

# Testování ekotoxicity solidifikovaného odpadu

Tereza Camfrlová

---

Bakalářská práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Camfrlová**  
Osobní číslo: **T14368**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Testování ekotoxicity solidifikovaného odpadu**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši o metodách testování ekotoxicity odpadů.
2. Provedte testy ekotoxicity u vybraného odpadu a produktů jeho solidifikace.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a přehledně písemně zpracujte.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**METODICKÝ POKYN MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů.**

**OECD – Series on Testing and Assessment: Ecotoxicity Testing.**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE  
VÝROBKOVÝ ÚSTAV UMĚLECKÉHO DÍLA UMELECKÉHO VÝKONU

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Vratislav Bednařík, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**3. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**18. května 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ..... 5.5.2014 .....

..... Camfrlová Tereza .....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávající zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá testováním ekotoxicity solidifikovaného odpadu. Solidifikace byla provedena pomocí cementu, asfaltu a silikonů. Následně byly získány výluhy ze solidifikovaných těles pomocí vyluhovacího testu. U výluhů byla poté stanovena ekotoxicita. Jako testovací organismy byly vybrány *Sinapis alba*, *Vibrio fischeri* a *Artemia salina*.

Klíčová slova:

ekotoxikologické testy, nebezpečný odpad, solidifikace, *Vibrio fischeri*, *Sinapis alba*

## **ABSTRACT**

This thesis deals with testing of ecotoxicity of solidified waste. Solidification was performed using cement, asphalt and silicones. Subsequently, leachates from solidified waste using leaching test were obtained and the values of ecotoxicity were determined. *Sinapis alba*, *Vibrio fischeri* and *Artemia salina* were selected as the test organisms.

Keywords:

ecotoxicological tests, hazardous waste, solidification, *Vibrio fischeri*, *Sinapis alba*

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Vratislavu Bednaříkovi, Ph.D. za odborné konzultace, ochotu a cenné rady. Děkuji také svým rodičům a nejbližším za velkou podporu a pochopení po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY</b> .....	<b>12</b>
1.1 VÝZNAM EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ.....	12
1.2 EKOTOXIKOLOGICKÉ INDEXY .....	13
1.3 ROZDĚLENÍ EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ .....	14
1.4 METODIKA EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ.....	15
1.4.1 Postup stanovení ekotoxicity odpadů.....	16
1.4.2 Postupový diagram testů ekotoxicity .....	17
1.5 METODIKA EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ.....	18
1.5.1 Akutní imobilizační test na hrotnatce velké ( <i>Daphnia magna</i> ) .....	18
1.5.2 Test na zelené řase <i>Chlorella vulgaris</i> .....	18
1.5.3 Test na sladkovodních řasách <i>Desmodesmus subspicatus</i> a <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	19
1.5.4 Test akutní toxicity na rybách .....	19
1.5.5 Test na žábřonozce solné ( <i>Artemia salina</i> ) .....	20
1.5.6 Kinetické hodnocení inhibice růstu denitrifikační bakterie <i>Paracoccus denitrificans</i> .....	20
1.5.7 Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test).....	21
1.5.8 Testy fytotoxicity .....	22
1.5.8.1 Test na semenech hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ).....	22
1.5.8.2 Test inhibice růstu okřehku menšího ( <i>Lemna minor</i> ).....	23
1.5.8.3 Test inhibice růstu kořene cibule ( <i>Allium cepa</i> ) .....	23
1.6 VYUŽITÍ TESTŮ EKOTOXICITY PRO STABILIZOVANÝ/SOLIDIFIKOVANÝ ODPAD.....	23
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
2.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	31
2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY .....	31
2.2.1 Testovaný odpad .....	32
2.3 PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍCH TĚLES SOLIDIFIKOVANÉHO ODPADU.....	32
2.3.1 Solidifikace pomocí cementu.....	32
2.3.2 Solidifikace pomocí silikonu.....	33
2.3.3 Solidifikace pomocí asfaltu.....	33
2.4 PŘÍPRAVA VODNÝCH VÝLUHŮ SOLIDIFIKOVANÉHO ODPADU .....	33
2.5 VYBRANÉ EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY .....	33
2.5.1 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ).....	33
2.5.1.1 Příprava ředící vody.....	34
2.5.1.2 Příprava standardu .....	34
2.5.1.3 Úprava vodného výluhu odpadu .....	34
2.5.1.4 Test klíčivosti a růstu kořene hořčice bílé na standardu.....	34
2.5.1.5 Test klíčivosti a růstu kořene hořčice bílé s vodnými výluhy solidifikovaného odpadu.....	35
2.5.2 Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test).....	35
2.5.2.1 Provedení testu s bakteriemi <i>Vibrio fischeri</i> .....	35



2.5.3	Test ekotoxicity na žábřonožce solné ( <i>Artemia salina</i> ) .....	37
2.6	VYHODNOCENÍ TESTŮ .....	38
2.6.1	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ).....	38
2.6.2	Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test).....	39
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
3.1	VÝSLEDKY TESTU INHIBICE RŮSTU KOŘENE HOŘČICE BÍLÉ (SINAPIS ALBA) .....	41
3.2	VÝSLEDKY BAKTERIÁLNÍHO BIOLUMINISCENČNÍHO TESTU EKOTOXICITY .....	43
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>46</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>52</b>

## ÚVOD

Pojem ekotoxikologie poprvé popsal vědec René Truhaut v roce 1969 [1]. Definoval ji jako část toxikologie, která se zabývá toxickými účinky vyvolanými přírodními nebo syntetickými polutanty na jednotlivé složky ekosystému, živočichy, rostliny a mikroorganismy v jedné souvislosti [2]. Ekotoxicita je vlastnost představující akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Využívá se k hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadu [3]. Toxické látky se mohou běžně vyskytovat v životním prostředí. Ke kontaminaci dochází z různých odvětví průmyslu, ale i z domácností [4].

K řešení problémů znečišťování životního prostředí různými toxickými látkami vedly především havárie a epidemické otravy [2]. První environmentální problémy, které vznikly, byly velmi akutní a viditelné [5]. Například v 50. letech 20. století došlo v Japonském zálivu Minamata k otravě vody methylrtutí, což mělo za následek smrt, tělesné deformace a nervové poruchy u zvířat i lidí [2]. V dnešní době znečištění zahrnuje různé směsi chemických látek, které se dostávají do všech složek prostředí. Účinek takových látek se netýká pouze mortality, látky mohou působit i karcinogenně, mutagenně nebo mohou mít negativní vliv na reprodukci [5]. Velké množství toxických látek se dostává do vod prostřednictvím odpadů, ale také vody z čistíren odpadních vod mohou být zdrojem polutantů [2].

Solidifikace je jeden ze způsobů jak lze fyzikálně a chemicky upravit odpad. Díky této metodě je možné odstranit širokou škálu nebezpečných odpadů [6]. Účelem solidifikační metody je zamezit nebo zpomalit uvolňování nebezpečných složek odpadu do prostředí. Toho lze dosáhnout například zmenšením povrchu odpadu, zabudováním odpadu do struktury vhodného pojiva, nebo vytvořením látkově stabilní strukturální vazby [7].

Nebezpečný odpad je takový, který vykazuje alespoň jednu z nebezpečných vlastností odpadů a je uveden v Katalogu odpadů jako nebezpečný [8]. Takový to odpad by mohl mít nepříznivý vliv na životní prostředí a na lidské zdraví. Jsou u něj také zvýšené požadavky pro nakládání s odpady [9]. Ekotoxikologické testy slouží ke zjištění toxických účinků na živé organismy a životní prostředí [10]. Hodnotí se tak rizika, která mohou toxické látky v prostředí způsobit [11].

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY

Ekotoxikologické testy se běžně označují jako biotesty. Tento pojem pochází z anglického „bioassay“, což znamená zkouška využívající biologický systém [5].

Tyto testy jsou důležitým nástrojem ekotoxikologické práce, slouží ke zjištění toxických účinků na živé organismy a životní prostředí [10]. Při biotestech se vystaví organismy účinkům testované látky a stanovuje se odpověď organismu. Princip biotestu je kontakt testované látky s detekčním systémem za definovaných a kontrolovatelných podmínek [5].

Od 60. let 20. století byly vyvíjeny metody, které jsou schopné popsat účinky toxických látek na životní prostředí [10]. Jako první testovací organismy byly použity ryby [12]. Nejdříve vznikaly metody testování toxicity na vodních organismech a tyto metody byly jednodruhé. Později se začaly vyvíjet metody hodnocení pro celá společenstva, což umožnilo reálně hodnotit rizika [10].

### 1.1 Význam ekotoxikologických testů

Testování účinků toxických látek, které jsou vypouštěny do prostředí, má význam jak z hlediska ochrany životního prostředí, tak i hospodářský. Přítomnost toxických látek může vést ke zhoršení kvality pitné vody a ovzduší, ale i ke snížení produkce biotických surovin (dřevo, zemědělské produkty). [11]

Biotesty jsou experimenty prováděné na živých systémech (buňkách, organismech) a slouží k určení druhu a míry škodlivého působení látek na testované organismy [11]. Jako testovací organismy se využívají bakterie, sinice, řasy, vyšší rostliny, vodní a půdní živočichové i rostliny [5].

Ekotoxikologické testy se společně s chemickými analýzami využívají v monitoringu životního prostředí. Jejich účelem je odhadování rizik spojených s výskytem toxické látky v prostředí [5]. Nevýhodou však je, že tyto testy nepodávají informaci o látce ve vzorku, která byla příčinou toxického účinku, proto je potřeba i chemická analýza vzorku [10]. Tyto testy tedy nejsou specifické, vyhodnocují celkové toxické účinky všech látek přítomných ve vzorku. Výhodou je rychlé a dostatečné zhodnocení vzorků například u havárií. Látky se posuzují v těch koncentracích, v jakých do prostředí vstupují nebo v jakých se v prostředí mohou vyskytnout [5].

Ekotoxicita je stanovována pomocí výsledků testů vodních výluhů nebo kapalných vzorků na vodních organismech. Využívají se například řasy, perloočky a rostliny. Pevné nebo ve vodě nerozpustné vzorky, které obsahují toxické látky, se testují pomocí kontaktních testů. Tyto testy nacházejí uplatnění při hodnocení kontaminovaných půd, sedimentů i pevných odpadů. Testovacími organismy jsou zde chvostoskoci (*Folsomia candida*), žížala hnojní (*Eisenia foetida*), rostliny a mikrobiální kultury. Při hodnocení odpadů je důležité znát místo i způsob jejich možného působení na životní prostředí. [10]

V platné legislativě ČR je používán úzký soubor 4 testů pro testování ve vodě rozpustných látek a vodních výluhů, což ovšem není postačující pro zhodnocení všech možných účinků. Mnohé látky jsou hydrofobní (např. polychlorované bifenyly) a těmito testy je tedy nelze posoudit. Pokud tyto testy neprokáží toxické účinky na dané organismy, je ekotoxicita testované látky hodnocena jako negativní. Naopak pozitivní je, když se objeví toxické účinky už na jednom z organismů. [10]

Výsledky testů toxicity pouze na jednom druhu organismu nelze považovat za ekologickou studii. Testy by měly zahrnovat výsledky testů toxicity na více organismech, které jsou na různých trofických úrovních ekosystému. Obvykle se doporučuje sada biotitů složená ze zástupců producenta, konzumenta a destruenta. [10]

Různé sady testů toxicity poskytnou různé výsledky o možném toxickém působení hodnocených vzorků. Důležité je zvolit vhodnou sadu testů pro dané hodnocení. Někdy dochází k tomu, že vzorky hodnocené podle legislativních metod jsou vyhodnoceny jako neškodné, ale ve skutečnosti jsou vysoce toxické [10]. Jednotlivé metody biotestů by měly umožnit srovnání účinků různých látek nebo různých organismů mezi sebou a důležité je i porovnání výsledků z různých laboratoří [5].

Mezi příčiny nízké vypovídající schopnosti testů ekotoxicky patří nejednotnost metod, rozdílné podmínky testů, odlišná příprava vzorků nebo nevhodná volba testů. Z testu toxicity lze zjistit vliv na daný organismus a na základě tohoto výsledku je možné odhadnout toxicitu na další organismy. [10]

## 1.2 Ekotoxikologické indexy

Základním toxikologickým indexem je dávka látky, která vyvolá sledovaný účinek. Jedná se o střední smrtelné dávky LD50 vztažené na hmotnost testovacího organismu. Toxikologie se zabývá účinky látek, které jsou přítomné v tělech organismů, zatím co ekotoxikologie

studuje především koncentrace látek v okolním prostředí organismů. Proto se v ekotoxikologii používá index letální koncentrace LC50. U biotestů jsou různé odezvy organismů například smrt, inhibice růstu, imobilizace, změn chování a další. Index efektivní koncentrace EC50 znamená, že u 50 % testovacích organismů vyvolá koncentrace látky v prostředí sledovaný účinek. Čím je hodnota EC50 nižší, tím je sledovaná látka toxičtější. Inhibiční koncentrace IC50, je taková koncentrace, která způsobí 50% inhibici sledovaného jevu (např. délka kořene) oproti kontrolnímu vzorku. [4, 10]

Další parametry vyjadřují práh účinku, např. NOAEL (no observed adverse effect concentration level) je nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které nejsou pozorovány účinky na testovaný organismus, naopak LOAEL (lowest observed adverse effect concentration level) je nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky na testovaný organismus. [13]

### 1.3 Rozdělení ekotoxikologických testů

Biotesty lze rozdělit podle různých kritérií, například:

- Podle cílového ekosystému (sladkovodní, mořský, půdní, ...)
- Podle doby expozice (akutní, chronický)
- Podle trofické úrovně testovacího organismu (testy s producenty, konzumenty, destruenty)
- Podle testovací matrice (voda, půda, vzduch, ...)
- Podle počtu testovacích organismů (jednodruhové, vícedruhové)
- Podle složitosti testovaného vzorku
- Podle sledované odpovědi (letální účinky, hodnocení fyziologické aktivity, reprodukční aktivita) [10]

Akutní testy sledují působení látek během krátkodobé expozice, test posuzuje okamžitý účinek, ale může trvat v závislosti na druhu organismu i 24 - 96 hodin [1, 10].

Chronické testy vyhodnocují působení látek po delší dobu expozice, měřítkem je délka života organismu. Tento typ testů může vyhodnotit i účinky látek na růst, rozmnožování či různé genetické změny [1, 10].

Akvatické testy využívají k testování vodní organismy s cílem určit toxicitu pro vodní ekosystémy. Používají se pro testování vodných výluhů i vzorků v pevném skupenství [10].

Terestické testy slouží k určení toxických účinků na půdní ekosystémy. Tento test lze využít i pro hydrofobní látky, které nelze otestovat pomocí akvatických testů [10].

Alternativní testy jsou oproti ostatním metodám rychlejší, lze s nimi testovat velké série vzorků a jsou miniaturizované, což umožňuje využívat menší množství chemikálií, proto bývají levnější. Takové testy nejsou náročné na obsluhu a obvykle jsou dostupné jako komerční sety. Významné alternativní testy jsou tzv. mikrobiotesty, které probíhají v kyvetách nebo zkumavkách. Konečným výstupem testu je změna absorbance, fluorescence nebo luminiscence, mortalita nebo imobilizace organismů. [10, 14]

Kontaktní testy vystavují organismy přímo testované matrici, jaká se vyskytuje v prostředí. Test napodobuje skutečnou situaci a bere v potaz, že všechny obsažené látky nemusejí být pro organismy dostupné [15].

Výluhové testy na rozdíl od kontaktních testů vystavují organismus výluhu látek z původní matrice. V důsledku toho, že se vzorek musí před testem upravit, nemají tyto testy takovou vypovídající schopnost. Výluhové testy jsou v dnešní době standardní v mnoha normách [15].

#### **1.4 Metodika ekotoxikologických testů**

Stejně jako v jiných vyspělých státech jsou i v České republice normy a metodiky podle kterých se provádí ekotoxikologické testy. Jsou v platnosti České státní normy (ČSN), ale zároveň jsou patné i normy a předpisy z Evropské unie. ČR je členem OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) a ISO (International Standardization Organisation), jejichž normy jsou platné i u nás. [5]

V ČR se běžně využívají standardní testy pro zjištění ekotoxicity vod, odpadních vod a vodných výluhů pevných matric [14]. Kromě těchto testů je u nás používají i testy dle OECD, jako je stanovení toxicity pro včely, žížaly, volně žijící ptáky a další [5].

Jako návod ke stanovení ekotoxicity, jedné z nebezpečných vlastností odpadů, slouží Metodický pokyn MŽP odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Jeho cílem je sjednocení postupu tak, aby bylo možné jednotlivé výsledky z různých laboratoří mezi sebou porovnávat a objektivně posuzovat. [3]

Stanovení ekotoxicity je prováděno jednotlivými metodami na organismech:

- *Daphnia magna* (hrotnatka velká) – test je prováděn podle normy ČSN EN ISO 6341 Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna*. Je to test akutní toxicity, doba působení zkoumané látky je 48 hodin.
- Ryby – *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) nebo *Brachydanio rerio* (dánio pruhované) dle ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby. Doba působení je 96 hodin.
- Řasy – *Desmodesmus subspicatus* nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* dle ČSN EN 28692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas. Doba působení je 72 hodin.
- *Sinapis alba* (hořčice bílá) – test inhibice růstu kořene hořčice bílé dle metodického pokynu Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů. Test klíčivosti semen hořčice bílé se uskutečňuje po dobu 72 hodin. [3, 16]

Metodický pokyn pro stanovení ekotoxicity odpadů lze využít k hodnocení odpadů z hlediska jejich využívání na povrchu terénu, ke zjišťování ekotoxicity u kapalných odpadů a kalů. Nelze využít u odpadů, u kterých není možné odebrat vzorek pro přípravu vodného výluhu nebo ze kterých vodný výluh nelze připravit. [3]

#### 1.4.1 Postup stanovení ekotoxicity odpadů

Pomocí testů akutní toxicity se testuje vodný výluh vzorku. Testované organismy reprezentují články ekosystémů, každý organismus může mít rozdílnou citlivost k látkám ve vzorku obsažených. Vždy rozhodují výsledky nejvíce citlivého organismu [3].

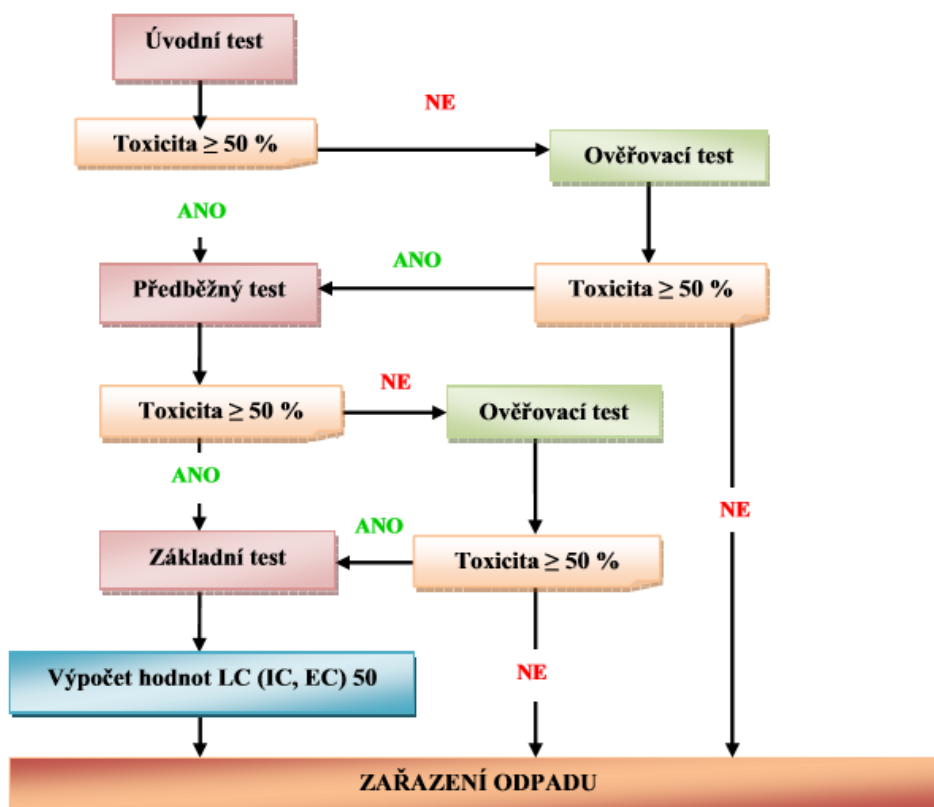
Postup odběru a úpravy vzorků je popsán v metodickém pokynu ke vzorkování odpadů a v metodickém pokynu k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů [3].

Příprava vodného výluhu odpadu pro testy ekotoxicity probíhá podle ČSN EN 12457-4. Vodný výluh se připraví ze vzorku podle stanoveného postupu vyluhování odpadů ve vodě. K vyluhování se používá destilovaná voda, která nesmí obsahovat chlor ani jiné toxické látky [14]. Tento vodný výluh se dále upravuje pro konkrétní testy podle použitého testovacího organismu [3].



### 1.4.2 Postupový diagram testů ekotoxicity

Testy ekotoxicity začínají úvodním testem, kdy je testovaný organismus vystaven testovanému neředěnému vodnému výluhu odpadu. Tento test využívá takový počet jedinců organismů, jaký je dán jednotlivými metodikami pro dané organismy, zatímco do testů ověřovacích se nasazují organismy v nejméně trojnásobném počtu než u testů základních. Jestliže se toxický účinek projeví u počtu organismů větší nebo rovno 50 %, provede se test předběžný s využitím zvolené řady koncentrací vodného výluhu. Vhodně zvolená koncentrační řada je taková, která zahrnuje koncentrace s toxickým účinkem pro 0 – 100 %. Pokud u předběžného testu není možné stanovit LC (EC, IC) 50 přichází na řadu opět test ověřovací. V jiných případech slouží výsledky předběžného testu pro stanovení rozsahu koncentrací pro základní test. [3] Vždy je důležité provádět i kontrolní testování, které se uskuteční ve stejných podmínkách a se stejným druhem organismu jako při běžném testu. Pojmem vnitřní kontrola se myslí základní test, který testuje standard. Jako standard se využívá dichroman draselný ( $K_2Cr_2O_7$ ). Tyto testy slouží k porovnání výsledků základních testů s obecně platnými hodnotami LC50, umožňují tedy určit správnost a citlivost testů. [17]



Obr. 1. Postupový diagram testů k hodnocení ekotoxicity [14]

## 1.5 Metodika ekotoxikologických testů

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

Hrotnatky se řadí do řádu perlooček, proto se často tyto testy označují i jako testy na perloočkách [3]. Jsou to drobní planktonní korýši o rozměrech 1 – 5 mm [14]. Tyto organismy jsou součástí ekosystémů jezer a rybníků, kde slouží jako potrava pro ryby, jsou tedy významnou součástí zooplanktonu [14, 18].

Testování probíhá tak, že se perloočky vystaví testované látce, která je rozpuštěná v ředící vodě, po dobu 48 hodin. Současně probíhá i kontrolní test, při kterém se perloočky dají do ředící vody bez obsahu testované látky. Po uplynutí 48 hodin se zkontroluje stav a zaznamenají se uhynulí či imobilizovaní jedinci. Mortalitu lze u těchto organismů poznat jen obtížně, proto se využívá spíše termín imobilizace. Při testech využíváme perloočky staré maximálně 24 hodin a nejméně třetí generace z prosperujícího chovu. [17]



Obr. 2. *Daphnia magna* [14]

### 1.5.2 Test na zelené řase *Chlorella vulgaris*

Řasy jsou požívány jako zkušební organismy protože, patří do první úrovně potravního řetězce, takže jakékoliv poruchy v jejich dynamice by mohly mít vliv na vyšší úrovně ekosystému. Řasy jsou také velmi citlivé na změny ve svém prostředí a díky jejich rychlému životnímu cyklu lze pozorovat účinky po více generacích. Konkrétně řasa *Chlorella vulgaris* je velmi citlivá na toxické látky a je snadno kultivovatelná. Je to sladkovodní jednobuněčná zelená řasa. Řasy se při tomto testu kultivují za aseptických podmínek v laboratoři po

dobu 4 dnů za teploty 21 °C. Médium pro kultivaci se připravuje v souladu s pokynem OECD pomocí deionizované vody a vhodných živin. Podmínky testování jsou teplota 21 – 24 °C, osvětlení 6000 – 10000 lx, doba expozice 72 hodin a ruční míchání dvakrát denně. Měří se optická hustota buněk při 440 nm, výsledkem testu je určení EC50, NOAEL, LOAEL. Tento test lze použít pro zjištění toxických účinků nebezpečných odpadů a odpadních vod. [19]

### 1.5.3 Test na sladkovodních řasách *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*

Testovací organismus jsou sladkovodní planktonní řasy *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*, je zde potřeba pracovat s kulturami standardních kmenů [3, 17]. Požívané druhy řas se běžně vyskytují v našich vodách [14].

Test začíná kultivací řasového kmene po několik generací v definovaném živné roztoku obsahující koncentrační řadu testované látky. Doba expozice je 72 hodin, jedenkrát za 24 hodin se měří hustota buněk. Pokud se testovaná látka projeví jako účinná, dochází ke snížení růstu nebo růstové rychlosti oproti kulturám, které nebyly vystaveny toxické látce. Při tomto testování by měla být teplota 25 °C a kontinuální osvětlení 6000 luxů. [17]

### 1.5.4 Test akutní toxicity na rybách

Ryby se vystaví účinkům testované látky rozpuštěné v ředící vodě. Další ryby jsou dány pouze do ředící vody, což slouží jako kontrola. V průběhu tohoto testu se kontroluje stav a chování ryb a odstraňují se uhynulí jedinci. Zaznamenávají se celkové počty uhynulých ryb a z výsledků se stanoví LC50. Teplota při testu by měla být 23 °C. Doba expozice dle normy je 96 hodin s výměnou lázně po každých 24 hodinách. [17]

Často se využívá živorodky duhové (*Poecilia reticulata*). Délka jejího těla by měla být 15 až 25 mm, ryby se používají v poměru pohlaví 1:1. Jedinci by měli být ve věku 3 až 4 měsíce. Lze použít i druh dáanio pruhované (*Brachydanio rerio*). Ryby jsou vybírány z populace stejného původu a dobrého stavu. [17]

Při testech na rybách je nutné dodržovat zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a vyhlášku č. 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat [17].

