.l<sup>-1</sup>. Kyselina peroctová je pro *Daphnia magna* mírně toxická. Tyto hodnoty  $EC_{50}$  jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty  $EC_{50}$  stanovené pro chlornan sodný nebo GA, které jsou uvedeny v předchozích citovaných pracích (Emmanuel et al., 2004; Boillot et Perrodin, 2008).

Berninger da Costa et al. (2014) studovali ekotoxický potenciál čtyř dezinfekčních látek (chlor, ozon, kyselina peroctová a UV záření), které se používají při dezinfekci městských odpadních vod. Testovacími organismy byly perloočky (*Ceriodaphnia silvestrii* a *Daphnia similis*), larvy komára *Chironimus xanthus* a ryby *Danio rerio*. Ozonizace a chlorování zapříčinilo 60 % až 100 % úmrtnost perlooček a *Danio rerio* v porovnání s kontrolou. Odpadní vody ošetřené kyselinou peroctovou a UV zářením mělo významný vliv pouze na úmrtnost *Ceriodaphnia silvestrii*. Nejodolnější všem způsobům dezinfekce byl *Chironimus xanthus*. Za nejvíce ekotoxický dezinfekční prostředek byl považován chlór a následovaly ozon, UV záření a kyselina peroctová.

V souvislosti s výsledky výše uvedených studií, lze konstatovat, že výsledky v této diplomové práci jsou v souladu s mnou zjištěnými výsledky.

### 7.3 Posouzení baterie ekotoxikologických testů

Porovnání výsledků a stanovených hodnot  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$  v diplomové práci s jinými studii je komplikované. V dnešní době je stále málo studií, které se zabývají ekotoxicitou odpadních vod ze zdravotnických zařízení vypouštěných z nemocniční ČOV. Publikované studie se věnují sledování ekotoxicity určitých látek či vzorků. Navíc jednotlivé studie používají pro hodnocení ekotoxicity odlišné testovací organismy a rozdílné délky expozice. V České republice dosud neexistuje ani česky vydávané periodikum, které by se systematicky věnovalo ekotoxikologii jako vědnímu oboru (Kočí, 2006).

Ferrando-Climent et al. (2014) hodnotili ekotoxické účinky protinádorových léků obsažených v nemocničních vodách. Vzorky byly odebírány na odtoku z nemocnice, z přítoku a odtoku ČOV (která přijímala nemocniční odpadní vody) a z řeky, kam byla odváděna upravená voda z ČOV. Akutní toxicita byla hodnocena pomocí *Vibrio fischeri* a měřena jako  $EC_{50}$  po 15 a 30 min (výsledky se nelišily). Průměrné hodnoty 15 min  $EC_{50}$  při testech s *Vibrio fischeri* byly na odtoku z nemocnice 12,05 ml.l<sup>-1</sup>, na přítoku ČOV 25,64 ml.l<sup>-1</sup>, na odtoku ČOV 47 ml.l<sup>-1</sup>. V povrchových vodách v řece již nebyla toxicita zaznamenána. Za nejtoxičtější lze považovat vody přímo vypouštěné z nemocnice. Fakultní nemocnice v Motole, jejíž vody byly předmětem diplomové práce, se také zabývá léčbou protinádorových onemocnění. Přes veškerou snahu se mi pro diplomovou práci nepodařilo získat potřebná data o množství a typech používaných léků. Ekotoxikologické testy provedené v diplomové práci na testovacím organismu *Vibrio fischeri* mají však hodnoty  $EC_{50}$  po 30 minutách mnohonásobně vyšší. Nejnižší stanovená hodnota 30 min  $EC_{50}$  byla 319,1 ml.l<sup>-1</sup>. V porovnání s výsledky studie Ferrando-Climent et al.

(2014) lze považovat odpadní vody (na základě výše uvedených výsledků testů s *Vibrio fischeri*) za netoxické.

Mísařová (2013) ve své diplomové práci hodnotila ekotoxicitu odpadních vod odebíraných na odtoku z ČOV Fakultní nemocnice v Motole a z Thomayerovy nemocnice. Porovnávala ekotoxicitu vzorků nemocničních odpadních vod odebíraných v únoru 2013 s ekotoxicitou vzorků odebíraných v roce 2010. Vzorky odebrané v roce 2010 byly v laboratoři SZÚ uchovávány v mrazáku při teplotě  $-20 \pm 2$  °C a před použitím do testu byly filtrovány. Jako testovací organismy byly použity perloočky *Daphnia magna*, zelené řasy *Desmodesmus subspicatus* a semena hořčice bílé *Sinapis alba*. Nejcitlivějším testovacím organismem byla v provedených ekotoxikologických testech řasa *Desmodesmus subspicatus*. Méně citlivým testovacím organismem byly perloočky a nejméně citlivá byla semena hořčice bílé. Podobná citlivost testovacích vzorků byla zjištěna i v mé diplomové práci.

Z ČOV Fakultní nemocnice v Motole byly nejnižší hodnoty  $EC_{50}$ , které byly vypočteny na základě výsledků akutní toxicity **na perloočkách**  $686,5 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku z r. 2010 a ze vzorku z r. 2013 nebylo možné  $EC_{50}$  stanovit (imobilizace perlooček byla menší než 50 %). Hodnota  $IC_{50}$  **pro semena** hořčice bílé byla stanovena pouze u vzorku z r. 2010 a stanovená hodnota  $IC_{50}$  byla  $808,9 \text{ ml.l}^{-1}$ . Nejnižší hodnota  $IC_{50}$ , která byla vypočteny na základě výsledků akutní toxicity **na řasách** byla  $333,0 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku z r. 2010. U vzorku z r. 2013 byla stanovená hodnota  $IC_{50}$   $499,4 \text{ ml.l}^{-1}$ .

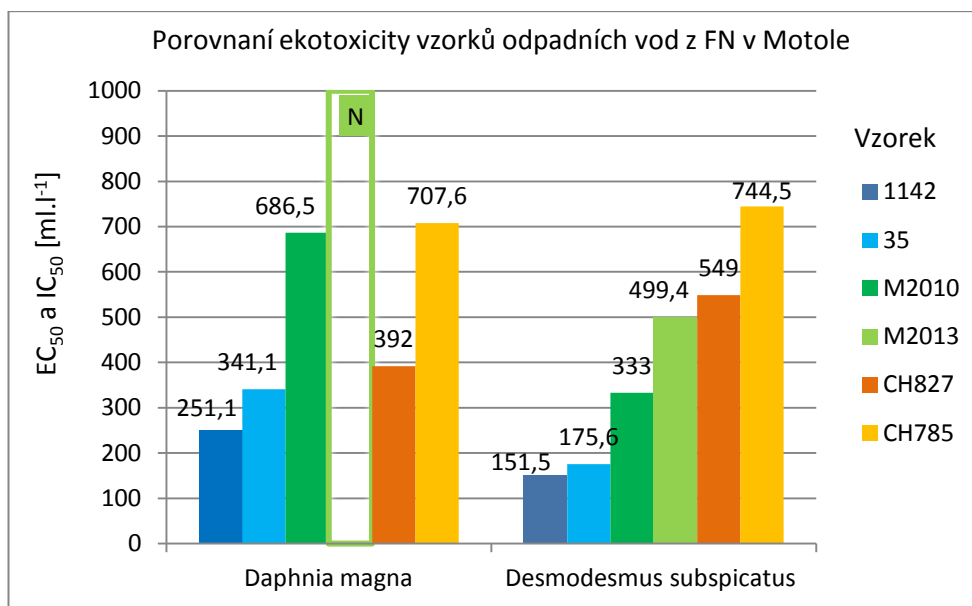
Z ČOV Thomayerovy nemocnice byla pro perloočky stanovena hodnota  $EC_{50}$   $846,6 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku z r. 2013 a hodnotu  $EC_{50}$  u vzorku z r. 2010 nebylo možné stanovit. Nejnižší hodnota  $IC_{50}$ , která byla vypočteny na základě výsledků akutní toxicity **na řasách** byla  $387,1 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku z r. 2010. U vzorku z r. 2013 byla stanovena hodnota  $IC_{50}$   $484,6 \text{ ml.l}^{-1}$  (Mísařová, 2013).

