

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VODŇANY

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ
VÝLUHŮ
TUHÝCH PRŮMYSLOVÝCH ODPADŮ

EDICE

METODIK



45

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ, s.p.
Oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb

J. MÁCHOVÁ, Z. SVOBODOVÁ, B. VYKUSOVÁ

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ
VÝLUHŮ
TUHÝCH PRŮMYSLOVÝCH ODPADŮ

č. 45

Vodňany

1994

ISBN (80-85887-00-2)

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Schema pracovního postupu při provádění ekotoxikologických testů.....	5
3. Metodiky ekotoxikologických testů.....	6
3.1. Standardní vodný výluh (analogický DIN 38 414 S4)	6
3.2. Příprava pracovních roztoků.....	7
3.2.1. Pracovní roztoky pro testy na rybách, perloočkách a semenech.....	8
3.2.2. Pracovní roztoky pro testy na zelené řase.....	9
3.3. Rozvržení koncentrací pro základní test na rybách a perloočkách.....	12
3.4. Test akutní toxicity na rybách.....	13
3.5. Test akutní toxicity na perloočkách <i>Daphnia magna</i> ..	17
3.6. Test inhibice růstu zelené řasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	21
3.7. Test inhibice růstu kořene <i>Sinapis alba</i>	26
3.8. Výpočet hodnot EC(IC)50.....	29
4. Hodnocení rizikovosti tuhých průmyslových odpadů...	36
5. Doporučené postupy pro chovy testovacích organismů...	39
5.1. Chov ryb	39
5.1.1. Chov <i>Poecilia reticulata</i>	39
5.1.2. Chov <i>Brachydanio rerio</i>	39
5.2. Chov perlooček <i>Daphnia magna</i>	40
6. Příklad protokolu o provedených testech.....	43
7. Doplnující normy a předpisy.....	49

1. Úvod

V souladu s nařízením vlády České republiky č. 513/1992 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady příloha 1 Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů byla vypracována ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech ve spolupráci s dalšími pracovišti (VUV Praha, KHS Praha) v koordinaci Ministerstva životního prostředí ČR metodika "Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů". Tato metodika navazuje na "Metodický návod Ministerstva zdravotnictví a sociálních věcí ČSR - hlavní hygienik ČSR č.j. HEM - 323 - 14.11. 1988 - pro hodnocení rizikovitosti tuhého průmyslového odpadu", publikovaného v bulletinu hlavního hygienika ČSR č. 3/1989 a v příloze č. 5/1989 k Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, Institut hygieny a epidemiologie Praha. Podle této metodiky se nepostupuje od vydání metodického návodu k hodnocení zdravotního nebezpečí odpadů, HEM - 300 - 27.7.1993 - viz. oddíl VI. Závěrečná ustanovení, který vydal podle § 71 odst. 3, zák. č. 20/1966 Sb., o péči a zdraví lidu hlavní hygienik ČR.

Metodika Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů simuluje vznik odpadních vod laboratorní přípravou vodného výluhu testovaného odpadu. Vodný výluh je potom testován z hlediska akutní toxicity pro 2 vodní živočichy (akvariální ryбка *Poecilia reticulata*, perloočka *Daphnia magna*), dále z hlediska inhibice růstu zelené kokální řasy (*Scenedesmus quadricauda*) a současně je zjišťován vliv uvedeného výluhu na klíčivost a růst kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Ekotoxikologickému testování by se měly podrobit všechny odpady určené ke skládkování, kde výsledky chemických analýz standardně připraveného vodného výluhu odpadu vyhovují limitním hodnotám tříd vyluhovatelnosti Ia až II a současně odpad nemá žádnou z vlastností, která by jej vylučovala z možnosti skládkování na skládkách 1. až 4. skupiny odpadů (Nařízení vlády č. 513/1992 Sb.). Vyhodnocení výsledků ekotoxikologických testů s rozhodujícím významem výsledku testu na organismu, který nejcitlivěji reagoval na testovaný výluh, je jedním z kritérií (TOXICITA) pro zařazení odpadu do třídy vyluhovatelnosti. Zároveň předkládaná metodika slouží k hodnocení jedné z nebezpečných vlastností (EKOTOXICITA) uvedených v příloze Kategorizace a katalogu odpadů. To znamená, že výsledky ekotoxikologických testů potvrdí či vyvrátí zařazení odpadu do třídy vyluhovatelnosti, které bylo navrženo podle výsledků chemických analýz.

Význam biologických testů tkví hlavně v tom, že postihují souhrn účinků všech přítomných komponent a současně také látek, které nebyly chemickými analýzami prokazovány. Předkládaná metodika je souhrnným zpracováním čtyř metod stanovení toxických (příp. inhibičních) vlastností vodného výluhu odpadu. Veškeré informace k metodice včetně softwaru poskytne Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický Vodňany.

Na zpracování metod jednotlivých testů se dále významnou měrou podíleli:

test na *Poecilia reticulata*:

MVDr. Z. Svobodová, DrSc. (VÚRH Vodňany)

Ing. B. Vykusová (VÚRH Vodňany)

Ing. J. Máchová (VÚRH Vodňany)

test na *Daphnia magna*:

RNDr. R. Faina (VÚRH Vodňany)

RNDr. P. Dušílek (IHE Praha)

test na *Scenedesmus quadricauda*:

RNDr. D. Matulová, CSc. (VÚV Praha)

test na *Sinapis alba*:

RNDr. V. Gottwaldová (KHS Praha)

výpočet EC(IC)50:

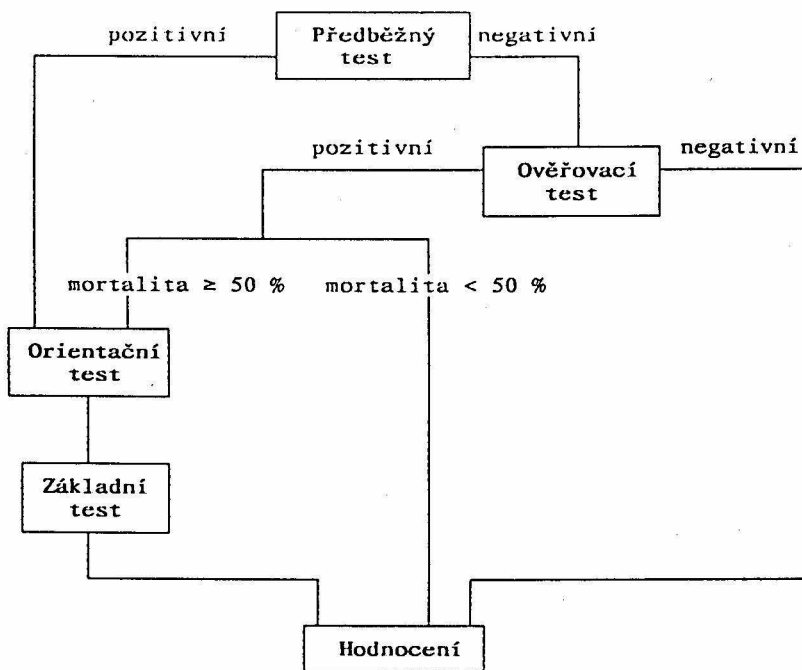
RNDr. I. Přikryl (VÚRH Vodňany)

Ing. Oldřich Daněk (VÚRH Vodňany)

Na zpracování metodiky dále spolupracovali: Ing. P. Dočkal, CSc. (VÚV Ostrava, nyní Aquachemie Ostrava), RNDr. P. Soldán (VÚV Ostrava), RNDr. E. Olivková (EKOTEST Hradec Králové), RNDr. J. Švec (OHS Zlín), Ing. V. Dvořák (EKOS Hradec Králové) a další. Rozpětí hodnot IC50 standardu $K_2Cr_2O_7$ pro *Scenedesmus quadricauda* a *Sinapis alba* je převzato ze zprávy pro účastníky okružního rozboru (RNDr. P. Lazecký, VÚV T.G.M. Praha, pobočka Ostrava, 1994).

Je samozřejmé, že v dalším období budou metodiky ekotoxikologického hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů dále rozpracovávány a současně budou ověřovány možnosti použití dalších toxikologických metod v této oblasti, jako např. testy na buněčných kulturách ryb, které se jeví jako dostatečně citlivé, a přitom nepříliš nákladné, nebo testy na luminiscenčních bakteriích apod. V následujícím období bude rovněž věnována pozornost řasovým testům, kde bude ověřována možnost použití řas *Selenastrum capricornutum* a *Scenedesmus subspicatus*, které jsou doporučovány jako testovací organismy v normách ISO, a které se u nás dosud v běžné praxi nepoužívají.

2. Schema pracovního postupu při provádění ekotoxikologických testů



3. Metodiky ekotoxikologických testů

3.1. Standardní vodný výluh (analogický DIN 38 414 S4)

Oblast použití

Tento postup je použitelný pro pevné, pastovité i kašovitě materiály. Pokud se odpad sedimentací rozděluje, je nutná předúprava - viz odst. "Odpady obsahující více fází".

Základní princip

Vodný výluh pevného odpadu*) je roztok, který vznikl při styku odpadu s vodou ve stanoveném poměru a za stanovených podmínek vyluhování. Stanovený poměr se docílí odvážením takového množství původního nebo předupraveného vzorku, které obsahuje 100 ± 1 g sušiny a přidáním 1 000 ml destilované vody. Podmínky vyluhování jsou definovány teplotou 20 ± 3 °C, 24 hodinami styku obou fází a oddělením filtrací (5 μ m) nebo centrifugací.

Složení vodného výluhu a jeho ekotoxikologické vlastnosti umožňují určit vyluhovatelnost odpadu a zařadit jej do třídy vyluhovatelnosti, neumožňují však vyslovit prognózu složení průsakových vod ze skládek. Při rozhodování o možnostech skládkování je třeba posuzovat i rizika vyplývající ze smísení odpadů.

Pomůcky a zařízení: Rotační třepačka, filtrační zařízení, centrifuga, filtry o velikosti pórů 5 μ m, vývěva
Voda: k přípravě vodného výluhu je nutno používat destilovanou vodu (kapitola 3.2.)

Předběžná úprava vzorku

Odpady určené k deponování - vzorek se drtí jen tehdy, je-li to nezbytné pro odběr vzorku a provedení analýzy - zpravidla pouze v případech, kdy zrnitost materiálu je větší než 10 mm. V žádném případě se vzorek nemele. Jemnozrnný materiál vzniklý při drcení se přimísí do vzorku v příslušném hmotnostním poměru.

Odpady obsahující více fází - rozdělí se na jednotlivé fáze a každá se analyzuje zvlášť. V protokolu se uvede množství jednotlivých fází. Oddělení je možné provést filtrací nebo centrifugací. Oddělená pevná fáze se použije k přípravě vodného výluhu bez promývání vodou. Způsob rozdělení se uvede v protokolu.

*) Poznámka: S odpady i se získanými výluhy je nutno pracovat jako s látkami, které mohou akutně ohrozit zdraví především v důsledku v nich obsažených látek leptavých nebo dráždivých a původců infekčních onemocnění. Proto je třeba používat vhodné osobní ochranné pracovní prostředky zejména k ochraně pokožky a obličeje (očí) a zachovávat pravidla osobní hygieny, zejména mytí rukou po práci a před jídlem, resp. dodržovat další ustanovení především ČSN 01 8003.

Příprava vodného výluhu

U vzorku odpadu (oddělené pevné fáze odpadu) se stanoví sušina při 105 °C. Při stanovení sušiny je nutno vycházet z charakteru analyzovaného vzorku. K množství původního vzorku odpovídajícímu 100 g sušiny se přidá 1000 ml destilované vody. Po 24 hodinách přerušovaného třepání (6 hod třepání, 18 hod sedimentace) se filtrací (filtr o velikosti pórů 5 µm) ze směsi oddělí pevná fáze a s přesností na 10 ml se odečte objem získaného výluhu. V případě, že k separaci nelze použít filtraci, je možno použít i jiný postup (odstředění). Způsob separace a objem získaného výluhu se uvede do protokolu. Takto získaný vodný výluh se skladuje v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 měsíce. V případě, že je odpad organické povahy a mohl by být během skladování biologicky odbouráván, doporučujeme dobu skladování zkrátit na minimum. Datum přípravy výluhu a provádění testů se zaznamenává do protokolu. Jestliže se ve výluhu objevují vločky, je třeba pro každou serii testů připravovat výluh nový. Pro potřeby biologických testů nelze výluh konzervovat žádnými konzervačními prostředky!