### 1.5.5 Test na žábřonožce solné (*Artemia salina*)

Žábřonožky jsou organismy žijící ve slaných stojatých vodách (slaná jezera, solné doly). Často se využívají jako krmivo pro akvarijní ryby. Dováženy jsou ve formě vajíček v konzervách [14]. Jsou velmi odolné, ve formě oplodněných vajíček mohou velmi dlouho přežít nepříznivé podmínky. Jsou schopny se přizpůsobit i extrémnímu prostředí vysychavých slaných jezer. Žábřonožky mohou žít až ve 25% roztoku soli [20].

Vajíčka se líhnou v laboratorní slané vodě s mírným provzdušňováním. Rychlost líhnutí závisí na teplotě, při 24 °C se vajíčka vylíhnou do 24 hodin. Živé žábřonožky jsou přitahovány světlem, dají se tak snadno shromáždit a odlovit [20]. Do testů se dávají čerstvě vylíhnutí jedinci, během testování nejsou krmeny a testovaný roztok se neprovzdušňuje. Sleduje se úmrtnost žábřonožek po 24 a 48 hodinách, hodnoty jsou porovnávány s kontrolními testy [14].

K ekotoxikologickému testování se využívá i komerční test používající jako testovací organismus žábřonožku. Tento test se nazývá Artoxkit M<sup>TM</sup> [14].



Obr. 3. *Artemia salina* [14]

### 1.5.6 Kinetické hodnocení inhibice růstu denitrifikační bakterie *Paracoccus denitrificans*

Tento test je miniaturizovaný, kultivace bakterií se uskutečňuje na 96 jamkové mikrotitrační destičce s automatickým zaznamenáváním růstových křivek. Test lze použít na testování iontů těžkých kovů, agrochemikálií a je vhodný i na hodnocení vzorků obsahující tě-

kavé složky. Testuje se vliv toxických látek na denitrifikační bakterii *Paracoccus denitrificans*. Takový test by bylo vhodné začlenit do sady biotestů, protože denitrifikace, jako důležitá část koloběhu dusíku, má významný vliv na ekosystém. [21]

Při testu se jamky mikrotitrační destičky naplní roztokem média a bakteriální kulturou a poté se destička vloží do čtečky mikrotitračních destiček. Zde se kultura pěstuje po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C a každých 30 minut se odečítá optická hustota při vlnové délce 550 nm v každé jamce. Pro vyhodnocení EC50 lze použít integrální metodu. Ze získaných dat se vytvoří růstové křivky a vypočítá se oblast pod křivkou pro každou koncentraci vzorku. Takto vypočítané hodnoty se porovnají s kontrolními testy a poté se zjistí inhibice růstu. Vytvoří se lineární závislost inhibice růstu na koncentraci a lineární regresí se odvodí hodnota EC50. Při testu, kde se jako testovaný vzorek použije těkavá látka, se používají plynotěsné vialky, do kterých se vzorek látky přidá pomocí injekční stříkačky. [21]

Významný vliv na výsledky testu má počáteční hustota naočkovaných buněk, zvláště pokud jsou ve vzorku ionty kovů, které inhibují růst už v nízkých koncentracích. Například přebytek buněčné biomasy může maskovat nízké koncentrace iontů kovů. Pokud je počáteční hustota buněk příliš nízká, kultura nedosáhne časného stacionárního růstu během 24 hodin a růst je tak zpožděn. [21]

### 1.5.7 Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test)

Testování je založeno na sledování změny bioluminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* vlivem účinku toxické látky [17]. Výhodou je, že jsou tyto bakterie snadno kultivovatelné a lze je pěstovat v laboratoři. Test s bakterií *Vibrio fischeri* patří mezi základní ekotoxikologické testy [18].

Za schopnost buněk luminovat zodpovídají geny, které tvoří operon lux CDABE. Buňky přirozeně emitují světlo vznikající při reakci katalyzované luciferázou. Bioluminiscence je jev, který způsobuje světélkování moří či světlušek. [20]

Nejdříve se změří množství emitovaného světla pomocí luminometru před přidáním testované látky a až poté se měří s testovanou látkou. Ze změny intenzity světla se určí toxický účinek. Jako referenční roztok se používá 2% roztok chloridu sodného. Při tomto testu je velmi důležité dodržovat konstantní teplotu, obvykle 15 °C, protože proces bioluminiscence je enzymaticky řízený a tudíž závislý na teplotě. Stejná teplota musí být u měření vzor-

ku i u slepého pokusu [17]. Měření bioluminiscence ovlivňuje hodnota pH měřeného vzorku, zákal, zbarvení a také obsah soli [5].

Test Microtox patří k nejméně finančně náročným testům s jednoduchou obsluhou. Výsledky z tohoto testu jsou poskytnuty už po 15 až 30 minutách. Množství vzorku potřebného pro test je méně než 5 ml. [5]

Tato metoda je jednoduchá, plně automatizovaná a celosvětově rozšířená. Test inhibice bioluminiscence mořských bakterií *Vibrio fischeri* se provádí dle souboru norem ČSN EN ISO 11348-1, ČSN EN ISO 11348-2 a ČSN EN ISO 11348-3. [20]

### 1.5.8 Testy fytoxicity

Tyto testy jsou běžně používané v monitoringu životního prostředí. Výhodou je, že jsou jednoduché, materiálově nenáročné a organismy lze jednoduše pěstovat. Nevýhodou je především časová náročnost testů, která vyplývá z dlouhodobé expozice toxickou látkou. Při těchto testech lze sledovat klíčivost semen, prodlužování kořene a růst rostlin. [14]

Organismy využívané při testech fytoxicity jsou hořčice bílá (*Sinapis alba*), řeřicha setá (*Lepidium sativum*), ředkev setá (*Raphanus sativus*), salát hlávkový (*Lactuca sativa*) a další. [14]

#### 1.5.8.1 Test na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Stanovuje se toxické působení látek obsažených ve vodném výluhu na klíčivost semen a růst kořene. Jako testovací organismus se používá hořčice bílá s klíčivostí minimálně 90 %, o střední velikosti semen (1,5 – 2,5 mm) a okrově žlutém zbarvení. [3]

Test probíhá při teplotě cca 20 °C po dobu 72 hodin bez osvětlení. Nejdříve se provede úvodní test s neředěným vodným výluhem vzorku. Na každou Petriho misku se vloží 30 semen. Po uplynutí požadované doby se změří a zaznamená délka kořenů jak v tomto testu, tak v kontrolním. Předběžný test se provádí stejně, ale pro široký rozsah koncentrací vodného výluhu. Z výsledků tohoto testu se vybere vhodná koncentrace pro základní test. Sledovaným parametrem je průměrná délka kořene. Hodnoty získané z vodného výluhu vzorku se porovnává s kontrolním testem. Výsledkem je procento inhibice (zkrácení) nebo stimulace (prodloužení) kořenů. Také se při vyhodnocení udává počet nenaklíčených semen. Správnost postupu a kvalita semen se ověřuje pomocí testů se standardem dichromanem draselným. [3]

### **1.5.8.2 Test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)**

Okřehek je rostlina porůstající hladiny stojatých vod, vytvářet ucelené plochy, což zapříčiňuje nepropouštění světla [14]. Do testu se používají rostliny pocházející ze zdravé kolonie, které jsou tvořeny 2 až 5 lístky [17].

Test probíhá 7 dní, kdy se nechají rostliny růst při účinku testované látky. Provádí se i kontrola, kdy se rostliny nechají růst ve stejných podmínkách jako testovací, ale bez toxické látky. Každých 24 hodin se zaznamenává stav rostliny a počet lístků. Účinky látky se vyhodnocují podle vegetativního růstu okřehku, posuzuje se rychlost růstu, počet lístků a hmotnost biomasy. U tohoto testu lze i zjistit nejnižší koncentrace, při kterých se pozorovaly účinky (LOAEL) a nejvyšší koncentrace nevyvolávající žádné pozorované účinky (NOAEL) [17]. Test je standardizovaný podle ČSN EN ISO 20079 a také organizací OECD [14].

### **1.5.8.3 Test inhibice růstu kořene cibule (*Allium cepa*)**

Cibule jako testovací organismus se využívá hlavně pro hodnocení přírodních, pitných a odpadních vod. Sleduje se inhibice růstu kořenů, které se porovnávají s kontrolními testy. [14]

Testy na cibuli se provádí k hodnocení chemických látek a také ke sledování genotoxicity těchto látek. Výsledkem tohoto testu je zjištění hodnoty EC50. Využívá se odrůda cibule české, která není chemicky ošetřena. Je to velmi citlivá a jednoduchá metoda testování. Poté co se kořeny cibule vystaví účinkům toxické látky, dochází k inhibici růstu kořene. Jako růstové médium se využívá studená vodovodní voda, která by měla mít ověřenou kvalitu, pH okolo 7 a bez přítomnosti toxických látek. Cibulky by neměly být poškozené ani vyschlé o průměrné velikosti 1,5 cm. Jejich kořenová primordia se poté ponoří do testované látky. Jako kontrola slouží růst kořenů ve vodě. Po 72 hodinách působení se kořeny změří a porovnávají se s kontrolou. [20]

## **1.6 Využití testů ekotoxicity pro stabilizovaný/solidifikovaný odpad**

Na univerzitě v Brazílii se vědci snažili porovnat charakterizaci průmyslových odpadů pomocí chemické analýzy a ekotoxikologických testů. Odpady byly podrobeny dvoustupňové stabilizaci/solidifikaci (S/S). Z výluhu byla zjišťována toxicita pomocí bakterií, řas a perlooček.

Odpadem v této studii byly různé kaly pocházející z automobilového a textilního průmyslu a kal ze zpracování kovů. Cílem bylo zjistit, zda jsou či nejsou tyto odpady nebezpečné dle brazilských předpisů.

Zjišťování účinků odpadů na životní prostředí je vhodné pomocí ekotoxikologických testů, důvodem je, že tyto odpady podléhají podmínkám prostředí a pouhá chemická analýza není na vyhodnocení vždy dostačující.

První stupeň S/S byl proveden za použití 33,33 % páleného vápna, 16,66 % jílu a 50 % kalu. Tato směs se nechala 7 dní tuhnout, poté došlo k dalšímu stupni S/S. Výsledný solidifikovaný odpad měl složení 33,33 % již jednou stabilizovaného kalu, 33,33 % vody, 11,11 % písku a 22,22 % cementu.

Druh řas, který byl vybrán k tomuto testování, byl *Scenedesmus subspicatus* Chodat. Test byl proveden pro různé koncentrace výluhu o třech paralelních stanoveních, jako standard byl použit dichroman draselný. Inkubace probíhala na třepačce při teplotě  $23 \pm 2$  °C s trvalým osvětlením. Po 72 hodinách byl zjištěn inhibiční účinek pomocí fluorescenční aktivity (měřeno při vlnové délce 685 nm).

U zkoušky s bakterií *Vibrio fischeri* dochází k inhibici luminiscence. Test byl proveden při teplotě  $15 \pm 1$  °C a u vzorků byla upravena salinita. Vzorky byly testovány v různých koncentracích a doba expozice byla 30 minut. Každý zředěný vzorek i kontrolní byly provedeny třikrát.

Test na perloočce (*Daphnia magna*) byl proveden při teplotě  $25 \pm 2$  °C po dobu 48 hodin. Do testů bylo vkládáno 5 jedinců méně než 24 hodin starých. Opět byl vzorek testován v různých koncentracích a jako standard byl použit dichroman draselný.

Všechny průmyslové kaly byly podrobeny chemické analýze. Podle výsledků této analýzy bylo zjištěno, že na základě složení těchto kalů je možné klasifikovat daný odpad jako nebezpečný dle brazilských předpisů o odpadech. Po S/S procesu těchto kalů je ale nelze zařadit mezi odpady klasifikované jako nebezpečné. Přesněji je lze považovat za bezpečné a neinertní. Podle výsledků testů ekotoxicity byly solidifikované kaly z textilního průmyslu vyhodnoceny jako netoxické pro všechny tři organismy. Naproti tomu solidifikovaný kal pocházející z automobilového průmyslu vykazuje toxicitu. Proto, když porovnáme chemickou analýzu s ekotoxikologickými testy, můžeme konstatovat, že chemická analýza může přecenit nebo naopak podcenit potenciál nebezpečnosti solidifikovaných odpadů. Chemická analýza tedy není vhodná pro hodnocení vlivu na ŽP. [22]



Španělští vědci realizovali testy ekotoxicity u výluhů odpadů, které byly upraveny pomocí technologie S/S. Testovaný odpad byl slévárenský kal, jehož stabilizace byla provedena pomocí cementu jako pojiva a jako přísady byly použity organofilní bentonit, vápno a popílek ze spalování uhlí. Tento slévárenský kal byl označen jako nebezpečný odpad z důvodu obsahu zinku a fenolických látek. Solidifikační technologií byla snaha znehybnit oba druhy znečišťujících látek.

U takto upravených odpadů bylo posouzeno, zda se nebezpečné složky odpadu podařilo stabilizovat, pomocí chemické analýzy i ekotoxikologických testů. Ekotoxicita byla hodnocena podle španělského nařízení a dle standardů EU z výluhů odpadů (TCLP test) pomocí luminiscenčních zkoušek. Odpad je považován za nebezpečný je-li hodnota ekotoxicity EC50 menší než 3000 mg/l.

Výluh z odpadu stabilizovaný jen pomocí cementu byl netoxický. Hodnota EC50 byla vyšší než hodnoty pro slévárenský kal (EC50 = 1015 mg/l) a také vyšší než limit španělského nařízení (EC50 = 3000 mg/l). Zařazením vápna do směsi došlo ke snížení ekotoxicity oproti odpadu solidifikovanému jen pomocí cementu. Zlepšila se stabilizace organických polutantů, když bylo 50 % cementu nahrazeno vápnem. Avšak docházelo k vyluhování zinku nad limit evropských předpisů pro skládkování inertních odpadů (koncentrace zinku - 0,5 mg/l) vlivem zásaditosti vápna. Přidání bentonitu pomohlo znehybnit fenolické sloučeniny, ale tato přísada byla neúčinná ke snížení ekotoxicity a mobility zinku. Popílek měl ze všech přísad nejhorší vlastnosti, oproti S/S odpadu jen pomocí cementu byl více ekotoxický a ani stabilizace nebezpečných látek nebyla příliš účinná. Nicméně u každé přísady byl vždy nalezen poměr, kdy výluh odpadu nebyl toxický. [23]

Na řecké univerzitě vědci zkoumali možnosti stabilizace čistírenských kalů pomocí popílku a vápna. Čistírenský kal může obsahovat patogenní organismy a znečišťující látky, také různé toxické kovy a rozpustné soli. Vápno je považováno za jeden z nejčastějších materiálů pro stabilizaci čistírenských kalů, protože významně snižuje obsah mikroorganismů (i patogenních) a účinné je i pro stabilizaci těžkých kovů.

Popílek, který vzniká spalováním fosilních paliv, obsahuje zvýšené množství oxidů vápníku a hořčíku. Je to alternativní materiál vhodný ke stabilizaci kalů, při jeho použití se snižují náklady za nákup, a navíc je to další možnost odstranění tohoto materiálu.

Cílem jejich práce bylo posoudit popílek a běžně používané vápno jako materiál vhodný ke stabilizaci. Dalším cílem bylo stanovení ekotoxicity u stabilizovaného čistírenského kalu.

Testy ekotoxicity byly provedeny na organismech *Sinapis alba* (hořčice bílá), *Sorghum saccharatum* (čirok dvoubarevný) a *Lepidium sativum* (řeřicha setá). Vždy byl testům podroben jak výluh surového kalu, tak také výluh stabilizovaného kalu.

Do testů bylo použito vždy deset semínek daného druhu rostliny. Semínka byla umístěna do mělkých zkušebních desek. Kontrolní vzorek byl připraven za použití referenční půdy dle normy OECD. Inkubace probíhala po dobu tří dnů při teplotě 25 °C a po této době byla vypočítána inhibice klíčivosti semen.

Testování ekotoxicity bylo provedeno také pomocí bakterie *Vibrio fischeri*. Byla měřena intenzita luminiscence pomocí Microtox 500 analyzátoru. Doba expozice byla 15 minut a zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru Microtox Omni.

Výsledky testů na bakterii *Vibrio fischeri* prokázaly nejvyšší toxicitu u vzorků s vysokým obsahem popílku vápna i u jejich kombinace. Směsi, které vykazovaly nejmenší toxicitu, měly nejmenší obsah popílku.

Vyrobené směsi měly silné fyto toxické účinky, ke snížení toxicity došlo v průběhu procesu stárnutí směsi, obzvláště ve směsích s vyšším obsahem kalů. Nižší míra inhibice klíčení byla zjištěna u vzorků, kde byl vysoký obsah kalů, například u vzorku, který obsahoval poměr popílek/vápno/kal - 0,5/0,5/ 2.

Odpady stabilizované tímto způsobem mají vysokou toxicitu. Tuto vlastnost lze vysvětlit vysokým množstvím přidaného popílku nebo může být také přičítána uvolnění kovů ze směsi. Z tohoto důvodu by mělo být použito menší množství popílku, aby se zoptimalizovaly všechny vlastnosti. [24]

V Japonsku zjišťovali, jakou toxicitu vyazuje stabilizovaný zdravotnický odpad. Stabilizace probíhala pomocí chelatačního činidla, jehož hlavní složka je dithiokarbamat, kyselého roztoku kyseliny fosforečné a alkalického roztoku fosforečnanu.

Infekčního odpadu se lze zbavit pomocí spalování, vzniká tak však značné množství pevného zbytku (popela, popílku). Tento zbytek je bohatý na obsah toxických látek (například těžké kovy) a tvoří asi 5 % z počáteční hmotnosti odpadu. Skládání tohoto odpadu, který je zařazen jako nebezpečný, bylo v Japonsku zakázáno. Nejčastější úpravou je stabilizace/solidifikace pomocí cementu nebo chemikálií a následné skládání, vitifikace a další metody.

Biotesty jsou důležitým parametrem pro popis vlastností odpadu, zajišťují úplnou odpověď testovaného organismu vůči odpadu. Jako testovací organismy byly vybrány *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* a *Lactuca sativa* (locika setá – salát hlávkový). Analyzovány byly těžké kovy ve výluhu před i po S/S.

Test inhibice růstu kořínků salátu probíhal 5 dní při 25 °C ve tmě. Filtrační papír byl umístěn na dno Petriho misky a nasycen 2 ml výluhu, bylo na něj rovnoměrně rozloženo dvacet semínek. Test byl proveden s pěti různými koncentracemi výluhu (3 opakování). Na konci inkubace byly pomocí pravítka změřeny délky kořínků a vypočteno IC50. Jako kontrola byla použita destilovaná voda.

Pro test mortality *Daphnia magna* byla upravena hodnota pH výluhu malým množstvím koncentrované kyseliny chlorovodíkové, aby se zabránilo vlivu nesprávného pH na perloočky. Biotest byl proveden ve vícejamkových miskách. Jako kontrola bylo použito standardní sladkovodní médium. Dvacet čerstvě vylíhlých jedinců bylo přeneseno do každé jamky, inkubace probíhala při 20 °C ve tmě. Po 24 a 48 hodinách byl zjišťován počet uhynulých jedinců a stanovena hodnota EC50.

Před bakteriálním testem bioluminiscence (Microtox) s bakterií *Vibrio fischeri* byl přidán k bakteriím 1 ml dvouprocentního roztoku chloridu sodného. Poté byly inkubovány při 3 °C po dobu 10 minut a při teplotě 15 °C po dobu 15 minut před použitím. Koncentrace výluhu, která způsobila 50% inhibici bioluminiscence (EC 50) byla zjištěna pomocí měření bioluminiscence s použitím luminometru. Výsledky všech testů byly stanoveny ze třech a více opakování u jednoho vzorku.

Z uvedené studie vyplynulo, že přidání stabilizačních chemických látek do popílku snižuje toxicitu výluhu popílku pro všechny tři testované organismy. Výsledky ukázaly, že použité stabilizátory byly schopny významně snížit koncentraci kovů ve výluhu. Ačkoliv jsou výluhy z obou stabilizovaných i z nestabilizovaného popílku vysoce toxické pro salát i pro perloočky, začleněním těchto stabilizačních činidel došlo k výraznému snížení toxicity pro tyto organismy. [25]

Čeští vědci zjišťovali toxicitu u stabilizovaných/solidifikovaných odpadů pomocí cementu. Studovaný odpad byl popílek vznikající při spalování tuhých paliv (černé, hnědé uhlí, lignit). Popílek může obsahovat různé oxidy a těžké kovy.

Byly připraveny zkušební tělíska (1 díl cementu, 3 díly standardního písku a 1/2 dílu vody). Solidifikace popílku (1/2 dílu cementu, 1/2 dílu popílku, 3 díly standardního písku, 1/2 dílu vody). Popílký byly vyluhovány podle ČSN EN 12 457-4.

Pro vyhodnocení ekotoxicity byly použity organismy *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotoxkit, test s korýši), *Pseudokirchneriella subcapitata* (test inhibice růstu řas) a *Vibrio fischeri* (Microtox test, bakteriální test). Testovány byly surové popílký i popílký solidifikované cementem.

Vždy byla stanovena efektivní a letální koncentrace (EC a LC), které byly přepočítány na jednotky toxicity (TU, bezrozměrné číslo).

Výluhy ze zkušebních tělísek byly mírně toxické pro korýše, netoxické pro bakterie a řasy. Toxicita výluhů popílků ze spalování lignitu a hnědého uhlí byla srovnatelná s výluhy ze zkušebních tělísek, toxicita výluhů popílků ze spalování černého uhlí byla nižší.

Výluh ze surového popílku ze spalování hnědého uhlí byl velmi toxický, zejména pro řasy (TU = 18,3), což neodpovídá chemickému rozboru. Dle chemického rozboru se předpokládalo, že u S/S popílků dojde ke snížení toxicity, k tomu ale došlo jen u popílku pocházejícího ze spalování hnědého uhlí. Výsledky ukazují, že nelze vždy spoléhat na výsledky chemické analýzy. Je dobré do testování zařadit právě i biotesty. [26]

Další česká studie se zabývala S/S galvanických kalů pomocí asfaltových emulzí. Toxicita byla u nich zjišťována mimo jiné i pomocí ekotoxikologických testů. Galvanické kaly jsou považovány za nebezpečný odpad, který je nutno před uložením na skládku stabilizovat, aby nedocházelo k uvolnění přítomných znečišťujících látek do ŽP.

Použití asfaltu jako pojiva je výhodné, protože je schopný vytvořit imobilizační bariéru, která účinně brání znečišťujícím látkám ve vyluhování ze stabilizovaného odpadu. Pro S/S byly použity 2 typy asfaltových emulzí, jedna byla neiontová (obsah asfaltu 50 – 55 %) druhá aniontová (obsah asfaltu 60 %). S/S odpadu byla dvoustupňová, nejdříve došlo k primárnímu smíšení odpadů s pomaluštěpnou asfaltovou emulzí a následný vznik sekundární asfaltové bariéry pomocí rychloštěpné asfaltové emulze.

Test byl proveden se čtyřmi vzorky galvanického kalu. Byl proveden vyluhovací test z nestabilizovaného odpadu pomocí dvou standardních metod loužení (TCLP test, vyluhovací test s neionizovanou vodou). Pro S/S produkty se využily stejné vyluhovací testy.

Ekotoxicita byla studována na bakterii *Pseudomonas putida*, rostlině *Lactuca sativa*, sladkovodní řase *Scenedesmus subspicatus* a korýši *Artemia salina*.

Neošetřené galvanické kaly vykazovaly vždy určitý stupeň toxicity, zejména u nejcitlivějšího testu *P. putida*. Po stabilizaci se ve všech případech toxicita snížila pod detekční limit.

Ekotoxické testy ukázaly, že toxicita výluhů solidifikovaných galvanických kalů je zanedbatelně nízká ve srovnání s relativně vysokou toxicitou neupravených kalů, což dokazuje, že postup S/S byl účinný. [27]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité přístroje

- Elektrické vrtulové míchadlo RZR 2020, Heidolph, Německo
- Vibrační stůl V – 95, Trystom, ČR
- Předvážky, Kern 440 – 47, Německo
- Analytické váhy Kern ABJ 220-4NM, Německo
- pH metr, Inolab pH 720, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Německo
- Laboratorní třepačka, RS 10 Basic, IKA, Německo
- Sušárna, Mora 524, ČR
- Autokláv, Adolf Wolf SANOclav, Robert Bosch, Německo
- Luminometr, 20/20n, Turner Biosystems, USA
- Plamenový AAS GBS 933-AA GBC, Scientific equipment PTY LTD, Austrálie

### 2.2 Použité chemikálie a materiály

- Destilovaná voda ( $H_2O$ ), připravena v laboratoři UTB Zlín
- Heptahydrát síranu hořečnatého p. a. ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Hydrogenuhličitan sodný p. a. ( $NaHCO_3$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Chlorid draselný p. a. ( $KCl$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ ), výrobce: Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Dichroman draselný p. a. ( $K_2Cr_2O_7$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Chlorid sodný p. a. ( $NaCl$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Heptahydrát síranu zinečnatého p. a. ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Hydrogenfosforečnan draselný p. a. ( $K_2HPO_4$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Hydrogenfosforečnan amonný ( $(NH_4)_2HPO_4$ ), výrobce: Lachema n. p. Brno
- Glycerol, výrobce: Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Casein Enzyme Hydrolysate, Type – I, Tryptone, výrobce: Hi-Media
- Yeast Extract Powder, výrobce: Hi-Media
- D-Glukosa, výrobce: Lach-Ner, s.r.o.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, výrobce: Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Asfalt: PARAMEX 80, výrobce: PARAMO, a. s.
- Cement: Optimcem CEM II/B-M (S-V) 32,5 R, portlandský cement směsný, výrobce: Cemmac
- Dvousložkový silikonový kaučuk: Lukopren N1522 + katalyzátor, výrobce: Lučební závody Kolín
- Dvousložková silikonová kaučuková hmota, vysokopevnostní RTV 20, výrobce: Lianhuan Group Limited
- Vodná emulze silikonové pryskyřice Lukofob ELX, výrobce: Lučební závody Kolín
- Akrylátová vodou ředitelná barva Eternal mat akrylátový, výrobce: Eternal

### 2.2.1 Testovaný odpad

Odpad použitý k testování pochází z nejmenované zahraniční firmy, kde vzniká při žárovém zinkování povrchů ocelových výrobků. Vzorek odpadu byl sypký šedý prášek s vysokým obsahem zinku. Další charakteristika tohoto odpadu je popsána v diplomové práci „Optimalizace solidifikační receptury pomocí vícefaktorové regresní analýzy“ z roku 2016 od Ing. Pavly Hřivnové [28].

