

ČÁST I

METODY PRO ZKOUŠENÍ VLASTNOSTÍ NEBEZPEČNÝCH PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

I. METODA PRO STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY PRO RYBY – metoda C.1 podle přílohy směrnice Komise 92/69/EHS ze dne 31. července 1992, kterou se po sedmnácté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sblížování správních a právních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek (dále jen „směrnice 92/69/EHS“)

I.1. METODA

I.1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Pro usnadnění výběru nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) s cílem zajistit dostatečně konstantní koncentrace zkušební látky po celou dobu experimentu je žádoucí mít pokud možno k dispozici údaje o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stabilitě, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

I.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látky. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC_{50}), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb.

Všechny koncentrace zkušební látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu ($mg \cdot l^{-1}$). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg \cdot kg^{-1}$).

I.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

I.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací $100 mg \cdot l^{-1}$, s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkušební látky přidané do vody po dobu 96 h. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 h a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC_{50}).

I.1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jednu rybu, pokud se použije méně než deset ryb).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

Koncentrace zkušební látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které

- i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo
- ii) mohou vytvářet stabilní emulze nebo disperse, nebo
- iii) jsou ve vodných roztocích nestabilní,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením testovacích ryb.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemá změnit o více než 1.

I.1.6

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Mohou být použity tři postupy:

Statická zkouška:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká. (Roztoky se během celé zkoušky nemění.)

Semistatická metoda:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích (např. po 24 h) zcela vyměňován.

Průtoková metoda:

Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkušební látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

I.1.6.1

Činidla

I.1.6.1.1

Roztoky zkušebních látek

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkušební koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředící vodě.

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejnou koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní ryby. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg na l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistují specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkušební látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

I.1.6.1.2 *Voda pro chov ryb a ředění*

Může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (viz doplněk 1). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg·l⁻¹ (vztaženo na CaCO₃) a pH od 6,0 do 8,5.

I.1.6.2 **Přístroje**

Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:

- systém pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),
- přístroj pro měření koncentrace kyslíku,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody,
- vhodný přístroj pro měření teploty,
- pH-metr.

I.1.6.3 **Testovací ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoli další významné ekonomické a biologické faktory. Při výběru druhu ryb by měla být také zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace (1).

Seznam doporučených druhů ryb pro provedení této zkoušky je uveden v doplňku 2; dává se přednost druhům danio pruhované a pstruh duhový.

I.1.6.3.1 *Chov*

Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Ryby musí být chovány nejméně 12 dní v následujících podmínkách:

Obsádka:

Vhodná vzhledem k metodě (metoda s recirkulací nebo průtoková metoda) a druhu ryb.

Voda:

Viz 1.6.1.2.

Osvětlení:

Osvětlení 12 až 16 h denně.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku:

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem.

Krmení:

Třikrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 h před začátkem zkoušky.

I.1.6.3.2 *Mortalita*

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se následující kritéria:

- mortalita vyšší než 10 % populace za 7 dní:
celá obsádka ryb se vyřadí,
- mortalita 5 až 10 % populace:
v chovu se pokračuje dalších 7 dní. Nedojde-li k dalším případům úhynu, obsádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena,
- mortalita menší než 5 % populace:
obsádka je pro zkoušku použitelná.

I.1.6.4 **Aklimatizace**

Všechny ryby musí být nejméně na 7 dnů před použitím ve zkoušce nasazeny do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se použije při zkoušce.

I.1.6.5 **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkušební látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria jakosti.

Ryby se exponují zkušební látce za níže uvedených podmínek:

- délka expozice: 96 h;
- počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci;
- nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce;
- obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g na litr; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka;
- zkušební koncentrace: nejméně pět koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %;
- voda: viz 1.6.1.2;
- osvětlení: osvětlení 12 až 16 h denně;
- teplota: podle druhu ryb (doplněk 2), avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ± 1 °C;
- koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě;
- krmení: žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 až 4 h a dále nejméně každých 24 h. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby se odstraní, jakmile jsou zpozorovány, a úhyn se zaznamená.

Zaznamenají se všechny zjevné abnormality (např. ztráta rovnováhy, změny v plavání, chování, v dýchací funkci, v pigmentaci atd.).

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkušební látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stabilní disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede se 7 až 10 rybami a se stejným počtem ryb v kontrole (kontrolách). (Podle teorie binomického rozdělení je při použití 10 ryb a při nulové mortalitě 99,9% pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Při 7, 8 nebo 9 rybách znamená nulová mortalita nejméně 99% pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.)

Dojde-li k úhynům, musí se provést celá studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se.

I.2

DATA A HODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24, 48, 72 a 96 h), vynese pro každou expoziční dobu mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC_{50} a meze spolehlivosti ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC_{50} , postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC_{50} nachází mezi těmito hodnotami.

Zjistí-li se, že není možné udržet stabilitu nebo homogenitu zkušební látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

I.3

ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující údaje:

- údaje o testovacích rybách (vědecký název, kmen, dodavatel, veškerá předchozí ošetření, velikost a počet ryb použitých při každé zkušební koncentraci);
- zdroj ředící vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, tvrdost, teplota);
- u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků;
- koncentrace všech pomocných látek;
- přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stabilitě zkušební látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích;

- jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky;
- výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena;
- důvody pro volbu použitého zkušební postupu a podrobnosti o něm (např. statický, semistatický, dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována obsádka ryb atd.);
- popis zkušebního zařízení;
- světelný režim;
- koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 h;
- důkaz, že byla splněna kritéria jakosti;
- tabulka kumulativních hodnot mortality při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování;
- graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky;
- podle možnosti hodnoty LC₅₀ při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti);
- použité statistické metody stanovení hodnot LC₅₀;
- při použití referenční látky a údaj o získaných výsledcích;
- nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb;
- nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu.

I.4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- (2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303, June 1985.
- (3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow-Through methods – NFT 90-305, June 1985.
- (4) ISO 7346/1, /2, /3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- (5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).
- (7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- (8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- (9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

- (10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.
- (11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- (12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed., APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- (13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P., Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments. *J. Pharm, Exp. Therap.*, 1949, 96, 99.
- (16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- (17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 1969, 3, 793-821.
- (18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 1970, 4, 3-32.
- (19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC₅₀. In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (F. I. Mayer, J. L. Hamelink (eds.)). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J., Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

DODATEK 1 Upravená voda

Příklad vhodné ředící vody

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky:

CaCl ₂ ·2H ₂ O (chlorid vápenatý dihydrát)	11,76 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (síran hořečnatý heptahydrát)	4,93 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
NaHCO ₃ (hydrogenuhličitan sodný)	2,59 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
KCl (chlorid draselný)	0,23 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	

Upravená ředící voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr. Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být $7,8 \pm 0,2$.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředící voda se nechá 12 h stát a nesmí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poměr množství iontů Ca : Mg je 4 : 1 a poměr množství iontů Na : K je 10 : 1.

Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

DODATEK 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušení

Doporučený druh	Doporučený rozsah teplot při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka ryb (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton - Buchanan), danio pruhované	20 až 24	$3,0 \pm 0,5$
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), střevle	20 až 24	$5,0 \pm 2,0$
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneanus 1758), kapr obecný	20 až 24	$6,0 \pm 2,0$
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	$3,0 \pm 1,0$
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), živorodka duhová	20 až 24	$3,0 \pm 1,0$
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneanus 1758), slunečnice modrá	20 až 24	$5,0 \pm 2,0$
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh duhový	12 až 17	$6,0 \pm 2,0$
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneanus 1758), jelec jesen	20 až 24	$6,0 \pm 2,0$

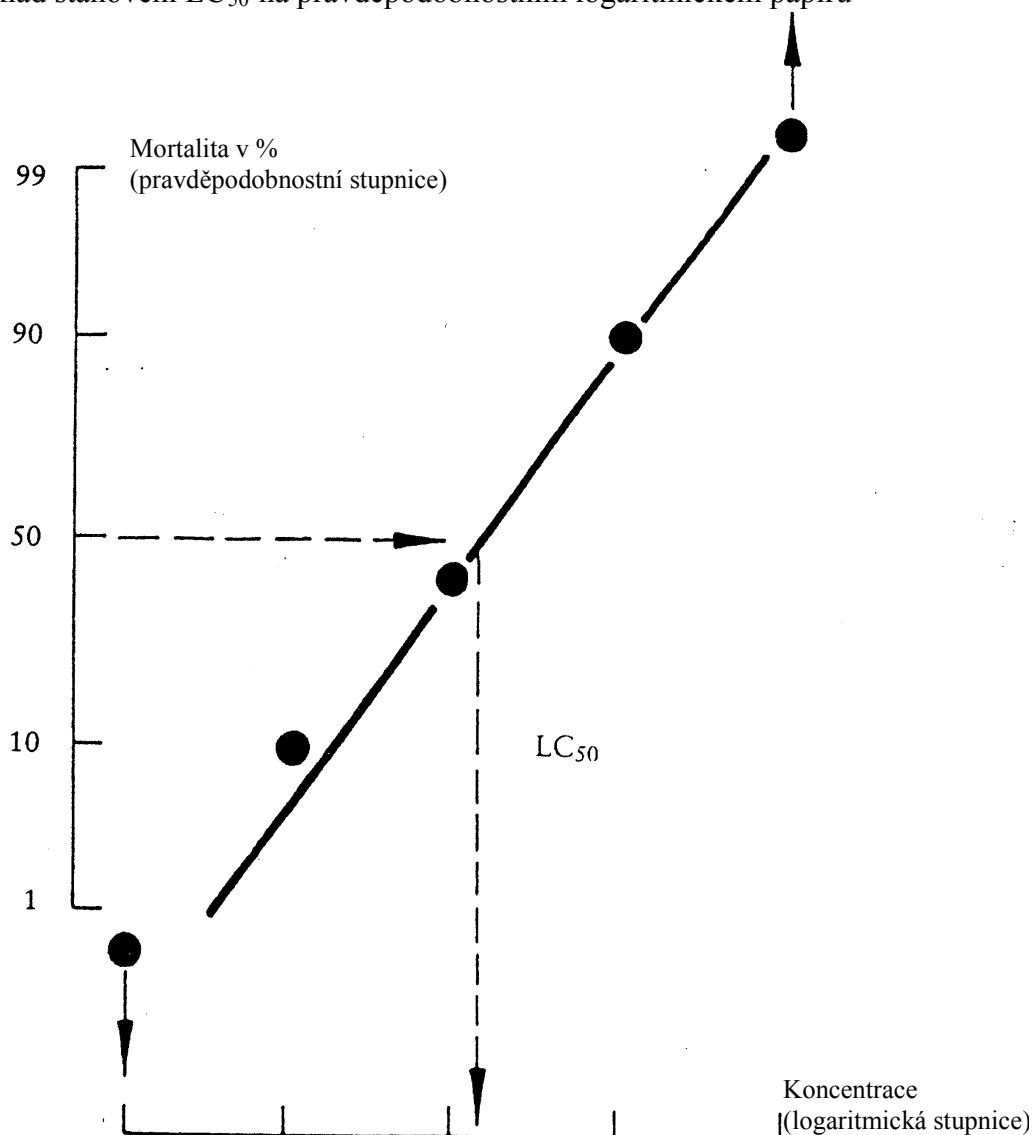
Opatřování ryb

Ryby uvedené v seznamu se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

DODATEK 3

Příklad křivky závislosti úmrtnosti, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení LC_{50} na pravděpodobnostním logaritmickém papíru



II. METODA PRO STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY PRO DAFNIE – metoda C.2 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

II.1 METODA

II.1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit střední účinnou koncentraci látky pro imobilizaci (EC_{50}) dafnií ve sladkovodním prostředí. Před započítím zkoušky je žádoucí mít pokud možno k dispozici údaje o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stabilitě, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

II.1.2

DEFINICE A JEDNOTKY

Požadavek směrnice stanovit LC_{50} pro dafnie se považuje za splněný stanovením EC_{50} , jak je popsáno v této zkušební metodě.

Akutní toxicita se v této zkoušce vyjadřuje střední účinnou koncentrací látky pro imobilizaci (EC_{50}) dafnií. Je to koncentrace (rozumí se výchozí koncentrace), která během nepřetržité expozice po určitou stanovenou dobu imobilizuje 50 % dafnií ve zkušební skupině během doby působení (doby expozice).

Imobilizace:

Dafnie, které nejsou schopné do 15 s po lehkém zatřepání zkušební nádrží začít plavat, se považují za imobilizované.

Všechny koncentrace zkušební látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu ($mg \cdot l^{-1}$). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg \cdot kg^{-1}$).

II.1.3

REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Souhrn výsledků okružního testu laboratoří EHS s použitím čtyř různých látek je uveden v doplňku 2.

II.1.4

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací $100 mg \cdot l^{-1}$, s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Dafnie se 48 h exponují zkušební látce přidané v různých koncentracích do vody. Použije-li se kratší doba, zdůvodní se ve zprávě.

Za jinak stejných experimentálních podmínek a v přiměřeném rozmezí koncentrací zkušební látky působí různé koncentrace zkušební látky na schopnost plavání dafnií rozdílně. Různé koncentrace mají za následek skutečnost, že na konci zkoušky ztrácí různý procentuální podíl dafnií schopnost plavat. Koncentrace, které nezpůsobují žádnou imobilizaci nebo způsobují 100% imobilizaci, se zjistí přímo pozorováním, zatímco hodnota 48hodinová EC_{50} se stanoví podle možnosti výpočtem.

Při této metodě se používá statický systém, zkušební roztoky se tedy během doby expozice neobnovují.

II.1.5.

KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Imobilizace v kontrolních zkouškách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %.

Dafnie se v kontrolních zkouškách nesmí trvale zdržovat u hladiny.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve zkušební nádrži musí být po celou dobu zkoušky vyšší než $3 mg \cdot l^{-1}$. Koncentrace kyslíku však nesmí v žádném případě klesnout pod $2 mg \cdot l^{-1}$.

Koncentrace zkušební látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které

- i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo
- ii) mohou vytvářet stabilní emulze nebo disperse, nebo
- iii) jsou ve vodných roztocích nestabilní,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením testovacích organismů.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než 1.

II.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

II.1.6.1 Činidla

II.1.6.1.1 *Roztoky zkušebních látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkušební koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředící vodě.

Látky se obvykle zkoušejí až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní dafnie. Koncentrace pomocných látek by měly být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg/l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistují specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkušební látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají ve zprávě.

II.1.6.1.2 *Zkušební voda*

Pro tuto zkoušku se použije upravená voda (viz doplněk 1 a odkaz (2): ISO 6341).

Aby nebylo nutné aklimatizovat dafnie před zkouškou, doporučuje se, aby byla voda pro kultivaci podobné jakosti (pH, tvrdost), jako voda pro zkoušku.

II.1.6.2 **Přístroje**

Použijí se běžné laboratorní přístroje a zařízení. Zařízení, které přijde do styku se zkušebními roztoky, by mělo být nejlépe skleněné:

- přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou, nebo jiný vhodný přístroj na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),
- vhodný přístroj pro měření teploty,
- pH-metr,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody.

II.1.6.3 **Testovací organismy**

Přednost se dává druhu *Daphnia magna*, ačkoliv se připouští také druh *Daphnia pulex*. Testovací dafnie musí být na začátku zkoušky mladší než 24 h, musí být laboratorně odchované, bez zjevných nemocí a musí být známého původu (např. chov, předchozí ošetření, atd.).

II.1.6.4 **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

Dafnie se exponují zkušební látce následujícím způsobem:

- *délka expozice*: 48 h,
- *počet dafnií*: nejméně 20 na každou zkušební koncentraci, nejlépe rozdělených na čtyři skupiny po pěti dafniích nebo na dvě skupiny po 10 dafniích,
- *obsádka*: na každou dafnií by měly připadat 2 ml zkušebního roztoku,
- *zkušební koncentrace*: zkušební roztok se připraví bezprostředně před nasazením dafnií, nejlépe bez použití jiného rozpouštědla než vody. Připraví se koncentrace tvořící geometrickou řadu, přičemž poměr mezi koncentracemi nesmí být vyšší než 2,2. Zároveň s kontrolami se zkoušejí koncentrace dostatečné pro to, aby po 48 h vyvolaly nulovou nebo a 100% imobilizaci, a dále mezilehlé koncentrace umožňující výpočet 48hodinové EC₅₀,
- *voda*: viz 1.6.1.2,
- *osvětlení*: střídání světla a tmy je libovolné,
- *teplota*: zkušební teplota by měla být 18 až 22 °C, avšak v rámci dané zkoušky kolísající v tomto rozmezí maximálně o ±1 °C,
- *provzdušňování*: zkušební roztok nesmí být provzdušňován probubláváním,
- *krmení*: žádné.

Měření pH a obsahu rozpuštěného kyslíku v kontrolních skupinách a u všech zkušebních koncentrací se provede na konci zkoušky; pH zkušebního roztoku nesmí být měněno.

Těkavé sloučeniny se zkoušejí v hermeticky uzavřených nádobách naplněných po okraj, dostatečně velkých, aby nedošlo k nedostatku kyslíku.

Prohlídka dafnií se provede nejpozději po 24 h a znovu po 48 h.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkušební látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stabilní disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede s 20 dafniemi rozdělenými do dvou nebo čtyř skupin a se stejným počtem v kontrolní skupině (v kontrolních skupinách). Dojde-li k imobilizaci, musí se provést celá studie.

II.2

DATA A HODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24 a 48 h), vynesou mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se pro každé pozorovací období EC_{50} a meze spolehlivosti ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty EC_{50} , postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají nulovou a 100% imobilizaci, jsou dostatečnou informací o rozpětí, ve kterém EC_{50} leží.

Zjistí-li se, že není možné udržet stabilitu nebo homogenitu zkušební látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

II.3

ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující údaje:

- údaje o testovacím organismu (vědecký název, kmen, dodavatel nebo původ, veškerá předchozí ošetření, metoda chovu – včetně původu, druhu a množství potravy, frekvence krmení);
- zdroj ředící vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, teplota, tvrdost);
- u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků;
- koncentrace všech pomocných látek;
- přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stabilitě zkušební látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích;
- jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky;
- výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena;
- popis zkušebního zařízení;
- světelný režim;

- koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků;
- důkaz, že byla splněna kritéria jakosti;
- tabulka kumulativních hodnot imobility při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování (24 a 48 h);
- graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky;
- podle možnosti hodnoty EC₅₀ při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti)
- použité statistické metody stanovení hodnot EC₅₀;
- při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích;
- nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky imobilizaci;
- nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% imobilizaci.

II.4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- (2) International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989.
- (3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
- (4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P., Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).
- (6) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- (7) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 1949, 96, 99-113.
- (8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 1969, 3, 793-821.
- (9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 1970, 4, 3-32.
- (10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC₅₀. In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (F. I. Mayer, J. L. Hamelink (eds.)). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65-84.
- (11) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J., Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

Příklad vhodné ředící vody (podle ISO 6341)

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky:

CaCl ₂ ·2H ₂ O (chlorid vápenatý dihydrát)	11,76 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (síran hořečnatý heptahydrát)	4,93 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
NaHCO ₃ (hydrogenuhličitan sodný)	2,59 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
KCl (chlorid draselný)	0,23 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	

Upravená ředící voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být $7,8 \pm 0,2$.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředící voda se nechá 12 h stát a nemusí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poměr množství iontů Ca : Mg je 4 : 1 a poměr množství iontů Na : K je 10 : 1.

Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

DODATEK 2

Souhrn výsledků kruhového testu EHS provedeného v roce 1978 (citovaného také v (2)).

Upozornění: účelem tohoto kruhového testu bylo stanovení 24hodinové hodnoty EC₅₀.

Použité látky:

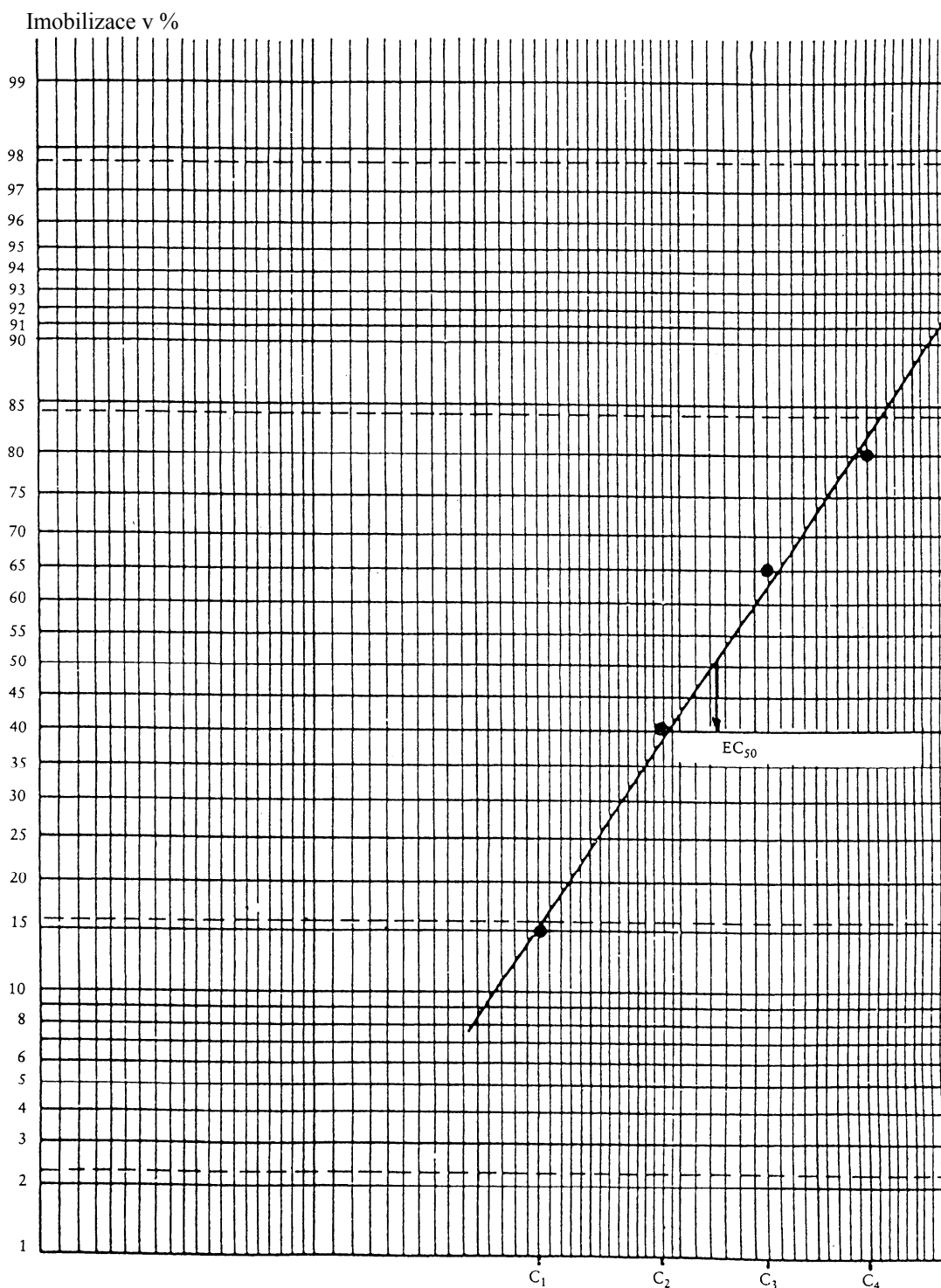
- 1) Dichroman draselný
- 2) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová
- 3) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová, sodná sůl
- 4) Kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová, draselná sůl

Látka	Počet zúčastněných laboratoří	Počet výsledků pro výpočet	Střední hodnota 24hodinové EC ₅₀ mg/l
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

DODATEK 3

Příklad závislosti imobilizace, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení EC₅₀ s použitím pravděpodobnostního logaritmického papíru



III. METODA PRO STANOVENÍ INHIBICE RŮSTU ŘAS – metoda C.3 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

III.1 METODA

III.1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit účinky látky na růst jednobuněčných zelených řas. Relativně krátkodobými zkouškami (72 h) lze posoudit účinky na několik generací řas. Tato metoda může být upravena pro

použití s několika druhy řas, přičemž musí být v protokolu o zkoušce uveden popis metody.

Použití metody je nejjednodušší v případě látek rozpustných ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně zůstávají ve vodě.

Metodu lze použít pro látky, které přímo neovlivňují měření růstu řas.

Je žádoucí mít před započítáním zkoušky k dispozici co nejúplnější údaje o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stabilitě, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturální vzorec, stupeň čistoty, druh a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

III.1.2

DEFINICE A JEDNOTKY

Hustota buněk: počet buněk na jeden mililitr.

Růst: zvyšování hustoty buněk během doby trvání zkoušky.

Růstová rychlost: nárůst hustoty buněk za jednotku času.

EC₅₀: v této metodě jde o koncentraci zkušební látky, která má za následek 50% snížení růstu (E_bC₅₀) nebo růstové rychlosti (E_rC₅₀) vzhledem ke kontrole.

NOEC (*no observed effect concentration*): v této metodě jde o je nejvyšší zkoušenou koncentraci, při níž není pozorováno žádné významné snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou.

Všechny koncentrace zkušební látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg·l⁻¹). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech (mg·kg⁻¹).

III.1.3

REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Při použití referenční látky musí být výsledky uvedeny do protokolu o zkoušce. Jako referenční látka může být použit dichroman draselný, ale jeho barva může ovlivnit kvalitu a intenzitu světla dostupného buňkám a také spektrofotometrická měření, pokud se použijí. Dichroman draselný byl použit v mezinárodních mezilaboratorních testech (viz (3) a doplněk 2).

III.1.4

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg·l⁻¹, s cílem prokázat, že EC₅₀ je vyšší než tato koncentrace.

Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několika generacích vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkušební látky.

Zkušební roztoky se kultivují 72 h, během nichž se alespoň každých 24 h měří hustota buněk v každém roztoku. Stanoví se snížení růstu ve srovnání s kontrolní kulturou.

III.1.5.

KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na celý zkušební postup.

Hustota buněk v kontrolních kulturách by se měla za 3 dny zvýšit alespoň šestnáctkrát.

Koncentrace zkušební látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které

- i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo
- ii) mohou vytvářet stabilní emulze nebo disperse, nebo
- iii) jsou ve vodných roztocích nestabilní,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

Je známo, že podstatná část zkušební látky může být během zkoušky zabudována do biomasy řas. Proto by se za účelem prokázání dodržení kritérií jakosti mělo brát v úvahu jak množství látky zabudované do biomasy řas, tak látka v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci). Protože však stanovení koncentrace látky v biomase řas může představovat technické obtíže, může být dodržení kritérií jakosti prokázáno zkouškou s nejvyšší koncentrací látky, ale bez řas, a měřením koncentrací v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku a na konci zkoušky.

III.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

III.1.6.1 Činidla

III.1.6.1.1 *Roztoky zkušebních látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkušební koncentrace se připraví přidáním vhodného alikvotního podílu k předkulturám řas (viz doplněk 1).

Látky se obvykle zkoušejí až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$ nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontroly. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg na l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistují specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkušební látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

III.1.6.1.2 Zkušební médium

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Je doporučeno následující médium:

Podle následující tabulky se připraví čtyři zásobní roztoky. Tyto roztoky se sterilizují membránovou filtrací nebo v autoklávu a skladují se v temnu při 4°C . Zásobní roztok č. 4 by se měl sterilizovat pouze membránovou filtrací. Ředěním těchto roztoků se získají konečné živné koncentrace zkušebních roztoků.

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku	Konečná koncentrace ve zkušebním roztoku
Zásobní roztok č. 1: makroživiny		
NH_4Cl	1,5	15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2	12 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8	18 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
KH_2PO_4	0,16	1,6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok č. 2: Fe - EDTA		
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80	0,08 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100	0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok č. 3: stopové prvky		
H_3BO_3	185	0,18 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415	0,415 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
ZnCl_2	3	3×10^{-3} $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5	$1,5\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	1×10^{-5} $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	7×10^{-3} $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok č. 4: NaHCO_3		
NaHCO_3	50	50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Po ustálení a po provzdušnění by mělo mít médium hodnotu pH přibližně 8.

III.1.6.2 Přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní vybavení.
- Kultivační baňky o vhodném objemu (např. Erlenmeyerovy baňky na 250 ml jsou vhodné v případě zkušebního roztoku o objemu 100 ml). Všechny zkušební baňky by měly být identické, pokud jde o materiál a rozměry.
- Kultivační zařízení: místnost nebo komora, v nichž lze udržovat teplotu $21 - 25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ a stálé rovnoměrné osvětlení v rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm. Jestliže všechny řasy v kontrolních kulturách dosáhly doporučené růstové rychlosti, lze předpokládat, že podmínky pro jejich růst, včetně intenzity světla, jsou vyhovující.

U zkušebních roztoků s průměrnými koncentracemi se doporučuje použít světelnou intenzitu od 60 do 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($35 - 70\cdot 10^{18}$ fotonů $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) při měření v rozsahu 400 – 700 nm vhodným detektorem. Při měření intenzity luxmetry je přijatelný rozsah odpovídající 6000 – 10 000 lx.

Této světelné intenzity lze dosáhnout umístěním čtyř až sedmi univerzálních bílých 30W zářivek (teplota chromatičnosti přibližně 4 300 K) ve vzdálenosti 0,35 m od kultury řas.

- Měření hustoty buněk by se mělo provádět přímým počítáním živých buněk, např. pod mikroskopem s počítacími komůrkami. Za předpokladu dostatečné citlivosti a prokázané dobré korelace s buněčnou hustotou mohou být použity i jiné postupy (fotometrie, turbidimetrie,...).

III.1.6.3 Testovací organismy

Je doporučeno použít rychle rostoucí druhy zelených řas vhodné pro kultivaci a zkoušení. Dává se přednost následujícím druhům:

- *Selenastrum capricornutum*, např. ATCC 22662 nebo CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, např. 86.81 SAG.

Poznámka:

ATCC = American Type Culture Collection (USA)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (VB)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, SRN)

Použití jiného druhu řas musí být uvedeno ve zprávě.

III.1.6.4 Zkušební postup

Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, se určí na základě výsledků orientačních zkoušek.

Dva parametry, jež jsou mírou růstu (biomasa a růstová rychlost), mohou poskytovat zcela rozdílné hodnoty snížení růstu; v orientační zkoušce by měly být použity oba parametry, aby mohlo zajištěno, že geometrická řada koncentrací umožní odhadnout jak E_bC_{50} , tak E_rC_{50} .

Počáteční hustota buněk

Doporučuje se, aby byla počáteční hustota buněk řasy *Selenastrum capricornutum* a řasy *Scenedesmus subspicatus* ve zkušebních roztocích přibližně 10^4 buněk na ml. Použije-li se jiný druh řasy, měla by být biomasa srovnatelná.

Koncentrace zkušební látky

Pro zkoušku se připraví geometrická řada nejméně pěti koncentrací lišících se od sebe vždy faktorem nepřekračujícím 2,2. Nejnižší zkoušená koncentrace by neměla vykazovat žádný pozorovatelný účinek na růst řas. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla omezit růst ve srovnání s kontrolní zkouškou nejméně o 50 %, nejlépe by měla růst zcela zastavit.

Opakování a kontroly

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací. Dále se provedou tři kontroly bez zkušební látky, a je-li použita pomocná látka, též tři kontroly s touto látkou. Je-li pro to důvod, může být plán zkoušky upraven tak, že se použije více koncentračních úrovní a sníží se počet opakování zkoušky s každou koncentrací.

Provedení zkoušky

Zkušební roztoky o požadované koncentraci zkušební látky a požadovaném množství inokula řas se připraví přidáním alikvotních podílů zásobního roztoku zkušební látky k vhodnému množství prekultury řas (viz doplněk 1).

Kultivační baňky se protřepou a umístí se do kultivačního zařízení. Buňky řas se udržují v suspensi třepáním, mícháním nebo probubláváním vzduchem, aby se zlepšila výměna plynů a zmenšilo se kolísání pH ve zkušebních roztocích. Kultury se udržují při teplotě 21 – 25 °C udržované s přesností na ± 2 °C.

Hustota buněk v každé baňce se stanoví nejméně po 24, 48 a 72 h po zahájení zkoušky. Používá-li se měření hustoty buněk jiná metoda, než je jejich přímé počítání, použije se ke stanovení pozadí filtrované médium pro kultivaci řas obsahující odpovídající koncentraci zkušební chemické látky.

pH se měří na začátku zkoušky a po 72 h.

Hodnota pH by se neměla během zkoušky změnit víc než o 1,5.

Zkoušení těkavých látek

V současné době neexistuje obecně přijatý způsob zkoušení těkavých látek. Je-li o látce známo, že se snadno vypařuje, mohou být použity uzavřené kultivační nádoby se zvětšeným mrtvým objemem. Při plánování objemu horní části kultivačních baněk se musí zohlednit eventuelní nedostatek CO₂. Byly navrženy varianty této metody (4).

Měl by být učiněn pokus stanovit množství zkušební látky, které v roztoku zůstalo; při interpretaci výsledků zkoušek s těkavými látkami v uzavřených systémech je doporučeno postupovat mimořádně opatrně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg·l⁻¹ s cílem prokázat, že EC₅₀ je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkušební látky taková, že nelze ve vodě dosáhnout koncentrace 100 mg·l⁻¹, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stabilní disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede alespoň třikrát, se stejným počtem kontrol. V limitní zkoušce se stanoví oba parametry, jež jsou mírou růstu (biomasa a růstová rychlost).

Zjistí-li se v limitní zkoušce pokles růstu biomasy nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolami o 25 % nebo více, provede se úplná zkouška.