Pro biologické testy se výluh dále upravuje, aby se vyloučilo, v případě malé rozpustnosti odpadu, negativní působení nízkého osmotického tlaku na ryby, bezobratlé a semena rostliny, nebo nedostatku živin v testech na zelené řase. Způsoby úpravy vodného výluhu pro potřeby biologických testů jsou uvedeny v následujících kapitolách.

Opakovaný výluh

Opakovaný výluh se provádí pouze ve speciálních případech, jeho postup je analogický odstavci "Příprava vodného výluhu".

3.2. Příprava pracovních roztoků

K přípravě pracovních roztoků se používá voda s konduktivitou do 1 mS.m⁻¹, což odpovídá destilované nebo redestilované vodě ze skleněné aparatury nebo demineralizované vodě. Demineralizace vody se vylučuje v případě, že se k přípravě používá lokální zdroj vody, kde není zaručena kvalita vody po stránce mikrobiologické. Voda nesmí obsahovat chlor ani jiné toxické látky (stopy kovů, pesticidů, amoniaku apod.). V textu dále se uvádí pouze "destilovaná voda".

3.2.1. Pracovní roztoky pro testy na rybách, perloočkách a semenech

Úprava vodného výluhu pro testy na rybách, perloočkách a semenech

Před zahájením testů se zjistí celková potřeba vodného výluhu a požadovaný objem se upraví pomocí zásobních roztoků solí stejným způsobem jako zředovací voda: do odměrné baňky potřebného objemu se odměří část vodného výluhu, poté se nadávkují zásobní roztoky solí (jejich objem závisí na objemu potřebného vodného výluhu) a objem baňky se doplní po rysku vodným výluhem.

Příprava zásobních roztoků solí

Zásobní roztok č.1: 117,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.2: 49,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.3: 25,9 g NaHCO_3 se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.4: 2,3 g KCl (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Na 1 litr vodného výluhu pro biologické testy se dává po 2,5 ml výše uvedených zásobních roztoků.

Poznámka: Vodný výluh je třeba před každým použitím důkladně protřepat, aby byla zaručena jeho homogenita.

Příprava zředovací vody podle ISO 7346 pro testy toxicity na rybách, perloočkách a semenech

Příprava zásobních roztoků:

Zásobní roztok č.1: 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.2: 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.3: 2,59 g NaHCO_3 se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č.4: 0,23 g KCl (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Na 1 litr zředovací vody se dává 25 ml každého zásobního roztoku: do odměrné baňky o objemu 1 l se nalije část destilované vody, nadávkují se zásobní roztoky a objem se doplní destilovanou vodou po rysku. Aerací se voda nasýtí kyslíkem na hodnotu minimálně 90 % a zkontroluje se hodnota

pH, která by se měla pohybovat v rozmezí 7.8 ± 0.2 . Případná úprava pH se provádí roztokem NaOH ($\text{NaOH}-1 \text{ mol.l}^{-1}$), nebo HCl ($\text{HCl}-1 \text{ mol.l}^{-1}$). Takto připravená zředovací voda se před použitím v testu nemusí dále upravovat.

Pro snazší manipulaci je také možné připravit 10krát koncentrovanější zásobní roztoky a dávkami 25 ml těchto roztoků připravit 10 l zředovací vody.

3.2.2. Pracovní roztoky pro testy na zelené řase

Úprava vodného výluhu pro biologický test na zelené řase

V předložené metodice jsou uvedeny 2 živné roztoky. Do vodného výluhu se přidávají živiny stejného druhu a množství, jako ve zvoleném živném roztoku. Zvolený živný roztok se pak v testu užívá jako zředovací voda a současně se používá při předkultivaci řas.

Před zahájením testů se zjistí celková potřeba vodného výluhu a požadovaný objem se upraví pomocí zásobních roztoků živin a stopových prvků stejným způsobem jako živné medium: do odměrné baňky potřebného objemu se odměří část vodného výluhu, poté se nadávkují zásobní roztoky (jejich objem závisí na objemu potřebného vodného výluhu) a objem baňky se doplní po rysku vodným výluhem.

Příprava zásobních roztoků živin a stopových prvků

a) při použití živného roztoku podle Knoppa:

Zásobní roztok č. 1: 100 g KNO_3 (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 2: 10 g K_2HPO_4 (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 3: 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 4: 0,1 g FeCl_3 (p.a.) se rozpustí a doplní do 100 ml destilovanou vodou

Na 1 litr vodného výluhu pro testy na zelené řase se dávkuje po 1 ml zásobních roztoků č. 1, 2, 3 a 4. Do odměrné baňky o objemu 1 litr se nalije část vodného výluhu, přidají se zásobní roztoky a objem se doplní po rysku vodným výluhem.

b) při použití živného roztoku dle mezinárodní normy ISO 8692:

Zásobní roztok č. 1 - živiny: (navážky na 1 litr roztoku)

NH_4Cl	1,5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
K_2HPO_4	0,16 g

Zásobní roztok č. 2 - Fe-EDTA: (navážky na 1 litr roztoku)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*)$	100 mg

Zásobní roztok č. 3 - stopové prvky: (navážky na 1 litr roztoku)

H_3BO_3	185 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg
ZnCl_2	3 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg

Zásobní roztok č. 4 - NaHCO_3 : (navážka na 1 litr roztoku)

NaHCO_3	50 g
------------------	------

Všechny tyto chemikálie by měly mít stupeň čistoty p.a. (pro analýzy). Zásobní roztoky se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min.). Roztoky se skladují při 4 °C ve tmě.

Roztok č. 4 se nesterilizuje v autoklávu, ale pouze filtruje přes membránový filtr.

Uvedenými 4 zásobními roztoky se obohacuje vodný výluh následujícím způsobem: do odměrné baňky požadovaného objemu se nalije část vodného výluhu, nadávkuje se jednotlivé zásobní roztoky živin a stopových prvků a objem se doplní po rysku vodným výluhem. Na jeden litr požadovaného upraveného výluhu se dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml roztoků č. 2, č. 3 a č. 4.

Poznámka: Vodný výluh je třeba před každým použitím důkladně protřepat, aby byla zaručena jeho homogenita.

¹⁾sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraacetové

Příprava živných medií pro řasy

a) podle Knoppa

Příprava zásobních roztoků živin a stopových prvků

Zásobní roztok č. 1: 10 g KNO_3 (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 2: 1 g K_2HPO_4 (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 3: 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

Zásobní roztok č. 4: 0,1 g FeCl_3 (p.a.) se rozpustí a doplní do 100 ml destilovanou vodou

Na 1 litr standardního živného media se dávkuje po 10 ml zásobních roztoků č. 1, 2 a 3 a 1 ml zásobního roztoku č. 4. Případně se použijí zásobní roztoky 1 až 3 desetkrát koncentrovanější a dávkují se do 1 litru po 1 ml. Do odměrné baňky o objemu 1 litr se nalije část destilované vody, přidají se zásobní roztoky a objem se doplní po rysku destilovanou vodou. Takto připravený živný roztok se sterilizuje v autoklávu nebo varem v tlakovém hrnci po dobu 20 minut.

b) podle mezinárodní normy ISO 8692:

Zásobní roztok č.1 - živiny: (navážky na 1 litr roztoku)

NH_4Cl	1,5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
K_2HPO_4	0,16 g

Zásobní roztok č. 2 - Fe-EDTA: (navážky na 1 litr roztoku)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg

Zásobní roztok č. 3 - stopové prvky: (navážky na 1 litr roztoku)

H_3BO_3	185 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg
ZnCl_2	3 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg

Zásobní roztok č. 4 - NaHCO_3 ; (navážka na 1 litr roztoku)

NaHCO_3	50 g
------------------	------

Všechny tyto chemikálie by měly mít stupeň čistoty p.a. K přípravě roztoků se používá destilovaná voda (odstavec 3.2.). Zásobní roztoky se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min.). Roztoky se uloží při 4.°C ve tmě.

Roztok č. 4 se nesterilizuje v autoklávu, ale pouze filtruje přes membránový filtr.

Z uvedených 4 zásobních roztoků se připraví zásobní živný roztok následujícím způsobem: do 1 000 ml odměrné baňky se nadávkuje: 100 ml roztoku 1
10 ml roztoku 2
10 ml roztoku 3
10 ml roztoku 4

a doplní po rysku destilovanou vodou.

Zásobní živný roztok se připravuje vždy čerstvý. Před použitím roztoku se nechá ustavit jeho rovnováha se vzduchem tak, že se přes noc nechá v kontaktu se vzduchem, nebo se po dobu 30 min. provzdušňuje filtrovaným vzduchem. Po dosažení rovnováhy se změří pH roztoku a pokud je to nutné, upraví se na $8,3 \pm 0,2$ přidávkem kyseliny chlorovodíkové ($\text{HCl}-1 \text{ mol.l}^{-1}$) nebo hydroxidu sodného ($\text{NaOH}-1 \text{ mol.l}^{-1}$).

Na 1 litr standardního živného media se dávkuje 100 ml zásobního živného roztoku: do odměrné baňky o objemu 1 000 ml se odměří 100 ml zásobního živného roztoku a doplní se po rysku destilovanou vodou.

3.3. Rozvržení koncentrací pro základní test na rybách a perloočkách

Koncentrace pro základní test navrhujeme na základě výsledků orientačního testu. Navržená rostoucí řada koncentrací má být symetricky rozložena kolem předpokládané hodnoty EC50. Obvykle se v základním testu připravuje 10 koncentrací tak, aby alespoň ve 3 (v případě vyhodnocení hodnoty EC50 počítačovou technikou) nebo v 5 koncentracích (v případě grafického vyhodnocení) došlo k úhynu nebo imobilizaci (v případě dafnií) 5 až 95 % testovacích organismů. Koncentrační řadu je možno např. volit podle tohoto vztahu:

$$\ln k = \frac{\ln \frac{C_2}{C_1}}{n - 2}$$

C_2 = minimální koncentrace se 100% úhynem (příp. imobilizací)

C_1 = maximální koncentrace s nulovým úhynem (imobilizací)

n = počet ředění (obvykle 10)

k = koeficient, kterým se opakovaně dělí koncentrace C_2 , a tím se získá geometrická řada koncentrací

Další možný způsob, který lze doporučit na základě mnoha provedených testů, vychází z odhadnuté hodnoty EC50 z orientačního testu. Pro základní test se volí geometricky rostoucí řada koncentrací symetricky rozložená kolem předpokládané hodnoty EC50. Pro *Poecilia reticulata* se navrhuje použít koeficient 1,15 a pro *Daphnia magna* koeficient 1,4. To znamená, že nejbližší vyšší koncentrací hodnotě EC50 získáme vynásobením této hodnoty koeficientem 1,4 pro *D. magna* a koeficientem 1,15 pro *P. reticulata* a každou další vyšší koncentrací vynásobením předchozí koncentrace uvedenými koeficienty v závislosti na druhu organismu. Podobně nejbližší nižší koncentrace se získají vydělením předcházející koncentrace uvedenými koeficienty.

3.4. Test akutní toxicity na rybách

Cíl

Stanovení akutní toxicity vodou vyluhovatelných látek z odpadu na ryby

Definice a zkratky

Vodný výluh: tuhého průmyslového odpadu připravený standardním postupem. Pro biologické testy se výluh obohacuje solemi stejným způsobem jako zředovací voda.

Zředovací voda: voda připravená podle ISO 7346.

Koncentrace vodného výluhu: množství solemi obohaceného vodného výluhu, doplněné do 1 litru zředovací vodou (ml.l^{-1}).

Kontrola: zředovací voda s testovacími rybami bez testovaného vodného výluhu.

EC50: koncentrace vodného výluhu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku.

Adaptace ryb: přizpůsobení ryb podmínkám testu.

Předběžný test: test pro odhad toxicity vodného výluhu, provádí se s neředěným výluhem.