## 2.3 Příprava zkušebních těles solidifikovaného odpadu

### 2.3.1 Solidifikace pomocí cementu

Pro přípravu směsi bylo naváženo 34,5 g cementu a 115,5 g odpadu. Do směsi se za stálého míchání postupně přidávalo 28,5 ml vody. Směs byla vrtulovým míchadlem dokonale zhomogenizována, což trvalo zhruba 10 minut, a poté rozdělena do čtyřech plastových forem ve tvaru válce, kde byla zhutněna pomocí vibračního stolku. Směs se nechala tuhnout po dobu 51 dnů. Tímto způsobem vznikla čtyři zkušební solidifikovaná tělesa, z nichž tři byla následně ošetřena nátěrem akrylátové vodou ředitelné barvy a následně vodnou emulzí silikonové pryskyřice. Výsledný obsah odpadu v suché směsi byl 77 %.

Další čtyři tělesa vznikla stejným způsobem, ale místo odpadu bylo použito stejné množství písku. Tyto tělesa sloužily jako slepý pokus a opět byla tři z nich ošetřena nátěrem.



### 2.3.2 Solidifikace pomocí silikonu

Zde probíhala solidifikace pomocí dvou různých silikonů. Do dvou plastových forem bylo naváženo 5 g odpadu a následně 5 g silikonu Lukopren N1522. Do zamíchané směsi se přidalo 13 kapek katalyzátoru a znovu došlo k promíchání konečné směsi. Tímto způsobem byla vytvořena dvě tělíska. Jako slepý pokus byla připravena dvě tělíska z 10 g silikonu a 13 kapek katalyzátoru. Tělíska se nechala ztuhnout a poté docházelo k jejich vyluhování. Obsah odpadu v solidifikátu byl 50 %.

Stejně byla vytvořena další sada tělísek jen s rozdílem použitého silikonu, zde byl použit vysokopevnostní silikon od výrobce Lianhuan Group Limited.

### 2.3.3 Solidifikace pomocí asfaltu

Bylo naváženo 200 g odpadu, který byl následně nasypán do 100 g roztaveného asfaltu zahřátého na 180 °C. Směs byla homogenizována, v tekutém stavu byla směs udržována zahříváním na elektrickém vařiči, a poté nalita do formiček, kterými zde byly žíhací keramické formy vystlané alobalem. Obsah odpadu v solidifikátu byl 66,7 %. Jako slepý pokus byla vytvořena tělíska jen ze samotného asfaltu.

## 2.4 Příprava vodných výluhů solidifikovaného odpadu

Příprava vodných výluhů probíhala podle ČSN EN 12457-4. Každé tělísko bylo zváženo a vloženo do skleněné láhve. Následně se k tělísku přidal 10-ti násobek destilované vody, láhev byla uzavřena a umístěna na laboratorní třepačku, kde probíhalo vyluhování po dobu 24 hodin při frekvenci třepání 150 kmitů za minutu. Po vyluhování se obsah láhve přefiltroval pomocí teflonového filtračního zařízení. Vodný výluh byl vždy skladován maximálně 7 dní v chladničce.

## 2.5 Vybrané ekotoxikologické testy

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

K testování byly použity semena hořčice bílé odrůda Severka od výrobce Aros osiva s.r.o. Do testů byla vybírána semena, která byla nepoškozená o střední velikosti 1,5 až 2,5 mm. Podmínkou byla jejich minimální klíčivost v kontrole 90 %. Test probíhal 72 hodin při teplotě  $20 \pm 2$  °C bez osvětlení. Testování vycházelo z Metodického pokynu MŽP odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů [3].

### 2.5.1.1 Příprava ředící vody

Bylo potřeba připravit 4 roztoky, z nichž se dále připravila ředící voda a to tak, že se do odměrné baňky o objemu 1 litr napipetovalo po 2,5 ml z každého roztoku. Baňka se poté doplnila po rysku destilovanou vodou.

- Zásobní roztok č. 1 – 44,4 g  $\text{CaCl}_2$  bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na objem 500 ml.
- Zásobní roztok č. 2 – 24,65 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na objem 500 ml.
- Zásobní roztok č. 3 – 12,95 g  $\text{NaHCO}_3$  bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na objem 500 ml.
- Zásobní roztok č. 4 – 1,15 g  $\text{KCl}$  bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na objem 500 ml.

### 2.5.1.2 Příprava standardu

Jako standard byl u testů s hořčicí bílou použit roztok  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , který byl připraven navážením 0,1075 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a doplněním destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná koncentrace tohoto roztoku byla 1,075 g/l.

### 2.5.1.3 Úprava vodného výluhu odpadu

Vodné výluhy solidifikovaných těles musely být před použitím do testů upraveny pomocí zásobních roztoků stejně jako ředící voda a to tak, že se do odměrné baňky o objemu 1 litr napipetovalo po 2,5 ml z každého roztoku a vodným výluhem odpadu byla baňka doplněna po rysku.

### 2.5.1.4 Test klíčivosti a růstu kořene hořčice bílé na standardu

Do plastových Petriho misek o průměru 60 mm byly napipetovány potřebné objemy zásobního roztoku standardu a ředící vody, přesné údaje jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1.). Do každé misky byl vložen filtrační papír a na něj umístěno 15 semen hořčice. Pro každou koncentraci standardu byl test proveden třikrát. Jako kontrola sloužily Petriho misky s filtračním papírem, který byl nasycen jen ředící vodou, bylo nutné, aby podmínky testu kontrolního a testu s daným vzorkem byly stejné. Kontrolní byly vždy tři Petriho misky.

Tab. 1. Objem standardu a ředící vody pro test klíčivosti a růstu kořene

$V_{\text{standard}}$ [ml]	$V_{\text{ředící voda}}$ [ml]	$c_{\text{standard}}$ [mg/l]
0	10	0
0,5	9,95	5,375
0,1	9,9	10,75
0,25	9,75	26,88
0,5	9,5	53,75
0,75	9,25	80,63
1	9	107,5
3	7	322,5

### 2.5.1.5 Test klíčivosti a růstu kořene hořčice bílé s vodnými výluhy solidifikovaného odpadu

Test byl vždy proveden s neředěným vodným výluhem (upravený dle popisu v kapitole 2. 5. 1. 3) a dále s širokým rozsahem koncentrací vodného výluhu. Do každé Petriho misky byly napipetovány příslušné objemy výluhu a ředící vody, přičemž součet objemů činil vždy 2 ml. Do každé misky byl vložen filtrační papír a 15 semen hořčice. Zvolené koncentrace výluhu byly 500; 100; 10; 2,5; 0,625 ml/l a neředěný vodný výluh. Test byl opět proveden pro každou koncentraci třikrát a bylo nutné provést i kontrolní testy.

### 2.5.2 Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test)

Do testu byly použity bakterie *Vibrio fischeri*, stanovení toxicity vodných výluhů bylo provedeno dle ISO 11348.

#### 2.5.2.1 Provedení testu s bakteriemi *Vibrio fischeri*

Suspenze bakterií byly skladovány v mrazničce v mikrozkuvkách, bylo tedy nutné suspenzi před použitím do testů rozmrazit. Zpočátku bylo testování provedeno s bakteriemi, které byly kultivovány v laboratoři. Kultivační médium bylo připraveno dle tabulky Tab. 2., veškeré chemické látky byly naváženy a převedeny do odměrné baňky, kde byly doplněny destilovanou vodou na 1 litr. Poté se kultivační médium nechalo sterilizovat v autoklávu. Následně bylo 200  $\mu$ l bakteriální suspenze převedeno do kultivačního média o objemu 200 ml, kde se bakterie nechaly 24 hodin kultivovat na třepačce při teplotě 25 °C ve tmě.

*Tab. 2. Množství chemických látek potřebných pro kultivaci 1 l kultivačního média*

Látka	Množství
NaCl	30 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	6,6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,204 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Glycerol	3 ml
casein peptone (trypton)	5 g
yeast extract	0,5 g

Později však bylo zjištěno, že testování lze provést i se zmraženými bakteriemi (bakterie se tedy nemusely kultivovat). Ke 200 µl bakteriální suspenze bylo přidáno 900 µl rekonstitučního pufru a 15 minut se nechala směs stát. Takto připravené bakterie se používaly ihned k testování. Příprava rekonstitučního pufru byla provedena podle tabulky Tab. 3. Navážené množství látek bylo převedeno do odměrné baňky a poté doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml. Dále bylo nutné upravit pH na hodnotu  $7 \pm 0,02$  pomocí kyseliny chlorovodíkové a 10% roztoku hydroxidu sodného.

*Tab. 3. Množství chemických látek potřebných pro 100 ml rekonstitučního pufru*

Látka	Množství [g]
Glukosa	0,8
NaCl	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,247
KCl	0,03
TRIS	0,553

K ředění všech roztoků byl připraven 2% roztok NaCl (ředící roztok). Také bylo zapotřebí připravit roztok síranu zinečnatého (standard) o koncentraci zinečnatých iontů 1 g/l. Příprava probíhala rozpuštěním 0,2199 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O v ředícím roztoku a doplnění tímto roztokem na rysku 50ml odměrné baňky.

Po kultivaci či po přípravě bakterií pomocí rekonstitučního pufru bylo odebráno 200 µl bakteriální suspenze a následně se k ní přidalo 900 µl ředícího roztoku. Takto připravenou suspenzi buněk bylo nutno ještě 1000x zředit, aby hodnoty luminiscence nebyly příliš velké.

Měřený vzorek byl vždy ředěn geometrickou řadou, v případě standardu roztoku zinečnatých iontů to bylo ředění faktorem 5, tak vznikly roztoky o koncentraci zinečnatých iontů 100; 20; 4,0; 0,8; 0,16; 0,032 a 0,0064 mg/l. Vodné výluhy se ředily faktorem 10, vycházelo se z neředěného vodného výluhu a z něj byly připraveny roztoky o koncentraci 100; 10; 1; 0,1; 0,01 ml/l. Měření s neředěným vodným výluhem provedeno nebylo, protože u něj nebylo možno zajistit potřebnou salinitu, tak jako u ostatních ředění.

Do mikrozku mávek bylo napipetováno 50  $\mu$ l zředěné suspenze bakterií, u kterých se změřila luminiscence ( $L_0$ ). Poté co se mikrozku mávka vyjmula z luminometru bylo k suspenzi přidáno 450  $\mu$ l dané koncentrace vodného výluhu nebo roztoku zinečnatých iontů a roztok byl zamíchán. Po 15-ti minutách se opět změřila luminiscence ( $L_{15}$ ). Vždy bylo nutné změřit 3 blanky, ze kterých byl vypočítán korekční faktor. Tak bylo zjištěno přirozené zeslabování luminiscence v čase. V případě blanků byl k suspenzi přidáván ředící roztok o množství 450  $\mu$ l. Měření bylo pro každý vzorek provedeno třikrát.

### 2.5.3 Test ekotoxicity na žábřonožce solné (*Artemia salina*)

Vajíčka *Artemia salina* značky Dajana artemia eggs hobby byly uchovávány v chladničce v původním obalu, ve kterém byla obsažena také sůl. Samotná příprava vajíček k líhnutí probíhala tak, že do kádinky naplněné 60 ml destilované vody se přidalo 1,5 g směsi vajíček se solí, která zajišťovala důležitou podmínku líhnutí.

Takto připravená kádinka byla zakryta potravinovou folií a umístěna pod lampu, která dodávala dostatečné množství světla na líhnutí. Při teplotě kolem 24 °C docházelo k líhnutí během 30-ti hodin.

Vylíhlé žábřonožky se měly dát do jednotlivých Petriho misek s připravenými koncentracemi standardu nebo výluhu odpadu. Současně muselo být v každé misce zajištěno potřebné prostředí pro žábřonožky, to bylo provedeno pomocí syntetické mořské vody.

Odlov korýšů z kádinky byl proveden pomocí mikropipet, tak došlo k jejich přenosu do prázdné Petriho misky, kde bylo vždy shromážděno více korýšů a ty byly následně přeneseny do Petriho misky se zkušebním roztokem. Avšak nebylo známé množství média, které bylo do zkušebních misek vloženo společně s korýši. Poté tedy nebylo možné určit přesnou koncentraci standardu či výluhu z tělísek, která způsobila imobilizaci jedinců. Další problémem byl, že někteří korýši byli po přenosu mikropipetou nehybní, nešlo však zjistit, zda to bylo jen dočasné a zda se tedy měli započítat do celkového počtu vložených jedinců. Bylo i

velmi složité spočítat množství vložených jedinců do testu., protože se poměrně rychle pohybovali. Tato metoda testování byla vyhodnocena jako neefektivní a nepřesná právě díky neznámému zředění vzorků médiiem a také k nemožnosti určení přesného počtu koryšů vložených do testu. Testování na žábřonozkách nebylo dále používáno.

## 2.6 Vyhodnocení testů

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

Vyhodnocení u tohoto testu bylo provedeno měřením délky kořene hořčice s přesností 1 mm po 72 hodinách od zahájení testu. Hodnoty stanovené ve vodných výlužích nebo u různých koncentrací standardu se porovnály s kontrolu a byla vypočítána inhibice (zkrácení) kořene. Nevyklíčená semena nebo taková, která nevytvořila žádný kořínek, se do aritmetického průměru započítávala jako nulová hodnota délky kořene. [3]

Z délek kořínků hořčice umístěné na jedné Petriho misce v kontrole (přítomna jen ředící voda) byl vypočítán aritmetický průměr. Takto byly zjištěny tři hodnoty (tři paralelní stanovení), ze kterých byl opět vypočítán aritmetický průměr. Průměrná hodnota délky kořene v kontrole byla považována za nulovou inhibici. Průměrná délka kořene byla vypočtena z každé misky s výluhem zvlášť a následně byla vypočítána inhibice.

Z těchto hodnot byla následně vypočtena inhibice v dané koncentraci a dále stanovena hodnota IC50 (inhibiční koncentrace).

$$I = \frac{L_K - L_V}{L_K} * 100 \quad (1)$$

Kde:

I – inhibice růstu kořene [%], pokud je I<0 jedná se o stimulaci růstu

L<sub>K</sub> – průměrná délka kořene v kontrole [mm]

L<sub>V</sub> – průměrná délka kořene v testovaném vzorku [mm]

Byl vytvořen graf závislosti inhibice v procentech na logaritmu koncentrace vodného výluhu či standardu. Hodnoty byly proloženy křivkou lineární regrese a pásy spolehlivosti, ty byly vytvořeny dle postupu, který je uveden v práci „Regresní analýza“ [29]. Z přímky byla poté odečtena hodnota IC 50.

Dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů [16] se jako ekotoxický hodnotí odpad, u něhož dojde k překročení limitní hodnoty. Konkrétně u testu na organismu *Sinapis alba* nesmí dojít k překročení hodnoty 10 ml/l.

### 2.6.2 Bakteriální bioluminiscenční test ekotoxicity (Microtox test)

U tohoto bioluminiscenčního testu bylo pro vyhodnocení nejdříve potřeba zjistit přirozené zeslabování luminiscence v čase. K tomuto slouží tzv. korekčního faktoru, který byl vypočítán z luminiscence blanků pomocí vzorce:

$$CF = \frac{\bar{L}_0}{\bar{L}_{15}} \quad (2)$$

Kde:

CF – korekční faktor

$\bar{L}_0$  – aritmetický průměr luminiscence blanků v čase 0

$\bar{L}_{15}$  – aritmetický průměr luminiscence blanků v čase 15 minut

Dále bylo potřeba vypočítat pro každou koncentraci korigovanou koncentraci, což bylo provedeno pomocí vzorce:

$$L_{15corr} = CF * L_{15} \quad (3)$$

Kde:

$L_{15corr}$  – korigovaná koncentrace

$L_{15}$  – luminiscence v čase 15 minut pro jednotlivé koncentrace vodných výluhů

CF – korekční faktor (vypočítaný dle vzorce 2)

Takto byl odstraněn vliv přirozeného zeslabování luminiscence v čase a vliv zředění. Dále byla vypočítána inhibice v procentech:

$$I = \frac{(L_0 - L_{15corr}) * 100}{L_0} \quad (4)$$

Kde:

I – inhibice [%]

$L_0$  – luminiscence v čase 0 pro jednotlivé koncentrace vodných výluhů

Byl vytvořeny grafy závislosti inhibice na logaritmu koncentrace vodného výluhu a z něj byly odečteny hodnoty koncentrací, které způsobily 50% inhibici (IC50). Protože byly uskutečněny tři paralelní měření, tak pro jeden vzorek byly zjištěny tři hodnoty IC50, ze kterých byl vypočten aritmetický průměr.

Požadavek na výsledek této zkoušky ekotoxicity, který je uvedený ve Vyhlášce č. 94/2016 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů [16], říká, že inhibice světelné emise bakterií nesmí být větší než 20 % při expozici 15 minut.



### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo připraveno 22 zkušebních tělísek (Tab. 4.), z nichž byly připraveny vodné výluhy a u každého výluhu byl proveden test ekotoxicity na organismu *Sinapis alba* a *Vibrio fischeri*. Dále byly provedeny testy s výluhem samotného odpadu, cementu a se standardy.

Tab. 4. Zkratky připravených tělísek a jejich složení

1C	cement + písek + nátěr	4S	silikon RTV20
2C	cement + písek + nátěr	5S	silikon RTV20 + odpad
3C	cement + písek + nátěr	6S	silikon RTV 20 + odpad
4C	cement + písek	7S	silikon RTV20
5C	cement + odpad + nátěr	8S	silikon LN1522
6C	cement + odpad + nátěr	1A	asfalt + odpad
7C	cement + odpad + nátěr	2A	asfalt + odpad
8C	cement + odpad	3A	asfalt + odpad
1S	silikon LN1522	4A	asfalt
2S	silikon LN1522 + odpad	5A	asfalt
3S	silikon LN1522 + odpad	6A	asfalt

#### 3.1 Výsledky testu inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Byly vytvořeny grafy závislosti inhibice v procentech na logaritmu koncentrace vodného výluhu či standardu. Jednotlivé hodnoty byly proloženy lineární regresí a pásy spolehlivosti. Z grafů byly následně odečteny hodnoty IC50 a rozmezí hodnot se spolehlivostí 95 % (toto rozmezí bude vždy uvedeno v závorce). Veškeré grafy k testům inhibice růstu kořene hořčice bílé jsou uvedeny v Příloze PI. Hodnoty IC50 pro vodné výluhy připravené ze zkušebních těles jsou uvedeny v tabulce Tab. 5.

Pro standard dichroman draselný je hodnota IC50 rovna 15,6 (11,8 – 20,7) mg/l. V Metodickém pokynu MŽP odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů [3] je uvedeno, že běžné rozmezí hodnot IC50 pro tento standard je 10 - 50 mg/l.

Hodnota IC50 pro výluh, který byl připraven z nesolidifikovaného odpadu je rovna 28,5 (22,9 – 35,5) ml/l.

Byl také připraven vodný výluh ze samotného cementu, zde ale nebylo možné určit hodnotu IC50 pro hořčici, protože inhibice růstu kořene nedosahovala 50 %.

Z výsledků uvedených v tabulce Tab. 5. je možné konstatovat, že kontrolní tělíška, která byla připravena jen ze samostatných poživ, nevykazovaly vysokou toxicitu, nebylo zde

možné určit hodnoty IC50. Dále lze z výsledků usoudit, že nejméně efektivní způsob solidifikace daného odpadu byla solidifikace pomocí cementu. V tomto případě byly hodnoty IC50 pro vodné výluhy velmi blížily hodnotě IC50 pro samostatný odpad (tělesa 5C a 8C) nebo byly dokonce nižší a tudíž toxičtější (tělesa 6C a 7C). Důvodem takových výsledků bylo nejspíše to, že se tělíska po dobu testu vyluhování téměř celá rozpadla. Ani tělíska ošetřená nátěrem nevykazovala lepší výsledky. Možným řešením tohoto problému by bylo zvolit jiné poměry cementu a odpadu.

Solidifikace odpadu pomocí asfaltu byla o něco úspěšnější než pomocí cementu, ale i tak stále tyto výluhy vykazovaly určité toxické účinky. Důvodem by mohl být vznik bublinek a kanálků při samostatné solidifikaci, pomocí nichž mohlo dojít k vyplavení zinku z těles.

Nejlépe proběhla solidifikace pomocí silikonů, zde byly hodnoty IC50 nejvyšší. Na základě výsledků testů na hořčici, lze posoudit, že účinnější byl vysokopevnostní silikon pocházející od výrobce Lianhuan Group Limited (označení RTV20).

*Tab. 5. Hodnoty IC50 pro Sinapis alba z vodných výluhů připravených ze zkušebních těles*

Těleso	IC50 [ml/l]	Těleso	IC50 [ml/l]
1C	>1000	4S	>1000
2C	>1000	5S	958,0 (148,8 - 6166,2)
3C	>1000	6S	471,5 (110,7 - 2008,2)
4C	>1000	7S	>1000
5C	33,3 (17,8 - 62,0)	8S	>1000
6C	20,9 (13,4 - 32,4)	1A	129,4 (58,5 - 286,1)
7C	12,7 (10,0 - 16,0)	2A	61,1 (23,4 - 159,3)
8C	28,5 (22,9 - 35,5)	3A	47,3 (23,2 - 96,5)
1S	>1000	4A	>1000
2S	131,9 (44,4 - 391,4)	5A	>1000
3S	355,0 (69,7 - 1807,7)	6A	>1000

U vodných výluhů z některých těles byla určena koncentrace zinku pomocí plamenového atomového absorpčního spektrometru (AAS), hodnoty jsou uvedeny v tabulce Tab. 6.

Při porovnání těchto výsledků s výsledky testů ekotoxicity pomocí hořčice lze konstatovat, že u výluhů z těles, kde byla koncentrace zinku nejvyšší, byla taktéž nejvyšší toxicita a naopak.

Na základě výsledných hodnot IC50 bylo určeno, zda jsou výluhy pro hořčici ekotoxické. Limitní hodnota pro ekotoxicitu je 10 ml/l, pokud je hodnota nižší jedná se o výluh ekoto-

xický. Z výsledků lze vidět, že ekotoxický není dle tohoto testu ani výluh ze samotného odpadu ani žádný další výluh.

Tab. 6. Naměřené hodnoty koncentrace zinku v mg/l pomocí plamenového atomového absorpčního spektrometru

Těleso	$c_{Zn}$ [mg/l]	Těleso	$c_{Zn}$ [mg/l]
2C	1,599	7S	29
3C	2,044	8S	62
6C	1689	1A	385
7C	3260	2A	626
8C	306	3A	418
3S	254	4A	2,171
6S	129	6A	0,181

Je potřeba však upozornit na relativní nepřesnost tohoto testu, chyba měření zde byla téměř vždy poměrně velká. Jak již bylo uvedeno dříve, test byl proveden vždy ve třech paralelních stanoveních. Často však docházelo k tomu, že i na Petriho miskách, ve kterých byla stejná koncentrace výluhu, byly kořínky rozdílně dlouhé, což mohlo způsobovat dané nepřesnosti. Testovací organismus *Sinapis alba* nebyl příliš citlivý na určení ekotoxicity pro tento druh odpadu.

### 3.2 Výsledky bakteriálního bioluminiscenčního testu ekotoxicity

Byly vytvořeny grafy závislosti inhibice v procentech na logaritmu koncentrace, z těchto grafů byly zjištěny hodnoty IC50. Grafy jsou uvedené v Příloze II.

V tabulce Tab. 7. jsou uvedeny hodnoty IC50 pro jednotlivé vodné výluhy ze zkušebních těles.

Roztok síranu zinečnatého, který v tomto testu sloužil jako standard, měl hodnotu IC50 0,08 mg/l. Pro vodný výluh ze samostatného odpadu bylo IC50 pro *Vibrio fischeri* 0,2 ml/l.

Pomocí bakterií byl testován i vodný výluh ze samotného cementu, zde byla hodnota IC50 rovna 1 ml/l. Vysoká toxicita u tohoto výluhu byla způsobena nejspíše v důsledku vysokému pH.

U výluhů ze zkušebních těles, která byla vytvořena jen z jednotlivých poživ, nebylo možné určit IC50 s výjimkou těles tvořených silikonem RTV20. Důvodem neurčení IC50 bylo, že inhibice nedosahovala ani v jednom případě 50 %.

Z výsledků uvedených v tabulce Tab. 7. lze usoudit, že solidifikace byla nejvíce úspěšná při použití silikonů jako pojiv. Nicméně i takto byla toxicita pro bakterie poměrně vysoká. Vodné výluhy u těles solidifikovaných pomocí cementu a asfaltu měly hodnoty IC50 pohybující se okolo 0,2 ml/l, což je hodnota shodná pro výluh samotného odpadu. Zde tedy solidifikace příliš úspěšná nebyla. U tělesa 5C se hodnota od ostatních cementových těles odlišovala. Důvodem by mohlo být, že byl lépe proveden nátěr a nedocházelo tedy k takovému vyluhování odpadu.