III.2

DATA A HODNOCENÍ

Naměřené hustoty buněk ve zkušební kultuře a v kontrolách se spolu s koncentracemi zkušební látky a dobami měření shrnou do tabulky. Střední hodnota hustoty buněk pro každou zkušební koncentraci a pro kontroly se vynese proti času (0 – 72 h) a sestrojí se růstová křivka.

Vztah koncentrace/účinek se stanoví dvěma následujícími postupy. Některé látky mohou růst při nízkých koncentracích stimulovat. V úvahu by měla být vzata pouze data udávající potlačení růstu mezi 0 a 100 %.

III.2.1

POROVNÁNÍ PLOCH POD RŮSTOVÝMI KŘIVKAMI

Plocha mezi růstovou křivkou a vodorovnou linií $N = N_0$ se vypočte podle následujícího vzorce:

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

kde

A = plocha,

N_0 = počet buněk v ml v čase t_0 (na počátku zkoušky),

N_1 = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_1 ,

N_n = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_n ,

t_1 = doba prvního měření od počátku zkoušky,

t_n = doba n-tého měření od počátku zkoušky,

n = počet měření od počátku zkoušky.

Potlačení růstu vyjádřené v % (I_A) se pro každou koncentraci zkušební látky vypočte podle vzorce:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kde

A_c = plocha mezi růstovou křivkou kontrolní zkoušky a horizontální linií $N = N_0$,

A_t = plocha mezi růstovou křivkou při koncentraci t a horizontální linií $N = N_0$.

Hodnoty I_A se nanesou na semilogaritmický nebo na pravděpodobnostní semilogaritmický papír proti odpovídajícím koncentracím. Vynesou-li se body na pravděpodobnostní papír, proloží se body přímkou, a to ručně nebo regresním výpočtem.

Hodnota EC_{50} se odhadne odečtením z regresní přímky jako koncentrace odpovídající 50% snížení růstu ($I_A = 50\%$). Pro jednoznačné označení této hodnoty v rámci této metody výpočtu se doporučuje použít symbol E_bC_{50} . Je důležité, aby byla s hodnotou E_bC_{50} uvedena příslušná expoziční doba, např. $E_bC_{50}(0 - 72 \text{ h})$.

III.2.2

POROVNÁNÍ RŮSTOVÝCH RYCHLOSTÍ

Průměrnou specifickou růstovou rychlost (μ) pro exponenciálně rostoucí kultury lze vypočítat jako:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kde t_0 je čas začátku zkoušky.

Průměrnou specifickou růstovou rychlost lze také odvodit ze sklonu regresní přímky v závislosti $\ln N$ na čase.

Snížení specifické růstové rychlosti vyjádřené v procentech pro každou koncentraci zkušební látky ($I_{\mu t}$) se vypočte podle vzorce:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kde

μ_c = střední specifická růstová rychlost v kontrole,

μ_t = střední specifická růstová rychlost pro zkušební koncentraci t .

Snížení střední specifické růstové rychlosti v procentech při všech koncentracích zkušební látky ve srovnání s kontrolní hodnotou se vynesou proti logaritmu koncentrace. Hodnotu EC_{50} lze odečíst z výsledného grafu. Pro jednoznačné označení EC_{50} odvozené touto metodou se

doporučuje použít symbol E_rC_{50} . Musí být uvedeny okamžiky měření, např. vztahuje-li se hodnota k času 0 a k 72 h, označí se symbolem $E_rC_{50}(0 - 72 \text{ h})$:

Poznámka: Ve výrazu pro specifickou růstovou rychlost vystupují logaritmy, tzn. malé změny růstové rychlosti mohou odpovídat velkým změnám biomasy. Hodnoty E_bC a E_rC tedy nejsou číselně srovnatelné.

III.2.3 VÝPOČET NOEC

Hodnota koncentrace nezpůsobující žádné pozorovatelné účinky (NOEC) se stanoví vhodnou statistickou metodou pro srovnávání více vzorků (např. analýza rozptylu a Dunnettův test) s využitím jednotlivých hodnot ploch pod růstovými křivkami A (viz bod 2.1) nebo specifických růstových rychlostí μ (viz bod 2.2).

III.3 ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující údaje:

- zkušební látka: údaje o chemické identitě;
- testovací organismus: původ, laboratorní kultura, číslo kmene, metoda kultivace;
- zkušební podmínky:
 - datum zahájení a ukončení zkoušky a délka zkoušení,
 - teplota,
 - složení média,
 - kultivační zařízení,
 - hodnoty pH roztoku na počátku a na konci zkoušky (je-li pozorováno kolísání pH o více než 1,5, uvede se vysvětlení),
 - nosič a metoda použitá pro rozpouštění zkušební látky, koncentrace nosiče ve zkušebních roztocích,
 - intenzita a kvalita světla,
 - zkoušené koncentrace (naměřené nebo nominální);
- výsledky:
 - koncentrace buněk v jednotlivých baňkách v každé době měření a metoda měření koncentrace buněk,
 - průměrné hodnoty koncentrace buněk,
 - růstové křivky,
 - grafické znázornění vztahu koncentrace – účinek,
 - hodnoty EC a metoda výpočtu,
 - NOEC,
 - další pozorované účinky.

III.4 LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, In: Rudolph / Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- (3) ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi, M. Vighi. *Chemosphere*, 1981, 10, 1123-1126.

DODATEK 1

Příklad postupu kultivace řas

Obecné poznámky

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity. Měly by být použity vhodné metody k tomu, aby bylo zajištěno, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi (ISO 4833). Vhodné mohou být axenické kultury, avšak základem jsou jednodruhové kultury.

Všechny operace se provádějí za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami. Kontaminované kultury se vyřadí.

Postupy při získání kultur řas

Příprava živných roztoků (médiá):

Médium lze připravit zředěním koncentrovaných základních roztoků živin. K získání pevného média se přidává 0,8 % agaru. Použité médium by mělo být sterilní. Sterilizace v autoklávu může vést ke ztrátě NH_3 .

Kmenová kultura:

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se pravidelně přenášejí do čerstvého média, kde slouží jako výchozí testovací materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, vyočkovávají se na šikmý agar. Poté se nejméně jednou za dva měsíce přenášejí do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmeyerových baňkách obsahujících vhodné médium (objem přibližně 100 ml). Jsou-li řasy kultivovány při teplotě 20 °C a stálém osvětlení, musí se přenášet každý týden.

Při přeočkování se přenesou sterilní pipetou do baňky s čerstvým médiem takové množství „staré“ kultury, aby byla výchozí koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace kultury staré.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout hustotu, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. K tomu musí dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura:

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas potřebných pro naočkování testovacích kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po třídenní inkubační lhůtě. Obsahují-li kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

DODATEK 2

V normě ISO 8692 - Jakost vody - Růstová inhibiční zkouška na sladkovodních řasách *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* jsou uvedeny výsledky mezilaboratorních zkoušek dichromanu draselného provedených 16 laboratořemi.

	Střední hodnota ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Rozpětí ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
$E_r C_{50}$ (0 – 72 h)	0,84	0,60 až 1,03
$E_b C_{50}$ (0 – 72 h)	0,53	0,20 až 0,75

IV. METODY PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – metody C.4 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IV.1.1 ÚVOD

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

- a) Zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4-A)
- b) Modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4-B)
- c) Zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO₂) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4-C)
- d) Zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4-D)
- e) Zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4-E)
- f) Zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu – Japonsko) (metoda C.4-F)

Obecné a společné úvahy pro všech šest zkoušek jsou uvedeny v části I metody. Specifické body jednotlivých metod jsou uvedeny v částech II až VII. Přílohy obsahují definice, vzorce a návody.

Mezilaboratorní srovnávací test OECD provedený v roce 1988 ukázal, že metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru látky, která má být zkoušena, se však může dávat přednost určité metodě.

IV.1.2

VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, tenzi par a o adsorpčních vlastnostech chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO₂, DOC, TOC, CHSK (viz přílohy I a II) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkušební chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je alespoň 100 mg·l⁻¹, lze zkoušet všemi metodami za předpokladu, že netěkají a neadsorbují se. Pro látky špatně rozpustné ve vodě, které těkají nebo se adsorbují, jsou vhodné metody uvedené v tabulce 1. Způsob, jakým je třeba zacházet s látkami špatně rozpustnými ve vodě a s látkami těkavými, je popsán v příloze III. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud je ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro zohlednění případné fyzikální ztráty.

Tabulka 1: Použitelnost zkušebních metod

Zkouška	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		špatně rozpustné	těkavé	adsorbující se
na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	—	—	+ / –
modif. zkouška OECD – na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	—	—	+ / –
na uvolňování CO ₂	respirometrie: uvolňování CO ₂	+	—	+
manometrická respirometrie	manometrická respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+ / –	+
zkouška v uzavřených lahvičkách	respirometrie: rozpuštěný kyslík	+ / –	+	+
MITI	respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+ / –	+

Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud jsou výsledky nízké nebo marginální, se vyžadují informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkušebního materiálu.

Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkušební chemické látky pro bakterie (příloha IV); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

IV.I.3

REFERENČNÍ LÁTKY

Pro ověření postupu se souběžně se zkouškou a ve vlastní baňce zkoušejí referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě predestilovaný), natrium-acetát, natrium-benzoát. Všechny tyto referenční chemické látky se za podmínek v uvedených metodách rozkládají, i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Byl podán návrh hledat referenční chemickou látku, která by byla snadno rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Navržen byl kalium-hydrogen-ftalát. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz přílohy II a V).

IV.I.4

PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Roztok nebo suspence zkušební látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkušební látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO₂ nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplnkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkušební látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziprojektu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tři po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

IV.I.5

KRITÉRIA JAKOSTI

IV.I.5.1

Reprodukovatelnost

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.

Je obecně známo, že čím vyšší je koncentrace mikroorganismů přidaných na počátku do zkušební média, tím menší jsou rozdíly mezi vícenásobnými měřeními. Okružní testy rovněž ukázaly, že mezi výsledky získanými různými laboratořemi mohou být velké rozdíly, avšak u snadno biologicky rozložitelných sloučenin se obvykle dosahuje dobré shody.

IV.I.5.2 **Platnost zkoušky**

Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkušební chemické látky v oblasti platů křivky menší než 20 % a dosáhl-li stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje. Vzhledem k náročnosti metod neznamenaají nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkušební látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkušební látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35% rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25% rozkladu (stanoveného podle TSK nebo TCO₂), lze zkušební chemické látky považovat za inhibující (viz také příloha IV). Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkušební chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg tuhých látek v litru.

IV.I.6 **OBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVA**

Obecné podmínky pro zkoušky jsou shrnuty v tabulce 2. Přístroje a další experimentální podmínky specifické pro jednotlivé metody jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.

Tabulka 2: Zkušební podmínky

Zkouška	Zkouška na úbytek DOC	Zkouška na uvolňování CO ₂	Manometrická respirometrie	Modif. screeningová zkouška OECD	Zkouška v uzavřených lahvičkách	Zkouška MITI (I)
Koncentrace zkušební látky mg·l ⁻¹ mg DOC/l mg TSK/l	10 - 40	10 - 20	100 50 - 100	10 - 40	2 - 10 5 - 10	100
Koncentrace inokula (buňky/l, přibližně)	≤ 30 mg/l SL nebo ≤ 100 ml odpadní vody/l (10 ⁷ -10 ⁸)			0,5 ml sekundární odpadní vody/l (10 ⁵)	≤ 5 ml odpadní vody/l (10 ⁴ -10 ⁶)	30 mg/l SL (10 ⁷ -10 ⁸)
Koncentrace prvků v minerálním médiu (v mg·l ⁻¹)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 – 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					nejlépe 7,0
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = rozpuštěný organický uhlík, TSK = teoretická spotřeba kyslíku, SL = suspendované látky						

IV.I.6.1 **Ředící voda**

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda neobsahující inhibující koncentrace toxických látek (např. ionty Cu^{2+}). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku vneseného zkušebním materiálem. Vysoká čistota vody pro zkoušky je nezbytná pro to, aby se nevyskytovaly vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminace může pocházet z vlastních přítomných nečistot, z materiálu měniče iontů, z rozkladných látek z bakterií a řas. Pro každou sérii měření se použije pouze jedna šarže vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených lahvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

IV.I.6.2 **Zásobní roztoky minerálních složek**

Pro přípravu zkušebních roztoků se připraví zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zředovacích faktorech) pro metodu s úbytkem DOC, modifikovanou screeningovou metodu OECD, metodu s uvolňováním CO_2 , pro manometrickou respirometrii a pro metodu s uzavřenými lahvičkami.

Zředovací faktory a specifická příprava minerálního media pro zkoušku MITI jsou uvedeny v oddílech pro jednotlivé zkoušky.

Zásobní roztoky:

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví následující zásobní roztoky:

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,40 g |
| | Chlorid amonný, NH_4Cl | 0,50 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4. | |
| b) | Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2 | 27,50 g |
| | nebo chlorid vápenatý dihydrát, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 36,40 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| c) | Síran hořečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| d) | Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |

Poznámka: Aby nebylo nutné připravovat tento roztok bezprostředně před použitím, přidá se jedna kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr.

IV.I.6.3 **Zásobní roztoky chemických látek**

Pokud je rozpustnost vyšší než $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, rozpustí se například 1 – 10 g (podle potřeby) zkušební nebo referenční látky v deionizované vodě a doplní se na 1 litr. Jinak se zásobní roztoky připravují v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud jde o postup s méně rozpustnými chemickými látkami, viz příloha III; ve zkoušce MITI (metoda C.4-F) se nepoužívají ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

IV.I.6.4 **Inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi. Používá-li se

aktivovaný kal ve zkoušce na úbytek DOC, na uvolňování CO₂ a ve zkoušce manometrickou respirometrií, měl by být odebrán z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované screeningové zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je potřebné zředěnější inokulum bez vloček kalu a nejvhodnějším zdrojem je voda z druhého stupně čistírny domovních odpadních vod nebo z laboratorní jednotky. Pro zkoušku MITI se inokulum získává ze směsi zdrojů a je popsáno v oddílu věnovaném této zkoušce.

IV.I.6.4.1 *Inokulum z aktivovaných kalů*

Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Podle potřeby se filtrací přes jemné síto odstraní hrubé částice a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Jinou možností je usazení nebo odstředění (např. 10 min při 1 100 g) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se odstraní. Kal se promyje minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3 – 5 g suspendovaných tuhých látek na litr a až do použití se provzdušňuje.

Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, voda nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných tuhých látek.

Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 min zpracovává v mechanickém mísiči při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá 30 min, popřípadě déle, usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml na litr minerálního média.

IV.I.6.4.2 *Jiné zdroje inokula*

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se 1 h usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a dekantovaná kapalina nebo filtrát se až do použití udržuje v aerobních podmínkách. Na litr média lze použít až 100 ml tohoto typu inokula.

Dalším zdrojem inokula je povrchová voda. V tomto případě se odebere vzorek vhodné povrchové vody, např. říční nebo jezerní vody, a uchovává se až do použití v aerobních podmínkách. V případě potřeby se inokulum zkoncentruje filtrací nebo odstředěním.

IV.I.6.5 **Předběžná úprava inokulí**

Inokula je možné předběžně upravit pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkušební látku. Předběžná úprava spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5 – 7 dnů při zkušební teplotě. Předběžná úprava někdy zlepšuje přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předběžná úprava inokula pro zkoušku MITI se nepovažuje za nutnou.

IV.I.6.6 **Abiotické kontroly**

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkušební látky stanovením úbytku DOC, příjmu kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého ve sterilních kontrolách bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací přes membránu (0,2 – 0,45 µm) nebo přidáním vhodné toxické látky v odpovídající koncentraci. Používá-li se membránová filtrace, odebírají se vzorky asepticky, aby byla zachována sterilita. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkušební látky, měly by zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotickou kontrolu, která je inokulována a intoxikována.

IV.I.6.7 **Počet nasazených baněk**

Počet nasazených baněk v typické zkoušce je uveden v oddílech věnovaných jednotlivým zkouškám.

Mohou být použity tyto baňky:

Zkušební suspenze: obsahující zkušební látku a inokulum

Slepá zkouška s inokulem: obsahující pouze inokulum

Kontrolní zkouška postupu: obsahující referenční látku a inokulum

Abiotická sterilní kontrola: sterilní, obsahující zkušební látku (viz I.6.6)

Kontrola adsorpce: obsahující zkušební látku, inokulum a sterilizační činidlo

Kontrola toxicity: obsahující zkušební látku, referenční látku a inokulum

Stanovení ve zkušební suspenzi a slepý pokus s inokulem musí být prováděny souběžně. Doporučuje se, aby stanovení v ostatních baňkách bylo prováděno rovněž souběžně.

To však nemusí být vždy možné. Je třeba zajistit, aby se odebíral dostatečný počet vzorků nebo aby se prováděl dostatečný počet odečtů pro vyhodnocení procenta úbytku v 10denním období rozkladu.

IV.I.7 **DATA A HODNOCENÍ**

Při výpočtu rozkladu v procentech D_t , se použijí střední hodnoty z měření parametru provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem. Vzorce jsou uvedeny dále v oddílech pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uveďte úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz přílohy II a V).

IV.I.7.1 **Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC**

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz I.5.2) by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkušební látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně. Vypočte se podle následující rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}} \right) \times 100$$

kde

D_t = rozklad v procentech v čase t ,

C_0 = střední počáteční koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkušební látku (v mg DOC na litr),

C_t = střední koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkušební látku v čase t (v mg DOC na litr),

C_{bo} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu (v mg DOC na litr),

C_{bt} = střední koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu v čase t (v mg DOC na litr).

Všechny koncentrace se stanoví experimentálně.

IV.I.7.2 **Rozklad měřený specifickou analýzou**

Je-li možné získat specifické analytické údaje, vypočte se primární biologický rozklad z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde

D_t = rozklad v procentech v čase t , obvykle po 28 dnech,

S_a = zbylé množství zkušební látky v médiu s inokulem na konci zkoušky (mg),

S_b = zbylé množství zkušební látky ve slepém pokusu s vodou/médiem, do kterých byla přidána pouze zkušební látka (mg).

IV.I.7.3 **Abiotický rozklad**

Použije-li se abiotická sterilní kontrola, vypočte se abiotický rozklad v procentech podle rovnice:

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(0)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den 0,

$C_{s(t)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den t .

IV.I.8 **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující údaje:

- zkušební a referenční chemické látky a jejich čistota;
- zkušební podmínky;
- inokulum: charakter a místo (místa) odběru, koncentrace a jakákoli předběžná úprava;
- podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy;
- délka zkoušky a teplota;
- v případě špatně rozpustných zkušebních látek použitý způsob zpracování;
- použitá zkušební metoda; měly by být uvedeny vědecké důvody a vysvětlení pro veškeré změny postupu;
- přehled dat;
- veškeré pozorované projevy inhibice;
- jakýkoli pozorovaný abiotický rozklad;
- specifická analytická data o chemické látce, pokud existují;
- analytická data o meziproduktech, pokud existují;
- graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkušební a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici (příloha I). Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkušební látku;
- rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti plató a na konci zkoušky.

IVA. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POMOCÍ ÚBYTKU ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (DOC) – metoda C.4-A podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVA.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkušební látky (10 – 40 mg DOC na litr) jako nominální jediný zdroj organického uhlíku se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C. Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace.

IVA 2 POPIS METODY

IVA 2.1 Aparatura

- a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;
- b) Třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;
- c) Filtrační aparatura s vhodnými membránami;
- d) Analyzátor DOC;
- e) Přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;
- f) Odstředivka;

IVA 2.2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

IVA 2.3 Příprava a předběžná úprava inokula

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IVA 2.4 Příprava baněk

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkušební a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10 – 40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I.6.4), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30 mg suspendovaných látek na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkušební nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkušební látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkušební, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkušební chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkušební látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkušební látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz příloha II, bod 4). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

IVA 2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IVA 2.6 **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspence.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředící vody (I.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspence. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz příloha II, bod 4). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 h při 2 – 4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

IVA 3 **DATA A ZPRÁVY**

IVA 3.1 **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1. (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

IVA 3.2 **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

IVA 3.3 **Zprávy**

Viz bod I.8.

IVA 4 **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC

1. **LABORATOŘ**
2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**
3. **ZKUŠEBNÍ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0 : $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

5 STANOVENÍ UHLÍKU

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkušební látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a , střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b , střední hodnota $C_{b(t)}$					
Slepá zkouška s inokulem bez zkušební látky	3	c_1					
		c_2					
		c , střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d , střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Baňka č.		Rozklad v % po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
Střední hodnota *	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

* Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) ve sterilní kontrole	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zbylé množství zkušební chemické látky na konci zkoušky ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IVB. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POMOCÍ ÚBYTKU ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (DOC) - MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD – metoda C.4-B podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVB.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkušební látky (10 – 40 mg DOC na litr) jako jediný zdroj organického uhlíku se inokuluje 0,5 ml odpadní vody na litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace.

IVB.2 POPIS METODY

IVB.2.1 Aparatura

- Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;
- Třepačka pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;
- Filtrační aparatura s vhodnými membránami;
- Analyzátor DOC;
- Přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;
- Odstředivka.

IVB.2.2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

V této metodě se používá jako inokulum pouze 0,5 ml odpadní vody na litr, a proto je nutné do média dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na jeden litr výsledného média:

Roztok stopových prvků:

Síran manganatý tetrahydrát, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinečnatý heptahydrát, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamonný, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe (FeCl_3 s kyselinou ethylendiaminotetraoctovou)	100,0 mg

Rozpusť se v ředící vodě a doplní se touto vodou na 1 000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt 15,0 mg

Kvasničný extrakt se rozpustí ve 100 ml vody. Sterilizuje se průchodem membránou 0,2 µm, nebo se připraví čerstvě.

IVB.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum se získá z výstupu druhého stupně čistírny nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody.

Viz I.6.4.2 a I 6.5.

Použije se 0,5 ml na litr minerálního média.

IVB.2.4 **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkušební a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10 – 40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují odpadní vodou z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I.6.4.2) v objemu 0,5 ml na litr. Připraví se rovněž slepé zkoušky s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkušební nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkušební látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkušební, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkušební chemická látka rozkládána abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkušební látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkušební látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz příloha II, bod 4). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

IVB.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IVB.2.6 **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspence.

Před odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředící vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob

přešly do roztoku nebo suspence. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz příloha II, odst. 4). Zfiltrované resp. odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 h při 2 – 4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

IVB.3 DATA A ZPRÁVY

IVB.3.1 Zpracování výsledků

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1. (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledů dat.

IVB.3.2 Platnost výsledků

Viz bod I.5.2.

IVB.3.3 Zprávy

Viz bod I.8.

IVB.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD

1. LABORATOŘ

2. DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY

3. ZKUŠEBNÍ LÁTKA

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0 : $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

5. STANOVENÍ UHLÍKU

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkušební látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a , střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b , střední hodnota $C_{b(t)}$					
Slepá zkouška s inokulem bez zkušební látky	3	c_1					
		c_2					
		c , střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d , střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Baňka č.	Rozklad po n dnech
----------	----------------------

		0	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_a(t) - C_{bl}(t)}{C_a(0) - C_{bl}(0)} \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_b(t) - C_{bl}(t)}{C_b(0) - C_{bl}(0)} \right) \times 100$	0				
Střední hodnota *	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

* Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC (mg·l ⁻¹) ve sterilní kontrole	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zbýlé množství zkušební chemické látky na konci zkoušky (mg·l ⁻¹)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IVC. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POMOCÍ UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO (CO₂) – MODIFIKOVANÁ STURMOVA ZKOUŠKA – metoda C.4-C podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVC.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkušební látky (10 – 20 mg DOC nebo TOC na litr), která je jediným zdrojem uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle regulovaným proudem vzduchu bez CO₂. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím vznikajícího CO₂ jímaného v roztoku hydroxidu barnatého nebo sodného, kde se stanoví titrací zbytkového hydroxidu nebo jako anorganický uhlík. Množství CO₂ vzniklého ze zkušební látky (po korekci na CO₂ pocházející z čistého inokula) se vyjádří v procentech TCO₂. Stupeň biologického rozkladu může být také vypočten z doplňkového stanovení DOC na začátku a na konci inkubace.

IVC.2 POPIS METODY

IVC.2.1 Přístroje

- Baňky na 2 – 5 l vybavené provzdušňovací trubicí dosahující až ke dnu nádoby a výstupním tvorem;
- Magnetické míchačky pro zkoušení špatně rozpustných látek;
- Absorpční lahv;
- Zařízení pro regulaci a měření průtoku vzduchu;

- e) Zařízení pro odstraňování CO₂ při přípravě vzduchu bez CO₂, popřípadě může být použita směs kyslíku bez CO₂ a dusíku bez CO₂ ve správném poměru (20 % O₂ a 80 % N₂) z lahví se stlačenými plyny;
- f) Zařízení na stanovení CO₂ buď titračně nebo pomocí analyzátoru anorganického uhlíku;
- g) Zařízení pro membránovou filtraci (podle volby);
- h) Analyzátor DOC (podle volby).

IVC.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

IVC.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IVC.2.4 **Příprava baněk**

Jako příklad jsou uvedeny hodnoty pro baňky na 5 litrů obsahující 3 litry suspense. V případě použití menších objemů se hodnoty úměrně upraví, musí být ovšem zajištěno, aby bylo možné přesně měřit vznikající CO₂.

Do každé baňky na 5 litrů se přenese 2 400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I.6.4.1 a I.6.5), aby koncentrace suspendovaných látek v konečném objemu 3 l inokulované směsi byla 30 mg·l⁻¹. Eventuálně lze nejdříve zředit připravený kal v minerálním médiu na suspensi o koncentraci 500 – 1 000 mg·l⁻¹ a poté přidat alikvotní části do baňky na 5 litrů, aby byla dosažena koncentrace 30 mg·l⁻¹; zajistí se tím větší přesnost. Mohou být použity i jiné zdroje inokula (viz I.6.4.2).

Inokulovaná směs se přes noc provzdušňuje vzduchem bez CO₂, aby se ze systému odstranil oxid uhličitý.

Odděleně do dvojic baněk se ze zásobních roztoků přidá zkušební látka a referenční látka tak, aby koncentrace pocházející z chemických látek byla v rozmezí 10 až 20 mg DOC nebo TOC na litr; některé lahve se nasadí jako kontrola inokula bez přidání chemických látek. Špatně rozpustné látky se odváží nebo odměří přímo do baněk, nebo se postupuje podle přílohy III.

Podle potřeby se jedna baňka použije ke kontrole možného inhibičního účinku zkušební látky, a to přidáním zkušební i referenční látky ve stejných koncentracích jako v ostatních baňkách.

Podle potřeby se další baňka použije k ověření, zda se zkušební látka nerozkládá abioticky, přičemž se použije roztok chemické látky bez inokula (viz I.6.6).

Sterilizace se provádí přidáním vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 l přidavkem minerálního média bez CO₂.

Podle potřeby lze odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz příloha II, bod 4) a/nebo pro specifickou analýzu. Poté se na výstup plynů u baněk připojí absorpční lahve.

V případě použití hydroxidu barnatého se za každou baňku na 5 litrů zařadí tři absorpční lahve, každá obsahující 100 ml roztoku Ba(OH)₂ o koncentraci 0,0125 mol·l⁻¹. Roztok nesmí obsahovat sraženinu síranů a uhličitánu barnatého a jeho koncentrace musí být stanovena bezprostředně před použitím. Je-li použit hydroxid sodný, spojí se 2 absorpční lahve, z nichž druhá slouží jako kontrola, že byl veškerý CO₂ zachycen v první absorpční lahvi. K tomuto účelu se hodí absorpční lahve opatřené sérovými uzávěry. Do každé absorpční lahve se přidá po

200 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což postačuje k absorpci veškerého oxidu uhličitého, který by se uvolnil při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného, i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitánů; korekce se provede odečtením množství uhličitánů ve slepém pokusu.

IVC.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IVC.2.6 **Provedení zkoušky**

Zkouška se zahájí probubláváním vzduchu bez CO_2 suspensí při průtoku $30 - 100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Za účelem analýzy obsahu CO_2 se pravidelně odebírají vzorky absorbentu. Doporučuje se, aby se v průběhu prvních 10 dnů prováděly analýzy každý druhý až třetí den a dále pak každý pátý den až do 28. dne, což umožní rozpoznat období 10denního období rozkladu.

28. den se (nepovinně) odebere vzorek pro stanovení DOC a/nebo pro specifickou analýzu, změří se pH suspensí a poté se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl; provzdušňuje se přes noc, aby se odstranil CO_2 přítomný v suspensi. Poslední analýza uvolněného CO_2 se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se provádí stanovení CO_2 , se odpojí absorpční lahev s hydroxidem barnatým bližší zkušební baňce a roztok hydroxidu barnatého se titruje $0,05\text{M}$ HCl za přítomnosti fenolftaleinu jako indikátoru. Zbývající dvě absorpční lahve se posunou k baňce a na konec řady se zařadí nová absorpční lahev se 100 ml čerstvě připraveného $0,0125\text{M}$ hydroxidu barnatého. Titrace se provádějí podle potřeby, např. je-li pozorována v první absorpční lahvi zřetelná sraženina a před tím, než vznikne viditelná sraženina ve druhé absorpční lahvi, nebo alespoň jednou týdně. Jinou možností je provést při použití NaOH jako absorbentu odběr malého vzorku hydroxidu sodného pomocí injekční stříkačky (podle použitého analyzátoru uhlíku) z absorpční lahve, která je nejbližší k baňce. Vzorek se nastříkne přímo do IC-části analyzátoru uhlíku pro analýzu anorganického uhlíku.

Obsah druhé absorpční lahve se analyzuje pouze na konci zkoušky s cílem stanovit korekci na možný únik CO_2 .

IVC.3 **DATA A ZPRÁVY**

IVC.3.1 **Zpracování výsledků**

Množství CO_2 zachyceného v absorpční lahvi je v případě titračního stanovení dáno vztahem:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde

V = objem HCl spotřebovaný při titraci 100 ml obsahu absorpční lahve (ml),

C_B = koncentrace roztoku hydroxidu barnatého ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$),

C_A = koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Je-li C_B $0,0125 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a C_A $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 50 ml a hmotnost CO_2 je dána vztahem:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{počet ml HCl spotřebované při titraci} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

V tomto případě se tedy k přepočtu objemu HCl spotřebovaného při titraci na hmotnost vzniklého CO_2 použije faktor 1,1.

S použitím příslušných výsledků titrace se vypočte hmotnost CO₂ vzniklého ze samotného inokula a inokula se zkušební látkou a jejich rozdíl je hmotnost CO₂ vzniklého ze samotné zkušební látky.

Je-li např. výsledkem titrace samotného inokula 48 ml a inokula se zkušební látkou 45 ml, je množství

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg,}$$

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula a zkušební látky} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg,}$$

a tedy hmotnost CO₂ vzniklého ze zkušební látky 3,3 mg.

Biologický rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý CO}_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO}_2 \times \text{přidaná zkušební látka v mg}}$$

nebo

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý CO}_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO přidaný ve zkoušce v mg} \times 3,67}$$

přičemž 3,67 je převodní faktor (44/12) pro uhlík a oxid uhličitý.

Rozklad v procentech se po každém období vypočte dosazením hodnoty TCO₂ vypočítané pro každý den až do doby, kdy byl měřen.

Při zachytávání do NaOH se vypočte hmotnost vzniklého CO₂, vyjádřeného jako anorganický uhlík v mg, vynásobením koncentrace anorganického uhlíku v absorpční lahvi objemem absorpčního roztoku.

Rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{TCO}_2 \text{ v \%} = \frac{\text{anorg. C ze zkušeb. baňky v mg} - \text{anorg. C ze slep. pokusu v mg}}{\text{TOC přidaný jako zkušební látka v mg}} \times 100$$

Úbytky DOC se (nepovinně) vypočítají podle bodu I.7. Tento výsledek spolu s ostatními výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

IVC.3.2 **Platnost výsledků**

Obsah anorganického uhlíku ve zkušební suspensi v minerálním médiu na začátku zkoušky musí být menší než 5 % TC a celkové množství CO₂ vzniklé na konci slepé zkoušky s inokulem nesmí za normálních okolností překročit 40 mg na litr média. Jsou-li hodnoty větší než 70 mg CO₂ na litr, měla by být data i experimentální postup kriticky přehodnoceny.

Viz také I.5.2.

IVC.3.3 **Zprávy**

Viz I. 8.

IVC.4 **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

- 1. LABORATOŘ**
- 2. DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**
- 3. ZKUŠEBNÍ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg·l⁻¹

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu: mg·l⁻¹

Celkové množství uhlíku přidaného do baňky: mg C

TCO₂: mg CO₂

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

5. TVORBA OXIDU UHLÍKITÉHO A ROZLOŽITELNOST

Metoda: $\text{Ba}(\text{OH})_2$ / NaOH / jiná

Čas (dny)	CO ₂ uvolněný ve zkoušce (mg)			CO ₂ uvolněný ve slepé zkoušce (mg)			Celkové množství CO ₂ (průměr ve zkoušce minus průměr ve slepé zkoušce) (mg)		TCO ₂ $\frac{\text{kumulativní CO}_2}{\text{TCO}_2} \times 100$		
	1	2	průměr	3	4	průměr	1	2	1	2	průměr
0											
n ₁											
n ₂											
n ₃											
28											

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. ANALÝZA UHLÍKU (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Zkušební látka ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
0	$C_{b(0)}$	C_0
28*	$C_{b(t)}$	C_t
* nebo na konci kultivace		

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTICKÝ ROZKLAD (nepovinné)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{\text{tvorba CO}_2 \text{ ve steril. podm. po 28 dnech v mg}}{\text{TCO}_2} \times 100$$

IVD. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ C.4-D podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVD.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkušební chemické látky (100 mg zkušební látky na litr, dávající nejméně 50 – 100 mg TSK na litr), která je jediným zdrojem organického uhlíku, se míchá v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) na dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanoví buď měřením množství kyslíku (elektrolyticky produkovaného), který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce, nebo ze změn objemu nebo tlaku (nebo obojího) v aparatuře. Uvolněný CO₂ se jímá v roztoku hydroxidu draselného nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, které je zkoušenou látkou spotřebováno

(korigované na spotřebu kyslíku inokulem ve slepé zkoušce, která se provádí současně), se vyjádří v procentech TSK nebo CHSK. Popřípadě může být z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace vypočten primární biologický rozklad a z analýzy DOC úplný biologický rozklad.