Ověřovací test: test k ověření negativního výsledku předběžného testu, provádí se s neředěným výluhem.

Orientační test: test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací vodného výluhu.

Základní test: test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu EC50. Sestává zpravidla z 10 různých koncentrací v rozmezí stanoveném orientačním testem.

Standard: kontrolní látka, u níž je určováno EC50 souběžně s testovaným vodným výluhem. Změny EC50 standardu odrážejí variabilitu podmínek testu a kondice testovacích organismů.

Probitová analýza: analýza kvantálních dat, určených relativní četností uhynulých jedinců v závislosti na koncentraci, resp. na jejím logaritmu, přičemž se esovitá regresní křivka aproximuje distribuční funkcí normálního rozložení.

Materiál

Testovací organismus: živorodka duhová (*Poecilia reticulata* Peters) použitá k testům akutní toxicity má být pohlavně diferencovaná, v rozmezí délek těla 15-25 mm, ve věku 3 až 4 měsíců. Samice nesmí mít zřetelnou zárodečnou skvrnu. Používají se ryby v přirozeném poměru pohlaví (nejčastěji 1:1), přičemž se ryby do jednotlivých testovacích nádob vybírají náhodně.

Vedle živorodky duhové je možno k testům akutní toxicity použít i další druhy ryb, např. danio pruhované (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Používají se ryby ve věku 2,5 až 3,5 měsíce, v rozmezí délek těla 25 až 35 mm.

V protokolu je nutno uvést druh testovacího organismu. Ryby použité k testu musí být homogenní a dobrého zdravotního stavu.

Metodika získávání a chovu testovacích ryb je podrobně uvedena v kapitolách 5.1.1. a 5.1.2.

Voda: k přípravě zředovací vody a vodného výluhu je nutno používat destilovanou vodu (kapitola 3.2).

Chemikálie: CaCl_2 (p.a.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.), NaHCO_3 (p.a.), KCl (p.a.), některý ze standardů: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a.), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.), p - nitrofenol (p.a.).

Pomůcky a zařízení: sítka a pomůcky pro odlov a přenášení ryb, celoskleněné nádrže (dle typu testu - kádinky, celoskleněná akvária), pipety, odměrné baňky, pHmetr, oximetr.

Podmínky testu

teplota: $22 \pm 2^\circ\text{C}$

délka expozice: 48 hodin

množství testovaného roztoku: minimálně 100 ml na jedince

osvětlení: 12 až 16 hodin denně

počet testovacích organismů (ryb): 3 až 10 kusů v jedné koncentraci v závislosti na druhu testu

počet paralelních stanovení: u ověřovacího a základního testu se nasazují 3 paralelní testy

ostatní podmínky: bez krmení

bez aerace, je však třeba upravit poměr plochy hladiny a objemu lázně tak, aby nasycení vody kyslíkem v průběhu testu nekleslo v kontrole pod 60 % (měří se na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu - doporučený poměr hladiny k objemu roztoku 800 cm^2 na 10 litrů)

Pracovní postup

Adaptace ryb: ryby, které budou použity k testu, se chovají po dobu 48 hodin před zahájením testu ve zředovací vodě o teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a po tuto dobu se nekrmí.

Předběžný test: do kádinky o objemu cca 500 ml s 300 ml testovaného vodného výluhu obohaceného solemi se nasadí 3 ryby a stejným způsobem se nasadí kontrola. Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu 48 hodin se zaznamenává mortalita ryb, případně výrazné změny v jejich chování (např. excitace, nekoordinovanost pohybu, ztráta rovnováhy, agonie, apod.).

Vyhodnocení předběžného testu: jestliže dojde během předběžného testu k úhynu více jak jedné ryby, je výsledek tohoto testu **p o z i t i v n í** a je třeba provést testy k určení EC50, v opačném případě (jestliže došlo k úhynu max. 1 ryby) je výsledek testu **n e g a t i v n í** a je třeba provést ověřovací test.

Ověřovací test: ověřovací test se provádí v případě negativního výsledku předběžného testu. Aby byla zaručena správnost výsledku, nasazují se 3 paralelní testy. Do 3 celoskleněných akvárií se odměří po 1 litru vodného výluhu obohaceného solemi a nasadí po 10 kusech ryb. Stejným způsobem se nasadí kontrola. Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu trvání testu se sleduje a zaznamenává chování a mortalita ryb.

Vyhodnocení ověřovacího testu: jestliže dojde během ověřovacího testu k výrazné změně chování ryb ve srovnání s kontrolou (podobně jak je uvedeno u předběžného testu), nebo k úhynu 1 nebo více kusů ryb, je výsledek tohoto testu **p o z i t i v n í**, v opačném případě je výsledek testu **n e g a t i v n í**.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu negativní, další testování se neprovádí a tato skutečnost se uvede do protokolu.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu pozitivní, ale celkový úhyn ryb (ze všech 3 paralelních testů) nepřesáhne 50 %, uvede se do protokolu mortalita ryb v % způsobená vodným výluhem, případně se popíše změny chování ryb a další testování se neprovádí.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu pozitivní s úhynem ryb 50 % a vyšším, provádí se stanovení hodnoty EC50 vodného výluhu.

Stanovení hodnoty EC50 pro ryby

Orientační test: sestává zpravidla z 10 různých koncentrací vodného výluhu, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací vodného výluhu o objemu minimálně 500 ml se nasazuje po 5 kusech ryb. Stejným způsobem se nasazuje kontrola. Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu trvání orientačního testu se sleduje a zaznamenává mortalita ryb. Na základě výsledků tohoto testu se volí koncentrace pro základní test.

Základní test: sestává zpravidla z 10 různých koncentrací vodného výluhu v rozmezí stanoveném orientačním testem. Aby byla zaručena správnost výsledků, nasazuje se základní test ve 3 paralelkách. Návod na vhodné rozvržení koncentrací pro základní test je uveden v kap. 3.3. Do připravených koncentrací o objemu minimálně 1 l se nasazuje po 10 kusech ryb a stejným způsobem se nasazuje kontrola. Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku, v průběhu testu se zaznamenává mortalita ryb.

Vyhodnocení základního testu: v průběhu trvání testu se sleduje a zaznamenává mortalita ryb a výsledky se vyhodnocují probitovou analýzou graficky nebo využitím počítačové techniky, jak je uvedeno v kap. 3.8. Výsledky jednotlivých paralelních testů se vyhodnocují zvláště a ze získaných hodnot LC50 se vypočítá průměr LC50. Jenotlivé hodnoty LC50 se nasmějí lišit o více než 30 %.

V kontrolních nádržích nesmí být v průběhu testů zjištěna mortalita, ani výrazné změny v chování ryb. V opačném případě je nutno test opakovat.

Testy akutní toxicity na standardech

Průběžně se doporučuje ověřovat kondici k testům použitých ryb a vhodnost podmínek pro provádění testů toxicity na některém ze standardů ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a., $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ p.a., p-nitrofenol p.a.).

Testy akutní toxicity se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy na zvolených organismech.

Podle dosavadních zkušeností jsou průměrné hodnoty 48hLC50 následující (v závorkách jsou uvedena rozpětí těchto hodnot):

Testovací organismus	K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg.l ⁻¹)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.l ⁻¹)	p-nitrofenol (mg.l ⁻¹)
<i>Poecilia reticulata</i>	180 (130-240)	174 (130-240)	28 (20-30)
<i>Brachydanio rerio</i> *)	115 (100-200)	190 (30-550)	27 (20-35)

*) jako zředovací voda byla použita voda vodovodní

3.5. Test akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

Cíl

Stanovení vlivu vodou vyluhovatelných látek z odpadu na imobilizaci zástupce vodních korýšů perloočku *Daphnia magna*.

Definice a zkratky

Vodný výluh: výluh tuhého průmyslového odpadu připravený standardním postupem. Pro biologické testy se výluh obohacuje solemi stejným způsobem jako zředovací voda.

Zředovací voda: voda připravená podle ISO 7346.

Koncentrace vodného výluhu: množství solemi obohaceného vodného výluhu, doplněné do 1 litru zředovací vodou (ml.l⁻¹).

Kontrola: zředovací voda s *Daphnia magna* bez testovaného vodného výluhu.

Imobilizace *Daphnia magna*: makroskopicky pozorovatelná neschopnost samostatného prostorového pohybu *Daphnia magna* do 15 s po krouživém zamíchání lázně. Jako imobilizované organismy hodnotíme např. i jedince, kteří pohybují tykadly 2. páru, ale výše uvedeného samostatného pohybu nejsou schopni.

EC50: koncentrace vodného výluhu, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích *Daphnia magna* ve zvoleném časovém úseku

Předběžný test: test pro odhad toxicity vodného výluhu, provádí se s neředěným vodným výluhem.

Ověřovací test: test k ověření negativního výsledku předběžného testu. provádí se s neředěným výluhem.

Orientační test: test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací vodného výluhu.

Základní test test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu EC50. Sestává zpravidla z 10 různých koncentrací v rozmezí stanoveném orientačním testem.

Standard: kontrolní látka, u níž je určováno EC50 souběžně s testovaným vodným výluhem. Změny EC50 standardu odrážejí variabilitu podmínek testu a kondice testovacích organismů.

Probitová analýza: analýza kvantálních dat, určených relativní četností uhynulých jedinců v závislosti na koncentraci, resp. na jejím logaritmu, přičemž se esovitá regresní křivka aproximuje distribuční funkcí normálního rozložení.

Materiál

Testovací organismus: *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) ve stáří do 24 hodin, nejméně třetí generace získaná acyklickou partenogenezí za podmínek zdravého prosperujícího chovu (kap. 5.2.).

Voda: k přípravě zředovací vody a vodného výluhu je nutno používat destilovanou vodu (kapitola 3.2).

Chemikálie: CaCl_2 (p.a.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.), NaHCO_3 (p.a.), KCl (p.a.), některý ze standardů: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a.), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.), p - nitrofenol (p.a.).

Pomůcky a zařízení: kelímky či kádinky objemu cca 200 ml, skleněné nádoby (3 l), elementky (1 l), soustava třídících sítok, pipety, odměrné baňky, tenkostěnné skleněné trubičky se světlostí 2 až 4 mm, mikroskop, Erlenmayerovy baňky, preparační jehla, pHmetr, oximetr.

Krmivo: chlorokokální řasy - čerstvé, sušené nebo lyofilizované (kap. 5.2.).

Podmínky testu

teplota: $20 \pm 2^\circ\text{C}$

délka expozice: 48 hodin

množství roztoku: minimálně 5 ml na jedince při dodržení výše sloupce vody (roztoku) minimálně 3 cm

počet testovacích organismů (dafnií): 10 až 60 kusů v jedné koncentraci v závislosti na druhu testu

počet paralelních stanovení: u ověřovacího a základního testu se nasazují 3 paralelní testy

příprava nádobí: kádinky se před použitím řádně vymyjí horkou vodou a vypláchnou destilovanou vodou

ostatní podmínky: bez aerace

bez krmení

bez osvětlení (v šeru nebo temnu)

Pracovní postup

Předběžný test: do 2 nádob (kádinek) s vodným výluhem obohaceným solemi se nasadí po 10 kusech dafnií a stejným způsobem se nasazuje kontrola. Na začátku a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu 48 hodin se zaznamenává mortalita a imobilizace dafnií.

Vyhodnocení předběžného testu: jestliže je během předběžného testu zaznamenána imobilizace nebo mortalita 10 % a více kusů dafnií, je výsledek testu **p o z i t i v n í** a je třeba provést orientační a základní test. V opačném případě je výsledek **n e g a t i v n í** a je třeba provést ověřovací test.

Ověřovací test: do 6 kádinek nebo kelímků se nadávkuje vodný výluh obohacený solemi a nasadí po 10 kusech dafnií a stejným způsobem se nasadí kontrola. Na začátku a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu trvání testu se sleduje a zaznamenává imobilizace a mortalita dafnií. Aby byla zaručena správnost výsledků testu, stejným způsobem se nasazují ještě další 2 paralelky.