Tab. 7. Hodnoty IC50 pro *Vibrio fischeri* z vodných výluhů připravených ze zkušebních těles

Těleso	IC50 [ml/l]	Těleso	IC50 [ml/l]
1C	>100	4S	61,2
2C	>100	5S	2,0
3C	>100	6S	3,7
4C	>100	7S	26,3
5C	1,5	8S	>100
6C	0,3	1A	0,5
7C	0,1	2A	0,2
8C	0,2	3A	0,4
1S	>100	4A	>100
2S	2,0	5A	>100
3S	2,8	6A	>100

Když výsledky testů na *Vibrio fischeri* porovnáme s výsledky měření pomocí plamenového AAS uvedených v tabulce Tab. 6, lze vidět, že hodnoty IC50 a koncentrace zinku ve výluhu sobě odpovídají, to znamená, že například pro nejvyšší hodnotu koncentrace zinku ve vodném výluhu byla naměřena nejnižší hodnota IC 50, což vypovídá také o nejvyšší toxicitě tohoto výluhu.

Bakterie *Vibrio fischeri* byly velmi citlivé na určení toxicity vodných výluhů s obsahem zinku. Dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů [16] je uveden limit pro ekotoxicitu. Ten říká, že inhibice světelné emise bakterií nesmí být větší než 20 % při expozici 15 minut. Při posouzení výsledků bylo zjištěno, že veškeré připravené vodné výluhy, které byly testovány na bakteriích, byly pro tento organismus ekotoxické.

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jakou ekotoxicitu vykazuje vybraný odpad i produkty jeho solidifikace.

Ekotoxicita byla zjišťována pomocí organismu *Sinapis alba* (hořčice bílá) a bakterii *Vibrio fischeri*. Hořčice byla vybrána jako jeden ze čtyř zástupců organismů, které jsou používány na hodnocení ekotoxicity dle platné legislativy ČR. Test s bakteriemi byl vybrán pro jeho jednoduchost a rychlost, tento test je také často využíván pro zjišťování ekotoxicity. Bylo zkoušeno i testování na *Artemia salina*, nicméně tento test se nepodařilo zrealizovat z důvodu nesnadné manipulace s organismy a poměrně velké nepřesnosti testování.

Jako zkoušený odpad byl použit jeden druh odpadu, který měl vysoký obsah zinku. Solidifikace byla provedena pomocí cementu, asfaltu a dvou druhů silikonů. U těles vytvořených ze samotných pojiv ve většině případech nešla určit hodnota IC50. Solidifikace byla dle obou testů ekotoxicity i plamenového AAS neúčinnější u těles vytvořených pomocí silikonů. Přičemž podle testu na hořčici měly lepší výsledky tělesa se silikonem RTV20, pro bakterie byla účinnost u obou silikonů obdobná, ale silikon RTV20 byl pro bakterie více toxický. Tělesa připravená pomocí cementu a asfaltu měla velmi podobné výsledky, nicméně při porovnání všech metod lze říct, že cement byl méně účinný než asfalt.

Výsledky obou testů ekotoxicity poukazují na to, že mnohem větší citlivost pro tento druh odpadu měly bakterie *Vibrio fischeri*. Bakterie měly hodnoty IC50 mnohem nižší než hořčice.

Ekotoxicita byla určována na základě limitů, které jsou uvedeny ve Vyhlášce č. 94/2016 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů [16]. Limit pro hořčici nebyl ani v jednom z testovaných výluhů překročen. Znamená to tedy, že ani výluh z nesolidifikovaného odpadu ani výluhy z těles nebyly ekotoxické pro hořčici. Bakterie *Vibrio fischeri* měly však zcela odlišné výsledky. Dle limitu byly veškeré připravené výluhy ekotoxické, dokonce i výluhy připravené jen ze samotných pojiv.

Na základě těchto výsledků by měl být odpad zařazen jako ekotoxický, ale dle naší platné legislativy by muselo být testování provedeno na čtyřech testovacích organismech, proto lze výsledky z této bakalářské práce brát pouze jako orientační.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ANDĚL, Petr. Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [2] FARGAŠOVÁ, Agáta. Enviromentálna toxikológia a všeobecná ekotoxikológia. Bratislava: Orman, 2008. ISBN 978-80-969675-6-8.
- [3] METODICKÝ POKYN MŽP odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů [online]. [cit. 2016-11-15]. Dostupné z: [http://www.eurochem.cz/files/texts/MP\\_ekotoxicita.pdf?PHPSESSID=fb8d5b03efa341b152e873911e4008e6](http://www.eurochem.cz/files/texts/MP_ekotoxicita.pdf?PHPSESSID=fb8d5b03efa341b152e873911e4008e6)
- [4] TICHÁ, Marcela. Ekotoxikologické hodnocení odpadů. Zlín, 2001. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [5] DVOŘÁK, Vladimír. Porovnání ekotoxikologických a mikrobiologických testů při hodnocení zátěže půdy. Praha, 2009. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- [6] HLAVATÁ, Miluše. Odpadové hospodářství. 1. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská -Technická univerzita Ostrava, 2004. ISBN 8024807378.
- [7] KIZLINK, Juraj. Nakládání s odpady. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. ISBN 978-80-214-3348-9.
- [8] Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů [online]. [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: [http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/8FC3E5C15334AB9DC125727B00339581/%24file/Z%20185\\_2001.pdf](http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/8FC3E5C15334AB9DC125727B00339581/%24file/Z%20185_2001.pdf)
- [9] HANULIAKOVÁ, L. Vyluhovací testy pro solidifikované odpady. Zlín, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [10] KOČÍ, Vladimír, VÝZNAM TESTŮ TOXICITY PRO HODNOCENÍ VLIVŮ LÁTEK NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ. Chemické listy, **100**, [online], 2006, 882 - 888 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_10\\_882-888.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_10_882-888.pdf)
- [11] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCO VÁ. Ekotoxikologie pro chemiky. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.

- [12] KOMÍNKOVÁ, Dana. Ekotoxikologie. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2008. ISBN 978-80-01-04058-4.
- [13] KOPP, Radovan, Klára HILSCHEROVÁ a Eva POŠTULKOVÁ. Základy vodní ekotoxikologie. Vydání: první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-334-9.
- [14] BALLNÉROVÁ, Petra. Ekotoxikologické testy a jejich aplikace k hodnocení vedlejších energetických produktů. Brno, 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická.
- [15] DYMÁK, Michal. Hodnocení ekotoxicity vytěžených a dnových sedimentů ekotoxikologickými testy výluhů. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta.
- [16] Vyhláška č. 94/2016 Sb. O hodnocení nebezpečných vlastností odpadů [online]. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-94>
- [17] SVOBODOVÁ, Zdeňka. *Ekotoxikologie: praktická cvičení*. Brno, 2000. Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-85114-95-X.
- [18] JOHNOVÁ, Jitka. Kritické srovnání testů ekotoxicity používaných pro hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadů H14 ekotoxicita v zemích evropské unie. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta.
- [19] SILVA, Aurora, Sonia A. FIGUEIREDO, M. Goreti SALES, Cristina DELERUE-MATOS. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* - A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of hazardous materials* 2009, **167**, 179-185. ISSN 0304-3894.
- [20] PAVLOVSKÝ, Jiří. Cvičení z ekotoxikologických testů. Ostrava, 2015 [online]. [cit. 2016-11-27]. Dostupné z: <https://www.fmmi.vsb.cz/export/sites/fmmi/617/cs/kestazeni/EKOTOXIKOLOGICKI-TESTY-cviceni.pdf>
- [21] KOUTNY, Marek a Linda ZAORALKOVA. Miniaturized kinetic growth inhibition assay with denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans*. *Chemosphere* 2005, **60**, 49-54. ISSN 0045-6535.
- [22] SILVA, Marcos A. R., Renan C. TESTOLIN, Alcione P. GODINHO-CASTRO, Albertina X. R. CORREA, Claudemir M. RADETSKI. Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: Chemical or ecotoxicologi-

- cal hazard evaluation?. Journal of hazardous materials 2011, **192**, 1108-1113. ISSN 0304-3894.
- [23] RUIZ-PUENTE, Carmen, Angel IRABIEN. Environmental behavior of cement-based stabilized foundry sludge products incorporating additives. Journal of hazardous materials 2004, **109**, 45-52. ISSN 0304-3894.
- [24] SAMARAS, P., C. A. PAPADIMITRIOU, I. HARITOU, A. I. ZOUBOULIS. Investigaton of sewage sludge stabilization potential by the addition of fly ash and lime. Journal of hazardous materials 2011, **154**, 1052-1059. ISSN 0304-3894.
- [25] SUKAMDAR, Tri PADMI, Masaru TANAKA, Isao AOYAMA. Chemical stabilization of medical waste fly ash using chelating agent and phosphates: Heavy metals and ecotoxicity evaluation. Waste management 2009, **29**, 2065-2070. ISSN 0956-053X.
- [26] MARŠÁLKOVÁ Eliška, Jitka MALÁ. Vliv solidifikace na vyluhovatelnost těžkých kovů z popílku a ekotoxicitu výluhů. Chemické listy 2009, **103** [online], 595 - 598 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_595-598.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_595-598.pdf)
- [27] BEDNARIK, Vratislav, Milan VONDRUSKA, Marek KOUTNY. Stabilization/solidification of galvanic sludges by asphalt emulsions. Journal of hazardous materials 2005, **122**, 139-145. ISSN 0304-3894.
- [28] HŘIVNOVÁ, P. Optimalizace solidifikační receptury pomocí vícefaktorové regresní analýzy. Zlín, 2016. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [29] SYNEK, V. Regresní analýza [online]. Výukový materiál. [cit. 2010-06-14]. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~synek/statistika/prednasky/less8reg2.doc>.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AAS	Atomová absorpční spektroskopie.
ČR	Česká republika.
ČSN	Česká státní norma.
ČSN EN	Česká technická norma.
EC50	Efektivní koncentrace, koncentrace která vyvolá sledovaný účinek u 50 % testovaných organismů.
EU	Evropská unie.
IC50	Inhibiční koncentrace, koncentrace která způsobí 50% inhibici sledovaného jevu.
ISO	International Standardization Organisation.
LC50	Střední smrtná dávka vztažená na hmotnost organismu.
LN1522	Silikon Lukopren N 1522.
LOAEL	Lowest observed adverse effect concentration level (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky na testovaný organismus).
MŽP	Ministerstvo životního prostředí.
NOAEL	No observed adverse effect concentration level (nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které nejsou pozorovány účinky na testovaný organismus).
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development.
RTV20	Vysokopevnostní silikon, výrobce Lianhuan Group Limited.
S/S	Stabilizace/solidifikace.
TCLP	Toxicity characteristic leaching procedure.
TU	Jednotka toxicity.
ŽP	Životní prostředí.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Postupový diagram testů k hodnocení ekotoxicity [14] .....	17
Obr. 2. <i>Daphnia magna</i> [14] .....	18
Obr. 3. <i>Artemia salina</i> [14] .....	20

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Objem standardu a ředící vody pro test klíčivosti a růstu kořene .....	35
Tab. 2. Množství chemických látek potřebných pro kultivaci 1 l kultivačního média .....	36
Tab. 3. Množství chemických látek potřebných pro 100 ml rekonstitučního pufru .....	36
Tab. 4. Zkratky připravených tělísek a jejich složení .....	41
Tab. 5. Hodnoty IC50 pro <i>Sinapis alba</i> z vodných výluhů připravených ze zkušebních těles .....	42
Tab. 6. Naměřené hodnoty koncentrace zinku v g/l nebo µg/l pomocí plamenového atomového absorpčního spektrometru .....	43
Tab. 7. Hodnoty IC50 pro <i>Vibrio fischeri</i> z vodných výluhů připravených ze zkušebních těles .....	44

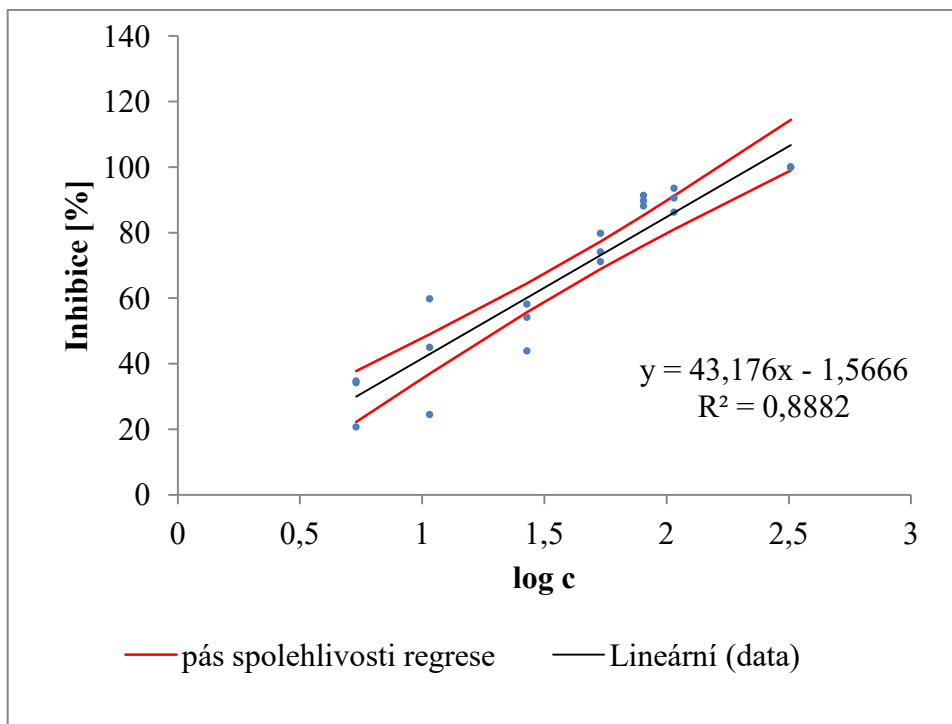
**SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha PI Grafy závislosti inhibice růstu kořene na logaritmu koncentrace pro hořčici bílou

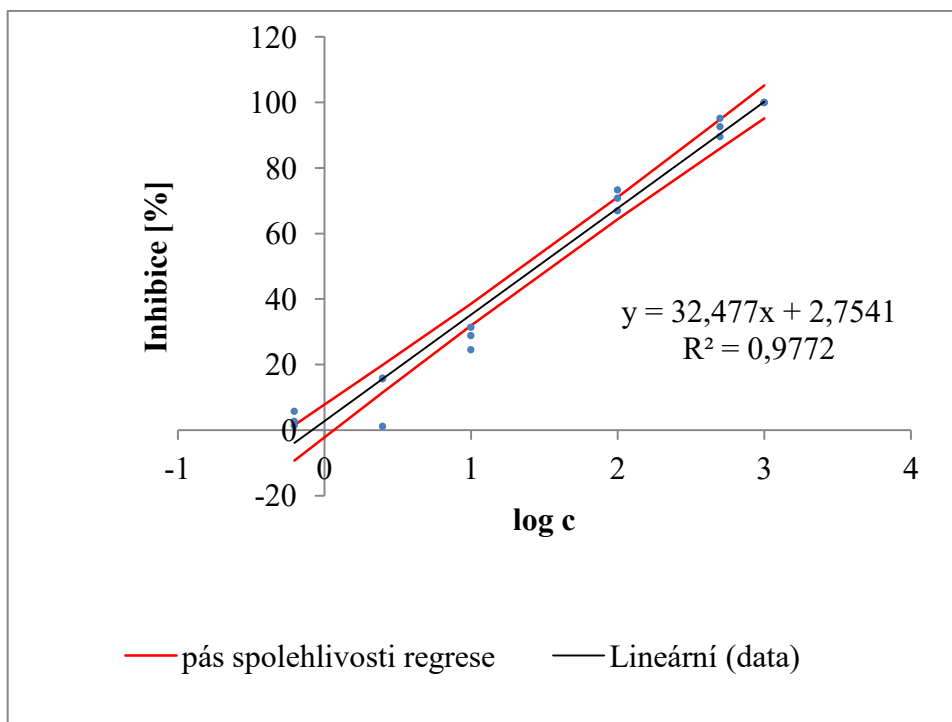
Příloha PII Grafy závislosti inhibice luminiscence na logaritmu koncentrace pro bakterie *Vibrio fischeri*

## PŘÍLOHA P I: GRAFY ZÁVISLOSTI INHIBICE RŮSTU KOŘENE NA LOGARITMU KONCENTRACE PRO HOŘČICI BÍLOU

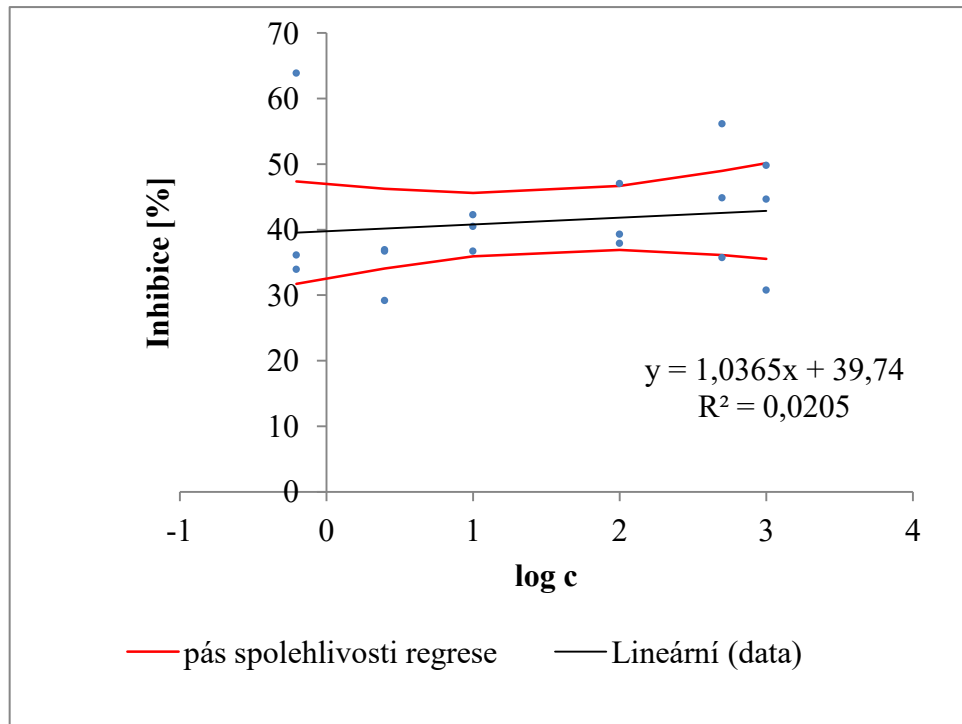
A) Pro standard (dichroman draselný)



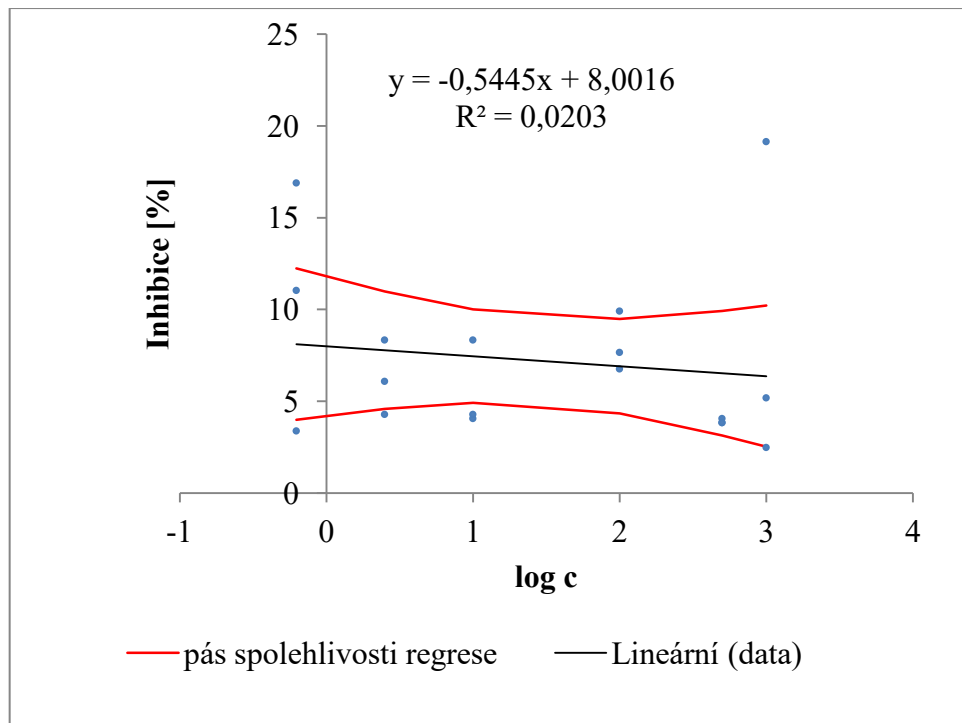
B) Pro vodný výluh z nesolidifikovaného odpadu



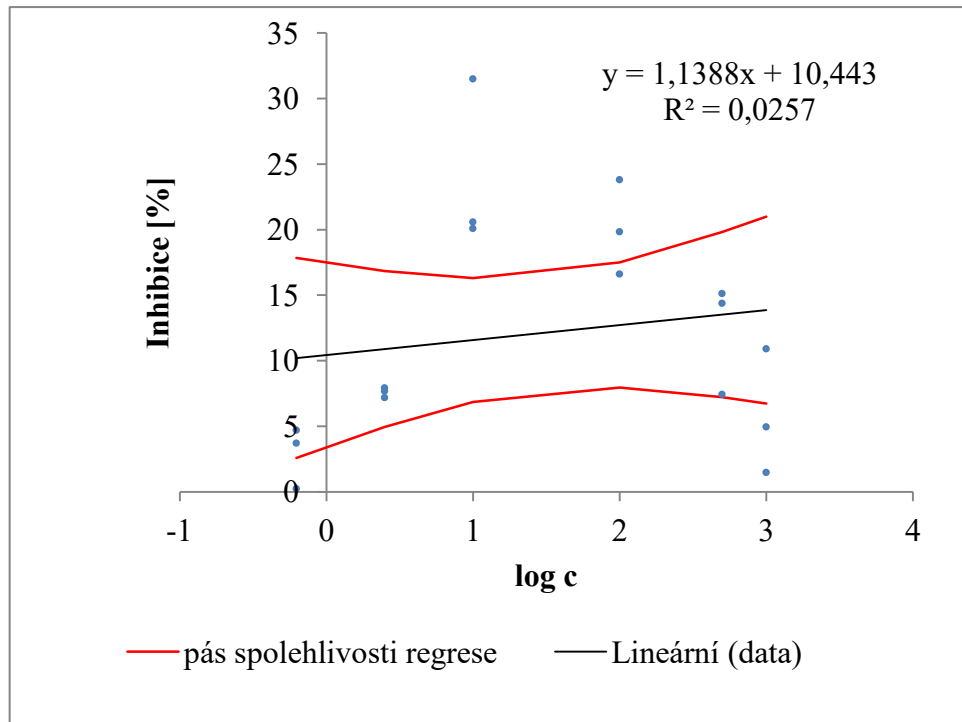
C) Pro vodný výluh z cementu



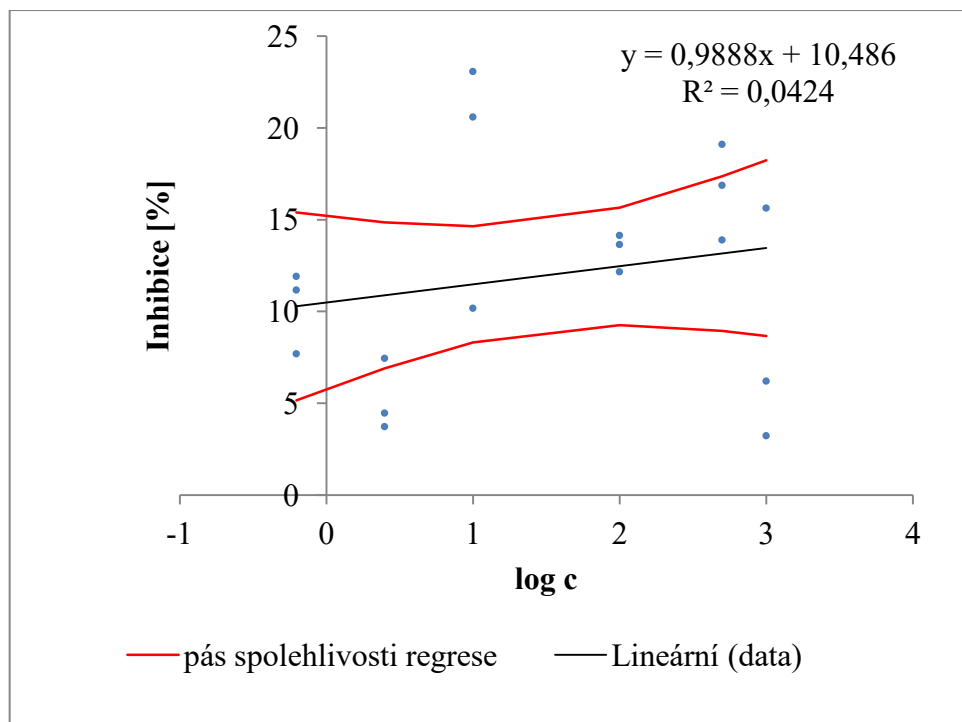
D) Pro vodný výluh tělesa 1C (cement + písek + nátěr)