IVD.2 **POPIS METODY**

IVD.2.1 **Přístroje**

- a) vhodný respirometr;
- b) regulátor teploty s přesností na ± 1 °C nebo lepší;
- c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);
- d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

IVD.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

IVD.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IVD.2.4 **Příprava baněk**

S použitím zásobních roztoků se připraví samostatné sady roztoků zkušební chemické látky a referenční chemické látky v minerálním médiu o koncentraci odpovídající obvykle 100 mg chemické látky na litr (dávající nejméně 50 – 100 mg TSK na litr).

TSK se vypočte z tvorby amoniových solí, pokud lze vyloučit nitrifikaci, v opačném případě by měl být výpočet založen na tvorbě dusičnanů (viz příloha II, bod 2).

Změří se pH a v případě potřeby se upraví na $7,4 \pm 0,2$.

Špatně rozpustné látky se přidávají v pozdějším stádiu (viz dále).

Má-li se stanovit toxicita zkušební látky, připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční i zkušební látku, a to ve stejných koncentracích jako v roztocích obsahujících jen jednu látku.

Požaduje-li se stanovení fyzikálně-chemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkušební látky obvykle o koncentraci 100 mg TSK na litr sterilizovaný přidavkem vhodné toxické látky (viz I.6.6).

Připravené objemy roztoků zkušební a referenční chemické látky se rozdělí alespoň duplicitně do baněk. Do dalších baněk se přidá pouze minerální médium (pro kontrolu inokula) a podle potřeby směs roztoku zkušební a referenční chemické látky a sterilní roztok.

Je-li zkušební chemická látka špatně rozpustná, odváží se nebo odměří v tomto stádiu přímo do baněk, nebo se postupuje podle přílohy III. Do lahví pro absorpci CO₂ se přidá hydroxid draselný, pelety hydroxidu sodného nebo jiný absorbent.

IVD.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IVD.2.6 **Provedení zkoušky**

V baňkách se nechá ustavit požadovaná teplota a vybrané baňky se inokulují přidáním aktivovaného kalu nebo jiného zdroje inokula, aby nebyla koncentrace suspendovaných látek větší než $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Zařízení se sestaví, spustí se míchačka, přezkouší se na vzduchotěsnost a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není třeba věnovat zkoušce žádnou zvláštní pozornost, kromě nezbytných odečtů a denní kontroly teploty a míchání.

Z pravidelných častých odečtů se podle postupu uvedeného výrobcem zařízení vypočte spotřeba kyslíku. Na konci inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách, a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK_{NH_4} (platí pro látky obsahující dusík).

V případě potřeby se na začátku a na konci odebírá vzorek z respiračních nádobek pro stanovení DOC nebo pro specifickou analýzu (viz příloha II, bod 4). Při počátečním odběru z baňky se zajistí, aby byl znám objem zkušební suspence, která v baňce zůstala. Je-li kyslík spotřebováván látkami obsahujícími dusík, stanoví se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů za 28 dnů a vypočte se korekce na spotřebu kyslíku nitrifikací (příloha V).

IVD.3 **DATA A ZPRÁVY**

IVD.3.1 **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkušební látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu kyslíku inokulem za stejnou dobu ve slepé zkoušce) se podělí hmotností zkušební látky v baňce. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkušební látky:

$$\text{BSK} = \frac{\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg}}{\text{hmotnost zkušební chem. látky v baňce v mg}} \\ = \text{mg O}_2 \text{ na mg zkušební chemické látky.}$$

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \% \text{ TSK} = \frac{\text{BSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}}{\text{TSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}} \times 100$$

nebo z rovnice:

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}}{\text{COD (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}} \times 100.$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (příloha II, bod 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

V případě, že se provádí nepovinné stanovení organického uhlíku a/nebo specifické chemické látky, vypočte se stupeň rozkladu podle bodu I.7.

Všechny výsledky se zaznamenávají do příslušného formuláře přehledu dat.

IVD.3.2 **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je $20 - 30 \text{ mg O}_2$ na litr a neměla by být větší než $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ za 28 dnů. Hodnoty větší než $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí $6 - 8,5$ a spotřeba kyslíku zkušební látkou je menší než 60% , měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkušební látky.

Viz také I.5.2.

IVD.3.3 **Zprávy**

Viz I.8.

IVD.4 **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ

1. LABORATOŘ

2. DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY

3. ZKUŠEBNÍ LÁTKA

Název:

Koncentrace zásobního roztoku: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Počáteční koncentrace v médiu, C_0 : $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Objem zkušební baňky (V): ml

TSK nebo CHSK: v mg O_2 na mg zkušební látky (NH_4 , NO_3):

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

5. SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

		Čas (dny)					
		0	7	14	21	28	
Spotřeba O_2 (mg) zkušební látkou	1						
	2						
	a , průměr						
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	3						
	4						
	b , průměr						
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$						
	$(a_2 - b_m)$						
BSK na mg zkušební látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$						
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$						
Rozklad v % $\frac{\text{BSK}}{\text{TSK}} \times 100$	$D_1 (a_1)$						
	$D_2 (a_2)$						
	Průměr*						

V = objem média ve zkušební baňce

* Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. KOREKCE NA NITRIFIKACI (viz příloha V)

Den	0	28	Rozdíl
i) Koncentrace dusičnanů (mg N na liter)			(N)
ii) Kyslíkový ekvivalent ($4,57 \times \text{N} \times V$) (mg)	—	—	
iii) Koncentrace dusitanů (mg N na liter)			(N)
iv) Kyslíkový ekvivalent ($3,43 \times \text{N} \times V$) (mg)	—	—	
ii + iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. ANALÝZA UHLÍKU (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepá zkouška ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Zkušební látka ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

0	$(C_{bl(0)})$	(C_0)
28*	$(C_{bl(t)})$	(C_t)
* nebo na konci inkubace		

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right) \times 100$$

8. SPECIFICKÁ ANALÝZA (nepovinné)

S_b = koncentrace ve fyzikálně-chemické kontrole (sterilní) po 28 dnech,

S_a = koncentrace v inokulované baňce po 28 dnech.

$$\text{biologický rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTICKÝ ROZKLAD (nepovinné)

a = spotřeba kyslíku ve sterilních baňkách po 28 dnech v mg,

spotřeba kyslíku na mg zkušební chemické látky = $\frac{a}{C_0V}$

(viz oddíl 1 a 3)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{a \times 100}{C_0V \times \text{TSK}}$$

IVE. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POMOCÍ ZKOUŠKY V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH – metoda C.4-E podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVE.1. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkušební látky v minerálním médiu, obvykle o koncentraci 2 až 5 mg·l⁻¹, se inokuluje malým množstvím mikroorganismů ze směsné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvičkách, v temnu a při konstantní teplotě. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím analýzy rozpuštěného kyslíku. Množství spotřebovaného kyslíku po korekci na souběžnou slepou zkoušku s inokulem se vyjádří jako TSK nebo CHSK.

IVE.2. POPIS METODY

IVE.2.1. Přístroje a pomůcky

- Lahve pro analýzu BSK se skleněnými zátkami, např. na 250 – 300 ml.
- Vodní lázeň nebo inkubátor pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ±1 °C nebo menší) v temnu.
- Velké skleněné lahve na 2 – 5 l pro přípravu média a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK.
- Kyslíková elektroda a oxymetr nebo vybavení a činidla pro Winklerovu titrační metodu.

IVE.2.2. Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se po 1 ml roztoků a) až d) a doplní se vodou na 1 litr.

IVE.2.3. Příprava inokula

Inokulum se obvykle získává z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Obvykle se použije

jedna kapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na litr média; k nalezení optimálního objemu dané odpadní vody může být nezbytné provést pokusy (viz I.6.4.2 a I.6.5).

IVE.2.4 **Příprava lahvíček**

Minerální médium se alespoň 20 min silně provzdušňuje. Všechny série zkoušek se provedou s minerálním médiem ze stejné dávky. Obecně je médium připraveno k použití po 20 h stání při zkušební teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu; jeho obsah by měl být asi $9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ při $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Všechny operace přenosu média nasyceného vzduchem a jeho plnění se provedou tak, aby nevznikaly bublinky, např. pomocí nasávaček.

Připravují se shodné skupiny lahvíček pro analýzu BSK pro stanovení se zkušební látkou a referenční látkou v souběžných sériích experimentů. Připraví se dostatečný počet lahvíček, včetně slepých pokusů, tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu, např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů, bylo možné provést alespoň dvě měření spotřeby kyslíku. K tomu, aby bylo možné rozpoznat 10denní období rozkladu, může být potřeba více lahvíček.

Velké lahve se přibližně do jedné třetiny naplní provzdušněným médiem. Poté se zvláště do jednotlivých velkých lahví přidá dostatečný objem zásobního roztoku zkušební látky a referenční látky, a to obvykle tak, aby nebyla konečná koncentrace chemických látek větší než $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ke slepému pokusu v další velké lahvi se nepřidávají žádné chemické látky.

S cílem zajistit, aby aktivita inokula nebyla omezená, nesmí koncentrace kyslíku v lahvíčkách pro analýzu BSK klesnout pod $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Toto omezuje koncentraci zkušební látky na $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro látky, které se špatně rozkládají, a pro látky s nízkou hodnotou TSK lze použít koncentraci $5 - 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V některých případech se doporučuje provést souběžné série měření při dvou různých koncentracích zkušební látky, např. při 2 a $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Obvykle se TSK počítá na základě tvorby amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace nebo kdy dochází k nitrifikaci, se TSK vypočte na základě tvorby dusičnanů (TSK_{NO_3} , viz příloha II, bod 2). V případech, kdy nitrifikace není úplná, se provede korekce na změny analytické stanovených koncentrací dusitanů a dusičnanů (viz příloha V).

Má-li být vyšetřena toxicita zkušební látky (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), je nezbytné nasadit další sérii lahvíček.

Připraví se další velká láhev s provzdušněným minerálním médiem (naplněná asi do jedné třetiny objemu), do které se přidá zkušební a referenční chemická látka o konečné koncentraci obvykle stejné jako v případě ostatních velkých lahví.

Roztoky ve velkých lahvích se inokulují výstupem z druhého stupně čistírny odpadních vod (jedna kapka nebo $0,05$ až $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$) nebo z jiného zdroje inokula, jako je např. říční voda (viz I.6.4.2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným minerálním médiem za použití hadičky, která sahá na dno, aby se dosáhlo dostatečného promíchání.

IVE.2.5 **Počet lahvíček v typické zkoušce**

V typické zkoušce se použijí následující lahvíčky:

nejméně 10 lahvíček se zkušební látkou a inokulem (zkušební suspenze),

nejméně 10 lahvíček pouze s inokulem (slepá zkouška s inokulem),

nejméně 10 lahvíček s referenční látkou a inokulem (kontrolní zkouška postupu),

a podle potřeby 6 lahvíček se zkoušenou látkou, referenční látkou a inokulem (kontrola toxicity). Pro rozpoznání 10denního období rozkladu je však potřebný dvojnásobný počet lahvíček.

IVE.2.6 **Provedení zkoušky**

Všechny připravené roztoky se ihned po přípravě rozdělí do příslušné skupiny lahvíček pro analýzu BSK, a to pomocí hadičky zavedené do spodní čtvrtiny velké lahve (nikoliv ke dnu) tak, aby se všechny lahvičky pro analýzu BSK zcela naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. V lahvičkách se Winklerovou metodou nebo pomocí oxymetru ihned stanoví obsah rozpuštěného kyslíku k počátku zkoušky (k času nula). Obsah lahvíček lze konzervovat pro pozdější analýzu přidávkem síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvním Winklerovým činidlem). Před provedením zbývajících kroků Winklerovy metody se pečlivě uzavřené lahvičky obsahující kyslík vázaný ve formě hydratovaného oxidu manganitého skladují v temnu nejdéle 24 h při teplotě 10 – 20 °C. Zbývajících souběžně připravené lahvičky se uzavřou tak, aby v nich nezůstaly bublinky vzduchu, a inkubují se v temnu při 20 °C. Každá série musí být doprovázena úplnou sérií slepého pokusu s inokulovaným médiem. Ve všech sériích se během 28 dnů inkubace v pravidelných intervalech (nejméně jednou týdně) stanoví alespoň ve dvou lahvičkách obsah rozpuštěného kyslíku.

Týdenní vzorky umožní stanovení rozkladu v procentech ve 14denním období rozkladu, zatímco vzorky odebírané každé 3 – 4 dny umožní rozpoznat 10denní období rozkladu, což vyžaduje dvojnásobný počet lahvíček.

U látek obsahujících dusík se provede korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci. K tomuto účelu se stanoví koncentrace rozpuštěného kyslíku oxymetrem a poté se z lahvíčky pro analýzu BSK odebere vzorek pro stanovení dusitanů a dusičnanů. Z přírůstku koncentrace dusitanů a dusičnanů se vypočte množství spotřebovaného kyslíku (viz příloha V).

IVE.3

DATA A ZPRÁVY

IVE.3.1

Zpracování výsledků

Nejprve se vypočte BSK, ke které došlo po každé časové periodě, a to odečtením spotřeby kyslíku (v mg O₂ na litr) ve slepém pokusu s inokulem od spotřeby zkušební chemickou látkou. Takto korigovaná spotřeba se vydělí koncentrací zkušební látky (mg·l⁻¹) a získá se specifická BSK v mg kyslíku na mg zkušební látky. Biologická rozložitelnost v procentech se vypočte jako podíl specifické BSK a specifické TSK (vypočtené podle přílohy II, bodu 2) nebo CHSK (stanovené analyticky, viz příloha II, bod 3), tedy:

$$\text{BSK} = \frac{\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slep. pokusu v mg}}{\text{hmotnost zkušební chem. látky v baňce v mg}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg zkušební chemické látky.}$$

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BSK (mg O}_2 \text{ na mg zkušeb. chem. látky)}}{\text{TSK (mg O}_2 \text{ na mg zkušeb. chem. látky)}} \times 100$$

nebo

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BSK (mg O}_2 \text{ na mg zkušeb. chem. látky)}}{\text{COD (mg O}_2 \text{ na mg zkušeb. chem. látky)}} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije odpovídající hodnota TSK (pro NH₄ nebo NO₃) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (příloha II, bod 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

IVE.3.2

Platnost výsledků

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu s inokulem by neměla být po 28 dnech vyšší než $1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyšší hodnoty vyžadují přešetření experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku ve zkušebních lahvičkách by neměla nikdy klesnout pod $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto nízké úrovně kyslíku jsou platné pouze tehdy, lze-li použitou metodou stanovení rozpuštěného kyslíku tak nízké úrovně přesně změřit.

Viz také I.5.2.

IVE.3.3 Zprávy

Viz I.8.

IVE.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. LABORATOŘ

2. DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY

3. ZKUŠEBNÍ LÁTKA

Název:

Koncentrace zásobního roztoku: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Počáteční koncentrace v lahvičce: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

TSK nebo CHSK: v mg O_2 na mg zkušební látky

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace v reakční směsi: $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

5. STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU:

Metoda: Winklerova metoda / oxymetr

Analýzy lahviček

	Doba kultivace (d)		Rozpuštěný kyslík ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)			
			0	n_1	n_2	
Slepá zkouška (bez chemické látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkušební chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. KOREKCE NA NITRIFIKACI (viz příloha V)

	Doba kultivace			
	0	n_1	n_2	n_3
i) Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)				
ii) Změna koncentrace dusičnanů (mg N na litr)	—			
iii) Kyslíkový ekvivalent ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	—			
iv) Koncentrace dusitanů (mg N na litr)				
v) Změna koncentrace dusitanů (mg N na litr)	—			
vi) Kyslíkový ekvivalent ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	—			
iii + vi) Celkový kyslíkový ekvivalent ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	—			

7. ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH

	Úbytek po n dnech (mg·l ⁻¹)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
LAHVIČKA 1: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 2: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem. látky} \times \text{TSK}}$				
LAHVIČKA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem. látky} \times \text{TSK}}$				
průměr * $\% D = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

* Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

m_{t0} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase 0

m_{tx} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase x

m_{b0} = hodnota pro slepý pokus v čase 0

m_{bx} = hodnota pro slepý pokus v čase x

Použijí se rovněž korekce na nitrifikaci z bodu iii + vi v oddílu 6.

8. ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLEPÉM POKUSU

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu je $(m_{b0} - m_{b28})$ v mg·l⁻¹. Tato spotřeba je důležitá pro platnost zkoušky. Měla by být menší než 1,5 mg·l⁻¹.

IVF. METODA PRO STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POMOCÍ ZKOUŠKY MITI – metoda C.4-F podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IVF.1 PODSTATA METODY

Měření spotřeby kyslíku v míchaném roztoku nebo suspensi zkušební chemické látky v minerálním médiu inokulovaném speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů se provádí automaticky po dobu 28 dnů za tmy v uzavřeném respirometru při 25 ± 1 °C. Uvolňovaný oxid uhličitý se jímá v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost se vyjádří jako spotřeba kyslíku (korigovaná na slepý pokus) vyjádřená v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Primární biologická rozložitelnost vyjádřená v procentech se rovněž vypočte z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace, popřípadě z analýzy DOC.

IVF.2 POPIS METODY

IVF.2.1 Přístroje a pomůcky

- automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr standardně vybavený 6 baňkami na 300 ml opatřenými uzávěry obsahujícími absorbent CO₂;
- místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň nastavená na 25 ± 1 °C;
- zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);
- analyzátor uhlíku (nepovinné).

IVF.2.2 Příprava minerálního média

- Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄ 8,50
Hydrogenfosforečnan didraselný, K₂HPO₄ 21,75 g
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Na₂HPO₄·12H₂O 44,60 g
Chlorid amonný, NH₄Cl 1,70 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.
pH roztoku musí být 7,2.

- b) Síran hořečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.
- c) Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2 27,50 g
Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.
- d) Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

Spojí se po 3 ml roztoků a), b), c), a d) a doplní se na 1 litr.

IVF.2.3

Příprava inokula

Odeberou se čerstvé vzorky nejméně z deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemické látky. Z míst, jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řeky, jezera a moře se odeberou litrové vzorky kalu, povrchových půd, vody atd., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyplavených látek a ustálení se pH supernatantu upraví na 7 ± 1 hydroxidem sodným nebo kyselinou fosforečnou.

Vhodným objemem filtrovaného supernatantu se naplní nádoba na aktivaci kalu a kapalina se $23\frac{1}{2}$ h provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije přibližně jedna třetina celkového objemu supernatantu a k usazenému materiálu se přidá stejný objem roztoku (pH 7), který obsahuje vždy po 0,1 % glukosy, peptonu a dihydrogenfosforečnanu draselného, a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad správné laboratorní praxe: odtok má být čistý, teplota má být udržována při 25 ± 2 °C, pH má být 7 ± 1 , kal se má dobře usazovat, provzdušňování musí být za všech okolností dostatečné, mají být přítomni prvoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé tři měsíce. Inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace, ale ne později než po čtyřech měsících. Proto se v pravidelných intervalech jednou za tři měsíce odebírají vzorky z 10 míst.

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant aktivovaného použitého kalu mísí se stejným objemem filtrovaného supernatantu čerstvě odebraného kalu pocházejícího z deseti zdrojů a směs se kultivuje podle výše uvedeného postupu. Kal se použije jako inokulum až 18 – 24 h po uvedeném zpracování.

IVF.2.4

Příprava baněk

Připraví se následujících 6 baněk:

Baňka č. 1: zkušební chemická látka v ředící vodě, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Baňky č. 2, 3, 4: zkušební chemická látka v minerálním médiu, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Baňka č. 5: referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Baňka č. 6: pouze minerální médium

Špatně rozpustné chemické látky se odváží nebo odměří, nebo se zpracují podle přílohy III, s výjimkou těch, u nichž nesmějí být použita rozpouštědla ani emulgátory. Do speciálních uzávěrů všech lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

IVF.2.5

Provedení zkoušky

Baňky č. 2, 3, 4 (zkušební suspence), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus s inokulem) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby byla výsledná

koncentrace kalu $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Do lahve č. 1 se inokulum nepřidává, slouží jako abiotická kontrola. Zařízení se sestaví, přezkouší se na vzduchotěsnost, spustí se míchačka a v temnu se zahájí měření spotřeby kyslíku. Denně se kontroluje teplota, míchání, coulometrický zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenají se všechny změny barvy obsahu baněk. Spotřeba kyslíku pro 6 baněk se odečítá přímo, např. šestikanálovým zapisovačem, čímž se získá křivka BSK. Na konci kultivace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách a stanoví se zbytková koncentrace zkušební chemické látky a jejích produktů rozkladu a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také koncentrace DOC (postup podle přílohy II, bodu 4). Zvláštní pozornost je třeba věnovat těkavým látkám. Pokud se předpokládá nitrifikace, stanoví se podle možnosti koncentrace dusičnanů a dusitanů.

IVF.3

DATA A ZPRÁVY

IVF.3.1

Zpracování výsledků

Spotřeba kyslíku (mg) zkušební látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu inokulem za stejnou dobu ve slepém pokusu) se podělí hmotností použité zkušební látky. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkušební látky:

$$\text{BSK} = \frac{\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg}}{\text{hmotnost zkušební chem. látky v baňce v mg}}$$

= mg O₂ na mg zkušební chemické látky.

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \% \text{ TSK} = \frac{\text{BSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}}{\text{TSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky)}} \times 100.$$

Pro směsi se TSK vypočte z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché sloučeniny. Použije se odpovídající hodnota TSK (TSK_{NH₄} nebo TSK_{NO₃}) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (příloha II, bod 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

Vypočte se primární biologický rozklad v procentech z úbytku specifické (výchozí) chemické látky (viz I.7.2):

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta zkušební chemické látky v baňce č. 1, zaznamená se to a jako koncentrace zkušební látky (S_b) po 28 dnech se pro výpočet biologické rozložitelnosti dosadí tato koncentrace.

Stanovuje-li se koncentrace DOC (nepovinné), vypočte se konečná hodnota biologického rozkladu v procentech podle vztahu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}} \right) \times 100$$

jak je uvedeno v bodě I.7.1. Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta DOC v baňce č. 1, použije se při výpočtu biologického rozkladu v procentech tato koncentrace DOC.

Všechny výsledky se zaznamenají do přehledu dat.

IVF.3.2

Platnost výsledků

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20 – 30 mg O₂ na litr a neměla by být větší než 60 mg·l⁻¹ za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg·l⁻¹ vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6 – 8,5 a spotřeba kyslíku zkušební látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkušební látky.

Viz také I.5.2.

V případě, že rozklad anilinu vypočtený ze spotřeby kyslíku nepřekročí po 7 dnech 40 % a po 14 dnech 65 %, považuje se zkouška za neplatnou.

IVF.3.3

Zprávy

Viz I.8.

IVF.4

PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MITI (I)

1. **LABORATOŘ**
2. **DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**
3. **ZKUŠEBNÍ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg·l⁻¹

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu, C₀: mg·l⁻¹

Objem reakční směsi, V: ml

TSK: mg O₂ na litr

4. **INOKULUM**

Místa odběru kalu:

- | | |
|-------|--------|
| 1)... | 6)... |
| 2)... | 7)... |
| 3)... | 8)... |
| 4)... | 9)... |
| 5)... | 10)... |

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci se syntetickými splašky = ... mg·l⁻¹.

Objem aktivovaného kalu v litru konečného média = ... ml

Koncentrace kalu v konečném médiu = ... mg·l⁻¹

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

Typ použitého respirometru:

		Čas (dny)				
		0	7	14	21	28
Spotřeba O ₂ (mg) zkušební látkou	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
Spotřeba O ₂ (mg) ve slepé zkoušce	b					
Korigovaná spotřeba O ₂ (mg)	(a ₁ – b)					
	(a ₂ – b)					
	(a ₃ – b)					
BSK na mg zkušební látky	$\frac{(a-b)}{C_0V}$	Baňka 1				
		Baňka 2				
		Baňka 3				
Rozklad v %		1				

$\frac{BSK}{TSK} \times 100$		2					
		3					
		Průměr*					

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku.

* Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

6. ANALÝZA UHLÍKU (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC		úbytek DOC v %	Průměr
	Naměřená hodnota	Korigovaná hodnota		
Voda + zkušební látko	a		—	—
Kal + zkušební látka	b_1	$b_1 - c$		
Kal + zkušební látka	b_2	$b_2 - c$		
Kal + zkušební látka	b_3	$b_3 - c$		
Kontrolní slepá zkouška	c	—	—	—

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. DATA ZE SPECIFICKÉ CHEMICKÉ ANALÝZY

	Zbytkové množství zkušební chemické látky na konci zkoušky	Rozklad v %
Slepá zkouška s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Rozklad v % se vypočte pro baňky $a1$, $a2$, $a3$.

8. POZNÁMKY

Připojí se křivka závislosti BSK na čase, je-li k dispozici.

PŘÍLOHA I ZKRATKY A DEFINICE

DO: Rozpuštěný kyslík (*dissolved oxygen*) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) je koncentrace kyslíku, který je rozpuštěn ve vodném vzorku.

BSK: Biochemická spotřeba kyslíku (*biochemical oxygen demand, BOD*) (g) je množství kyslíku, jež je v průběhu metabolizace zkušební látky spotřebováno mikroorganismy; vyjadřuje se také jako spotřeba kyslíku v gramech na gram zkušební látky. (Viz metoda C.5).

CHSK: Chemická spotřeba kyslíku (*chemical oxygen demand, COD*) (g) je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkušební látky horkým kyselým dichromanem; je měřítkem množství přítomných oxidovatelných látek; vyjadřuje se také v gramech kyslíku spotřebovaného na gram zkušební látky. (Viz metoda C.6).

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (*dissolved organic carbon*) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$ nebo zůstane v supernatantu po odstředování po dobu 15 min při zrychlení $40\,000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ (asi 4 000 g).

TSK: Teoretická spotřeba kyslíku (*theoretical oxygen demand, ThOD*) (mg) je celkové množství kyslíku nezbytné pro úplnou oxidaci chemické látky; vypočte se

z molekulového vzorce látky (viz příloha II, bod 2) a vyjadřuje se také jako množství kyslíku v mg nezbytné na mg zkušební látky.

TCO₂: Teoretický oxid uhličitý (*theoretical carbon dioxide, ThCO₂*) je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkušební látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkušební látky.

TOC: Celkový organický uhlík (*total organic carbon*) ve vzorku je součtem organického uhlíku v roztoku a v suspenzi.

IC: Anorganický uhlík (*inorganic carbon*).

TC: Celkový uhlík (*total carbon*) je součtem organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky způsobené biologickým působením, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Snadno biologicky rozložitelná:

je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

Biologicky rozložitelná:

je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Odstranitelnost:

je náklonnost látek k jejich odstranění při biologickém čištění odpadních vod, aniž by byl nepříznivě ovlivněn normální průběh čisticích pochodů. Látky snadno biologicky rozložitelné jsou obecně odstranitelné, avšak ne všechny rozložitelné látky jsou odstranitelné. Mohou zde působit také abiotické procesy.

Fáze iniciace:

je doba, ve zkoušce na úbytek rozpuštěného organického uhlíku, od inokulace do dosažení alespoň 10% biologického rozkladu. Fáze iniciace je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce fáze zdržení do dosažení 90 % maximální dosažitelné úrovně rozkladu.

10denní období rozkladu:

je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10% rozkladu.

PŘÍLOHA II

VÝPOČET A STANOVENÍ NĚKTERÝCH SOUHRNNÝCH PARAMETRŮ

V závislosti na zvolené zkušební metodě se vyžaduje určení některých souhrnných parametrů. V následujícím oddíle je popsán výpočet těchto hodnot. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. Obsah uhlíku

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví analýzou prvků ve zkušební látce.

2. Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)

Teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) lze vypočítat ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků analýzy prvků. Pro látku



bez nitrifikace,

$$* TSK_{NH_4} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{M} \quad \text{v mg/mg}$$

nebo s nitrifikací,

$$TSK_{NH_4} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + \frac{5}{2}n + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{M}$$

3. Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví metodou C.6.

4. Rozpuštěný organický uhlík (DOC)

Rozpuštěným organickým uhlíkem je podle definice organický uhlík přítomný ve vodném roztoku chemické látky nebo směsi, který projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

Odeberou se vzorky ze zkušebních nádob a ihned se filtrují pomocí filtračního zařízení s vhodným membránovým filtrem. Prvních 20 ml (toto množství může být při použití malých filtrů zmenšeno) se odstraní. 10 – 20 ml, nebo v případě nástřiku menší objem (objem závisí na množství potřebném pro analýzu), se uschová pro analýzu uhlíku. Koncentrace DOC se stanoví pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, která je menší nebo rovna 10 % počáteční koncentrace DOC použité ve zkoušce.

Zfiltrované vzorky, které není možné analyzovat ve stejný pracovní den, se uchovávají v lednici 48 h při 2 – 4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tedy může obsahovat až několik mg rozpustného organického uhlíku, který může ovlivnit stanovení biologické rozložitelnosti.

Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením třikrát jednu hodinu v deionizované vodě. Filtry lze poté skladovat 1 týden ve vodě. Při použití filtračních patron pro jedno použití se musí u každé šarže ověřit, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkušební látky na filtru. Doporučuje se ověřit, zda k adsorpci zkušební chemické látky na filtru nedochází.

Místo filtrace lze použít k rozlišení TOC od DOC odstředování při 40 000 m·s⁻¹ (4 000 g) po dobu 15 min. Tato metoda však není spolehlivá při počáteční koncentraci DOC < 10 mg·l⁻¹, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 12th ed., Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.
- Wagner, R. von Wasser, 1976, vol 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409, Teil 41 – Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

* *Poznámka.* M je molekulová hmotnost.

- Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, vol 13(1), 169.

PŘÍLOHA III

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ŠPATNĚ ROZPUSTNÝCH LÁTEK

Při zkouškách biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Zatímco odběr vzorků homogenních kapalin je problémem jen zřídka, u tuhých látek se doporučuje provést homogenizaci vhodnými prostředky, aby v důsledku nehomogenity nedošlo k chybám. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům reprezentativních vzorků o několika miligramech ze směsi látek, které obsahují velké množství nečistot.

V průběhu zkoušek lze použít různé způsoby míchání. Je třeba věnovat pozornost tomu, aby míchání bylo přiměřené právě pro udržení látky v disperzi a nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pění a nadměrným třecím silám.

Může se použít emulgátor vytvářející stabilní disperzi chemické látky. Nesmí být toxický pro bakterie a nesmí se biologicky rozkládat nebo pění za zkušebních podmínek.

Stejná kritéria jako pro emulgátory platí i pro rozpouštědla.

U tuhých zkušebních látek se nedoporučuje používat tuhé nosiče, mohou však být vhodné v případě olejovitých látek.

Použijí-li se pomocné látky, jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče, musí být proveden slepý pokus s pomocnou látkou.

Pro studium biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek lze použít kteroukoli ze tří respirometrických zkoušek (zkouška na úbytek CO₂, na BSK, zkouška MITI).

LITERATURA

- de Morsier, A. *et al.* Biodegradation tests for poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 1987, 16, 833.
- Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, 13, 169.

PŘÍLOHA IV

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK POTENCIÁLNĚ TOXICKÝCH PRO INOKULUM

Je-li chemická látka podrobena zkoušení snadné biologické rozložitelnosti a jeví se jako biologicky nerozložitelná, doporučuje se postupovat při požadavku rozlišit inhibiční působení od odolnosti látky vůči rozkladu následujícím způsobem (Reynolds *et al.*, 1987).

Ve zkouškách toxicity i ve zkouškách biologické rozložitelnosti se použijí podobná nebo stejná inokula.

K posouzení toxicity chemických látek zkoušených ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu (směrnice 88/302/EHS), stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Nemá-li dojít k inhibici z důvodu toxicity, měla by být koncentrace zkušební látky použitá ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti menší než 1/10 hodnoty EC₅₀ (nebo menší než EC₂₀) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s EC₅₀ > 300 mg·l⁻¹ pravděpodobně nemají při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti toxické účinky.

Hodnoty EC₅₀ < 20 mg·l⁻¹ mohou při následném zkoušení působit potíže. Měly by být použity nízké koncentrace, což vyžaduje použít přísné a citlivé zkoušky v uzavřených

lahvičkách nebo materiál značený ^{14}C . Použití vyšších koncentrací zkušební látky může být popřípadě umožněno nasazením aklimatizovaného inokula. V tomto případě se však ztrácí specifické kritérium zkoušky snadné biologické rozložitelnosti.

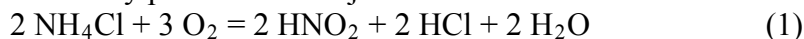
LITERATURA

Reynolds, L. *et al.*, Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere*, 1987, 16, 2259.

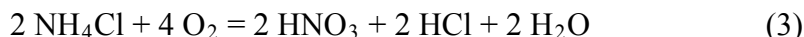
PŘÍLOHA V KOREKCE NA SPOTŘEBU KYSLÍKU PŘI NITRIFIKACI

Chyby způsobené tím, že při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, není vzata v úvahu nitrifikace, nejsou významné (nejsou větší než 5 %), i když je oxidace amoniakálního dusíku ve zkušebních nádobách a ve slepém pokusu nepravdělná. U zkušebních látek obsahujících dusík může dojít ke značným chybám.

