VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ KALŮ Z ČISTÍREN ODPADNÍCH VOD

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE SLUDGES FROM WATER TREATMENT PLANTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE LUCIE HELLINGEROVÁ
AUTHOR

BRNO 2008

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ KALŮ Z ČISTÍREN ODPADNÍCH VOD

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE SLUDGES FROM WATER TREATMENT PLANTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE LUCIE HELLINGEROVÁ

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2008

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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	**FCH-DIP0262/2007**	Akademický rok: **2007/2008**
Ústav	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka)	**Hellingerová Lucie**	
Studijní program	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)	
Studijní obor	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce	**MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**	
Konzultanti diplomové práce	Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Ekotoxikologické hodnocení kalů z čistíren odpadních vod

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Výběr čistíren pro odběry kalů a výběr optimálních testů pro ekotoxikologické hodnocení
3. Zařazení kalů do tříd vyluhovatelnosti a posouzení jejich ekotoxicity v souladu s platnou legislativou

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Lucie Hellingerová student(ka)	MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D. Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na testování ekotoxicity čistírenských kalů. Testy ekotoxicity byly prováděny na vodných výluzích kalů ze dvou různých čistíren odpadních vod. Pro posouzení ekotoxicity byly použity dva alternativní testy toxicity: Thamnotoxkit F^{TM} na organismu *Thamnocephalus platyurus* a Daphnotoxkit F^{TM} magna na organismu *Daphnia magna*. Ekotoxicita byla hodnocena i testem inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*).

Výsledkem testů ekotoxicity byly hodnoty 24h LC50 pro organismus *Thamnocephalus platyurus*, 24h EC50 a 48h EC50 pro organismus *Daphnia magna* a 72h IC50 pro hořčici bílou. Na základě těchto hodnot byly kaly zařazeny do tříd vyluhovatelnosti a posouzena jejich ekotoxicita. Hodnocení bylo provedeno v souladu s platnou legislativou.

ABSTRACT

This diploma work targets the ecotoxicological testing of sewage sludges. Ecotoxicity tests were conducted on the water extracts of the sewage sludges from two different waste water treatment plants. Two alternative toxicity tests, Thamnotoxkit F^{TM} on sense organisms *Thamnocephalus platyurus* and Daphnotoxkit F^{TM} magna on sense organisms *Daphnia magna* were used for the evaluation of ecotoxicity. Phytotest *Sinapis alba* root growth inhibition test was also employed.

As the results the value of 24h LC50 for *Thamnocephalus platyurus*, 24h EC50 and 48h EC50 for *Daphnia magna* and 72h IC50 for *Sinapis alba* were evaluated. On the basis of the obtained values the sludges were classified into the corresponding degree of leachability, and the dangerous property of the sewage sludges ecotoxicity was evaluated. The evaluation was realised in accordance with the valid legislation of the Czech Republic.

KLÍČOVÁ SLOVA

čistírenské kaly, ekotoxicita, třídy vyluhovatelnosti kalů

KEY WORDS

sewage sludges, ecotoxicity, the grades of leachability

HELLINGEROVÁ, L. *Ekotoxikologické stanovení kalů z čistíren odpadních vod.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 91 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

……
podpis diplomanta

Poděkování:
Ráda bych poděkovala MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé závěrečné práce. Dále také pracovníkům ČOV Modřice – panu Ing. Hrichovi a panu Hellingerovi, kteří mi umožnili odběr vzorků čistírenských kalů a poskytovali mi potřebné informace o kalech z ČOV Modřice. V neposlední řadě své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1. ÚVOD 7
2. CÍL PRÁCE 8
3. TEORETICKÁ ČÁST 9
3.1. Ekotoxikologie 9
3.2. Ekotoxicita 10
3.3. Testy toxicity 11
3.3.1. Rozdělení ekotoxikologických biotestů 11
3.3.1.1. Rozdělení testů podle doby expozice 11
3.3.1.2. Rozdělení testů podle úrovně na které jsou testy prováděny 12
3.3.1.3. Rozdělení testů podle úrovně vývoje metodiky 12
3.3.1.4. Rozdělení testů podle trofické úrovně testovacích organismů 13
3.3.2. Standardní testy toxicity 13
3.3.2.1. Test inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata* 14
3.3.2.2. Test akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata* a *Brachydanio rerio* 15
3.3.2.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* 16
3.3.2.4. Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* 17
3.3.3. Alternativní testy 18
3.3.3.1. Testy s bezobratlými organismy – toxkity 18
3.3.3.2. Bakteriální testy toxicity 21
3.3.4. Testy toxicity na cévnatých rostlinách – fytotesty 22
3.3.5. Podmínky metodiky testů 22
3.3.6. Testovací schéma 23
3.4. Vodný výluh 24
3.4.1. Příprava vodného výluhu 24
3.4.2. Úprava vodného výluhu solemi 25
3.5. Odběr, úprava a uchovávání vzorků 27
3.6. Třídy vyluhovatelnosti 28
3.7. Kaly z ČOV 29
3.7.1. Složení kalu 30
3.7.2. Typy kalů 30
3.8. Zpracování, úprava a likvidace čistírenských kalů 31
3.8.1. Primární metody úpravy kalů 32
3.8.2. Finální metody zpracování kalů 34
3.9. Současný stav nakládání s čistírenskými kaly v ČR a EU 37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 39
4.1. Vzorky kalů 39
4.1.1. Technologie Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno 39
4.1.2. Technologie Čistírny odpadních vod v Modřicích 40

4.2. Přístroje a zařízení ... 41
4.3. Příprava vodných výluhů kalů ... 41
4.4. Testy ekotoxicity ... 42
4.4.1. Daphnotoxkit F^{TM} ... 42
4.4.2. Thamnotoxkit F^{TM} ... 44
4.4.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* ... 45
5. VÝSLEDKY ... 47
5.1. Stanovení sušiny a příprava výluhů kalů ... 47
5.2. Testy ekotoxicity ... 48
5.2.1. Anaerobně stabilizovaný kal ... 48
5.2.1.1. Daphnotoxkit F^{TM} ... 48
5.2.1.2. Thamnotoxkit F^{TM} ... 50
5.2.1.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* ... 51
5.2.2. Odvodněný anaerobně stabilizovaný kal ... 53
5.2.2.1. Daphnotoxkit F^{TM} ... 53
5.2.2.2. Thamnotoxkit F^{TM} ... 56
5.2.2.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* ... 59
5.2.3. Sušený anaerobně stabilizovaný kal ... 61
5.2.3.1. Daphnotoxkit F^{TM} ... 61
5.2.3.2. Thamnotoxkit F^{TM} ... 64
5.2.3.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* ... 66
5.2.4. Primární kal ... 69
5.2.4.1. Daphnotoxkit F^{TM} ... 69
5.2.4.2. Thamnotoxkit F^{TM} ... 72
5.2.4.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* ... 74
5.2.5. Vodné výluhy série I a II ... 77
6. DISKUZE VÝSLEDKŮ ... 80
7. ZÁVĚR ... 82
8. LITERATURA ... 83
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ... 88
10. SEZNAM PŘÍLOH ... 89
11. PŘÍLOHY ... 90

1. ÚVOD

S rostoucím úsilím o zlepšení kvality povrchových vod se v České republice v posledních letech prudce zvyšuje počet čistíren odpadních vod a tím pádem i produkce kalů z těchto čistíren. Vzhledem k závazku, který dala naše republika Evropské unii, by mělo dojít do roku 2010 k výstavbě čistíren odpadních vod ve všech obcích nad 2000 ekvivalentních obyvatel. Z tohoto důvodu se musí počítat s ještě vyšší produkcí čistírenských kalů a je nutno hledat vhodné způsoby jejich využití nebo odstranění. [1, 2]

Je všeobecně přiznáváno, že dosud neexistuje žádny univerzální proces pro efektivní zpracování, využití nebo likvidaci čistírenských kalů. Nejčastěji se kaly využívají v zemědělství, skládkují nebo se spalují. K přednostem využívání kalů v zemědělství (kompostování s jinými surovinami nebo aplikování přímo na zemědělskou půdu) patří zejména významný přísun makroprvků (dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík) a organické hmoty do půdy. Proto jsou čistírenské kaly vhodným hnojivem. Aplikace čistírenských kalů do zemědělské půdy je obecně ekonomicky nejefektivnějším využitím kalů a je prioritním směrem využívání tohoto odpadu v Evropské unii. Hlavním omezením pro masovou a nekontrolovatelnou aplikaci kalů do půdy je výskyt rizikových prvků; zejména těžkých kovů, organických polutantů a patogenních mikroorganismů. [1]

Kal je nevyhnutelným a velice obtížným odpadem každé mechanicko-biologické technologie pro čištění odpadních vod. Produkované objemy čistírenských kalů jsou enormní a náklady na jejich zpracování a dopravu jsou mimořádné. Kaly představují přibližně 1 – 2 % objemu čištěných vod a je v nich transformováno 50 – 80 % původního znečištění. Náklady na jejich likvidaci představují 40 – 50 % z celkových nákladů ČOV. Kalové hospodářství, zejména využití nebo likvidace kalu, je u většiny čistíren odpadních vod limitujícím faktorem jejich provozu. [3, 4]

Jednou z vlastností, která by měla spolurozhodovat o možnosti dalšího využití kalů je jejich případná ekotoxicita. Pro hodnocení této vlastnosti a pro zařazení odpadu do třídy vyluhovatelnosti jsou vyžadovány výsledky testů akutní toxicity na rybách, perloočkách, řasách a test inhibice růstu kořene kulturní rostliny hořčice bílé.

2. CÍL PRÁCE

Předložená diplomová práce je zaměřena na ekotoxikologické hodnocení kalů pocházejících z různých čistíren odpadních vod. Cílem diplomové práce byl výběr vhodných alternativních a standardních testů toxicity pro posouzení ekotoxicity kalů. Na základě výsledků získaných pomocí testů toxicity bude posouzen vliv kalů na životní prostředí; při hodnocení bude postupováno v souladu s platnou legislativou. Bude provedeno zařazení kalů do tříd vyluhovatelnosti a posouzeno, zda hodnocené kaly vykazují nebezpečnou vlastnost ekotoxicitu

Pro splnění cílů bude provedeno:

- Zhotovení výluhů kalů z čistíren odpadních vod
- Ekotoxikologické hodnocení výluhů kalů pomocí vybraných alternativních testů toxicity
- Ekotoxikologické hodnocení výluhů kalů pomocí vybraných standardních testů toxicity
- Posouzení vhodnosti vybraných testů ekotoxicity pro ekotoxikologické hodnocení výluhů kalů
- Posouzení vybraných kalů z hlediska ekotoxicity a jejich zařazení do tříd vyluhovatelnosti v souladu s platnou legislativou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je poměrně mladá mezioborová vědní disciplína, která je na hranici mezi chemií životního prostředí, toxikologií, ekologií a biologií. Jako o samostatném vědním oboru se o ní hovoří teprve od konce 60. let 20. století. [5]

Termín ekotoxikologie použil jako první okolo roku 1969 člen francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut. Definoval tuto disciplínu jako „studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva“. [6]

Počátky pozorování dopadů lidské činnosti na životní prostředí se objevují v období průmyslové revoluce, kolem roku 1850. Jedním z prvních vědců zkoumajících vodní ekosystémy byl Forbes. První test akutní toxicity provedli při zkoumání průmyslové odpadní vody v roce 1863 Penny a Adams a v roce 1885 Weigelt, Saare a Schwab. První „standardní metoda“ pro posouzení ekotoxicity vodních ekosystémů byla publikována Hartem v roce 1945 a následně přijata společností American Society for Testing and Materials. [6]

Vyčlenění environmentální toxikologie a následně ekotoxikologie z klasické toxikologie podnítila jedna z klíčových knih šedesátých let „Mlčící jaro“ americké bioložky Rachel Carsonové z roku 1962. Autorka v díle rozvíjí myšlenky totální katastrofy, k níž by mohlo vést další neuvážené používání pesticidů. Tato kniha vzrušila veřejné mínění a má značnou zásluhu na tom, že se ochrana životního prostředí začala stávat hnutím. [7]

Na rozdíl od environmentální toxikologie, která se soustředí na jednotlivé účinky toxických látek, ekotoxikologie spojuje účinky toxických látek na všechny úrovně biologické organizace, tzn. od úrovně molekulární k celým společenstvím a ekosystémům. Kromě sledování účinků látek je předmětem zájmu ekotoxikologie i jejich pohyb v životním prostředí. [8, 9]

Cílem oboru je vyvíjet metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních reprodukovatelných podmínek. Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří. [10]

Do ekotoxikologie zařazujeme především stanovení akutní a chronické toxicity na rybách, korýších a mikroorganismech ve vodních tocích apod. Dále se provádí testování toxikologických účinků na ptactvu, zvěři, hmyzu, ale i např. na půdních mikroorganismech. Do ekotoxikologie můžeme zahrnout i tzv. fytotoxikologii, která sleduje působení chemických škodlivin na rostliny, ale i působení rostlinné buňky na škodlivinu, vedoucí k její biotransformační přeměně. [11]

3.2. Ekotoxicita

Ekotoxicita je jednou ze základních charakteristik chemických látek, chemických přípravků včetně pesticidních a odpadů. Povinnost hodnotit ji je v České republice i v Evropské unii dána legislativou. V české republice je to zejména Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů, Zákon č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči a Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech, ve znění Zákona č. 314/2006.

Legislativa České republiky (vyhláška č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadu, ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb.) zavádí pojem ekotoxicita také pro oblast odpadů. Ekotoxicita představuje akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí a je jednou z nebezpečných vlastností odpadu označenou symbolem H14, tak jak je uvedeno v definici této nebezpečné vlastnosti odpadů ve výše citované vyhlášce. Stanovuje se pomocí testů akutní toxicity, kterým je podroben vodný výluh odpadu. Testy se provádějí na zástupcích ryb, zooplanktonu, fytoplanktonu a vyšších rostlin, uvedených. Testovací organismy využívané pro hodnocení ekotoxicity reprezentují důležité články ekosystému s rozdílnou citlivostí k různým látkám obsažených v odpadu a uvolněných do vodného výluhu odpadu. Pro stanovení ekotoxicity jsou rozhodující výsledky testu nejcitlivěji reagujícího organismu.

V případě, že se nebezpečná vlastnost H14 Ekotoxicita posuzuje u kalu, který uvolňuje kapalnou fázi, zkouší a hodnotí se postupem stanoveným pro hodnocení nebezpečných vlastností kapalná i pevná fáze samostatně.

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 testovaný organismus tyto hodnoty:

$$LC(EC, IC)50 \leq 10 \text{ ml/l} \quad [12]$$

Testovanými organismy jsou:

- *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod.)
- *Daphnia magna* (doba působení 48 hod.)
- *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve *Selenastrum capricornutum*) (doba působení 72 hod.)
- *Sinapis alba* (semeno, doba působení 72 hod.) [12]

Vysvětlivky:

LC50 – koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku.

EC50 – koncentrace, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů (*Daphnia magna*).

IC50 – koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50procentní inhibici růstu kořene *Sinapis alba* ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku [12].

3.3. Testy toxicity

Součástí ekotoxikologické práce jsou biologické testy toxicity (biotesty). Biotest je definován jako „zkouška“ využívající biologický systém, který zahrnuje expozici organismu testovaným materiálem a stanovuje odpověď organismu. [13] Testy toxicity bývají nespecifické, to znamená, že zachycují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovaných vzorcích bez nutné bližší znalosti jejich složení či chemické struktury. [8]

Testy toxicity se využívají především pro hodnocení nově vyvinutých chemických látek a přípravků včetně pesticidních a při klasifikaci odpadů. Velký význam mají testy pro zjišťování potenciálního nebezpečí pro vodní ekosystém. Sledují reakce, kdy je určený často jednoduchý organismus s dobře známými životními projevy, stavbou těla a fyziologií v uměle připraveném prostředí vystaven známé koncentraci známé látky nebo je daný organismus vystaven působení neznámého prostředí. Z reakce organismu se usuzuje na rizika plynoucí z expozice sledované látky. [14]

Bateriové testy, které užívají soubory různých organismů (bakterie, řasa, dafnie, vířníci, rybky, kořeny hořčice apod.) jsou na rozdíl od testů na jediném organismu mnohem spolehlivější. [8]

3.3.1. Rozdělení ekotoxikologických biotestů

Testy toxicity se dělí podle několika hledisek:

3.3.1.1. Rozdělení testů podle doby expozice

- **Testy akutní toxicity**

Sledují se účinky, které se projeví v krátké době v životě daného organismu po jednorázovém podání zkoumané látky. Při hodnocení akutní toxicity se zjišťují hodnoty EC50, popř. LC50 či IC50. LC50 je letální koncentrace, která způsobí 50 % úmrtnost (mortalitu) testovaných organismů v testech na rybách. IC50 je inhibiční koncentrace, která způsobí 50 % snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku v testech na zelených řasách, hořčici bílé a na okřehku menším. EC50 je efektivní koncentrace, která vyvolává 50 % úhyn, či imobilizaci testovaných organismů v testech na zástupcích zooplanktonu. Doba trvání akutního testu je v rozmezí 24 – 72 ± 2 hodiny. [15, 16, 17]

- **Testy subchronické toxicity**

Subchronický toxický účinek je vyvolaný podáním sníženého množství škodliviny než je tomu u akutní toxicity, ale organismus je tomuto účinku vystaven po delší dobu. Toxické látce jsou testované organismy vystaveny opakovaně, obvykle jednou denně. Testy trvají 1 až 3 měsíce. [16, 17]

- **Testy chronické toxicity**

Tyto testy představují studium účinků testované látky, která je opakovaně podávaná dlouhodobě, zpravidla déle jak tři měsíce. Negativní vliv toxické látky je patrný až na dalších vývojových stádiích, generacích a potomcích, na snížení porodnosti, nebo se projevuje výskytem degenerativních útvarů a možným přenosem dědičných vad a chorob u testovaných jedinců. Testy se provádí zejména na řasách a vodních korýších. Poskytují informace nutné ke stanovení hodnot NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) a LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level). NOAEL je nejvyšší hodnota dávky (koncentrace) bez pozorovaného nepříznivého účinku a LOAEL nejnižší dávka nebo koncentrace spojená s pozorovaným nepříznivým účinkem. [15, 17]

3.3.1.2. Rozdělení testů podle úrovně na které jsou testy prováděny

- **Testy prováděné na úrovni buněk a tkání**

Testy na úrovni buněk a tkání se používají pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech. Výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost a naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků „in-vitro“ od výsledků obdržených „in-vivo“.

- **Testy na úrovni jedinců (organismů)**

Tyto testy představují naprostou většinu v současnosti prováděných testů toxicity. I když existují jisté problémy s jejich reprodukovatelností a s rizikem při interpretaci výsledků a jejich extrapolaci na přírodní podmínky, jsou tyto testy vhodným kompromisem přijatelným jak z hlediska technického, tak i ekonomického. Při ekotoxikologickém monitoringu by se nikdy neměly dělat závěry z testování na jednom organismu. Je důležité provádět testování na větším počtu organismů, tím potom poroste výpovědní hodnota celého postupu pro zkoumaný vzorek.

- **Testy na úrovni společenstev (biocenóz)**

Na úrovni biocenóz se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu přírodě blízkém., Nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně; u organismů mohou nastat různé reakce na určitý druh toxikantu, změny biocenóz mohou nastat v důsledku narušení potravních řetězců apod. Reprodukovatelnost výsledků těchto testů je velmi omezená z neboť lze velmi těžko vytvořit identické podmínky těchto testů. [6, 18]

3.3.1.3. Rozdělení testů podle úrovně vývoje metodiky

- **Biotesty 1. generace**

První generace testů je představována klasickými (standardními, konvenčními) metodikami, které jsou založené na akutních testech na organismech a kulturách chovaných a udržovaných.v laboratoři.

- **Biotesty 2. generace**

Druhá generace testů toxicity se začíná v současné době stále více používat a je představována alternativními biotesty, které jsou známé pod pojmem mikrobiotesty. Tes

- **Biotesty 3. generace**

Třetí generace ekotoxikologických testů, která využívá biosenzory nebo biosondy, je v současnosti na úrovni základního výzkumu a jejich uplatnění se očekává zejména v on-line monitorovacích systémech a screeningových testech toxicity. [18, 19]

3.3.1.4. Rozdělení testů podle trofické úrovně testovacích organismů

Organismy by měly být vybírány tak, aby byly zastoupeny všechny trofické úrovně tzn. producenti – konzumenti – destruenti. Prakticky to znamená 4 úrovně studovaného ekosystému, a to řasy, bezobratlí, ryby a bakterie. [20]

3.3.2. Standardní testy toxicity

Mezi nejznámější a v laboratorní praxi nejrozšířenější patří standardní laboratorní testy akutní toxicity. V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří metodiky ISO (International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci) a metodiky OECD (Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj). [18]

Pro testování ekotoxicity se klasicky používají ryby, bezobratlí, řasy a semena klíčících kulturních rostlin, přičemž existuje mnoho metodik, podle kterých se tyto testy standardně provozují. [13, 18]

V České republice jsou doporučovány čtyři konvenční testy, identické s evropskými ISO a OECD normami:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna Straus* (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN EN 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692; 1989)
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan* (*Teleostei, Cyprinidae*)] – část 2: Obnovovací metoda
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů. [21]

Tyto biotesty jsou uznávány mezinárodními legislativami, ale jejich provedení je značně náročné. Kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat za specifických podmínek a zajišťovat jim kvalitní potravu. Testování zabírá mnoho laboratorního prostoru, spotřebovává velká množství testovaného materiálu, vyžaduje pravidelnou péči o organismy a je tedy časově velmi náročné. Základem testů je příprava vodného výluhu odpadu, zásobních roztoků solí pro zvolené typy testovacích organismů, chovy testovaných organismů a vhodné laboratorní prostředí s vybavením. [18, 19]

3.3.2.1. Test inhibice růstu sladkovodních řas Desmodesmus subspicatus a Pseudokirchneriella subcapitata

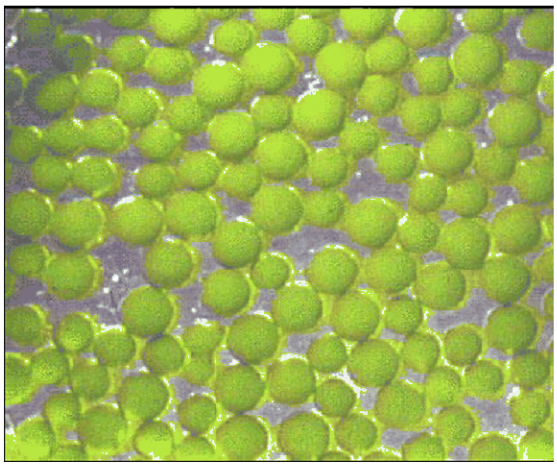
Jednodruhové řasové kmeny se po několik generací kultivují při teplotě 25 ± 2 °C za kontinuálního osvětlení 6000 lx v definovaném živném roztoku, který je zároveň ředící vodou při přípravě koncentrační řady testované látky nebo vodného výluhu odpadu. Řasy se inkubují po dobu 72 hodin v různých koncentracích testované látky. V době inkubace se v nich jedenkrát za 24 hodin měří hustota buněk pomocí Bůrkerovy počítací komůrky a řasová suspenze se třikrát denně promíchává. Účinek testované látky se na řasové kultuře projeví buď jako inhibice nebo stimulace. Pokud testovaná látka působí na řasu pouze stimulačně výpočet 72h IC50 se neprovádí. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích a na vyšší koncentrace působí inhibičně, vyhodnocuje se 72h IC50 za použití koncentrací, ve kterých byla prokázána inhibice růstu.