Chrobáková (2014) ve své diplomové práci hodnotila ekotoxicitu šesti vzorků nemocničních odpadních vod, které byly odebírány ve dvou termínech na odtoku z ČOV po procesu chlorování u tří pražských nemocnic (Fakultní nemocnice v Motole – vzorek č. 785, 827; Nemocnice Na Bulovce – vzorek č. 786, 828; Thomayerova nemocnice – vzorek č. 787, 829). Použitými testovacími organismy byly perloočky *Daphnia magna*, zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*, semena hořčice bílé *Sinapis alba*, akvarijní ryby *Poecilia reticulata*. Nejcitlivějším testovacím organismem byla v této práci *Daphnia magna*. Méně citlivým testovacím organismem byla řasa *Desmodesmus subspicatus*. Nejméně citlivé k testovaným odpadním vodám byla semena hořčice bílé *Sinapis alba* a ryby *Poecilia reticulata*. Ekotoxicita odpadních vod byla hodnocena pouze podle  $LC_{50}$ ,  $IC_{50}$  nebo  $EC_{50}$  a byla prokázána jen na odpadních vodách z Fakultní nemocnice v Motole (785, 827) a z Nemocnice Na Bulovce (828). Nejnižší hodnoty  $EC_{50}$ , které byly vypočteny na základě výsledků akutní toxicity **na perloočkách** byly  $318,2 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku č. 828 a  $392,0 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku č. 827. A nejnižší hodnota  $IC_{50}$ , která byla vypočteny na základě výsledků akutní toxicity **na řasách** byla  $549,0 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku č. 827.

Výsledky uveřejněné v diplomové práci Chrobákové (2014) se liší od mnou zjištěných výsledků. Chrobáková považuje za nejcitlivější testovací organismus ke znečištění odpadních vod perloočky. Z výsledků uvedených v tabulkách č. 19 a 21 je zřejmé, že nejcitlivějším organismem jsou řasý. Zjištěné hodnoty  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$  se v obou pracích liší a výsledky v práci Chrobákové vykazují nižší hodnoty.

Porovnání výsledných hodnot  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$  z výše citovaných prací (Mísařová, 2013; Chrobáková, 2014) je patrné z grafu č. 6. Jsou porovnávány výsledné hodnoty  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$ , které byly vypočteny na základě výsledků akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna* a řasách *Desmodesmus subspicatus*. Všechny vzorky odpadní vody byly odebírány na odtoku z ČOV z Fakultní nemocnice v Motole. Do grafu jsem volila testovací organismy, které ve všech diplomových pracích byly prokázány jako nejcitlivější.

Vzorky č. 1142 a 35 byly testovány v této diplomové práci. Vzorky z práce Mísařové (2013) jsou M2010 (odpadní voda odebírána v r. 2010) a M2013 (odpadní voda odebírána v r. 2013). Vzorky z práce Chrobákové (2014) jsou CH827 a CH785.



Graf č. 6: Porovnání hodnot pro ekotoxicitu vzorků odpadních vod z FN v Motole  
N = pro daný vzorek nebylo možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$

Z grafu č. 6 je patrné, že hodnoty  $EC_{50}$  stanovené na základě výsledků ekotoxikologických testů na perloočkách a  $IC_{50}$  stanovené na základě výsledků ekotoxikologických testů na řasách se v porovnávaných diplomových pracích liší. Liší se výsledné hodnoty jak mezi jednotlivými testovacími organismy, tak i výsledky mezi jednotlivými vzorky.



Ekotoxicita nemocničních odpadních vod závisí na celkovém počtu přítomných pacientů v nemocnici, na počtu pacientů léčených cytostatiky, antibiotiky a mnoha dalšími skupinami léčiv. Dále na počtu akutních i plánovaných operací, na probíhajícím výzkumu v nemocnici, na množství použitých čisticích a dezinfekčních prostředků. Všechna tato kritéria jsou proměnlivá v čase a jsou zodpovědná za rozdílné hodnoty ekotoxicity jednotlivých vzorků odebíraných ve čtyřech termínech. Z tohoto důvodu by bylo vhodné provést dlouhodobější výzkum, aby bylo možné stanovit statistické hodnoty ekotoxicity odpadních vod.

Nemocniční odpadní vody obsahují značné koncentrace léčiv. Léčiva, která nejsou snadno degradována v ČOV, mohou následně způsobovat kontaminaci vod. Při úpravě nemocničních odpadních vod jsou všeobecně důležité dva eliminační procesy a to sorpce na suspendované částice a biodegradace (Šídlová et al., 2011).

Nejčastěji se koncentrace cytostatik v odpadních vodách pohybují v řádu  $\text{ng.l}^{-1}$  a v případě povrchových vod pod hodnotou  $1 \text{ ng.l}^{-1}$ . Avšak v nemocničních odpadních vodách jsou tyto koncentrace řádově vyšší, pro jednotlivou sloučeninu mohou dosahovat až  $50 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ . Jejich koncentrace v odpadních vodách během dne výrazně kolísá v závislosti na množství podávaných cytostatik. Cytostatika představují značné nebezpečí pro životní prostředí zejména díky své vysoké ekotoxicitě (Šídlová et al., 2011).

Zouňková et al., (2007) zkoumali ekotoxicitu pěti často používaných cytostatik. Testovacími organismy byly řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*, perloočky *Daphnia magna* a bakterie *Pseudomonas putida*. Hodnoty  $\text{EC}_{50}$  se pohybovaly v hodnotách od  $\mu\text{g.l}^{-1}$  do  $\text{mg.l}^{-1}$ . Nejnižší stanovené hodnoty  $\text{EC}_{50}$  pro *Pseudomonas putida* byly  $0,027 \text{ mg.l}^{-1}$ , pro *Pseudokirchneriella subcapitata*  $\text{EC}_{50} = 0,11 \text{ mg.l}^{-1}$  a pro *Daphnia magna* byla nejnižší hodnota  $\text{EC}_{50} 0,64 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Z organismů vodního prostředí jsou pro biomonitoring vhodné perloočky *Daphnia magna*. Tento testovací organismus je citlivý na toxické látky a není náročný na manipulaci v laboratoři. Významnou výhodou ryb *Danio rerio* je jejich dostupnost v mnoha zemích, snadný laboratorní chov a vyhovující citlivost k širokému spektru látek. Kromě toho je tento druh mezinárodně standardizován pro použití při ekotoxikologických testech (Kern et al., 2015). Kern et al. (2015) hodnotili ekotoxicitu nemocničních odpadních vod z prádelny z krajské nemocnice v Brazílii. Testy akutní toxicity byly prováděny s *Daphnia magna* a *Danio rerio*. Průměrné hodnoty  $\text{EC}_{50}$  pro *Daphnia magna* byly  $20,1 \text{ ml.l}^{-1}$  a pro *Danio rerio* byly průměrné hodnoty  $\text{LC}_{50} 292,5 \text{ ml.l}^{-1}$ . Dle autorů byla *Daphnia magna* citlivějším testovacím organismem než *Danio rerio* a byla prokázána extrémní toxicita. I v mé diplomové práci byly perloočky *Daphnia magna* citlivějším testovacím organismem než ryby (*Poecilia reticulata*). V porovnání s výše uvedenými studiemi (Zouňková et al., 2007; Kern et al., 2015) jsou výsledné hodnoty  $\text{EC}_{50}$  a  $\text{IC}_{50}$  mnohonásobně nižší než v řešené diplomové práci. Avšak pro porovnání výsledných hodnot těchto prací a zdůvodnění jejich rozdílů nejsou v předložených studiích poskytnuty dostatečné

informace o velikosti nemocnice, počtu léčených pacientů, o objemu vypouštěných odpadních vod a mnoho jiných důležitých informací, aby bylo možné odhadnout hlavní příčiny ekotoxicity.

Před použitím jakéhokoli obecného biologického čištění a před vypuštěním nemocničních odpadních vod do veřejné kanalizace je potřeba provádět důkladnější testování různých typů nemocničních odpadních vod a je důležité znát jejich ekotoxické účinky a podle toho navrhnout konkrétní ošetření. Pro správné testování ekotoxicity nemocničních odpadních vod je důležité zvolit vhodnou baterii ekotoxikologických testů. Schopnost sestavit takovou baterii ekotoxikologických testů, která bude mít co nejreálnější vypovídací hodnotu a jejíž interpretace bude přesně odpovídat problematice studované lokality, patří ke znalostem ekotoxikologa. Jak již bylo zmíněno, je vhodné použít testy toxicity na organismech minimálně tří trofických úrovní. Dle výše předkládaných prací a jejich porovnáním s mou diplomovou prací se jako nejcitlivější testovací organismus zdají být řasy (*Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*), perloočky *Daphnia magna* a luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*.