Dochází-li k nitrifikaci, avšak nikoli úplně, musí být spotřeba kyslíku reakční směsí korigována na množství kyslíku spotřebovaného na oxidaci amoniaku a amonných iontů na dusitany a dusičnany, jsou-li změny koncentrace dusitanů a dusičnanů během kultivace stanoveny pomocí následujících rovnic:



Celkově:



Podle rovnice 1 je spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, tzn., že přepočítávací faktor je 3,43 (96/28). Stejně tak je podle rovnice 3 spotřeba kyslíku při oxidaci na dusičnan 128 g, tzn. přepočítávací faktor je 4,57 (128/28).

Protože popsané reakce *následují po sobě*, přičemž jsou realizovány odlišnými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat; při poklesu roste odpovídajícím způsobem koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku při tvorbě dusičnanů se tedy vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, zatímco spotřeba kyslíku při tvorbě dusitanů se vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusitanů faktorem 3,43, nebo při poklesu obsahu dusitanů se ztráty kyslíku vypočtou vynásobením poklesu koncentrace faktorem -3,43.

To znamená:

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ při tvorbě dusičnanů} = 4,57 \times \text{přírůstek koncentrace dusičnanů} \quad (4)$$

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ při tvorbě dusitanů} = 3,43 \times \text{přírůstek koncentrace dusitanů} \quad (5)$$

$$\text{ztráta O}_2 \text{ při úbytku dusitanů} = -3,43 \times \text{pokles koncentrace dusitanů} \quad (6)$$

Tedy

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ při nitrifikaci} = \pm 3,43 \times \text{změna koncentrace dusitanů} + 4,57 \times \text{změna koncentrace dusičnanů} \quad (7)$$

a proto

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ v důsledku oxidace C} = \text{celková pozorovaná spotřeba} - \text{spotřeba v důsledku nitrifikace} \quad (8)$$

Jinými slovy, pokud se stanoví pouze celkový oxidovaný N, je možno za spotřebu kyslíku v důsledku nitrifikace považovat v prvním přiblížení hodnotu $4,57 \times$ přírůstek oxidovaného dusíku.

Korigovaná hodnota spotřeby kyslíku v důsledku oxidace C se potom porovnává s TSK NH_3 vypočítanou podle přílohy II.

V. METODA PRO STANOVENÍ ROZLOŽITELNOSTI – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU – metoda C.5 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

V.1 METODA

V.1.1 ÚVOD

Metoda je určena pro měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) tuhých nebo kapalných organických látek.

Data získaná při této zkoušce platí pro látky rozpustné ve vodě; těkavé látky a látky s nízkou rozpustností ve vodě lze touto metodou alespoň v zásadě rovněž zkoušet.

Metodu lze použít pouze pro organické látky, které nemají v koncentracích používaných při zkoušce inhibiční účinek na bakterie. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, může být nezbytné použít pro dosažení dobré dispergace zkušebního materiálu zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Informace o toxicitě chemické látky mohou být užitečné při interpretaci nízkých hodnot výsledku zkoušky a při volbě vhodných zkušebních koncentrací.

V.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je definována jako množství rozpuštěného kyslíku, které je nutné k biochemické oxidaci určitého objemu roztoku látky za předepsaných podmínek.

Výsledky se vyjadřují v gramech spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkušební látky.

V.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Je žádoucí použít vhodnou referenční látku pro kontrolu aktivity inokula.

V.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném, dobře provzdušněném médiu se inokuluje mikroorganismy a kultivuje se v temnu za stálé, definované teploty.

BSK se stanoví z rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku na začátku a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně pět dní a nejdéle 28 dní.

Souběžně musí být provedena slepá zkouška bez obsahu zkušební látky.

V.1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Stanovení BSK nelze považovat za ověřené stanovení biologické rozložitelnosti látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za screeningovou zkoušku.

V.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se předběžný roztok nebo disperze zkušební látky o koncentraci vhodné pro použitou metodu. Poté se stanoví BSK některou vhodnou vnitrostátní nebo mezinárodní standardizovanou metodou.

V.2 DATA A HODNOCENÍ

BSK předběžného roztoku se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na BSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkušební látky.

V.3 ZPRÁVY

Uvede se použitá metoda.

Biochemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří platných měření.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav, toxické účinky a vlastní složení zkušební látky.

Použití přísad pro inhibici biologické nitrifikace musí být uvedeno.

V.4 LITERATURA

Seznam příkladů standardizovaných metod:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

VI. METODA PRO STANOVENÍ ROZLOŽITELNOSTI - CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU – metoda C.6 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

VI.1 METODA

VI.1.1 ÚVOD

Metoda je určena pro měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) tuhých nebo kapalných organických látek prováděné standardním dohodnutým způsobem za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků jsou užitečné informace o chemickém vzorci látky (např. zda jde o soli halogenů, železnaté soli organických sloučenin, organické sloučeniny chloru).

VI.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky, která se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyslíku oxidačního činidla spotřebovaného látkou za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Výsledek se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku (COD) v gramech na 1 g zkušební látky.

VI.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

VI.1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vodě se za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru oxiduje dichromanem draselným v prostředí koncentrované kyseliny sírové pod zpětným chladičem. Přebytečný dichroman se stanoví titrací odměrným roztokem síranu amonno-železnatého.

U látek obsahujících chlór se pro omezení rušení chloridy přidává síran rtuťnatý*.

VI.1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Vzhledem k dohodnutým podmínkám stanovení je CHSK „ukazatelem oxidovatelnosti“ a jako takový se používá pro hodnocení organických látek.

Ve zkoušce mohou rušit chloridy; na stanovení CHSK mohou mít rovněž vliv anorganické redukční a oxidační látky.

U některých cyklických sloučenin a u řady těkavých sloučenin (např. u nižších mastných kyselin) nedochází v této zkoušce k úplné oxidaci.

VI.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se počáteční roztok nebo disperse látky tak, aby bylo dosaženo CHSK od 250 do 600 mg·l⁻¹.

Poznámky:

* S roztoky obsahujícími rtuť se po použití nakládá tak, aby nedošlo k průniku rtuti do životního prostředí.

U špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek lze jemně rozmělněnou látku nebo kapalinu v množství odpovídajícím 5 mg CHSK odvážit a vpravit přímo do experimentální aparatury s vodou.

Často je výhodné, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit CHSK upravenou metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnávačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto upravenou metodou lze často úspěšně kvantifikovat i látky, u nichž je stanovení konvenční metodou obtížné – např. kyselinu octovou. Metoda však také selhává v případě pyridinu. Zvýší-li se koncentrace dichromanu draselného předepsaná v (1), na 0,25 N (0,0416 M), usnadní se přímé navažování 5 – 10 mg látky, což je důležité pro stanovení CHSK látek obtížně rozpustných ve vodě (2).

Jinak se CHSK stanoví vhodnou vnitrostátní nebo mezinárodní metodou.

VI.2 **DATA A HODNOCENÍ**

CHSK obsahu experimentální baňky se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na CHSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkušební látky.

VI.3 **ZPRÁVY**

Uvede se odkaz na použitou metodu.

Chemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří měření. Jsou-li známy, musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav a základní vlastnosti zkušební látky.

Uvede se použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chloridy.

VI.4 **LITERATURA**

- (1) Kelkenberg, H. *Z. von Wasser und Abwasserforschung*, 1975, 8, 146.
- (2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, 13, 169.

Seznam příkladů normovaných metod:

NBN T 91-201	Determination of the chemical oxygen demand.
ISBN O 11 7512494	Chemical oxygen demand (dichromat value) of polluted and waste waters.
NF T 90-101	Determination of the chemical oxygen demand.
DS 217	Water analysis –Determination of the chemical oxygen demand.
DIN 38409-H-41	Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO 6060	Water Quality: Chemical oxygen demand dichromate methods.

VII. METODA PRO STANOVENÍ ABIOTICKÉHO ROZKLADU – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE pH – metoda C.7 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

VII.1 **METODA**

Metoda je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

VII.1.1 **ÚVOD**

Hydrolýza je důležitá reakce ovlivňující abiotický rozklad. Tato reakce má zvláštní význam u látek, které jsou málo biologicky rozložitelné; může ovlivnit stálost látky v životním prostředí.

Většina reakcí hydrolýzy probíhá jako reakce pseudoprvního řádu, a poločasy jsou tedy nezávislé na koncentraci. To zpravidla dovoluje extrapolaci výsledků získaných s laboratorními koncentracemi na podmínky v životním prostředí.

Mimoto byly u několika typů chemických sloučenin publikovány příklady uspokojivé shody výsledků naměřených v čisté vodě a v přírodních vodách (2).

Při provádění této zkoušky je užitečné znát hodnotu tlaku par dané látky.

Metoda je použitelná pouze pro látky rozpustné ve vodě. Nečistoty mohou ovlivnit výsledky.

Chování látek při hydrolýze by mělo být zkoumáno při hodnotách pH, které se obvykle vyskytují v životním prostředí (pH 4 – 9).

VII.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Hydrolýzou se rozumí reakce látky RX s vodou. Tuto reakci lze znázornit prostou výměnou skupiny X za skupinu OH:



Rychlost, kterou klesá koncentrace látky RX, je dána vztahem:

$$\text{rychlost} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad (2)$$

Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce ve velkém přebytku, označuje se obvykle tento typ reakce jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je pozorovaná rychlostní konstanta dána vztahem:

$$k_{\text{pozorov.}} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad (3)$$

Tuto konstantu lze určit pro danou hodnotu pH a teplotu T z výrazu:

$$k_{\text{pozorov.}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad (4)$$

kde

t = čas,

C_0 = koncentrace látky v čase 0,

C_t = koncentrace látky v čase t ,

2,303 = přepočítací faktor mezi přirozeným logaritmem a dekadickým logaritmem.

Koncentrace se vyjádří v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo v $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Konstanta $k_{\text{pozorov.}}$ má rozměr $[\text{čas}]^{-1}$.

„Poločas“ $t_{1/2}$ je definován jako doba potřebná pro snížení koncentrace látky o 50 %,

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad (5)$$

Z rovnic (4) a (5) plyne, že

$$t_{1/2} = 0,693 / k_{\text{pozorov.}} \quad (6)$$

VII.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Jako referenční látky byly použity následující látky (1):

Kyselina acetylsalicylová (aspirin),

O,O-diethyl-*O*-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl)fosforothioát (dimpylát, diazinon).

VII.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka se rozpustí ve vodě v nízké koncentraci; pH a teplota se regulují.

Vhodnou analytickou metodou se sleduje pokles koncentrace látky v závislosti na čase.

Sestrojí se graf závislosti logaritmu koncentrací na čase, a je-li závislost lineární, lze zjistit rychlostní konstantu reakce prvního řádu ze směrnice přímky (viz bod 2).

Není-li možné stanovit rychlostní konstantu pro danou teplotu přímo, je obvykle možné odhadnout ji pomocí Arrheniovy rovnice, která udává teplotní závislost rychlostních konstant. Z průběhu lineární závislosti logaritmu rychlostních konstant, získaných při vhodných teplotách, na převrácené hodnotě absolutní teploty (K) lze extrapolací získat hodnotu rychlostní konstanty, kterou nebylo možné stanovit přímo.

VII.1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

V odkazu (2) se uvádí, že měření rychlostních konstant hydrolýzy lze u 13 tříd organických sloučenin provádět s vysokou přesností.

Reprodukovatelnost závisí zejména na regulaci pH a teploty a může být ovlivněna přítomností mikroorganismů a ve speciálních případech koncentrací rozpuštěného kyslíku.

VII.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

VII.1.6.1 Reakční činidla

VII.1.6.1.1 *Pufrační roztoky*

Zkouška se provádí při třech hodnotách pH: 4,0, 7,0 a 9,0.

K tomuto účelu se za použití chemikálií čistoty p.a. a destilované nebo deionizované vody připraví pufrační roztoky. Některé příklady pufračních roztoků jsou uvedeny v doplňku.

Použitý pufrační roztok může mít vliv na rychlost hydrolýzy; je-li tomu tak, je třeba zvolit jiný pufrační roztok. V odkazu (2) se doporučuje použít namísto fosforečnanových pufračních roztoků boritanové a acetátové pufrační roztoky.

Není-li známa hodnota pH pufračních roztoků při zkušební teplotě, lze ji stanovit s přesností na $\pm 0,1$ pH-metrem kalibrovaným při zvolené teplotě.

VII.1.6.1.2 *Zkušební roztoky*

Zkušební látka se rozpustí ve zvoleném pufračním roztoku a koncentrace by neměla překročit $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo polovinu koncentrace nasyceného roztoku, podle toho, která z těchto hodnot je nižší.

Použití organických rozpouštědel mísitelných s vodou se doporučuje jen u látek s nízkou rozpustností ve vodě.

Množství tohoto rozpouštědla by mělo být menší než 1 % a nemělo by mít vliv na proces hydrolýzy.

VII.1.6.2 **Aparatura**

Použijí se skleněné baňky se zabroušenými zátkami, pro něž není vhodné používat mazací tuk.

Pokud jsou chemická látka nebo pufrační roztok těkavé, nebo provádí-li se zkouška při zvýšené teplotě, upřednostňují se baňky zatavené nebo jinak uzavřené a s omezeným prostorem nad roztokem.

VII.1.6.3 **Analytická metoda**

Použitá metoda musí být specifická pro stanovení zkušební látky při zkušebních koncentracích a může být i kombinací vhodných analytických technik.

Použitá analytická metoda bude záviset na povaze látky a musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

VII.1.6.4 **Zkušební podmínky**

Zkoušky se provádí v termostatovaném prostoru nebo za použití termostatované lázně nastavené na zvolenou teplotu s tolerancí $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Teplota se udržuje a měří s přesností na $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Vhodnými opatřeními je třeba zabránit fotolýze.

U snadno oxidovatelných látek je nezbytné odstranit rozpuštěný kyslík (např. 5minutovým probubláváním roztoku dusíkem nebo argonem před přípravou roztoku).

VII.1.6.5 **Zkušební postup**

VII.1.6.5.1 *Předběžná zkouška*

U všech látek se provede předběžná zkouška při teplotě $50 \pm 0,5$ °C pro tři hodnoty pH: 4,0, 7,0 a 9,0. Provede se dostatečný počet měření, aby bylo možné pro každé pH odhadnout, zda je při 50 °C poločas ($t_{1/2}$) menší než 2,4 h nebo zda po 5 dnech dojde k hydrolýze méně než 10 %. (Lze odvodit, že tyto hodnoty odpovídají za podmínek, které se nejčastěji vyskytují v životním prostředí (25 °C), poločasu kratšímu než jeden den, resp. delšímu než 1 rok). Jestliže se v předběžném experimentu ukáže, že při 50 °C dojde při všech třech hodnotách pH (4, 7, 9) za 2,4 h k hydrolýze 50 nebo více procent zkušební látky, nebo že po 5 dnech dojde k hydrolýze méně než 10 % zkušební látky, nejsou další experimenty nezbytné.

V ostatních případech a pro hodnoty pH, u nichž výše uvedené podmínky nenastanou, se provede zkouška 1.

VII.1.6.5.2 *Zkouška 1*

Zkouška 1 se provede při jedné teplotě, nejlépe při $50 \pm 0,5$ °C, a pokud možno za sterilních podmínek při pH, pro něž se v předběžné zkoušce ukázala nutnost dalších zkoušek.

Zvolí se dostatečný počet vzorků, aby byl pokryt stupeň hydrolýzy 20 až 70 % a bylo tak možné ověřit, že jde při specifikovaném pH o reakci pseudoprvního řádu. Pro každé pH, při němž se zkouška 1 provede, se stanoví řád reakce.

Odhad rychlostní konstanty při 25 °C:

Rozhodnutí o dalším experimentálním postupu závisí na tom, zda lze ze zkoušky 1 usuzovat na reakci pseudoprvního řádu, či nikoliv.

Pokud nelze ze zkoušky 1 s jistotou usuzovat na reakci pseudoprvního řádu, je třeba provést další experimenty podle zkoušky 2.

Vyplývá-li s jistotou ze zkoušky 1, že jde o reakci pseudoprvního řádu, provedou se další experimenty podle zkoušky 3. (Za speciálních okolností lze vypočítat rychlostní konstanty při 25 °C z konstant při 50 °C vypočtených s použitím výsledků zkoušky 1, viz bod 3.2).

VII.1.6.5.3 *Zkouška 2*

Tato zkouška se provede při každém pH, pro něž se její provedení ukázalo na základě výsledků zkoušky 1 nezbytným, a to

— buď při teplotě nižší než 40 °C,

— nebo při dvou teplotách nad 50 °C, které se od sebe liší nejméně o 10 °C.

Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se má provést zkouška 2, se v přiměřených intervalech zvolí nejméně 6 bodů tak, že stupeň hydrolýzy je v oblasti 20 až 70 %.

Pro jedno pH a pro jednu teplotu se provede měření dvakrát. Pokud se zkouška 2 provádí při dvou teplotách nad 50 °C, provede se měření dvakrát nejlépe při nižší z těchto dvou teplot.

Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se provede zkouška 2, se podle možnosti uvede grafický odhad poločasu ($t_{1/2}$).

VII.1.6.5.4 *Zkouška 3*

Tato zkouška se provede při každém pH, pro něž se její provedení ukázalo na základě výsledků zkoušky 1 nezbytným, a to

— buď při teplotě nižší než 40 °C,

— nebo při dvou teplotách nad 50 °C, které se od sebe liší nejméně o 10 °C. Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se má provést zkouška 3, se zvolí tři body, první v čase 0, druhý a třetí při stupni hydrolyzy vyšším než 30 %; vypočte se konstanta $k_{\text{pozorov.}}$ a poločas $t_{1/2}$.

VII.2

DATA

Jde-li o reakci pseudoprvního řádu, lze vypočítat hodnoty konstanty $k_{\text{pozorov.}}$ pro každé pH a každou zkušební teplotu z grafu závislosti hodnot logaritmu koncentrací na čase pomocí rovnice:

$$k_{\text{pozorov.}} = - \text{směrnice} \times 2,303 \quad (7)$$

Dále je možné z rovnice (6) vypočítat $t_{1/2}$.

Podle potřeby se s použitím Arrheniovy rovnice stanoví $k_{25\text{ °C}}$.

Pokud chování neodpovídá reakci pseudoprvního řádu, viz bod 3.1.

VII.3

ZPRÁVA

VII.3.1

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující údaje:

- specifikaci látky;
- všechny výsledky získané s referenčními látkami;
- podstatu a podrobnosti použité analytické metody;
- pro každou zkoušku: teplotu, pH, složení pufrčního roztoku, tabulku se všemi údaji o koncentraci a čase;
- u reakcí pseudoprvního řádu hodnoty $k_{\text{pozorov.}}$ a $t_{1/2}$, včetně metody jejich výpočtu;
- u reakce, která neodpovídá pseudoprvnímu řádu, graf průběhu závislosti logaritmu koncentrace na čase;
- všechny informace a pozorování nezbytné pro interpretaci výsledků.

VII.3.2

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Může existovat možnost vypočítat přijatelné hodnoty rychlostních konstant (při 25 °C) zkušebních látek za předpokladu, že pro homology chemické látky již existují experimentální údaje pro aktivační energii a za předpokladu, že lze důvodně očekávat, že aktivační energie zkušební látky je stejného řádu.

VII.4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81), 30 final.
- (2) W. Mabey, T. Mill.: Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1978, 7 (2), 383-415.

DODATEK

Pufrační roztoky

A.

CLARK A LUBS

Hodnoty pH uvedené v následujících tabulkách byly vypočteny na základě měření potenciálu za použití Sørensenových standardních rovnic. Skutečné hodnoty pH jsou o 0,04 vyšší než hodnoty v tabulce.

Složení	pH
kalium-hydrogenftalát (0,1 mol·l ⁻¹) a HCl (0,1 mol·l ⁻¹) při 20 °C 2,63 ml HCl + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	3,8
kalium-hydrogenftalát (0,1 mol·l ⁻¹) a NaOH (0,1 mol·l ⁻¹) při 20 °C 0,40 ml NaOH + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	4,2

dihydrogenfosforečnan draselný (0,1 mol·l ⁻¹) a NaOH (0,1 mol·l ⁻¹) při 20 °C	
23,45 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	7,2

H ₃ BO ₃ (0,1 mol·l ⁻¹) v KCl (0,1 mol·l ⁻¹) a NaOH (0,1 mol·l ⁻¹) při 20 °C	
16,30 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF A VLEESHOUWER

Složení	pH
Monokalium-citrát (0,1 mol·l ⁻¹) a NaOH (0,1 mol·l ⁻¹) při 18 °C (je třeba přidat malý krystalek thymolu, aby nevznikaly plísňe)	
2,0 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

Borax (0,05 mol·l⁻¹) a HCl (0,1 mol·l⁻¹)

Složení		pH			
ml boraxu	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

Borax (0,05 mol·l⁻¹) a NaOH (0,1 mol·l⁻¹)

Složení		pH			
ml boraxu	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12

VIII. METODA PRO STANOVENÍ TOXICITY PRO ŽÍŽALY – ZKOUŠKA NA UMĚLÉ PŮDĚ – metoda C.8 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

VIII.1 METODA

VIII.1.1 ÚVOD

V této laboratorní zkoušce se zkoušená látka přidá do umělé půdy, do které se na 14 dní umístí žížaly. Po této době (a nepovinně i po sedmi dnech) se vyšetří letální účinek látky na žížaly. Zkouška je metodou relativně krátkodobého orientačního zjištění účinku chemických látek na žížaly při dermálním a potravním příjmu.

VIII.1.2 JEDNOTKY A DEFINICE

LC₅₀: Koncentrace látky, vyhodnocená jako hodnota, při které v průběhu zkoušky dojde k uhynutí 50 % pokusných zvířat.

VIII.1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Referenční látka se používá periodicky jako prostředek pro důkaz, že se citlivost zkušebního systému podstatně nezměnila.

Jako referenční látka se doporučuje chloracetamid analytické čistoty.

VIII.1.4 PRINCIP ZKOUŠKY

Půda představuje proměnlivé prostředí, takže se pro zkoušku používá pečlivě definovaná umělá hlinitá půda. V definované umělé půdě se chovají dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámku v příloze) a exponují se různým koncentracím zkoušené látky. Obsah nádob se 14 dní (a nepovinně i 7 dní) po začátku zkoušky rozprostře na podložku a spočítají se žížaly, které při jednotlivých koncentracích přežijí.

VIII.1.5 KRITÉRIA KVALITY

Zkouška je navržena tak, aby byla z hlediska zkušebního substrátu a organismů co nejreprodukovatelnější. Úhyn v kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %, jinak je zkouška neplatná.

VIII.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

VIII.1.6.1 Látky

VIII.1.6.1.1 Substrát pro zkoušku

Jako základní substrát pro zkoušku se používá definovaná umělá půda.

(a) Základní substrát (procenta se rozumí na bázi suché hmotnosti):

- 10 % sfagnové rašeliny (s pH co nejbližší 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mleté),
- 20 % kaolinitického jílu, pokud možno s více než 50 % kaolinitu,
- asi 69 % průmyslového křemenného písku (dominantní jemný písek s více než 50 % částic velikosti 0,05 až 0,2 mm). Pokud zkoušená látka není dostatečně dispergovatelná ve vodě, je třeba ponechat k dispozici pro pozdější míšení se zkoušenou látkou 10 g na každou zkušební nádobu,
- asi 1 % uhličitanu vápenatého (CaCO₃), práškového, chemicky čistého, přidaného pro úpravu pH na 6,0 ± 0,5.

(b) Substrát pro zkoušku:

Substrát pro zkoušku obsahuje základní substrát, zkoušenou látku a deionizovanou vodu.

Obsah vody činí asi 25 až 42 % sušiny základního substrátu. Obsah vody v substrátu se stanoví vysušením vzorku na konstantní hmotnost při 105 °C. Klíčovým kritériem je, že mělá půda musí být vlhčena tak, aby neobsahovala stojící vodu. Je třeba věnovat péči míšení, aby se dosáhlo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. působ uvedení zkoušené látky do substrátu je třeba uvést ve zprávě.

(c) Kontrolní substrát:

Kontrolní substrát obsahuje základní substrát a vodu. Přidává-li se aditivní činidlo, musí další kontrola obsahovat stejné množství aditivního činidla.

VIII.1.6.1.2 *Nádoby pro zkoušku*

Skleněné nádoby o obsahu asi jednoho litru (řádně přikryté plastovými víky, miskami nebo plastovou fólií s otvory pro větrání), naplněné množstvím vlhkého substrátu pro zkoušku nebo kontrolního substrátu, ekvivalentním 500 g suchého substrátu.

VIII.1.6.2 **Experimentální podmínky**

Nádoby je třeba uchovávat v klimatizovaných komorách při 20 ± 2 °C se stálým světlem. Intenzita světla by měla být 400 až 800 lux.

Doba trvání zkoušky je 14 dní, ale je možné nepovinně vyhodnotit úhyn sedm dní po začátku zkoušky.

VIII.1.6.3 **Pracovní postup**

Zkoušené koncentrace

Koncentrace zkoušené látky se vyjadřují jako hmotnost látky na hmotnost sušiny základního substrátu ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Zkouška pro zjištění rozsahu koncentrací

Aby se získaly informace o vhodném rozmezí koncentrací pro definitivní zkoušku provede se předběžná zkouška, kterou se zjistí rozsah koncentrací, které právě způsobují úhyn od 0 do 100 %.

Látku je třeba zkoušet při těchto koncentracích: 1000; 100; 10; 1; 0,1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ substrátu pro zkoušku (jako sušina).

Je-li třeba provést úplnou definitivní zkoušku, stačí pro zkoušku pro zjištění rozsahu koncentrací jedna zkušební skupina na každou koncentraci a jedna pro neexponovanou kontrolu, každá o 10 žízalách.

Definitivní zkouška

Výsledky zkoušky pro zjištění rozsahu koncentrací se použijí pro volbu nejméně pěti koncentrací, odstupňovaných v geometrické posloupnosti, právě pokrývajících rozsah 0 až 100 % mortality, lišících se o konstantní činitel nepřevyšující 1,8. Zkoušky používající tyto řady koncentrací musí umožnit co nejpřesnější stanovení hodnoty LC_{50} a jejich mezí spolehlivosti.

V definitivní zkoušce se používají nejméně čtyři zkušební skupiny na každou koncentraci a čtyři neexponované kontrolní skupiny, každá o 10 žízalách. Výsledky za tyto replikované skupiny se uvedou průměrem a standardní odchylkou.

Tam, kde úhyn 0 % a 100 % vyvolají dvě po sobě následující koncentrace, jež jsou vůči sobě v poměru 1,8, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, do které spadá LC_{50} .

Mísení základního substrátu a zkoušené látky

Substrát pro zkoušení musí být všude tam kde je to možné připraven bez jakýchkoli přídavných činidel jiných než voda. Těsně před začátkem zkoušky se smísí emulze nebo disperze zkoušené látky v deionizované vodě nebo v jiném rozpouštědle se základním substrátem pro zkoušení, nebo se na něj rovnoměrně rozstříká rozprašovačem pro chromatografii nebo podobným rozprašovačem.

Je-li zkoušená látka nerozpustná ve vodě, může se rozpustit v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu).

K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené látky lze použít pouze činidla, která snadno těkají. Substrát pro zkoušení je nutné před použitím odvětrat. Množství odpařené vody je nutné nahradit. Kontrolní zkouška musí obsahovat stejné množství všech aditivních činidel.

Není-li zkoušená látka rozpustná, dispergovatelná ani emulgovatelná v organických rozpouštědlech, připraví se směs 10 g křemenného písku a množství zkoušené látky potřebné pro přípravu 500 g zkušební substrátu a ta se smíchá se 490 g zvlhčeného základního substrátu (hmotnost se rozumí v sušině).

Pro každou jednotlivou vsázku použitou ve zkoušce se do skleněné nádoby vpraví množství vlhkého substrátu pro zkoušku, ekvivalentní 500 g sušiny, a na povrch substrátu se umístí 10 žízal, které byly před použitím kondicionovány po 24 hodiny v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaaveny přebytečné vody absorpcí filtračním papírem.

Nádoby se přikryjí plastovými víky s otvory, miskami nebo fólií, aby se zabránilo vysychání substrátu, a udržují se v podmínkách zkoušky po 14 dní.

Vyhodnocení je třeba provést 14 dní (a nepovinně i sedm dní) po zahájení zkoušky. Substrát se rozprostře na podnos ze skla nebo nerezové oceli. Žízaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žízaly se považují za mrtvé, jestliže nereagují na jemné mechanické podráždění na předním konci.

Provádí-li se vyšetření po sedmi dnech, nádoba se znovu naplní substrátem a žízaly se znovu vloží na povrch téhož substrátu.

VIII.1.6.4 **Organizmy použité ve zkoušce**

Ke zkoušce musí být použity dospělé žízaly *Eisenia foetida* (viz poznámku v příloze) (alespoň dva měsíce staré s klitellem) o hmotnosti (ve vlhkém stavu) 300 až 600 mg. (Pokud se týká metody chovu, viz příloha.)

VIII.2 **VÝSLEDKY**

VIII.2.1 **ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Uvedou se koncentrace zkoušené látky s odpovídajícím procentem mrtvých žízal. Jsou-li údaje vyhovující, stanoví se hodnota LC_{50} a meze spolehlivosti ($p = 0,05$) s použitím standardních metod (Litchfield a Wilcoxon, 1949, nebo ekvivalentní metoda). LC_{50} se udává v mg zkoušené látky na 1 kg substrátu pro zkoušku (v sušině).

V případech, kdy sklon křivky koncentrací je pro vý počet LC_{50} příliš strmý, stačí grafický odhad této hodnoty.

Tam, kde úhyn 0 % a 100 % vyvolají dvě po sobě následující koncentrace, jež jsou vůči sobě v poměru 1,8 jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci rozsahu, do kterého spadá LC_{50} .

VIII.3 **ZPRÁVA**

VIII.3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Je-li to možné, má protokol obsahovat tyto informace:

- prohlášení, že zkouška byla provedena v souladu s výše uvedenými kritérii kvality,
- o druhu provedené zkoušky (zkouška pro zjištění rozsahu koncentrací a (nebo) definitivní zkouška),

- přesný popis experimentálních podmínek nebo konstatování, že zkouška byla provedena v souladu s metodou; je nutno uvést veškeré odchylky,
- přesný popis, jak byla zkoušená látka smíšena se základním substrátem,
- informace o organismech použitých ve zkoušce (druh, stáří, střední hmotnost a rozsah jednotlivých hodnot, podmínky chovu, dodavatel),
- metoda použitá ke stanovení LC₅₀,
- výsledky zkoušky včetně všech použitých údajů,
- popis pozorovaných symptomů nebo změn v chování organismů použitých ve zkoušce,
- úhyn v kontrolních zkouškách,
- LC₅₀ nebo nejvyšší zkoušená koncentrace nevyvolávající úhyn a nejnižší zkoušená koncentrace vyvolávající 100 % úhyn 14 dní (a nepovinně sedm dní) od začátku zkoušky,
- grafické znázornění křivky koncentrace/odezva,
- výsledky získané s referenční látkou, ať v souvislosti s touto zkouškou nebo dřívějších zkoušek kontroly jakosti.

VIII.4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981. *Test Guideline 207*, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Edwards, C.A. a Lofty, J.R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and all, London.
- (3) Bouche, M.B., 1972, *Lombriciens de France, Écolo gieet Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 str.
- (4) Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., *A simplified method of evaluation dose effect experiments*. J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, str. 99
- (5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahr rensvorschlag "Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

PŘÍLOHA

Chov žížal před zkouškou

Pro účely chovu se 30 až 50 dospělých žížal umístí do chovné schránky s čerstvým substrátem a vyjmou se po 14 dnech. Tyto jedince je možné použít pro další chovné vsázky. Žížaly vylíhlé ze zátočků se použijí ke zkoušení, když jsou dospělé (v uvedených podmínkách po dvou až třech měsících).

Podmínky chovu

Klimatizovaná komora: teplota 20 ± 2 °C, nejlépe s neustálým světlem (intenzita 400 - 800 lux).

Chovné nádoby: vhodné mělké nádoby o objemu 10 až 20 l.

Substrát: *Eisenia foetida* je možné chovat v různých zvířecích exkrementech. Jako chovné médium se doporučuje používat směs 50 % obj. rašeliny a 50 % obj.hovězího

nebo koňského hnoje. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mmhos nebo 0,5 % koncentraci solí).

Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrá.

Vedle výše uvedené metody je možné používat i jiné úspěšné postupy.

Poznámka:

Eisenia foetida existuje ve dvou odrůdách, které někteří taxonomové rozlišili na druhy (Bouche, 1972). Jsou si morfologicky podobné, avšak jedna, *Eisenia foetida foetida*, má na člancích typické příčné pruhování nebo páskování a druhá, *Eisenia foetida andrei*, toto postrádá a má pestře červené zbarvení. Pokud je to možné, je třeba používat *Eisenia foetida andrei*. Jiné druhy je možné použít, pokud existuje potřebná metodika.

IX. METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – ZAHN-WELLENSOVA ZKOUŠKA – metoda C.9 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

IX.1 METODA

IX.1.1 ÚVOD

Cílem metody je stanovení úplné biologické rozložitelnosti ve vodě rozpustných netěkavých organických látek statickou zkouškou, při které jsou tyto látky vystaveny účinku vysokých koncentrací mikroorganismů.

Při interpretaci výsledků musí být zohledněna fyzikálně-chemická adsorbce na suspendované pevné částice.

Zkoušené látky jsou zředěvány v koncentracích odpovídajících hodnotám DOC nebo TOC od 50 do 400 mg.l⁻¹ nebo hodnotám CHSK 100 - 1000 mg.l⁻¹. Tyto poměrně vysoké koncentrace umožňují dostatečně spolehlivou analýzu.