Jako zkušební organismus lze použít tyto planktonní sladkovodní řasy: *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus)*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve *Selenastrum capricornutum,* syn. *Raphidocellis subcapitata* Koršikov) *Scenedesmus quadricauda* (obr. 1 a 2).

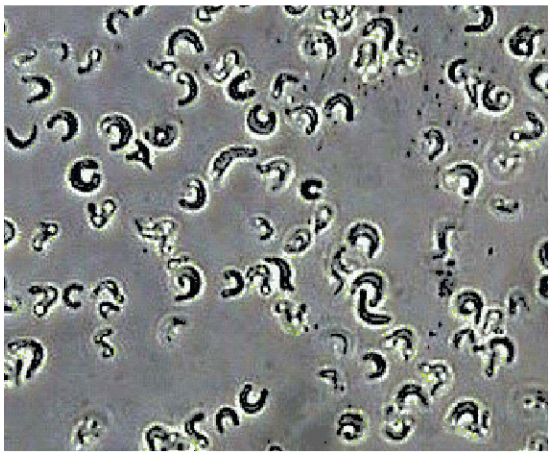
Výsledky testu se považují za platné, jestliže se hustota buněk v kontrole v průběhu 72 hodin zvýší více než 16krát a pH se nezmění o více než 1,5 jednotky.

Stanovení hodnoty IC50 se provádí dvěma způsoby, a to stanovením hodnoty IC50 pomocí integrálu biomasy nebo pomocí růstových rychlostí. V prvním případě je základem pro výpočet IC50 vytvoření růstové křivky řasové kultury pro jednotlivé koncentrace a kontrolu. Porovnáním ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a testovaných vzorcích se stanoví inhibice růstu. V případě stanovení hodnoty IC50 pomocí růstových rychlostí je výpočet inhibice růstu založen na porovnání růstových rychlostí řasové kultury v testovaných roztocích a kontrole.

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky. [12, 18, 20]



Obr.1: Pseudokirchneriella subcapitata v imobilizovaném stavu [22]



Obr. 2: Pseudokirchneriella subcapitata v mobilizovaném stavu [22]

3.3.2.2. Test akutní toxicity na rybách Poecilia reticulata a Brachydanio rerio

Ryby se vystaví po dobu 48 hodin při teplotě 23 ± 2 °C při osvětlení 12 až 16 hodin denně účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředicí vodě. Současně se nasadí testovací organismy do ředicí vody bez testované látky – kontrola. V průběhu testu se kontroluje stav a chování ryb a odlovují se uhynulí jedinci. V časovém úseku 24 a 48 hodin se zaznamenají celkové počty uhynulých ryb v jednotlivých koncentracích a kontrolním akváriu. Z těchto hodnot se stanoví 24h LC50 a 48h LC50. V praxi se tento test obvykle provádí podle normovaných postupů semistatickým způsobem po dobu 96 hodin s výměnou lázně každých 24 hodin. Je také možno využít metodu průtočného testu.

Jako testovací organismus se využívá živorodka duhová (*Poecilia reticulata* Peters) (obr. 3). Má být pohlavně diferencovaná, v rozmezí délek těla 15 až 25 mm, ve věku 3 až 4 měsíců. Může se použít také danio pruhované (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) (obr. 4), homogenní, ve věku 2,5 až 3,5 měsíce, s délkou těla 25 až 35 mm. Používají se ryby v přirozené poměru pohlaví 1:1 a jedinci se vybírají náhodně. Před testem se ryby aklimatizují 7 dnů v ředicí vodě, při teplotě a osvětlení jako při vlastní testu. Ryby se nekrmí 24 hodin před zahájením testu. V průběhu testu v intervalu 24 hodin se zaznamenává teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po ukončení testu jsou živí jedinci (s výjimkou ryb v kontrolní skupině) usmrceni oxidem uhličitým vyrobeným v sifonové lahvi, podle zásad etické práce s laboratorními zvířaty s ohledem na zákon č. 77/2004 Sb., kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Výsledky testů se považují za platné, jestliže koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích a v kontrole neklesla během testu pod 60 % nasycení, koncentrace testované látky v průběhu testu nepoklesla pod 80 % nominální koncentrace a mortalita ryb v kontrole nepřekročila 10 %.

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky. [12, 20]

Obr. 3: Poecilia reticulata [23]

Obr. 4: Brachydanio rerio [24]

3.3.2.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

Semena hořčice bílé se vystaví na dobu 72 hodin účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředicí vodě, současně se na dobu 72 hodin nasadí semena do ředicí vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po uplynutí dané doby se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a změří se délka kořenů. Z naměřených hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72h IC50). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně (průměrná délka kořene v testované látce je větší než v kontrole), výpočet IC50 se neprovádí. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působí inhibičně, vyhodnocuje se IC50 za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu.

Semena hořčice bílé *Sinapis alba* (obr. 5) mají okrově žlutou barvu a střední velikost 1,5 až 2,5 mm. Jejich klíčivost musí být minimálně 90 %.

Výpočet průměrné délky kořene Sinapis alba:

$$\overline{L} = \frac{\sum L_i}{n}, \text{ kde} \qquad (1)$$

$\overline{L}$ … je průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm)
L_i ….délka i-tého kořene ve zvolené koncentraci (mm)
n ….. je počet semen ve zvolené koncentraci (30)

Stejným způsobem se vypočte průměrná délka kořene v kontrole L_c (mm).

Výpočet inhibice růstu kořene v testované látce oproti kontrole

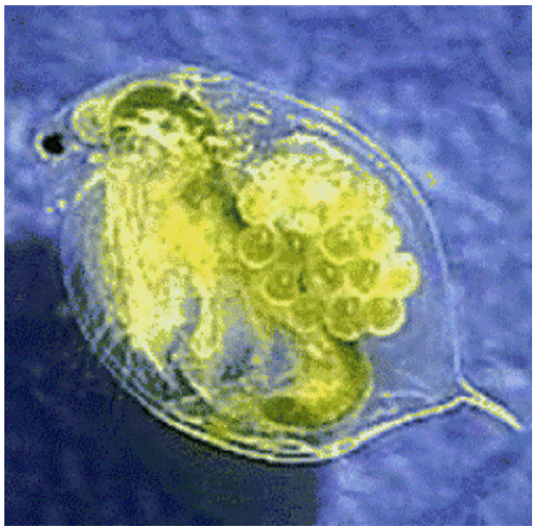
$$\overline{I_i} = \frac{\overline{L_c} - \overline{L_v}}{\overline{L_c}} \cdot 100, \text{ kde} \qquad (2)$$

I_i … inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci, je-li I < 0, jedná se o stimulaci růstu
$\overline{L_c}$ … průměrná délka kořene v kontrole (mm)
$\overline{L_v}$ … průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

V kontrole musí být dosaženo minimální klíčivosti 90 % a zjištěná hodnota 72h IC50 dichromanu draselného musí být ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky. Základem pro hodnocení inhibičních (stimulačních) účinků testované látky na *Sinapis alba* je průměrná délka kořene zjištěná v testovacích miskách ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Nevyklíčená semena se započítávají do průměru jako nulová délka kořene, stejně jako semena, která vyklíčí, ale nevytvoří kořen. [12, 20, 25]

Obr. 6: Sinapis alba [26]



Obr. 6: Daphnia magna [27]

3.3.2.4. Akutní imobilizační test na perloočkách Daphnia magna

Perloočky se vystaví účinkům různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředicí vodě po dobu 24 a 48 hodin, při teplotě 20 ± 2 °C, bez krmení a osvětlení nebo při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Současně se nasadí testovací organismy do ředicí vody bez testované látky jako kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroluje stav perlooček a zaznamenávají se uhynulí a imobilizovaní jedinci v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Ze získaných hodnot se následně stanoví 24 a 48 hodinová efektivní koncentrace EC50.

Jako testovací organismus jsou používány perloočky *Daphnia magna* Straus (obr. 6) ve stáří do 24 hodin, nejméně třetí generace.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích na konci testu musí být větší nebo rovna 2 mg/l. Koncentrace testované látky během testu nesmí klesnout pod 80 % nominální koncentrace. Imobilizace kontrolních organismů musí být menší nebo rovna 10 %. Zjištěná hodnota 24h EC50 dichromanu draselného musí být v rozsahu od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky. [12, 20]

3.3.3. Alternativní testy

V poslední době se těší zvýšené pozornosti alternativní testy, tzv. mikrobiotesty. [19] Tyto testy, na rozdíl od standardních biotestů nejsou validovány a schváleny institucemi. Jejich výsledky však ve většině případů odpovídají výsledkům standardních testů toxicity a tak je jen otázkou času, kdy budou i tyto testy zařazeny mezi testy standardní. [28]

Testovací organismy mohou představovat bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury, atd. Tyto organismy se dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích (bezobratlí), lyofilizovaném stavu (baktérie) nebo v imobilizované formě (řasy) a podle potřeby se mohou oživit před vlastním testováním. Testům se někdy říká miniaturizované testy, což je dáno minimálním množstvím objemů potřebných pro testování, minimálním požadavkem na laboratorní prostory a vybavení. Malou potřebou testovaných roztoků umožňují provedení více paralelních testů, alternaci při vyhodnocování a v případě potřeby i opakování testu. Výstup z testů může mít různý charakter, např. počet mrtvých nebo nepohyblivých organismů, změna absorbance, fluorescence nebo luminiscence atd.. Mikrobiotesty jsou vhodné pro zhodnocení toxicity kontaminovaného vodného a suchozemského prostředí, odpadních vod i pevných odpadů. [18, 19, 29]

3.3.3.1. Testy s bezobratlými organismy – toxkity

Toxkity jsou mikrobiotesty využívající klidových stádií zooplanktonu. Testovací organismus se líhne z klidových stádií (cyst, ephippií) během 20 – 24 hodin. Testy jsou k dispozici v komerčním balení, které obsahuje veškerý materiál k jejich provedení: pipety, testovací destičky, živné médium, dormantní stádia testovacích organismů, protokol o provedené zkoušce a návod k použití. Testy se provádějí v akvatickém prostředí. Doména, která se udává u každého toxkitu určuje, pro jakou vodu je daný test určen; např. „F“ pro sladkou vodu a „M“ pro vodu slanou. [13, 29]

Daphnotoxkit F^{TM} magna a pulex

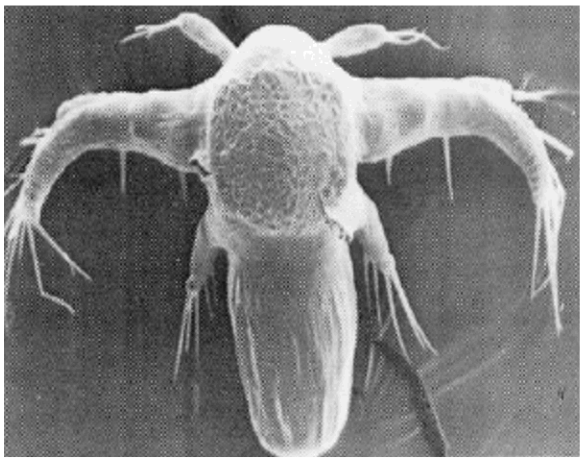
Daphnotoxkit používá spící vajíčka korýšů *Daphnia magna* (obr. 2), *Daphnia pulex* nebo *Ceriodaphnia dubia*, které jsou celosvětově používány k testům toxicity. Tato vajíčka jsou chráněna chitinovou skořápkou zvanou ephippium a mohou být skladována po dlouhou dobu bez ztráty životaschopnosti. Když jsou ephippia umístěna do specifických životních podmínek vyvinou se z nich během tří dnů larvy (neonaty), které mohou být přímo použity pro testování.

Líhnutí ephippií je započato 3 – 4 dny před začátkem testu při 20 °C a osvětlení 6 000 lx. Inkubace musí probíhat při 20 °C a po 24 a 48 hodinách se sleduje imobilizace organismů. Testovací destičky jsou přizpůsobeny velikosti organismu, lze testovat 5 koncentrací ve čtyřech opakováních s pěti organismy v jamce. Výsledkem tohoto mikrobiotestu je stanovení hodnot 24h EC50 a 48h EC50 (nebo LC50). [13, 30]

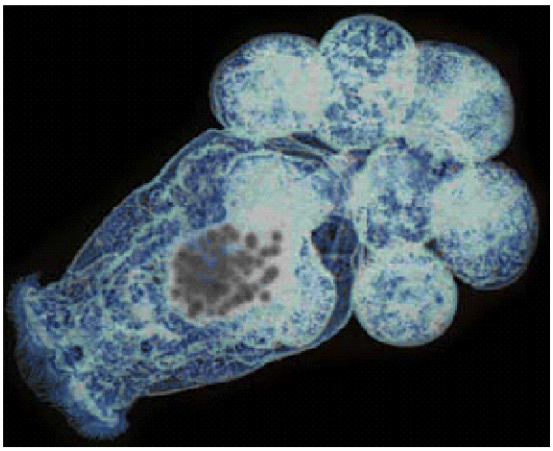
Tento test se řídí ISO normou 6341 a OECD direktivou 202. [30]

Thamnotoxkit F^{TM}

Testovacím organismem jsou larvy nižšího sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* (obr. 7), které jsou vylíhlé z cyst. S přípravou testu se začíná 20 – 22 hodin před vlastním testováním, a to líhnutím organismů z vajíček ve standardní vodě při 25 °C za stálého osvětlení 4000 lx. Následující den se plní mikrodestička testovacími roztoky a mikropipetou se do každé jamky přenáší vylíhlé organismy. Inkubace probíhá 24 hodin při 25 °C ve tmě. Po 24 hodinách se počítají mrtvé organismy v každé testovací jamce a z % mortality v závislosti na koncentraci roztoku se vypočte hodnota 24h LC50. [19, 29]



Obr. 7: Thamnocephalus platyurus [22]



Obr. 8: Brachionus calyciflorus [22]

Rotoxkit F^{TM}

Testovací organismus představuje vířník *Brachionus calyciflorus* (obr. 8). Jedná se o zefektivněnou verzi standardní metody, která byla přijata v USA Úřadem pro standardizaci ASTM (American Society For Testing And Materials – Americká společnost pro testování a materiály). Nevýhodou tohoto mikrobiotestu může být malá velikost vířníků, která činí počáteční manipulaci s nimi obtížnější. Na druhé straně je tento test zajímavý pro české podmínky, protože *Brachionus calyciflorus* je běžnou součástí našich vodních ekosystémů.

Organismy se líhnou 16 – 20 hodin před vlastním testem při teplotě 25 °C a kontinuálním osvětlení 4 000 lx. Biotest se provádí v temnu při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. Oživené rotifery se poté podrobí testu toxicity na připravené koncentrační řadě testovaného roztoku. Opět se po ukončení inkubace stanovuje mortalita a hodnota LC50. [13, 29]

Tento test se řídí standardní ASTM direktivou E14490-91. [31]

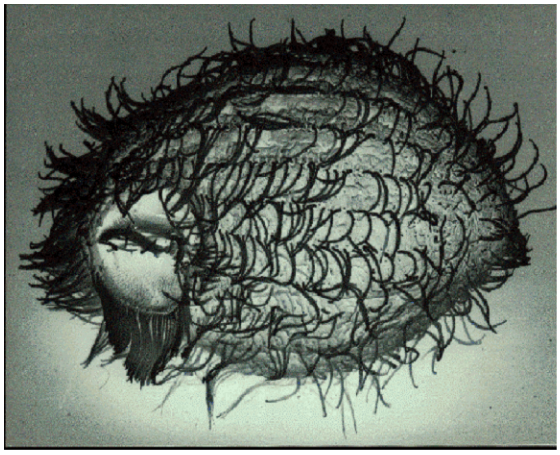
Algaltoxkit F™

Při tomto biotestu se pomocí inhibice růstu testovaného organismu řas *Selenastrum capricornutum* (nyní pojmenované *Pseudokirchneriella subcapitata*) (obr. 4) stanovuje 72h IC50. Využití těchto řas v testech toxicity je velmi výhodné z důvodu jejich rychlého růstu. Před nasazením do testu jsou řasy imobilizovány ve speciálním prostředí, kde jsou schopny přežít i několik měsíců. Imobilizace se provádí protřepáním a následnou centrifugací při 3 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Pro spektrofotometrické stanovení optické hustoty je nezbytná třídenní inkubace při teplotě 21–25 °C. V průběhu inkubace (24, 48 hodin) a po 72 hodinách se stanoví IC50. [22, 29]

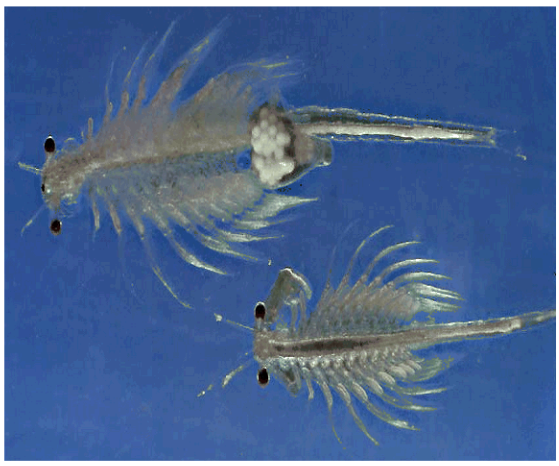
Tento test se řídí ISO normou 8692 a OECD direktivou 201. [32]

Protoxkit F™

U tohoto testu se jako testovací organismus používá řasnatý prvok *Tetrahymena thermophila* (obr. 9), který se uchovává v klidovém stádiu. Je to 24 hodinový test inhibice reprodukce. Používá se pro sledování toxicity odpadních vod, sedimentů, povrchových a podzemních vod. Tento test je uvažován jako direktiva OECD. [22]



Obr. 9: Tetrahymena thermophila [22]



Obr. 10: Artemia salina [33]

Artoxkit M™

Tento test je určen pro slané prostředí. Testovacím organismem je v tomto testu korýš *Artemia salina* (dříve *Artemia franciscana*) (obr. 10), který se uchovává v klidových stádiích. Každých 24 hodin se počítají mrtvé organismy a určuje se 24h LC50. [22]

3.3.3.2. Bakteriální testy toxicity

Microtox

Tento nejznámější a pravděpodobně i nejpoužívanější bakteriální biotest využívá lyofilizovaných kultur světélkující mořské baktérie *Vibrio fischeri*. Bioluminiscence je produkována větví elektronového řetězce, do kterého jsou zahrnuty oxido-redukční koenzymy a enzym luciferáza. Za přítomnosti kyslíku a aldehydu se tvoří aktivovaný komplex, který po degradaci uvolňuje fotony. Intenzita luminiscence odpovídá toxickému vlivu testované látky. Microtox je vhodný k vyhodnocování akutní toxicity povrchových, podzemních a odpadních vod, výluhů ze sedimentů a odpadů. Nevýhodou Microtoxu je nákladné přístrojové vybavení. [19, 34]

Polytoxkit

Polytoxkit využívá směs bakterií z aktivačních nádrží kdy se pomocí kyslíkové elektrody měří respirační aktivita rehydratovaných kultur za přítomnosti toxikantu. Test je méně citlivý k anorganickým i organickým chemikáliím než Microtox. Jeho hlavní výhodou je, že je využívána standardní bakteriální populace místo aktivovaného kalu, což umozňuje mezilaboratorní srovnání. [19]

Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad

Tyto biotesty vyvinuté v Burlingtonu v Kanadě slouží k detekci toxicity ve vodách, půdách, sedimentech a tuhých odpadech. Princip je založen na inhibici syntézy de novo b-galaktozidázy v kmeni *Escherichia coli*, mutantu citlivému k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům, pod vlivem toxikantu. Lyofilizované baktérie jsou oživeny směsí živného média a specifického induktoru pro chromogenní enzym a jsou kontaktovány s testovaným vzorkem, který inhibuje obnovovací proces a syntézu b-galaktozidázy. Směs je nanášena do sérologických destiček a množství de novo syntetizovaného enzymu je po cca 2 – 3 hodinové inkubaci při 37 °C určeno semikvantitativně kolorimetrickou reakcí nebo může být kvantifikováno na čtecím zařízení pro destičky. U Toxi-Chromopadu není nutná žádná předúprava pevných vzorků, reakční směs s baktériemi i testovaným sedimentem se nanáší na filtrační papírky napuštěné modrým chromogenním substrátem. [19]

ECHA Bioxide Monitor

Tento test je založen na použití malého absorpčního papírku, který je impregnován testovacím organismem *Bacillus species*. Jeho růst je indikován tetrazoliovým barvivem. Papírek je ponořen do testovaného vzorku nebo přitlačen na sediment po dobu 10 s, poté následuje inkubace po dobu 18 – 24 hodin při 35 – 37 °C. Vyvinutá barva se interpretuje podle přiložené stupnice: toxický vzorek – bílá, netoxický – červená, růžová nebo tečkovaná – jako mírně toxický. [19]

3.3.4. Testy toxicity na cévnatých rostlinách – fytotesty

Přestože jsou testy na klíčících rostlinách řazeny mezi klasické testy toxicity, patří k nejméně standardizovaným testům, a proto je jejich výpovědní hodnota často zpochybňována. Nejednotnost spočívá ve výběru testovacího organismu, designu testu a končí způsobem vyhodnocení a interpretace výsledku testu.

Pro testy toxicity jsou využívány zejména tito zástupci dvouděložných: semena řeřichy seté (*Lepidium sativum*), hořčice seté (*Sinapis alba*), ředkvičky seté (*Raphanus sativa*), salátu hlávkového (*Lactuca sativa*) a další. Tyto rody patří mezi nejcitlivější, i když jednotlivé kultivary a odrůdy zejména salátu a ředkviček jsou dosti rozdílné v citlivosti k toxickým látkám. Dále se používají rostliny jako kukuřice (*Zea mays*), pšenice (*Tritium sativum*), ječmen (*Hordeum sativum*) ad. Výběr závisí především na účelu testu, mohou být sestavovány baterie jednoděložných rostlin (obiloviny, cibule *Allium cepa*, atd.) nebo dvouděložných.