Vyhodnocení ověřovacího testu: základem pro vyhodnocení ověřovacího testu je zjištění mortality a imobilizace dafnií v kontrole a ve vodném výluhu. Imobilizace a mortalita zjištěná ve vodném výluhu v % ze 180 nasazených jedinců se porovnává s kontrolou. Jestliže zjištěné procento imobilizace a úhynu dafnií ve vodném výluhu je o více než 10 % vyšší než v kontrole, je výsledek testu **p o z i t i v n í**, jestliže procento imobilizovaných nebo uhynulých dafnií ve vodném výluhu je 10 % a nižší ve srovnání s kontrolou, je výsledek testu **n e g a t i v n í**.

Jestliže se imobilizace nebo úhyn dafnií v ověřovacím testu přibližuje limitním hodnotám, doporučujeme test zopakovat, případně nasadit základní test s vyššími koncentracemi vodného výluhu a teprve potom rozhodnout, zda je test na dafniích pozitivní nebo negativní.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu negativní, další testování se neprovádí a tato skutečnost se uvede do protokolu.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu pozitivní, ale imobilizace nebo úhyn dafnií není o více než 50 % vyšší než v kontrole, uvede se tato skutečnost do protokolu a další testování se neprovádí.

Jestliže je výsledek ověřovacího testu pozitivní s úhynem dafnií 50 % a vyšším, provádí se stanovení hodnoty ECS₅₀.

Stanovení hodnoty EC50 pro dafnie

Orientační test: tento test sestává zpravidla z 10 různých koncentrací vodného výluhu, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací vodného výluhu se nasazuje po 10 kusech dafnií. Stejným způsobem se nasazuje kontrola. Na začátku a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu trvání orientačního testu se sleduje a zaznamenává mortalita a imobilizace dafnií. Na základě výsledků tohoto testu se volí koncentrace pro základní test.

Základní test: základní test sestává zpravidla z 10 různých koncentrací vodného výluhu v rozmezí stanoveném orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2 paralelky.

Návrh rozložení koncentrační řady je uveden v kap. 3.3.

Do připravených roztoků vodného výluhu o různých koncentracích se nasazuje po 10 kusech dafnií a stejným způsobem se nasadí kontrola. Uhynulé a imobilizované dafnie v jednotlivých paralelních koncentracích se sčítají. Na začátku a na konci testu se měří teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Aby byla zaručena správnost výsledku, nasazuje se základní test celkem třikrát.

Vyhodnocení základního testu: v průběhu trvání testu se sleduje a zaznamenává imobilizace a mortalita dafnií a výsledky se vyhodnocují probitovou analýzou graficky nebo užitím počítačové techniky (kap. 3.8). Hodnoty EC50 se vyhodnocují pro každý test zvlášť a počítá se z nich průměr. Jednotlivé hodnoty EC50 se nesmí lišit o více než 30 %.

V kontrolách jsou dafnie nasazovány do zředěvací vody za stejných podmínek (objem zředěvací vody, počet testovacích organismů, teplota), jako v pokusných nádobách. V kontrolních nádobách nesmí být v průběhu testů zjištěna imobilizace nebo mortalita vyšší než 10 %. V opačném případě je nutno test opakovat.

Testy akutní toxicity na standardech

Průběžně se doporučuje ověřovat kondici k testům použitých dafnií a vhodnost podmínek pro provádění testů toxicity na některém ze standardů ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a., $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ p.a., p-nitrofenol p.a.). Testy akutní toxicity se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy.

Podle našich zkušeností jsou průměrné hodnoty 48hEC50 následující (v závorkách jsou uvedena rozpětí těchto hodnot):

Testovací organismus	K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg.l ⁻¹)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.l ⁻¹)	p-nitrofenol (mg.l ⁻¹)
<i>Daphnia magna</i>	0,67 (0,3-1,5)	9,6 (1-25)	12,9 (5-20)

3.6. Test inhibice růstu zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* (možno též *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum*)

Cíl

Stanovení vlivu vodou vyluhovatelných látek z odpadu na růst planktonní sladkovodní řasy

Definice a zkratky

Vodný výluh: výluh tuhého průmyslového odpadu připravený standardním postupem. Pro potřeby testů na řasách se výluh obohacuje živinami v množství odpovídajícím standardnímu živnému roztoku.

Živné médium: standardní živný roztok (dle Knoppa nebo dle ISO 8692).

Zředovací voda: živné médium.

Koncentrace vodného výluhu: množství živinami obohaceného vodného výluhu doplněné do 1 litru živným médiem (ml.l⁻¹).

Testovaný roztok: směs živného média, vodného výluhu obohaceného živinami ve zvolené koncentraci a řasových buněk.

Kontrola: živné médium a testovací řasy bez testovaného vodného výluhu.

IC50: koncentrace vodného výluhu obohaceného živinami, která způsobí 50% redukci růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury v určitém časovém intervalu ve srovnání s kontrolním roztokem.

Předběžný test: test pro odhad toxicity vodného výluhu, provádí se s neředěným vodným výluhem.

Ověřovací test: test k ověření negativního výsledku předběžného testu, provádí se s neředěným výluhem.

Orientační test: test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací vodného výluhu.

Základní test: test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu IC50.

Hustota řasové kultury: počet buněk, (u *Scenedesmus quadricauda* čtyřbuněčných cenobií) v 1 ml.

Inokulum: celkové množství buněk (cenobií) vložených do testovací baňky na začátku testu, vyjádřené jako hustota řasové kultury na počátku testu (počet buněk nebo cenobií v 1 ml).

Přirůstek řasové kultury: změna hustoty řasové kultury zjištěná za určitý časový interval.

Rychlost růstu řasové kultury: přírůstek řasové kultury za jednotku času.

Materiál

Testovací organismus: zelená kokální řasa *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb., *Typicus 1*, kmen Greifswald 15, nebo *Scenedesmus subspicatus* Chodat (86.81 SAG), nebo *Selenastrum capricornutum* Printz (ATCC 22662 nebo CCAP 278/4)*). V testech je třeba pracovat s kulturami standardních kmenů, které lze objednat v některé ze sbírek autotrofních organismů, např. ze Sbírkky autotrofních organismů v Hydrobotanickém oddělení BÚ ČSAV, Dukelská 145, Třeboň, PSČ 379 82.

Voda: k přípravě zředovací vody a vodného výluhu je nutno používat destilovanou vodu (kap. 3.2)

Chemikálie: podle použití živného media dle Knoppa nebo dle ISO 8692, které jsou uvedeny v kapitole 3.2.2. Všechny chemikálie by měly mít stupeň čistoty p.a.

Pomůcky a zařízení: termoluminostat, kultivační nádoby - Erlenmayerovy baňky stejného typu a objemu (objem 250 ml při práci se 70 ml suspenze, objem 100 ml při práci s 25 ml suspenze), parafilm na uzavření baněk, zařízení na kontinuální míchání vzorků (pokud není k dispozici je třeba zajistit promíchání ručně min. třikrát denně), světelný mikroskop, počítací komůrka typu Cyrus 1, 2 nebo Bürkerova krevní komůrka, autokláv pro sterilizaci živných medií, pipety, odměrné baňky, pH metr. Všechny pomůcky a zařízení, přicházející do styku s testovanými a srovnávacími látkami a roztoky mají být ze skla nebo jiného chemicky odolného materiálu.

Podmínky testu

teplota: $27 \pm 2^\circ\text{C}$

osvětlení: kontinuální, 6 000 lux, max. 10 000 lux

délka expozice: min. 96 hodin při použití živného media dle Knoppa, min. 72 hod při použití živného media dle ISO 8692, hodnocení růstu kultury se provádí jedenkrát za 24 hodin

množství testovaného roztoku: 25, resp. 70 ml podle objemu (100, resp. 250 ml) Erlenmayerových baněk

počáteční koncentrace řasové suspenze: $20\ 000 \pm 2\ 000$ cenobii nebo 80 000 buněk v 1 ml při práci s řasou rodu *Scenedesmus*, nebo 120 000 buněk v 1 ml při práci s řasou rodu *Selenastrum*

počet paralelních testů: 3 paralelní testy

ostatní podmínky: bez aerace

promíchávání řasové suspenze kontinuální, příp. min. 3krát denně

do protokolu je třeba uvést údaje o velikosti inokula a použitém živném mediu

*) Tento druh je nyní systematicky nazýván *Raphidocellis subcapitata* Korsikov

Pracovní postup

Udržování řasové kultury a adaptace na pokusné podmínky

- udržování kmenové kultury se provádí na šikmém 1,5% agaru ve standardním živném mediu, na nepřímém denním světle při laboratorní teplotě, přeočkovává se 1krát za 2 měsíce
- zásobní kultury se pěstují ve 250 až 300 ml Erlenmayerových baňkách se 100 ml standardního živného media, za stejných podmínek jako udržovací kmenová kultura
- předkultivace se provádí v termoluminostatu za stejných podmínek jako vlastní test

Řasové inokulum pro tento test se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury.

Při použití Knoppova živného media se týden před zahájením pokusu zásobní kultury přeočkují do 50 ml standardního živného media v 300 ml Erlenmayerových baňkách. Tyto kultury se používají pro očkování testovacích kultur.

Při použití živného media dle ISO 8692 se smíchá 1 objemový díl zásobního roztoku živin s 8 díly vody. Přidá se takový objem zásobní řasové kultury, aby při desetinasobném zředění živným mediem dosahovala hustota buněk řádově 10^4 v 1 ml. Inokulační kultura se udržuje po dobu 3 dnů za podmínek testu a poté se použije pro inokulaci.

Příprava inokula

- v počítací komůrce se stanoví hustota kultury z předkultivace. U *Scenedesmus quadricauda*, které vytváří čtyřbuněčná cenobia, počítáme čtyřbuněčné cenobium jako jednotku, dvou-buněčné cenobium jako 1/2, osmibuněčné cenobium jako 2 jednotky. Při použití řasy *Scenedesmus subspicatus* nebo *Sele-nastrum capricornutum* se počítají jednotlivé buňky. Výpočet se stanoví objem dávkované řasové suspenze.

Výpočet potřebného objemu inokula

V počítací komůrce se stanoví hustota kultury z předkultivace. Testovací i kontrolní roztoky se naočkují stejným množstvím řasové suspenze tak, aby po naočkování bylo ve všech testovacích i kontrolních kulturách 20 000 cenobií nebo 80 000 nebo 120 000 buněk v 1 ml v závislosti na použitém druhu řasy (viz podmínky testu). Výpočet množství inokulační suspenze (x) přidávané k testovanému roztoku (V) se provádí následujícím způsobem:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}$$

x = potřebný objem inokula v ml

c = požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu

V = množství testovaného roztoku v ml

a = hustota inokulační kultury (počet cenobií v 1 ml)

Stanovení toxicity vodného výluhu

Předběžný test: tento test se provádí s vodným výluhem obohaceným živinami, který se naočkuje řasovou suspenzí tak, aby výchozí hustota kultury odpovídala druhu zvolené řasy (20 000 cenobií nebo 80 000 nebo 120 000 buněk v 1 ml). Kultivační nádoby se vzorkem a řasovou suspenzí se umístí do termoluminostatu, inkubace se provádí po dobu min. 96 hodin při použití živného media dle Knoppa, min. 72 hod při použití živného media dle ISO 8692. Řasová kultura se během kultivace kontinuálně protřepává nebo min. 3krát denně ručně promíchává. Na začátku testu a každých 24 hodin se měří pH a teplota suspenze. Růst kultury se hodnotí jednou za 24 hodin počítáním buněk v počítací komůrce. Kontrolní řasy se inkubují za stejných podmínek jako pokusné ve standardním živném mediu.

Vyhodnocení předběžného testu: základem pro hodnocení výsledků testů na zelené řase jsou růstové křivky zjištěné pro růst řasové kultury ve vodném výluhu obohaceném živinami a kontrole. (Do grafu se vynáší přirozený logaritmus hustoty řasové kultury proti času ve dnech - kap. 3.8, obr. 2). Inhibice, případně stimulace růstu se hodnotí porovnáním ploch pod růstovými křivkami (popsáno v kapitole 3.8). Výsledek testu lze vyhodnotit také porovnáním růstových rychlostí řasové kultury ve vodném výluhu a v živném mediu (kontrola). Způsob výpočtu je uveden v kapitole 3.8. Výsledek předběžného testu se hodnotí jako *n e g a t i v n í*, jestliže růst řasové kultury ve vodném výluhu obohaceném živinami ve srovnání s kontrolou nebyl inhibován o více jak 30 %, ani stimulován o více než 100 %.