Sloučeniny s toxickými vlastnostmi mohou však proces rozkladu zpomalit.

Mírou biologické rozložitelnosti zkoušené látky v této metodě je úbytek rozpuštěného organického uhlíku nebo chemická spotřeba kyslíku. Specifickými analytickými metodami může být stanovena i primární biologická rozložitelnost látek.

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které při koncentracích použitých ve zkoušce:

- jsou za podmínek zkoušky rozpustné ve vodě,
- mají za podmínek zkoušky nevýznamnou tenzi par,
- neinhibují bakterie,
- jsou ve zkušebním systému jen omezeně adsorbovány,
- pěněním nesnižují svou koncentraci ve zkoušeném roztoku.

Pokud jsou stanoveny nízké nebo marginální hodnoty biologické rozložitelnosti, je nutné pro interpretaci výsledků znát obsah nejdůležitějších komponent zkoušené látky.

Pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky jsou důležité rovněž informace o toxicitě zkoušené látky.

IX.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Procentuální hodnota biologického rozkladu v čase se vypočítá podle vztahu:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \cdot 100$$

kde:

D_T = rozklad (%) v čase T,

C_a = hodnoty DOC (nebo CHSK) zkoušené látky 3 h od zahájení zkoušky (mg.l^{-1}),

C_T = hodnoty DOC (nebo CHSK) zkoušené látky v době odběru vzorku (mg.l^{-1}),

C_B = hodnoty DOC (nebo CHSK) kontroly v době odběru vzorku (mg.l^{-1}),

C_{BA} = hodnoty DOC (nebo CHSK) kontroly 3 h od zahájení zkoušky (mg.l^{-1}).

Stupeň rozložitelnosti se zaokrouhuje na celá procenta.

Jako procentuální rozložitelnost je udáván procentuální úbytek hodnot DOC (nebo CHSK) zkoušené látky.

Rozdíl mezi hodnotami naměřenými po 3 h po zahájení zkoušky a mezi vypočítanými a zejména však naměřenými počátečními hodnotami, poskytuje užitečnou informaci o rozložitelnosti zkoušené látky (viz 3.2).

IX.1.3 **STANDARDNÍ LÁTKY**

Při posuzování rozložitelnosti nových látek mohou být v jednotlivých případech využity referenční materiály, v této metodice však nejsou doporučeny žádné.

IX.1.4 **PRINCIP METODY**

Aktivovaný kal, minerální živné médium a zkoušená látka ve vodném roztoku jako zdroj uhlíku se smíchají v 1 - 4 l skleněné nádobě s míchadlem a aeračním zařízením. Suspenze je míchána a aerována až 28 dní při teplotě 20-25 ° C v difuzním světle nebo temnu. Rozklad je sledován denně nebo v jinak vhodně stanovených časových intervalech prostřednictvím měření hodnot DOC (nebo CHSK) v odebraném vzorku po jeho přefiltrování. Procentuální hodnota biologického rozkladu v čase je definována jako poměr mezi hodnotami DOC (nebo CHSK) v době odběru vzorku a po 3 h od zahájení zkoušky. Výsledek je vyjádřen graficky jako funkce času.

V případě, že se analyticky stanovují změny koncentrací původní molekuly látky, jsou tyto změny měřítkem primární biologické rozložitelnosti.

IX.1.5 **KRITÉRIA KVALITY**

Dostatečná reprodukovatelnost byla ověřena mezilaboratorními zkouškami.

Citlivost metody je značně závislá na variabilitě kontrolního vzorku, na poměrně malé přesnosti stanovení množství organického uhlíku a na koncentraci zkoušené látky v suspenzi.

IX.1.6 **POSTUP ZKOUŠENÍ**

IX.1.6.1 **Příprava**

IX.1.6.1.1 *Reagencie*

Voda: Pitná voda s obsahem organického uhlíku menším než 5 mg.l^{-1} . Koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů nesmí překročit $2,7 \text{ mmol.l}^{-1}$, jinak je nutné jako rozpouštědlo použít deionizovanou nebo destilovanou vodu.

Kyselina sírová p. a. 50 g.l^{-1}

Hydroxid sodný p.a. 40 g.l^{-1}

Minerální živné médium: v jednom litru deionizované vody se rozpustí:

Chlorid amonný NH_4Cl p.a. 38,5 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. 33,4 g

KH_2PO_4 p.a. 8,5 g

K_2HPO_4 p.a. 21,75 g

Tento roztok slouží zároveň jako tlumič pH.

IX.1.6.1.2 *Přístroje*

Skleněné nádoby o objemu 1 - 4 l.

Skleněné nebo kovové míchadlo, které by mělo být umístěno 5 - 10 cm nad dnem nádoby. Použito může být rovněž magnetické míchadlo se 7 - 10 cm dlouhým ramenem.

Skleněná aerační trubice o vnitřním průměru 2 - 4 mm. Vyústění trubice by mělo být umístěno cca 1 - 10 cm nad dnem nádoby.

Odstředivka (cca 3 550 g).

pH-metr.

Oximetr.

Papírový filtr.

Membránový filtrační přístroj.

Membránový filtr o velikosti porů 0,45 μm , který během filtrace neuvolňuje a neabsorbuje uhlík.

Analyzátor ke stanovení obsahu organického uhlíku a vybavení ke stanovení CHSK.

IX.1.6.1.3 *Příprava inokula*

Aktivovaný kal z biologické čistírny se promývá opakovaně vodou předepsané kvality a buď se opakovaně centrifuguje nebo sedimentuje.

Aktivovaný kal musí mít vhodné složení, tzn., že musí obsahovat co nejvíce druhů bakteriálních kultur. Inokulum může být namícháno z různých zdrojů (např. z čistírny, z půdního extraktu, z říční vody, atd.).

Stanovení aktivity aktivovaného kalu je popsáno v kap. 1. 6. 2 nazvané Funkční kontrola.

IX.1.6.1.4 *Příprava pracovních roztoků zkoušené látky*

Do zkušební nádoby odměříme 500 ml vody, 2,5 ml.l^{-1} minerálního živného roztoku a přidáme aktivovaný kal v množství 0,2 až 1,0 g.l^{-1} sušiny v konečné směsi a odpipetujeme takový objem základního roztoku zkoušené látky, aby bylo dosaženo koncentrace rozpuštěného organického uhlíku od 50 do 400 mg.l^{-1} suspenze. Odpovídající hodnoty CHSK jsou 100 až 1000 mg.l^{-1} . Doplníme vodou na celkový objem 1 - 4 l. Zvolený objem je závislý na počtu odebíraných vzorků nutných ke stanovení hodnot DOC nebo CHSK a na tom, kolik odběrů bude vyžadovat zvolený analytický postup.

Zpravidla postačuje objem 2 l. Současně je s každou zkušební sérií nasazena alespoň jedna kontrola, do které je odměřen aktivovaný kal a minerální živné médium doplněné na stejný objem jako má zkoušená směs.

IX.1.6.2 **Pracovní postup**

Kultivační nádoby se inkubují při difusním světle nebo v tmavé komoře při teplotě 20 - 25 $^{\circ}\text{C}$, za stálého míchání pomocí magnetického míchadla nebo šroubovitého míchadla. Nádoba se provzdušňuje tlakovým vzduchem, který je čištěn, pokud je to potřebné, vatovým filtrem nebo přes promývačku. Musí být zajištěno, aby nedošlo k usazování kalu a koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 2 mg.l^{-1} .

V pravidelných časových intervalech se měří pH (např. denně) a pokud je to potřebné upravuje se na hodnotu pH 7 - 8.

Ztráty vypařováním se vyrovnávají destilovanou nebo deionizovanou vodou vždy před odebráním vzorku. Je účelné označit hladinu kapaliny před začátkem zkoušky a znovu zaznamenat výšku hladiny po odebrání vzorku při vypnutí aeraci a míchání. První vzorky se odebírají 3 h po zahájení zkoušky, aby aktivovaný kal dostatečně adsorboval zkoušenou látku.

Rozklad zkoušené látky se sleduje stanovením hodnoty DOC a CHSK

v pravidelných časových intervalech. Vzorky z nádoby se zkoušenou látkou a z kontroly se před analýzou filtrují na promytém papírovém filtru. Prvních 5 ml filtrátu se vylévá. Kaly, které se špatně filtrují mohou být odděleny 10 min odstředěním. Stanovení DOC a CHSK se provede nejméně dvakrát. Všechny baňky se nechají inkubovat 28 dní.

Poznámka: Vzorky, které jsou po uvedeném postupu ještě zakalené, se filtrují na membránovém filtru, který nesmí uvolňovat nebo adsorbovat organické látky.

Funkční kontrola aktivovaného kalu

Paralelně se ke každé sérii pokusů nasazuje referenční nádoba s kalem, médiem, vodou a referenční látkou, která slouží ke kontrole citlivosti aktivovaného kalu. Doporučován je diethylenglykol.

Adaptace

V relativně krátkých časových intervalech (např. denně) jsou prováděny analýzy a naměřené hodnoty jsou vynášeny do grafu. Na inhibiční křivce lze zpočátku rozlišit tzv. adaptační fázi (viz obr. 2), proto by zkouška neměla být nasazována ke konci týdne. Jestliže na konci normální délky zkoušky dochází znovu k adaptaci, může být zkouška prodloužen až do konečného rozložení zkoušené látky.

Upozornění: Pokud chcete důkladně poznat chování aktivovaného kalu, upravte ho následujícím postupem:

Míchadlo a aerační zařízení se vypne, aby se mohl aktivovaný kal usadit. Kapalná fáze se vypustí, dekantovaný kal v nádobě se doplní vodou na objem 2 l, 15 min se míchá a znovu se nechá sedimentovat. Kapalná fáze se znovu vypustí a zkouška se opakuje se sedimentovaným kalem a stejnou zkoušenou látkou podle kap. 1. 6. 1. 4 a 1. 6. 2. Aktivovaný kal může být upraven také centrifugací.

Adaptovaný kal může být smíchán s čerstvým aktivovaným kalem tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,2 - 1 g sušiny na litr suspenze.

Příprava pro analýzu

Vzorky se filtrují přes promyté papírové filtry (k promývání se používá deionizovaná voda).

Zakalené vzorky se filtrují přes membránové filtry (0,45 µm).

Ve filtrátech vzorku (prvních 5 ml filtrátu se nepoužívá) se přístrojem na měření TOC stanoví dvakrát koncentrace rozpuštěného uhlíku DOC. Jestliže nemůže být filtrát analyzován v den odběru vzorku, musí být do příštího dne uchován v ledničce. Delší skladování se však nedoporučuje.

CHSK se ve filtrátu vzorku stanoví standardním postupem podle této vyhlášky.

IX.2

VYHODNOCENÍ ZKOUŠKY

Koncentrace DOC a nebo CHSK se ve vzorcích stanoví dle kap. 1. 6. 2 nejméně dvakrát. Biologická rozložitelnost v čase t se vypočítá podle vzorce 1. 2 a její hodnota se zaokrouhluje na celá procenta. Takt stanovená rozložitelnost se označuje jako „Biologická rozložitelnost stanovená Zahn-Wellensovou zkouškou“.

Poznámka: Jestliže je dosaženo úplného rozložení zkoušené látky před řádným proběhnutím zkoušky a výsledek je potvrzen další analýzou provedenou následující den, může být zkouška ukončena.

IX.3

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

IX.3.1

PROTOKOL O ZKOUŠCE

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny následující údaje:

- počáteční koncentrace látky,
- všechny informace a experimentální výsledky (název zkoušené látky, referenční látka, kontrolní vzorek),

- koncentrace látky po 3 h,
- inhibiční křivka s popisem,
- datum a zdroj odběru kalu, stav adaptace, použitá koncentrace atd.,
- vědecké odůvodnění případných změn v provedení zkoušky.

IX.3.2 **INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Postupné ubývání DOC nebo CHSK během dnů až týdnů naznačuje, že zkoušená látka je biologicky rozkládána.

V mnoha případech může ovlivňovat výsledky zkoušky fyzikálně-chemická adsorbce. To lze prokázat tím, že se zjistí úplné nebo částečné odstranění DOC nebo CHSK během prvních tří hodin zkoušky a rozdíl mezi supernatantem z kontroly a ze zkoušeného vzorku je nečekaně malý.

Má-li se rozlišit úplná nebo částečná biologická rozložitelnost od adsorbce, musí se provést další zkoušky.

Ty mohou být provedeny více postupy, nejsprávnější je ale použít supernatant nebo inokulum v některé zkoušce snadné biologické rozložitelnosti (nejlépe v respirometrické zkoušce).

Zkoušené látky, které vykazují velký úbytek DOC nebo CHSK a nejsou ovlivněny adsorbci lze pokládat za biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorbční úbytek znamená, že látka je přinejmenším alespoň částečně biologicky rozložitelná.

Jestliže je úbytek DOC nebo CHSK minimální nebo žádný, mohla nastat inhibice mikroorganismů působením zkoušené látky. Tato inhibice se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem zkoušené suspenze. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím látek značených ^{14}C . Jestliže je použita zkoušená látka s ^{14}C , je možné stanovením $^{14}\text{CO}_2$ prokázat, že nastal rozklad zkoušené látky.

Pokud je udáván výsledek jako primární biologická rozložitelnost, měly by být uvedeny, pokud je to možné, změny v chemické struktuře, které způsobily snížení obsahu výchozí, rodičovské, zkoušené látky.

Musí se také dokladovat ověření analytické metody a výsledky stanovení v živném médiu bez přídavku zkoušené látky.

IX.4 **LITERATURA**

- (1) OECD Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Beschluss des Rates C (81) 330 Final
- (2) Anhang V C.9 Abbaubarkeit. Chemischer Sauerstoffbedarf, Richtlinie der Kommission 84/449/EWG (Amtsblatt den Europäischen Gemeinschaften Nr. L 251 vom 19. September 1984).

PŘÍLOHA

PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

Organická látka:	4 - ethoxybenzoová kyselina
Teoretická koncentrace ve zkoušce:	600 mg.l ⁻¹
Teoretická DOC :	390 mg.l ⁻¹
Inokulum:	městská čistírna v
Koncentrace:	1 g sušiny . l ⁻¹
Adaptace:	bez adaptace
Analytika:	stanovení DOC

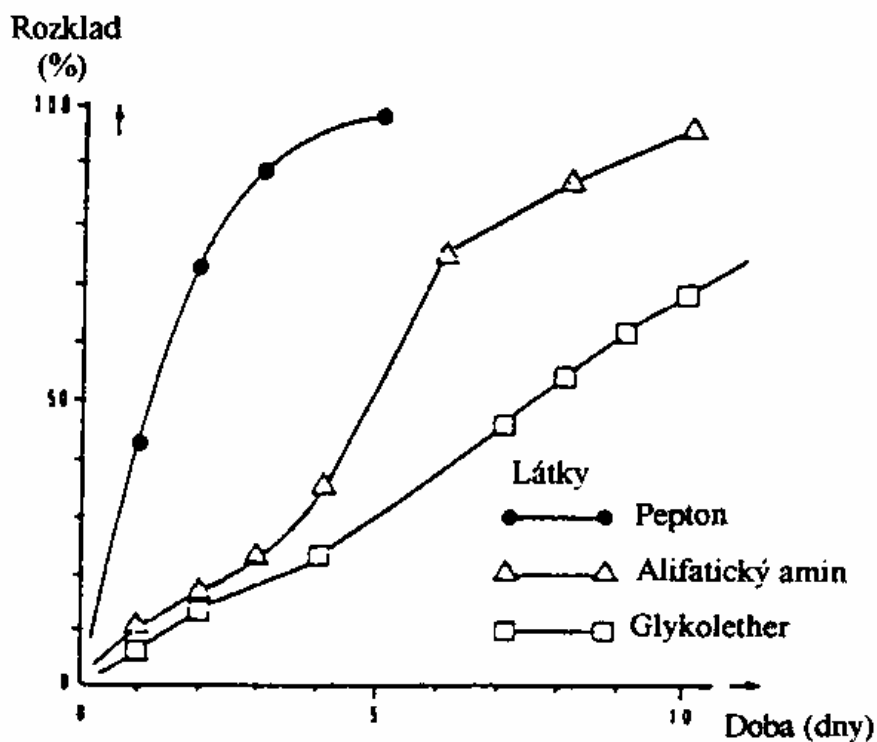
Množství vzorku: 3 ml
Referenční látka: diethylenglykol
Toxicita zkoušené látky: žádné toxické účinky při koncentraci menší než 1000 mg.l⁻¹
Použitá zkouška: zkouška ve fermentačních trubicích

Doba zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	sl. p. mg.l ⁻¹	DOC mg.l ⁻¹	DOCn mg.l ⁻¹	Rozklad %	DOC mg.l ⁻¹	DOCn mg.l ⁻¹	Rozklad %
0	-	-	300	-	-	390	-
3 h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 den	6,1	288,3	282,3	6	373,3	367,2	6
2 dny	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dnů	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dnů	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dnů	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dnů	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dnů	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dnů	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

Poznámka: DOC stanovena v triplicátech.
sl. p. = slepý pokus

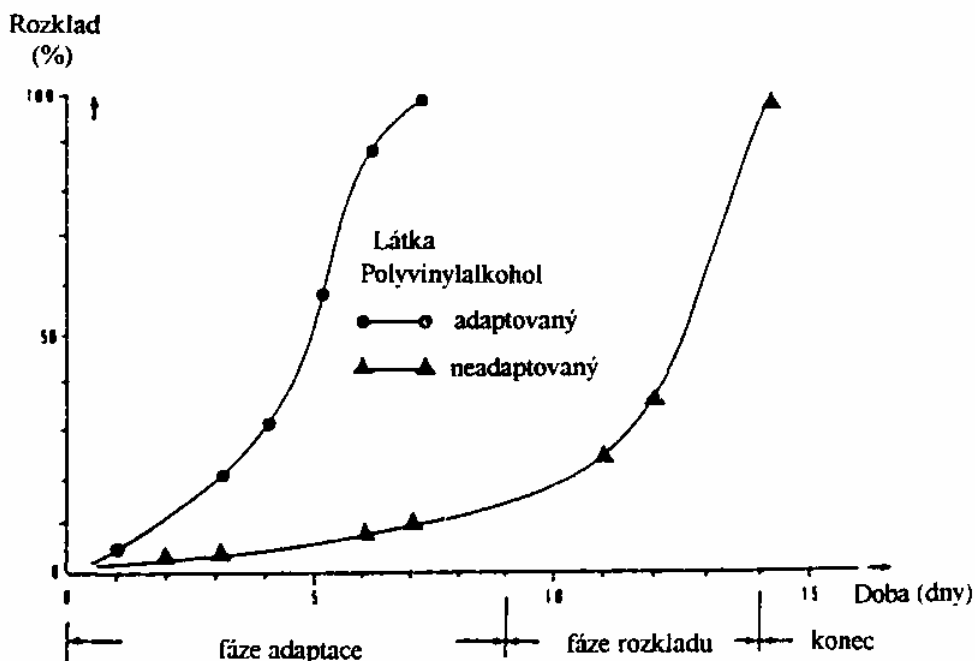
Obrázek 1

Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2

Příklad adaptace kalu



X. METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA S AKTIVOVANÝM KALEM – metoda C.10 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

X.1 METODA

X.1.1 ÚVOD

X.1.1.1 Obecné poznámky

Metoda je vhodná pouze pro ty organické látky, které v používaných koncentracích:

- jsou natolik rozpustné ve vodě, aby bylo možné připravit zásobní roztok,
- mají za podmínek zkoušky zanedbatelnou tenzi par,
- neinhibují bakterie.

Je užitečné mít informace o relativním podílu nejdůležitějších komponent obsažených ve zkoušeném materiálu, zvláště tehdy, když biologická rozložitelnost dosahuje nízkých nebo marginálních hodnot. Při interpretaci nízkých hodnot biologické rozložitelnosti a volbě vhodné zkušební koncentrace je potřebné znát údaje o toxicitě látky vůči mikroorganismům.

X.1.1.2 Stanovení úplné biologické rozložitelnosti (analýza DOC/CHSK)

Cílem metody je stanovení úplné biologické rozložitelnosti organické látky na základě měření úbytku zkoušené látky a vzniklých metabolitů v koncentracích DOC více než 12 mg.l^{-1} (nebo CHSK cca 40 mg.l^{-1}) ve zkušebním zařízení s náplní aktivovaného kalu. Prokázalo se, že optimální je koncentrace DOC 20 mg /l .

Je nutné znát obsah organického uhlíku nebo CHSK zkoušené látky.

X.1.1.3 **Stanovení primární biologické rozložitelnosti (specifická analýza)**

Cílem metody je stanovení primární biologické rozložitelnosti zkoušené látky při koncentraci cca 20 mg/l v modelovém zařízení s aktivovaným kalem (pokud to umožňuje analytická metoda nebo toxicita zkoušené látky, může být použita koncentrace zkoušené látky vyšší nebo nižší). To dovolí odhadnout primární biologickou rozložitelnost zkoušené látky (vymizení původní „rodičovské“ chemické struktury).

Cílem metody není stanovení stupně mineralizace zkoušené látky.

Ke kvantitativní analýze musí být k dispozici vhodná metoda.

X.1.2 **DEFINICE A JEDNOTKY**

X.1.2.1 **Analýza DOC/CHSK**

Úbytek látky je vyjádřen vztahem:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \cdot 100\% \quad (1a)$$

DR = DOC nebo CHSK úbytek v % vztažený na zkoušenou látku při dané střední době prodlení,

T = koncentrace zkoušené látky na přítoku do zkušební jednotky v mg.l⁻¹ DOC nebo CHSK,

E = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku ze zkušební jednotky v mg.l⁻¹,

E_o = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku z kontrolní jednotky v mg.l⁻¹.

Rozklad je definován jako procentuální úbytek DOC nebo CHSK při udané době zdržení, vztažený na zkoušenou látku.

X.1.2.2 **Specifická analýza**

Procentuální odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_w) během udaného času prodlení:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \cdot 100\% \quad (1b)$$

C₁ = koncentrace zkoušené látky v přítoku do zkušebního zařízení (v mg.l⁻¹) stanovená specifickou analýzou,

C₀ = koncentrace zkoušené látky na odtoku ze zkušebního zařízení (v mg.l⁻¹) stanovená specifickou analýzou.

X.1.3 **REFERENČNÍ LÁTKY**

Při zkoušení nových látek je někdy vhodné použít referenční látku. Specifické referenční látky doposud nejsou doporučeny.

X.1.4 **PRINCIP ZKUŠEBNÍCH METOD**

Ke stanovení úplné biologické rozložitelnosti se používají dvě paralelně pracující modelová zařízení s aktivovaným kalem (potvrzující zkouška OECD nebo zařízení s porézni nádobkou). Zkoušená látka se přidává na přítoku do jedné z jednotek (se syntetickou nebo s komunální odpadní vodou), zatímco ve druhé je obsažena pouze odpadní voda. Ke stanovení primární biologické rozložitelnosti pomocí specifické analýzy zkoušené látky na přítoku a odtoku je zapotřebí jedna jednotka.

Na odtoku se měří koncentrace DOC nebo CHSK nebo se stanoví koncentrace zkoušené látky specifickou analýzou.

DOC zkoušené látky se nestanovuje, pouze se konstatuje.

Při měření DOC nebo CHSK se vychází z toho, že rozdíl mezi průměrnými koncentracemi na odtoku ze zkušební a z kontrolní jednotky je způsoben nerozloženou částí zkoušených látek.

Jestliže jsou prováděny specifické analýzy, lze stanovovat změny koncentrace původní chemické látky (primární biologická rozložitelnost).

Obě zařízení mohou být provozována jako „spřažená“ pomocí postupu vzájemné inokulace.

X.1.5 **KRITÉRIA KVALITY**

Koncentrace zkoušené látky se volí s ohledem na druh analytické metody a její mez stanovitelnosti.

X.1.6 **POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**

X.1.6.1 **Příprava**

X.1.6.1.1 *Přístroje*

Pokud se neprovádí specifická analýza, používají se dvě modelové zkušební jednotky stejného typu. Mohou být používány dva typy zařízení:

P o t v r z u j í c í z k o u š k a O E C D

Zařízení se skládá ze zásobní nádoby (A) na syntetickou odpadní vodu, dávkovacího čerpadla (B), aerační nádoby (C), sedimentační nádoby (D), mamutky (E) k recirkulaci aktivovaného kalu a sběrné nádoby vyčištěné vody (F). Nádoby (A a F) musí být ze skla nebo z vhodné umělé hmoty objemu nejméně 24 l. Čerpadlo (B) musí zajišťovat konstantní přítok syntetických splašků do aerační nádoby. Použit může být jakýkoliv vhodný systém zajišťující stanovený přítok a koncentraci. Za normálních podmínek je výška separátoru (D) nastavena tak, aby objem kultivační suspenze v aerační nádobě byl 3 l. V dolní části konické části aerační nádoby je ponořena porézní aerační krychlička. Množství dodávaného vzduchu může být kontrolováno průtokoměrem. Mamutka (E) je osazena tak, aby byl aktivovaný kal ze separátoru do aktivační nádoby dopravován rovnoměrně.

Z a ř í z e n í s p o r é z n í n á d o b k o u

Porézní nádobka je vyrobena z porézní polyethylenové fólie (tloušťka 2 mm, maximální velikost pórů 95 mikronů) stočené do válce o průměru 14 cm s konickým dnem 45 °, obrázky 1 a 2 v příloze 2. Porézní nádobka je umístěna v nepropustné nádobě o průměru 15 cm zhotovené z vhodné umělé hmoty, která má nad konickou částí odtok ve výšce 17,2 cm, čímž je

v zařízení vymezen objem 3 l. Na horním konci vnitřní nádoby je upevněn kruhový držák tak, že mezi vnější a vnitřní nádobou je 0,5 cm odtoková mezera.

Celé zařízení je umístěno do vodní lázně regulované termostatem. Vzduch je přiváděn na dno vnitřní nádoby pomocí vhodného rozvaděče.

Nádoby (A) a (E) musí být vyrobeny ze skla nebo vhodné umělé hmoty a mají mít objem nejméně 24 l. Čerpadlo (B) umožňuje konstantní přítok odpadních vod do aerační nádoby. Může být použit jakýkoliv vhodný systém za předpokladu, že zaručuje stanovený přítok a koncentraci.

K dispozici musí být zásoba dalších porézních nádobek jako náhrada za zanesené; zanesené nádobky se čistí namočením na 24 hodin do roztoku chlornanu sodného a promytím pitnou vodou.

X.1.6.1.2 *Filtrace*

Používají se membránové filtrační přístroje a membránové filtry (velikost pórů 0,45 μm). Membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík ani nesmí adsorbovat zkoušenou látku při filtraci.

X.1.6.1.3 *Odpadní voda*

Může být použito buď vhodné syntetické médium nebo komunální odpadní voda.

Příklad syntetického média:

V 1 l pitné vody se rozpustí:

pepton 160 mg,

masový extrakt	110 mg,
močovina	30 mg,
NaCl	7 mg,
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	4 mg,
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2 mg,
K ₂ HPO ₄	28 mg.

Komunální odpadní vody:

Odebírají se čerstvé každý den z přepadu mechanického stupně čistírny, která čistí převážně městské odpadní vody.

X.1.6.1.4 *Zásobní roztok zkoušené látky*

Připraví se např. 1% roztok zkoušené látky, který se bude přidávat do zkušební jednotky. Stanoví se koncentrace zkoušené látky a určí se příslušný objem zásobního roztoku, který je potřebné přidat k odpadní vodě nebo dalším čerpadlem přímo do zkušební jednotky, aby byla dosažena požadovaná zkušební koncentrace.

X.1.6.1.5 *Inokulum*

Poznámka: Je-li používána komunální odpadní voda není vhodné používání inokula s malou koncentrací bakterií, ale má se používat aktivovaný kal.

Mohou se používat inokula z různých zdrojů.

Příklady vhodného inokula:

a) Inokulum z odtoku biologické čistírny odpadních vod

Inokulum může být získáno z odtoku dobře fungující čistírny zpracovávající převážně komunální odpadní vody. Vzorek odtoku musí být v době mezi odběrem a použitím uchován v aerobních podmínkách. Inokulum se připraví filtrací vzorku vody přes hrubý filtr, prvních 200 ml filtrátu se vylije. Až do okamžiku použití se filtrát uchovává v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito ve stejný den kdy bylo připraveno. K inokulaci se užívá nejméně 3 ml.

b) Směsné inokulum

Inokulum odebrané z odtoku čistírny:

Viz předchozí popis.

Inokulum z půdy:

100 g zahradní zeminy (úrodná, nesterilní zemina) se suspenduje v 1 l nechlórované pitné vody (nevhodné jsou zeminy s vysokým obsahem jílu, písku a humusu). Po zamíchání se nechá suspenze 30 minu dekantovat. Kapalná fáze se přefiltruje, prvních 200 ml se vylije. Filtrát se ihned provzdušňuje až do okamžiku použití. Inokulum je možné použít pouze ten den, kdy bylo připraveno.

Inokulum z povrchové vody:

Další díl směsného inokula se získává z mesosaprobniých povrchovým vod. Odebraný vzorek se filtruje, prvních 200 ml se vylije. Až do okamžiku použití se filtrát udržuje v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito pouze ten den, kdy bylo připraveno.

Směsné inokulum se získá smísením a dobrým promícháním stejných objemových dílů všech tří dílčích inokulí. K očkování se používají nejméně 3 ml směsného roztoku.

c) Inokulum z aktivovaného kalu

Používá se aktivovaný kal (s obsahem suspendovaných pevných částic do 2,5 g/l) odebraný z aerační nádrže čistírny komunálních odpadních vod.

X.1.6.2 **Postup**

Zkouška se provádí při laboratorní teplotě, která se má udržovat mezi 18 - 25 °C. Zkouška může být event. prováděna při nižších teplotách (do 10 °C). Pokud se zkoušená látka za těchto podmínek rozkládá, nejsou zapotřebí žádná další měření. Jestliže však při nižší teplotě rozkládána není, musí být zkouška opakována při teplotě 18 - 25 °C.

X.1.6.2.1 *Fáze zpracování: tvorba kalu/stabilizace kalu*

Fází růstu/stabilizace kalu je období, během kterého dochází za provozních podmínek k ustálení koncentrace aktivovaného kalu a funkce zkušební jednotky. Rozběhová fáze začíná první vsádkou zkoušené látky a končí dobou, kdy naměřený úbytek zkoušené látky dosáhne relativně konstantní hodnoty. Tato fáze by neměl trvat déle než 6 týdnů.

Hodnotící fáze je doba trvající 3 týdny od okamžiku kdy úbytek zkoušené látky dosáhl relativně konstantní, zpravidla vysoké, hodnoty. Pro látky, které se během šest týdnů trvající rozběhové fáze nerozkládají nebo jejich úbytek dosahuje nízkých hodnot se za vyhodnocovací fázi považuje období dalších tří následujících týdnů.

Na začátku zkoušky se zkušební jednotka(y) naplní zkušební kapalinou s inokulem.

Zapne se provzdušňování a mamutka (při použití zkušebního zařízení podle OECD) a zapne se dávkovací zařízení.

Přítok odpadních vod bez zkoušené látky do aerační nádoby se udržuje na rychlosti 1 l.h⁻¹ nebo 1/2 l.h⁻¹; doba zdržení tak dosáhne 3 h nebo 6 h.

Intenzita provzdušňování musí být regulována tak, aby se udržoval obsah aerační nádoby ve vzhledu a obsah rozpuštěného kyslíku neklesl pod hodnotu 2 mg.l⁻¹.

Pěnění směsi se zabraňuje vhodnými prostředky, které neinhibují kal.

Kal, který se shromažďuje v horní části aerační nádoby a u průkazné zkoušky OECD na dně sedimentační nádoby a v cirkulačním okruhu musí být alespoň jednou za den vrácen do matečné suspenze setřením nebo jiným vhodným způsobem.

Jestliže kal špatně sedimentuje lze zvýšit jeho hustotu přidávkou 2 ml 5% roztoku chloridu železitého. Přídavek je možné opakovat podle potřeby.

Odtok ze sedimentační nádrže se shromažďuje v nádobách E nebo F po dobu 20 - 24 hod. Před odebráním vzorku se směs důkladně promíchá. Nádoby E a F se musí pečlivě čistit.

Pro potřeby sledování účinnosti procesu a pro potřeby jeho řízení se stanoví nejméně dvakrát týdně CHSK nebo DOC zfiltrovaného průměrného vzorku výtoku ze zařízení a filtrované směsi dávkované do zařízení. K filtraci se používá membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Prvních 20 ml filtrátu se vylíje. Pokud se rozkladné procesy ustálí, vyrovnají se i poklesy CHSK nebo DOC.

Sušina kalu v aerační nádobě se stanovuje dvakrát týdně (g.l⁻¹).

Zařízení mohou být provozována dvěma způsoby: pokud je sušina kalu vyšší než 2,5 g.l⁻¹ přebytečný kal se vypustí nebo se denně odebere z každé nádoby 500 ml suspenze, takže střední doba zdržení kalu v zařízení je 6 dní.

Jestliže jsou naměřené a hodnocené parametry (účinnost metody stanovená na základě úbytku CHSK nebo DOC, koncentrace kalu, schopnost sedimentace kalu, zákal kapalně fáze v sedimentační nádobě atd.) dvou jednotek dostatečně stabilní, může být zahájeno přidávání zkoušené látky dle kap. 1. 6. 2. 2 do nátku do jedné z jednotek.

Alternativně může být zkoušená látka přidávána na začátku fáze růstu kalu (1. 6. 2. 1), zvláště tehdy, když je jako inokulum používán aktivovaný kal.

X.1.6.2.2 *Pracovní postup*

Za dodržování podmínek pro rozběhovou fázi se do přítoku do zkušebního zařízení přidává zásobní roztok zkoušené látky (cca 1 %), aby obsah DOC v suspenzi byl v rozmezí 10 - 20 mg.l⁻¹ nebo CHSK 40 mg.l⁻¹.