Pro lepší porozumění ekologických dopadů z vypouštěných vyčištěných odpadních vod do životního prostředí, by biologické hodnocení odpadních vod za použití standardních ekotoxikologických testů mělo být považováno za doplňkové k fyzikálně-chemickému hodnocení. Tento integrovaný přístup nabízí komplexnější posouzení rizika odpadních vod na vodní ekosystémy (Berninger da Costa et al., 2014).

## 8. Závěr

Ekotoxikologické testy mají důležité místo při monitoringu životního prostředí, protože podávají doplňující informace k chemickým analýzám a slouží k odhalení rizik spojených s výskytem testované látky v životním prostředí. Hodnocení ekotoxicity je také důležitým faktorem při sledování kvality odpadních vod a je nezbytné charakterizovat ekotoxicitu znečišťujících látek vyskytujících se v odpadních vodách, s ohledem na hodnocení jejich dopadu na vodní ekosystémy.

Klíčovým bodem ekotoxikologické práce je správná volba vhodné sady testů.

V diplomové práci byla hodnocena ekotoxicita osmi vzorků odpadních vod ze zdravotnického zařízení fakultní nemocnice v Motole, které byly odebírány ve čtyřech termínech. Čtyři vzorky odpadní vody (E/965, E/1096, E/1141, E/34) byly odebírány před samotnou dezinfekcí odpadních vod a čtyři vzorky (E/966, E/1097, E/1142, E/35) na odtoku z čistírny odpadních vod po dezinfekci roztokem chlornanu sodného. Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že:

Pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod byla použita sada ekotoxikologických testů s následujícími testovacími organismy: perloočky *Daphnia magna*, zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*, semena hořčice bílé *Sinapis alba*, akvarijní ryby *Poecilia reticulata*, luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*.

U odpadních vod byla testována ekotoxicita pro neřaděné vzorky a dále pak byla zjišťována hodnota  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$ .

Hodnoty ekotoxikologických testů provedených s jednotlivými vzorky odpadní vody se u jednotlivých metod lišily a různé hodnoty byly zaznamenány i u metod s různými organismy u jednoho vzorku.

Nejcitlivějším testovacím organismem byla ve všech provedených ekotoxikologických testech s nemocniční odpadní vodou řasa *Desmodesmus subspicatus* a citlivost testovacích organismů v provedených ekotoxikologických testech klesala v řadě: řasy (*Desmodesmus subspicatus*), perloočky (*Daphnia magna*), bakterie (*Vibrio fischeri*), ryby (*Poecilia reticulata*) a hořčice bílá (*Sinapis alba*).

Nejnižší hodnota  $IC_{50}$  byla zjištěna na základě výsledku testu akutní toxicity na řasách a to u vzorku E/1142 ( $IC_{50} = 151,5 \text{ ml.l}^{-1}$ ) a E/35 ( $IC_{50} = 175,6 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Tyto vzorky měly na řasy největší ekotoxický účinek.

Nejnižší hodnota  $EC_{50}$ , která byla vypočtena na základě výsledků akutní toxicity na perloočkách, byla  $251,1 \text{ ml.l}^{-1}$  a to u vzorku E/1142.

Nejnižší hodnota  $EC_{50}$ , která byla vypočtena na základě výsledků akutní toxicity na bakteriích, byla  $319,1 \text{ ml.l}^{-1}$  u vzorku E/1142

Všechny vzorky, u kterých bylo možné stanovit hodnoty LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> nebo IC<sub>50</sub> je možné považovat za ekotoxické. Lze konstatovat, že za ekotoxické je možné považovat pro *Daphnia magna* vzorky E/1097, E/1142 a E/35, pro *Desmodesmus subspicatus* byly všechny vzorky ekotoxické, pro *Vibrio fischeri* vykazovaly toxicitu vzorky odpadních vod s čísly E/965, E/1097, E/1142, E/34 a E/35, pro *Sinapis alba* vykazoval toxicitu pouze vzorek E/35. Pro *Poecilia reticulata* nevykazoval ekotoxicitu žádný vzorek.

Výsledky ekotoxikologických testů neřaděných odpadních vod podle hodnocení ve vyhlášce č. 294/2005 Sb. prokázaly ekotoxický účinek u všech vzorků, minimálně pro jeden organismus.

Výsledky ekotoxikologických testů odpadních vod hodnocené dle vyhlášky č. 376/2001 Sb., ukázaly, že odpadní vody ze zdravotnických zařízení nepatří do kategorie nebezpečných odpadů (nejsou toxické pro ŽP).

Výsledky uvedené v této práci potvrdily ekotoxicitu způsobenou obsahem chlóru pocházejícího z chlorování odpadních vod. Zvýšené koncentrace chlóru v nemocničních odpadních vodách korelují se zvýšenými hodnotami ekotoxicity. Výsledky ekotoxikologických testů provedených se vzorky před dezinfekcí a po dezinfekci roztokem chlornanu sodného vykazovaly významné rozdíly a z výsledků vyplývá, že na zvýšení ekotoxicity odpadních vod se podílí koncentrace volného chlóru vyšší než 0,20 mg.l<sup>-1</sup>.

Na základě výsledků ekotoxikologických testů provedených v praktické části diplomové práce, je možné považovat za vhodné testovací organismy pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod řasy *Desmodesmus subspicatus*. Hodnoty pro perloočky *Daphnia magna* relativně korelují s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*. Avšak luminiscenční test s *Vibrio fischeri* je vhodnější z důvodu rychlosti jeho provedení oproti ostatním používaným biotestům. Za méně vhodné testovací organismy považují semena hořčice bílé *Sinapis alba* a ryby *Poecilia reticulata* z důvodů jejich nízké citlivosti. Pro další výzkum bych tyto dva testovací organismy nedoporučila.

Aby byla sestavena vhodná testovací řada, je důležité do ekotoxikologických testů zahrnout všechny trofické úrovně organismů. Doporučuji vhodné testovací organismy (*Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*) doplnit např. okřehkem menším (*Lemna minor*) nebo dalšími druhy řas, nálevníky či vířníky. Pro stanovení limitů je třeba provést daleko vyšší četnost pokusů a na základě jejich statistického vyhodnocení se rozhodnout pro stanovení způsobu posuzování ekotoxicity odpadních vod.

## 9. Seznam literatury a dalších použitých zdrojů

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

BERNINGER DA COSTA J. B., RODGHER S., DANIEL L. A. et ESPÍNDOLA E. L. G., 2014: Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. *Ecotoxicology* 23: 1803 – 1813.

BOILLOT C. et PERRODIN Y., 2008: Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: Use of the Toxicity Index model and isoblogram representation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 252 – 259.

CLEUVERS M., 2004: Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 309 – 315.

CRANE M., WATTS CH. et BOUCARD T., 2006: Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 367: 23 – 41.

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

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

EMMANUEL E., PIERRE M. G. et PERRODIN Y., 2009: Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environment International* 35: 718 – 726.

FERRANDO-CLIMENT L., RODRIGUEZ-MOZAZ S. et BARCELÓ D., 2014: Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environmental Pollution* 193: 216 – 223.

FUKA T., 2010: Provozní řád ČOV FN Motol. Techneco, Praha, 38 s.

GAUTAM A. K., KUMAR S. et SABUMON P. C., 2007: Preliminary study of physico chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environmental Management* 83: 298 – 306.

GOULLÉ J. - P., SAUSSEREAU E., MAHIEU L., CELLIER D., SPIROUX J. et GUERBET M., 2012: Importance of Anthropogenic Metals in Hospital and Urban Wastewater: Its Significance for the Environment. *Bull Environ Contam Toxicol* 89: 1220 – 1224.

HLAVÍNEK P., MIČÍN J. et PRAX P., 2003: Stokování a čištění odpadních vod. Akademické nakladatelství CERM, s.r.o., Brno, 283 s.