V opačném případě je výsledek předběžného testu *p o z i t i v n í*. V případě stimulace růstu a k ověření negativního výsledku předběžného testu nasazujeme ověřovací test. Jestliže je výsledek předběžného testu pozitivní v důsledku inhibice růstu, nasazujeme testy k určení hodnoty IC50.

Pozor! Jestliže je zaznamenána v neředěném výluhu obohaceném živinami stimulace růstu řasy o více než 100 %, nasazujeme řasy v ověřovacím testu do neředěného výluhu bez přídatku živin.

OVĚŘOVACÍ TEST: se provádí stejným způsobem jako předběžný test. V případě stimulace růstu řasy vyšší než 100 % zjištěné v předběžném testu, nasazujeme řasy do neřaděného výluhu bez přidavku živin. Aby byla zabezpečena správnost výsledků, nasazuje se test ve třech paralelkách (3 baňky s neřaděným výluhem a tři kontroly).

Vyhodnocení ověřovacího testu: se provádí stejným způsobem jako u předběžného testu (kapitola 3.8). Z naměřených ploch pod růstovými křivkami řasové kultury (příp. rychlostí růstu) zjištěnými v neřaděném výluhu se spočítá průměrná hodnota, která se porovnává s průměrnou hodnotou zjištěnou v kontrolách.

Výsledek ověřovacího testu se hodnotí jako *n e g a t i v n í*, jestliže růst řasové kultury ve vodném výluhu obohaceném živinami (případně bez živin) ve srovnání s kontrolou nebyl inhibován o více jak 30 %, ani stimulován o více než 100 %.

V opačném případě, tj. při inhibici vyšší než 30 % nebo stimulaci vyšší než 100 %, je výsledek ověřovacího testu *p o z i t i v n í*. Při inhibici růstu vyšší než 30 % a současně nižší než 50 % nebo stimulaci vyšší než 100 % se výsledek uvede do protokolu a další testování se neprovádí.

Jestliže inhibice růstu řasové kultury v ověřovacím testu dosáhla 50 % a více, provádí se další testy k určení hodnot IC50.

Jestliže se inhibice nebo stimulace růstu řasové kultury v neřaděném výluhu ve srovnání s kontrolou přibližuje limitním hodnotám, doporučujeme test zopakovat, při zjištěné inhibici případně nasadit základní test s vyššími koncentracemi vodného výluhu k určení hodnot IC50 a teprve potom rozhodnout o výsledku testu.

Stanovení hodnoty IC50

Test inhibice růstu zelené řasy: pro tento test se připraví koncentrační řada vodného výluhu obohaceného živinami. Ředící vodou je zde standardní živné medium. Očkování řasovou kulturou a kultivace se provádí stejným způsobem jako v předběžném testu. Kultivační baňky se vzorky a kontrolami se umístí do termoluminostatu, obvykle se nasazují 3 paralelky. Rozsah koncentrací se volí podle povahy výluhu, většinou 10 koncentrací v rozmezí od 1 ml.l⁻¹ až k neřaděnému výluhu, případně se provede orientační test s koncentracemi 1, 10, 100, 500 ml.l⁻¹ a neřaděný výluh a na základě výsledků tohoto testu se volí rozsah koncentrací pro test k určení hodnoty IC50.

Výpočet hodnoty IC50 je uveden v kapitole 3.8. Hodnota IC50 se hodnotí pro každý z paralelních testů zvlášť, výsledná hodnota je průměrem těchto hodnot. Variabilita výsledků by neměla být větší než 30 %.

Poznámka: Při zjišťování chronických účinků vodných výluhů je možné prodloužení testu na dobu asi 10 až 14 dnů, kdy kultura dosáhne přes lag (adaptační) fázi a fázi logaritmického růstu fáze stagnace. Pak je možné porovnávat nejenom absolutní počty cenobií, ale také tvar růstových křivek (např. prodloužení lag fáze a vliv na stav kultury - tvar a obsah buněk, počet buněk v cenobíích, tvorba shluků, velikost buněk apod.). Při sestrojování růstových křivek se vynášejí přirozené logaritmy hustoty řasových kultur $\ln c_k$, $\ln c_v$ (c_k - hustota řasové kultury v kontrole, c_v - hustota řasové kultury v testovaném roztoku vodného výluhu) zjištěné v jednotlivých koncentracích v průběhu testu proti času (obr. 2, kap. 3.8).

Testy akutní toxicity na standardu

Průběžně se doporučuje ověřovat správnost postupu a stavu řasové kultury pomocí testu provedeném na standardu $K_2Cr_2O_7$. Inhibiční testy se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy. Podle našich zkušeností a zkušeností dalších pracovišť se hodnoty IC50 pohybují v rozmezí:

Testovací organismus	Rozpětí hodnot $72IC_{50}$ ($mg.l^{-1}$)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0,5 - 2

3.7. Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Cíl

Stanovení vlivu vodou vyluhovatelných látek z odpadu na růst kořene v počátečních stadiích vývoje rostliny.

Definice a zkratky

Vodný výluh: výluh tuhého průmyslového odpadu připravený standardním způsobem. Pro test na *Sinapis alba* se výluh obohacuje solemi stejným způsobem jako zředovací voda.

Zředovací voda: voda připravená podle ISO 7346.

Koncentrace vodného výluhu: množství solemi obohaceného vodného výluhu doplněné do 1 l zředovací vodou ($ml.l^{-1}$).

Předběžný test: test pro odhad toxicity vodného výluhu, provádí se s neředěným vodným výluhem.

Ověřovací test: test k ověření negativního výsledku předběžného testu, provádí se s neředěným výluhem.

Orientační test: test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací vodného výluhu.

Základní test: test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu EC50.
Kontrola: semena ve zředovací vodě bez testovaného vodného výluhu.
Inhibice růstu kořene: zkrácení průměrné délky kořene ve výluhu ve srovnání s kontrolou.
Stimulace růstu kořene: prodloužení průměrné délky kořene ve vodném výluhu ve srovnání s kontrolou.
IC50: koncentrace vodného výluhu, která způsobí 50% inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku (72 hodin).

Materiál

Testovací organismus: přebraná semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) s klíčivostí minimálně 90 %, střední velikosti (1,5 až 2,5 mm), okrově žlutá.
Voda: k přípravě zředovací vody a vodného výluhu je nutno používat destilovanou vodu (kap. 3.2).
Chemikálie: CaCl_2 (p.a.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.), NaHCO_3 (p.a.), KCl (p.a.).
Pomůcky a zařízení: Petriho misky, filtrační papír hrubší pórovitosti, pinzeta, pipety, odměrné baňky, milimetrové měřítko, hřebíček, nůžky, termostat pro teplotu 20 °C.

Podmínky testu

teplota: 20 ± 2°C
množství roztoku: 10 ml na Petriho misku o průměru 120 až 140 mm
počet testovacích semen: 30 semen na jedné Petriho misce
délka expozice: 72 hodin
počet paralelních stanovení: 3 paralelní stanovení
ostatní podmínky: bez osvětlení

Pracovní postup

Předběžný test: tento test se provádí na vodném výluhu obohaceném solemi v množství odpovídajícím zředovací vodě. Filtrační papír se vystřihne podle velikosti Petriho misky a rozvrhne se na něj pravouhlá síť 6 x 5 řad. V průsečících sítě se hřebíčkem udělají otvory pro geometrické uspořádání semen. Takto připravené filtrační papíry se uloží na dna Petriho misek a nasatí se 10 ml vodného výluhu nebo zředovací vody (kontrola). Na navlhčené filtrační papíry se pinzetou rovnoměrně rozmístí po 30 semenech. Takto připravené Petriho misky se umístí do termostatu s teplotou 20 °C bez přístupu světla. Po 72 hodinách se změní a zaznamenává délka všech kořenů ve výluhu i v kontrole.

Vyhodnocení předběžného testu: základem pro hodnocení testu inhibice růstu je průměrná délka kořene zjištěná v kontrole

a ve vodném výluhu. Počet nevyklíčených semen se uvede do protokolu. Do aritmetického průměru se tato semena započítávají jako nulová délka kořene. Jestliže semeno vyklíčí, ale nevytvorí kořínek, započítává se tato hodnota do aritmetického průměru rovněž jako nulová (kapitola 3.8.).

Výsledek testu hodnotí jako *n e g a t i v n í*, jestliže zjištěná inhibice růstu kořene není větší než 30 %, ani stimulace růstu není větší než 100 % ve srovnání s kontrolou. K ověření tohoto výsledku nasazujeme ověřovací test. V opačném případě je výsledek předběžného testu *p o z i t i v n í* a v případě inhibice růstu nasazujeme testy ke zjištění hodnoty IC50.

Ověřovací test: se provádí stejným způsobem jako předběžný test. Aby bylo zaručena správnost výsledků, nasazují se 3 paralelky (90 semen do neředěného výluhu, 90 semen kontrolních).

Vyhodnocení ověřovacího testu: se provádí stejným způsobem jako u předběžného testu, průměrná délka kořene se počítá ze všech 90 semen a porovnává s kontrolou.

Výsledek testu hodnotí jako *n e g a t i v n í*, jestliže zjištěná inhibice růstu kořene není větší než 30 %, ani stimulace růstu není větší než 100 % ve srovnání s kontrolou. V opačném případě je výsledek předběžného testu *p o z i t i v n í*. Při inhibici růstu vyšší než 30 % a současně nižší než 50 % nebo stimulaci vyšší než 100 % se výsledek uvede do protokolu a další testování se neprovádí.

Jestliže inhibice růstu kořene dosáhla 50 % a více, provádí se další testy k určení hodnoty IC50.

Jestliže se inhibice nebo stimulace růstu kořene v neředěném výluhu ve srovnání s kontrolou přibližuje limitním hodnotám, doporučujeme test zopakovat, při zjištěné inhibici případně nasadit základní test s vyššími koncentracemi vodného výluhu k určení hodnot IC(50) a teprve potom rozhodnout, zda je test na semenech pozitivní nebo negativní.

Stanovení hodnoty IC50

Test inhibice růstu kořene: pro tento test se připraví koncentrační řada vodného výluhu, pro každou koncentraci i kontrolu se nasazují 3 paralelní stanovení. Rozsah koncentrací se volí podle povahy výluhu, většinou 10 koncentrací v rozmezí od 1 ml.l^{-1} až k neředěnému výluhu. Případně je možné provést nejdříve orientační test (koncentrace 1, 10, 100, 500, ml.l^{-1} a neředěný výluh) a na základě výsledků tohoto testu zvolit vhodný rozsah cca 5 koncentrací pro test k určení hodnoty IC50. Pracovní postup je analogický s postupem uvedeným u předběžného testu.

Vyhodnocení testu inhibice růstu: základem pro výpočet hodnoty IC50 jsou opět průměrné délky kořene zjištěné v kontrole a v jednotlivých koncentracích, výpočet je uveden v kapitole 3.8. Hodnota IC50 se hodnotí pro každý z paralelních

testů zvláště, výsledná hodnota je průměrem těchto hodnot. Variabilita výsledků by neměla být větší než 30 %.

Testy akutní toxicity na standardu

Průběžně se doporučuje ověřovat správnost postupu a kvalita semen pomocí testu provedeném na standardu $K_2Cr_2O_7$. Inhibiční testy se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy. Podle našich zkušeností a zkušeností dalších pracovišť se hodnoty IC_{50} pohybují v rozmezí:

Testovací organismus	Rozpětí hodnot $72hIC_{50}$ ($mg \cdot l^{-1}$)
<i>Sinapis alba</i>	10 - 50

3.8. Výpočet hodnot $EC(IC)_{50}$

A. Grafické postupy

Poecilia reticulata, *Daphnia magna*
(výpočet pomocí probitové analýzy)

K získání dostatečně přesné hodnoty EC_{50} grafickou metodou je třeba alespoň 5 hodnot (5 koncentrací, kde došlo k úhynu 5 až 95 % testovacích organismů, u dafnií k imobilizaci či úhynu 5 až 95 % testovacích organismů).