Zásobní roztok se buď denně přimíchává do odpadní vody nebo se přivádí pomocí čerpadla přímo do suspenze. Koncentrace se postupně zvyšuje až na požadovanou hodnotu. Vyzkoušeny mohou být i vyšší koncentrace než udává předchozí odstavec, pokud nemá zkoušená látka na aktivovaný kal toxické účinky.

Do kontrolní jednotky se dává pouze odpadní voda bez zkoušené látky. Z odtoku se odebírají vzorky pro analýzu a filtrují se na membránovém filtru s velikostí pórů 0,45 μm. Prvních 20 ml filtrátu se vylévá.

Filtráty vzorků musí být analyzovány v den odběru nebo musí být konzervovány (např. přidávkem 0,05 ml 1% chloridu rtuťnatého na 10 ml filtrátu, uložením na 24 h při teplotě 2 - 4 °C nebo při -18 °C na delší dobu).

Doba trvání rozběhové fáze od okamžiku přidavku zkoušené látky by neměla překročit 6 týdnů. Vyhodnocovací fáze by neměla být kratší než 3 týdny, aby bylo možné provést 14 - 20 stanovení nutných k vyhodnocení zkoušky.

Spřažená zařízení

Zařízení jsou spřažena tak, že je mezi nimi 1x denně vyměňováno 1,5 l suspenze (včetně kalu) z aeračních nádob. Dochází-li k silné adsorbci zkoušené látky, odebere se 1,5 l kapalné fáze ze sedimentační nádoby a přidává se do aerační nádoby druhého zařízení.

X.1.6.2.3 *Analytika*

Ke sledování chování zkoušené látky se používají dvě metody stanovení: DOC a CHSK.

Hodnoty DOC se stanoví dvakrát pomocí analyzátoru uhlíku a CHSK se stanoví podle literatury (2).

Specifická analýza

Koncentrace zkoušené látky se stanoví vhodnou analytickou metodou. Je-li to možné, stanoví se zvlášť množství látky adsorbované na aktivovaný kal.

X.2

DATA A VYHODNOCENÍ

X.2.1

SPŘAŽENÁ ZAŘÍZENÍ

Pokud je používáno spřažené zařízení, počítá se denně stupeň odstranění, DR, postupem podle 1. 2. 1.

Tyto denní hodnoty se opraví na hodnotu DR_c, zohledněním přenosu materiálu při očkování. Tento výpočet se provádí dle rovnice (2) pro střední dobu prodlení 3 hodiny a podle rovnice (3) pro střední dobu prodlení 6 hodin.

$$DR_c = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad (2)$$

$$DR_c = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad (3)$$

Ze získaných hodnot se vypočítá jejich průměr a dále standardní odchylka podle rovnice (4)

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad (4)$$

kde:

s_{DRc} = standardní odchylka,

\overline{DRc} = průměr hodnot DR_c,

n = počet stanovení.

Odlehlé hodnoty DR_c se eliminují vhodnou statistickou metodou, např. Nalimovou metodou (6) pro 95% hladinu významnosti, průměr a standardní odchylka se potom vypočtou s vyloučením odlehlých hodnot DR_c :

Výsledek se vyjádří dle (5) :

$$DR_c = \overline{DR_c} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR_c} \quad (5)$$

kde

$t_{n-1; \alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot e a E_o a statistickou mez spolehlivosti P ($P=1-\alpha$), kde P = 95% (1).

Výsledkem je průměr s udanými mezemi tolerance pro 95% hladinou významnosti případně s udanou standardní odchylkou, počtem dat hodnot DR_c bez odlehlých hodnot a počtem odlehlých hodnot.

Např.

$DR_c = 98,6 \pm 2,3\%$ úbytku DOC,

s = 4,65% úbytku DOC,

n = 18,

x = počet odlehlých hodnot.

X.2.2 **NESPŘÁZENÁ ZARÍZENÍ**

Provozní výkon zařízení může být ověřen následovně:

% odstranění CHSK nebo DOC =

$$= \frac{CHSK \text{ nebo } DOC \text{ odp. vody} - CHSK \text{ nebo } DOC \text{ výtoku}}{CHSK \text{ nebo } DOC \text{ odp. vody}} \cdot 100$$

Vynášením denně naměřených úbytků do grafu se zdůrazní všechny trendy, např. adaptace.

X.2.2.1 **Využití stanovení CHSK/DOC**

Z denně naměřených hodnot se podle kap. 1.2.1 vypočítá procentuální úbytek DR. Z řady hodnot DR se spočítá jejich průměr a podle rovnice (6) standardní odchylka:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad (6)$$

kde

s_{DR} = standardní odchylka hodnot DR_i ,

\overline{DR} = průměr hodnot DR_i ,

n = počet stanovení.

Odlehlé hodnoty DR se eliminují vhodnou statistickou metodou např. podle Nalimova (6) při 95% hladině významnosti, střední hodnota a standardní odchylka jsou potom znovu vypočítány s vyloučením odlehlých hodnot DR.

Výsledná hodnota se počítá dle rovnice (7)

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} \cdot s_{DR} \quad (7)$$

kde

$t_{n-1; \alpha}$ - tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot e a E_o a statistickou n mez spolehlivosti P ($P=1-\alpha$), kde P = 95 % (1).

Výsledkem je průměr s mezemi tolerance při 95% hladině významnosti s udanou standardní odchylkou, počtem dat hodnot DR bez odlehlých hodnot a počtem odlehlých hodnot.

Např.:

Dr = (98,6 ± 2,3%) úbytku DOC,

s = 4,65% úbytku DOC,

n = 18,

x = počet odlehlých hodnot.

X.2.2.2 **Použití výsledků specifické analýzy**

Odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_w) v % se počítá podle 1. 2. 2.

X.3 **ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

X.3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny pokud je to možné následující údaje:

- provozní podmínky, které jsou zaznamenány do formuláře uvedeného v příloze č. 3 této metody;
- druh použitého zkušebního zařízení (zařízení pro průkaznou zkoušku OECD nebo zařízení s porézní nádobkou);
- způsob provozování zařízení: spřažená nebo nespřažená zařízení;
- druh odpadních vod: syntetické nebo komunální odpadní vody, u komunálních odpadních vod datum a místo odběru;
- druh inokula, datum a místo odběru;
- popis použitých analytických metod, pokud byly prováděny specifické analýzy;
- grafické vyjádření závislosti úbytku CHSK nebo DOC na čase ve fázi rozběhové a vyhodnocovací;
- výsledek stanovení obsahu zkoušené látky prostřednictvím CHSK nebo DOC v zásobním roztoku;
- při provádění specifické analýzy: grafické vyjádření procentuálního úbytku zkoušené látky z kapalně fáze během rozběhové a vyhodnocovací fáze v závislosti na čase;
- střední úbytek DOC nebo CHSK zkoušené látky a standardní odchylka výsledků získaných během vyhodnocovací fáze, kdy úbytek zkoušené látky je konstantní;
- grafické vyjádření koncentrace aktivovaného kalu v závislosti na čase;
- poznámky týkající se aktivovaného kalu (odstraňování přebytečného kalu ze zařízení, tvorba shluků, použití chloridu železitého atd.);
- proměřované koncentrace zkoušené látky;
- výsledky analýz kalu;
- všechny informace o zkoušené látce a o referenční látce, pokud byla použita;
- vědecké zdůvodnění všech odchylek a změn metody.

X.3.2 **INTERPRETACE VÝLEDKŮ**

Příčinou nízké hodnoty úbytku zkoušené látky z vodné fáze může být inhibice mikroorganismů způsobená touto látkou. Projevuje se to především rozpouštěním a ztrátou kalu, zakalováním kapalně fáze a snížením účinnosti odstraňování CHSK nebo DOC v zařízení.

Někdy hraje roli fyzikálně-chemická adsorbce. Vztah mezi biologickým působením na látku a její fyzikálně-chemickou adsorpcí je možné rozlišit po odpovídající desorpci.

K rozlišení úplného nebo částečného biologického rozkladu od adsorbce je nutno provést další zkoušky.

Nabízí se zde více možností. Nejlepším postupem je použití kapalně fáze ze sedimentační nádoby jako inokula v některé ze zkoušek snadné biologické rozložitelnosti (nejlépe v respirometrické zkoušce).

Vysoké hodnoty úbytku DOC nebo CHSK jsou zpravidla způsobovány biologickým rozkladem, nízké hodnoty úbytku naproti tomu nelze odlišit od jiných mechanismů odstranění látky. Pokud např. rozpustná sloučenina vykazuje stupeň adsorbce 98 % a denně je odstraňováno 10 % kalu, dochází až ke 40 % odstranění látky v tomto kalu. Je-li denně odstraňováno 30 % kalu, může eliminace na základě adsorbce a odstranění kalu stoupnout na 65 % (4):

Při používání specifických analýz je třeba brát na zřetel vliv struktury látky na specifickou analýzu. Úbytek látky stanovený specifickou analýzou nemůže být interpretován jako mineralizace látky.

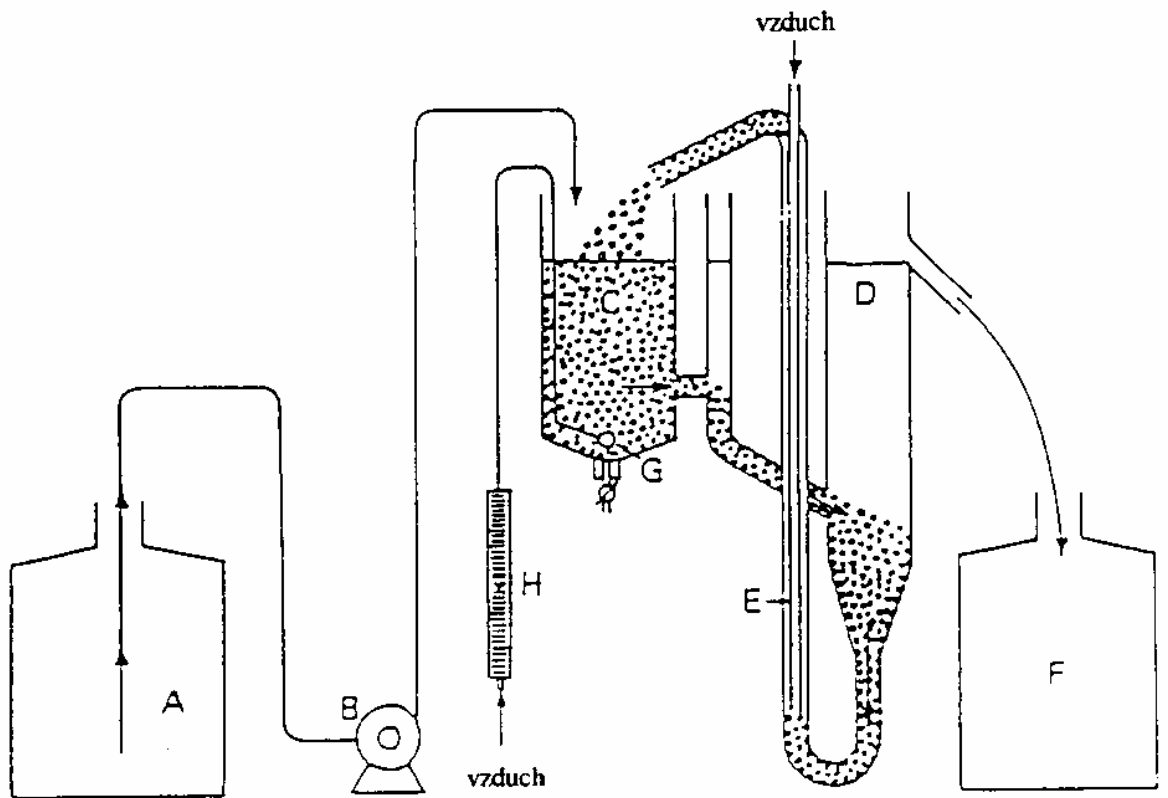
X.4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C (81) 30 final.
- (2) Annex V C9 Degradation Test - Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19. 9. 1984).
- (3) H. A. Painter and E. F. King, WRC *Porous Pot method for assessing biodegradability*. Technical report TR70. June 1978, Water Research Center, Velká Británie.
- (4) Wierich P. and Gerike P., The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Absorbing Compounds in Activated Sludge Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, Nr. 2 - June 1981, str. 161 - 171.
- (5) Council Directives 82/242/EEC und 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L109, 22. 4. 1982, amending Council Directives 73/404/EEC und 73/405/EEC on biodegradability of detergents, *Official Journal of the European Communities*, No L347, 17. 12. 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreisetest, insbesondere bei Rindversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* (1980), str. 406 - 408.

PŘÍLOHA 1

Obrázek 1

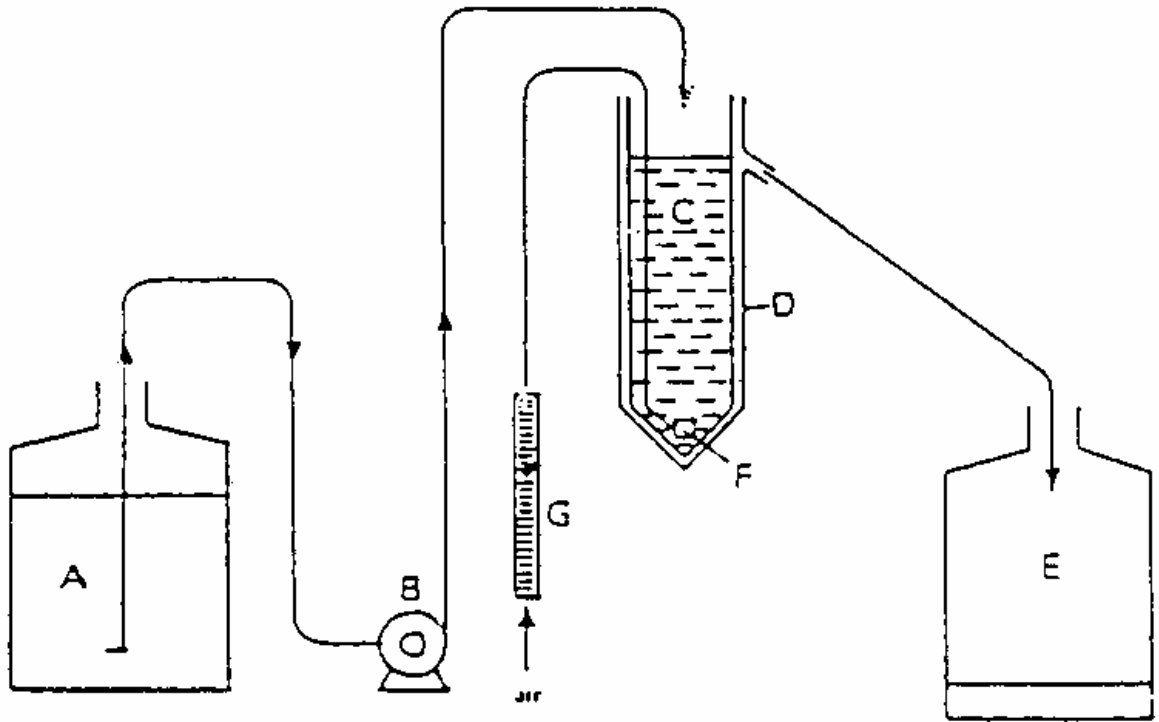


A = zásobník
B = dávkovací zařízení
C = aerační komora (objem 3 litry)
D = sedimentační nádoba

E = mamutka
F = zásobník na výtok
G = aerátor
H = průtokoměr (nepovinně)

Obrázek 1

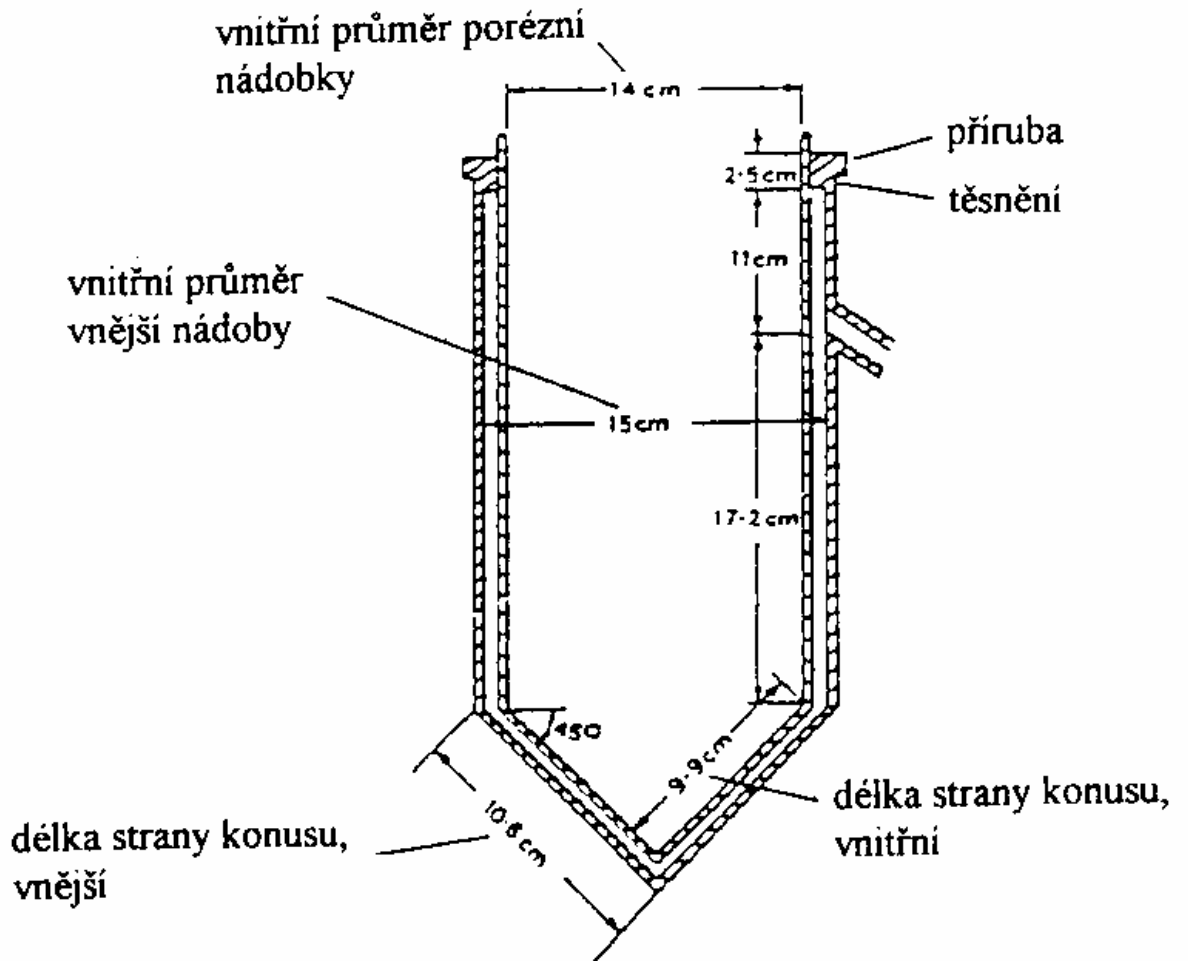
Zařízení používané pro stanovení biologické rozložitelnosti



A = zásobník
B = dávkovací čerpadlo
C = porézní aerační nádobka
D = vnější nepropustná nádoba

E = zásobník na výtok
F = vzduchovací kámen
G = rotametr

Obrázek 2
 Detaily třílitrové vzduchovací porézní nádoby



PŘÍLOHA 3

Provozní podmínky simulační zkoušky s aktivovaným kalem
Označ v každé skupině

Zařízení:

- průkazná zkouška OECD
- zařízení s porézní nádobkou

Způsob provozu:

- samostatná jednotka
- spřažená zařízení
- nespřažená zařízení

Přeočkování:

- žádné
- aktivovaným kalem
- kapalnou fází vzniklou odstraněním sedimentu

Střední doba zdržení:

3 hodiny	<input type="text"/>
6 hodin	<input type="text"/>
Živné médium:	
komunální odpadní voda	<input type="text"/>
syntetická odpadní voda	<input type="text"/>
Inokulum:	
z čistírny odpadních vod	<input type="text"/>
směsné inokulum	<input type="text"/>
aktivovaný kal	<input type="text"/>
Přidávání zkoušené látky:	
na začátku	<input type="text"/>
postupně	<input type="text"/>
po vytvoření kalu	<input type="text"/>
Analýzy:	
specifická	<input type="text"/>
CHSK	<input type="text"/>
DOC	<input type="text"/>

XI. METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – ZKOUŠKA INHIBICE DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU – metoda C.11 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

XI.1 METODA

XI.1.1 ÚVOD

Popsaná metoda hodnotí vliv zkoušené látky na mikroorganismy měřením intenzity jejich dýchání za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky.

Účelem této metody je poskytnout rychlou vyhledávací metodu, kterou je možné určit látky, které mohou nepříznivě ovlivnit aerobní mikrobiální čistírny vod, a naznačit vhodné koncentrace zkoušených látek, které nejsou inhibující a které je možno použít ve zkouškách biologické rozložitelnosti.

Definitivní zkoušce může předcházet zkouška pro nalezení pracovní oblasti. Může poskytnout informace o oboru koncentrací, které je možné použít v hlavní zkoušce.

Do schématu zkoušky jsou zařazeny dvě kontroly, jedna na začátku a druhá na konci řady pokusů. Každou dávku aktivovaného kalu je také nutno kontrolovat s použitím referenční látky.

Tato metoda se nejlépe aplikuje na látky, které díky své rozpustnosti a nízké těkavosti zůstávají ve vodě.

U látek s nízkou rozpustností v médiích používaných ve zkoušce může být nemožné stanovit EC_{50} .

Pokud má zkoušená látka sklon k rozkladu oxidační fosforylací mohou výsledky založené na absorpci kyslíku vést k nesprávným závěrům,

Pro provedení zkoušky je užitečné znát následující informace:

— rozpustnost ve vodě,

- tlak par,
- strukturní vzorec,
- čistota zkoušené látky.

Doporučení:

Aktivovaný kal může obsahovat potenciálně patogenní organizmy a je třeba s ním zacházet opatrně.

XI.1.2 **DEFINICE A JEDNOTKY**

Respirační rychlost je spotřeba kyslíku mikroorganismy odpadních vod v aerobním kalu, obecně vyjádřená jako mg O₂ na 1 mg kalu za hodinu.

Pro výpočet inhibičního účinku zkoušené látky při určité koncentraci se respirační rychlost vyjadřuje jako procento průměrné hodnoty dvou kontrolních respiračních rychlostí:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c_1} + R_{c_2}}\right) \cdot 100 = \% \text{inhibice}$$

kde:

R_s = rychlost spotřeby kyslíku při použité koncentraci zkoušené látky,

R_{c₁} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrolní zkoušce 1,

R_{c₂} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrolní zkoušce 2.

EC₅₀ v této zkoušce je koncentrace zkoušené látky, při které respirační rychlost činí 50 % hodnoty vycházející z kontrolní zkoušky za podmínek popsanych v této metodě.

XI.1.3 **REFERENČNÍ LÁTKY**

Jako referenční látku se doporučuje používat známý inhibitor dýchání 3,5-dichlorfenol. Ověřením EC₅₀ u každé dávky aktivovaného kalu by mělo být zkontrolováno, že kal není abnormálně citlivý.

XI.1.4 **PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY**

Rychlost dýchání aktivovaného kalu vyživovaného standardním množstvím syntetické odpadní vody se měří po době kontaktu 30 minut, 3 hodin nebo v obou časech. Měří se také rychlost dýchání téhož aktivovaného kalu v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky za jinak stejných podmínek. Inhibiční efekt zkoušené látky při určité koncentraci se vyjadřuje jako procento průměrné rychlosti dýchání ze dvou kontrolních pokusů. Hodnota EC₅₀ se vypočítá ze stanovení při různých koncentracích.

XI.1.5 **KRITÉRIA KVALITY**

Výsledky zkoušky jsou platné, jestliže:

- respirační rychlosti dvou kontrolních pokusů se od sebe liší nejvýše o 15 %,
- EC₅₀ (pro 30 minut nebo pro 3 hodiny) 3,5-dichlorfenolu leží v přijatém rozmezí 5 - 30 mg.l⁻¹.

XI.1.6 **POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**

XI.1.6.1 **Činidla**

XI.1.6.1.1 *Roztoky zkoušené látky*

Roztoky zkoušené látky se připravují čerstvé na začátku studie s použitím zásobního roztoku. Použije-li se níže popsany postup, je vhodná koncentrace zásobního roztoku 0,5 g.l⁻¹.

XI.1.6.1.2 *Roztok kontrolní látky*

Roztok 3,5-dichlorfenolu lze připravit například rozpuštěním 0,5 g 3,5-dichlorfenolu v 10 ml 1 M NaOH, zředěním destilovanou vodou přibližně na 30 ml, přidáním 0,5 M H₂SO₄ do bodu začínajícího srážení (je třeba asi 8 ml 0,5 M H₂SO₄) a konečným doplněním směsi destilovanou vodou na 1 litr. pH musí potom ležet mezi 7 a 8.

XI.1.6.1.3 *Syntetická odpadní voda*

Používaná syntetická odpadní voda se připraví rozpuštěním následujícího množství látek v 1 litru vody:

- 16 g peptonu,
- 11 g masového extraktu,
- 3 g močoviny,
- 0,7 g NaCl,
- 0,4 g CaCl₂·2H₂O,
- 0,2 g MgSO₄·7H₂O,
- 2,8 g K₂HPO₄.

Poznámka 1: Tato syntetická odpadní voda má stonásobnou koncentraci oproti vodě popsané v technické zprávě OECD "Návrh metody stanovení biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek používaných v syntetických detergentech" (11.6.1976), s přídavkem monohydrogenfosforečnanu draselného.

Poznámka 2: Nepoužije-li se připravené médium ihned, je nutné je přechovávat v temnu při 0 - 4 °C ne déle než jeden týden za podmínek, které nezpůsobují žádné změny v jeho složení. Médium je také možné před uschováním sterilizovat, nebo je možné pepton a masový extrakt přidat krátce před provedením zkoušky. Před použitím je nutné médium důkladně promíchat a upravit pH.

XI.1.6.2 **Aparatura**

Měřicí aparatura: Přesná konstrukce není podstatná. Musí však mít volný prostor nad kapalinou a sonda musí přesně zapadat do hrdla odměrné baňky.

Z běžného laboratorního vybavení je třeba zejména toto:

- měřicí přístroje,
- provzdušňovací zařízení,
- měřič pH a monitorovací zařízení,
- kyslíková elektroda.

XI.1.6.3 **Příprava inokula**

Jako mikrobiální inokulum pro zkoušku se používá aktivovaný kal z čistírny odpadních vod čistící převážně domovní odpadní vody.

Je-li to nutné, je možné při dodání kalu do laboratoře odstranit hrubé částice krátkodobým usazením (např. 15 minut) a dekantovat horní vrstvu jemnějších tuhých částic pro použití. Alternativně je možné kal po několik sekund promíchat.

Lze-li mimoto předpokládat, že je přítomna látka mající inhibiční účinek, je nutné kal promýt vodovodní vodou nebo izotonickým roztokem. Po zcentrifugování se roztok nad usazeninou dekantuje (tento postup se opakuje třikrát).

Malé množství kalu se zváží a vysuší. Z výsledku je možné vypočítat množství vlhkého kalu, které je nutné suspendovat ve vodě, aby se získal aktivovaný kal v oblasti koncentrací suspendovaných tuhých látek ve směsné kapalině mezi 2 a 4 g.l⁻¹. Dodrží-li se níže doporučený postup získá se zkušební médium s koncentrací kalu 0,8 a 1,6 g.l⁻¹.

Není-li možné kal použít v den kdy byl shromážděn přidá se ke každému litru aktivovaného kalu, připraveného tak, jak je popsáno výše, 50 ml syntetické odpadní vody, potom se provzdušňuje přes noc při 20 ± 2 °C. Poté se udržuje za provzdušňování pro použití během dne. Před použitím se zkontroluje pH a je-li třeba, upraví se na 6 - 8. Obsah suspendovaných tuhých látek ve směsné kapalině je třeba stanovit, jak je popsáno v předchozím odstavci.

Požaduje-li se použití stejné dávky kalu v následující dny (nejvýše po čtyři dny), přidává se na konci každého pracovního dne dalších 50 ml syntetické odpadní vody na litr kalu.

XI.1.6.4 **Provedení zkoušky**

Trvání/doba kontaktu: 30 minut a (nebo) 3 hodiny, během kterých probíhá provzdušňování

Voda: Pitná voda (v případě potřeby zbavená chlóru)

Přívod vzduchu: Čistý vzduch, prostý oleje. Průtok 0,1 - 1 l.min⁻¹.

Měřicí aparatura: Baňka s plochým dnem, jaká se používá pro stanovení BSK.

Měřič obsahu kyslíku: Vhodná kyslíková elektroda, se zapisovačem.

Živný roztok: Syntetická odpadní voda (viz výše).

Zkoušená látka: Rztok zkoušené látky se připraví čerstvý na začátku zkoušky.

Referenční látka: např. 3,5-dichlorfenol (nejméně tři koncentrace)

Kontrolní zkouška: Naočkovaný vzorek bez zkoušené látky

Teplota: 20 ± 2 °C

Dále je uveden navržený experimentální postup, kterého je možné použít jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku, pro dobu kontaktu tři hodiny:

Používá se několika nádob (např. jednolitrových kádinek).

Je třeba použít alespoň pět koncentrací, odstupňovaných o konstantní faktor nepřevyšující pokud možno 3,2.

V okamžiku "0" se 16 ml syntetické odpadní vody doplní vodou na 300 ml. Přidá se 200 ml mikrobiálního inokula a výsledná směs (500 ml) se převede do první nádoby (první kontrola C₁).

Nádoby, používané v pokusu, je nutné nepřetržitě provzdušňovat, aby bylo zaručeno, že koncentrace rozpuštěného kyslíku nepoklesne pod 2,5 mg.l⁻¹ a aby těsně před měřením rychlosti dýchání činila koncentrace kyslíku přibližně 6,5 mg.l⁻¹.

V okamžiku "15 minut" (15 minut je libovolně zvolený, avšak vhodný interval) se opakuje totéž až na to, že se k 16 ml syntetické odpadní vody před doplněním vodou na 300 ml a přidáním mikrobiálního inokula na celkový objem 500 ml přidá 100 ml zásobního roztoku zkoušené látky. Tato směs se pak převede do druhé nádoby a provzdušňuje se jako výše. Tento postup se opakuje v 15-minutových intervalech s různými objemy zásobního roztoku zkoušené látky, čímž se získá řada nádob obsahujících různé koncentrace zkoušené látky. Nakonec se připraví druhá kontrolní nádoba.

Po třech hodinách se zaznamená pH, dobře promíchaný vzorek obsahu první nádoby se převede do měřicí aparatury a v době do 10 minut se změří rychlost dýchání.

Stanovení se opakuje u obsahu každé z nádob v 15minutových intervalech tak, že doba kontaktu v každé nádobě je tři hodiny.

Referenční látka se zkouší na každé dávce mikrobiálního inokula tímž způsobem.

Mají-li se měření provádět po 30 minutách kontaktu, je třeba použít jiného režimu (např. použití více než jednoho měřiče kyslíku).

Vyžaduje-li se měření chemické spotřeby kyslíku, připraví se další nádoby, obsahující zkoušenou látku, syntetickou odpadní vodu a čistou vodu, ale ne aktivovaný kal. Spotřeba kyslíku se měří a zaznamená po době provzdušňování 30 minut a (nebo) tři hodiny (doba kontaktu).

XI.2

VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Rychlost dýchání se vypočítá ze záznamu zapisovače mezi přibližně 6,5 mg.l⁻¹ a 2,5 mg.l⁻¹, nebo za desetiminutovou periodu, je-li rychlost dýchání nízká. Část respirační křivky, ze které se vyhodnocuje rychlost dýchání, musí být lineární.

Jestliže rychlosti dýchání v obou kontrolních pokusech neleží v rozmezí 15 % od sebe navzájem, nebo EC₅₀ (za 30 minut nebo tři hodiny) referenční látky neleží v akceptovaném rozmezí (5 - 30 mg.l⁻¹ pro 3,5-dichlorfenol), je zkouška neplatná a musí se opakovat.

Pro každou zkušenu koncentraci (viz bod 1. 2) se vypočte inhibice v %. Inhibice v % se vynese proti koncentraci na logaritmicko-normálním (nebo logaritmicko-pravděpodobnostním) papíru a odečte se hodnota EC₅₀.

Standardními postupy je možné stanovit pro hodnoty EC₅₀ 95% meze spolehlivosti.

XI.3

ZPRÁVA

XI.3.1

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Je-li to možné, má protokol o zkoušce obsahovat tyto informace:

- zkoušená látka: chemické identifikační údaje,
- systém použitý při zkoušce: zdroj, koncentrace a veškerá předběžná úprava aktivovaného kalu,
- experimentální podmínky:
 - pH reakční směsi před měřením respirace,
 - teplota při zkoušce,
 - ba trvání zkoušky,
 - referenční látka a její změřená EC₅₀,
 - abiotická spotřeba kyslíku (pokud k ní dochází).
- výsledky:
 - veškeré naměřené hodnoty,
 - křivka inhibice a metoda výpočtu EC₅₀,
 - EC₅₀ a je-li možné 95% meze spolehlivosti, EC₂₀ a EC₈₀,
 - veškerá pozorování a veškeré odchylky od této zkušební metody, které mohly ovlivnit výsledek.