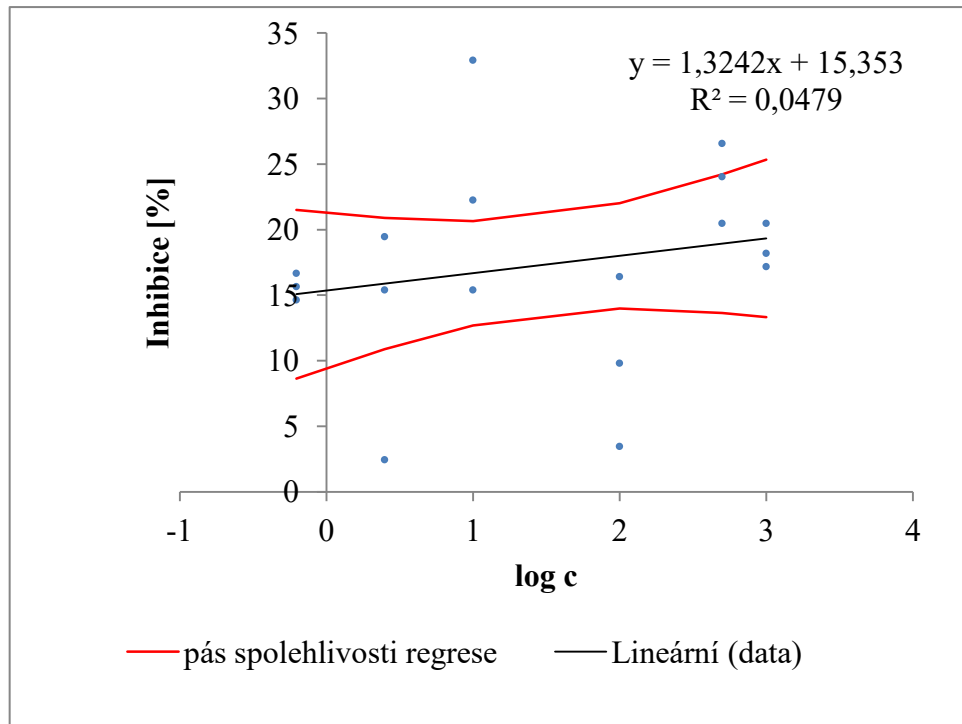
E) Pro vodný výluh tělesa 2C (cement + písek + nátěr)



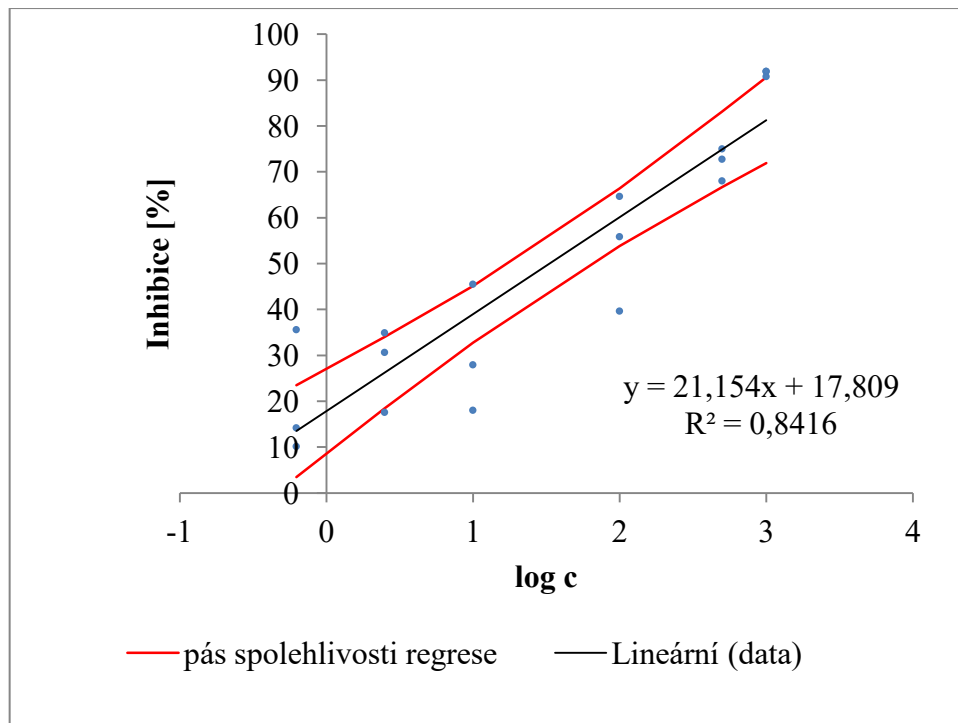
F) Pro vodný výluh tělesa 3C (cement + písek + nátěr)



G) Pro vodný výluh tělesa 4C (cement + písek)

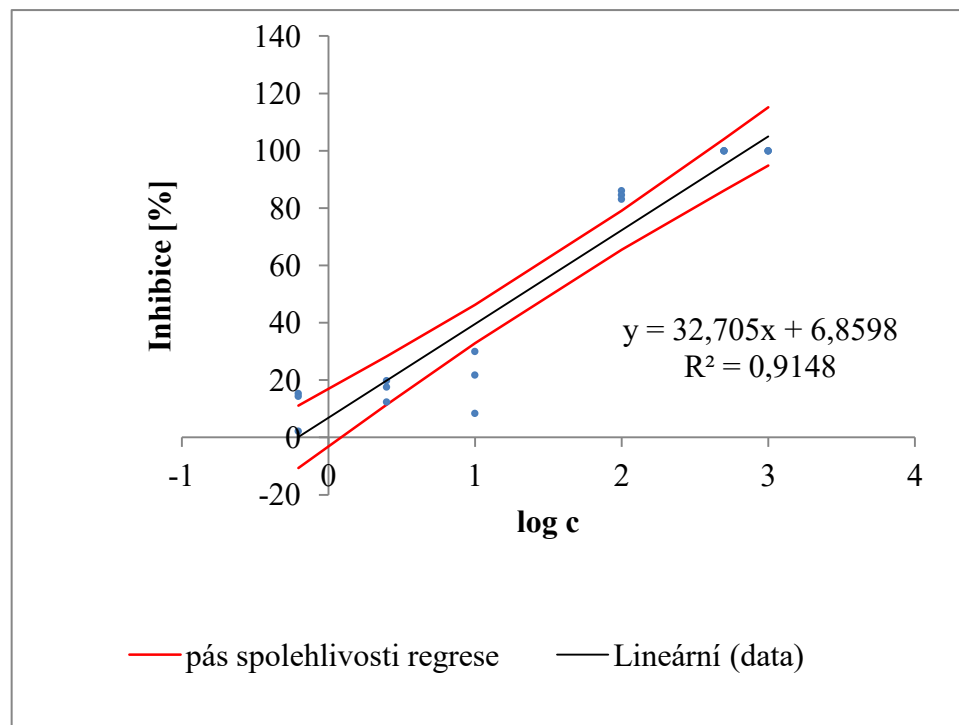


H) Pro vodný výluh tělesa 5C (cement + odpad + nátěr)

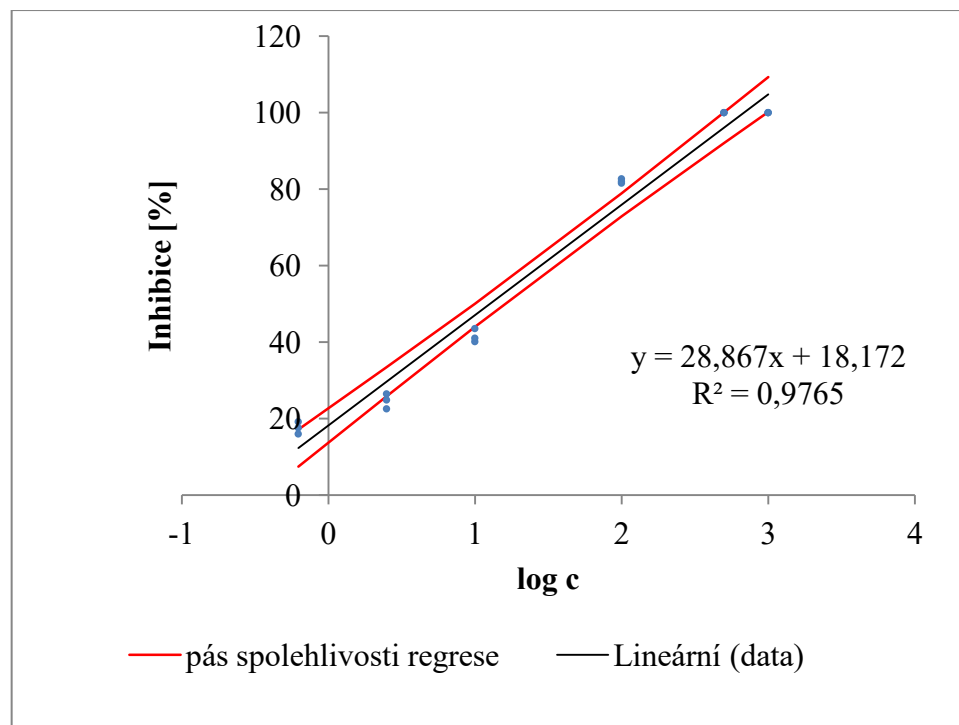




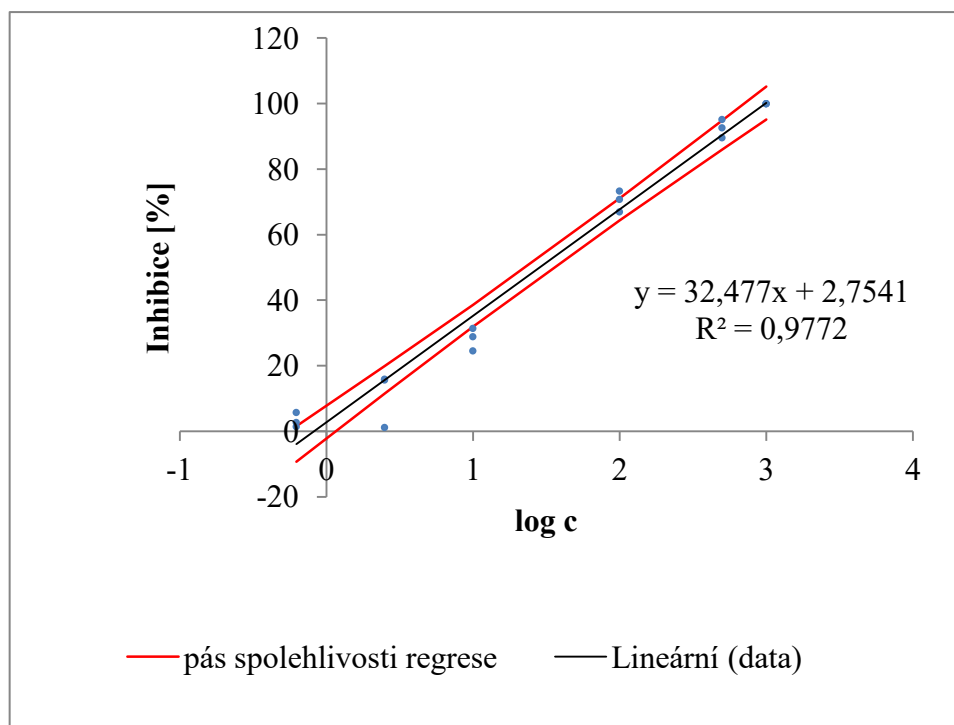
I) Pro vodný výluh tělesa 6C (cement + odpad + nátěr)



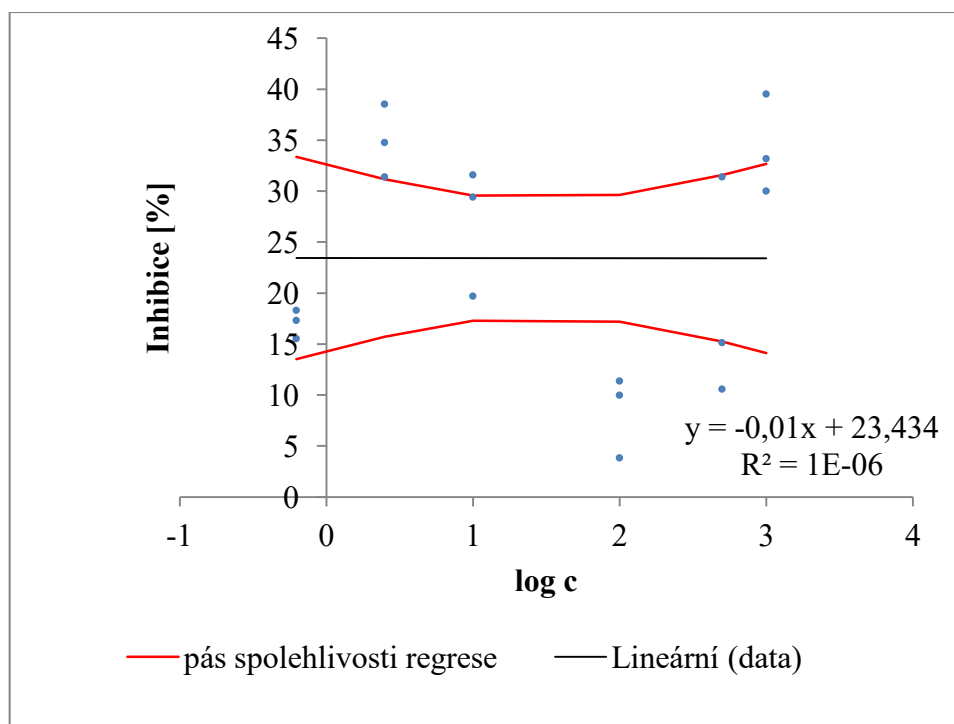
J) Pro vodný výluh tělesa 7C (cement + odpad + nátěr)



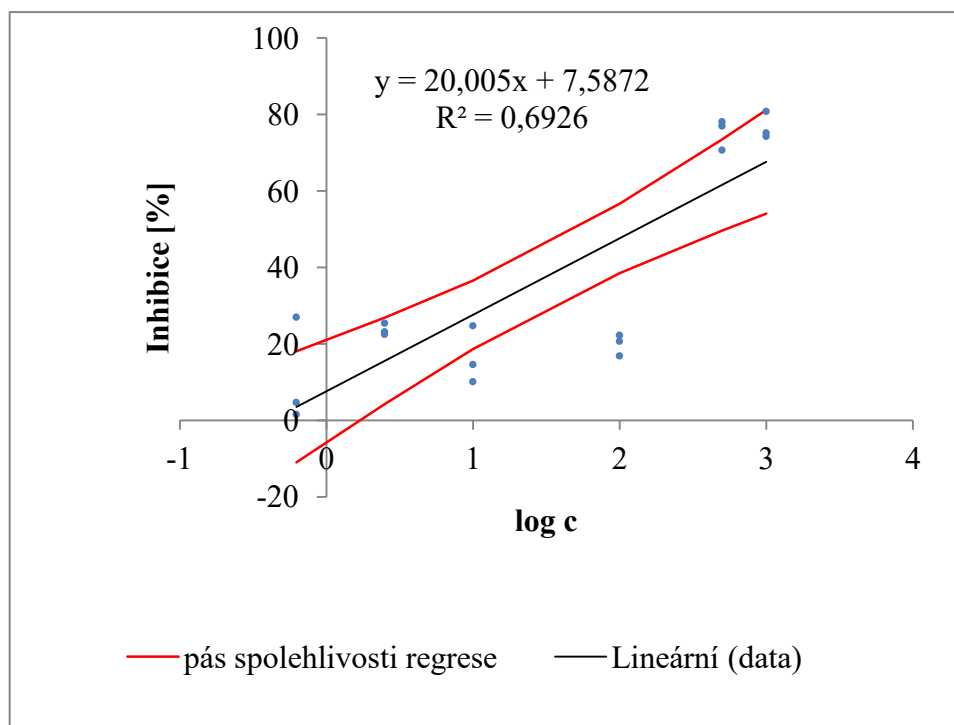
K) Pro vodný výluh tělesa 8C (cement + odpad)



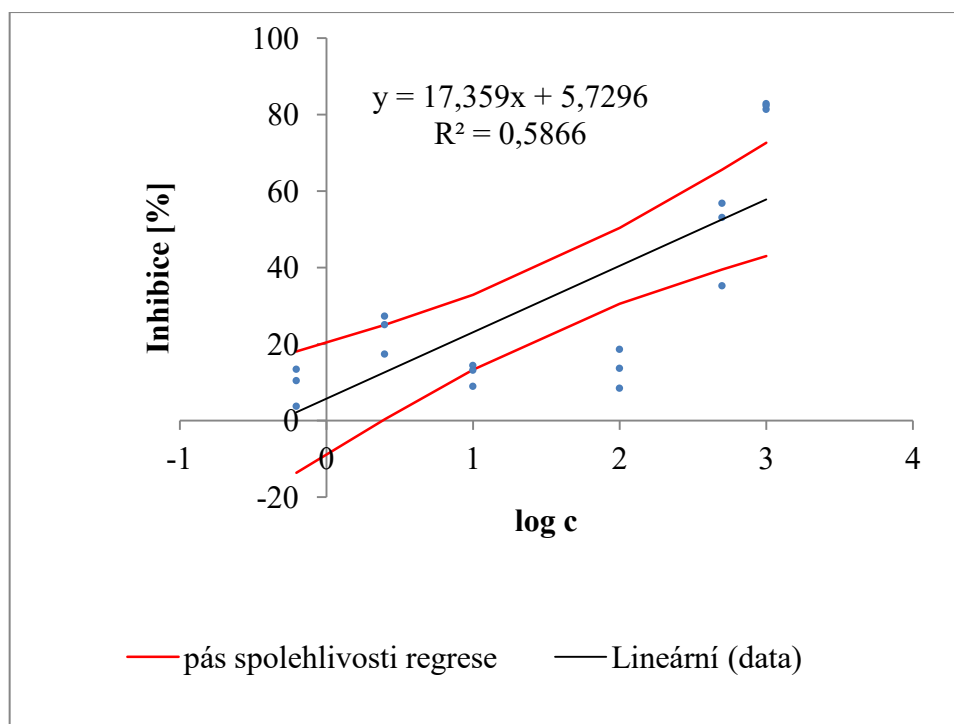
L) Pro vodný výluh tělesa 1S (silikon LN1522)



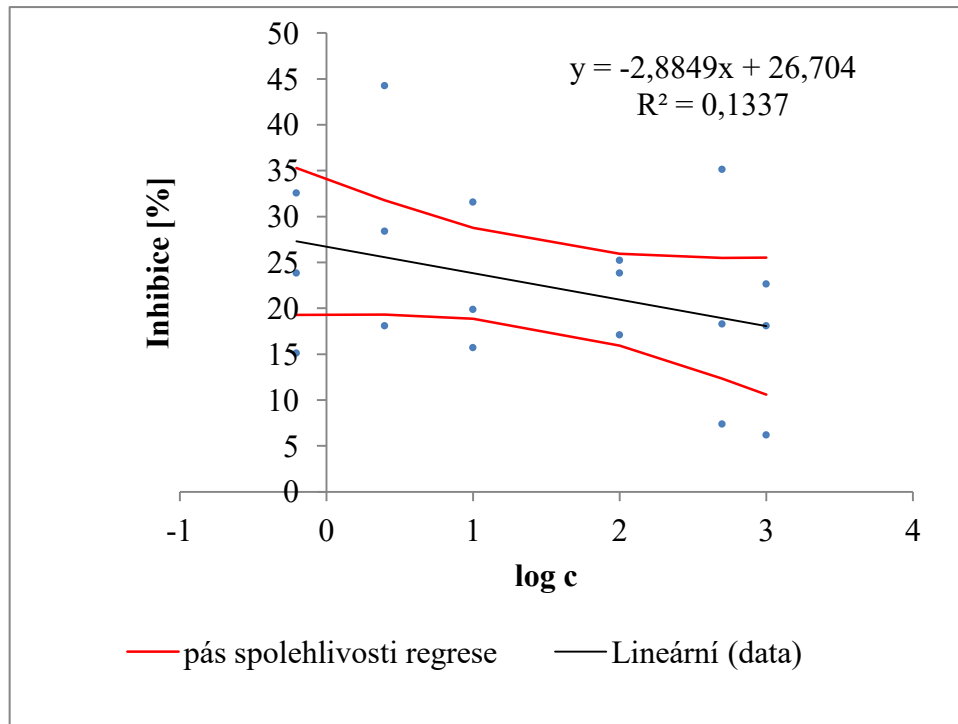
M) Pro vodný výluh tělesa 2S (silikon LN1522 + odpad)



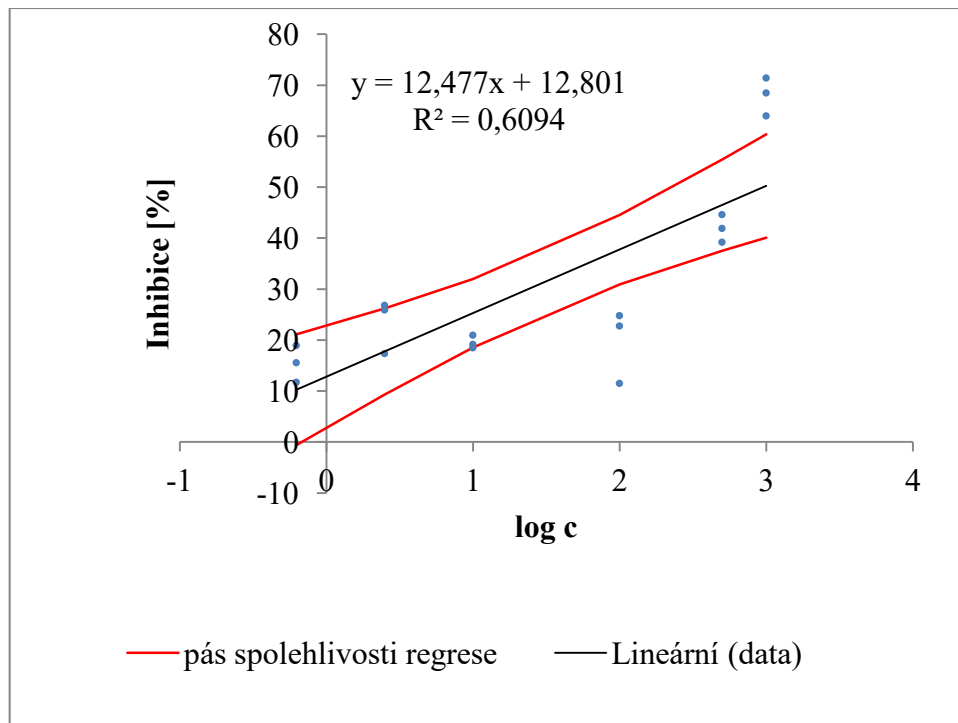
N) Pro vodný výluh tělesa 3S (silikon LN1522 + odpad)



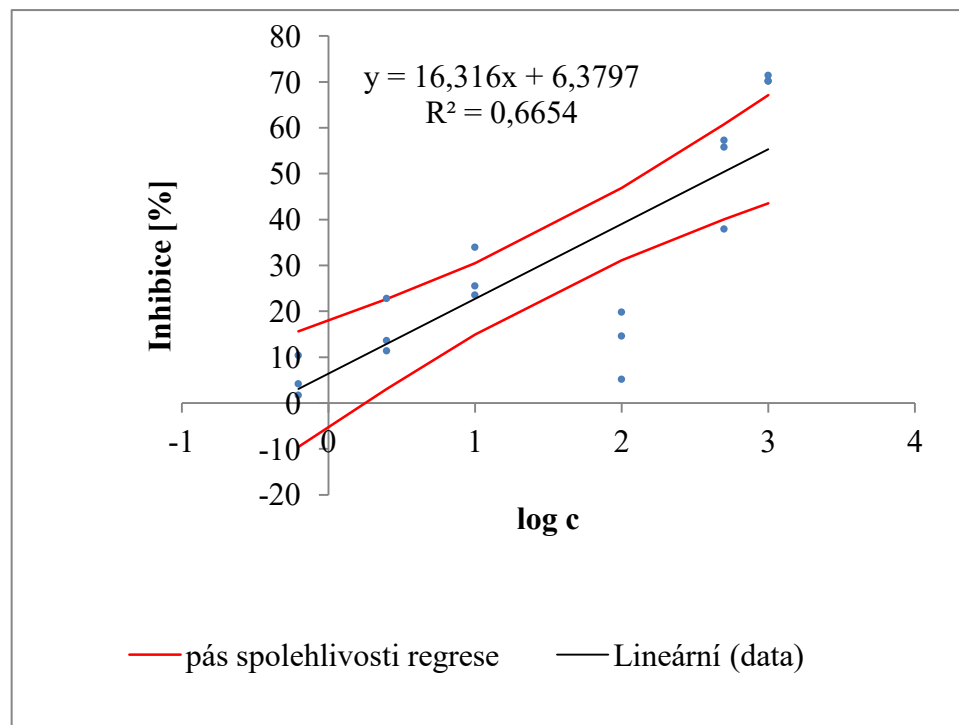
O) Vodný výluh tělesa 4S (silikon RTV20)



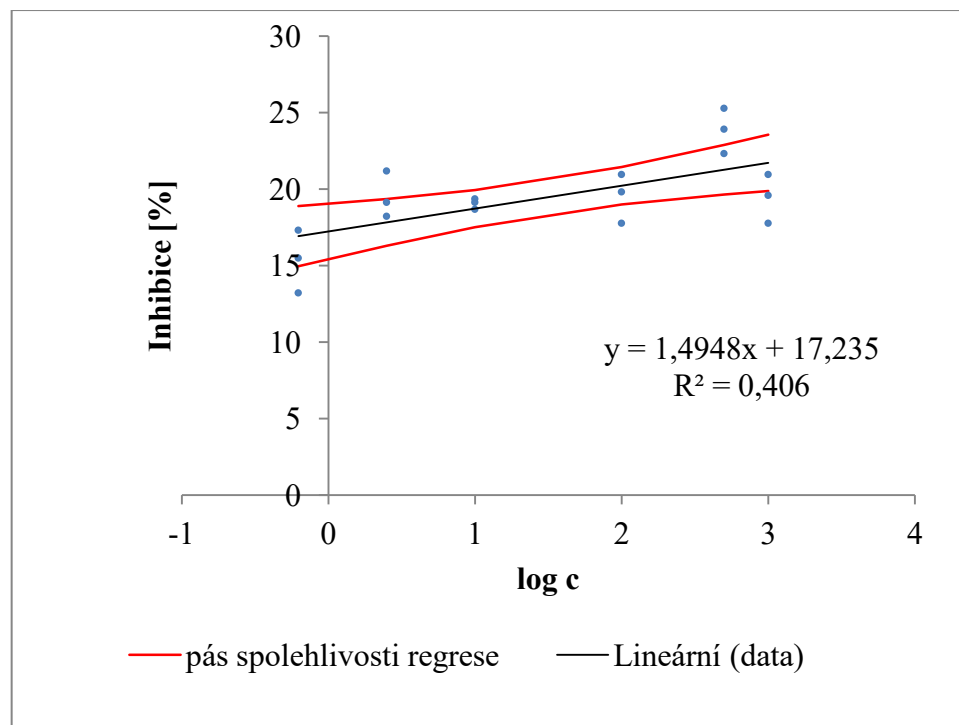
P) Pro vodný výluh tělesa 5S (silikon RTV20 + odpad)