Vyhodnocení probíhá většinou měřením délky kořene. Toto měření je však jen jedna z možností a pravděpodobně ne ta nejcitlivější. Dále je vhodné měřit hmotnost živé nadzemní biomasy a její sušinu, hmotnost živé biomasy kořene a jeho sušinu, do protokolu je vhodné uvádět defekty chlorofylu, nekrózy a další pozorovatelné abnormality.

Test toxicity na cévnatých rostlinách lze vyhodnocovat také pomocí změn aktivit dehydrogenáz, fosfatáz, oxidáz nebo peroxidáz. Metoda vyhodnocování přítomnosti mikrojadérek patří mezi citlivé testy pro detekci mutagenů vyšších rostlin. [13]

3.3.5. Podmínky metodiky testů

Součástí každého testu je **kontrola**. Testování kontrolních organismů probíhá pouze v prostředí ředicí vody, tj. bez přídavku vodného výluhu odpadu nebo testované chemické látky, chemického přípravku nebo pesticidního přípravku, za stejných podmínek jako probíhá test úvodní, předběžný, základní, ověřovací, pro který je kontrola využívána. [12, 20]

Jako ředicí voda se používá voda známých fyzikálně-chemických vlastností. Musí vyhovovat fyziologickým potřebám testovaných organismů, nesmí obsahovat zbytkový chlór a rezidua jiných toxických látek. Také nesmí výrazně ovlivňovat toxicitu testované látky nebo vodného výluhu odpadu. Složení ředicí vody je součástí jednotlivých metodik testů toxicity.

Toxikologická laboratoř je také povinna provádět v určitých časových intervalech tzv. **vnitřní kontrolu**. Jedná se o základní test, v němž je testovanou látkou standard. Využívá se dichroman draselný (K_2CrO_7 p.a.), p-nitrofenol a heptahydrát síranu zinečnatého ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ p.a.). Provedení testu se standardem a porovnání takto získané hodnoty LC (EC, IC)50 s obecně platnými hodnotami umožňuje laboratoři kontrolu správnosti postupu i citlivosti použitých testovaných organismů.

Každá ekotoxikologická laboratoř má možnost **vnější kontroly** a to formou účasti na tzv. okružních testech toxicity chemické látky, přípravku nebo odpadu. Tyto testy jsou organizovány laboratoří ASLAB při Výzkumném ústavu vodohospodářském TGM v Praze zpravidla 1 – 2krát do roka. Pokud laboratoř vyhoví požadavkům, získá osvědčení, které přikládá ke svým závěrečným protokolům. Dalšími a vyššími stupni kontroly jakosti jsou akreditační systém podle ČSN EN 45 000 a systém správné laboratorní praxe SLP (Good Laboratory Practise - GLP). [20]

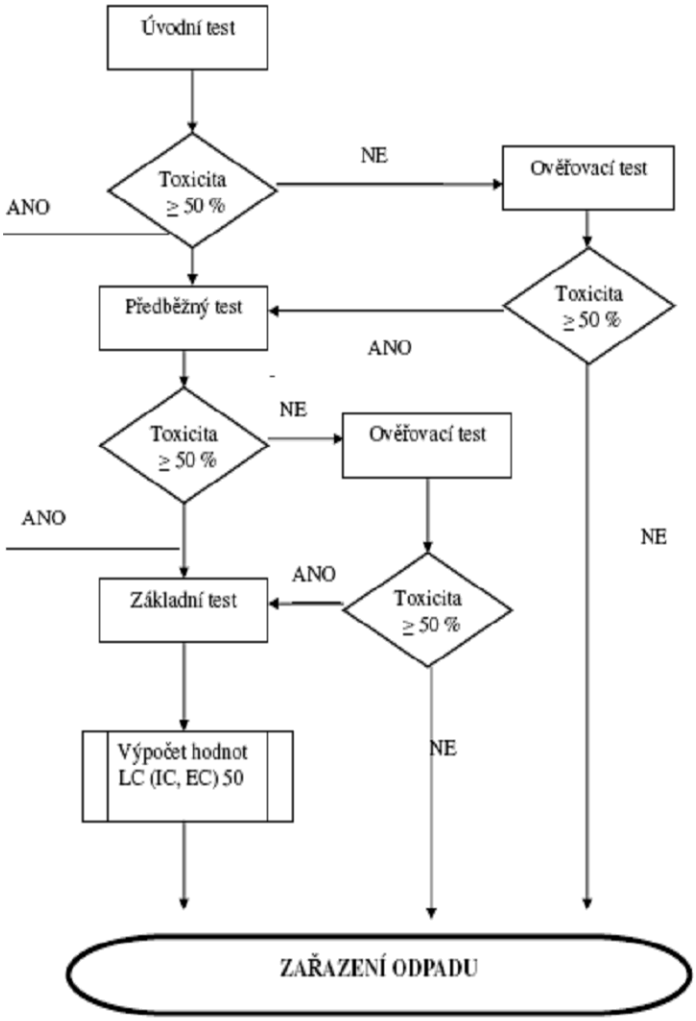
3.3.6. Testovací schéma

Při provádění testů je velmi důležité zvolit správný rozsah koncentrací. Při testování ekotoxicity výluhů z odpadů se nejprve provádí tzv. **úvodní test**. Je to test s neředěným vodným výluhem sloužící pro odhad ekotoxicity pro jednotlivé testovací organismy.

Pokud je tento test negativní následuje **test ověřovací**. Slouží k ověření negativního účinku testu úvodního. Provádí se s nejméně trojnásobným množstvím organismů proti počtům organismů požadovaných při základních testech.

V případě, že je úvodní test pozitivní (mortalita ≥ 50 %) následuje **test předběžný**. Předběžný test slouží k vyhledání intervalu koncentrací ředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) pro provedení základního testu ekotoxicity. Za vhodně zvolenou koncentrační řadu vodného výluhu se považuje řada zahrnující koncentrace s toxickým účinem pro 0–100 % testovaných organismů.

Na základě výsledků předběžného testu se volí užší rozsah koncentrací pro tzv. **základní test**, z jehož výsledků se potom vypočítává hodnota LC(EC, IC)50 a následně slouží k výpočtu TU. TU je toxikologická jednotka, které se používají k zařazení odpadů do tříd vyluhovatelnosti a dále pro potvrzení či vyloučení nebezpečné vlastnosti "ekotoxicita". [12, 20]



Obr. 11: Diagram znázorňující postup při hodnocení vlastnosti „ekotoxicita“ [12]

3.4. Vodný výluh

Vodný výluh je výluh, který byl připraven ze vzorku odpadu podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě. Postup přípravy vodného výluhu je podrobně upraven přílohou č. 4 k vyhlášce č. 41/2005 Sb. Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. [25]

K loužení odpadu se používá voda destilovaná, demineralizovaná nebo neionizovaná, která neobsahuje chlor ani jiné toxické látky. Před zahájením testování ekotoxicity je nutné potřebné množství vodného výluhu obohatit solemi pomocí zásobních roztoku, které jsou určeny pro jednotlivé testovací organismy.

Z důvodu větší časové náročnosti ekotoxikologických testů se prodlužuje doba skladování vzorku na dobu nezbytně nutnou pro možné opakování testů. Vzorky se uchovávají v těsně uzavřených nádobách, v temnu a při teplotě (4 ± 2) °C. [12]

3.4.1. Příprava vodného výluhu

Předběžná úprava vzorku

Pro provedení testu je třeba získat laboratorní vzorek v souladu s požadavky použitých normalizovaných metod. Pro výluh se použije pevný odpad s velikostí částic menší než 4 mm buď původní, nebo po předúpravě prosévání. V případě, že se laboratorní vzorek musí sušit, nesmí teplota sušícího vzduchu překročit 40 °C. Pokud zbytek na sítě (nadsítná frakce) činí více než 5 % hmotnosti laboratorního vzorku, rozdrtí se a znovu proseje. Jakékoliv způsoby mletí vzorku jsou nepřípustné. [25]

Postup přípravy vodného výluhu

Výluh se připravuje z analytického vzorku odpadu. Vlastní přípravě výluhu předchází stanovení podílu sušiny (DR), respektive vlhkosti, v samostatném analytickém vzorku. Do příslušné vzorkovnice se naváží takové množství analytického vzorku, aby po doplnění vody byl poměr vody a pevné fáze odpadu L/S ve vzorkovnici 10/1 (v přepočtu na vysušený vzorek). Kvalita kapalné fáze obsažené v odpadu se nezjišťuje a má se za to, že odpovídá vodě. Vzorkovnice se po naplnění vzorkem a vodou uzavře a umístí do třepačky. [25, 35]

Stanovení podílu sušiny a hmotnosti analytického vzorku

Sušina vzorku se stanoví při teplotě (105 ± 5) °C podle ISO 11465 a podíl sušiny se vypočítá podle rovnice:

$$DR = 100 \cdot \frac{M_D}{M_W}, \qquad (3)$$

kde DR ... je podíl sušiny v analytickém vzorku v [%];
M_D ... hmotnost vysušeného analytického vzorku v [kg];
M_W ... navážka nevysušeného analytického vzorku v [kg]. [25, 35]

Příprava cca 1 l vodného výluhu

Ze zkušebního vzorku se připraví analytický vzorek o celkového hmotnosti M vypočtené podle rovnice:

$$M = 100 \cdot \frac{M_T}{DR}, \tag{4}$$

kde M ... hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu v [kg];
M_T ... teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg];
DR... podíl sušiny v analytickém vzorku [%].[25, 35]

Vyluhování odpadu vodou

Teplota vody použité pro přípravu výluhu musí být po celou dobu vyluhování udržována mezi 15 a 25 °C. Analytický vzorek o hmotnosti M odpovídající hmotnosti sušiny M_T = 0,100 kg se vloží do vzorkovnice a přidá se k němu takové množství vody L_A, vypočtené podle rovnice:

$$L_A = M_T \cdot \frac{11 - 100/DR}{\rho_{H_2O}}, \tag{5}$$

kde L_A .... množství přidané vyluhovací kapaliny v [l];
M_T .... teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg];
DR ... podíl sušiny v analytickém vzorku v [%];
ρ_{H2O}... hustota vody (stanovena pro účely stanovení vyluhovatelnosti je rovna 1 kg/l).

Poměr L/S musí být 10/1. Uzavřená vzorkovnice se upne do třepačky. Vyluhování se provádí při plynulém otáčení nádoby se vzorkem a vodou způsobem „hlava – pata" rychlostí 5–10 otáček za minutu po dobu 24 hodin ± 0,5 hodiny. [25, 35]

Oddělení kapalné a pevné fáze

Po ukončení otáčivého pohybu vzorkovnice v třepačce se její obsah nechá usazovat po dobu 15 ± 5 minut. Následně se vodný výluh slije a pokud je to třeba, upraví se odstředěním a předběžnou filtrací přes filtr s větší porózitou. Pro ekotoxikologické testy se výluh filtruje přes papírové filtry o střední velikosti póru 5 μm.

U získaného výluhu se změří jeho celkový objem V_E. Bezprostředně se změří konduktivita [mS/m], hodnota pH a teplota výluhu. [25, 35]

3.4.2. Úprava vodného výluhu solemi

Pro biologické testy se výluh dále upravuje za použití živných roztoků solí, jejichž volba záleží na typu použitého testovacího organismu. Důvodem úpravy vodného výluhu je zamezení negativního působení nízkého osmotického tlaku na testovací organismy či nedostatek živin v případě použití zelených řas. K úpravě výluhu a přípravě ředicí vody, ve které se udržují kmenové organismy, se používají zásobní roztoky solí. [18]

Příprava zásobních roztoků a úprava vodného výluhu pro testy na rybách, perloočkách a semenech

Pro přípravu výluhu se používají následující zásobní roztoky solí (tab. 1). Konečné koncentrace odpovídají požadavkům ČSN EN ISO 7346-2 a ČSN EN ISO 6341.

Tab. 1: Příprava zásobních roztoků solí pro testy na rybách, perloočkách a semenech

Zásobní roztok	**Chemikálie**	**Navážka (na 1 l roztoku)**
č. 1	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (p.a.)	117,6 g
č. 2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (p.a.)	49,3 g
č. 3	$NaHCO_3$ (p.a.)	25,9 g
č. 4	KCl (p.a.)	2,3 g

Odměrná baňka potřebného objemu se částečně naplní vodným výluhem, poté se dávkuje po 2,5 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků solí na 1 litr vodného výluhu a baňka se doplní na požadovaný objem vodným výluhem. Vodný výluh je třeba před každým použitím důkladně protřepat, aby byla zaručena jeho homogenita. [12, 20, 25]

Příprava zásobních roztoků a úprava vodného výluhu pro test na zelených řasách

Pro úpravu výluhu se používají následující zásobní roztoky solí (tab. 2). Konečné koncentrace odpovídají požadavkům ČSN EN 8962.

Tab. 2: Příprava zásobních roztoků solí pro test na zelených řasách

Zásobní roztok	**Chemikálie**	**Navážka (na 1 l roztoku)**
č. 1 (živiny)	NH_4Cl	1,5 g
	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1,2 g
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,8 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,5 g
	KH_2PO_4	0,16 g
č. 2 (Fe-EDTA)	$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	80 mg
	$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	100 mg
č. 3 (stopové prvky)	H_3BO_3	185 mg
	$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	415 mg
	$ZnCl_2$	3 mg
	$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1,5 mg
	$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,01 mg
	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	7 mg
č. 4 ($NaHCO_3$)	$NaHCO_3$	50 g

Zásobní roztoky č. 1 – 3 se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min). Roztok č. 4 se nesterilizuje v autoklávu, ale pouze filtruje přes membránový filtr. Roztoky se skladují při teplotě 4 °C ve tmě.

Vodný výluh se uvedenými čtyřmi zásobními roztoky obohacuje tímto způsobem: Odměrná baňka požadovaného objemu se částečně naplní vodným výluhem, poté se do ní dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml roztoků č. 2, 3 a 4 na 1 litr požadovaného objemu vodného výluhu a na tento objem se nádoba doplní vodným výluhem odpadu. Vodný výluh je třeba před každým použitím důkladně protřepat. [12, 20, 25]

3.5. Odběr, úprava a uchovávání vzorků

Pro odběr vzorků kalu jsou vhodné vzorkovnice z polyethylenu, polypropylenu, polykarbonátu a skla pro svou chemickou stabilitu. Je nutné dát pozor na přetlak, ke kterému může docházet v důsledku tvorby plynu v čistírenských kalech za vzniku výbušných směsí par. Kaly často podléhají rychlému mikrobiologickému rozkladu a je proto nutné převážet je z místa odběru v chladicích boxech. Před dalším zpracováním se uchovávají v chladničce. Vzorkovnice se označují, balí, uchovávají a přepravují pokud možno v temnu, při teplotě (4 ± 2) °C. [36, 37]

Z důvodu větší časové náročnosti ekotoxikologických testů a potřeby uchovávání vzorků kalů pro případné ověření výsledků stanovení ekotoxicity se prodlužuje doba jejich skladování na dobu nezbytně nutnou pro možné opakování testů. [12]

Se zvětšujícím se počtem odebraných vzorků se zvyšuje míra spolehlivosti z hlediska reprezentativnosti vzorku. Známe dva druhy vzorku kalů – směsný a prostý. Směsný vzorek je smíchán ze vzorků odebíraných nepřetržitě, nebo ze vzorků prostých, získaných odběrem tekutého nebo odvodněného kalu. Prostý vzorek je náhodně odebraný z proudu tekoucího kalu nebo z odvodněného kalu, popř. z jednoho odběrového místa haldy. [37]

3.6. Třídy vyluhovatelnosti

Třídy vyluhovatelnosti odpadů vodou jsou množiny limitních hodnot ukazatelů vybraných chemických látek (škodlivin) uvolněných do prvního vodného výluhu. Limitní hodnoty představují nejvyšší přípustné hodnoty koncentrací těchto látek pro jednotlivé třídy vyluhovatelnosti (s výjimkou ekotoxicity). [25]

Na základě Vyhlášky č. 383/2001 Sb. ve znění Vyhlášky č. 41/2005 Sb., jsou odpady zařazovány do tříd vyluhovatelnosti určených v katalogu odpadů.

Do třídy vyluhovatelnosti I jsou zařazovány odpady, jejichž neředěné výluhy vykazují v testech ekotoxicity negativní výsledky

Do třídy vyluhovatelnosti II jsou zařazovány odpady, jejichž vodné výluhy v testech ekotoxicity na testovaný organismus vykazují hodnotu toxické jednotky TU $\leq$ 1. Tomu odpovídá hodnota LC(EC, IC)50 $\geq$ 100 ml/l. Do této třídy náleží i odpady, u nichž výsledky testů neředěných vodných výluhů překračují kritéria hodnocení, ale není možné ještě stanovit hodnotu LC(EC, IC)50.

Do třídy vyluhovatelnosti III jsou zařazovány odpady, u jejichž vodných výluhů v testech ekotoxicity na testovaný organismus je překročena hodnota ukazatelů pro tuto třídu vyluhovatelnosti. Do této třídy se dále zařazují odpady, jejichž vodné výluhy v testech akutní toxicity pro nejcitlivěji reagující testovací organismus vykazují hodnotu LC(EC, IC)50 > 10 ml/l.

Pro výpočet hodnoty LC(EC, IC)50 se používá tzv. ***toxikologická jednotka (TU).*** Tato bezrozměrná jednotka je dána podílem čísla 100 a hodnoty LC(EC, IC)50 vyjádřené v ml/l.

$$TU = \frac{100}{LC(EC,IC)50} \quad [12, 20, 35] \qquad (6)$$

3.7. Kaly z ČOV

Kal je směs kapalin a pevných částic (směs kapalných a pevných odpadů oddělených z různých typů kapalin jako výsledek přírodních nebo umělých procesů). [25]

Rozeznáváme čistírenský kal, vytvořený při čištění odpadních vod (splašků) a upravený kal, který byl podroben biologické, chemické nebo tepelné úpravě, dlouholetému skladování nebo jakémukoli jinému vhodnému procesu za účelem významného snížení patogenních organismů a tím i zdravotního rizika spojeného s jeho aplikací. [38, 39]

Základní charakteristikou kalu je obsah vody určující jeho objemové množství. Látky obsažené v kalu, stanovené jeho odpařením při 105 °C tvoří sušinu. Určitou část sušiny tvoří látky původně ve vodě rozpuštěné, včetně koloidních, které při zahušťování a odvodňování kalu zůstávají v kalové vodě, příp. filtrátu apod. Látky suspendované tvoří většinou podstatnou část kalové sušiny a mají při zpracování kalu rozhodující význam. [40]

V případě pochybností, zda kal sedimentací uvolňuje kapalnou fázi, se postupuje podle následujícího návodu: kal se umístí do skleněné válcovité nádoby o průměru větším než 30 mm (např. odměrný válec) tak, že jeho vrstva v nádobě je vyšší než 10 cm. Nádoba se ponechá stát otevřená při teplotě okolí 5 – 25 °C a tlaku odpovídajícímu atmosférickému tlaku po dobu jedné hodiny. Pokud za popsaných podmínek dojde k vizuálně sledovatelnému oddělení kapalné a pevné fáze v nádobě, je kal považován za odpad, který sedimentací uvolňuje kapalnou fázi. [25]

Od 1. ledna 2002 platí nový zákon o odpadech č. 185/2001 Sb. ve kterém je uvedena definice kalu a upraveného kalu z praktického hlediska. Současně s tímto zákonem nabývá účinnosti i vyhláška MŽP č. 382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. [39, 41]

V současné době je přítomnost rizikových látek v kalech podle legislativy povinně sledována pouze chemickými metodami. Ačkoli počet předepsaných stanovovaných látek narůstá (zvyšuje se počet sledovaných těžkých kovů) a plánuje se vedle AOX (absorbovatelné organicky vázané halogeny) a PCB (polychlorované bifenyly) zavést povinnost sledovat přítomnost linearních alkylbenzen sulfonátů, di(2-ethylhexyl)phtalátů, nonylfenolethoxalátů, polykondenzovaných uhlovodíků a polychlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů, nelze nikdy vyloučit přítomnost jiné nebezpečné látky. [42]

Provádět chemické analýzy na přítomnost všech případných organických polutantů a rizikových prvků by bylo finančně a časově nemožné. Chemické rozbory také nevypovídají o biodostupnosti přítomných látek nebo jejich produktech degradace, neodhalují jejich toxicitu pro organismy a možné synergické nebo antagonické účinky polutantů. Proto je dobré doplnit chemické analýzy odpovídajícími ekotoxikologickými testy. I když se tomu tak v současné době často děje, v platné legislativě to zakotveno není. [42]

3.7.1. Složení kalu

Základní složení kalu charakterizuje 6 základních složek:

1) netoxické organické látky – z velké části biologického původu (organické látky obsažené v mikroorganismech, které vznikají jako produkty rozkladu)
2) látky obsahující dusík a fosfor
3) toxické anorganické a organické polutanty
   a) těžké kovy (Zn, Pb, Cu, Cr, Ni, Cd, Hg, As)
   b) polychlorované bifenyly (PCBs), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), nonylfenoly, lineární alkylsulfonáty, polybromované retardanty
4) patogeny a jiné mikrobiologické polutanty
5) anorganické složky – křemičitany, hlinitany a látky obsahující vápník a hořčík
6) voda – obsah se může měnit od několika procent k více než 95 %. [43, 44]

3.7.2. Typy kalů

V závislosti na tom, odkud je kal při čištění vod získáván, jej lze rozdělit na:

Primární kal je tvořen usaditelnými látkami v surové odpadní vodě (kal z usazovacích – primárních nádrží). Má zpravidla zrnitou strukturu a je tvořen nerozpuštěnými látkami, které prošly lapákem písku a česlemi. Množství kalu dosahuje 2,5 – 50 $g.l^{-1}$ sušiny. Protože kal obsahuje i značné množství koloidních látek, má schopnost vázat vodu a udržovat ji, a proto se špatně odvzdušňuje (vysouší).

Sekundární kal či přebytečný aktivovaný kal tvoří přebytečná biomasa z biologického růstu (kal z dosazovacích nádrží). Má vločkovitou strukturu a jeho charakter je ovlivněn čistícím zařízením, v němž vznikl. Podstatný vliv na charakter přebytečného kalu z biologického čištění má složení a koncentrace odpadních vod.