XI.3.2

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Hodnotu EC₅₀ je třeba považovat pouze za orientační hodnotu pravděpodobné toxicity zkoušené látky buď při zpracování odpadních vod aktivovaným kalem, nebo pro mikroorganismy v odpadních vodách, protože složité interakce, ke kterým dochází v životním prostředí, nelze přesně simulovat laboratorní zkouškou. Mimoto, zkoušené látky, které mohou mít inhibiční účinky na oxidaci amoniaku, mohou také způsobovat atypické inhibiční křivky. Proto je nutné interpretovat tyto křivky opatrně.

XI.4

LITERATURA

- (1) International Standard ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, str. 165
- (3) Brown, D., Hitz, H.R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, str. 245
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries - Ekologická a toxikologická asociace průmyslu výroby barviv), *Recommended Method* No 103, také popsáno v:
- (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, str. 80
- (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, str. 247
- (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(81) 30 final.

XII. METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS – metoda C.12 podle přílohy směrnice 92/69/EHS

XII.1 METODA

XII.1.1 ÚVOD

Cílem této metody je hodnocení potenciální úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsou-li vystaveny poměrně vysokým koncentracím mikroorganismů po dlouhé časové období. Životaschopnost mikroorganismů se udržuje po tuto dobu denními přídávky živin z usazené odpadní vody. (Pro potřebu během víkendů lze odpadní vodu přechovávat při 4 °C. Alternativně je možné použít syntetickou odpadní vodu podle potvrzující zkoušky OECD.)

Při interpretaci výsledků (viz 3. 2) je nutné brát v úvahu, že může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných tuhých látkách.

V důsledku dlouhé doby zdržení kapalně fáze (36 hodin) a průběžného přidávání živin nesimuluje zkouška podmínky existující v čistírně odpadních vod. Výsledky získané při pokusech s různými látkami ukazují, že zkouška má vysoký potenciál biologického rozkladu.

Podmínky poskytované zkouškou jsou vysoce příznivé pro výběr a adaptaci mikroorganismů schopných rozkládat zkoušenou látku. (Postup je možné použít také k získávání aklimatizovaných inokulí pro použití v jiných zkouškách.)

V této metodě se používá k hodnocení výsledné biologické rozložitelnosti zkoušené látky hodnota koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC). DOC se doporučuje raději stanovit po okyselení a přečištění než jako rozdíl $C_{\text{celk.}} - C_{\text{anorg.}}$.

Současné použití specifické analytické metody může umožnit určení primárního rozkladu látky (úbytek výchozí chemické struktury).

Metoda je použitelná pouze pro ty organické látky, které v koncentracích používaných ve zkoušce:

- jsou rozpustné ve vodě (alespoň 20 mg rozpuštěného organického uhlíku na litr),
- mají zanedbatelnou tenzi par,
- nepůsobí inhibičně na bakterie,
- významně se neadsorbují ve zkušebním systému,
- neztrácejí se ze zkoušeného roztoku pěněním.

Je nutné stanovit obsah organického uhlíku ve zkoušené látce.

Při interpretaci získaných výsledků, zejména v případech, kdy výsledky jsou nízké nebo marginální, jsou cenné informace o relativních podílech hlavních složek ve zkoušeném vzorku

Pro interpretaci nízkých výsledků a při volbě vhodné koncentrace při zkoušce mohou být užitečné informace o toxicitě látky pro mikroorganismy.

XII.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

C_T = koncentrace zkoušené látky na začátku provzdušňovací periody, vyjádřená jako množství organického uhlíku přítomného nebo přidaného k usazené odpadní vodě (mg.l^{-1}),

C_t = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v kapalině nad usazeninou, ve zkoušce, na konci provzdušňovací periody (mg.l^{-1}),

C_c = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v kapalině nad sedimentem, v kontrolní zkoušce, na konci provzdušňovací periody (mg.l^{-1}).

Biologický rozklad je v této metodě definován jako úbytek organického uhlíku.

Biologický rozklad je možné vyjádřit jako:

1. Procentický úbytek D_{da} množství denně přidávané látky:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \cdot 100 \quad (1)$$

kde D_{ds} = rozklad/denní přídavek

2. Procentický úbytek D_{ssd} množství látky přítomného na začátku každého dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ii} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{C_T + C_{ii} - C_{ci}} \cdot 100 \quad (2(a))$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \cdot 100 \quad (2(b))$$

kde D_{red} = rozklad/denní přídavek;

indexy i a $(i + 1)$ se vztahují ke dni měření.

Rovnice 2(a) se doporučuje, mění-li se DOC v odcházející vodě den ode dne, zatímco rovnicí 2(b) lze používat, zůstává-li DOC v odcházející vodě den ode dne relativně konstantní.

XII.1.3

REFERENČNÍ LÁTKY

XII.1.4

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal z čistírny odpadních vod se vpraví do semikontinuální jednotky pro aktivovaný kal (SCAS, semi-continuous activated sludge unit). Přidají se zkoušená látka a usazená domovní odpadní voda a směs se provzdušňuje 23 hodin. Provzdušňování se pak ukončí, kal se nechá usadit a kapalina nad usazeninou se odstraní.

Kal zbylý v provzdušňovací komoře se pak smísí s další alikvotní částí zkoušené látky a odpadní vody a cyklus se opakuje.

Biologický rozklad se určí stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku v kapalině nad sedimentem. Tato hodnota se porovná s hodnotou, zjištěnou pro kapalinu získanou z kontrolní nádoby, do které byla dávkována pouze usazená odpadní voda.

Použije-li se specifická analytická metoda, je možné měřit změny koncentrace výchozí chemické látky v důsledku biologického rozkladu (primární biologický rozklad).

XII.1.5

KRITÉRIA KVALITY

Reprodukovatelnost této metody, založené na úbytku rozpuštěného organického uhlíku, nebyla ještě stanovena. (Pokud se uvažuje primární biologický rozklad, dosahuje se velmi přesných hodnot pro látky, které se rozkládají ve vysokém stupni.)

Citlivost metody je ve velké míře určena variabilitou slepé zkoušky a v menší míře přesností stanovení rozpuštěného organického uhlíku a obsahem zkoušené látky v kapalině na začátku každého cyklu.

XII.1.6

POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU

XII.1.6.1

Příprava

Sestaví se dostatečný počet čistých provzdušňovacích jednotek, alternativně je možné použít originální zkušební jednotku SCAS o obsahu 1,5 l, a trubic pro přívod vzduchu (obrázek 1) pro každou zkoušenou látku a pro kontrolní zkoušky. Stlačený vzduch přiváděný do zkušebních jednotek, přečištěný vatovým filtrem,

musí být prostý organického uhlíku a musí být předem nasycen vodou, aby se snížily ztráty vypařováním.

Vzorek směsné kapaliny, obsahující 1 - 4 g suspendovaných tuhých látek v 1 litru, se získá z čistírny pracující s aktivovaným kalem, čistící převážně domovní odpadní vody. Pro každou provzdušňovací jednotku je třeba přibližně 150 ml směsné kapaliny.

Zásobní roztoky zkoušené látky se připravují s použitím destilované vody; normálně požadovaná koncentrace je 400 mg.l^{-1} jako organický uhlík, což představuje koncentraci zkoušené látky 20 mg.l^{-1} uhlíku na začátku každého cyklu provzdušňování, nedochází-li k biologickému rozkladu.

Dovoluje-li to toxicita pro mikroorganismy jsou přípustné vyšší koncentrace.

Měří se obsah organického uhlíku zásobních roztoků.

XII.1.6.2 **Experimentální podmínky**

Zkoušku je třeba provádět při $20 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Používá se vysoká koncentrace aerobních mikroorganismů ($1 - 4 \text{ g.l}^{-1}$ suspendovaných látek), a efektivní doba zdržení je 36 hodin. Uhlíkaté látky v přiváděné odpadní vodě se v široké míře oxidují, normálně během osmi hodin po začátku každého cyklu provzdušňování. Potom kal endogenně dýchá po zbytek provzdušňovací periody, a v této době je jediným dostupným substrátem zkoušená sloučenina, pokud se také rychle nemetabolizuje. Tyto skutečnosti spolu s denně opakovaným očkovaním, používá-li se jako médium domovní odpadní voda, vytvářejí vysoce příznivé podmínky jak pro aklimatizaci, tak pro vysoký stupeň rozkladu.

XII.1.6.3 **Provedení zkoušky**

Získá se vzorek směsné kapaliny z vhodné čistírny čistící aktivovaným kalem převážně domovní odpadní vody nebo vzorek kapaliny z laboratorní jednotky a udržuje se v aerobních podmínkách až do použití v laboratoři. Do každé aerační i kontrolní jednotky se naplní 150 ml směsné kapaliny (používá-li se originální jednotka pro zkoušku SCAS, je třeba uvedené objemy násobit 10) a zahájí se provzdušňování. Po 23 hodinách se provzdušňování ukončí a kal se nechá 45 minut usadit. Postupně se otevrou kohouty všech nádob a odeberou se 100 ml podíly kapaliny nad usazeninou. Ke kalu zbylému v každé aerační jednotce se přidá 100 ml usazené domovní odpadní vody získané bezprostředně před použitím. Opět se zahájí provzdušňování. V této etapě se nepřidávají žádné zkoušené látky, a do jednotek se denně přidává domovní odpadní voda pouze do té doby, než se po usazení získá čirá kapalina nad usazeninou. To trvá obvykle až dva týdny, během kterých se obsah rozpuštěného organického uhlíku v kapalině nad usazeninou na konci každého aeračního cyklu přiblíží konstantní hodnotě.

Na konci této fáze se jednotlivé usazené kaly smísí a do každé jednotky se předloží 50 ml výsledného směsného kalu.

Do kontrolních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml vody, a do zkušebních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody plus 5 ml příslušného zásobního roztoku zkoušené látky (450 mg.l^{-1}). Znovu se zahájí provzdušňování a pokračuje se v něm 23 hodin. Kal se pak nechá 45 minut usadit, kapalina nad usazeninou se odebere a analyzuje na obsah rozpuštěného organického uhlíku.

Výše uvedený postup plnění a odběru se opakuje v průběhu zkoušky denně.

Může se ukázat nutným očistit před usazováním stěny jednotek, aby se předešlo hromadění tuhých látek nad hladinou kapaliny. Pro každou jednotku se používá samostatná stěrka nebo kartáč, aby se předešlo vzájemné kontaminaci.

V ideálním případě se rozpuštěný organický uhlík stanoví v kapalinách nad

usazeninami denně, i když jsou přípustné méně časté analýzy. Před analýzou se kapaliny zfiltrují přes promyté 0,45 µm membránové filtry nebo se zcentrifugují. Membránové filtry jsou vhodné, je-li zaručeno, že ani neuvolňují uhlík, ani ve filtračním kroku neabsorbují příslušnou látku. Teplota vzorku po dobu, kdy je v odstředivce, nesmí přesáhnout 40 °C.

Doba trvání zkoušky pro látky, u kterých dochází k malému nebo žádnému biologickému rozkladu není určena, ale na základě zkušenosti lze doporučit, aby trvala obecně nejméně 12 týdnů, avšak ne déle než 26 týdnů.

XII.2

VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v čiré kapalině nad usazeninami ve zkušebních jednotkách a v kontrolních jednotkách se vynesou proti času.

Po skončení biologického rozkladu se koncentrace zjištěná ve zkoušce přiblíží hodnotě v kontrolní jednotce. Jakmile se ve třech po sobě následujících měřeních zjistí, že rozdíl mezi oběma úrovněmi je konstantní, provede se takový počet dalších měření, který je postačující pro statistické vyhodnocení výsledků, a vypočte se procentní hodnota biologického rozkladu zkoušené látky (D_{da} nebo D_{red} , viz 1. 2).

XII.3

ZPRÁVA

XII.3.1

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Je-li to možné, má protokol o zkoušce obsahovat tyto informace:

- veškeré informace o druhu odpadní vody, typu použité jednotky a o experimentálních výsledcích týkajících se zkoušené látky, referenční látky (pokud byla použita) a slepé zkoušky,
- teplotu,
- křivku úbytku s popisem, způsob výpočtu (viz 1. 2),
- datum a lokalitu, kde byly odebrány aktivovaný kal a odpadní voda, stav adaptace, koncentrace atd.,
- vědecké důvody pro veškeré změny v postupu zkoušky,
- podpis a datum.

XII.3.2

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Protože látky zkoušené touto metodou nejsou snadno biologicky rozložitelné, bude normálně jakýkoli úbytek DOC, ke kterému dojde pouze v důsledku biologického rozkladu, během dnů nebo týdnů, postupný, s výjimkou případů, kdy aklimatizace je náhlá, jak je to indikováno náhlým vymizením zkoušené látky po několika týdnech.

Někdy může hrát významnou úlohu fyzikálně-chemická adsorpce; to je indikováno úplným nebo částečným úbytkem přidaného DOC na začátku. K čemu dojde potom, závisí na činitelích jako je míra adsorpce a koncentrace suspendovaných látek v nepoužité odcházející vodě. Obvykle rozdíl mezi koncentrací DOC v kapalinách nad usazeninou u kontroly a ve zkoušce postupně vzrůstá z počáteční nízké hodnoty a tento rozdíl pak, pokud nedojde k aklimatizaci, zůstává na nové hodnotě po zbytek experimentu.

Je-li třeba rozlišit mezi biologickým rozkladem (nebo částečným biologickým rozkladem) a adsorpcí, jsou nezbytné další zkoušky. Je možné je provést řadou způsobů, ale nejpřesvědčivější je použití kapaliny nad usazeninou nebo kalu jako inokula ve zkoušce vybrané ze základního souboru (nejlépe v respirometrické zkoušce).

Zkoušené látky, u kterých v této zkoušce dochází k vysokému neadsorpčnímu úbytku DOC, je třeba považovat za potenciálně biologicky rozložitelné. Částečný

neadsorpční úbytek ukazuje, že u látky dochází alespoň k určitému biologickému rozkladu.

Nízké nebo nulové úbytky DOC mohou být způsobeny inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, což se může projevit také lyzí a ztrátou kalu, takže kapalina nad usazeninou je zakalená. Zkoušku je nutné opakovat s nižší koncentrací zkoušené látky.

Vyšší citlivosti je možné dosáhnout použitím specifické analytické metody nebo sloučeniny značené ^{14}C . V případě zkoušené látky značené uhlíkem ^{14}C se zachycením $^{14}\text{CO}_2$ potvrdí, že došlo k biologickému rozkladu.

Tam, kde jsou výsledky uvedeny také jako primární biologický rozklad, je třeba, pokud je to možné, uvést také vysvětlení změny chemické struktury, která vede ke ztrátě odezvy u mateřské zkoušené látky.

Je nutné uvést potvrzení platnosti metody spolu s odezvou zjištěnou u média ve slepé zkoušce.

XII.4

LITERATURA

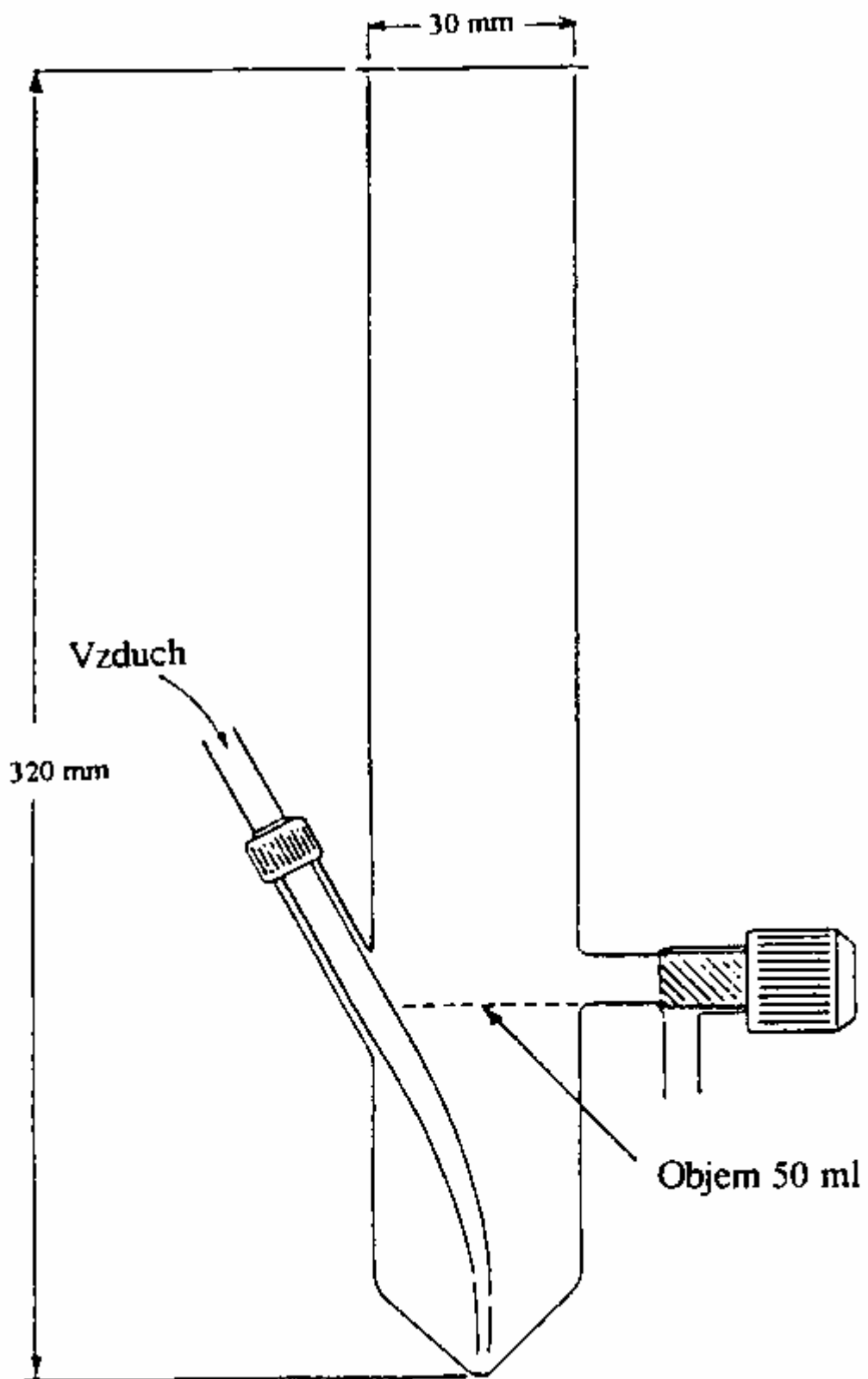
- (1) OECD, Paris, 1981. Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

PŘÍLOHA 1

Zkouška SCAS: příklad výsledků

Látka	C_T (mg.l^{-1})	$C_1 - C_c$ (mg.l^{-1})	Procento biolog. rozkladu D_{da}	Doba trvání zkoušky (dny)
4 -acetylamino-benzen sulfonan	17,2	2,0	85	40
tetrapropylenbenzen sulfonan	17,3	8,4	51,4	40
4 - nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilin	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentantetra- karboxylát	17,9	3,2	81,1	120

PŘÍLOHA 2
Příklad zkušební aparatury



XIII. METODA PRO STANOVENÍ BIOAKUMULACE - PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH – metoda C.13 podle přílohy směrnice Komise 98/73/ES ze dne 18. září 1998, kterou se po dvacáté čtvrté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice rady 67/548/EHS o sblížení správních a právních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek

XIII.1 METODA

Tato bioakumulační metoda je replikou metody OECD TG 305 (1996).

XIII.1.1 Úvod

V této metodě je popsán postup pro charakterizování potenciálu látek bioakumulovat se v rybách za průtokových podmínek. Ačkoliv jsou průtokové režimy preferovány, semistatické režimy se připouštějí, jsou-li splněna kritéria validace.

V metodě jsou dostatečně popsány podrobnosti pro provedení zkoušky, přičemž je poskytnuta dostatečná volnost pro přizpůsobení experimentálního uspořádání podmínkám v jednotlivých laboratořích a různým vlastnostem zkušebních látek. Metoda je nejefektivnější pro stabilní organické chemikálie s hodnotou $\log P_{ov}$ od 1,5 do 6,0 (1), ale může být také použita na superlipofilní látky (s hodnotou $\log P_{ov} > 6,0$). Předběžně odhadnutý bioakumulační faktor (BCF), někdy označován jako K_B , bude pro takové superlipofilní látky pravděpodobně vyšší než hodnota bioakumulačního faktoru v rovnovážném stavu (BCF_{ss}), která je očekávána z laboratorních experimentů. Předběžné odhady pro organické látky s hodnotou $\log P_{ov}$ až asi 9,0 lze získat pomocí rovnice Binteina et al (2). Mezi parametry, které charakterizují bioakumulační potenciál, patří rychlostní konstanta příjmu (k_1), rychlostní konstanta vylučování (k_2) a BCF_{ss} .

Zkušební látky značení radioizotopy mohou usnadnit analýzu vzorků vody a ryb a mohou být použity v případě, že by měla být provedena identifikace a kvantifikace produktů odbourávání. Měří-li se celkový obsah radioaktivního zůstatku (například spálením nebo solubilizací tkáně), zakládá se hodnota BCF na výchozí sloučenině, všech zadržených metabolitech a také na asimilovaném uhlíku. Hodnoty BCF založené na celkovém obsahu radioaktivního zbytku tedy nemohou být přímo srovnatelné s hodnotou BCF získanou specifickou chemickou analýzou pouze výchozí sloučeniny.

V metodách se značením radioaktivními izotopy mohou být pro stanovení výchozí sloučeniny zařazeny purifikační postupy, a je-li to považováno za nezbytné, mohou být charakterizovány hlavní metabolity. Je možné rovněž kombinovat studii metabolismu ryb se studií bioakumulace analýzou a identifikací reziduí v tkáních.

XIII.1.2 Definice a jednotky

Biokoncentrace/Bioakumulace je nárůst koncentrace zkušební látky v organismu (v jeho specifické tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkušební látky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BCF nebo K_B) je koncentrace zkušební látky v rybách nebo na nich nebo v jejich specifikovaných tkáních (C_f v $\mu\text{g/g}$ (ppm)) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_w v $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), a to v každém okamžiku fáze příjmu při této zkoušce.

Bioakumulační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{ss} nebo K_B) se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkušební látky v okolním médiu je po tuto dobu konstantní.

Plató nebo *rovnovážný stav* je stav dosažený tehdy, je-li při grafickém vyjádření křivka časové závislosti koncentrace zkušební látky v rybách (C_f) rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy C_f vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o $\pm 20\%$ a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný výrazný rozdíl. Analyzují-li se sdružené vzorky, požadují se čtyři po sobě jdoucí analýzy. V případě zkušebních látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly.

Bioakumulační faktory vypočtené přímo z rychlostních konstant kinetiky (k_1/k_2) se nazývají kinetické koncentrační faktory (BCF_k).

Rozdělovací koeficient oktanol-voda (P_{ov}) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemikálie v n-oktanolu a ve vodě (metoda A.8) a označuje se také jako K_{ow} . Logaritmus hodnoty P_{ov} se používá jako ukazatel potenciálu chemikálie bioakumulovat se ve vodních organismech.

Expozice nebo *fáze příjmu* je časový úsek, během něhož jsou ryby vystaveny působení zkušební chemikálie.

Rychlostní konstanta příjmu (k_1) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkušební látky v testovacích rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních), jsou-li ryby této chemikálii vystaveny (k_1 se vyjadřuje ve jednotce den^{-1}).

Po-expoziční nebo *vylučovací fáze* je časový úsek po přemístění testovacích ryb z média obsahujícího zkušební látku do média, které tuto látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování látky z testovacích ryb (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_2) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkušební látky v testovacích rybách (nebo v jejich specifikovaných tkáních) po jejich přemístění z média obsahujícího zkušební látku do média, které tuto látku neobsahuje (k_2 se vyjadřuje ve jednotce den^{-1}).

XIII.1.3

Princip zkušební metody

Zkouška má dvě fáze: fázi expozice (příjem) a po-expoziční fázi (vylučování). Během fáze příjmu jsou dvě oddělené skupiny ryb stejného druhu exponovány alespoň dvěma koncentracím zkušební látky. Poté jsou přemístěny do média, které zkušební látku neobsahuje, aby začala fáze vylučování. Fáze vylučování je vždy nezbytná, není-li příjem látky během fáze příjmu nevýznamný (např. je-li BCF menší než 10). Koncentrace zkušební látky v rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních) se sleduje v průběhu obou fází zkoušky. Vedle těchto dvou zkušebních koncentrací se za stejných podmínek, s výjimkou přítomnosti zkušební látky, udržuje kontrolní skupina ryb, aby mohly být na odpovídající kontrolní skupině porovnány možné nepříznivé účinky pozorované při bioakumulačních zkouškách a aby byly získány požadované koncentrace zkušební látky.

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že rovnováhy je dosaženo dříve. Délku fáze příjmu a dobu potřebnou k ustavení rovnovážného stavu lze předpovědět pomocí rovnice v příloze 3. Fáze vylučování poté začne po přemístění ryb do jiné nádrže bez zkušební látky. Je-li to možné, vypočítají se bioakumulační faktory nejlépe jako poměr (BCF_{ss}), tj. poměr koncentrace v rybách (C_f) a ve vodě (C_w) ve zřetelném rovnovážném stavu, a jako kinetický bioakumulační faktor (BCF_k), tj. poměr rychlostních konstant příjmu (k_1) a vylučování (k_2) za předpokladu kinetiky prvního řádu. Neřídí-li se zjevně naměřené hodnoty kinetikou prvního řádu, měl by být použit složitější model (příloha 5).

Nedojde-li k rovnovážnému stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve; poté začne fáze vylučování.

Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta vylučování (úbytku) (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely), bioakumulační faktor a , je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelu, který popisuje naměřené koncentrace zkušební látky v rybách a ve vodě. Faktor BCF se vyjadřuje jako funkce celkové živé hmotnosti ryby. Pro zvláštní účely však mohou být použity specifikované tkáně nebo orgány (svalovina, játra), je-li ryba dostatečně velká nebo je-li možné ji rozdělit na jedlý (vykostěný) podíl a nejedlý podíl (vnitřnosti). Vzhledem k tomu, že u mnoha organických látek existuje zřetelný vztah mezi potenciálem bioakumulace a lipofilí, existuje také odpovídající vztah mezi obsahem tuku v testovacích rybách a pozorovanou bioakumulací takové látky. Aby se tedy snížilo kolísání výsledků pro tyto látky s vysokou lipofilí (tj. s $\log P_{ov} > 3$), měla by být bioakumulace vztažena vedle celkové hmotnosti těla také k obsahu tuku.

Obsah tuku by měl být stanoven pokud možno na stejném biologickém materiálu, jaký je použit ke stanovení koncentrace zkušební látky.

XIII.1.4 **Informace o zkušební látce**

Před prováděním zkoušek bioakumulace by měly být o zkušební látce známy tyto informace:

- a) rozpustnost ve vodě,
- b) rozdělovací koeficient oktanol-voda P_{ov} (označovaný také jako K_{ow} , stanovený metodou HPLC, viz A.8),
- c) hydrolyza,
- d) fototransformace ve vodě stanovená ozářením slunečním nebo simulovaným slunečním světlem za podmínek zkoušky bioakumulace (3),
- e) povrchové napětí (tj. u látek, u nichž nelze stanovit $\log P_{ov}$),
- f) tlak par,
- g) popřípadě ochota k biologickému odbourávání.

Další požadovanou informací je toxicita pro druh ryby, který má být použit, nejlépe asymptotická hodnota LC_{50} (tj. časově nezávislá). Musí být k dispozici vhodná analytická metoda o známé správnosti, přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení zkušební látky ve zkušebních roztocích a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchování vzorků. Měly by být také známy meze stanovitelnosti zkušební látky jak ve vodě, tak v rybích tkáních. Je-li použita zkušební látka značená ^{14}C , měla by být známá aktivita nečistot vyjádřená v procentech.

XIII.1.5 **Platnost zkoušky**

Aby zkouška platila, měly by platit následující podmínky:

- kolísání teploty je menší než ± 2 °C,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60% nasycení,
- koncentrace zkušební látky v nádrži je udržována v intervalu ± 20 % kolem střední hodnoty naměřených hodnot během fáze příjmu,
- mortalita nebo jiné nepříznivé účinky/choroby jak u kontrolních, tak u exponovaných ryb je na konci zkoušky menší než 10 %; jestliže je zkouška prodloužena na několik týdnů nebo měsíců, měl by být úhyn nebo jiné nepříznivé účinky v obou skupinách ryb menší než 5 % za měsíc nebo by neměl překročit celkem 30 %.

c1.6 **Referenční sloučeniny**

Použití referenčních sloučenin o známém bioakumulačním potenciálu je popřípadě užitečné pro kontrolu experimentálního postupu. Zatím nelze ještě doporučit žádné specifické látky.

XIII.1.7 **Popis zkušební metody**

XIII.1.7.1 *Přístroje a pomůcky*

V případě všech částí zařízení je třeba se důsledně vyhnout použití materiálů, které mají schopnost rozpouštět, sorbovat nebo vyluhovat a mají nepříznivý účinek na ryby. Lze použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádrže vyrobené z inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na náplň. Použití měkkých trubek z plastu by mělo být minimalizováno. Měly by být použity trubky z teflonu (R), z korozivzdorné oceli a/nebo ze skla. Zkušenosti ukázaly, že pro látky s vysokými absorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, je potřebné silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno.

XIII.1.7.2 *Voda*

Ve zkoušce se používá přírodní voda a měla by být získána z nekontaminovaného zdroje stálé kvality. Ředící voda musí mít kvalitu, která umožní přežití zvoleného druhu ryby po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazoval abnormální klinický zjev nebo chování. V ideálním případě by mělo být prokázáno, že testovací druh může v ředící vodě přežít, růst a rozmnožovat se (např. zkouškou s laboratorní kulturou nebo zkouškou toxicity během životního cyklu). Voda by měla být charakterizována alespoň hodnotou pH, tvrdostí, celkovým obsahem nerozpuštěných látek, celkovým obsahem organického uhlíku a podle možnosti také obsahem amoniaku a dusičnanů, alkalitou a v případě mořských druhů salinitou. Všechny parametry, které jsou důležité pro optimální prospívání ryb, jsou známy, v příloze I jsou přesto uvedeny doporučené maximální koncentrace pro řadu parametrů sladkovodní a mořské vody.

Voda by měla mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,0 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkušební látkou) nebo nepříznivý vliv na stav obsádky ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů, kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), pesticidů (např. celkový obsah organofosforových a organochlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek by měl být proveden každé tři měsíce, je-li kvalita ředící vody relativně konstantní. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

Celkový přirozený obsah částic a rovněž obsah organického uhlíku (TOC) v ředící vodě by měl být co nejnižší, aby nedošlo k absorpci zkušební látky na organických látkách, což může snížit její biologickou dostupnost (4). Maximální přijatelná hodnota je 5 mg/l pro částice (sušina zachycená filtrem 0,45 μm) a 2 mg/l pro celkový organický uhlík (viz příloha II). Je-li to nezbytné, měla by být voda před použitím filtrována. Příspěvek k obsahu organického uhlíku od testovacích ryb (exkrekty) a ze zbytků potravy by měl být co nejmenší. V průběhu zkoušky by neměla koncentrace organického uhlíku ve zkušební nádrži překročit koncentraci organického uhlíku pocházejícího ze zkušební látky a z rozpouštědla, je-li použito, o více než 10 mg/l ($\pm 20\%$).

XIII.1.7.3 *Zkušební roztoky*

Zásobní roztok zkušební látky se připraví ve vhodné koncentraci. Zásobní roztok by měl být připraven nejlépe jednoduchým smícháním nebo protřepáním zkušební látky s ředící vodou. Použití rozpouštědel nebo dispersantů (solubilizačních činidel) se nedoporučuje; může však být v některých případech nezbytné pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci. Rozpouštědly, která mohou být použita, jsou ethanol, methanol, ethylenglykol-monomethylester, ethylenglykol-dimethylester, dimethylformamid a triethylenglykol. Dispersanty, které mohou být použity, jsou Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Zkušební látka může být značena radioaktivními izotopy a měla by být nejvyšší čistoty (např. > 98%).

Pro průtokové zkoušky je pro zajištění koncentrací testované látky nezbytný systém, který plynule dávkuje a ředí zásobní roztok zkušební látky (např. dávkovací čerpadlo, proporcionalní dávkovač, saturační systém). Přijatelná je výměna nejlépe pěti objemů v každé zkušební nádrži za den. Upřednostňuje se průtokový režim, není-li to však možné (např. jsou-li testovací organismy nepříznivě ovlivňovány), může být použita semi-statická technika za předpokladu, že jsou splněna kritéria validity. Rychlosti průtoku zásobního roztoku a ředící vody by měly být kontrolovány jak 48 hodin před zkouškou, tak poté alespoň denně během zkoušky. Tato kontrola by měla zhrnovat stanovení rychlosti průtoku v každé testovací nádrži a měla by zajistit, aby se rychlost průtoku neměnila o více než 20 % v rámci jedné nádrže nebo mezi nádržemi.

XIII.1.7.4 *Výběr druhů*

Důležitými kritérii pro výběr druhu jsou jeho dostupnost, možnost získat jej ve vyhovující velikosti a jeho bezproblémové udržování v laboratoři. Dalšími kritérii pro výběr druhu ryb jsou jeho rekreační, komerční a ekologický význam a rovněž srovnatelná citlivost, úspěšné dřívější použití atd. Doporučené druhy jsou uvedeny v příloze II. Mohou být použity jiné druhy, avšak zkušební postup musí být upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

XIII.1.7.5 *Chov ryb*

Obsádka ryb se nechá aklimatizovat alespoň dva týdny při zkušební teplotě a krmí se odpovídající potravou stejného typu jako v průběhu zkoušky.

Po 48 hodinách aklimatizace se zaznamená úhyn a použijí se následující kritéria:

- úhyn vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku;
- úhyn 5 až 10 % populace za sedm dnů: nechat aklimatizovat dalších sedm dnů;
- úhyn nižší než 5 % populace za sedm dnů: násada se přijímá; dojde-li během dalších sedmi dnů k úhynu vyššímu než 5 %, celá násada se vymění.