HOFFMAN D. J., RATTNER B. A., BURTON G. A. et CAIRNS, J., 2003: Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers, New York, 1290 s.

CHROBÁKOVÁ T., 2014: Ekotoxikita odpadních vod. Nепublikováno. Dep.: Česká zemědělská univerzita v Praze.

KERN D. I., SCHWAICKHARDT R. DE O., LUTTERBECK C. A., KIST L. T., ALCAYAGA E. A. L. et MACHADO E. L., 2015: Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol* 68: 64 – 73.

KOČÍ V., 2006: Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy* 100: 882 – 888.

KOČÍ V. et MOCO VÁ K., 2009: Ekotoxikologie pro chemiky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 199 s.

KOMÍNKOVÁ D., 2008: Ekotoxikologie. České vysoké učení technické v Praze, Praha, 156 s.

KÜMMERER K., 2001: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectans into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45: 957 - 969.

KÜMMERER K., 2009: The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90: 2354 - 2366.

KÜMMERER K. et HELMERS E., 1997: Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *The Science of the Total Environment* 193: 179 - 184.

MAGDALENO A., JUÁREZ A. B., DRAGANI V., SAENZ M. E., PAZ M. et MORETTON J., 2014: Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. *Journal of Toxicology* 248461: 1 – 10.

MALÝ J. et HLAVÍNEK P., 1996: Čištění průmyslových odpadních vod. NOEL 2000 s.r.o, Brno, 255 s.

MALÝ J. et MALÁ J., 1996: Chemie a technologie vody. NOEL 2000 s.r.o., Brno, 197 s.

MARŠÁLEK B., 2002: Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. Sborník pracovní konference - Ekotoxikologické biotesty 1, Seč u Chrudimi, 8 - 24.

MÍSAŘOVÁ V., 2013: Využití ekotoxikologických metod při hodnocení odpadu a odpadních vod. Nepublikováno. Dep.: Česká zemědělská univerzita v Praze.

NEWMAN M. C., 1998: Fundamentals of ecotoxicology. Arbor Press, Michigan, 402 s.

ORIAS F. et PERRODIN Y., 2013: Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. Science of the Total Environment 454 – 455: 250 – 276.

ORIAS F. et PERRODIN Y., 2014: Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. Chemosphere 115: 31 – 39.

PANOUILLÉRES M., BOILLOT C. et PERRODIN Y., 2007: Study of the combined effects of peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. Ecotoxicology 16: 327 - 340.

PAUWELS B. et VERSTRAETE W., 2006: The treatment of hospital wastewater: an appraisal. Journal of Water and Health 04.4: 405 - 416.

PAVLÍKOVÁ D., PAVLÍK M., MATĚJŮ L. et BALÍK J., 2009: Ekotoxikologie. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 171 s.

POŠTA J., HEJTMÁNKOVÁ A., JUST T., RŮŽIČKOVÁ I., KOLLER J. et DOHÁNYOS M., 2005: Čistírny odpadních vod. Česká zemědělská univerzita v Praze, technická fakulta, Praha, 208 s.

RAND G. M. et PETROCELLI S. R., 1995: Fundamentals of aquatic toxicology. Taylor and Francis, Washington D. C., 803 - 816.

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., 2009: Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 226 s.

ŠÍDLOVÁ P., PODLIPNÁ R. et VANĚK T., 2011: Cytostatická léčiva v životním prostředí. Chemické Listy 105: 8 – 14.

ZOUNKOVÁ R., ODRÁŠKA P., DOLEŽALOVÁ L., HILSCHEROVÁ K., MARŠÁLEK B. et BLÁHA L., 2007: Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. Environmental Toxicology and Chemistry 26/10: 2208 - 2214.

## **Internetové zdroje**

ASIO, 2015: Čištění a úprava vod. A SIO, spol. s.r.o., Brno, online: <http://www.asio.cz/cz/energie-sedych-vod>, cit. 19. 2. 2015.

BECKER R., DONNEVERT G. et RÖMBKE J., 2007: Biologische Testverfahren zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen. Umweltbundesamt, online: [http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/resources/Becker\\_et\\_al\\_2007\\_H14\\_Ring\\_Test\\_Final\\_Report.pdf](http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/resources/Becker_et_al_2007_H14_Ring_Test_Final_Report.pdf), cit. 17. 2. 2015

ČSÚ, 2012: Množství vypouštěných odpadních vod. Český statistický úřad, Praha, online: [http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/t/8E003C50B6/\\$File/2141120302g.pdf](http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/t/8E003C50B6/$File/2141120302g.pdf), cit. 19. 2. 2015.

IRZ, 2014: Halogenované organické sloučeniny (jako AOX), Praha, online: [http://www.irz.cz/repository/latky/halogenovane\\_organicke\\_slouceniny.pdf](http://www.irz.cz/repository/latky/halogenovane_organicke_slouceniny.pdf) , cit. 17. 3. 2015.

SZÚ, 2015: Laboratoř hygieny půdy a odpadů. Státní zdravotní ústav, Praha, online: <http://www.szu.cz/laborator-hygieny-pudy-a-odpadu>, cit. 10. 3. 2015.

## **Právní předpisy**

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

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

NAŘÍZENÍ VLÁDY č. 416/2010 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod podzemních, v platném znění.

NAŘÍZENÍ VLÁDY č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. a nařízení vlády č. 23/2011 Sb.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **České technické normy a jiné standardy**

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

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

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

ČSN EN 12056-1. Vnitřní kanalizace – Gravitační systémy – Část 1: Všeobecné a funkční požadavky. Český normalizační institut, Praha, 2001. Třídící znak 75 6760.

ČSN EN 14 735. Charakterizace odpadů - Příprava vzorků odpadu pro testy ekotoxicity. Český normalizační institut, Praha, 2007. Třídící znak 83 8004.

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

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

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

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

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

ČSN ISO 7393-1. Jakost vod. Stanovení volného a celkového chloru. Část 1: Odměrná metoda s N,N-diethyl-1,4-fenylendiaminem. Český normalizační institut, Praha, 1995. Třídící znak 757419.

SOP č. 3/2.3. SOP pro test inhibice růstu sladkovodních řas. Státní zdravotní ústav, Praha, 2013, 12 s.

### **Další zmiňované technické normy**

ČSN EN ISO 11267. Kvalita půdy - Inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) látkami znečišťujícími půdu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2014. Třídící znak 83 6451.

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

ČSN EN ISO 11348-1. Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009. Třídící znak 75 7734.

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

ČSN EN ISO 15088. Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009. Třídící znak 75 7762.

ČSN EN ISO 16387. Kvalita půdy - Vliv znečišťujících látek na Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Stanovení vlivu na reprodukci. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2014. Třídící znak 83 6450.

ČSN EN ISO 20079. Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) - Zkouška inhibice růstu okřehku. Český normalizační institut, Praha, 2007. Třídící znak 75 7745.

ČSN ISO 10229. Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového [*Oncorhynchus mykiss Walbaum* (Teleostei, Salmonidae)]. Český normalizační institut, Praha, 1997. Třídící znak 75 7760.

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

ČSN ISO 12890. Jakost vod - Stanovení toxicity pro embryonální a larvální stadia sladkovodních ryb - Semistatická metoda. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2010. Třídící znak 75 7763.

ISO 15685. Soil quality - Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification - Rapid test by ammonium oxidation. 2012.