Terciární či chemický **kal** je získáván ze srážení po biologickém čištění.
Sekundární kal se většinou přečerpává z dosazovací nádrže do primární usazovací nádrže a dále se zpracovává jako kal smíšený. Tento **kal** se označuje jako **surový**. [40, 43]

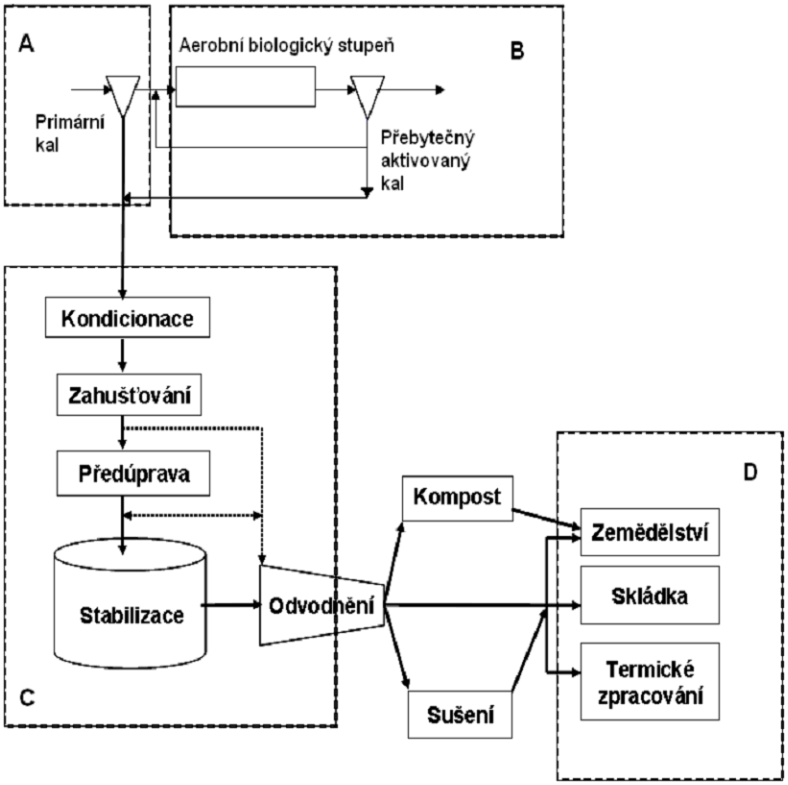
3.8. Zpracování, úprava a likvidace čistírenských kalů

Čistírenský kal je jedním z konečných produktů procesu čištění odpadních vod. V procesu klasického čistírenského postupu se většina z přivedeného znečištění v odpadních vodách převádí do kalů. Zpracování a likvidace těchto kalů se tak stává jedním z nejdůležitějších a nejkritičtějších problémů čištění odpadních vod. Neexistuje žádná univerzální metoda pro zpracování, využití, eventuelně likvidaci čistírenských kalů. Z tohoto důvodu je značná rozdílnost přístupů k nakládání s čistírenskými kaly. [4]

Obecně lze metody zacházení a zpracování kalů a odpadů (obr. 12) rozdělit do dvou skupin, tzv. primární tj. metody úpravy a fiální tj. metody umožňující konečné řešení, jak naložit s daným materiálem. Primární metody slouží jako první stupeň a usnadňují průběh nebo jsou mnohdy podmínkou pro aplikaci finálních metod.

Mezi **primární metody** úpravy kalů patří kondicionace, zahušťování a odvodňování, desintegrace, hygienizace, anaerobní biologická a aerobní biologická stabilizace, sušení.

Mezi **finální metody** zpracování kalů řadíme kompostování, aplikaci na zemědělskou, chemickou stabilizaci, mokré spalování, spalování v cementárenské peci, spoluspalování, termické zpracování, spalování a skládkování. [45]



Obr. 12 Obecné schéma zpracování čistírenského kalu [3]

Vysvětlivky: A – primární (mechanické) čištění odpadních vod, separace suspendovaných látek; B – biologické aerobní čištění s recyklem aktivovaného kalu a odvodem přebytečného aktivovaného kalu; C – operace úpravy a stabilizace kalu; D – způsoby využití a likvidace kalu [3]

3.8.1. Primární metody úpravy kalů

Kondicionace

Předúprava kalu chemickou nebo termickou kondicionací vede ke zefektivnění následného zahušťování nebo odvodňování kalu. Chemická kondicionace je realizována s použitím anorganických činidel jako jsou soli a vápno, nebo organických sloučenin (polymerů). Termická kondicionace spočívá v ohřívání kalu při teplotě 150 – 200 °C po dobu 30 – 60 minut. [46]

Zahušťování a odvodňování

Vzhledem k tomu, že kaly jsou řídkou suspenzí ve vodě, je jednou z nejdůležitějších technologických operací snižování množství vody tj. zahušťování a odvodňování kalu. Pro zmenšení objemu kalu a snížení nákladů je kal před stabilizací odvodněním zahušťován v sedimentačních nebo flotačních nádržích. Odstraňování vody mechanickými způsoby je energeticky řádově výhodnější než odstraňování termické. Odvodnitelnost kalů je velmi důležitá při použití termických metod zpracování. Z odvodňování stabilizovaného kalu odpadá kapalná fáze – filtrát, centrát.

Kalová voda po odvodnění anaerobně stabilizovaného kalu se vyznačuje vysokou koncentrací amoniakálního dusíku (u splaškových kalů až 1 500 mg/l), což se prezentuje jako nevýhoda této metody. Odvodnění je ekonomicky zajímavé v těch případech, kdy je cena za odvodnění kalu menší než úspory dosažené jeho transportem a ukládáním. [4, 43, 47]

Desintegrace

Cílem desintegrace je rozbití částic kalu, buněk mikroorganismů a uvolnění buněčného obsahu. Metody desintegrace kalů rozdělujeme do čtyř skupin – metody mechanické, termické, chemické a biologické. Pro mechanickou desintegraci je potřebné zajistit tlakovou, translační nebo rotační energii. Mezi nejčastěji používaná zařízení patří různé typy mlýnů, vysokotlaké a ultrazvukové homogenizátory a lyzátovací centrifugy. Principem termické desintegrace je většinou tepelná hydrolýza, která probíhá při 130 – 200 °C po několik minut a za vysokého tlaku. Do skupiny chemických metod patří ozonizace, alkalická nebo kyselá hydrolýza. Cílem předúpravy ozónem je oxidace a hydrolýza organické hmoty a rozpad vysokomolekulárních látek na nižší a lépe rozložitelné. Biologické metody využívají enzymy. [48]

Hygienizace

Obecně k hygienizaci kalů lze použít všech metod, při kterých dochází k usmrcování mikroorganismů. Hygienizace může být zařazena jako samostatná metoda a to před nebo po stupni stabilizace kalu anebo hygienizačně působí již zvolená technologie zpracování kalu (např. termofilní aerobní nebo anaerobní stabilizace, všechny termické metody). Základní hygienizační metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin:

- chemické - silná oxidační činidla (H_2O_2, O_3, formaldehyd, fenol, aj.)
- fyzikální - teplota, radiace, ultrazvuk, mechanická destrukce buněk mikroorganismů [45, 49]

Stabilizace

Stabilizace kalu je nezbytný krok pro spolehlivé zpracování čistírenských kalů. Kal je stabilizován za účelem redukce odbouratelné organické hmoty (omezení zápachu), dále pro destrukci patogenních organismů, která je nezbytná, pokud kal přichází do kontaktu s lidmi, pro zlepšení odvoditelnosti a redukce hmotnosti a množství kalu a získávání využitelného produktu. Destrukce patogenů, stejně jako redukce odbouratelné organické hmoty, je potřebná pro zemědělské i nezemědělské využití čistírenských kalů. Zápach vznikající při skládkování stabilizovaného kalu je výrazně nižší než u kalu nestabilizovaného. Redukce patogenů je vyžadována z hygienických důvodu. [47]

a) Anaerobní stabilizace kalů

Všeobecně nejrozšířenější metodou zpracování surových kalů je jejich anaerobní stabilizace, při níž dochází k přeměně většiny rozložitelných organických látek za nepřítomnosti molekulárního kyslíku do bioplynu za současné stabilizace a hygienizace kalu. Následné využívání bioplynu je ekonomickým přínosem pro čistírnu. Konečným produktem je vyhnilý kal, který obsahuje zbylé nerozložené organické látky, anorganický podíl a další složkou je kapalná fáze - kalová voda.

Vyhnívání probíhá ve vyhnívacích nádržích s dobou zdržení od 15 do 30 dnů. Podle pracovní teploty rozlišujeme tři oblasti vyhnívání. V praxi se teplota obvykle udržuje mezi 30 – 40 °C (mezofilní vyhnívání). Je rovněž možné pracovat při vyšších teplotách (termofilní vyhnívání při 40 – 60 °C). Proces anaerobního vyhnívání je doprovázen nepříjemným zápachem, proto probíhá v uzavřených vyhnívacích komorách či štěrbinových nádržích. [4, 15, 43]

Výhodou je nízká energetická náročnost a možnost vytvářet energii produkcí spalitelného plynu. Hlavní nevýhodou jsou vysoké investiční náklady a nutnost kvalifikované obsluhy. Je výhodný tam, kde se kal zemědělsky zpracovává. [47]

b) Aerobní stabilizace kalů

Aerobní vyhnívání je biologická destrukce odbouratelné organické hmoty za přítomnosti kyslíku. Odbouratelná organická hmota je oxidována na CO_2 a H_2O za přítomnosti aerobních bakterií. Kyslík musí být dodáván v přímé proporci k množství organických látek odbouraných v procesu (1,42 kg O_2 je nutné k odbourání 1 kg organických látek). Dosažená redukce sušiny je 24 – 60 % a čas zdržení je 10 dní a více. Destrukce patogenů nastane jako důsledek zdržení kalu a přirozeného odumírání patogenních organismů.

Investiční náklady jsou obecně nižší, ale energetické nároky výrazně vyšší než u anaerobní stabilizace. Proces je jednodušší provozně, je však podstatně méně účinný na destrukci patogenů. [47]

Sušení

Sušení je z hlediska fyzikálně-chemického pochod, při kterém se pomocí tepelné energie odstraňuje z materiálu vlhkost vypařováním. Dochází ke zvýšení obsahu sušiny na 60 – 95 %.

Protože odstraňování vlhkosti sušením vyžaduje velkou spotřebu energie, je z ekonomického hlediska výhodné odstranit co nejvíce vlhkosti z materiálu mechanickými způsoby (odvodňováním). Předběžné i nevelké zmenšení vlhkosti sušeného materiálu dovoluje podstatně zvětšit hospodárnost sušení. [49]

3.8.2. Finální metody zpracování kalů

Kompostování

Kompostování je řízený proces, při kterém jsou organické látky z kalu biologicky za aerobních podmínek rozloženy na stabilizovaný materiál – kompost, který již není nebezpečný pro životní prostředí a může být přímo použit ke kondicionaci půdy. [49]

Kompost je složen z odvodněného kalového koláče smíchaného s dřevěnými pilinami a z recyklovaným kompostem při koncentraci sušiny ve směsi 40 %. Směs je zahřívána teplem vylučovaným při odbourávání organické hmoty. Teplo zvyšuje teplotu kompostu a nastává redukce patogenů a redukce vlhkosti. Výsledná koncentrace kompostu je cca 50 – 60 %. Doba kompostování se pohybuje mezi 15 – 45 dny. Kompostovaný materiál je pak skladován cca dalších 30 dní pro úplnou stabilizaci kalu. Destrukce patogenů nastane, když teplota kompostu vystoupí na 35 °C po dobu 3 dnů. K dispozici je mnoho typů kompostovaných systémů. Jsou však mezi nimi značné rozdíly co se týče ceny, zápachu a kvality výsledného produktu. [47]

Výhodou je skladovatelnost produktu, možnost prodeje a nízké náklady v porovnání se spalováním. Nevýhodou je potřeba velké plochy a vyšší cena v porovnání s přímou aplikací kalu na pole. Proces kompostování je také potenciálním zdrojem zápachu a bioaerosolů. [49]

Chemická stabilizace

Stabilizace je dosažena přidáním zásadité substance, obvykle vápna, do odvodněného kalu za účelem zvýšení pH kalu na hodnotu 12 po dobu minimálně 2 hodin. Zvýšením pH je dosaženo redukce patogenů. Vápno může být ke kalu přidáváno před nebo po odvodnění. Jestliže je před odvodněním kalu přidáván hydroxid vápenatý, vzniká kal bez zápachu s velmi dobrou schopností odvodnění. Je-li po odvodnění kalu dávkováno nehašené vápno, dojde ke značnému zvýšení teploty a tím ke sterilizaci kalu. [43, 47]

Stabilizace kalu přídavkem vápna má řadu výhod. Proces může být dobře regulován a finanční náklady nejsou vysoké. [43]

Mokré spalování

Tato nová metoda je velmi výhodná z ekologického hlediska pro likvidaci organických materiálů, hlavně kalů. Realizované procesy mokré oxidace je možné rozdělit do tří skupin:

- mokrá oxidace vzduchem (např. systém ZIMPRO)
- katalytická mokrá oxidace
- mokrá oxidace v superkritické oblasti (SCWO Supercritical Water Oxidation)

Principem prvního způsobu je oxidace kalu za přístupu vzduchu při teplotě 200 – 300 °C, tlaku 40 – 60 barů a době zdržení 60 minut. Za těchto podmínek je 75 – 90 % organických látek v kalu převedeno do kapalné fáze ve formě směsi nižších mastných kyselin a metanolu a z větší části zoxidováno.

Druhý způsob využívá katalyzátory, které mají za následek celkovou destrukci organických složek bez použití tak vysokých teplot a tlaků.

Největšího využití energie z kalu lze dosáhnout při mokré oxidaci kalu v nadkritické oblasti vody (kritická teplota vody je 374 °C, kritický tlak 22 MPa). Dochází tak k úplné konverzi všech přítomných organických látek a většiny látek anorganických. [45, 50]

Spalování v cementárenské peci

Spalování v cementárenské peci je nová ekologická a bezodpadová metoda likvidace odpadu, kdy dochází k zapracování kalů do cementu. Mezi její výhody lze řadit úplné odstranění všech toxických organických látek v důsledku vysoké teploty vypalování (> 1000 °C), těžké kovy jsou vázány do cementářského slinku a nemohou být vyluhovány. Další pozitiva metody jsou úspora uhlí a surovin, snížení emisí CO_2 a bezodpadové zpracování kalu. [45]

Spalování

Spalování kalů je jednou z možností využití kalů. Legislativně se spalováním kalů zabývá zákon o odpadech č. 185/2001 Sb. a zákon o ochraně ovzduší č. 86/2002. Kaly z čistíren odpadních vod lze spalovat v různých spalovacích zařízeních. Hlavní možnosti spalování kalů jsou spalovny tuhých komunálních odpadů, teplárny a elektrárny, cementárny a speciální spalovny odvodněného kalu. [49]

Z hlediska spotřeby energie může být proces spalování kalů soběstačný. Záleží na stupni odvodnění, složení kalů (podíl hořlavých látek) resp. jejich výhřevnosti. Vyhnilý, vysušený kal má obvykle složení i výhřevnost podobnou hnědému uhlí. Surový kal má vyšší výhřevnost než kal vyhnilý, avšak z hlediska jeho nestability je nakládání s ním více problematické. [49]

Existují v podstatě dvě technická řešení spalování kalu: spalování vysušeného kalu a spalování nevysušeného kalu spolu s jiným palivem. Z čistě termodynamického hlediska jsou oba tyto způsoby rovnocenné, tj. volba jednoho nebo druhého neovlivní výslednou energetickou bilanci. [51]

Jedním z problémů spalování je potenciální toxicita plynných emisí. Z tohoto důvodu musí být kladen důraz na jejich účinné čištění. [45]

Při spalování se sníží objem kalu o více než 90 %, přitom zbylý materiál je inertní a lze jej bez obav uložit na skládku nebo jinak využít. Spalování kalu je prakticky realizovatelné pouze v případě, že se spalovna nachází v bezprostřední blízkosti místa vzniku kalu. Převážení kalu by sebou neslo podstatné prodražení již tak nákladného procesu, ale také vážné hygienické problémy (infekčnost, zápach, atd.) [45, 51]

Termické zpracování

Dalším novým technologickým postupem likvidace čistírenských kalů je pyrolýza za nepřítomnosti kyslíku při teplotě 800 – 1000 °C. Při pyrolýze kalu probíhá chemická destrukce organických látek teplem. Produkty jsou plynné (oxid uhličitý, oxid uhelnatý, vodík, methan a další uhlovodíky), kapalné (kondenzát a vyšší uhlovodíky) a tuhý zbytek. Poměr kapalného a pevného produktu závisí na podmínkách a teplotě pyrolýzy. Je známa řada technologických variant, lišící se tlakem, teplotou a eventuálně použitím katalyzátorů. Pyrolýzní plyn a kapalný podíl se spalují, tuhý zbytek je možno skládkovat. [45]

Skládkování

Dalším často používaným způsobem zneškodňování kalu je skládkování. Vzhledem k úpravám v legislativě EU i ČR lze očekávat v nejbližší době značné omezení přímého skládkování odpadů s vyšším podílem organické složky, tedy i čistírenských kalů. Tato metoda byla a je dosud v České republice poměrně hodně využívaná. Poplatky za uložení jsou ale poměrně vysoké a neustále rostou. [38, 49]

Přímé skládkování nijak neupraveného kalu naráží na problémy. Prvním z nich je vysoký obsah vody. K tomu přistupují rovněž technické a hygienické potíže s manipulací a dopravou a také speciální nároky na konstrukci skládky. Na rozdíl od spalování, potenciální infekčnost kalu přetrvává ještě dlouhou dobu po jeho uložení na skládce, čímž se skládka stává potenciálním ložiskem patogenních organismů. Dále by pak na skládce docházelo k vyhnívání kalu, které by bylo doprovázeno emisemi methanu, jehož negativní klimatický vliv je řádově větší než v případě oxidu uhličitého. Rovněž by existovalo nezanedbatelné riziko uvolnění vodné fáze, což by mohlo způsobit kontaminaci okolí skládky případnými polutanty. Některé zmíněné faktory částečně, ale zdaleka ne úplně, odstraňuje anaerobní stabilizace. [51]

Sušení kalu s následným ukládáním vysušeného kalu na skládku, se také nejeví jako příliš vhodné řešení, a to především z hlediska vysokých nákladů na sušení. Kromě toho může vysušený kal při intenzivním dešti snadno „rozbřednout“ a naopak za sucha se může stát značně prašným, případně se může vznítit, a tím přivodit skládkový požár. [51]

Aplikace na zemědělskou půdu

Stabilizované odvodněné čistírenské kaly představují svým bohatým obsahem organických látek, živin a biologicky aktivních látek významný doplňkový zdroj chybějících organických a ostatních hmot pro zemědělskou půdu. Hnojivý účinek kalů spočívá v obsahu pro půdu příznivých prvků (N, P, K, Ca, Mg), dostatku organické hmoty a obsahu stopových prvků nezbytných pro zdárný vývin a růst rostlin. Hlavním limitujícím faktorem využívání kalů v zemědělství je obsah cizorodých látek v kalech a přítomnost patogenních mikroorganizmů. Z cizorodých látek jsou to především těžké kovy (Zn, Cu, Co, Pb, Hg, Cr, Cd), avšak jejich koncentrace v kalech se daří postupně snižovat. Druhou a v současné době nebezpečnější skupinou cizorodých látek jsou organické chlorované látky (PCB, dioxiny, atd.), polyaromatické uhlovodíky a dále organické sloučeniny jako jsou farmaceutika, chemikálie pro domácnost a další.

Čistírenské kaly se využívají k přímému hnojení zemědělských půd a lesních dřevin, k rekultivaci neplodných, narušených a devastovaných půd. Potřebná a v řadě případů i nezbytná je jejich hygienizace. V příznivých podmínkách je využití stabilizovaných čistírenských kalů pro hnojení zemědělských půd a pro rekultivace nejvhodnějším a nejekonomičtějším řešením.

Kal obsahuje v sušině po stabilizaci 30 – 50 % cenných organických látek. Z hnojivých složek obsahuje kromě jiných 2 – 4 % dusíku, 1 – 2 % fosforu, 2 – 10 % vápníku, kdežto obsah draslíku je poměrně nízký -0,1 – 0,35 %.

Nyní se u nás použití čistírenských kalů v zemědělství řídí vyhláškou č. 382/2001 Sb. Tato vyhláška je plně v souladu se směrnicemi Rady EU č. 86/278/EEC, která určuje za jakých podmínek lze čistírenské kaly v zemědělství využívat. Na kvalitu a hygienickou nezávadnost kalů aplikovaných na půdu jsou kladeny stále větší nároky. Podle vyhlášky 382/2001 Sb. musí být při aplikaci upravených čistírenských kalů na zemědělskou půdu dodrženy mezní hodnoty koncentrace vybraných rizikových látek a prvků v kalech. [41, 49]

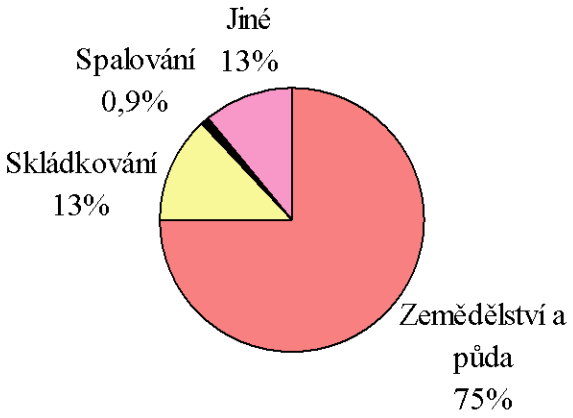
3.9. Současný stav nakládání s čistírenskými kaly v ČR a EU

Jednotlivé hlavní způsoby nakládání s kalem v roce 2005 a 2006 v ČR jsou znázorněny v tabulce 3. Uvedené údaje o produkci a nakládání s odpady jsou výstupem z Informačního systému o odpadech (ISOH), který provozuje Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., Centrum pro hospodaření s odpady pro MŽP.