Koncentrace vodného výluhu, ve kterých došlo k 5 až 95% imobilizaci nebo mortalitě dafnií nebo mortalitě ryb se vyjádří v logaritmických hodnotách ($\log c$).

Imobilizace nebo mortalita dafnií nebo mortalita ryb se vyjádří v procentech a tyto hodnoty se převedou podle tabulky 1 na probity.

Získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je $\log c$ (osa x), závisle proměnnou probitové hodnoty (osa y), jak je naznačeno na obr. 1.

Vynesenými body se proloží přímka (např. metodou nejmenších čtverců).

Z průsečíku proložené přímky a souřadnice probitové hodnoty 5 (tj. 50 %) se spustí kolmice na osu x a odečte se příslušná hodnota $\log c$.

Odlogaritmováním hodnoty $\log c$ se získá hledaná koncentrace EC_{50} .

Tab. 1: Probitové hodnoty

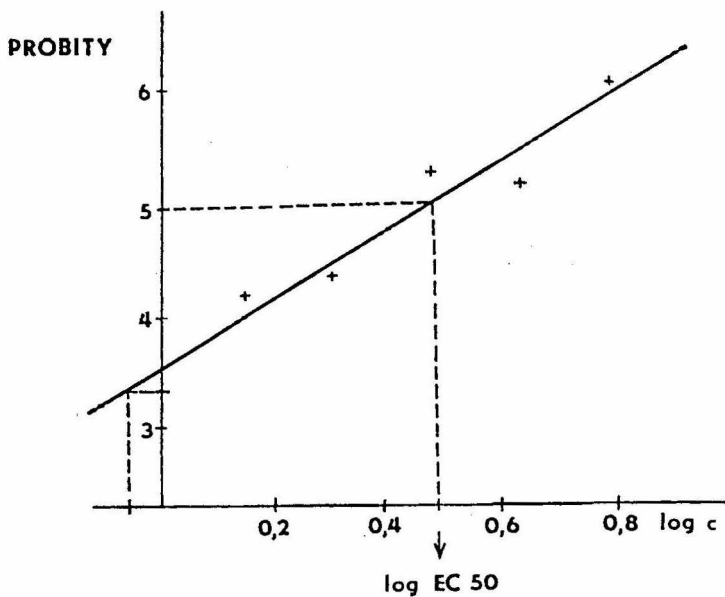
%	probit y	%	probit y	%	probit y	%	probit y
0,2	2,122	21,0	4,194	51,0	5,025	82,0	5,915
0,4	2,348	22,0	4,228	52,0	5,050	83,0	5,954
0,6	2,488	23,0	4,261	53,0	5,075	84,0	5,994
0,8	2,591	24,0	4,294	54,0	5,100	85,0	6,036
1,0	2,574	25,0	4,326	55,0	5,126	86,0	6,080
1,2	2,743	26,0	4,357	56,0	5,151	87,0	6,126
1,4	2,803	27,0	4,387	57,0	5,176	88,0	6,175
1,6	2,856	28,0	4,417	58,0	5,202	89,0	6,227
1,8	2,903	29,0	4,447	59,0	5,228	90,0	6,282
2,0	2,946	30,0	4,476	60,0	5,253	91,0	6,341
2,5	3,040	31,0	4,504	61,0	5,278	92,0	6,405
3,0	3,123	32,0	4,532	62,0	5,305	93,0	6,476
3,5	3,188	33,0	4,560	63,0	5,332	94,0	6,555
4,0	3,249	34,0	4,588	64,0	5,358	95,0	6,645
4,5	3,305	35,0	4,615	65,0	5,385	95,5	6,695
5,0	3,355	36,0	4,642	66,0	5,412	96,0	6,751
6,0	3,445	37,0	4,668	67,0	5,440	96,5	6,812
7,0	3,524	38,0	4,695	68,0	5,468	97,0	6,881
8,0	3,595	39,0	4,722	69,0	5,496	97,5	6,960
9,0	3,659	40,0	4,747	70,0	5,524	98,0	7,054
10,0	3,718	41,0	4,772	71,0	5,553	98,2	7,096
11,0	3,773	42,0	4,798	72,0	5,583	98,4	7,144
12,0	3,825	43,0	4,824	73,0	5,613	98,6	7,197
13,0	3,874	44,0	4,849	74,0	5,643	98,8	7,257
14,0	3,920	45,0	4,874	75,0	5,674	99,0	7,326
15,0	3,964	46,0	4,900	76,0	5,706	99,2	7,409
16,0	4,006	47,0	4,925	77,0	5,739	99,4	7,512
17,0	4,046	48,0	4,950	78,0	5,772	99,6	7,652
18,0	4,085	49,0	4,975	79,0	5,806	99,8	7,878
19,0	4,122	50,0	5,000	80,0	5,842		
20,0	4,158			81,0	5,878		

Příklad grafického postupu:

Tab. 2: Příklad výsledků testu toxicity

Koncentrace vodného výluhu (c)		Mortalita testovacích organismů		Probity
(ml.l^{-1})	(log c)	(ks)	(%)	
1,0	0,0	1	5	3,35
1,4	0,1461	4	20	4,16
2,1	0,3222	5	25	4,33
3,0	0,4771	12	60	5,25
4,3	0,6335	11	55	5,13
6,2	0,7924	17	85	6,04
Kontrola	-	0	0	-

Obr. 1: Grafické vyhodnocení hodnoty LC50



Scenedesmus quadricauda
(stanovení hodnoty IC50 pomocí integrálů biomasy)

Základem pro výpočet hodnoty IC50 jsou růstové křivky řasové kultury sestavené pro jednotlivé koncentrace, které se porovnávají s kontrolou.

Stanovení inhibice růstu je založeno na porovnání ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a v testovaných vzorcích (integrály biomasy). Příklad růstové křivky je uveden na obr. 2.

Plocha A pod růstovou křivkou (v bilineárních souřadnicích) se vypočítá pro každou testovanou kulturu z následující rovnice:

$$A = \frac{(N_1 - N_0) \cdot t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \cdot (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0) \cdot (t_n - t_{n-1})}{2}$$

kde t_1 je doba prvního měření od počátku testu

t_n je doba n-tého měření od počátku testu

N_0 je jmenovitá počáteční hustota buněk

N_1 je změřená hustota buněk v čase t_1

N_n je změřená hustota buněk v době t_n

Z vypočtených hodnot A pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice (případně stimulační) I_{Ai} v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_{Ai} = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} \quad (\%)$$

kde I_{Ai} je inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami, je-li $I_{Ai} < 0$, jedná se o stimulaci růstu

A_i je průměrná plocha pro danou koncentraci

A_c je průměrná plocha pro kontrolní vzorek

Scenedesmus quadricauda
(výpočet IC50 pomocí růstových rychlostí)

Výpočet inhibice růstu může být také založen na porovnání růstových rychlostí (μ) řasové kultury v testovaných roztocích a v kontrole:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{\tau_n}$$

kde N_n je hustota buněk naměřená v závěru testu (počet buněk nebo cenobií v 1 ml)

N_0 je hustota buněk na počátku testu (počet buněk nebo cenobií v 1 ml)

τ_n je doba trvání testu (dny)

Z vypočtených hodnot μ pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice (případně stimulační) I_i v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_i = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c} \quad (\%)$$

kde I_i je inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí, je-li $I_i < 0$, jedná se o stimulaci růstu

μ_i je růstová rychlost řasové kultury v testované koncentraci

μ_c je růstová rychlost řasové kultury v kontrole

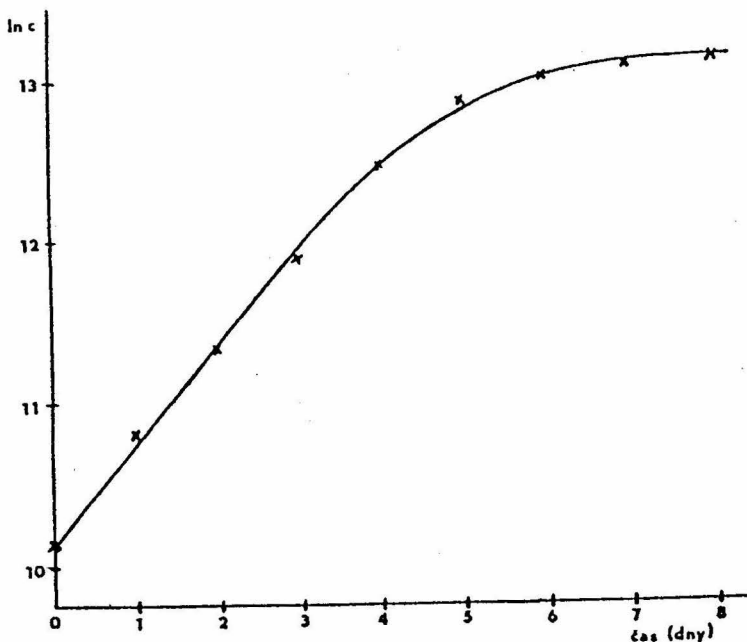
Vyhodnocení testu na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami však považujeme za objektivnější, neboť se v něm odráží průběh celého testu. Proto doporučujeme při vyhodnocování řasových testů vycházet z porovnání ploch pod růstovými křivkami.

Do protokolu je třeba uvést způsob vyhodnocení testu.

Výpočet hodnoty IC50

Do tabulky se sestaví hodnoty I_{Ai} , příp. I_{ui} proti odpovídajícím testovaným koncentracím a z těchto dat se sestaví příslušný graf na semilogaritmickém papíru (testovaná koncentrace se vynáší v logaritmické stupnici). Vynesenými body se proloží křivka a odečte se hodnota IC 50 (koncentrace vodného výluhu odpovídající 50% inhibici).

Při sestrojování růstových křivek se vynáší přirozené logaritmy hustoty řasových kultur $\ln c_k$, $\ln c_v$ (c_k - hustota řasové kultury v kontrole, c_v - hustota řasové kultury v testovaném roztoku vodného výluhu) zjištěné v jednotlivých koncentracích v průběhu testu proti času (obr. 2).



Sinapis alba

Základem pro hodnocení inhibičních (stimulačních) účinků výluhu na *Sinapis alba* je průměrná délka kořene zjištěná ve výluhu nebo jeho roztoku ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Počet nevykličených semen se uvede do protokolu a do průměru se tato semena započítávají jako nulová délka kořene. Semena, která vykličí, ale nevytvorí kořen, se do průměru započítávají rovněž jako nulová. Hodnota IC50 se počítá pro každé paralelní stanovení zvlášť, výsledná hodnota je průměrem uvedených hodnot. Jednotlivé hodnoty IC50 by se neměly lišit o více než 30 %.

Výpočet průměrné délky kořene *Sinapis alba*:

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^n L_i}{n}$$

\bar{L} = průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (cm)

L_i = délka i -tého kořene ve zvolené koncentraci (cm)

n = počet semen ve zvolené koncentraci (60)

Stejným způsobem se vypočte průměrná délka kořene v kontrole \bar{L}_C (cm).

Výpočet inhibice růstu kořene ve výluhu oproti kontrole:

$$I_i = \frac{\bar{L}_C - \bar{L}_V}{\bar{L}_C} \cdot 100$$

I_i = inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci,
je-li $I < 0$, jedná se o stimulaci růstu

\bar{L}_C = průměrná délka kořene v kontrole (cm)

\bar{L}_V = průměrná délka kořene v testované koncentraci vodného výluhu (cm)

Výpočet hodnoty IC50

Do tabulky se sestaví hodnoty I_i proti odpovídajícím testovaným koncentracím a z těchto dat se sestaví příslušný graf na semilogaritmickém papíru (testovaná koncentrace se vynáší v logaritmické stupnici). Vynesenými body se proloží křivka a odečte se hodnota IC 50 (koncentrace vodného výluhu odpovídající 50% inhibici).