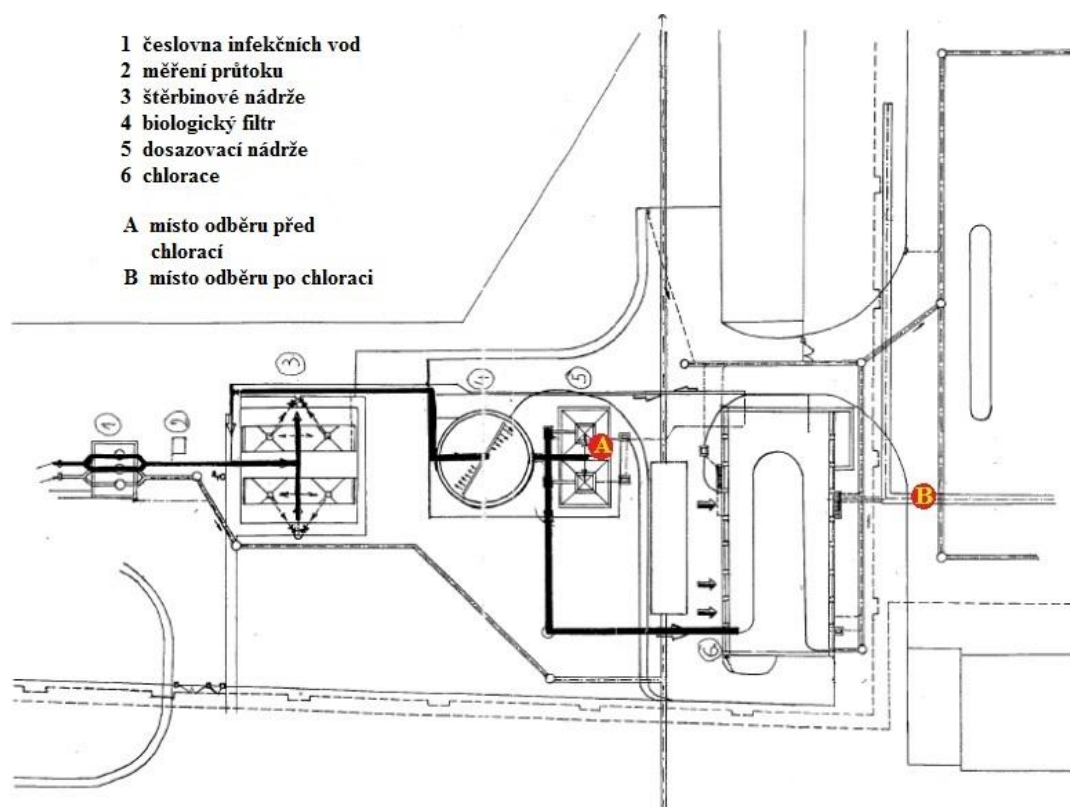
## **Software**

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

FB12 Sirius Software

## 10. Přílohy

### Příloha č. 1 – Fotodokumentace



Obr. č. 1: Schéma ČOV s vyznačenými místy odběru (zdroj: Fuka T., 2010: Provozní řád ČOV FN Motol. Techneco, Praha, 38 s.)



Foto č. 1: Místo odběru po chloraci (zdroj: vlastní)

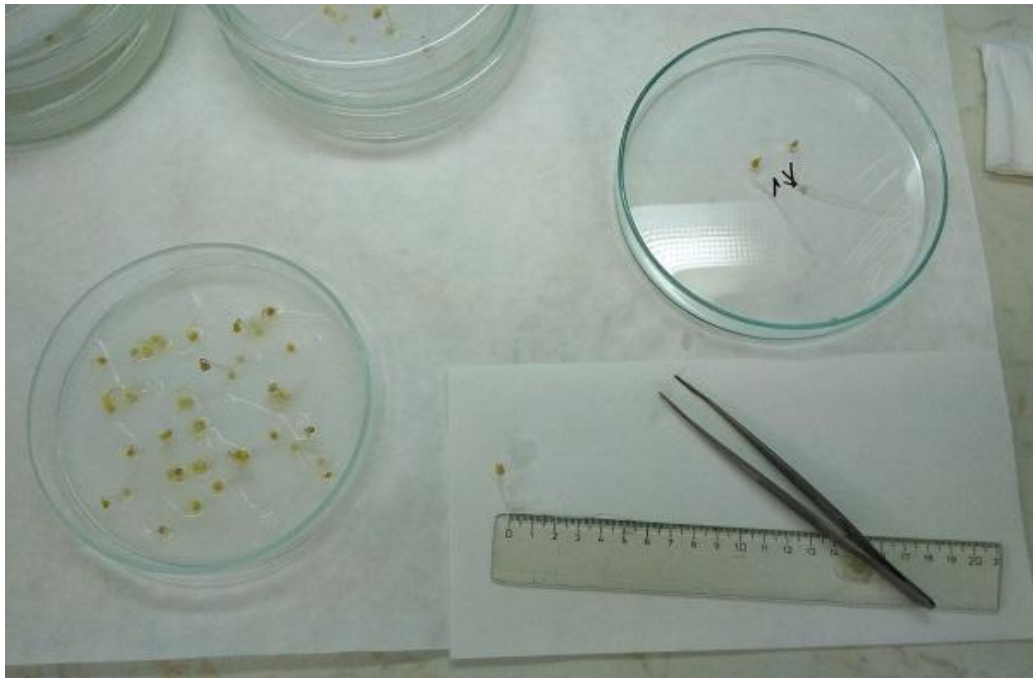


Foto č. 2: Test na semenech hořčice bílé (zdroj: vlastní)

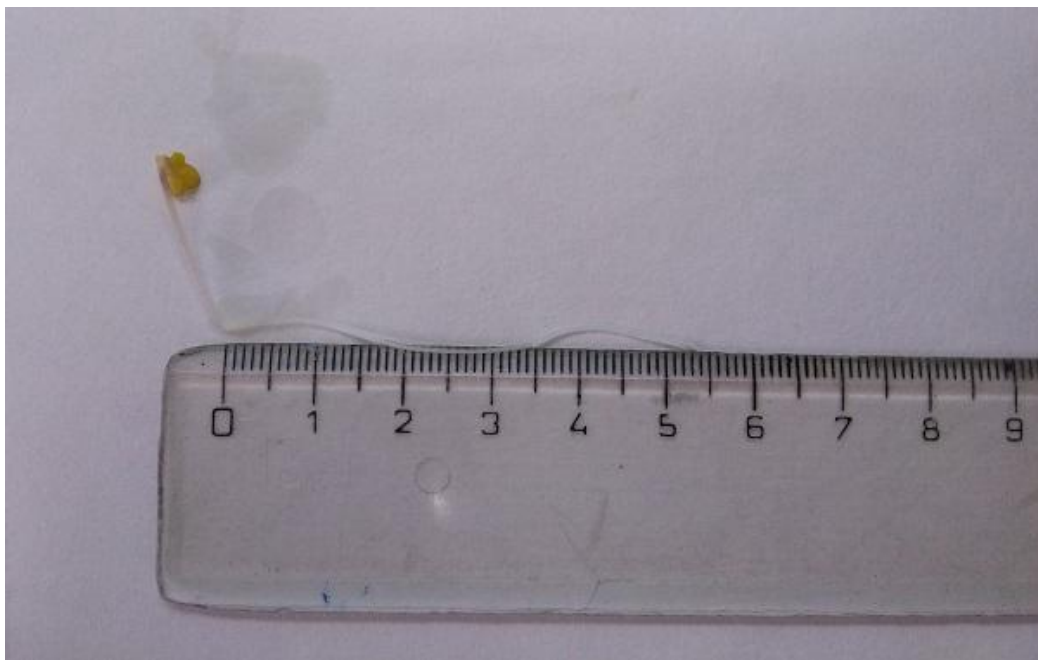


Foto č. 3: Test na semenech hořčice bílé – měření délky kořene (zdroj: vlastní)



Foto č. 4: Test na řasách – příprava koncentrační řady (zdroj: vlastní)



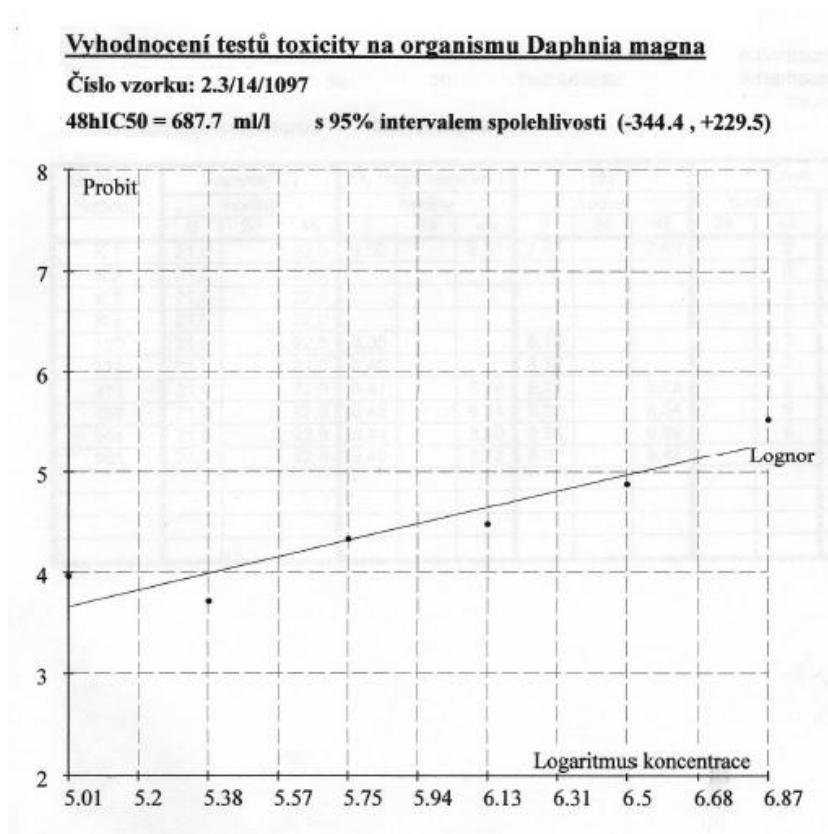
Foto č. 5: Test na luminiscenčních bakteriích *Vibrio fischeri* (zdroj: vlastní)