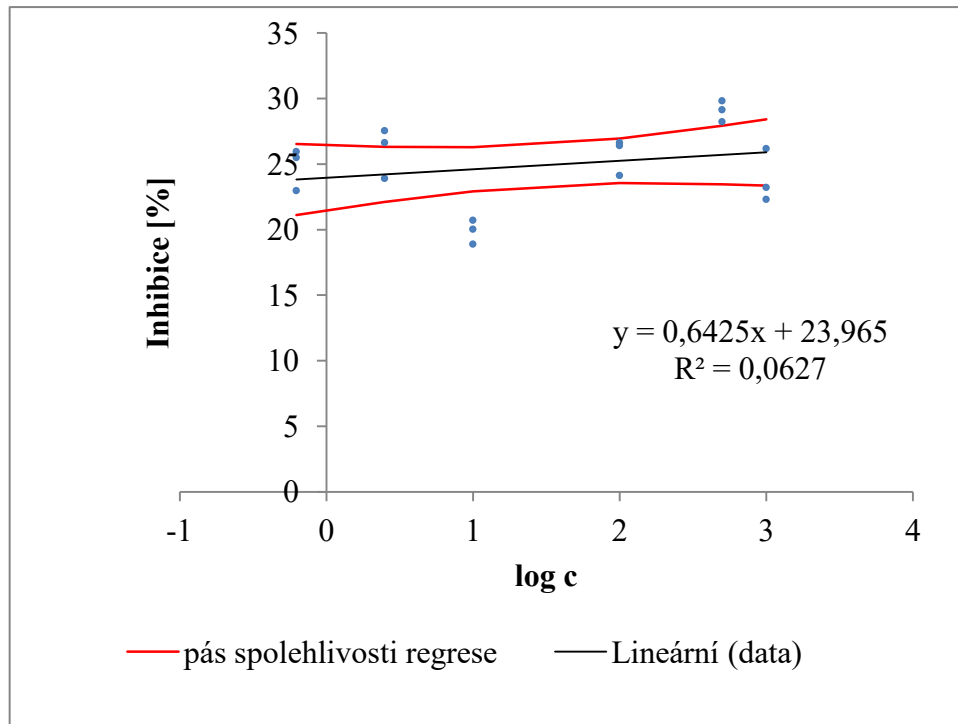
Q) Pro vodný výluh 6S (silikon RTV20 + odpad)



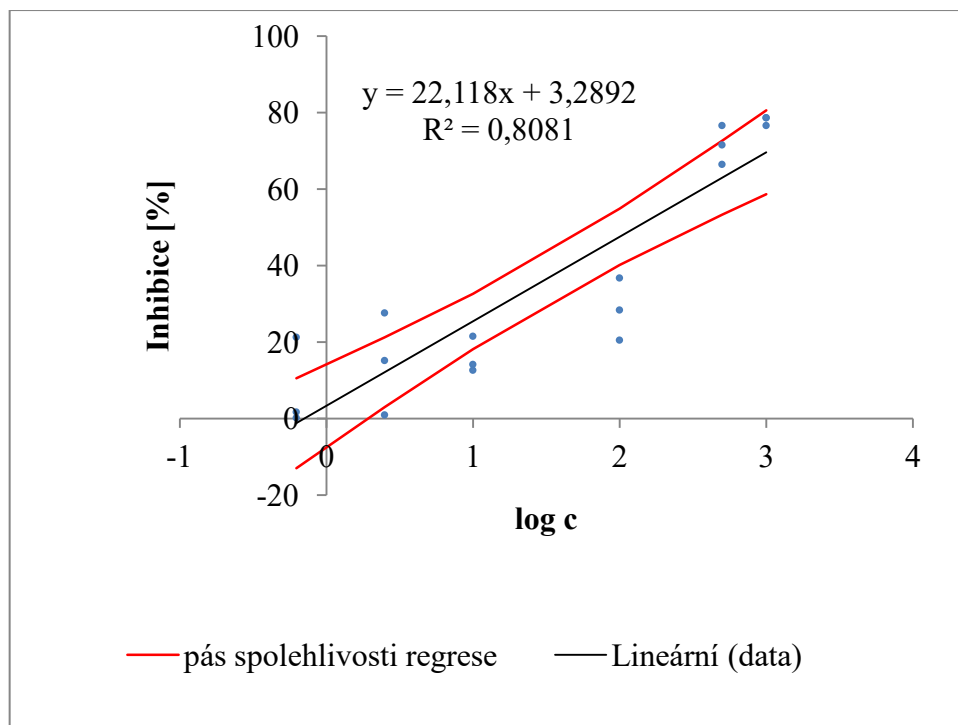
R) Pro vodný výluh tělesa 7S (silikon RTV20)



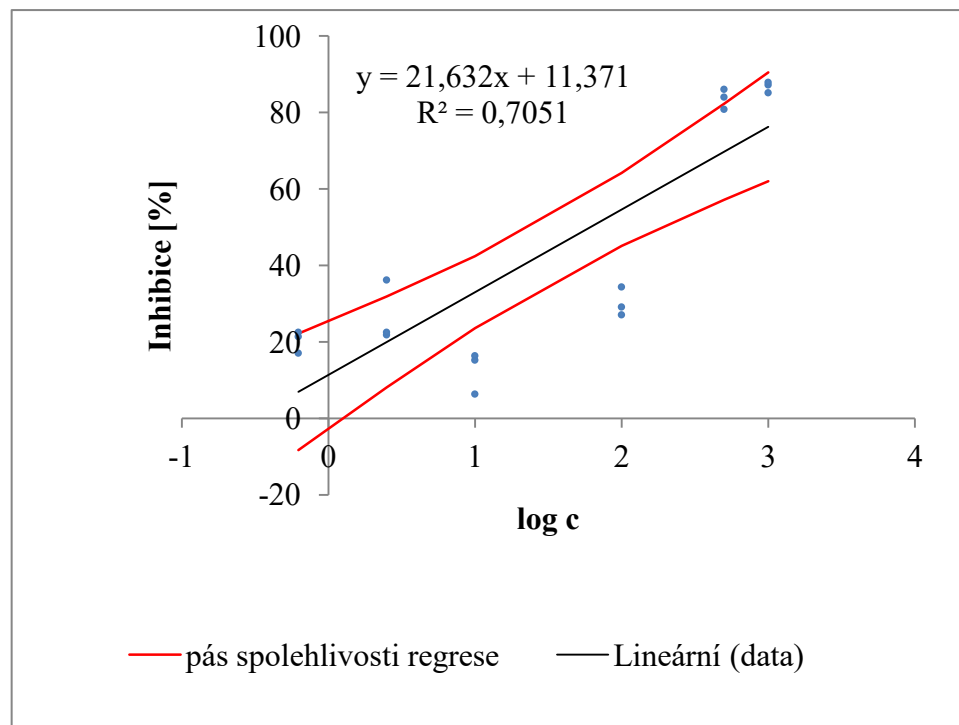
S) Pro vodný výluh tělesa 8S (silikon LN1522)



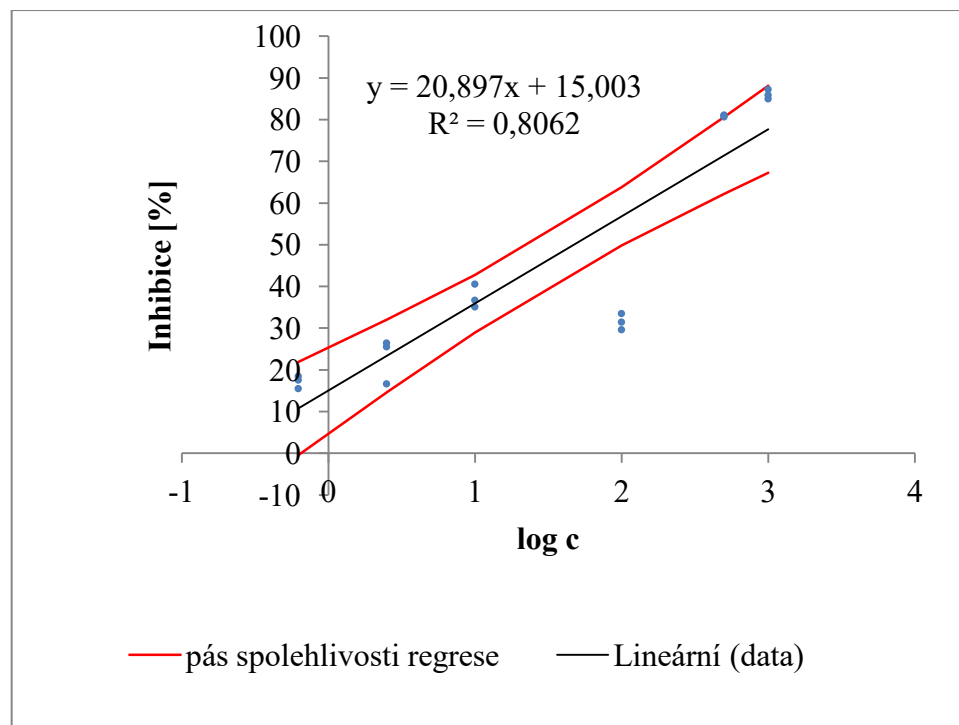
T) Pro vodný výluh tělesa 1A (asfalt + odpad)



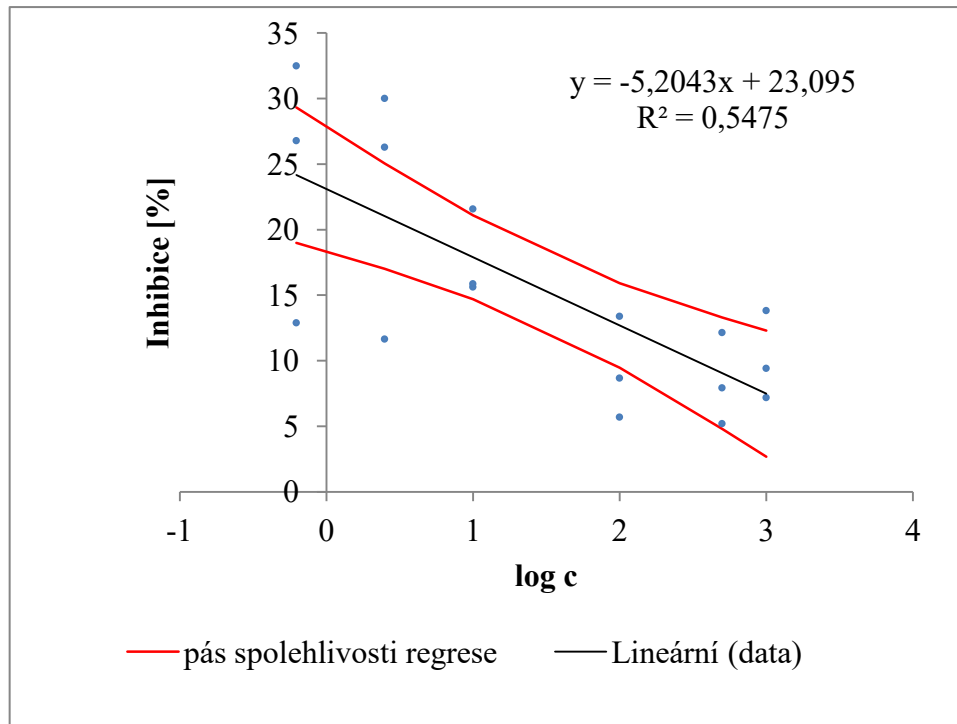
U) Pro vodný výluh tělesa 2A (asfalt + odpad)



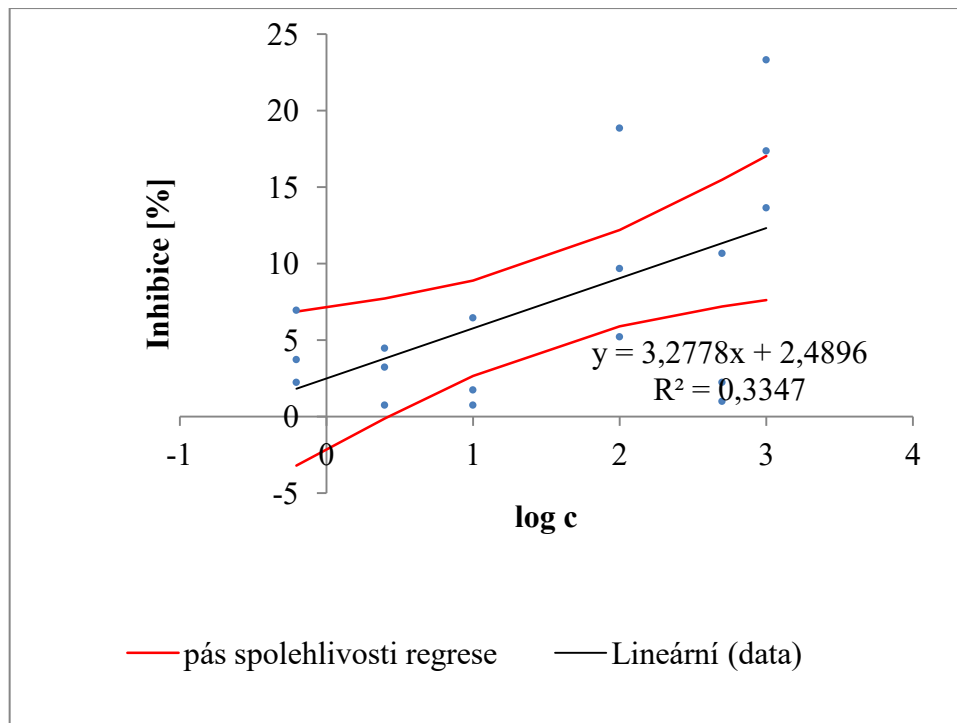
V) Pro vodný výluh tělesa 3A (asfalt + odpad)



W) Pro vodný výluh tělesa 4A (asfalt)

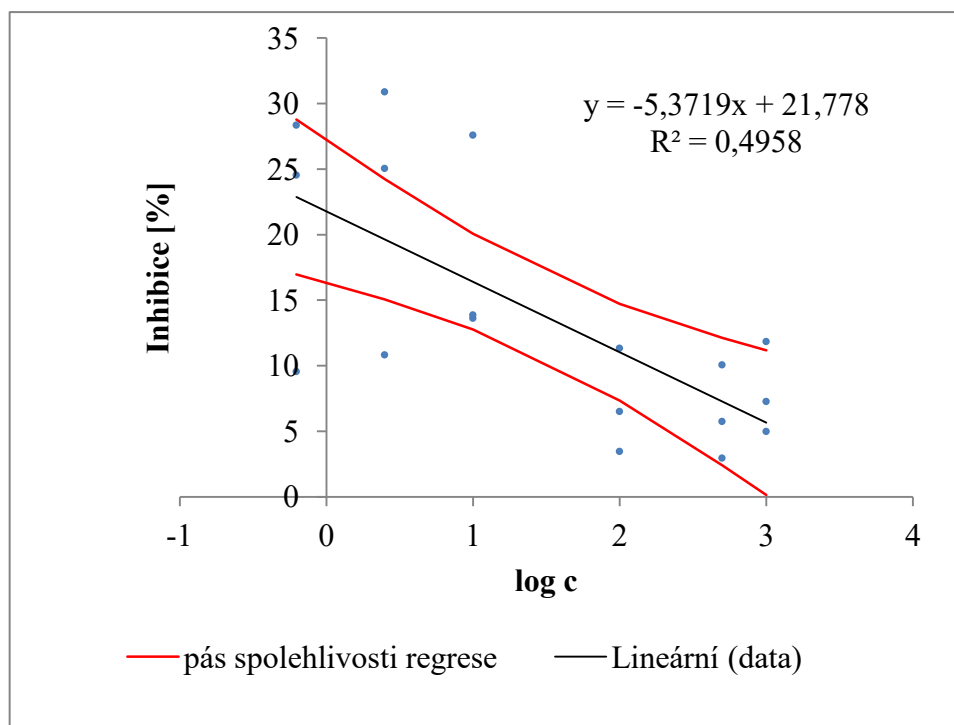


X) Pro vodný výluh tělesa 5A (asfalt)



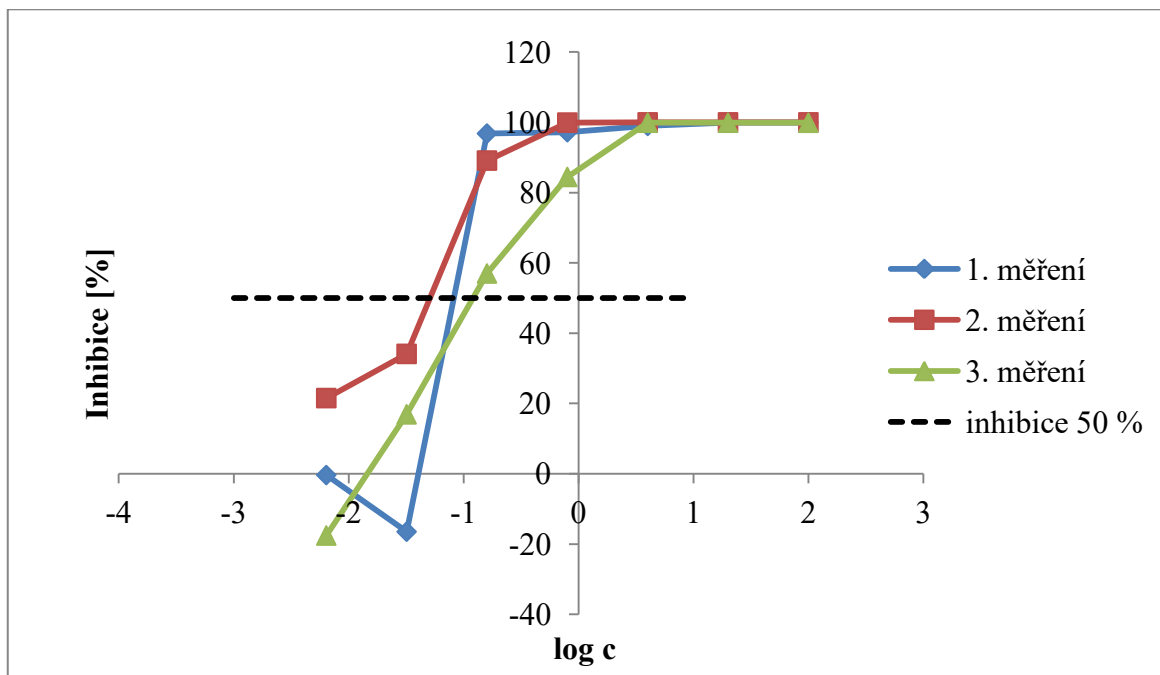


Y) Pro vodný výluh tělesa 6A (asfalt)

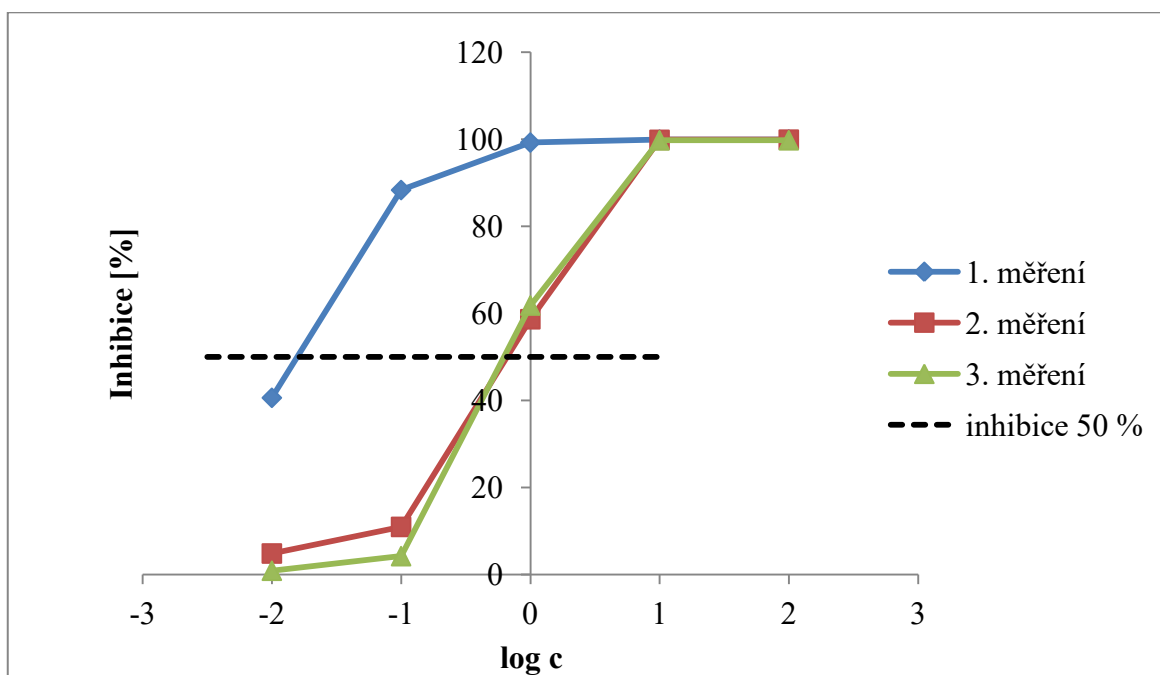


## PŘÍLOHA P II: GRAFY ZÁVISLOSTI INHIBICE LUMINISCENCE NA LOGARITMU KONCENTRACE PRO BAKTERIE VIBRIO FISCHERI

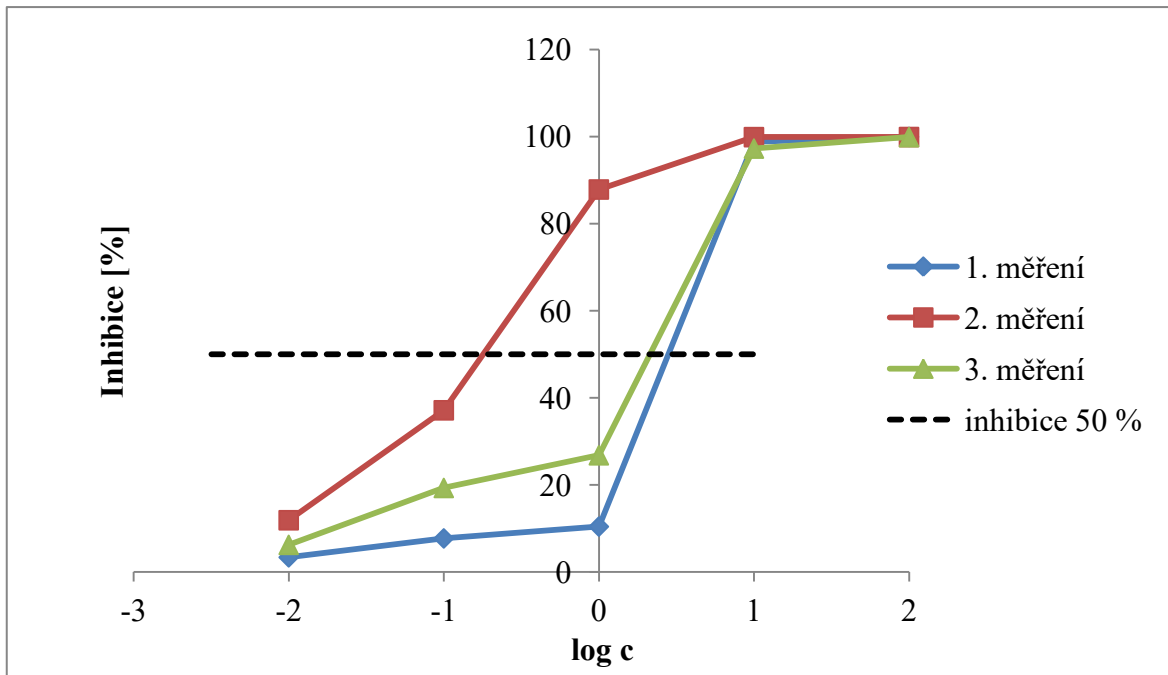
A) Pro standard (roztok síranu zinečnatého)



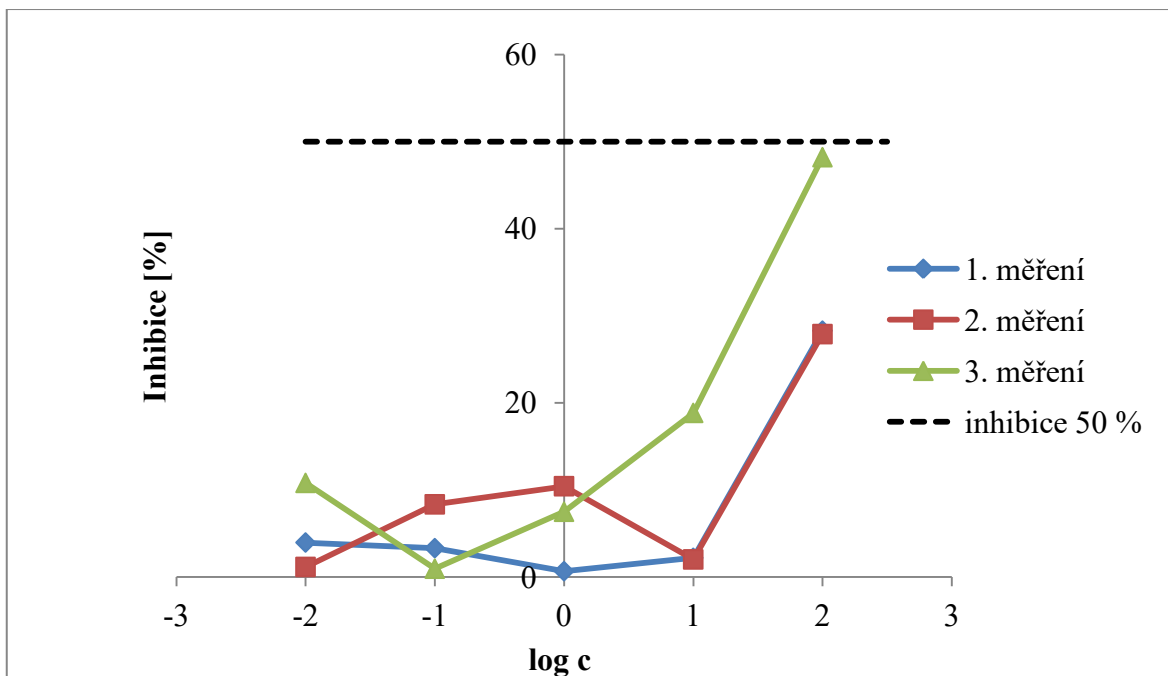
B) Pro vodný výluh z nesolidifikovaného odpadu