Oproti roku 2005 nastal v roce 2006 nárůst u využití kalů pro aplikaci na zemědělskou půdu a pokles v jiných blíže nespecifikovatelných způsobech použití, ostatní způsoby nedoznaly podstatných změn (graf 1). [52]

Tab. 3: Způsoby nakládání s kalem v ČR v roce 2005 a 2006 [52]

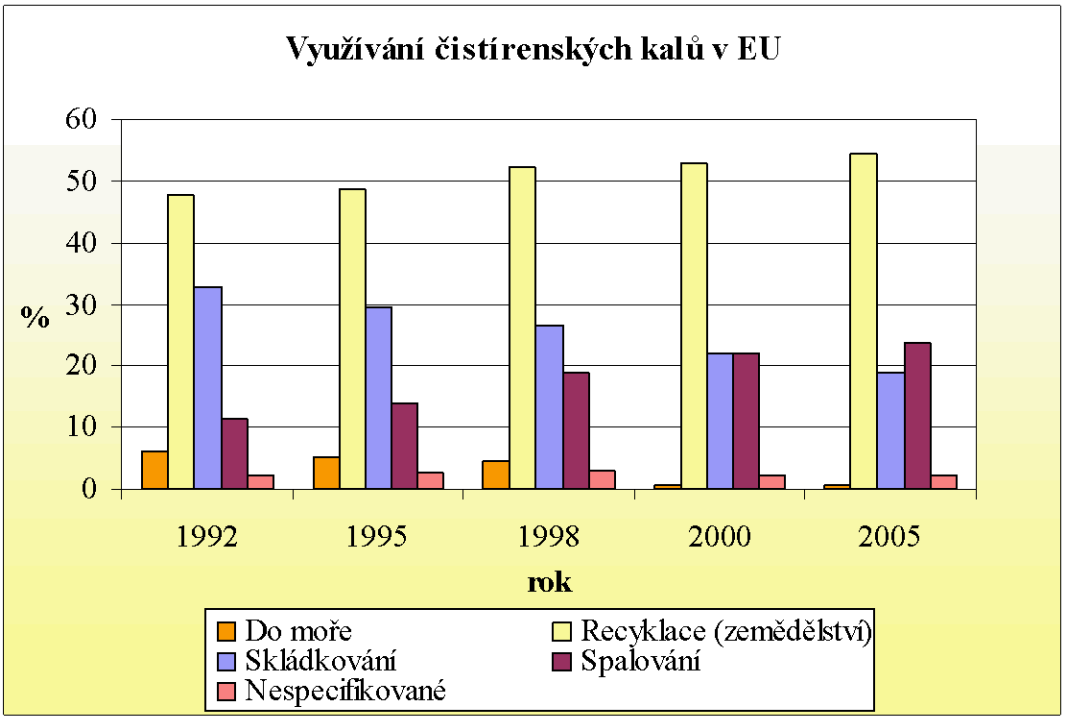
		rok 2005	**rok 2006**
produkce kalu	tis.t.sušiny	211,6	220,7
zemědělství a půda	%	68,6	75,0
	tis.t.sušiny	145,2	165,5
skládkování	%	13,2	13,0
	tis.t.sušiny	27,9	28,7
spalování včetně výroby paliva	%	0,02	0,9
	tis.t.sušiny	0,05	2,0
jiné	%	18,2	11,0
	tis.t.sušiny	38,5	24,3



Graf 1: Způsoby nakládání s kalem v ČR v roce 2006 [53]

V zemích Evropské Unie je recyklováno 50 – 55 % čistírenských kalů, z nichž je většina využívána v zemědělství. Zbývající část kalů je ukládána na skládkách (15 – 20 %), spalována (20 – 25 %), či jinak využívána (5 %), zejména ve stavebnictví (graf 2).

Stále rostoucí zájem o recyklaci kalů v některých evropských zemích v posledních letech je důsledkem zpřísnění limitů pro jejich skládkování, zákazu vypouštění kalů do moře (od 31. 12. 1998) a skutečnosti, že recyklace je nejlevnějším způsobem odstranění kalů. [51]



Graf 2: Grafické znázornění využívání čistírenských kalů v EU za roky 1992–2005 [52]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Vzorky kalů

V této diplomové práci byly použity vzorky kalů z Čistírny odpadních vod v Modřicích a Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Z Čistírny odpadních vod v Modřicích byly k testování použity tyto kaly:

- anaerobně stabilizovaný kal
- odvodněný anaerobně stabilizovaný kal
- sušený anaerobně stabilizovaný kal

Z Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno byl použit kal primární.

Anaerobně stabilizovaný kal byl odebrán z vyhnívací komory metodou vzorkování z potrubí a odstředěný kal byl odebrán z potrubí odstředivky. Sušený kal byl vzorkován z kontejnerů umístěných vně budovy sušárny. Kal primární byl vzorkován z usazovací nádrže. Vzorky byly odebrány k tomu způsobilou osobou.

Všechny vzorky byly přechovávány a přepravovány v uzavřené plastové láhvi v chladu a temnu.

4.1.1. Technologie Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Voda, která přitéká do ČOV, je zbavována nejrůznějších hrubých nečistot česly. Poté je odvedena do usazovací nádrže kuželovitého tvaru o šířce 6 m. Zde se její tok téměř zastaví a na dno postupně sedimentuje primární kal. Po mechanickém vyčištění je odpadní voda vedena do aktivační nádrže, kde je čištěna v poměru 350 – 750 ml aktivovaného kalu na 1 l vody. V aktivační nádrži dochází k intenzivnímu provzdušňování odpadních vody. Po biologickém odstranění znečištění natéká směs aktivovaného kalu a vyčištěné vody do prostoru dosazovací nádrže. V dosazovacím prostoru dojde k sedimentaci nerozpuštěných látek. Aktivovaný kal je zpět přečerpáván do procesu biologického čištění. Voda je dezinfikována chlorem v množství 180 mg/h Cl_2 a následně odtéká do odtokového potrubí ČOV.

Na dně usazovací nádrže je čerpadlo, které přečerpává kal do sterilizátoru. Sterilizace probíhá při teplotě 125 °C po dobu 35 minut a poté je kal zchlazen na teplotu 30 – 40 °C a vypuštěn do kanalizační stoky. [54]

4.1.2. Technologie Čistírny odpadních vod v Modřicích

Tato čistírna (obr. 13) využívá technologii anaerobní stabilizace kalu.

Voda, přitékající do ČOV je zbavována nečistot v lapáku štěrku, česlech a v lapáku písku. Voda je poté kanálem vedena do šesti usazovacích nádrží, které zajišťují mechanické odstranění usaditelných látek a odtud je přečerpávána do aktivace. Voda je přiváděna nejprve do anaerobní nádrže s funkcí defosfatace, následně do oběhové anoxické nádrže s funkcí předřazené denitrifikace. Posledním stupněm aktivace je oxická část s aerací rozdělená na provzdušňovanou a neprovzdušňovanou zónu.

Z aktivačních nádrží postupuje aktivační směs do šesti dosazovacích nádrží, kde dochází k usazení a oddělení aktivovaného kalu. Usazený kal je veden přes čerpací stanici vratného kalu do preanoxické zóny aktivace. Aktivovaný přebytečný kal, odebíraný z aktivace, je zpracováván v kalovém hospodářství

Primární kal z usazovacích nádrží je zahušťován v zahušťovací nádrži kruhového typu a odtahován do kalové směšovací nádrže. Odsazená kalová voda se vrací do rozdělovacího objektu usazovacích nádrží. Přebytečný biologický kal, přiváděný z biologického stupně je zahušťován v flotační jednotce DAF. Ke smíšení obou kalů dochází v homogenizační směšovací nádrži s mícháním. Směsný surový kal je dále čerpán do vyhnívacích komor. Čtyři vyhnívací nádrže jsou intenzivně promíchávány a udržovány na konstantní teplotě 35 °C, aby byl zajištěn růst mezofilních bakterií. Doba zdržení kalu ve vyhnívacích nádržích je cca 22 dnů. Zbývající dvě bývalé vyhnívací nádrže jsou rekonstruovány na uskladňovací nádrže stabilizovaného kalu. Z nich je vyhnilý kal, který obsahuje cca 4 % sušiny, odvodňován dvěma odstředivkami. Kal z odstředivky o sušině cca 24 % je transportován do sušárny. Lopatková sušárna pracuje se systémem nepřímého ohřevu kalu. Pro přenos tepla v sušárně je použit horký olej o teplotě 180 – 210 °C, který proudí uvnitř pláště, dutými hřídeli a lopatkami. Dlouhá doba zdržení kalu (přes tři hodiny) v kombinaci s průměrnou teplotou kalu 100 °C umožňuje kaly pasterizovat a hygienizovat.

Kaly jsou vyváženy do kompostáren nebo oblastí, kde se provádí rekultivace půdy. Čistírna do budoucna plánuje ještě ekologičtější likvidaci odpadu, a to jeho spalování v cementárně. [55]

Obr.13: Letecký pohled na ČOV Modřice [55]

4.2. Přístroje a zařízení

Sušárna Binder, překlopná třepačka Heidolph Reax 20, centrifuga Nüve NF 800, chlazený inkubátor Nüve ES 110, toxkit inkubátor Novital Covatutto 20.

4.3. Příprava vodných výluhů kalů

U každého vzorku kalu byl stanoven podíl sušiny způsobem, který je popsán v kapitole 3.4.1. Vzorek byl sušen v sušárně při teplotě (105 ± 5) °C.

Z každého vzorku kalu byly připraveny dva vodné výluhy. První série vzorků vodných výluhů, označená jako vodné výluhy série I, byla připravena standardním způsobem dle Metodického pokynu k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů tak, aby poměr fází voda : pevná fáze byl 10 : 1 l/kg. Druhá série vodných výluhů, označená jako vodné výluhy série II, byla připravena naředěním na hustotu kalu s nejmenším podílem sušiny tak, aby mohly být mezi sebou porovnány z hlediska hodnocené vlastnosti ekotoxicita. Nejmenší obsah sušiny měl anaerobně stabilizovaný kal z ČOV Modřice s podílem sušiny 3,89 % (kapitola 5.1.). Tento kal měl podíl sušiny pod 10 %, proto byl považován za kapalný odpad již připravený k ekotoxikologickému testování a vodné výluhy se z něho nedělaly.

Po naplnění vzorkovnice stanoveným množstvím vzorku a vody byla uzavřena a upnuta do třepačky. Vyluhování bylo prováděno při plynulém otáčení nádoby se vzorkem a vodou způsobem „hlava – pata" rychlostí 5 – 10 otáček za minutu po dobu 24 hodin ± 0,5 hodiny při teplotě 15 – 25 °C. Poté se obsah vzorkovnice nechal usazovat dobu 15 ± 5 minut. Vodný výluh byl slit, upraven odstředěním a zfiltrován přes papírové filtry o střední velikosti póru 5 μm.

Vodné výluhy byly obohaceny solemi. Přesný postup a složení roztoků solí je popsáno v teoretické části v kapitole 3.4.2.

4.4. Testy ekotoxicity

4.4.1. Daphnotoxkit F^{TM}

Jako testovací organismus byl použit korýš *Daphnia magna*, který byl vylíhnut z vajíček. Výsledkem tohoto mikrobiotestu bylo stanovení hodnot 24h EC50 a 48h EC50.

Příprava standardní sladké vody

Pro přípravu 2 l standardní sladké vody byly použity ampule s koncentrovanými solnými roztoky, které jsou součástí příslušného kitu. Tato voda byla použita jako inkubační medium pro ephippia a pro přípravu koncentrační řady roztoků vodného výluhu.

Odměrná baňka o objemu 2 l byla naplněna z poloviny destilovanou vodou. Do ní byly nality koncentrované roztoky solí, a to nejprve ampule označená číslem 1 ($NaHCO_3$), dále ampule č. 2 ($CaCl_2$), ampule č. 3 ($MgSO_4$) a ampule č. 4 (KCl). Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a protřepána.

Před použitím standardní sladké vody pro inkubaci ephippií a před přípravou roztoků vodného výluhu byla voda 15 minut provzdušňována. Mezi jednotlivými testy byla tato voda uchovávána v chladničce a v temnu. [22, 30]

Inkubace vajíček Daphnia magna

Inkubace ephippií musí být započata 3 dny před začátkem testů toxicity. Obsah ampule s ephippii byl nalit na mikrosítko a pro odstranění všech stop skladovacího média byla vajíčka promyta vodovodní vodou. V 15 ml provzdušněné standardní sladké vody byla ephippia přenesena na inkubační Petriho misku. Miska byla zakryta víčkem a inkubována 72 hodin při teplotě 20–22 °C za kontinuálního ozařování 6000 luxy. Dvě hodiny před nasazením organismů do testu byly perloočky předkrmeny suspenzí řasy *Spiruliny microalgae*, která byla protřepána se standardní sladkou vodou. [22, 30]

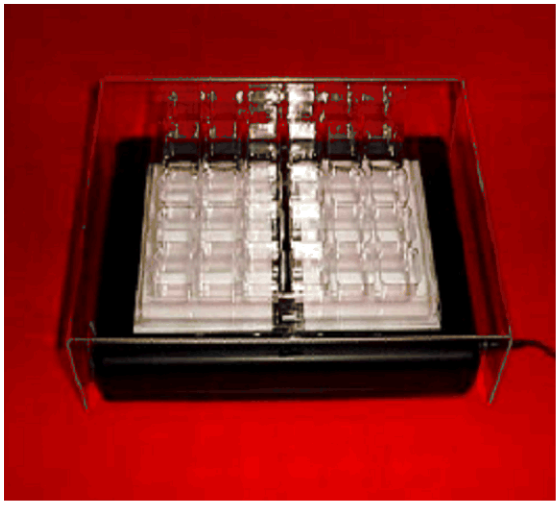
Příprava roztoků vodného výluhu

Byla připravena vhodná koncentrační řada vodného výluhu. K úvodnímu testu byl použit neředěný vodný výluh, u předběžného testu byly připraveny tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla zvolena na základě výsledků předběžného testu. K ředění vodného výluhu byla používána standardní sladká voda.

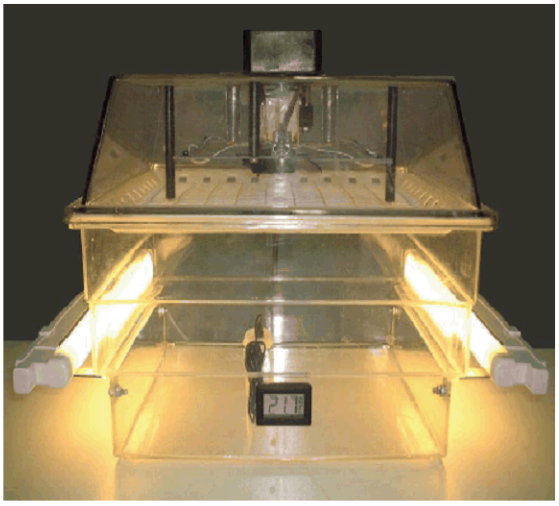
Plnění testovací desky a přenos perlooček do testovacích šachet

Do každé šachty v kontrolním řádku bylo napipetováno 10 ml ředící vody a do šachet v ostatních řádcích bylo napipetováno 10 ml příslušné koncentrace vodného výluhu v pořadí podle klesající koncentrace.

Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule opatřená tmavými okraji a průhledným krytem (obr. 14). Přenos neonatů do testovacích šachet byl prováděn pomocí mikropipety. Nejprve bylo přeneseno přibližně 20 neonatů z Petriho misky do promývacích šachet na desce. Tyto šachty slouží k zamezení zředění testovaných roztoků vodných výluhů při transportu testovacích organismů z inkubační misky na testovací desku. Poté bylo přeneseno 5 jedinců z promývacích mycích do ostatních 4 šachet v témž řádku. Následně byla testovací deska přikryta parafilmem a přiložen kryt. Deska byla obalena alobalem a uložena do inkubátoru (obr. 15) nastaveného na teplotu 20 °C na dobu 48 hodin. [22, 30]



Obr. 14: Světelná tabule [22]



Obr. 15: Inkubátor [22]

Vyhodnocení testu

Test byl vyhodnocen po 24 a 48 hodinách, kdy byla destička vyjmuta z inkubátoru a byly spočítáni uhynulí a imobilizovaní jedinci. Bylo vypočítáno procento mortality a pokud byla úmrtnost v kontrole 10 %, byl test považován za neplatný.

Výsledkem toho mikrobiotestu bylo stanovení hodnot 24h EC50 a 48h EC50, které se získaly následujícím způsobem: k odpovídajícím koncentracím testovaného výluhu se odečetla imobilizace nebo mortalita perlooček a vyjádřila se v procentech. Tyto hodnoty se následně převedly na probitové hodnoty (dle tabulky v příloze č. 1). Z dat se sestrojil graf závislosti probitových hodnot (na ose y) na logaritmech koncentrací (na ose x). Vynesenými body se proložila přímka (např. metodou nejmenších čtverců). Z průsečíku proložené přímky a souřadnice probitové hodnoty 5 (tj. 50 %) se spustila kolmice na osu x a odečetla se příslušná hodnota log c. Odlogaritmováním hodnoty log c se získala hledaná koncentrace EC50. [22, 30]

4.4.2. Thamnotoxkit F^{TM}

Test byl proveden v multišachtové desce za použití růstového stádia larev sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus,* právě vylíhnutých z cyst. Výsledkem tohoto testu je stanovení hodnoty 24h LC50.

Obr. 16: Cysty Thamnocephalus platyurus

Příprava standardní sladké vody

K přípravě 1 l standardní sladké vody byly použity ampule s koncentrovanými solnými roztoky z příslušného kitu. Tato voda byla použita jako medium pro inkubaci cyst (obr. 16) a jako ředicí médium pro přípravu koncentrační řady roztoků vodného výluhu.

Odměrná baňka o objemu 1 l byla naplněna přibližně 800 ml destilovanou vodou. Do ní byly nality koncentrované roztoky solí. Nejprve byla použita ampule označená č. 1 ($NaHCO_3$), dále ampule č. 2 ($CaCl_2$), ampule č. 3 ($MgSO_4$) a ampule č. 4 (KCl). Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a protřepána.

Před použitím standardní sladké vody pro inkubaci cyst a před přípravou roztoků vodného výluhu byla voda 15 minut provzdušňována. Mezi jednotlivými testy byla standardní voda uchovávána v chladničce a v temnu. [22, 56]

Inkubace cyst Thamnocephalus platyurus

Inkubace byla provedena 24 hodin před začátkem testování. K 2,5 ml standardní sladké vody bylo přidáno 17,5 ml deionizované vody. Vialka s cystami byla naplněna 1 ml inkubačního roztoku, který vznikl naředěním standardní sladké vody, poté byla uzavřena a 30 minut protřepávána. Předhydratované cysty byly převedeny na inkubační Petriho misku a dále bylo přidáno ještě 10 ml zředěné standardní vody. Petriho miska byla uzavřena víčkem a ponechána v inkubátoru za stálého osvětlení (3000 – 4000 lux) při teplotě 25 °C po dobu 20 – 22 hodin. [22, 56]

Příprava roztoků vodného výluhu

K úvodnímu testu byl použit neředěný vodný výluh, u předběžného testu byly připraveny tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Koncentrační řada základního testu byla vytvořena na základě výsledků předběžného testu. K ředění vodného výluhu byla používána standardní sladká voda.

Plnění testovací desky a přenos larev do testovacích šachet

Byl přenesen 1 ml ředící vody do každé šachty v kontrolním řádku testovací desky a 1 ml příslušné koncentrace vodného výluhu do šachet ostatních sloupců v pořadí podle rostoucí koncentrace. Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule opatřená tmavými okraji a průhledným krytem. Přenos larev do testovacích šachet byl prováděn pomocí mikropipety. Nejprve bylo přeneseno přibližně 50 larev z Petriho misky do každé mycí šachty na desce a poté bylo přeneseno 10 jedinců z mycích šachet do ostatních 3 šachet v témže sloupci. Tento přenos byl zopakován i pro ostatní sloupce. Poté byla testovací deska přikryta parafilmovým páskem a přiložen kryt. Deska byla obalena alobalem a uložena do inkubátoru nastaveného na teplotu 25 °C na dobu 24 hodin. [22, 56]

Vyhodnocení testu

Destička byla po 24 hodinách vyjmuta z inkubátoru a byly spočítáni uhynulí a živí jedinci. Larvy byly považovány za uhynulé, když u nich nebyl během 10 sekund pozorován žádný pohyb. Bylo vypočítáno procento mortality a pokud úmrtnost v kontrole přesahovala 10 %, byl test považován za neplatný.

Výsledkem toho biotestu bylo stanovení hodnoty 24h LC50, která se zjistila stejným způsobem jako hodnota EC50 u testu Daphnotoxkit F^{TM} (kapitola 4.5.). [22, 56]

4.4.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Podmínky testu

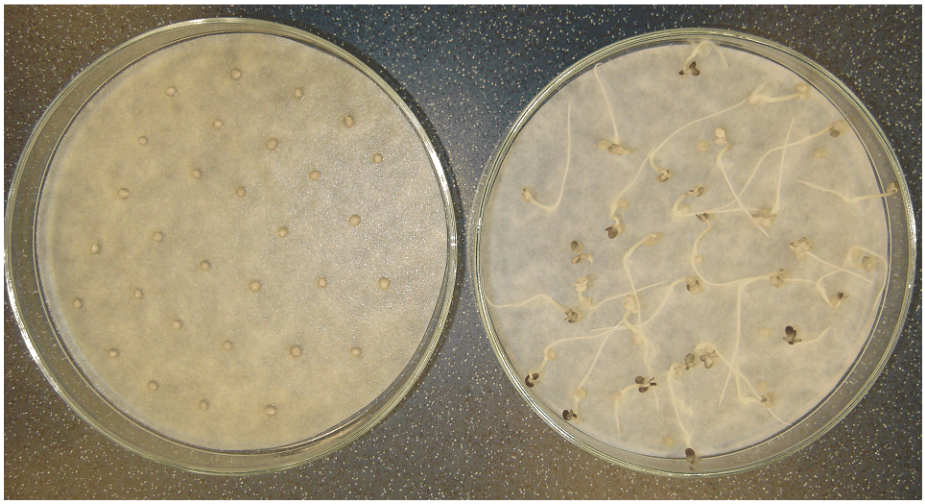
Na dno Petriho misky o průměru 120 až 140 mm byl vložen filtrační papír, na který bylo napipetováno 5 ml roztoku testovaného vodného výluhu. Poté bylo na dno Petriho misky umístěno 30 semen *Sinapis alba* s klíčivostí minimálně 90 %. Misky byly přikryty víčkem a uloženy do zatemněného inkubátoru o teplotě 20 ± 2 °C na dobu 72 hodin. Po uplynutí dané doby byla stanovena inhibice růstu 72h IC50. Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu je průměrná délka kořene (obr. 17). Hodnota stanovená v neředěném vodném výluhu či testovaných koncentracích vodného výluhu se porovnává s kontrolou a vypočítává se procento inhibice (zkrácení) či stimulace (prodloužení kořene). [12, 19]

Příprava ředící vody

Nejdříve byla připravena série zásobních roztoků. Na analytických vahách bylo naváženo 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a kvantitativně převedeno do odměrné baňky objemu 1 l a doplněno destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byly připraveny další tři zásobní roztoky s navážkami 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H2O$; 2,59 g $NaHCO_3$ a 0,23 g KCl. Ředící voda byla připravena tak, že do odměrné baňky o objemu 1 l bylo napipetováno 25 ml každého zásobního roztoku a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Připravená voda byla 24 hodin provzdušňována a poté nechána 24 hodin odstát. Dále byla zkontrolována hodnota pH 7,8 ± 0,2 a případně upravena pomocí roztoku NaOH nebo HCl o koncentraci 1 mol.l^{-1}. [19]

Příprava roztoků vodného výluhu

K úvodnímu testu byl použit neředěný vodný výluh, u předběžného testu byly připraveny tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 10; 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Na základě výsledků předběžného testu byla vytvořena koncentrační řada základního testu. K ředění vodného výluhu byla používána standardní sladká voda.