## Příloha č. 2 – Výstupy z programu EKO-TOX 5.2

Příloha č. 2 obsahuje výstupy z programu EKO-TOX 5.2, v kterém byly pomocí probitové analýzy stanoveny hodnoty  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$ .

Jako vstupní hodnoty pro stanovení  $EC_{50}$  byly použity testované koncentrace odpadní vody a imobilizace perlooček (*Daphnia magna*) v jednotlivých koncentracích vyjádřená v procentech.

Jako vstupní hodnoty pro stanovení  $IC_{50}$  byly použity testované koncentrace odpadní vody a inhibice růstu zelených řas (*Desmodesmus subspicatus*) nebo inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) v jednotlivých koncentracích vyjádřená v procentech.

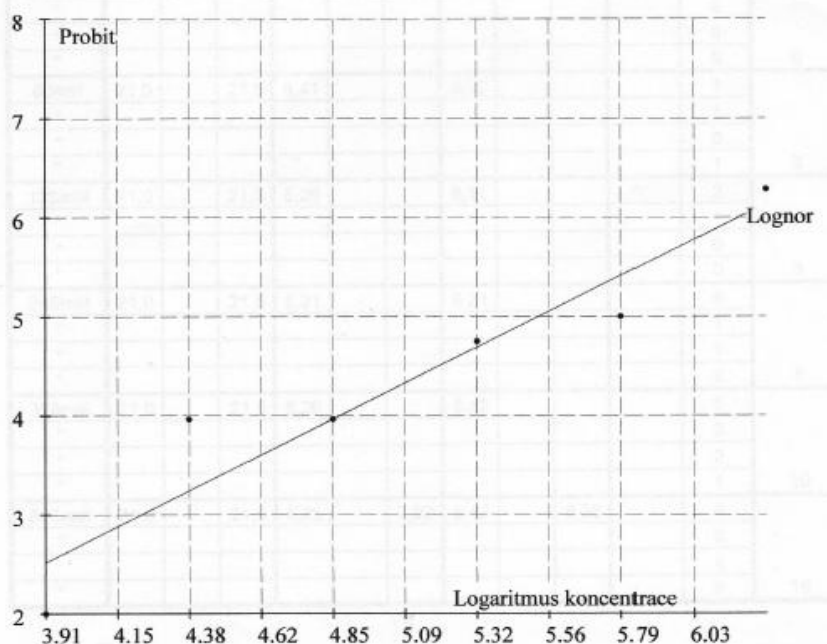


Obr. č. I: Vyhodnocení testu akutní toxicity na perloočkách (vzorek E/1097)

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

Číslo vzorku: 2.3/14/1142

48hIC50 = 251.1 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-120.4, +81.4)

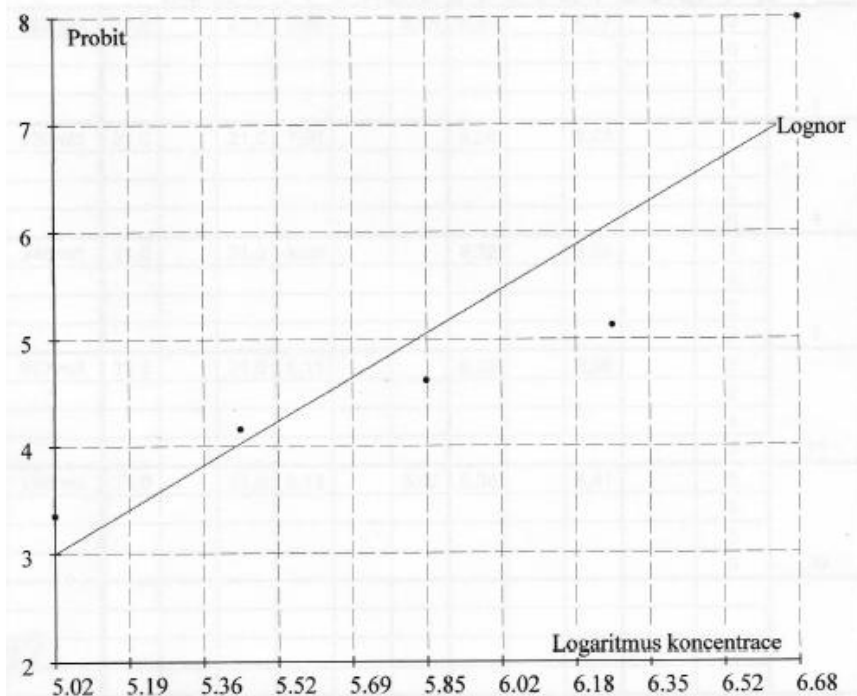


Obr. č. II: Vyhodnocení testu akutní toxicity na perloočkách (vzorek E/1142)

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

Číslo vzorku: 2.3/15/35

48hIC50 = 341.1 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-185.5, +120.1)



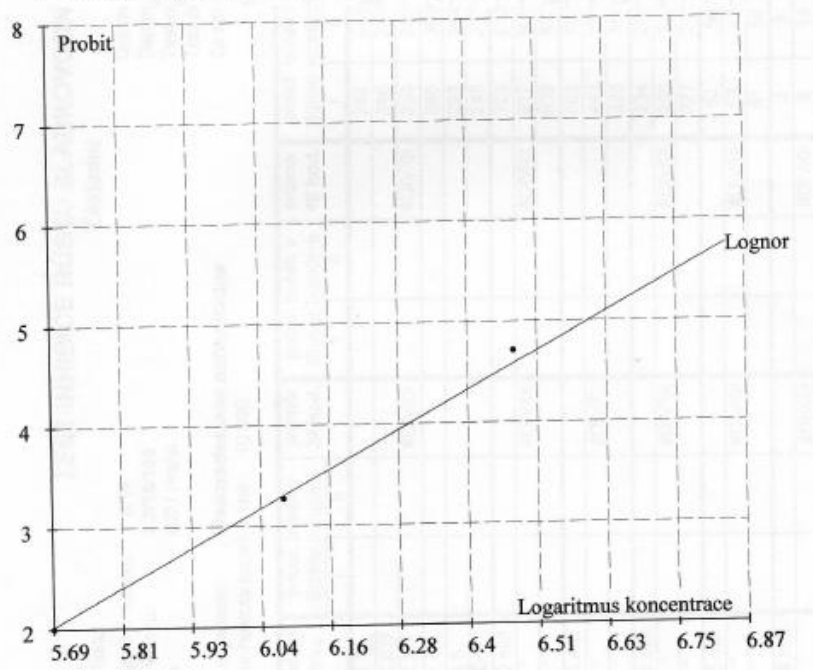
Obr. č. III: Vyhodnocení testu akutní toxicity na perloočkách (vzorek E/35)



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

Číslo vzorku: 2.3/14/965

72hIC50 = 736.6 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-70.5, +64.4)