B. Výpočet hodnot EC(IC)50 pomocí počítačové techniky:

Poecilia reticulata, *Daphnia magna*

Při tomto způsobu výpočtu je nutné mít k dispozici alespoň 3 údaje, kde mortalita testovacích organismů (u dafnií inhibice a mortalita), leží v rozmezí 5 až 95 %. Tento způsob výpočtu zohledňuje též hodnoty odpovídající maximální koncentraci s nulovou mortalitou a minimální koncentraci s mortalitou (imobilizací) 100 %. Informace o tomto počítačovém programu poskytuje VÚRH Vodňany (oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb).

Scenedesmus quadricauda, *Sinapis alba*

Pro tento výpočet je třeba mít k dispozici alespoň 3 koncentrace, v nichž došlo k inhibici růstu. Pro kvalitní výpočet je třeba, aby alespoň v jedné koncentraci došlo k inhibici růstu vyšší než 50 % a alespoň v jedné k inhibici růstu nižší než 50 %. Při nedodržení této podmínky je získaný výsledek považován za méně spolehlivý a doporučuje se test zopakovat.

Informace o softwaru poskytuje VÚRH Vodňany, PŠČ 389 25, tel. 0342/905906.

4. Hodnocení rizikovosti tuhých průmyslových odpadů z hlediska jejich účinků na vodní organismy a rostliny

Podle nařízení vlády České republiky č. 513/1992 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady příloha 1 "Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů" se odpady určené pro skládkování hodnotí podle vlastností výluhu a zařazují do tříd vyluhovatelnosti. Jedním z kritérií tohoto hodnocení je "toxicita", což je vlastnost, kterou hodnotíme na základě výsledků souboru toxikologických testů, které se provádějí s vodným výluhem na 3 vodních organismech a semenu kulturní rostliny.

Výsledek toxikologických testů je A. negativní
B. pozitivní

ad. A)

Výsledek ekotoxikologických testů (v nařízení vlády České republiky č. 513/1992 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady - příloha 1 "Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů" - "toxicita") je negativní, jestliže jsou splněny následující 4 podmínky:

- 1) v ověřovacím testu s neřaděným výluhem na *Poecilia reticulata* nevykazují ryby žádné výrazné změny v chování ve srovnání s kontrolou a během testu neuhyne žádná ryba.

- 2) v ověřovacím testu s neřaděným výluhem na *Daphnia magna* zjištěné procento imobilizace a úhynu nepřekročí 10 % ve srovnání s kontrolou (v kontrole nesmí dojít k úhynu nebo imobilizaci více než 10 % dafnií).
- 3) v testu na *Scenedesmus quadricauda* (*Scenedesmus subspicatus* nebo *Selenastrum capricornutum*) se neprokáže inhibice růstu o více než 30 %, ani stimulace růstu o více než 100 % ve srovnání s kontrolou.
- 4) v testu s neřaděným výluhem na *Sinapis alba* se neprokáže inhibice růstu o více než 30 %, ani stimulace růstu vyšší než 100 % ve srovnání s kontrolou.

ad. B)

Výsledek toxikologických testů je pozitivní, jestliže není splněna minimálně jedna z výše uvedených podmínek.

Jestliže v testu s neřaděným výluhem uhynie méně než 50 % testovacích organismů nebo je zjištěna inhibice růstu řas nebo kořene nižší než 50 %, nebo je zjištěna stimulace růstu o 100 % a vyšší, nelze hodnotu EC(IC)50 stanovit a tato skutečnost se uvede do protokolu.

Jestliže neřaděný vodný výluh způsobuje mortalitu, imobilizaci nebo inhibici růstu 50 % a vyšší, stanovují se hodnoty EC(IC)50. Tyto hodnoty se potom převádějí na tzv. toxikologickou jednotku (TU), což je bezrozměrné číslo, které se vypočte jako podíl čísla 100 /ml.l^{-1} a hodnoty EC(IC)50 vyjádřené v ml.l^{-1} :

$$TU = \frac{100 \text{ /ml.l}^{-1}}{EC(IC)50 \text{ / ml.l}^{-1}}$$

.Podle nařízení vlády České republiky č. 513/1992 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady příloha 1 "Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů" se rozlišují 4 třídy vyluhovatelnosti a dále podle kvality standardně připraveného vodného výluhu (limitních hodnot) je možno odpady skládkovat na skládkách s odpovídajícím technickým vybavením a stupněm zabezpečení (nařízení vlády České republiky 513/1992 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady příloha 4 "Technické zabezpečení pro jednotlivé skupiny skládek" nařízení vlády České republiky o podrobnostech nakládání s odpady).

I. třída vyluhovatelnosti - zeminy a hlušiny

do této třídy vyluhovatelnosti náleží odpady, kde výsledky toxikologických testů jejich vodného výluhu na všech čtyřech organismech jsou negativní.

II. třída vyluhovatelnosti - ostatní odpady

do této třídy vyluhovatelnosti náleží odpady, kde hodnota EC(IC)50 jejich vodného výluhu pro nejcitlivější z testovacích organismů je vyšší než 100 ml.l^{-1} (toxikologická jednotka $TU < 1$)

Odpady, kde hodnota EC(IC)50 vodného výluhu pro nejcitlivější z testovacích organismů je rovna nebo nižší než 100 ml.l^{-1} (toxikologická jednotka $TU \geq 1$), jsou řazeny do vyšších tříd vyluhovatelnosti.

Nebezpečné odpady

Odpady, kde hodnota EC(IC)50 vodného výluhu pro nejcitlivější z testovacích organismů je rovna nebo nižší než 10 ml.l^{-1} (toxikologická jednotka $TU \geq 10$) jsou podle Kategorizace a katalogu odpadů nebezpečné odpady (vykazují nebezpečnou vlastnost ekotoxicitu).

5. Doporučené postupy pro chovy testovacích organismů

5.1. Chov ryb

5.1.1. Chov *Poecilia reticulata*

K testům se používají rybky z vlastního chovu nebo od stabilních chovatelů - akvaristů. Živorodky se chovají v akváriích o objemu nad 10 litrů při teplotě vody 20 až 25 °C, teplota nesmí dlouhodobě poklesnout pod 16 °C. Voda v akváriích se mírně aeruje. Samečci se zřetelně odlišují od samic. Oplozená samička je nápadná zvětšeným bříškem, na jeho bocích a na spodku se v blízkosti řitní ploutve nachází tmavě zbarvená skvrna březosti - zárodečná skvrna. Samičky rodí podle věku a zdravotního stavu 10 až 50 mladých, doba březosti trvá v průměru 4 týdny při teplotě vody 25 °C. Samička vypuzuje z těla jikry s úplně vyvinutými mláďaty, která ihned po vypuštění z těla matky protrhnou blánu jikry, plavou a jsou schopna přijímat i větší potravu. Pro zdárný vývoj však potřebují i potravu rostlinnou. Plůdek je možno krmit jak živou potravou (nítěnky, perloočky), tak i vhodnou krmnou směsí. Potrava nesmí být jednotvárná, doporučuje se, aby převažovaly živé nítěnky. Dospělé páry se chovají v oddělených nádržích. Vzhledem k tomu, že páření může nastat již u velmi mladých jedinců, je nutné oddělit samce od samic co nejdříve a ponechat je až do doby jejich řádného vzrůstu a zesílení oddělené. Rybky pohlavně dospívají během 3 až 4 měsíců. Oplozené samičky se značně zvětšeným bříškem a tmavou skvrnou březosti se oddělují od chovu a dávají se do tzv. porodnic (nádob o objemu 1 až 5 litrů s možností úkrytů narozených ryb), po porodu se ihned samička od mláďat oddělí a po uplynutí 2 až 3 dnů opět zařazuje do chovné nádrže. Chovné nádrže je nutno minimálně jedenkrát týdně zbarvit usazenin.

5.1.2. Chov *Brachydanio rerio*

K testům se získávají rybky z vlastního chovu nebo od stabilních chovatelů - akvaristů. Dania pruhovaná se chovají v akváriích o objemu nad 50 litrů při teplotě vody 20 až 25 °C. Ke stimulaci výtěru se teplota vody zvyšuje na 24 až 27 °C. Voda v akváriích se mírně aeruje. Rozlišení pohlaví v dospělosti je poměrně jednoduché. Samečci jsou štíhlejší se zlatavým nádechem povrchu těla, samičky mají zřetelně zvětšený objem dutiny tělní. Pohlavně dospívají ve 4 až 6 měsících, kdy dosahují délky těla kolem 35 mm. Příprava ryb na výtěr trvá asi 2 týdny, samečci a samičky jsou odděleny a krmeny živou potravou. Hustota nasazení je maximálně 30 ryb v nádrži o objemu 70 litrů. Výtěr probíhá při 24 až 27 °C. Do výtěrové nádrže se umístí síťová vložka o velikosti ok 2 mm, aby mohly jikry padat ke dnu. Výška vodního sloupce mezi dnem síťové podložky a hladinou má být okolo 10 cm. Do tohoto prostoru se umístí v ranních hodinách 3 sa-

mečci a ve večerních hodinách se přidají 2 samičky. Výtěr je obvykle vyvolán ranním světlem. Po výtěru se dospělci odloví. Plůdek se líhne z jiker zhruba za 48 až 72 hodin při teplotě 24 až 27 °C a rozplavává se po 3 až 5 dnech. Krmí se nejjemnějším živým krmivem (nálevníky, vířníky) nebo potravou umělou (např. Mikromin). Další odchov je prováděn na velikostně odpovídající přirozené potravě. Z výtěru jednoho páru bývá až 200 kusů potomstva.

5.2. Chov perlooček *Daphnia magna*

Životní cyklus perlooček

Po většinu roku dochází u druhu *Daphnia magna* k partenogenetickému rozmnožování. Znamená to, že z partenogenetických, tzv. letních vajíček se líhnou pouze samičky. K líhnutí samečků, a poté k pohlavnímu rozmnožování, dochází při nástupu nepříznivých životních podmínek. Pohlavním rozmnožováním vznikají oplozená, tzv. zimní, neboli efipiální vajíčka, která jsou na rozdíl od letních vajíček pouze 2 a jsou uložena v tmavém pouzdře - efipiu.

Chov perlooček

Není jednoznačně stanoven. Mohou být vhodně použity různé metody tak, aby byla zaručena kvalitní partenogenetická reprodukce. Doporučuje se např. tento postup:

Několik skleněných nádob, (např. třílitrových potravinářských sklenic), se naplní cca 2,5 litry vody přirozeného původu (rybník, studna, potok apod.), která není kontaminována cizorodými látkami a nepůsobí nepříznivě na dafnie. Je vhodné vodu nejdříve předběžně vyzkoušet v pokusném odchovu v malém měřítku.

Do každé nádoby se přenese po 10 až 20 ks samiček *Daphnia magna* z prosperujícího laboratorního chovu nebo z přirozené lokality. Jestliže začínáme pracovat s dafniemi z přirozené lokality, je nutné selektovat samičky následujícím způsobem: na podložní skličko se přenese několik kusů dafnií a mikroskopicky se určí, zda se jedná o druh *Daphnia magna*. Dospělé samičky s vajíčky umístíme do nádoby, kde je dále popsán způsobem krmíme. Z uvolněných mláďat zakládáme další chov. Prohlídkou pod mikroskopem překontrolujeme, zda všichni nasazení jedinci jsou samičky. Získáme-li z přírodního chovu mladé jedince, též mikroskopicky zkontrolujeme jejich pohlaví a samečky vyřadíme. Vhodné je prohlédnout též část jejich potomstva, určenou pro nasazení do chovu. Samečkové se mohou dostat do chovu při rutinním přesazování mláďat z degradujícího chovu, kde se již určité množství samečků může vyskytovat. Dospělého samečka poznáme podle odlišného chování: sameček prudce plave a snaží se přichytit na samičky, přichycuje se

i na stěny nádob. Má též odlišný tvar těla. Mladé samečky lze s jistotou poznat podle dlouhých tykadélek (obr. 3) pouze mikroskopicky. Samičky je nutno selektovat následujícím způsobem: Na podložní sklíčko se přenese několik ks dafnií a mikroskopicky, při malém zvětšení, např. 6x10, se určí samečkové - u sameček tykadélka nepřesahují rypec, zatímco u sameček tykadélka rypec výrazně přečnivají.