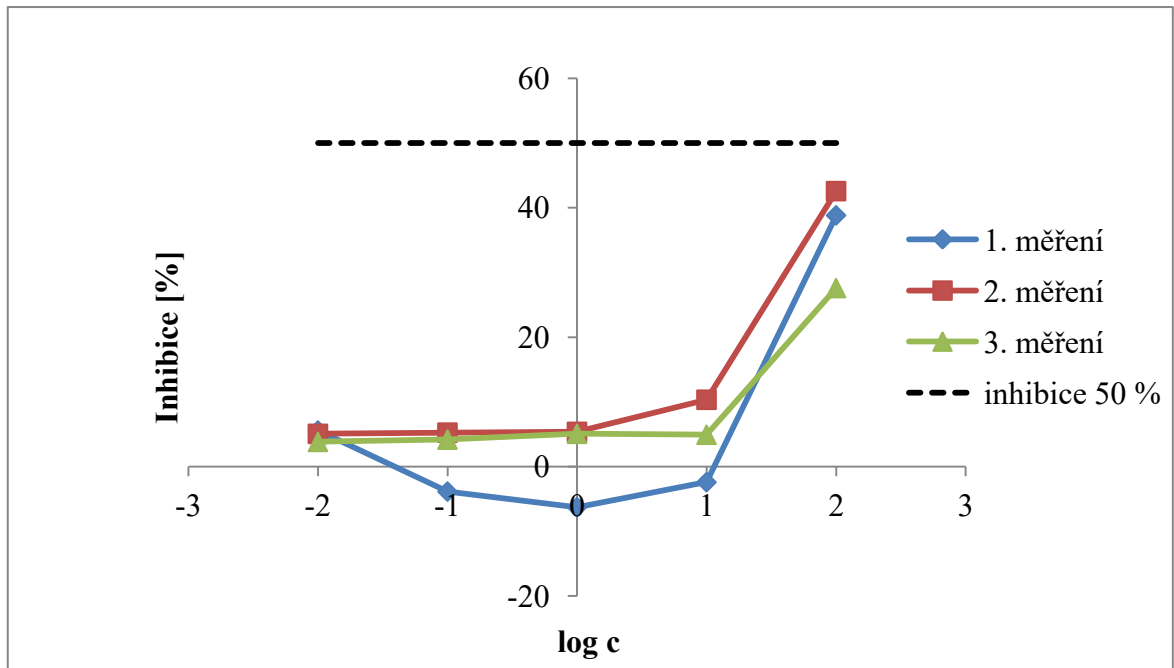
C) Pro vodný výluh z cementu



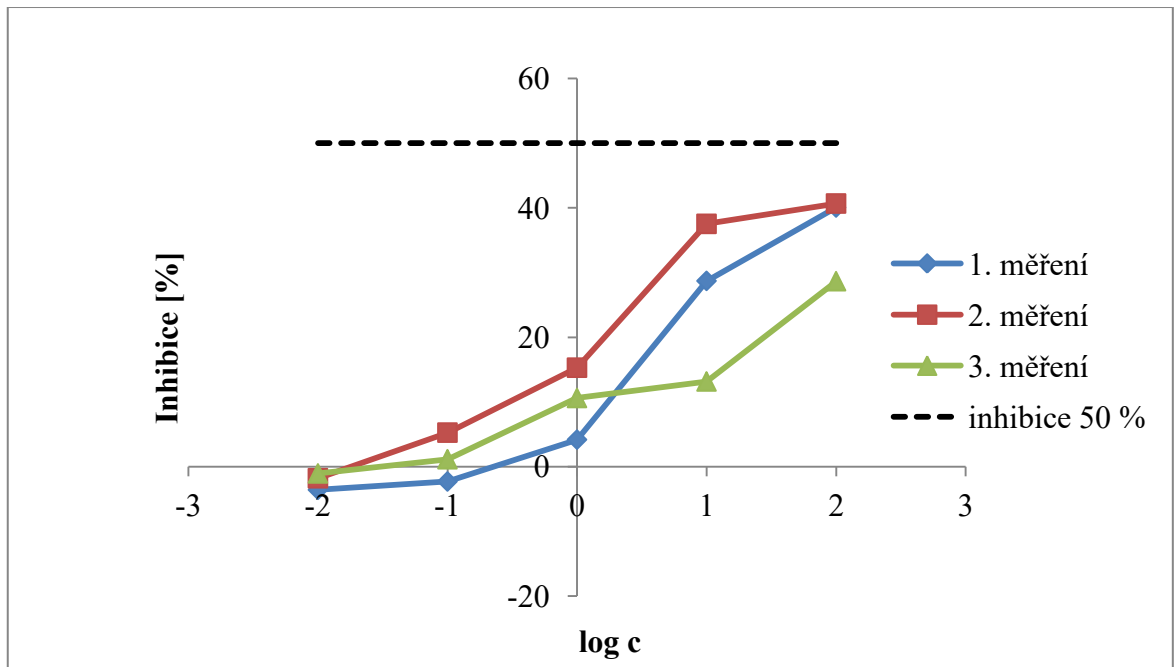
D) Pro vodný výluh tělesa 1C (cement + písek + nátěr)



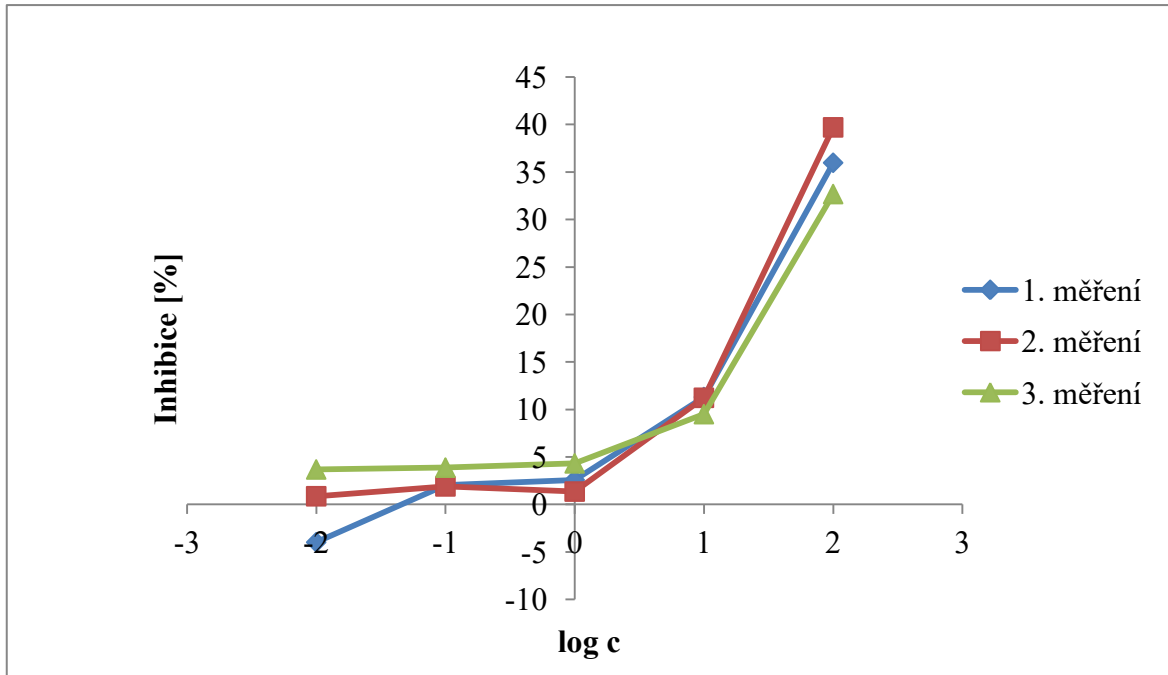
E) Pro vodný výluh tělesa 2C (cement + písek + nátěr)



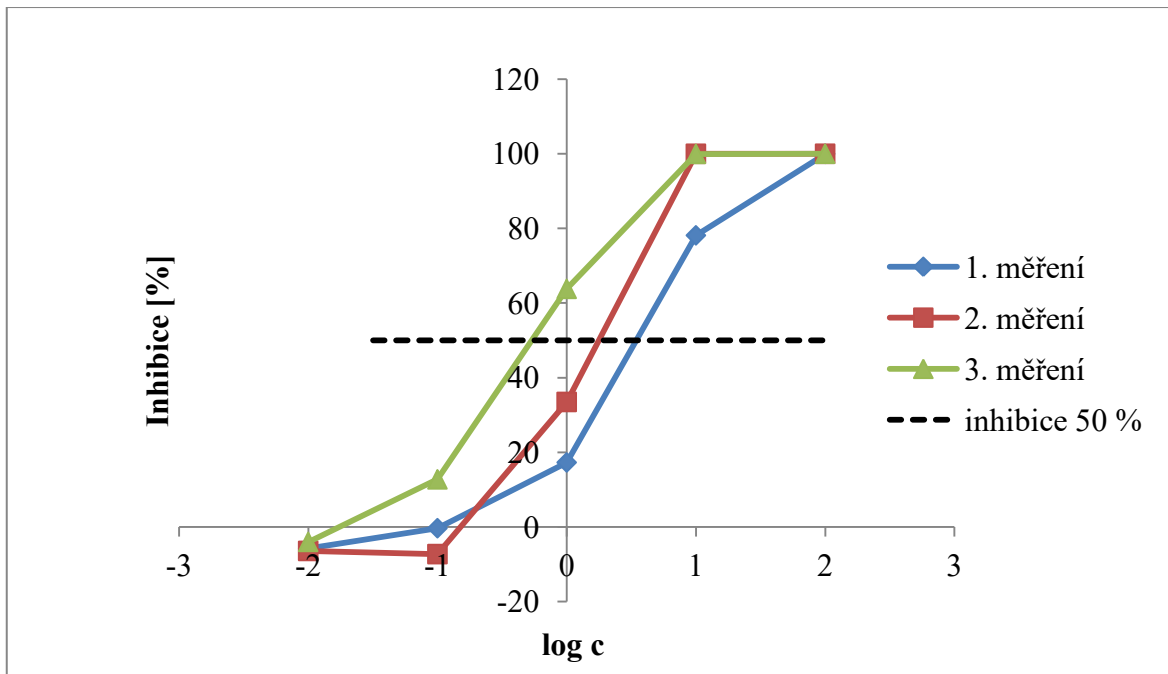
F) Pro vodný výluh tělesa 3C (cement + písek + nátěr)



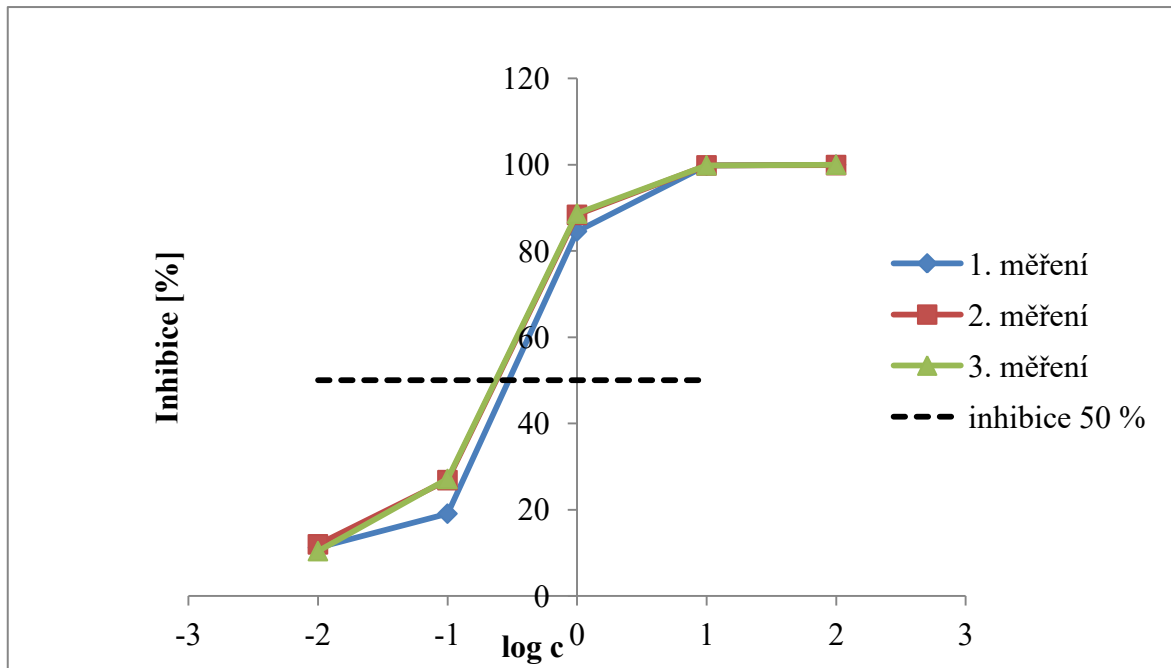
G) Pro vodný výluh tělesa 4C (cement + písek)



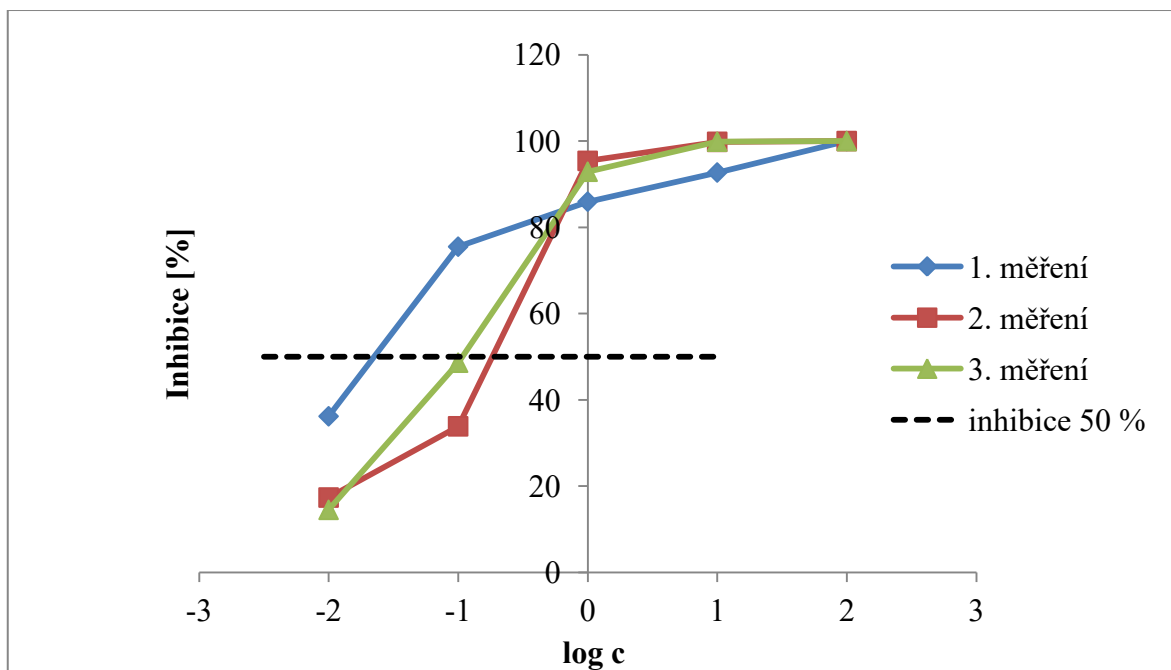
H) Pro vodný výluh tělesa 5C (cement + odpad + nátěr)



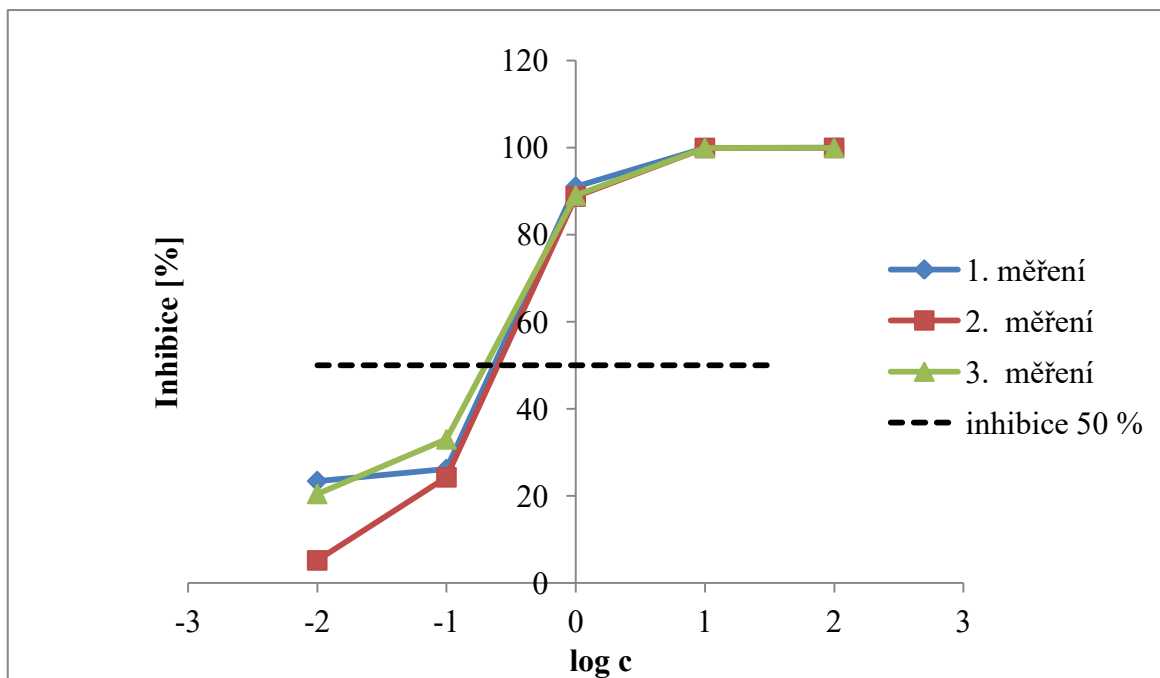
I) Pro vodný výluh tělesa 6C (cement + odpad + nátěr)



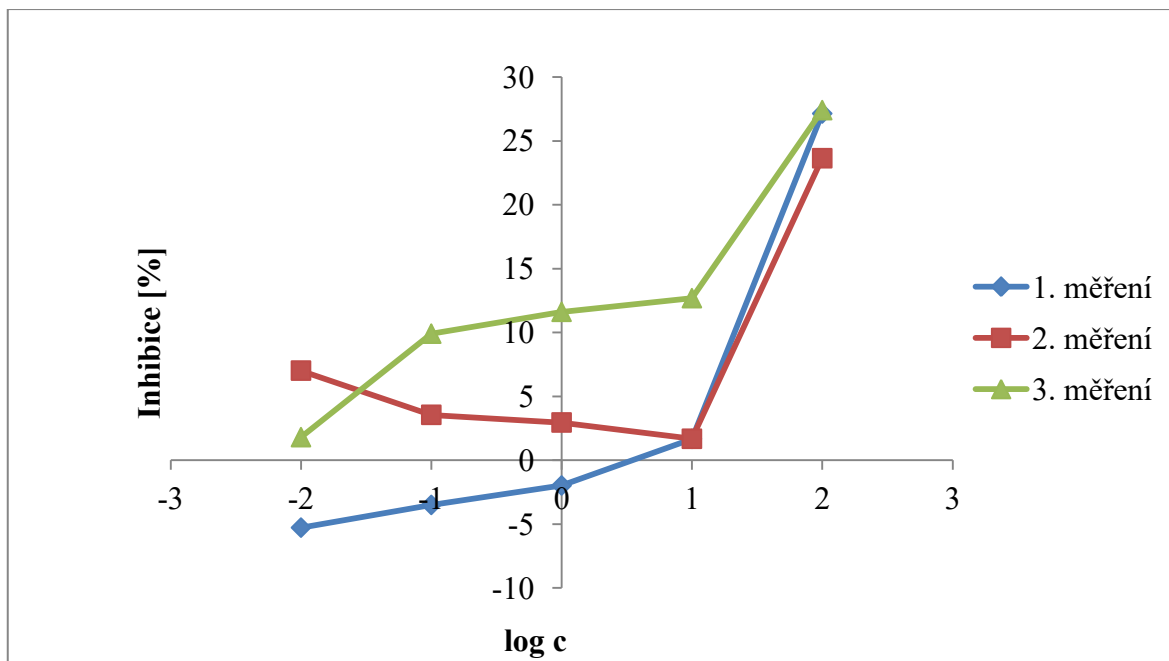
J) Pro vodný výluh tělesa 7C (cement + odpad + nátěr)



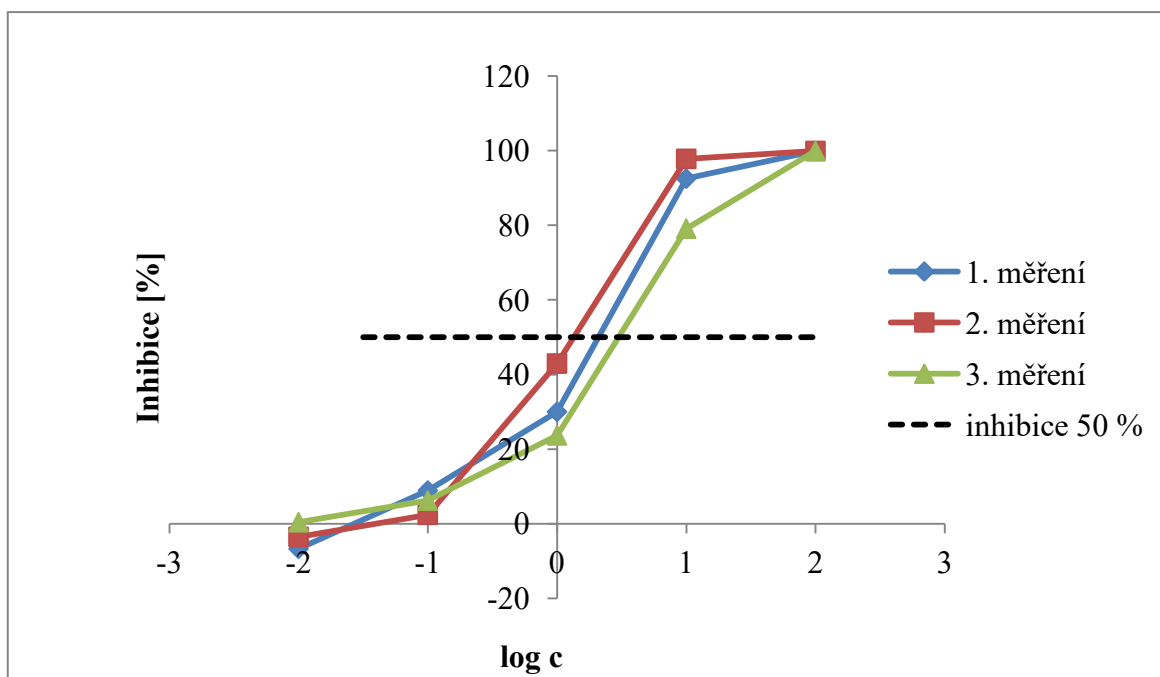
K) Pro vodný výluh tělesa 8C (cement + odpad)



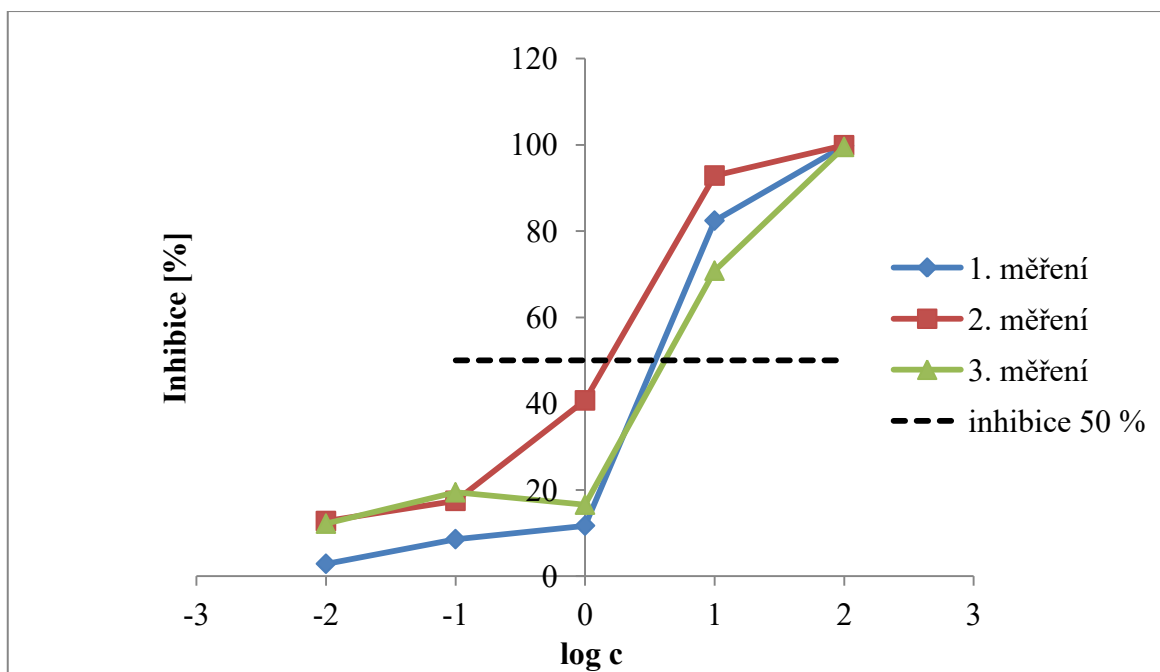
L) Pro vodný výluh tělesa 1S (silikon LN1522)