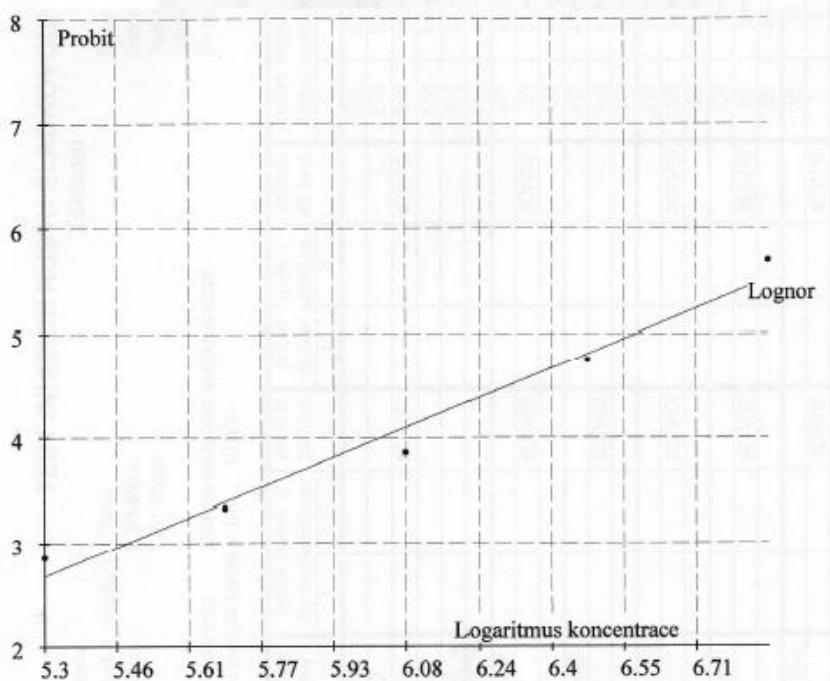


Obr. č. IV: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/965)

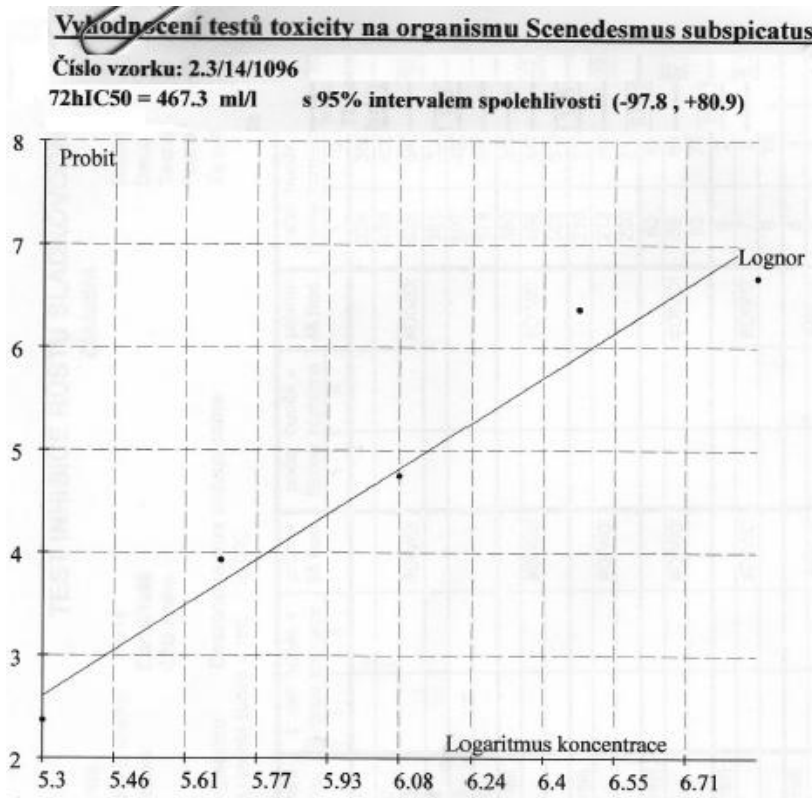
**Vyhodnocení testů toxicity na organismu *Scenedesmus subspicatus***

Číslo vzorku: 2.4/14/966

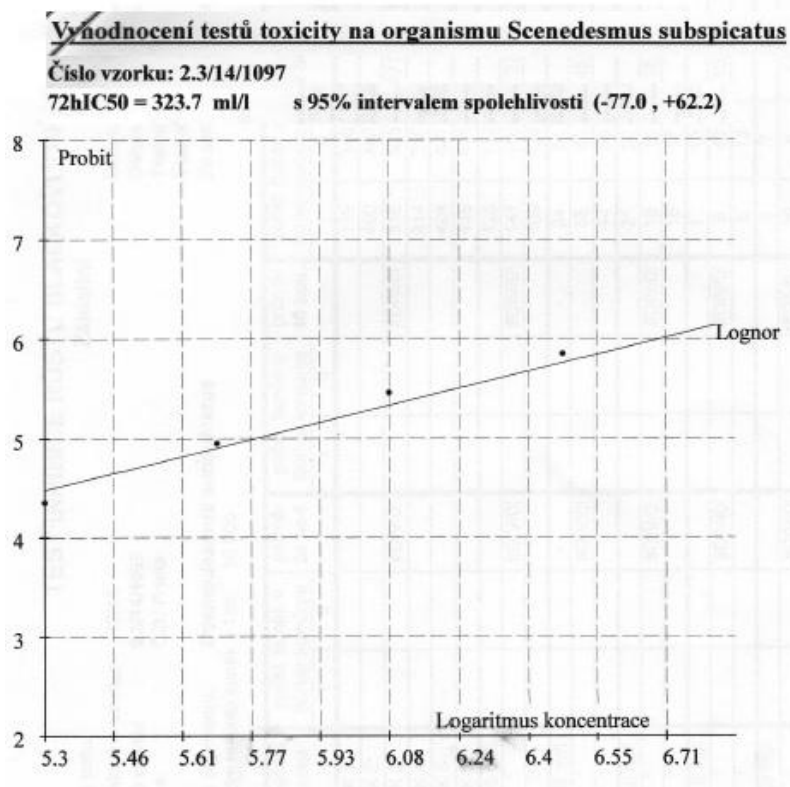
72hIC50 = 721.3 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-172.0, +138.9)



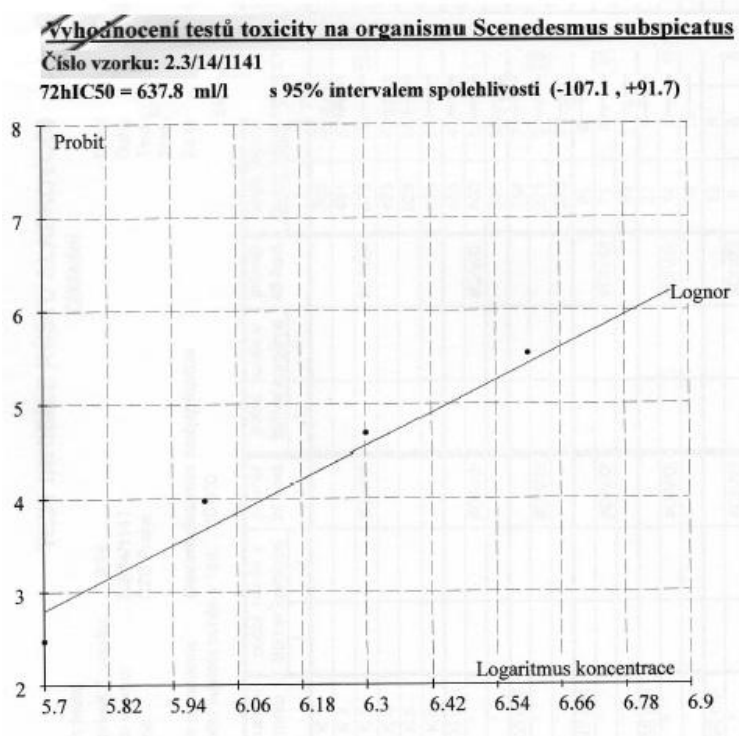
Obr. č. V: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/966)