Při mikroskopování perlooček postupujeme takto: trubičkou odchytíme 3 až 4 kusy dafnií, které kápneme na čisté podložní sklíčko a přebytečnou vodu odsajeme ke sklíčku kolmo postavenou trubičkou. Tím dafniím znemožníme aktivní pohyb a můžeme je poměrně snadno prohlédnout. Po prohlédnutí a vyřazení nevhodných jedinců zbylé dafnie spláchneme do nádoby.

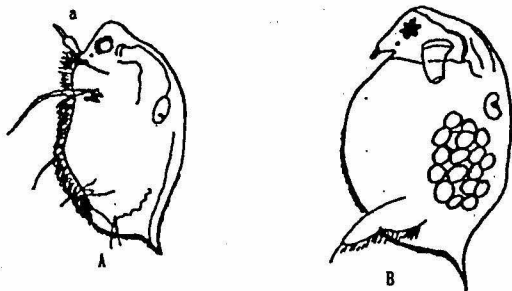
Nasazené dafnie je nutné ihned začít krmit, nejlépe suspenzí čerstvých, lyofilizovaných nebo sušených řas. Suspenze řas se dává do sklenic do vzniku slabě nazelenalého zákalu vody. Sušené a lyofilizované řasy dodává Mikrobiologický ústav ČSAV, Třeboň - Opatovický mlýn. Dávky krmiva nesmějí být příliš velké, aby nedocházelo k tvorbě zahnívajících sedimentů na dně nádob. Vhodnější je krmení v malých dávkách a kratších intervalech (např. dvakrát denně). Před dnem pracovního volna je možno dávky zvýšit, ale poté je třeba kontrolovat čistotu nádob. Pro krmení se osvědčila příprava zásobní koncentrované suspenze řas na 3 až 4 krmné dny, kterou uchováváme v chladu, mírný silážní zápach není na závadu. Při nedostatečném krmení se objevují samečci a samičky s epipii. Při překrmování nebo krmení nevhodným krmivem bývají kultury napadány plísněmi. Napadené kultury je nutné ihned odstranit a umyté nádoby desinfikovat 4% formaldehydem.

Zásadní podmínkou prosperujícího chovu je udržování perlooček ve fázi partenogenetického rozmnožování (rodí se pouze samičky). Tohoto stavu lze docílit pravidelnou inokulací čerstvě narozených mláďat z předchozí generace. Doporučuje se oddělovat dospělé perloočky od mladých jedinců jakmile dojde k hromadnému uvolnění většiny mláďat ze zárodečných prostorů samic. Vyprázdněné samice se znovu přelovují do chovných nádob, nevyprázdněné samice se odstraní. Tím se získá záruka relativně synchronního chovu. Z 10 nasazených sameček je možno počítat se ziskem 150 až 300 mladých jedinců *Daphnia magna* (dle velikosti mateřských organismů). Při teplotě vody 20 až 22 °C a dostatečném krmení bývá interval od inokulace jednodenních sameček do odběru mladých perlooček do testů zhruba deseti- až čtrnáctidenní. Při použití vyprázdněných dospělých sameček z předchozího chovu lze získat použitelné mladé jedince zhruba za týden.

Pro plynulý odběr je vhodné provozovat odchov dafnií ve větším množství nádrží. Při každém hromadném vrhu neonát je třeba tyto jedince separovat přelitím přes sítku o světlosti ok 1 mm, kterou mladé perloočky projdou, převedou se do připravené nádoby a dospělé samičky s prázdným vaječným prostorem se okamžitě vrací do chovu. Zachycené mladé perloočky se scedí opatrně přes síto se světlostí ok 0,1 mm a okamžitě spláchnou do manipulační nádoby, ze které jsou

odpočítávají do testů. Část mladých perlooček se může použít pro kontinuální regeneraci chovu.

Obr. 3: *Daphnia magna*
(A - sameček, a - dlouhá tykadélka; B - samička)



Počítání perlooček

Počítání perlooček do chovných či testovacích roztoků se provádí následujícím způsobem: k odlovu dafnií se používají skleněné trubičky světlosti 2 až 4 mm podle velikosti dafnií, opatřené pipetovacím balónkem. Při přenosu dbáme, aby nedošlo k mechanickému poškození těl perlooček. Perloočky vysazujeme do vytemperovaných roztoků (bez bublinek), aby nedošlo k vniknutí vzduchu pod skořápky perlooček. Manipulační nádoby i trubičky udržujeme v úzkostlivé čistotě, neboť i nepatrná kontaminace některým toxikantem může likvidovat chov.

6. Příklad protokolu o provedených testech

Protokol o provedení biologických testů toxicity s výluhem tuhého průmyslového odpadu

Objednatel:

Původce odpadu:

Typ výroby produkující odpad:

Datum převzetí vzorku k testování:

Protokol vypracován dne:

Protokol odeslán dne:

Jméno a podpis odpovědného pracovníka:

Počet stran protokolu:

Seznam pracovníků, kteří prováděli toxikologické testy:

Datum a způsob odběru vzorku: (podle údajů objednatele)

Specifikace použitých metod: metodicky bylo postupováno dle metodiky "Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů", vypracované ve VÚRH Vodňany.

Tuhý průmyslový odpad

Slovní popis odpadu:

Sušina při 105 °C: g.kg⁻¹

Příprava vodného výluhu: naváženo g surového zhomogenizovaného odpadu, přidáno 1 000 ml redestilované vody a 6 hodin třepáno na třepačce. Po dalších 18 hodinách sedimentace v odměrném válci odečten objem pevné fáze, směs byla přefiltrována a byl změřen objem získaného filtrátu.

Základní charakteristika vodného výluhu:

Objem pevné fáze: ml

Objem filtrátu: ml

Slovní popis:

pH:

Rozpuštěné látky: g.l⁻¹

Výsledky toxikologických testů:

1. Test akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Předběžný test: nasazeno po ks ryb

	Teplota (°C)			O ₂ (% nasycení)			pH			Mortalita (ks)		
	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.
Nereditý výluh												
Kontrola												

Výsledek předběžného testu:

Základní test: v 1 koncentraci ks ryb

Výsledky základního testu:

Koncentrace (ml.l ⁻¹)	Teplota (°C)			O ₂ (% nasycení)			pH			Mortalita (ks)	
	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	48 hod.	
Kontrola											

48hLC50 = ml.l⁻¹

Klinické příznaky intoxikace:

2. Test akutní toxicity na *Daphnia magna*

Předběžný test: nasazeno po ks dafnií

	Teplota (°C)			O ₂ (% nasycení)			pH			Mortalita (ks)		
	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.
Neředitelný výluh												
Kontrola												

Výsledek předběžného testu:

Základní test: v jedné koncentraci ks dafnií

Výsledky základního testu:

Koncentrace (ml.l ⁻¹)	Teplota (°C)			O ₂ (% nasycení)			pH			Mortalita (ks)
	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	0 hod.	24 hod.	48 hod.	48 hod.
Kontrola										

48hEC50 = mg.l⁻¹
 =====

3. Test inhibice růstu *Scenedesmus quadricauda*

Předběžný test: inokulum: cenobíí v 1 ml
 živné medium: dle ISO 8692
 délka expozice: 72 hodin

Výsledky předběžného testu:

	Teplota (°C)				pH				Hustota řasové suspenze (tis. cenobíí v 1 ml)			
	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.
Kontrola												
Neředěný výluh												

Výsledek předběžného testu:

Základní test: inokulum: cenobii v 1 ml
 živné médium: dle ISO 8692
 délka expozice: 72 hodin

Výsledky základního testu:

Koncentrace (ml.l ⁻¹)	Teplota (°C)				pH				Hustota řasové suspenze (tis. cenobii v 1 ml)			
	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.
Kontrola												

72hIC50 = ml.l⁻¹
 =====

Inhibice růstu byla hodnocena na základě velikosti ploch pod růstovými křivkami

4. Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Předběžný test: nasazeno: semen
 doba expozice: 72 hodin

Výsledky předběžného testu:

	Průměrná délka kořene (cm)
Kontrola	
Neřaděný výluh	

Teplota v průběhu testu:

Datum				
Teplota (°C)				

Výsledek předběžného testu:

Základní test: nasazeno semen v každé koncentraci
doba expozice: 72 hodin

Výsledky základního testu:

Koncentrace (ml.l ⁻¹)								kontrola
Průměrná délka kořene (cm)								

Teplota v průběhu testu:

Datum				
Teplota (°C)				

72hIC50 = ml.l⁻¹

Hodnocení výluhu ve smyslu nařízení vlády České republiky ze dne 23.9. 1992 o podrobnostech nakládání s odpady:

Na základě výsledků ekotoxikologických testů navrhuje výluh zařadit do třídy vyluhovatelnosti (kategorie odpadů).

Upozornění: Laboratoř neručí za způsob odběru vzorku a jeho reprezentativnost pro daný odpad či skládku.

Protokol může být reprodukován jedině celý, s písemným souhlasem laboratoře.

Poznámka: Vzhledem k tomu, že se jedná o ukázkový protokol, jsou zde uvedeny výsledky pouze jednoho testu - v praxi se budou uvádět výsledky všech tří paralelních testů, včetně průměrných hodnot EC(1C)50.

7. Doplnující normy a předpisy

ČSN 01 8003 Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích 1985 (Schválena: 11.4.1985, účinnost: 1.7.1986)

ON 46 6807 Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších (Schválena: 10.3.1988, účinnost: 1.5.1989)

ISO 8692 Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, 1989

ISO 6341 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea), 1989

ISO 7346/1 Water quality - Dermination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] Part 1: Static method, 1984

Zákon č. 138/1973 Sb., o vodách (vodní zákon)

Zákon ČNR č. 130/1974 Sb., o státní správě ve vodním hospodářství, ve znění zákona ČNR č. 49/1982 Sb., zákona ČNR č. 425/1990 Sb., a zákona ČNR č. 23/1992 Sb. (Úplné znění, jak vyplývá z pozdějších změn a doplnění uveřejněno pod č. 458/1992 Sb.)

Nařízení vlády ČSR č. 192/1988 Sb., o jedech a, některých jiných látkách škodlivých zdraví, ve znění nařízení vlády ČR č. 182/1990 Sb., nařízení vlády ČR č. 33/1992 Sb. a nařízení vlády č. 278/1993 Sb., kterými se mění a doplňuje nařízení vlády ČSR č. 192/1988 Sb.

Zákon č. 238/1991 Sb., o odpadech.

Opatření FVŽP, kterým se vyhlašuje Kategorizace a katalog odpadů, uveřejněné v částce 69/1991 Sb. (Včetně oprav chyb, podle redakčního sdělení v částce 90/1991 Sb.)

Zákon ČNR č. 311/1991 Sb., o státní správě v odpadovém hospodářství, ve znění zákona ČNR č. 311/1991 Sb., o státní správě v odpadovém hospodářství.

Vyhláška MŽP ČR č. 401/1991 Sb., o programech odpadového hospodářství.

Nařízení vlády ČR č. 521/1991 Sb., o evidenci odpadů.

Zákon ČNR č. 311 o státní správě v odpadovém hospodářství ze dne 8. července 1991.

Nařízení vlády ČR č. 171/1992 Sb., kterým se stanoví ukazatele přípustného znečištění vod.

Nařízení vlády ČR č. 513/1992 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady.

DOČKAL, P.: Metody testů akutní toxicity a biodegradability xenobiotik., 3. revidované a doplněné vydání, VÚV Ostrava 1991, 155 s.

FINNEY, D. J.: Probit analysis. Cambridge Univ. Press, London, 1971.

WEBER, E.: Grundriss der biologischen Statistik. VEB G. Fischer Verlag. Jena, 1980.

Adresa autorů:

Ing. Jana M á c h o v á , MVDr. Zdeňka S v o b o d o -
v á , DrSc., Ing. Blanka V y k u s o v á , Výzkumný ústav
rybářský a hydrobiologický, 389 25 Vodňany

Lektoroval:

Prof.RNDr. Vladimír S l á d e ě k , DrSc., Havlovického 3
147 00 Praha 4 - Hodkovičky