Obr. 17: Semena Sinapis alba před nasazením testu a po 72 hodinách testu

Vyhodnocení testu

Po uplynutí 72 hodinové inkubace byly misky vyndány z termostatu a u jednotlivých semen změřeny délky kořenů. Délky kořenů byly zaznamenány do tabulky a zprůměrovány.

Výsledkem toho testu byla hodnota 72h IC50, která se stanovila následujícím způsobem: koncentrace látky, kde došlo k inhibici růstu se vyjádřila v logaritmických hodnotách. Získané hodnoty se vynesly do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou byla log c (osa x) a závisle proměnnou % inhibice (osa y). Vynesenými body se proložila přímka (např. metodou nejmenších čtverců). Z průsečíku proložené přímky a souřadnice inhibice 50 % se spustila kolmice na osu x a odečetla se příslušná hodnota log c. Odlogaritmováním hodnoty log c se získala hledaná koncentrace IC50.

5. VÝSLEDKY

Veškeré výsledky byly pro lepší přehlednost zpracovány do tabulek a grafů. Pro každý testovaný kal jsou uvedeny provedené testy toxicity a výsledky získané pomocí těchto testů pro oba typy vodných výluhů (série I a II).

5.1. Stanovení sušiny a příprava výluhů kalů

V následujících tabulkách 4 a 5 jsou u každého kalu uvedeny navážky vzorků, ze kterých byl vypočten podíl sušiny *Dr*, dále hmotnost analytického vzorku odpadu *M* a množství přidané vody L_A pro přípravu vodného výluhu kalu (rovnice, které slouží pro výpočet těchto parametrů, jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.).

Tab. 4: Stanovení sušiny a přehled vypočtených parametrů pro přípravu vodných výluhů série I

vzorek kalu	navážka vzorku [g]	m_{vzorku} po 18 hod. [g]	m_{vzorku} po 19 hod. [g]	*DR* [%]	*M* [kg]	L_A [l]
anaerobně stabilizovaný	50,25	1,96	1,96	3,89	-	-
odvodněný anaer. stabil.	49,66	10,38	10,38	20,90	0,4785	0,6215
sušený anaer. stabil.	51,35	47,76	47,76	93,01	0,1075	0,9925
primární	58,19	10,01	10,01	17,20	0,5814	0,5186

Tab. 5: Stanovení sušiny a přehled vypočtených parametrů pro přípravu vodných výluhů série II

vzorek kalu	*DR* [%]	poměr pevná fáze : voda [kg/l]	*M* [kg]	L_A [l]
anaerobně stabilizovaný	3,89	-	-	-
odvodněný anaerobně stabiliz.	20,90	1 : 5,4	0,1563	0,8437
sušený anaerobně stabiliz.	93,01	1 : 23,9	0,0402	0,9598
primární	17,20	1 : 4,4	0,1852	0,8148

5.2. Testy ekotoxicity

Vzorky posuzovaných kalů byly podrobeny jednomu testu standardnímu – test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* a dvěma alternativním testům ekotoxicity – test Thamnotoxkit F^{TM} na testovacím organismu *Thamnocephalus platyurus* a test Daphnotoxkit F^{TM} na testovacím organismu *Daphnia magna*.

V průběhu všech testů byla sledována kritéria podmiňující validitu testu; pH, teplota a množství kyslíku. Všechna tato kritéria byla ve shodě s podmínkami vyžadovanými pro jednotlivé testy.

5.2.1. Anaerobně stabilizovaný kal

5.2.1.1. Daphnotoxkit F^{TM}

- délka expozice 24 a 48 hodin
- do každé šachty testovací desky bylo napipetováno 10 ml roztoku vzorku a vloženo 5 jedinců
- test byl proveden jednou ve čtyřech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Aby mohly být výsledky testu Daphnotoxkit F^{TM} považovány za platné, byl nejprve tento test proveden na roztocích standardu dichromanu draselného $K_2Cr_2O_7$.

Test byl vyhodnocen graficky probitovou metodou. Byla stanovena hodnota 24h EC50 0,999 mg/l a 48h LC50 0,803 mg/l, což je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard. Také druhé kritérium pro platnost testu bylo splněno; imobilizace organismů v kontrole byla menší nebo rovna 10 %.

Úvodní test

Do každé ze čtyř testovacích šachet testovací desky bylo napipetováno 10 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 5 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. V kontrole neuhynul žádný testovací organismu, v neředěném vodném výluhu uhynuly organismy všechny. Výsledky tohoto úvodního testu jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6: Vyhodnocení úvodního testu pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	úhyn celkem		% mortality	
	24h	48h	24h	48h
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testu: test byl pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následoval test předběžný

Předběžný test

Do testovací desky byly odměřeny tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. K ředění vodného výluhu byla používána standardní sladká voda. Pro testování každé koncentrace bylo použito 20 jedinců, kteří byly rozděleni do 4 šachet. Výsledky tohoto testu uvádí tabulka 7.

Tab. 7: Výpočet mortality (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	1/20	0,0	5,0
50	0/20	0/20	0,0	0,0
100	20/20	20/20	100,0	100,0
200	20/20	20/20	100,0	100,0
500	20/20	20/20	100,0	100,0
700	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testu:

24h EC50 = 72,87 ml/l

48h EC50 = 72,87 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžného testu byla připravena koncentrační řada vodného výluhu pro základní test: 0 (kontrola); 50; 60; 70; 80; 90 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Výpočet mortality pro anaerobně stabilizovaný kal je uveden v tabulce 8.

Tab. 8: Výpočet mortality (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	1/20	1/20	5,0	5,0
50	3/20	7/20	15,0	35,0
60	16/20	17/20	80,0	85,0
70	17/20	19/20	85,0	95,0
80	20/20	20/20	100,0	100,0
90	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testu:

24h EC50 = 56,42 ml/l

48h EC50 = 52,04 ml/l

5.2.1.2. Thamnotoxkit F^{TM}

- délka expozice 24 hodin
- do každé šachty testovací desky byl napipetován 1 ml roztoku vzorku a vloženo 10 jedinců
- test byl proveden jednou ve třech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Aby mohly být výsledky testu Thamnotoxkit F^{TM} považovány za platné, byl nejprve tento test proveden na roztocích standardu dichromanu draselného $K_2Cr_2O_7$.

Test byl vyhodnocen graficky probitovou metodou. Byla stanovena hodnota 24h LC50 0,088 mg/l, což je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard. Také druhé kritérium podmiňující platnost výsledků testů bylo splněno; imobilizace organismů v kontrole byla menší nebo rovna 10 %.

Úvodní test

Do každé ze tří testovacích šachet testovací desky byl napipetován 1 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 10 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. V kontrole neuhynul žádný organismus, v neředěném vodném výluhu uhynuly organismy všechny. Tabulka 9 uvádí vyhodnocení úvodního testu na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

Tab. 9: Vyhodnocení úvodního testu pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	úhyn celkem	% mortality
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Vyhodnocení testu: test byl pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následoval test předběžný

Předběžný test

Do testovací desky byly odměřeny tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. K ředění vodného výluhu byla používána standardní sladká voda. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10: Výpočet mortality (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	úhyn celkem	% mortality
0 (kontrola)	3/30	10,0
50	30/30	100,0
100	30/30	100,0
200	30/30	100,0
500	30/30	100,0
700	30/30	100,0

Vyhodnocení testu: na základě předběžného testu, kdy již v nejméně koncentrovaném vodném výluhu docházelo ke 100% mortalitě, nelze stanovit hodnotu 24h LC50. Proto následoval základní test, ve kterém se hodnoty koncentrací vodného výluhu pohybovaly v rozmezí 10 – 50 ml/l.

Základní test

Na základě výsledků předběžného testu byla připravena koncentrační řada vodného výluhu: 0 (kontrola); 10; 20; 30; 40; 50 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Vypočet mortality pro anaerobně stabilizovaný kal je uveden v tabulce 11.

Tab. 11: Výpočet mortality (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	úhyn celkem	% mortality
0 (kontrola)	2/30	6,7
10	0/30	0,0
20	10/30	33,3
30	15/30	50,0
40	30/30	100,0
50	30/30	100,0

Vyhodnocení testu: 24h LC50 = 22,81 ml/l

5.2.1.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

- délka expozice 72 hodin
- do každé Petriho misky bylo napipetováno 5 ml roztoku vzorku a vloženo 30 semen hořčice bílé
- test byl proveden jednou ve dvou paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny z provedených stanovení a zprůměrňovány
- pokud byla inhibice růstu kořene I_i v dané koncentraci menší než nula, jednalo se o stimulaci růstu

Proto, aby mohl být test na *Sinapis alba* považován za platný, byl proveden na roztocích standardu dichromanu draselného $K_2Cr_2O_7$.

Test byl vyhodnocen graficky pomocí počítačové techniky. Byla stanovena hodnota 72h IC50 63,42 mg/l, což je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard. Bylo splněno i druhé kritérium pro platnost, kdy klíčivost semen v kontrole byla větší než 90 %.

Úvodní test

Do třech Petriho misek byly vloženy filtrační papíry, na které bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu. Do každé z nich bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v tabulce 12.

Tab. 12: Vyhodnocení úvodního testu pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	45,50		
1000	0,00	1,00	100

Vyhodnocení testu: úvodní test byl pozitivní (inhibice ≥ 50 %), proto následoval test předběžný

Předběžný test

Byly připraveny různé koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 10; 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. K ředění vodného výluhu byla použita ředící voda. Pro testování každé koncentrace bylo použito 60 semen (ve dvou Petriho miskách). Vyhodnocení předběžného testu je uvedeno v tabulce 13.

Tab. 13: Výpočet inhibice (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	45,50		
10	47,50	-0,04	-4
50	45,00	0,01	1
100	44,10	0,03	3
200	26,60	0,42	42
500	1,40	0,97	97
700	0,00	1,00	100

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 210,69 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžného testu byla připravena koncentrační řada vodného výluhu: 0 (kontrola); 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400 ml/l. Pro testování každé koncentrace a pro příslušnou kontrolu bylo použito 60 semen (ve dvou Petriho miskách). Výpočet inhibice na testu se *Sinapis alba* je uveden v tabulce 14.

Tab. 14: Výpočet inhibice (%) pro anaerobně stabilizovaný kal

koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	45,30		
100	39,80	0,12	12
150	34,70	0,23	23
200	32,00	0,29	29
250	17,10	0,62	62
300	6,70	0,85	85
350	1,60	0,96	96
400	1,20	0,97	97

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 203,62 ml/l

5.2.2. Odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

5.2.2.1. Daphnotoxkit F^{TM}

- délka expozice 24 a 48 hodin
- do každé šachty testovací desky bylo napipetováno 10 ml roztoku vzorku a vloženo 5 jedinců
- test byl proveden jednou ve čtyřech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do každé ze čtyř testovacích šachet testovací desky bylo napipetováno 10 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 5 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Takto byly testovány oba vodné výluhy. V tabulkách 15a a 15b jsou uvedena vyhodnocení úvodních testů pro vodné výluhy série I a II.

Tab. 15a: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 15b: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testů: testy obou sérií vodných výluhů byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly testy předběžné

Předběžný test

Do testovací desky byly odměřeny koncentrace vodných výluhů: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 20 jedinců (4 šachty). Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Vyhodnocení předběžných testů vodných výluhů série I a II jsou uvedena v tabulkách 16a a 16b.

Tab. 16a: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	2/20	0,0	10,0
50	0/20	1/20	0,0	5,0
100	1/20	2/20	5,0	10,0
200	20/20	20/20	100,0	100,0
500	20/20	20/20	100,0	100,0
700	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 16b: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
50	0/20	0/20	0,0	0,0
100	2/20	3/20	10,0	15,0
200	2/20	3/20	10,0	15,0
500	20/20	20/20	100,0	100,0
700	2020	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 142,46 ml/l
48h EC50 = 110,57 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 196,34 ml/l
48h EC50 = 188,24 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 100; 120; 140; 160; 180 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 200; 250; 300; 350; 400 ml/l. Bylo použito 20 jedinců (4 šachty) pro testování každé koncentrace. Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů jsou uvedeny v tabulkách 17a a 17b.

Tab. 17a: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
100	0/20	0/20	0,0	0,0
120	1/20	5/20	5,0	25,0
140	4/20	9/20	20,0	45,0
160	14/20	17/20	70,0	85,0
180	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 17b: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
200	0/20	0/20	0,0	0,0
250	1/20	1/20	5,0	5,0
300	3/20	5/20	15,0	25,0
350	8/20	13/20	40,0	65,0
400	14/20	15/20	70,0	75,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 142,85 ml/l
48h EC50 = 136,38 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 363,40 ml/l
48h EC50 = 340,37 ml/l

5.2.2.2. Thamnotoxkit F™

- délka expozice 24 hodin
- do každé šachty testovací desky byl napipetován 1 ml roztoku vzorku a vloženo 10 jedinců
- test byl proveden jednou ve třech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do šachet testovací desky byl napipetován 1 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 10 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Tímto způsobem byly testovány vodné výluhy série I a II. Tabulky 18a a 18b uvádí vyhodnocení úvodních testů obou sérií vodných výluhů.

Tab. 18a: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Tab. 18b: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Vyhodnocení testů: testy vodných výluhů série I a II byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly testy předběžné

Předběžný test

Byla připravena koncentrační řada vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Takto byly testovány vodné výluhy série I a II. Tabulky 19a a 19b uvádí vyhodnocení předběžných testů obou sérií vodných výluhů.

Tab. 19a: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	2/30	6,7
50	25/30	83,3
100	30/30	100,0
200	30/30	100,0
500	30/30	100,0
700	30/30	100,0

Tab. 19b: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	1/30	3,3
50	0/30	0,0
100	4/30	13,3
200	28/30	93,3
500	30/30	100,0
700	30/30	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 2,66 ml/l

vodný výluh série II: 24h LC50 = 153,43 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro vodný výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 20; 30; 40; 50; 60 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 110; 130; 150; 170; 190 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů jsou uvedeny v tabulkách 20a a 20b.

Tab. 20a: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
20	0/30	0,0
30	2/30	6,7
40	9/30	30,0
50	21/30	70,0
60	30/30	100,0

Tab. 20b: Výpočet mortality (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	1/30	3,3
110	1/30	3,3
130	12/30	40,0
150	30/30	100,0
170	30/30	100,0
190	30/30	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 39,57 ml/l

vodný výluh série II: 24h LC50 = 128,02 ml/l

5.2.2.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

- délka expozice 72 hodin
- do každé Petriho misky bylo napipetováno 5 ml roztoku vzorku a vloženo 30 semen hořčice bílé
- test byl proveden jednou ve dvou paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny z provedených stanovení a zprůměrovány
- pokud byla inhibice růstu kořene I_i v dané koncentraci menší než nula, jednalo se o stimulaci růstu

Úvodní test

Bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu do třech Petriho misek. Do každé z nich bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Takto bylo provedeno testování obou sérií vodných výluhů. Výsledky těchto úvodních testů uvádí tabulky 21a a 21b.

Tab. 21a: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	50,70		
1000	0,00	1,00	100

Tab. 21b: Vyhodnocení úvodního testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	30,70		
1000	17,10	0,44	44

Vyhodnocení testů: test vodného výluhu série I byl pozitivní (inhibice $\geq$ 50 %), proto následoval test předběžný
test vodného výluhu série II byl negativní (inhibice $\leq$ 50 %), proto následoval test ověřovací

Předběžný test

Do Petriho misek byly odměřeny tyto koncentrace vodného výluhu série I: 0 (kontrola); 10; 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 60 semen (ve dvou Petriho miskách). V tabulce 22 je uvedeno vyhodnocení předběžného testu vodného výluhu série I.

Tab. 22: Výpočet inhibice (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	50,70		
10	47,40	0,07	7
50	55,70	-0,10	-10
100	48,90	0,04	4
200	46,50	0,08	8
500	19,10	0,62	62
700	1,70	0,97	97

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 307,45 ml/l

Ověřovací test

Do šesti Petriho misek bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu série II. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Do každé Petriho misky bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Výsledky tohoto testu vodného výluhu série II jsou uvedeny v tabulce 23.

Tab. 23: Vyhodnocení ověřovacího testu pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	30,70		
1000	17,10	0,44	44

Vyhodnocení testu: hodnota 72h IC50 nelze stanovit, protože vodný výluh nevykazoval ekotoxický efekt

Základní test

Na základě výsledků předběžného testu byla připravena koncentrační řada vodného výluhů série I: 0 (kontrola); 100; 200; 250; 300; 350; 400; 450 ml/l. Pro každou koncentraci a pro kontrolu bylo použito 60 semen. Výpočet mortality tohoto vodného výluhu je uveden v tabulce 24.

Tab. 24: Výpočet inhibice (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	52,30		
100	46,70	0,11	11
200	35,20	0,33	33
250	25,80	0,51	51
300	23,00	0,56	56
350	21,20	0,59	59
400	15,60	0,70	70
450	11,00	0,79	79

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 262,16 ml/l

5.2.3. Sušený anaerobně stabilizovaný kal

5.2.3.1. Daphnotoxkit F^{TM}

- délka expozice 24 a 48 hodin
- do každé šachty testovací desky bylo napipetováno 10 ml roztoku vzorku a vloženo 5 jedinců
- test byl proveden jednou ve čtyřech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do každé ze čtyř testovacích šachet testovací desky bylo napipetováno 10 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 5 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Výsledky těchto úvodních testů jsou uvedeny v tabulkách 25a a 25b.

Tab. 25a: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 25b: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	1/20	1/20	5,0	5,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testů: testy obou sérií vodných výluhů byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly testy předběžné

Předběžný test

Do testovací desky byly napipetovány tyto koncentrace vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 20 jedinců (4 šachty). Tímto způsobem testovány vodné výluhy série I a II. Výsledky těchto předběžných testů jsou uvedeny v tabulkách 26a a 26b.

Tab. 26a: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	1/20	1/20	5,0	5,0
50	1/20	1/20	5,0	5,0
100	3/20	3/20	15,0	15,0
200	0/20	3/20	0,0	15,0
500	20/20	20/20	100,0	100,0
700	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 26b: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
50	0/20	0/20	0,0	0,0
100	0/20	0/20	0,0	0,0
200	5/20	6/20	25,0	30,0
500	5/20	6/20	25,0	30,0
700	15/20	15/20	75,0	75,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 197,16 ml/l
48h EC50 = 161,45 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 539,80 ml/l
48h EC50 = 507,28 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro vodný výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 190; 210; 230; 250; 270 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 450; 500; 550; 600; 650 ml/l. Bylo použito 20 jedinců (4 šachty) pro testování každé koncentrace. Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů uvádí tabulky 27a a 27b.

Tab. 27a: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
190	2/20	5/20	10,0	25,0
210	5/20	8/20	25,0	40,0
230	7/20	9/20	35,0	45,0
250	9/20	10/20	45,0	50,0
270	13/20	14/20	65,0	70,0

Tab. 27b: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
450	2/20	2/20	10,0	10,0
500	8/20	8/20	40,0	40,0
550	10/20	12/20	50,0	60,0
600	14/20	14/20	70,0	70,0
650	16/20	17/20	80,0	85,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 250,83 ml/l
48h EC50 = 236,42 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 548,83 ml/l
48h EC50 = 540,21 ml/l

5.2.3.2. Thamnotoxkit F™

- délka expozice 24 hodin
- do každé šachty testovací desky byl napipetován 1 ml roztoku vzorku a vloženo 10 jedinců
- test byl proveden jednou ve třech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do šachet testovací desky byl napipetován 1 ml neředěného vodného výluhu a o do něho přeneseno 10 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Tabulky 28a a 28b uvádí vyhodnocení úvodních testů obou sérií vodných výluhů.

Tab. 28a: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Tab. 28b: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	1/30	3,3
1000	30/30	100,0

Vyhodnocení testů: testy obou sérií vodných výluhů byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly testy předběžné

Předběžný test

Byla připravena koncentrační řada vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Takto byly testovány vodné výluhy série I a II. Vyhodnocení předběžných testů vodných výluhů série I a II jsou uvedena v tabulkách 29a a 29b.

Tab. 29a: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	2/30	6,7
50	5/30	16,7
100	6/30	20,0
200	29/30	96,7
500	30/30	100,0
700	30/30	100,0

Tab. 29b: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
50	0/30	0,0
100	1/30	3,3
200	0/30	0,0
500	23/30	76,7
700	30/30	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 100,62 ml/l

vodný výluh série II: 24h LC50 = 303,54 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro vodný výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 90; 110; 130; 150; 170 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 300; 350; 400; 450; 500 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů jsou uvedeny v tabulkách 30a a 30b.

Tab. 30a: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
90	1/30	3,3
110	1/30	3,3
130	2/30	6,7
150	6/30	20,0
170	30/30	100,0

Tab. 30b: Výpočet mortality (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
300	3/30	10,0
350	17/30	56,7
400	27/30	90,0
450	30/30	100,0
500	30/30	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 139,64 ml/l
vodný výluh série II: 24h LC50 = 343,15 ml/l

5.2.3.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

- délka expozice 72 hodin
- do každé Petriho misky bylo napipetováno 5 ml roztoku vzorku a vloženo 30 semen hořčice bílé
- test byl proveden jednou ve dvou paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny z provedených stanovení a zprůměrovány
- pokud byla inhibice růstu kořene I_i v dané koncentraci menší než nula, jednalo se o stimulaci růstu

Úvodní test

Bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu do třech Petriho misek. Do každé z nich bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Tímto způsobem byly testovány oba vodné výluhy. Vyhodnocení úvodních testů vodných výluhů série I a II jsou uvedena v tabulkách 31a a 31b.

Tab. 31a: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	45,50		
1000	0,00	1,00	100

Tab. 31b: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	30,5		
1000	15,5	0,49	49

Vyhodnocení testů: test vodného výluhu série I byl pozitivní (inhibice $\geq$ 50 %), proto následoval test předběžný
test vodného výluhu série II byl negativní (inhibice $\leq$ 50 %), proto následoval test ověřovací

Předběžný test

Do Petriho misek byly odměřeny tyto koncentrace vodného výluhu série I: 0 (kontrola); 10; 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 60 semen (ve dvou Petriho miskách). Tabulka 32 uvádí vyhodnocení předběžného testu vodného výluhu série I.