M) Pro vodný výluh tělesa 2S (silikon LN1522 + odpad)

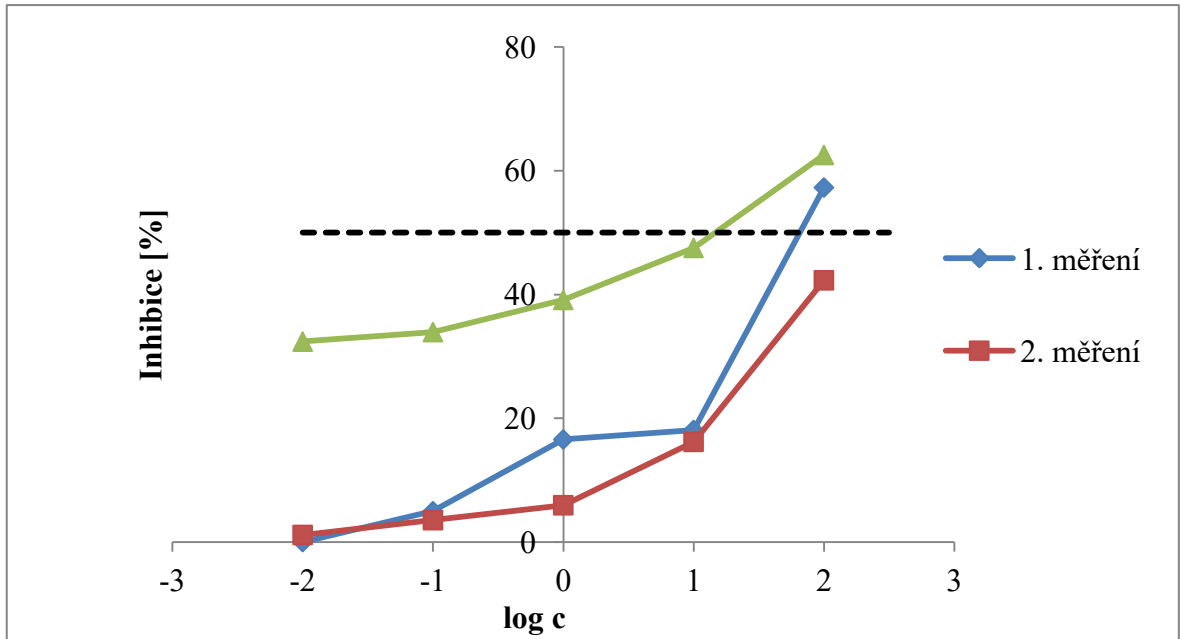


N) Pro vodný výluh tělesa 3S (silikon LN1522 + odpad)

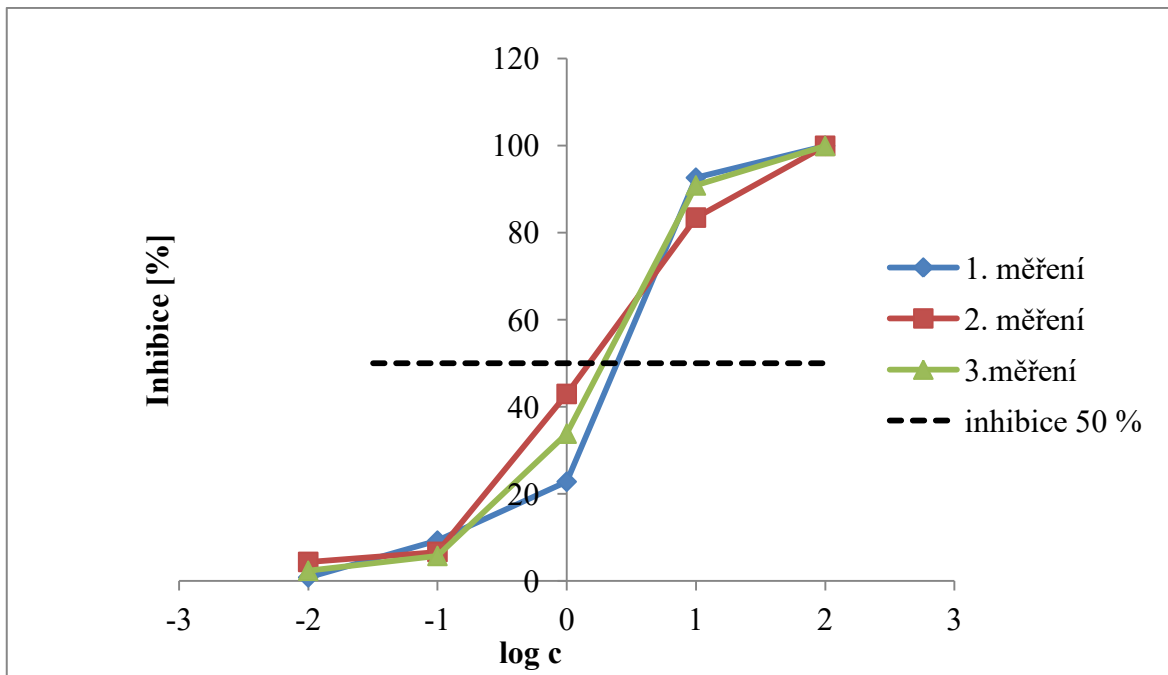




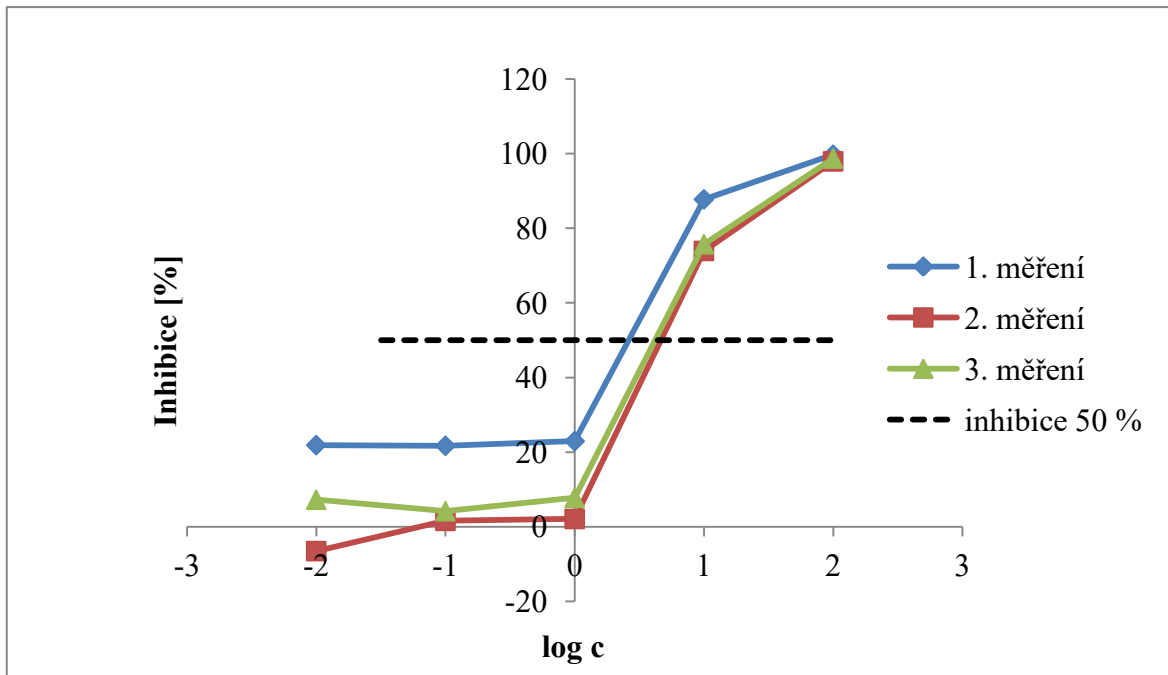
O) Pro vodný výluh tělesa 4S (silikon RTV20)



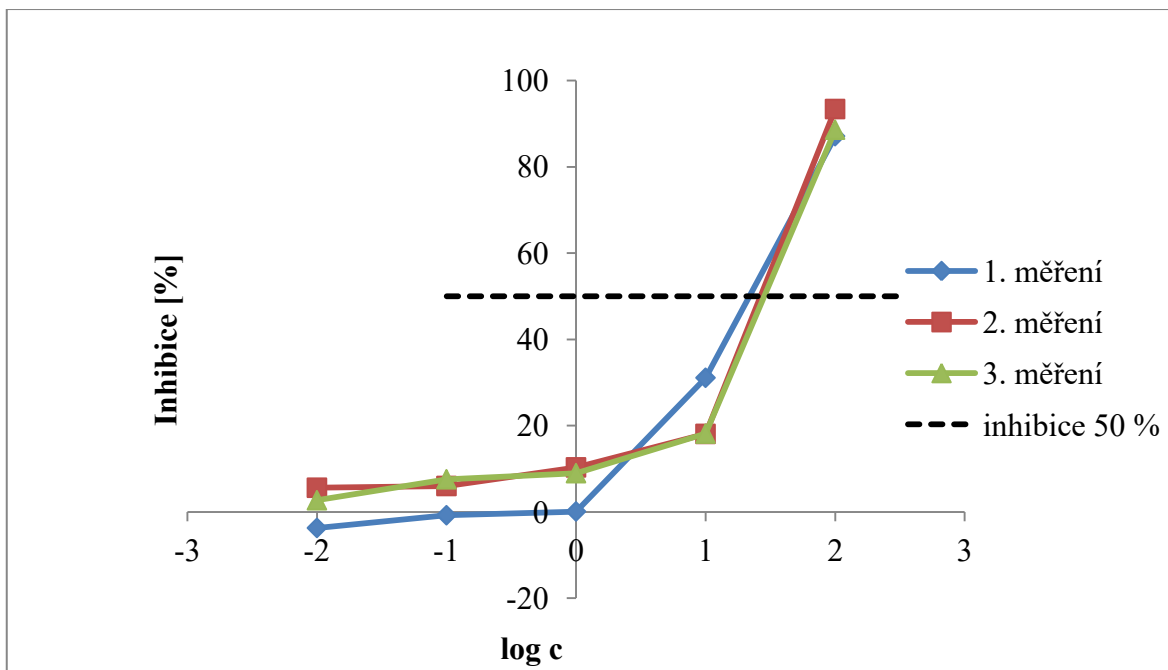
P) Pro vodný výluh tělesa 5S (silikon RTV20 + odpad)



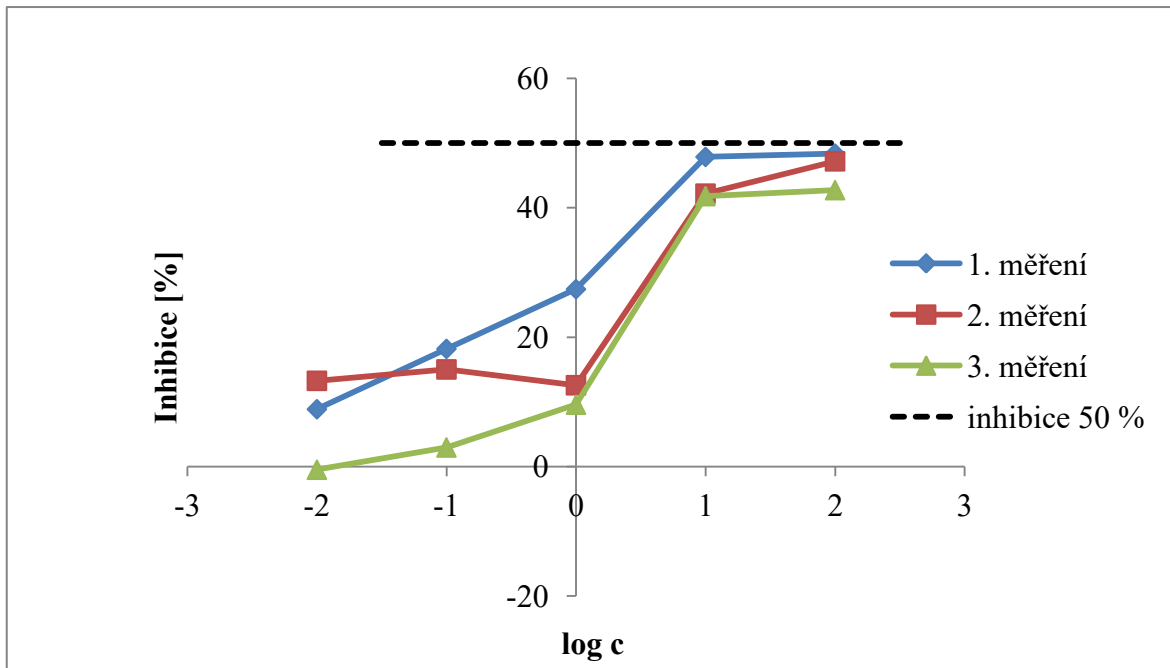
Q) Pro vodný výluh tělesa 6S (silikon RTV20 + odpad)



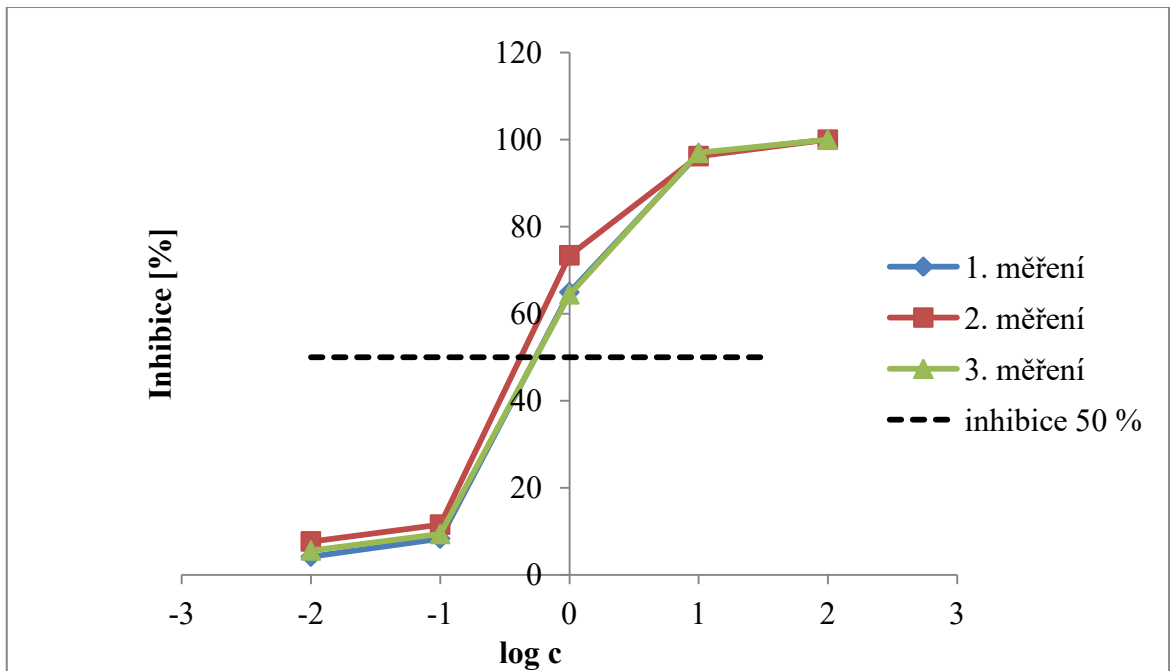
R) Pro vodný výluh 7S (silikon RTV20)



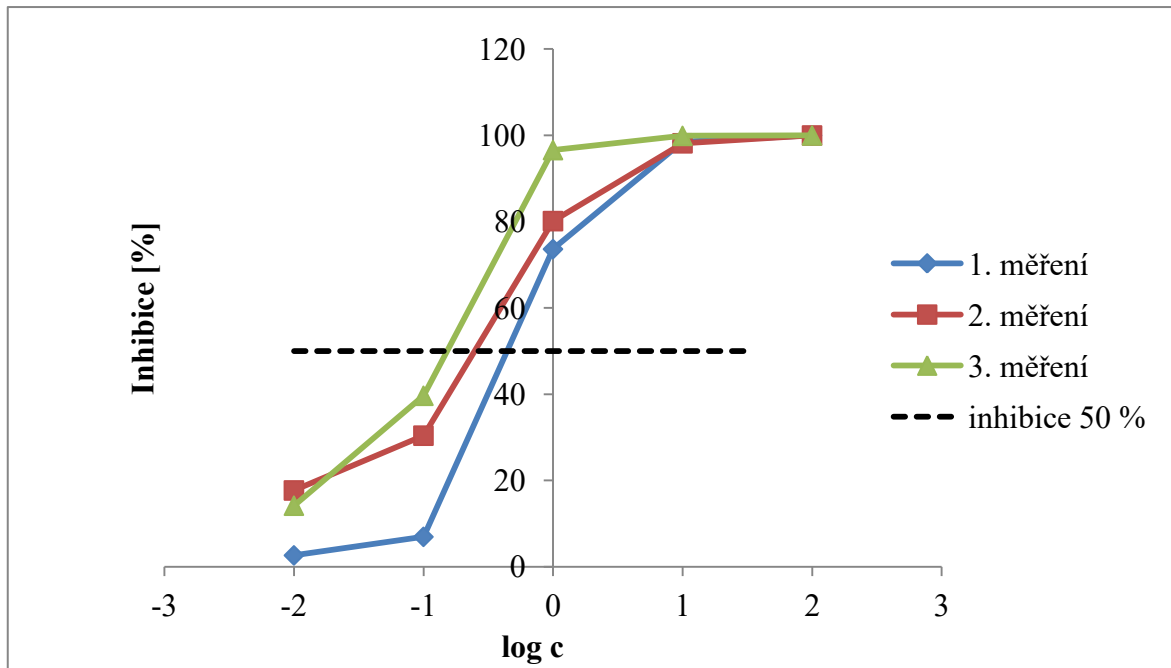
S) Pro vodný výluh tělesa 8S (silikon LN1522)



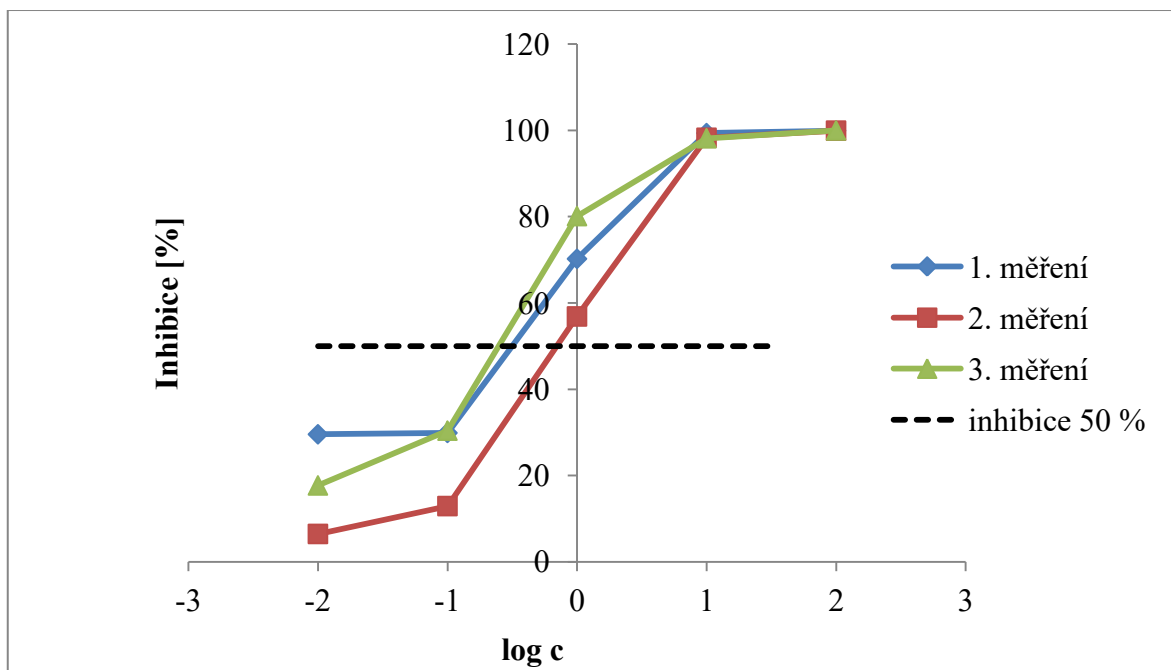
T) Pro vodný výluh tělesa 1A (asfalt + odpad)



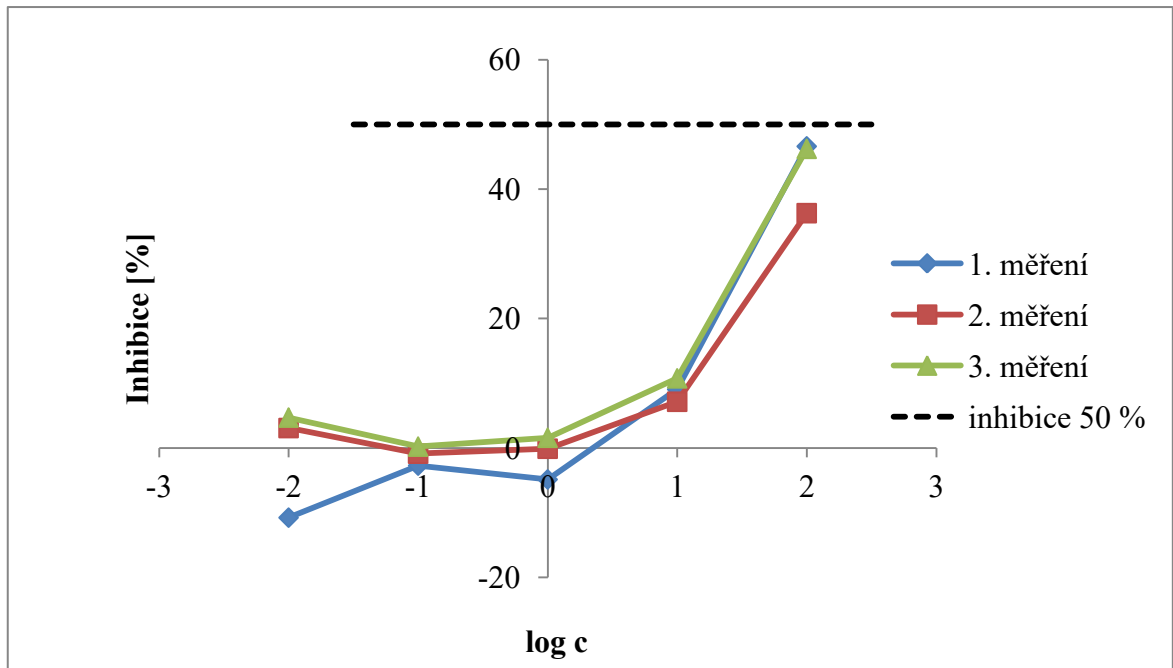
U) Pro vodný výluh tělesa 2A (asfalt + odpad)



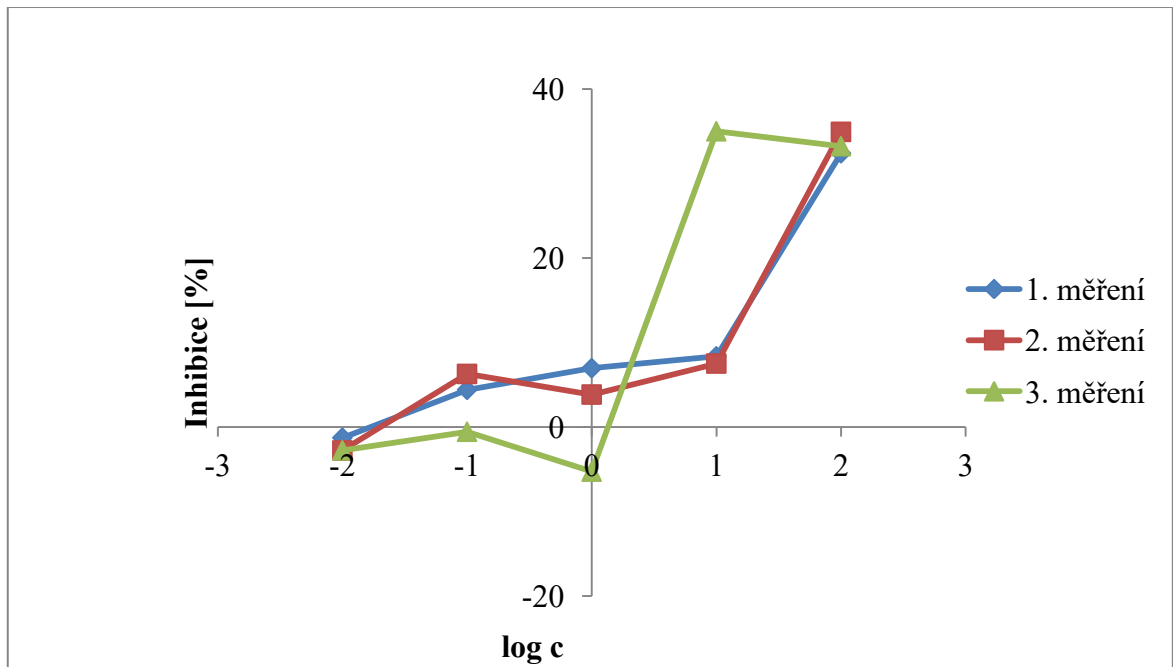
V) Pro vodný výluh tělesa 3A (asfalt + odpad)



W) Pro vodný výluh tělesa 4A (asfalt)



X) Pro vodný výluh tělesa 5A (asfalt)



Y) Pro vodný výluh tělesa 6A (asfalt)