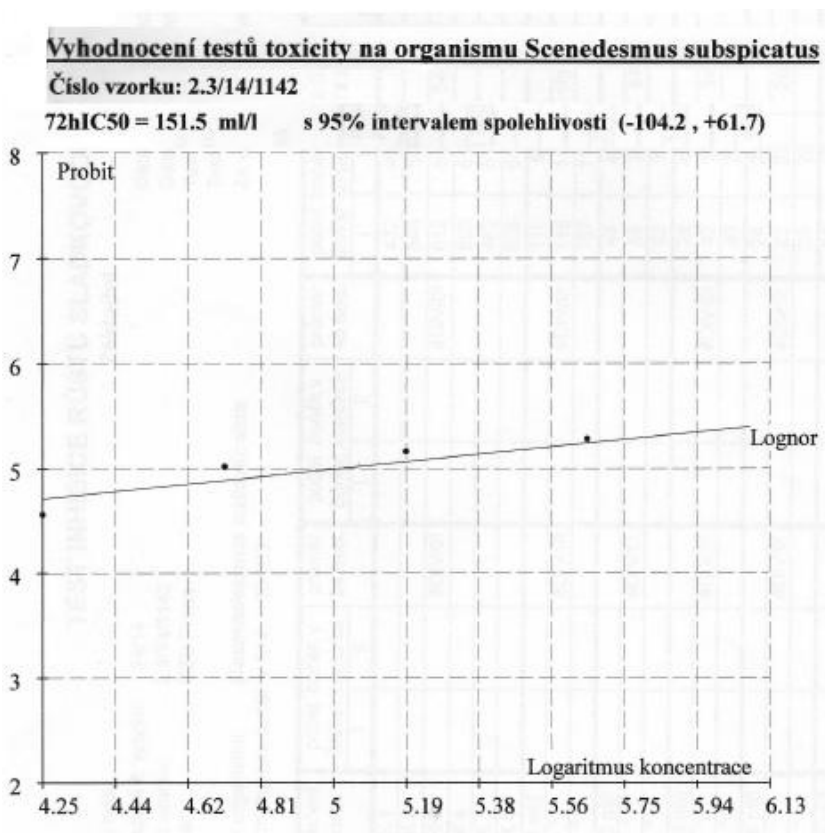
Obr. č. VI: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/1096)



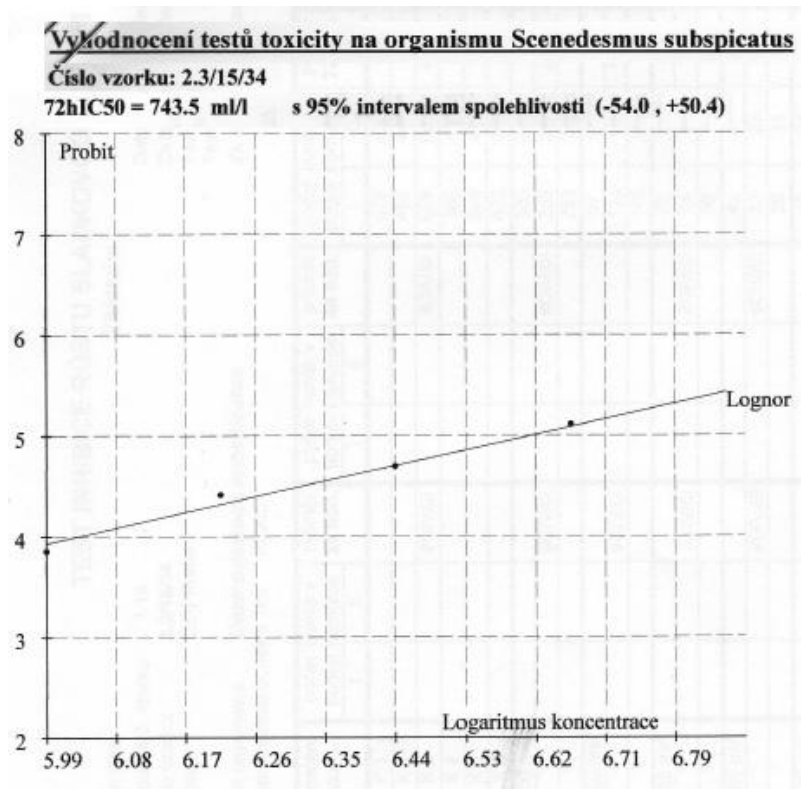
Obr. č. VII: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/1097)



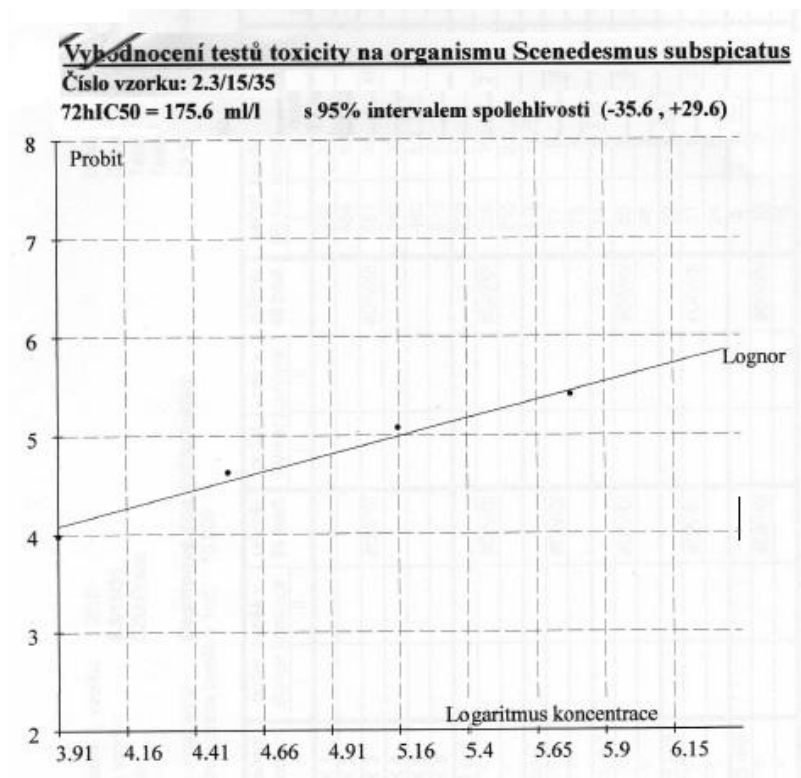
Obr. č. VIII: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/1141)



Obr. č. IX: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/1142)



Obr. č. X: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/34)

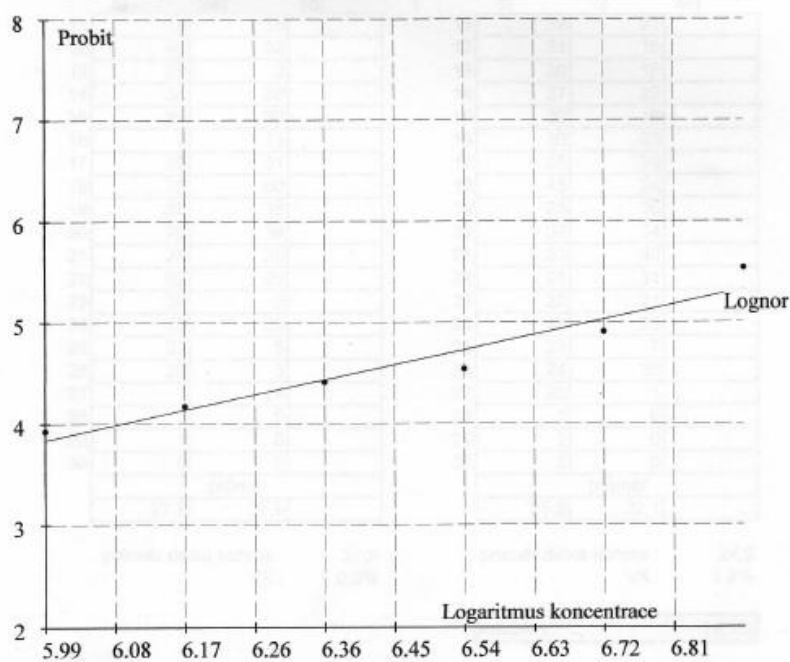


Obr. č. XI: Vyhodnocení testu akutní toxicity na řasách (vzorek E/35)

**Vyhodnocení testů toxicity na organismu *Sinapis alba***

Číslo vzorku: 2.3/15/35

72hEC50 = 815.2 ml/l s 95% intervalem spolehlivosti (-121.7, +105.9)



Obr. č. XII: Vyhodnocení testu akutní toxicity na kořenech hořčice bílé (vzorek E/35)