Tab. 32: Výpočet inhibice (%) pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	35,80		
10	28,40	0,21	21
50	32,10	0,10	10
100	35,10	0,02	2
200	24,60	0,31	31
500	1,70	0,95	95
700	0,00	1,00	100

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 169,78 ml/l

Ověřovací test

Do šesti Petriho misek bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu série II. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Do každé Petriho misky bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Tabulka 33 uvádí vyhodnocení ověřovacího testu vodného výluhu série II.

Tab. 33: Vyhodnocení ověřovacího testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	32,30		
1000	17,40	0,46	46

Vyhodnocení testu: hodnota 72h IC50 nelze stanovit, vodný výluh nevykazoval ekotoxický efekt

Základní test

Na základě výsledků předběžného testu byla připravena koncentrační řada vodného výluhu série I: 0 (kontrola); 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 ml/l. Pro testování každé koncentrace a pro kontrolu bylo použito 60 semen. Výpočet inhibice pro tento výluh je uveden v tabulce 34.

Tab. 34: Výpočet inhibice (%) pro odvodněný anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	26,00		
150	25,70	0,01	16
200	22,30	0,14	25
250	14,20	0,45	23
300	9,80	0,62	62
350	5,70	0,78	78
400	4,20	0,84	84
450	1,90	0,93	93

Vyhodnocení testu: 72h IC50 = 266,56 ml/l

5.2.4. Primární kal

5.2.4.1. Daphnotoxkit F^{TM}

- délka expozice 24 a 48 hodin
- do každé šachty testovací desky bylo napipetováno 10 ml roztoku vzorku a vloženo 5 jedinců
- test byl proveden jednou ve čtyřech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do každé ze čtyř testovacích šachet testovací desky bylo napipetováno 10 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 5 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Výsledky úvodních testů vodných výluhů série I a II jsou uvedeny v tabulkách 35a a 35b.

Tab. 35a: Vyhodnocení úvodního testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 35b: Vyhodnocení úvodního testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
1000	20/20	20/20	100,0	100,0

Vyhodnocení testů: testy obou sérií vodných výluhů byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly testy předběžné

Předběžný test

Do testovací desky byly odměřeny koncentrace vodných výluhů: 0; 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 20 jedinců. Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Vyhodnocení předběžných testů obou sérií vodných výluhů jsou uvedena v tabulkách 36a a 36b.

Tab. 36a: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
50	17/20	19/20	85,0	95,0
100	17/20	18/20	85,0	90,0
200	19/20	20/20	95,0	100,0
500	20/20	20/20	100,0	100,0
700	20/20	20/20	100,0	100,0

Tab. 36b: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH č. série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
50	1/20	1/20	1,0	1,0
100	2/20	2/20	2,0	2,0
200	4/20	4/20	4,0	4,0
500	14/20	14/20	14,0	14,0
700	16/20	16/20	16,0	16,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 21,75 ml/l
48h EC50 = 5,18 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 311,33 ml/l
48h EC50 = 311,33 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro vodný výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 10; 20; 30; 40; 50 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 300; 350; 400; 450; 500 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 20 jedinců (4 šachty). Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů jsou uvedeny v tabulkách 37a a 37b.

Tab. 37a: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
10	0/20	1/20	0,0	5,0
20	1/20	1/20	5,0	5,0
30	4/20	4/20	20,0	20,0
40	5/20	5/20	25,0	25,0
50	17/20	19/20	85,0	95,0

Tab. 37b: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II				
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**		**% mortality**	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**
0 (kontrola)	0/20	0/20	0,0	0,0
300	2/20	2/20	10,0	10,0
350	3/20	3/20	15,0	15,0
400	5/20	5/20	25,0	25,0
450	12/20	13/20	60,0	65,0
500	16/20	16/20	80,0	80,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I : 24h EC50 = 41,40 ml/l
48h EC50 = 38,17 ml/l

vodný výluh série II: 24h EC50 = 430,26 ml/l
48h EC50 = 426,89 ml/l

5.2.4.2. Thamnotoxkit F™

- délka expozice 24 hodin
- do každé šachty testovací desky byl napipetován 1 ml roztoku vzorku a vloženo 10 jedinců
- test byl proveden jednou ve třech paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny ze všech provedených stanovení a zprůměrovány

Úvodní test

Do šachet testovací desky byl napipetován 1 ml neředěného vodného výluhu a přeneseno 10 jedinců. Stejným způsobem byla nasazena kontrola se standardně sladkou vodou. Takto byly testovány vodné výluhy série I a II. Tabulky 38a a 38b uvádí vyhodnocení úvodních testů obou sérií vodných výluhů.

Tab. 38a: Vyhodnocení úvodního testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Tab. 38b: Vyhodnocení úvodního testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
1000	30/30	100,0

Vyhodnocení testů: testy obou vodných výluhů byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), proto následovaly následovat testy předběžné

Předběžný test

Byla připravena koncentrační řada vodného výluhu: 0 (kontrola); 50; 100; 200; 500; 700 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců. Takto byly testovány vodné výluhy série I a II. Vyhodnocení předběžných testů obou sérií vodných výluhů jsou uvedena v tabulkách 39a a 39b.

Tab. 39a: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
50	3/30	10,0
100	3/30	10,0
200	23/30	76,7
500	30/30	100,0
700	30/30	100,0

Tab. 39b: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	0/30	0,0
50	0/30	0,0
100	1/30	3,3
200	0/30	0,0
500	20/30	66,7
700	30/30	100,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 130,94 ml/l

vodný výluh série II: 24h LC50 = 316,15 ml/l

Základní test

Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrační řady vodných výluhů. Pro vodný výluh série I to byly koncentrace: 0 (kontrola); 90; 120; 150; 180; 210 ml/l. Pro vodný výluh série II to byly tyto koncentrace: 0 (kontrola); 300; 350; 400; 450; 500 ml/l. Pro testování každé koncentrace bylo použito 30 jedinců (3 šachty). Výpočty mortality pro obě série vodných výluhů jsou uvedeny v tabulkách 40a a 40b.

Tab. 40a: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	1/30	3,3
90	1/30	3,3
120	6/30	20,0
150	15/30	50,0
180	30/30	100,0
210	30/30	100,0

Tab. 40b: Výpočet mortality (%) pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II		
koncentrace [ml/l]	**úhyn celkem**	**% mortality**
0 (kontrola)	2/30	6,7
300	1/30	3,3
350	2/30	6,7
400	3/30	10,0
450	14/30	46,7
500	27/30	90,0

Vyhodnocení testů:

vodný výluh série I: 24h LC50 = 129,57 ml/l

vodný výluh série II: 24h LC50 = 422,34 ml/l

5.2.4.3. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

- délka expozice 72 hodin
- do každé Petriho misky bylo napipetováno 5 ml roztoku vzorku a vloženo 30 semen hořčice bílé
- test byl proveden jednou ve dvou paralelních stanovení
- výsledky byly odečteny z provedených stanovení a zprůměrovány
- pokud byla inhibice růstu kořene I_i v dané koncentraci menší než nula, jednalo se o stimulaci růstu

Úvodní test

Bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu do třech Petriho misek. Do každé z nich bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Takto byly testovány vodné výluhy série I a II. Vyhodnocení úvodních testů obou sérií vodných výluhů jsou uvedena v tabulkách 41a a 41b.

Tab. 41a: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	38,3		
1000	25,0	0,35	35

Tab. 41b: Vyhodnocení úvodního testu pro sušený anaerobně stabilizovaný kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	42,00		
1000	37,60	0,10	10

Vyhodnocení testů: testy obou vodných výluhů byly negativní (inhibice $\leq$ 50 %), proto následovaly testy ověřovací

Ověřovací test

Do šesti Petriho misek bylo napipetováno 5 ml neředěného vodného výluhu. Do každé z nich bylo nasazeno 30 semen *Sinapis alba*. Stejným způsobem byla připravena kontrola s ředicí vodou. Takto byly testovány obě série vodných výluhů. Tabulky 42a a 42b uvádí vyhodnocení ověřovacích testů vodných výluhů série I a II.

Tab. 42a: Vyhodnocení ověřovacího testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série I			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	42,30		
1000	29,30	0,31	31

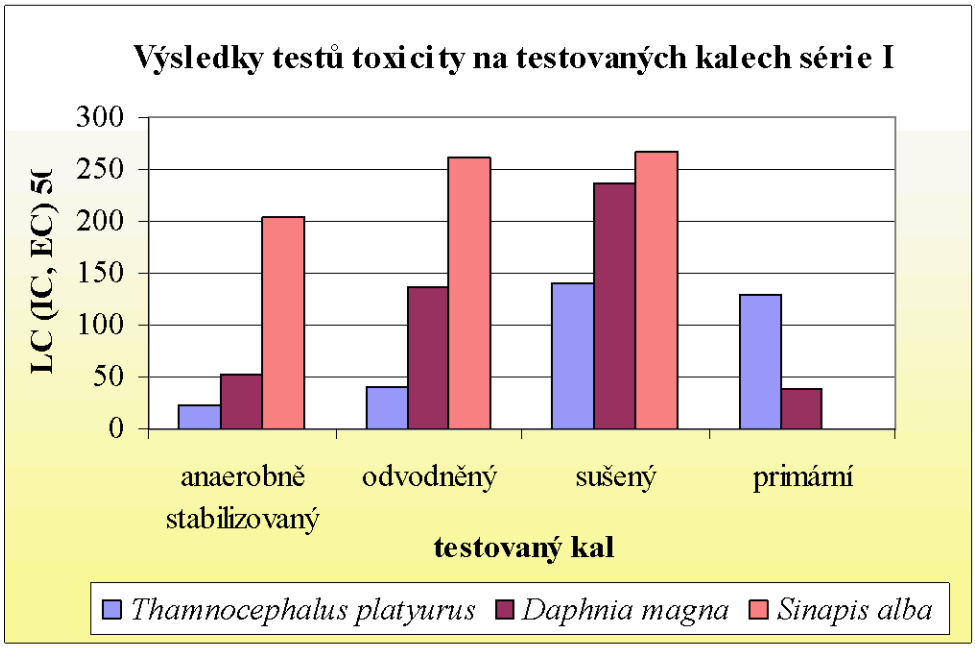
Tab. 42b: Vyhodnocení ověřovacího testu pro primární kal

VODNÝ VÝLUH série II			
koncentrace [ml/l]	***L* – průměrná délka kořene [mm]**	**I_i inhibice**	**I_i [%]**
0 (kontrola)	41,80		
1000	38,10	0,09	9

Vyhodnocení testů: hodnota 72h IC50 nelze stanovit, vodné výluhy nevykazovaly ekotoxický efekt

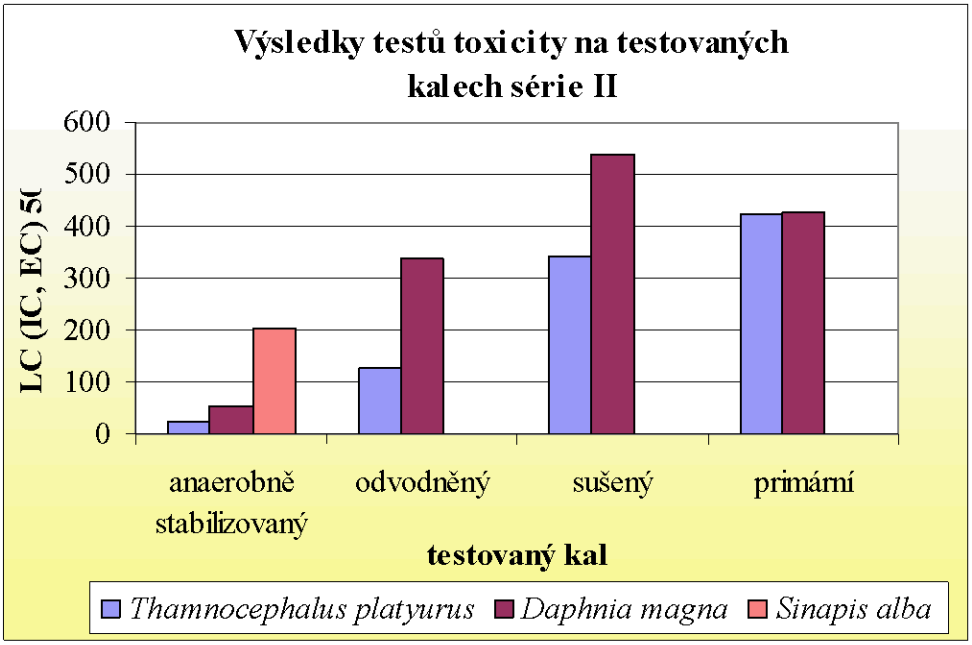
5.2.5. Vodné výluhy série I a II

Na vodných výluzích kalů sérií I a II bylo provedeno posouzení citlivosti a vhodnosti použití vybraných testů toxicity pro hodnocení jejich ekotoxicity; v našem případě byly posuzovány dva alternativní testy toxicity Thamnotoxkit F^{TM} a Daphnotoxkit F^{TM} a standardní test na hořčici bílé *Sinapis alba*. Pro názornost byly sestrojeny grafy 3 a 4, na jejichž podkladě bylo posouzení citlivosti a vhodnosti testů provedeno.



Graf 3: Porovnání citlivosti testovacích organismů prostřednictvím hodnot LC, IC, EC50 u vodných výluhů kalů série I

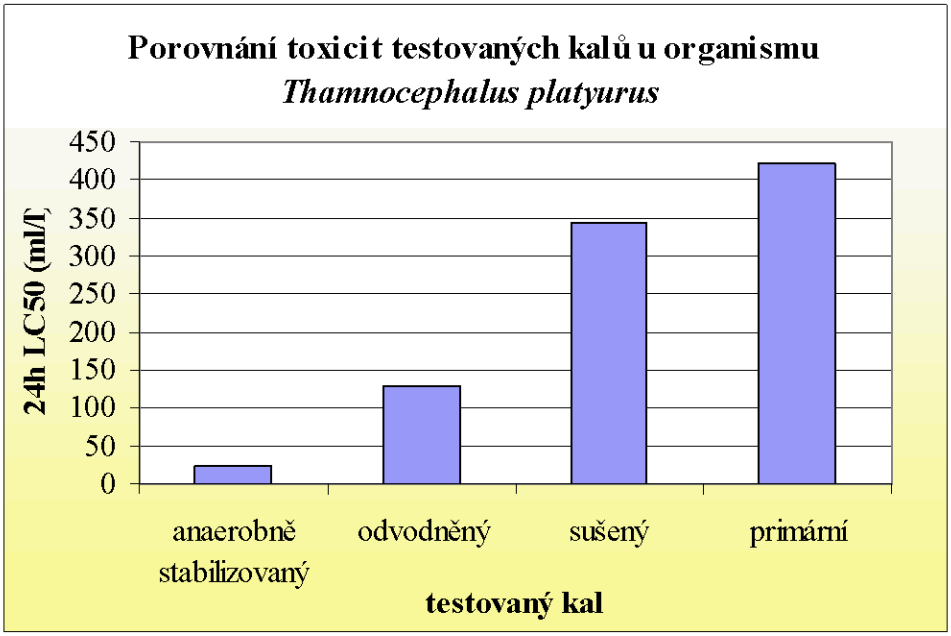
V grafu 3 a 4 jsou znázorněny výsledky testů toxicity pro všechny typy testovaných kalů sérií I a II, které byly testovány prostřednictvím všech výše uvedených specifických testů. Z grafů je zřejmé, že téměř ve všech případech byl nejvíce citlivým organismem korýš *Thamnocephalus platyurus*. V porovnání s testy na aquatických organismech je test inhibice růstu kořene *Sinapis alba* nejméně citlivým. V grafech není pro všechny typy testovaných kalů uvedena vypočtená hodnota 72h IC50 v testu na hořčici bílé, protože v těchto případech kaly nevykazovaly žádný ekotoxický efekt.



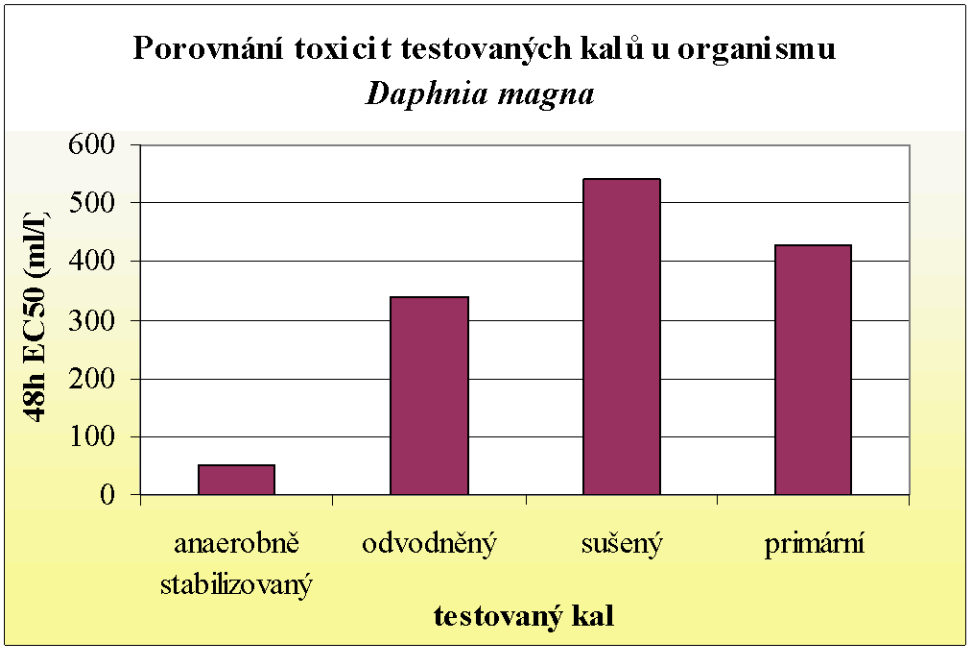
Graf 4: Porovnání citlivosti testovacích organismů prostřednictvím hodnot LC, IC, EC50 u vodných výluhů kalů série II

Aby mohly být mezi sebou jednotlivé posuzované kaly porovnány z hlediska ekotoxicity, byly naředěny na hustotu kalu s nejmenším podílem sušiny (série II). Porovnání hodnot 24h LC50 stanovených prostřednictvím testu Thamnotoxkit F^{TM} pro jednotlivé posuzované kaly je znázorněno v grafu 5. Z tohoto grafu je zřejmé, že nejvyšší toxicitu vykazoval anaerobně stabilizovaný kal z ČOV Modřice, dále odvodněný kal z ČOV Modřice, sušený kal ze stejné čistírny a nejmenší ekotoxicitu vykazoval primární kal z ČOV VFU Brno.

V grafu 6 je presentováno porovnání stanovených hodnot 48h EC50 pro kaly testované prostřednictvím testu Daphnotoxkit F^{TM}. Z grafu je vyplývá, že nejvíce toxický je anaerobně stabilizovaný kal z ČOV Modřice a nejméně toxický byl sušený kal ze stejné čistírny odpadních vod.



Graf 5: Porovnání hodnot 24h LC50 testovaných kalů série II na organismu Thamnocephalus platyurus



Graf 6: Porovnání hodnot 48h EC50 testovaných kalů série II na organismu Daphnia magna

Graf, který by znázorňoval porovnání hodnot 72hIC50 stanovených pro testované kaly na *Sinapis alba*, nemohl být sestrojen, protože v tomto případě nevykazovaly ekotoxický efekt tři ze čtyř posuzovaných kalů.

6. DISKUZE VÝSLEDKŮ

Pro ekotoxikologické hodnocení kalů z čistíren odpadních vod byly použity vzorky kalů odebrané z velkokapacitní komunální Čistírny odpadních vod v Modřicích (ČOV Modřice), která využívá technologii anaerobní stabilizace kalu a Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (ČOV VFU Brno), která kal stabilizuje pouze tepelnou sterilizací. Z ČOV Modřice byly k ekotoxikologickému testování vybrány anaerobně stabilizovaný kal, odvodněný anaerobně stabilizovaný kal a sušený anaerobně stabilizovaný kal. Z ČOV VFU Brno byl použit primární kal.

Ze všech odebraných kalů byly dvěma různými způsoby připraveny vodné výluhy. První série vodných výluhů; označená vodné výluhy série I, byla připravena standardním postupem podle Metodického pokynu k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů [25]. Druhá série vodných výluhů, označená vodné výluhy série II, byla připravena naředěním na hustotu kalu s nejmenším podílem sušiny tak, aby mohly být mezi sebou porovnány tyto kaly z hlediska jejich posuzované vlastnosti ekotoxicita.

Aby mohla být stanovena skutečná ekotoxicita kalu, bylo nutné testovat vzorky co nejrychleji po odběru a eliminovat tak biodegrabilitu přítomných toxických látek v kalu. Protože testy nebylo možné nasadit v jeden den, byl vzorek výluhu uchováván v chladu a temnu ve skleněné nádobě, při teplotě 4 °C.

K ekotoxikologickému hodnocení kalů byly použity dva alternativní testy; Thamnotoxkit F^{TM} a Daphnotoxkit F^{TM} a jeden test standardní, kterým byl test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba)*. Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou, která je pro příslušné stanovení zpracována. Ověření správnosti postupů a kvality semen a také citlivosti organismů bylo provedeno pomocí standardních testů toxicity se standardní látkou dichromanem draselným ($K_2Cr_2O_7$). Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 dichromanu draselného byly ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard, a proto bylo možné ověřené postupy a organismy použít při hodnocení kalů.

Nejcitlivěji reagujícím testovacím organismem byl korýš *Thamnocephalus platyurus*; perloočka *Daphnia magna* se jevila ve srovnání s tímto organismem méně citlivá. U testu na *Sinapis alba* došlo v několika případech ke stimulaci růstu a některé výluhy kalů ekotoxický efekt nevykazovaly ani v případě neředěného výluhu odpadu. *Sinapis alba* nejméně reaguje v porovnání s testy na aquatických organismech, na přítomnost testované látky, v našem případě výluhu z kalů. Pravděpodobně je to způsobeno minerálními látkami a stopovými prvky přítomnými v kalu, které vedou ke stimulaci růstu kořene *Sinapis alba*.

Vodné výluhy kalů připravené standardním způsobem podle Metodického pokynu k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů a na základě Vyhlášky č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady ve znění Vyhlášky č. 41/2005 Sb. byly zařazeny do tříd vyluhovatelnosti:

- **Anaerobně stabilizovaný kal** byl zařazen do třídy vyluhovatelnosti **III**. Pro nejcitlivěji reagující organismus *Thamnocephalus platyurus* byla hodnota 24h EC50 = 22,81 ml/l.
- **Odvodněný anaerobně stabilizovaný kal** byl zařazen do třídy vyluhovatelnosti **III**. Pro nejcitlivěji reagující organismus *Thamnocephalus platyurus* byla hodnota 24h EC50 = 39,57 ml/l.
- **Sušený anaerobně stabilizovaný kal** byl zařazen do třídy vyluhovatelnosti **II**. Pro nejcitlivěji reagující organismus *Thamnocephalus platyurus* byla hodnota 24h EC50 = 139,64 ml/l.

- **Primární kal** byl zařazen do třídy vyluhovatelnosti **III**. Pro nejcitlivěji reagující organismus *Daphnia magna* byla hodnota 48h LC50 = 38,17 ml/l. [25, 35]

Ani u jednoho z testovaných kalů nebyla prokázána nebezpečná vlastnost ekotoxicita. Podle definice uvedené ve Vyhlášce č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, mají odpady nebezpečnou vlastnost H14 Ekotoxicita, jestliže jejich vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení na testovací organismus hodnoty LC50, EC50, IC50 ≤ 10 ml/l. [21]

Na základě zařazení kalů do tříd vyluhovatelnosti můžeme podle Vyhlášky č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady uložit hodnocené kaly na určitý typ skládky [35]. Na podkladě námi získaných výsledků můžeme anaerobně stabilizovaný kal, odvodněný anaerobně stabilizovaný kal a primární kal sládkovat na řízené skládce skupiny S – ostatní odpad, která je určená pro odpady, jejichž vodný výluh nepřekračuje limitní hodnoty výluhové třídy číslo III. Skládky této skupiny se označují S-OO. Sušený anaerobně stabilizovaný kal lze uložit na skládku skupiny S – inertní odpad, která je určená pro odpady, jejichž vodný výluh nepřekračuje limitní hodnoty výluhové třídy číslo II. Tato skupina skládek má označení S-IO.

Proces skládkování však přináší svá rizika, mezi které patří zejména postupně uvolňované skládkové plyny, které mohou zatěžovat okolí skládek, dále emise methanu nebo neúčelné zaplňování skládek.

Protože žádný z testovaných kalů nevykázal nebezpečnou vlastnost ekotoxicitu, je předpoklad, že aplikace kalů do půdy prováděná v souladu s dobrou zemědělskou praxí, by neměla představovat žádné nebezpečí pro životní prostředí.

Vodné výluhy série II byly ředěny na výluhy se stejným podílem sušiny, a to za účelem vzájemného porovnání z hlediska toxicity. Nejvíce toxický byl anaerobně stabilizovaný kal, který vykazoval hodnotu 24h EC50 22,81 ml/l, dále pak odvodněný kal, jehož hodnota 24h EC50 činila 128,02 ml/l, u sušeného kalu pak byla stanovena hodnota 24h EC50 na 343,15 ml/l a nejméně toxický byl kal primární, kde hodnota 24h EC50 činila 422,34 ml/l. Odvodněný kal je méně toxičtější než kal anaerobně stabilizovaný pravděpodobně proto, že odstředěním se z kalu odstraní kalová voda, která může obsahovat některé látky odpovědné za ekotoxicitu, např. amoniakální dusík. Při sušení naopak může docházet k chemické destrukci organických látek teplem a kal se tak stává méně toxickým.

Všechny provedené testy prokázaly citlivost vybraných organismů k polutantům obsaženým v čistírenských kalech a jsou tedy velmi vhodným nástrojem k hodnocení kalů. Funkčnost těchto testů jako doplňkového zdroje informací byla potvrzena. Jak již bylo uvedeno, musí být kaly podle Vyhlášky č. 382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě pravidelně podrobovány chemické analýze [41]. Vzhledem k lepšímu odhadu případného rizika využití kalů z čistíren odpadních vod aplikací na zemědělskou půdu, by bylo vhodné každou chemickou analýzu doplnit o ekotoxikologické testování.

7. ZÁVĚR

Úkolem diplomové práce bylo ekotoxikologické hodnocení kalů z různých čistíren odpadních vod. Pro tyto účely byly použity vzorky kalů z Čistírny odpadních vod v Modřicích a z Čistírny odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

- K ekotoxikologickému hodnocení vybraných kalů byl použit jeden test fytotoxicity a dva alternativní testy toxicity. Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou. Za účelem prověření korektnosti provedené testovací procedury a citlivosti testovaných organizmů byly provedeny referenční testy. Standardní testovanou látkou pro kontrolu kvality byl dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$. Všechny stanovené hodnoty 24h EC50 a 72h IC50 u použitých testů toxicity byly ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.
- Z alternativních testů byly v diplomové práci použity testy toxicity na aquatických organismech; Thamnotoxkit F^{TM} a Daphnotoxkit F^{TM}. Jako standardní test byl použit test fytotoxicity; test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*
- Porovnáním citlivosti použitých alternativních testů lze učinit závěr, že citlivějším testem byl test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.
- Test fytotoxicity na *Sinapis alba* byl při posuzování vlastnosti ekotoxicita u testovaných kalů nejméně citlivým ze všech vybraných testů.
- Na základě výsledků testů ekotoxicity byly čtyři vybrané kaly z čistíren odpadních vod zařazeny do tříd vyluhovatelnosti podle Vyhlášky č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění Vyhlášky č. 41/2005 Sb. Anaerobně stabilizovaný kal, odvodněný anaerobně stabilizovaný kal a primární kal byly zařazeny do třídy vyluhovalnosti III, sušený anaerobně stabilizovaný kal byl zařazen do třídy vyluhovalnosti II.
- Nebezpečná vlastnost ekotoxicita H14 byla testována podle Vyhlášky č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Tato vlastnost nebyla prokázána u žádného z testovaných kalů.

8. LITERATURA

[1] HANČ, A., TLUSTOŠ, P., SZÁKOVÁ, J., BALÍK, J.: Změna pohyblivosti kadmia a zinku v čistírenských kalech po jejich úpravě, *Chemické listy 101*, s. 807-810.

[2] HRNČÍŘOVÁ, J: Aplikace kalů z ČOV na zemědělskou půdu s ohledem zejména na obsah težkých kovů v kalech. *The Waste* [online]. 2004 [cit. 2007-12-30]. Dostupné z www: http://www.waste.cz/pdf/05-04/Aplikace_kalu.pdf

[3] HARTMAN, M., POHOŘELÝ, M., TRNKA, O.: Chemická a palivová charakteristika anaerobně stabilizovaného čistírenského kalu a jeho popela. *Chemické listy 100*, s. 813-820.

[4] KUTIL, J., DOHÁNYOS, M.: Efektivní využití a likvidace čistírenských kalů. *Biom.cz* [online]. 2005-01-05 [cit. 2007-10-17]. Dostupné z www: http://biom.cz/index.shtml?x=215789. ISSN 1801-2655.

[5] KOČÍ, V.: Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí, *Chemické listy 100*, 2006, s. 882-888.

[6] HOFFMANN D.J., RATTNER B.A., BURTON G.A., CAIRNS J.: *Handbook of ecotoxicology*. 2nd edition, Lewis Publisher 2003, 1290 p., ISBN 1-56670-546-0.

[7] BAZERMAN, CH., DE LOS SANTOS R.A.: Measuring Incommensurability: Are toxicology and ecotoxicology blind to what the other sees? *Rhetoric and incommensurabilit*. Ed. Randy Harris. Albany NY: SUNY Press, pp. 424-463.

[8] KOCI, V.: Ekotoxikologie – nauka o účincích toxických látek na životní prostředí, *Sborník přednášek podzimní školy Astra* [online]. Praha 2003 [cit. 2007-10-24]. Dostupné z www: http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2003.pdf

[9] MALTBY, L., NAYLOR, C.: Preliminary Observations on the Ecological Relevance of the Gammarus ´Scope for Growth' Assay: Effect of Zinc on Reproduction – Functional Ecology, vol. 4, no. 3, New Horizons in Ecotoxicology 1990, pp. 393-397.

[10] RAND, G.M., PETROCELLI, S.R.: *Fundamentals of aquatic toxikology*. Tailor & Francis, Washington D.C. 1995, 1125 p., ISBN 1560320915.

[11] RUSEK, V.: *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti v chemické laboratoři* [online]. Univerzita Pardubice, Pardubice 2001 [cit. 2007-11-10]. Dostupné z www: http://webak.upce.cz/~uozp/skripta/uozp-skripta-tox-rusek.pdf

[12] Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. *Věstník MŽP*, ročník. XVII, částka 4, duben 2007.

[13] MARŠÁLEK, B.: *Mikrobiotesty* [online]. Botanický ústav AV ČR, Brno [cit. 2007-10-31]. Dostupné z www: http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf

[14] PROKEŠ, J.: *Základy toxikologie – Obecná toxikologie a ekotoxikologie*, Galén, Univerzita Karlova v Praze, 1.vyd., Praha 2005, 248 s., ISBN 80-7262-301-X.

[15] ŘÍHOVÁ-AMBROŽOVÁ, J.: *Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník* [online]. VŠCHT Praha, Praha 2007 [cit. 2007-10-28]. Dostupné z www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=E000

[16] BARILE, FRANK A.: *Principles of toxicology testing*. Taylor & Francis Group 2007, 312 p., ISBN 0-8493-9025-7.

[17] HODGSON, E., *A Textbook of Modern Toxikology*, 3rd. Edition, John Wiley & Sons, New Jersey 2004, 557 p., ISBN 0-471-26508-X.

[18] AMBROŽOVÁ, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd., VŠCHT Praha, Praha 2003, 198 s., ISBN 80-7080-521-8.

[19] MARŠÁLEK, B.: *Alternativní testy toxicity* [online]. Botanický ústav AV ČR, Brno [cit. 2007-10-31]. Dostupné z www: http://recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf

[20] SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J.: *Ekotoxikologie – praktická cvičení část I.*, VFU Brno, 1. vyd., Brno 2000, 72 s., ISBN 80-85114-95-X.

[21] Vyhláška MŽP a MZd č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů

[22] *Toxkit microbiotests* [online]. 2006 [cit. 2007-11-3]. Dostupné z www: http://www.microbiotests.be

[23] *Poecilia reticulata* [online]. 2007 [cit. 2008-3-11]. Dostupné z www: http://www.biolib.cz/cz/taxon/id15976/

[24] *Brachydanio rerio* [online]. 2006 [cit. 2008-3-11]. Dostupné z www: http://www.pecesymas.com/peces/agua_dulce/nombre_comun_mar.htm

[25] Metodický pokyn odboru odpadů Ministerstva životního prostředí k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. *Věstník MŽP*, ročník. XII, částka 12, prosinec 2002

[26] *Sinapis alba* [online]. [cit. 2008-3-11]. Dostupné z www: http://www.maltawildplants.com/CRUC/Pics/SNPAL/SNPAL-Sinapis_alba_t.jpg

[27] *Daphnia magna* [online]. 2006 [cit. 2008-3-11]. Dostupné z www: http://www.ufz.de/data/11225.png

[28] ROJÍČKOVÁ, R., MARŠÁLEK, B.: Hodnocení alternativních testů toxicity. *Sborník Toxicita a biodegrabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*, 1. vyd., JČU, Výzkumný ústav vodohospodářský a hydrobiologický, Vodňany 1997, s. 65-77.

[29] VÁVROVÁ, M.: *Testy toxicity*. Přednášky z ekotoxikologie, FCH VUT Brno, Brno 2007

[30] *Daphnotoxkit F™ Magna*, screeningový test toxicity na korýších pro sladkou vodu, standardní operační manuál

[31] Rotoxkit F™ [online]. 2006 [cit. 2008-2-25]. Dostupné z www: http://www.microbiotests.be/product.htm

[32] Algaltoxkit F™ – Bench protocol [online]. 2006 [cit. 2008-2-25]. Dostupné z www: http://www.microbiotests.be/toxkits/AlgaltoxkitFstp.pdf

[33] *Artemia salina* [online]. [cit. 2008-3-11]. Dostupné z www: http://seplessons.ucsf.edu/files/Artemia%20salina.jpg

[34] JOHNSON, B.: Microtox® Acute Toxicity Test, *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*,Part 2, Springer Netherlands 2005, pp. 69-105, ISBN 978-1-4020-3119-9

[35] Vyhláška MZP č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění Vyhlášky č. 41/2005 Sb.

[36] ČSN ISO 5667 – 10: Jakost vod – Odběr vzorků – Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod

[37] ČSN ISO 5667 – 13: Jakost vod – Odběr vzorků – Část 13: Pokyny pro odběr vzorků kalů z čistíren a úpraven vod.

[38] KIZLINK, J.: *Nakládání s odpady*. 1. vyd., FCH VUT Brno, Brno 2007, 284 s., ISBN 978-80-214-3348-9.

[39] Zákon č.185/2001 Sb. o odpadech a o změně některých dalších zákonů

[40] POKORNÁ, T.: Základní vlastnosti kalu. *The Waste* [online]. 2004 [cit. 2007-10-16]. Dostupné z www: http://www.waste.cz/waste.php?clanek=05-04/vlastnosti_kalu.htm

[41] Vyhláška MŽP č.382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě

[42] KUBÍK, V.: *Efekty organicky bohatých substrátů na půdní biotu*. Brno, Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, 2006. 148 s., Vedoucí diplomové práce RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

[43] *Příručka pro čištění a úpravu vody.*: KEMIFLOC, a.s., Dolejš P., Přerov 1996. 133 s.

[44] RUELKES, W. Sewage Sludge as a Biomass Resource for the Production of Energy: Overview and Assessment of the Various Options. *Energy & Fuels*, [online]. Vol. 22, No. 1, 2008 [cit. 2008-2-26]. Dostupné z www: http://pubs.acs.org/cgi-bin/sample.cgi/enfuem/2008/22/i01/pdf/ef700267m.pdf

[45] DOHÁNYOS, M.: Efektivní využití a likvidace čistírenských kalů. *Biom.cz* [online]. 2006-05-09 [cit. 2007-10-20]. Dostupné z www: http://biom.cz/index.shtml?x=1888405. ISSN 1801-2655.

[46] European Commission Regulary Report (2001): Disposal and recycling routes for sewage sludge, part 3. European Commission DG Environment, 131 p. [cit. 2008-2-26]. ISBN 92-894-1800-1. Dostupné z www: http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_disposal3.pdf

[47] HLAVÍNEK, P., NOVOTNÝ, D.: *Intenzifikace čistíren odpadních vod*. NOEL 2000 s.r.o., Brno, 235 s.

[48] Sludge Disintegration Techniques, STOWA 2006, [cit. 2008-2-27]. Dostupné z www: http://www.stowa-selectedtechnologies.nl/Sheets/Sheets/Sludge.Disintegration. Techniques.html

[49] DOHÁNYOS, M.: *Kalové hospodářství čistíren odpadních vod*. VSCHT Praha, Praha 2007-10-02 [cit. 2007-10-22]. Dostupné z www: http://web.vscht.cz/starad/html/COV_Skripta_Kal_hosp.doc

[50] NOYES, R.: *Unit Operations in Environmental Engineering*. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey 1994, 498 s., ISBN 0-8155-1343-7.

[51] BEDNAŘÍK, V., VONDRUŠKA, M: Čistírenské kaly – extenzivní odpadová komodita. *The Waste* [online]. 2004 [cit. 2007-10-17]. Dostupné z www: http://www.waste.cz/pdf/05-04/Extenzivni_komidita.pdf

[52] Ing. Marie Michalová, osobní sdělení, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i., Centrum pro hospodaření s odpady, 13. 11. 2007.

[53] DOHÁNYOS, M.: Kalové *hospodářství čistíren odpadních vod*. VSCHT Praha, Praha 2007-10-02 [cit. 2007-10-22]. Dostupné z www: http://web.vscht.cz/starad/html/Kalov-C3-A9_hospod[1]._1a.ppt

[54] Jaroslav Ryšavý, osobní sdělení, Čistírna odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 17. 4. 2008.

[55] Brněnské vodárny a kanalizace, a.s. – Čistírna odpadních vod v Modřicích [online]. 2005 [cit. 2008-4-3]. Dostupné z www: http://www.bvk.cz/page.jsp?lang=cz&firstLevel=29&secondLevel=43&thirdLevel=45

[56] *Thamnotoxkit F*^{TM} – standardní operační manuál

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- **LC50** – koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku
- **EC50** – koncentrace, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů *(Daphnia magna)*
- **IC50** – koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50procentní inhibici růstu kořene *Sinapis alba* ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
- **NOAEL** – No Observed Adverse Effect Level (nejvyšší hodnota dávky (koncentrace) bez pozorovaného nepříznivého účinku)
- **LOAEL** – Lowest Observed Adverse Effect Level (nejnižší dávka nebo koncentrace spojená s pozorovaným nepříznivým účinkem)
- **ASLAB** – laboratoř při výzkuném ústavu vodohospodářském TGM v Praze
- **SLP** – systém správné laboratorní praxe (Good Laboratory Practise - GLP)
- **TU** – toxikologická jednotka
- **ISO** – International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro Normalizaci)
- **OECD** – Organization for Economic Cooperation od Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
- **ASTM** – American Society For Testing And Materials (Americká společnost pro testování a materiály)
- **Inhibice růstu kořene** – zkrácení průměrné délky kořene hořčice bílé v testovaném vzorku ve srovnání s kontrolou
- **Inhibice růstu řas** – snížení růstu řas na základě zjištěné hustoty řasové kultury ve srovnání s kontrolou
- **Stimulace růstu kořene** – prodloužení průměrné délky kořene hořčice bílé v testovaném vzorku ve srovnání s kontrolou
- **Stimulace růstu řas** – zvýšení růstu řas na základě zjištěné hustoty řasové kultury ve srovnání s kontrolou
- **Inokulum** – množství buněk vložených do testovacích baněk na začátku testu, vyjádřené jako hustota řasové kultury na počátku testu (počet buněk v 1 ml)
- **72h IC50** – koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene hořčice bílé ve srovnání s kontrolou v časovém úseku 72 ± 2 hodin
- **24h EC50** – koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 24 ± 2 hodin
- **48h EC50** – koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 48 ± 2 hodin
- **24h LC50** – koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v časovém úseku 24 ± 2 hodin
- **ISOH** – Informační systém o odpadech
- **PCBs** – polychlorované bifenyly
- **PAHs** – polycyklické aromatické uhlovodíky
- **AOX** – absorbovatelné organicky vázané halogeny
- **ČOV** – čistírna odpadních vod

10. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1:

Tabulka převedení úmrtnostních dat v procentech na probity

Příloha č. 2:

Blokové schéma Čistírny odpadních vod v Modřicích

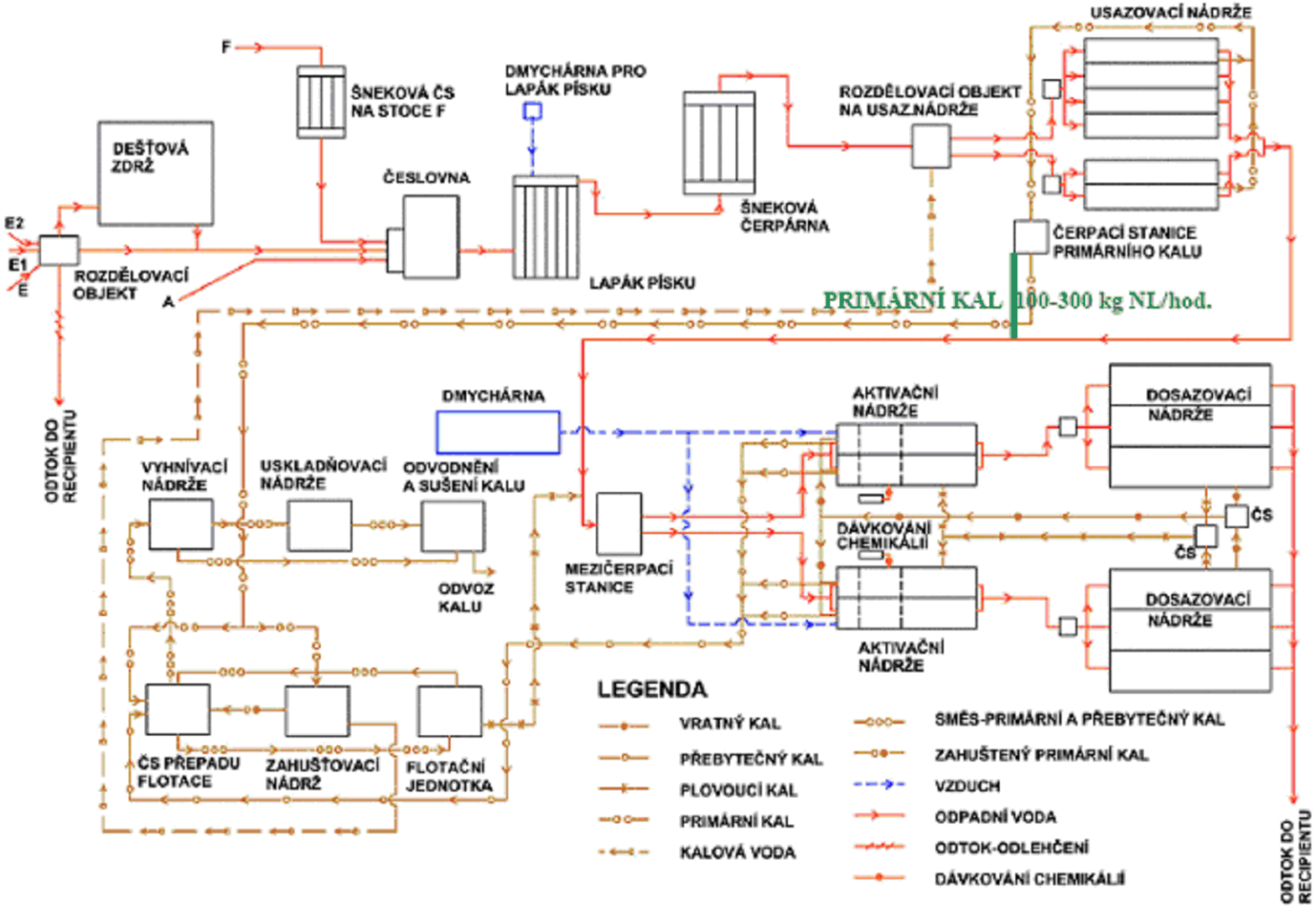
11. PŘÍLOHY

Příloha č. 1:

Tabulka převedení úmrtnostních dat v procentech na probity [19]

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,585
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

Příloha č. 2:



Blokové schéma ČOV Modřice [53]