Zajistí se, aby ryby použité pro zkoušku nevykazovaly pozorovatelné nemoci a abnormality. Všechny nemocné ryby se vymění. Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny nemoci u ryb.

XIII.1.8 **Provedení zkoušky**

XIII.1.8.1 *Předběžná zkouška*

Může být užitečné provést předběžný experiment s cílem optimalizovat zkušební podmínky konečné zkoušky, např. výběr koncentrace (koncentrací) zkušební látky, délka fáze příjmu a fáze vylučování.

XIII.1.8.2 *Délka fáze příjmu*

Předpověď délky fáze příjmu lze získat z praktických zkušeností (např. z dřívější studie nebo z akumulace podobné chemikálie) nebo z určitých empirických vztahů využívajících znalosti buď rozpustnosti ve vodě, nebo rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro zkušební látku (viz příloha 3).

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že rovnováhy je dosaženo dříve. Nedojde-li k rovnovážnému stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení, přičemž se provádějí další měření, nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve.

XIII.1.8.2.2 Délka fáze vylučování

Doba odpovídající polovině délky fáze příjmu je obvykle dostatečná k tomu, aby došlo k přiměřenému (např. 95%) snížení obsahu látky v organismu (vysvětlení odhadu viz příloha 3). Jestliže doba nezbytná pro dosažení 95% úbytku je neúčelně dlouhá, překračuje například dvakrát normální délku fáze příjmu (tj. více než 56 dnů), může být použita kratší doba (tj. dokud není koncentrace zkušební látky menší než 10 % koncentrace v rovnovážném stavu). V případě látek se složitějším charakterem příjmu a vylučování, než jaký je popsán modelem ryby s jedním kompartmentem řídicím se kinetikou prvního řádu, však delší fáze vylučování umožní stanovit rychlostní konstanty úbytku. Délka fáze však může být určena dobou, po kterou zůstává koncentrace zkušební látky v rybách nad mezí detekce analytické metody.

XIII.1.8.2.3 Počet testovacích ryb

Počet ryb na jednu zkušební koncentraci se zvolí tak, aby pro každý odběr byly k dispozici čtyři ryby na jeden vzorek. Je-li požadována větší statická síla, bude na vzorek nezbytných více ryb.

Použijí-li se pohlavně dospělé ryby, uvede se, zda byly v experimentu použity ryby samičího nebo samčího pohlaví (nebo – uvede se pohlaví ryb použitých v experimentu). V případě použití obou pohlaví společně by mělo být před započítáním expozice prokázáno, že rozdíl v obsahu tuku mezi oběma pohlavími není významný; oddělení samců a samic může být nezbytné.

V každé zkoušce se vyberou ryby podobné hmotnosti, tak aby hmotnost nejmenší z nich nebyla nižší než dvě třetiny hmotnosti největší ryby. Všechny by měly být stejného stáří a měly by pocházet ze stejného zdroje. Vzhledem k tomu, že se jeví, že stáří a hmotnost ryby mají často významný vliv na hodnoty BCF (1), musí být tyto podrobnosti přesně zaznamenány. Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek obsádky ryb s cílem odhadnout střední hmotnost.

XIII.1.8.2.4 Násada

Volí se vysoký poměr množství vody k množství ryb, aby se minimalizovalo snížení koncentrace C_w způsobené přidáním ryb na začátku zkoušky a také proto, aby nedošlo k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku. Je důležité, aby rychlost nasazování byla přiměřená použitému druh. V každém případě se obvykle doporučuje rychlost nasazování 0,1 až 1,0 g ryb (živá hmotnost) na litr vody za den. Vysoká rychlost nasazování může být zvolena, je-li prokázáno, že požadovaná koncentrace zkušební látky může být udržována v mezích $\pm 20\%$ a že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60% nasycení.

Při volbě režimu nasazování má být přihlédnuto k obvyklému přirozenému prostředí ryb. Například ryby žijící u dna mohou vyžadovat při stejném objemu vody větší plochu dna než pelagické druhy ryb.

XIII.1.8.2.5 Krmení

Během aklimatizace a po dobu zkoušky se ryby krmí vhodnou potravou se známým obsahem tuku a celkových bílkovin podávanou v množství dostatečném

pro udržení zdravého stavu a pro udržení tělesné hmotnosti. Ryby se krmí denně v průběhu aklimatizace a po dobu zkoušky množstvím přibližně 1 až 2 % tělesné hmotnosti; tím se udrží v průběhu zkoušky obsah tuku u většiny druhů ryb na relativně konstantní úrovni. Množství krmiva by mělo být například jednou týdně nově přepočítáno, aby byla udržena odpovídající tělesná hmotnost a obsah tuku. Hmotnost ryb v každé nádrži může být pro tento výpočet odhadnuta z hmotnosti ryb naposledy odebraných z dotyčné nádrže. Ryby, které zůstaly v nádrži, se neváží.

Nezkrmená potrava a exkrementy se odstraňují z nádrží denně krátce po krmení (30 minut až jednu hodinu). Nádrže se udržují v celém průběhu zkoušky v co nejvyšší čistotě, aby byla koncentrace organických látek co nejnižší, neboť přítomnost organického uhlíku může snižovat biologickou dostupnost zkušební látky (1).

Poněvadž mnoho krmiv pochází z rybí moučky, mělo by být krmivo analyzováno na přítomnost zkušební látky. Je rovněž žádoucí, aby bylo krmivo analyzováno na přítomnost pesticidů a těžkých kovů.

XIII.1.8.2.6 Světlo a teplota

Fotoperioda je obvykle 12 až 16 hodin a teplota (± 2 °C) by měla odpovídat testovacímu druhu (viz příloha 2). Druh a charakteristiky osvětlení by měly být známy. Měla by být věnována pozornost možné fototransformaci zkušební látky za světelných podmínek studie. Měly by být použito vhodné osvětlení, aby nedošlo k expozici ryb fotoproduktům nevyskytujícím se v přírodě. V některých případech může být vhodné použít filtr pro odfiltrování UV záření s vlnovou délkou kratší než 290 nm.

XIII.1.8.2.7 Zkušební koncentrace

Ryby jsou vystaveny za průtokových podmínek alespoň dvěma koncentracím zkušební látky ve vodě. Vyšší (nejvyšší) koncentrace zkušební látky se obvykle volí tak, aby byla na úrovni 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50} a aby byla desetkrát vyšší než je mez detekce této látky ve vodě při použití analytické metody. Nejvyšší zkušební koncentraci lze také stanovit dělením akutní 96hodinové LC_{50} příslušným poměrem akutní/chronická letální dávka (u některých chemikálií může koeficient ležet mezi 3 a 100). Je-li to možné, volí se druhá (další) koncentrace tak, aby se lišila od výše uvedené faktorem 10. Není-li to možné z důvodu kritéria 1 % z LC_{50} nebo z důvodu kritéria meze detekce, může být použit nižší faktor než 10 nebo by mělo být zváženo použití zkušební látky značené ^{14}C . Žádná koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky.

Je-li použito rozpouštěcí činidlo, neměla by být jeho koncentrace vyšší než 0,1 ml/l a mělo by být stejné ve všech zkušebních nádržích. Jeho příspěvek, společně s příspěvkem zkušební látky, k celkovému obsahu organického uhlíku ve zkušební vodě by měl být znám. Avšak maximální snaha by měla být vynaložena k zamezení použití takovýchto látek.

XIII.1.8.2.8 Kontroly

Vedle zkušební série by měla být založena kontrola sestávající z ředící vody, která popřípadě obsahuje rozpouštěcí činidlo, pokud bylo zjištěno, že toto činidlo nemá žádné účinky na ryby. Není-li tomu tak, měly by být založeny obě kontroly.

XIII.1.8.3 Četnost měření kvality vody

V průběhu zkoušky by měly být v každé nádrži měřeny množství rozpuštěného kyslíku, TOC, pH a teplota. Celková tvrdost a popřípadě salinita by měly být měřeny v kontrolách a v jedné nádrži s vyšší (nejvyšší) koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a popřípadě salinita by měly být měřeny alespoň třikrát – na

začátku, přibližně uprostřed a na konci fáze příjmu – a jednou týdně ve fázi vylučování. Hodnota TOC by měla být měřena na začátku zkoušky (24 hodin a 48 hodin před započítáním fáze příjmu) před nasazením ryb a alespoň jednou týdně jak v průběhu fáze příjmu, tak v průběhu fáze vylučování. Teplota by měla být měřena denně, pH na začátku a na konci každé fáze a tvrdost vody jednou v průběhu zkoušky. Teplota by měla být měřena nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné nádrži.

XIII.1.8.4 *Odběr vzorků a analýza ryb a vody*

XIII.1.8.4.1 Časový rozvrh odebírání vzorků ryb a vody

Voda ze zkušebních nádrží se pro stanovení koncentrace zkušební látky odebírá před nasazením ryb a během fáze příjmu i během fáze vylučování. Voda se odebírá alespoň ve stejnou dobu jako ryby a před krmením. Během fáze příjmu se stanovují koncentrace zkušební látky, aby se ověřilo, že jsou v souladu s kritérii validity.

Ryby se odebírají alespoň pětkrát během fáze příjmu a alespoň čtyřikrát během fáze vylučování. Vzhledem k tomu, že v mnoha případech bude obtížné s tímto počtem vzorků vypočítat rozumně přesný odhad hodnoty BCF, zejména jde-li o jinou než jednoduchou kinetiku prvního řádu, může být účelné odebírat vzorky v obou fázích častěji (viz příloha 4). Dodatečné vzorky se uloží a analyzují až poté, co se výsledky prvního kola analýz ukáží jako nedostatečné pro výpočet hodnoty BCF o požadované přesnosti.

Příklad přijatelného časového rozvrhu odběru vzorků je uveden v příloze 4. Jiné plány lze snadno odvodit pomocí jiné předpokládané hodnoty P_{ov} , jejíž pomocí se vypočítá expoziční doba pro 95% příjem.

V odběru vzorků se pokračuje během fáze příjmu do ustavení rovnovážného stavu nebo po dobu 28 dnů, podle toho, co nastane dříve. Není-li rovnovážného stavu dosaženo do 28 dnů, v odběru se vzorků se pokračuje do ustavení rovnovážného stavu nebo do 60 dnů, podle toho, co nastane dříve. Před zahájením fáze vylučování se ryby přemístí do čistých nádrží.

XIII.1.8.4.2 Odběr vzorků a příprava vzorků

Vzorky vody pro analýzy se odebírají například odsáváním potrubím z inertního materiálu ze středu zkušební nádrže. Vzhledem k tomu, že se biologicky nedostupná frakce zkušební látky nedá často oddělit od biologicky dostupné frakce ani filtrací, ani odstředěním (zejména v případě superlipofilních chemikálií, tj. chemikálií s $\log P_{ov} > 5$) (1), (5), nemohou být vzorky takto zpracovány. Namísto toho je třeba učinit opatření pro to, aby nádrže byly udržovány co nejčistší, a obsah organického uhlíku by měl být pravidelně monitorován jak během fáze příjmu, tak během fáze vylučování.

Při každém odběru se z nádrží odebere vhodný počet ryb (obvykle alespoň čtyři). Odebrané ryby se rychle omyjí pod tekoucí vodu, osuší se „do sucha“, ihned se usmrtí nejvhodnější humánní metodou a zváží se.

Ryby a voda se pokud možno analyzují ihned po odběru s cílem předejít degradaci nebo ztrátám a vypočítat přibližné rychlosti příjmu a vylučování ještě v průběhu zkoušky. Okamžitá analýza rovněž zabrání zpoždění ve stanovení platů při jeho dosažení.

Nedojde-li k okamžité analýze, vzorky se vhodným způsobem uchovají. Před zahájením studie je třeba zjistit informace o řádné metodě uchovávání vzorků s ohledem na dotyčnou zkušební látku – například hluboké zmrazení, udržování při 4 °C, délka uchovávání, vyluhování atd.

XIII.1.8.4.3 Kvalita analytické metody

Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně správností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkušební látky, je třeba experimentálně kontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkušební látky jak z vody, tak ze vzorů ryb jsou pro dotýčnou analytickou metodu dostatečné. Kontroluje se také, zda se zkušební látka nevyskytuje v použité ředící vodě.

Hodnoty C_w a C_f se podle potřeby korigují podle výtěžku a pozad'ových hodnot kontrol. Vzorokry ryb a vody se zpracovávají tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku absorpce odběrovým zařízením).

XIII.1.8.4.4 Analýza vzorků ryb

Je-li ve zkoušce použit materiál značený radioizotopy, je možné provést analýzu s celkovou aktivitou (tj. s výchozí látkou i s metabolity) nebo lze provést separaci, tak aby mohla být výchozí látka analyzována samostatně. V rovnovážném stavu nebo na konci fáze příjmu, podle toho, k čemu dojde dříve, mohou být stanoveny také hlavní metabolity. Je-li hodnota BCF vypočtená z celkové aktivity reziduí $\geq 1\ 000\ %$, může být účelné, a pro určité kategorie chemikálií, např. pesticidy, je to důrazně doporučeno, identifikovat a kvantifikovat produkty odbourávání představující $\geq 10\ %$ celkového množství reziduí v tkáních ryb v rovnovážném stavu. Jsou-li produkty odbourávání představující $\geq 10\ %$ celkové aktivity reziduí identifikovány a kvantifikovány, doporučuje se také identifikovat a kvantifikovat produkty odbourávání ve vodě.

Koncentrace zkušební látky by měla být obvykle stanovena pro každou jednotlivou zváženou rybu. Není-li to možné, mohou být vzorky při každém odběru sdružovány, avšak sdružování omezuje statistické postupy, které lze na data aplikovat. Pokud na specifickém statistickém postupu a na síle záleží, měl by být ve zkoušce nasazen dostatečný počet ryb vyhovující požadovanému sdružování a požadované síle (6), (7).

Hodnota BCF by měla být vyjádřena jako funkce celkové živé hmotnosti a v případě lipofilních látek také jako funkce obsahu tuku. Obsah tuku v rybách se stanoví pokud možno při každém odběru. Pro stanovení obsahu tuku by měla být použita vhodná metoda (odkazy 8 a 2 v příloze 3). Jako standardní metoda může být doporučena technika extrakce do chloroformu/methanolu (9). Různé metody nedávají stejné hodnoty (10), je proto důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, měla by být analýza tuků provedena na extraktu připravenému pro analýzu zkušební látky, neboť tuky musí být často před chromatografickou analýzou odstraněny. Obsah tuku v rybách (v mg/kg živé hmotnosti) na konci experimentu by se neměl lišit od obsahu na počátku od více než $\pm 25\ %$. Měl by být uveden také podíl pevných látek v tkáních, aby bylo možné provést přepočet koncentrace tuků z živé hmotnosti na hmotnost sušiny.

XIII.2

DATA

XIII.2.1

Zpracování výsledků

Křivka příjmu zkušební látky se sestrojí vynesemím její koncentrace v rybách nebo na nich (nebo ve specifikovaných tkáních) v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka plató, tj. začíná být rovnoběžná s časovou osou, vypočítá se hodnota BCF_{ss} v rovnovážném stavu z poměru

$$\frac{C_f \text{ v rovnovážném stavu (střední hodnota)}}{C_w \text{ v rovnovážném stavu (střední hodnota)}}$$

Není-li rovnovážného stavu dosaženo, je možné vypočítat hodnotu BCF_{ss} s dostatečnou přesností pro posouzení rizika z „rovnovážného stavu v 80%

($1,6/k_2$) nebo 95% ($3,0/k_2$) rovnováže. Také koncentrační faktor BCF_k se stanoví jako poměr dvou rychlostních konstant prvního řádu k_1/k_2 . Rychlostní konstanta vylučování se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkušební látky v rybách v čase). Rychlostní konstanta příjmu se poté vypočte pomocí hodnoty k_2 a hodnoty C_f odvozené z křivky příjmu (viz také příloha 5). Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty BCF_k a rychlostních konstant k_1 a k_2 je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače (11). K výpočtu hodnot k_1 a k_2 lze jinak použít grafické metody. Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v příloze 3) a měl by být konzultován biostatistik.

XIII.2.2 **Interpretace výsledků**

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že naměřené koncentrace zkušebních roztoků se pohybují na úrovních blízkých mezi detekce analytické metody.

Jasně vymezené křivky příjmu a úbytku jsou ukazatelem dobré kvality dat o bioakumulaci. Rozdíl konstant příjmu/vylučování pro dvě zkušební koncentrace by měl být nižší než 20 %. Pozorované významné rozdíly v rychlostech příjmu/vylučování mezi dvěma použitými zkušebními koncentracemi by měly být zaznamenány a mělo by být uvedeno jejich možné vysvětlení. Interval spolehlivosti hodnot BCF u dobře navržených studií se všeobecně blíží ± 20 %.

XIII.3 **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XIII.3.1 **Zkušební látka**

- fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemické identifikační údaje (včetně obsahu organického uhlíku, je-li to třeba),
- v případě značení radioaktivními izotopy jejich přesná poloha a aktivita příměsí, vyjádřená v procentech.

XIII.3.2 **Testovací druh**

- vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, rozpětí velikostí atd.

XIII.3.3 **Zkušební podmínky**

- použitý zkušební postup (např. průtokový nebo semistatický),
- typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádrží, rychlost výměny objemu vody, počet opakování, počet ryb v jednom opakování, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků ryb a vzorků vody),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost jejich obnovování (je-li použito rozpouštěcí činidlo, musí být uvedena jeho koncentrace a jeho příspěvek k obsahu organického uhlíku ve vodě),
- nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení,
- zdroj ředicí vody, popis jakékoliv předchozí úpravy, výsledky jakéhokoliv prokazování schopnosti zkušebních ryb žít v této vodě a charakteristiky vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, úroveň zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, (popřípadě)

- salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoliv jiných provedených měření,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích, hodnota pH, tvrdost vody, obsah TOC, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (například typ krmiva, zdroj, složení – alespoň pokud možno obsah tuku a bílkovin, podávané množství a četnost),
- informace o zpracování vzorků ryb a vody, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, o extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkušební látku a obsah tuku (je-li měřen).

XIII.3.4 **Výsledky**

- výsledky jakýchkoliv provedených předběžných studií,
- úhyn kontrolních ryb a ryb v každé expoziční nádrži a jakékoliv pozorované neobvyklé chování,
- obsah tuku v rybách (je-li stanoven při zkoušce),
- křivky (včetně všech naměřených dat) příjmu a vylučování zkušební chemikálie rybami, doba dosažení rovnovážného stavu,
- hodnoty C_f a C_w (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota C_f se vyjadřuje v $\mu\text{g/g}$ živé hmotnosti (ppm) celého těla nebo specifikované tkáně, např. tuku, a C_w se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ (ppm)); hodnoty C_w pro kontroly (měly by být uvedeny také hodnoty pozadí),
- bioakumulační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{ss}) a/nebo kinetický koncentrační faktor (BCF_k) a popřípadě 95% intervaly spolehlivosti pro rychlostní konstanty příjmu a vylučování (úbytku) (vše vztaženo na celý organismus a na celkový obsah tuku v rybě, je-li stanoven, nebo na její specifikovanou tkáň), intervaly spolehlivosti a směrodatné odchylky (jsou-li k dispozici) a metody výpočtu/analýzy dat pro každou použitou koncentraci zkušební látky,
- v případě použití látek značených radioaktivními izotopy a je-li to nutné, musí být uvedena akumulace jakýchkoliv detekovaných metabolitů,
- všechny zvláštnosti zkoušky, všechny odchylky od těchto postupů a ostatní relevantní informace.

Všem výsledkům typu „nedetekováno při uvedené mezi detekce“ by mělo být předcházeno předběžným odzkoušením metod a uspořádání experimentu, neboť takové výsledky nelze použít pro výpočet rychlostních konstant.

XIII.4 **LITERATURA**

- (1) Connell D.W. (1988). *Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms*. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117-156.
- (2) Bintein S., Devillers J., Karcher W. (1993). *Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient*. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, pp. 29-390.
- (3) OECD, Paris (1996). *Direct phototransformation of chemicals in water*. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.
- (4) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals*. Water Quality Institute, Denmark.

- (5) US EPA 822-R-94-002 (1994) *Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors*. July 1994.
- (6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. *Pesticide analytical manual*, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- (7) US EPA (1974). Section 5, A(1). *Analysis of Human or animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J. F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- (8) Compaan H. (1980) in „*The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation*“, Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, Netherlands.
- (9) Gardner et al, (1995). *Limn. & Oceanogr.* 30, pp. 1099-1105.
- (10) Randall R. C., Lee H., Ozretich R. J., Lake J. L., Pruell R. J. (1991). *Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation*. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, pp 1431-1436.
- (11) CEC, *Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method - Ring Test Programme*, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen, N. Nyholm.
- (12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

PŘÍLOHA 1

Chemické charakteristiky přijatelné ředící vody

	Látka	Koncentrační limit
1	Nerozpuštěné látky	5 mg/l
2	Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
3	Neionizovaný amoniak	1 µg/l
4	Zbytkový chlor	10 µg/l
5	Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
6	Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenylly	50 ng/l
7	Celkový organický chlor	25 ng/l
8	Hliník	1 µg/l
9	Arsen	1 µg/l
10	Chrom	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Měď	1 µg/l
13	Železo	1 µg/l
14	Olovo	1 µg/l
15	Nikl	1 µg/l
16	Zinek	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Rtuť	100 ng/l
19	Stříbro	100 ng/l

PŘÍLOHA 2

Doporučené druhy ryb pro zkoušení

	Doporučený druh	Doporučené rozpětí zkušební teploty (°C)	Doporučená celková délka těla testovacích jedinců (cm)
1	Danio rerio ¹ (Teleostei, Cyprinidae)	20 - 25	3,0 ± 0,5

	(Hamilton-Buchanan), danio pruhované		
2	<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), střevle	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus), kapr obecný	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel), halančík japonský	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), živorodka duhová	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque), slunečnice	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), pstruh duhový	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei Gasterosteidae) (Linnaeus), koljuška třístná	18 - 20	3,0 ± 1,0

¹ Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

V různých zemích byly použity různé druhy estuarinních a mořských druhů, například:

ryba z čeledi Scienidae (Smuhovití)	<i>Leiostomus xanthurus</i>
halančík	<i>Cyprinodon variegatus</i>
ryba z čeledi Argentinidae (Stříbrnicovití)	<i>Menidia beryllina</i>
ryba z čeledi Enbiotocidae (Příbojkovití)	<i>Cymatogaster aggregata</i>
platýz z čeledi Pleuronectidae	<i>Parophrys vertulus</i>
vranka z čeledi Cottidae	<i>Leptocottus armatus</i>
koljuška třístná	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
mořčák z čeledi Moronidae	<i>Dicentracus labrax</i>
ouklej obecná	<i>Alburnus alburnus</i>

Dostupnost ryb

Sladkovodní ryby uvedené v seznamu se snadno chovají a/nebo jsou dobře dostupné po celý rok, zatímco dostupnost mořských nebo estuarijních ryb je omezena na určité země. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

PŘÍLOHA 3

Předpověď délky fáze příjmu a fáze vylučování

1. Předpověď délky fáze příjmu

Před provedením zkoušky lze získat odhad hodnoty k_2 a odtud lze získat dobu nezbytnou pro dosažení určitého stupně rovnovážného stavu (v procentech) z empirických vztahů mezi k_2 a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda (P_{ov}) nebo mezi k_2 a rozpustností ve vodě (s).

Odhad hodnoty k_2 (den^{-1}) lze získat například z následujícího empirického vztahu (1):

$$\log_{10}k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ov}) + 1,47 (r^2 = 0,95) \quad (1)$$

Další vztahy viz odkaz 2.

Není-li rozdělovací koeficient (P_{ov}) znám, lze jej odhadnout (3) ze znalosti rozpustnosti látky ve vodě (s) pomocí vztahu:

$$\log_{10}(P_{ov}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (2)$$

kde s = rozpustnost (v mol/l): ($n = 36$).

Tyto vztahy platí pouze pro chemikálie s hodnotou $\log P_{ov}$ od 2 do 6,5 (4).
Dobu, za kterou dojde k dosažení určitého stupně rovnovážného stavu vyjádřeného v procentech, lze získat pomocí odhadu hodnoty k_2 , z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

nebo je-li C_w konstanta:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (3)$$

Blíží-li se rovnovážný stav ($t \rightarrow \infty$), může být rovnice 3 zjednodušena (5), (6) na

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ nebo } C_f/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

Pak $k_1/k_2 \cdot C_w$ přiblížením koncentrace v rybách v „rovnovážném stavu“ ($C_{f,s}$).
Rovnice 3 může být přepsána na rovnici:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \text{ nebo } \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (4)$$

Použitím rovnice 4 lze předpovědět dobu potřebnou k dosažení určitého stupně rovnovážného stavu vyjádřeného v procentech, je-li hodnota k_2 předem odhadnuta z rovnice 1 nebo 2.

Je pravidlem, že statisticky optimální délka fáze příjmu pro získání statisticky přijatelných dat (BCF_k) je doba nezbytná k tomu, aby křivka sestavená vnesením logaritmu koncentrace zkušební látky v rybách proti času v lineárním měřítku dosáhla svého středního bodu, popřípadě $1,6k_2$, neboli 80 % rovnovážného stavu, ale ne více než $3,0k_2$, neboli 95 % rovnovážného stavu (7).

Doba nezbytná pro dosažení 80 % rovnovážného stavu je při použití rovnice 4:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ nebo } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (5)$$

Podobně 95 % rovnovážného stavu je dosaženo:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (6)$$

Například délka fáze příjmu (up) pro zkušební látku s $\log P_{ov} = 4$ je (při použití rovnic 1, 5 a 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ den}^{-1}$$

$$up (80 \%) = 1,6/0,652, \quad \text{tj. } 2,45 \text{ dnů (59 hodin)}$$

nebo $up (95 \%) = 3,0/0,652, \quad \text{tj. } 4,60 \text{ dnů (110 hodin)}$.

Podobně pro zkušební látku s hodnotou $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = 5,0$) je délka fáze (při použití rovnic 1, 2, 5 a 6):

$$\log_{10}(P_{ov}) = 0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ den}^{-1}$$

$$up (80 \%) = 1,6/0,246, \quad \text{tj. } 6,5 \text{ dnů (156 hodin)}$$

$$\text{nebo } up (95 \%) = 3,0/0,246, \quad \text{tj. } 12,2 \text{ dnů (293 hodin)}$$

Rovnice

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ov} + 55,31 \quad (\text{hodin})$$

může být eventuelně použita pro výpočet doby potřebné pro dosažení efektivního rovnovážného stavu (4).

2. Předpověď délky fáze vylučování

Předpověď doby nezbytné pro snížení obsahu látky v organismu na určitou procentuální úroveň počáteční koncentrace může být rovněž získána z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu) (1), (8):
V případě fáze vylučování se C_w předpokládá rovna nule. Rovnice může být zjednodušena na rovnici:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w \quad \text{nebo} \quad C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

kde $C_{t,0}$ je koncentrace na počátku fáze vylučování. 50% vyloučení bude dosaženo v čase (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{t,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t} \quad \text{nebo} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobně 95% vyloučení bude dosaženo v čase

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Je-li pro první fázi zvoleno dosažení 80% příjmu ($1,6/k_2$) a pro fázi vylučování je zvoleno dosažení 95% úbytku ($3,0/k_2$), je délka fáze vylučování přibližně dvojnásobkem délky fáze příjmu.

Je však důležité poznamenat, že odhady jsou založeny na předpokladu, že se příjem a vylučování řídí kinetikou prvního řádu. Neřídí-li se zjevně kinetikou prvního řádu, měl by být použit složitější model (např. odkaz (1)).

Literatura (k příloze 3)

- (1) Spacie A., Hamelink J. L. (1982). *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish*. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp. 309-320.
- (2) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals*. Danish Water Quality Institute.
- (3) Chiou C. T., Schmedding D. W. (1982). *Partitioning of organic compounds in octanol-water systems*. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.
- (4) Hawker D. W., Connell D. W. (1988). *Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish*. Wat. Res. 22 (6), pp. 701-707.
- (5) Branson D. R., Blau G. E., Alexander H. C., Neely W. B. (1975). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp. 785-792.
- (6) Ernst W. (1985). *Accumulation in Aquatic organisms*. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W., Bourdeau P. H. Part 4.4, pp. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd N.Y.
- (7) Reilly P. M., Bajramovic R., Blau G. E., Branson D. R., Sauerhoff M. W. (1977). *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models*, Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 614-622.
- (8) Könemann H., Van Leeuwen K. (1980). *Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, pp. 3-19.

PŘÍLOHA 4

Teoretický příklad plánu odběru vzorků pro bioakumulační zkoušky látek s $\log P_{ov} = 4$

Odběr vzorků ryb	Plán dob odběru vzorků		Počet vzorků vody	Počet ryb na vzorek
	Minimální požadovaná četnost (dny)	Dodatečný odběr vzorků		
Fáze příjmu	-1 0		2 ^(*) 2	Přídavek 45 až 80 ryb
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Fáze vylučování				Přenesení ryb do vody neobsahující zkušební chemikálii
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Odběr vzorku vody po dodání alespoň tří „objemů nádrže“.

Hodnoty v závorkách jsou počty vzorků (vody, ryb), které mají být odebrány, je prováděn dodatečný odběr.

Poznámka: Předběžný odhad k_2 pro $\log P_{ov}$ rovný 4,0 je 0,652 den^{-1} . Celková délka experimentu je stanovena na

$3 \times up = 3 \times 4,6$ dnů, tj. 14 dnů. Odhad hodnoty „ up “ viz příloha 3.

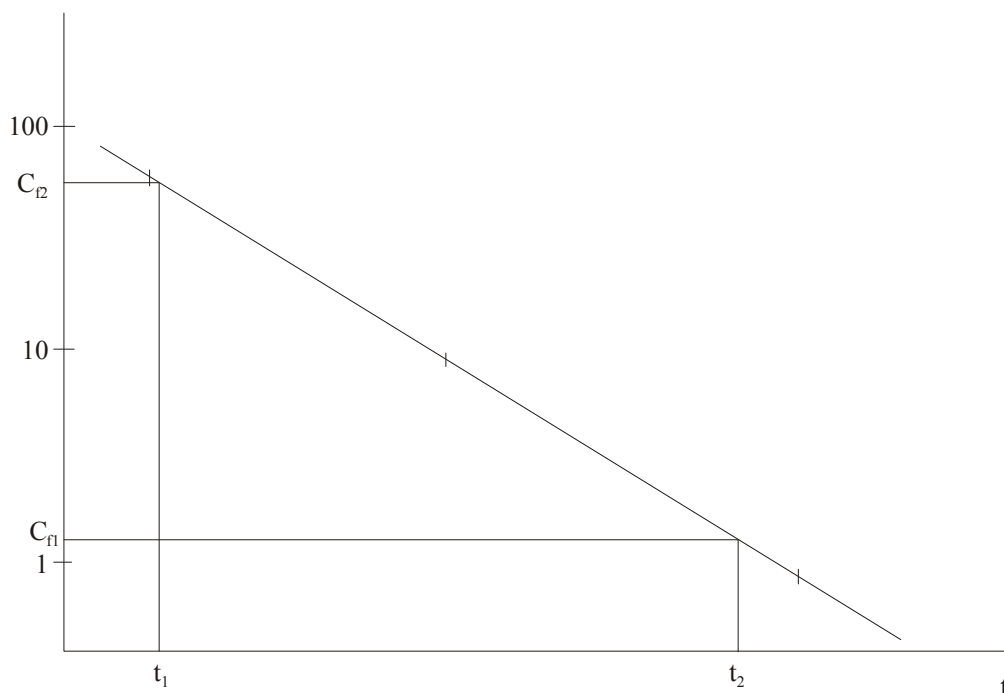
PŘÍLOHA 5 Omezení modelu

U většiny bioakumulačních dat se předpokládá, že jsou „rozumně“ dobře popsány jednoduchým modelem se dvěma kompartmenty/dvěma parametry, jak je patrné z přímkou, která aproximuje body pro koncentrace v rybách během fáze vylučování, je-li vynesena na semilogaritmickém papíru. (Nelze-li tyto body popsat přímkou, měl by být použit složitější model (viz například Spacie a Hamelik, odkaz 1 v příloze 3).

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty vylučování (úbytku) k_2

Koncentrace zkušební látky nalezená v každém vzorku ryb se vynesou na semi-logaritmickém papíru proti času odběru vzorků. Směrnice této přímkou je rovna k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{t_1}/C_{t_2})}{t_2 - t_1}$$



Je třeba si všimnout, že odchylky od přímky mohou znamenat složitější model vylučování, než je kinetika prvního řádu. Pro analýzu typů vylučování, které se odchyľují od kinetiky prvního řádu, mohou být použity grafické metody.

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty příjmu k_1

Při dané konstantě k_2 se k_1 vypočte následujícím způsobem:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (1)$$

Hodnota C_f se odečte ze středního bodu hladké křivky příjmu vytvořené vynesemím logaritmu koncentrace proti času (v lineárním měřítku).

Metoda výpočtu rychlostních konstant příjmu a vylučování (úbytku) s využitím počítače

Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty bioakumulačního faktoru a rychlostních konstant k_1 a k_2 je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Těmito programy se naleznou hodnoty k_1 a k_2 založené na sadě po sobě jdoucích dat koncentrací a na modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (2)$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (3)$$

kde t_c = čas konce fáze příjmu.

Tento přístup poskytuje odhady směrodatné odchylky k_1 a k_2 .

Vzhledem k tomu, že ve většině případů lze odhadnout k_2 z křivky vylučování s relativně vysokou přesností a vzhledem k tomu, že mezi těmito dvěma parametry k_1 a k_2 existuje silná korelace, jsou-li odhadovány současně, může být účelné nejdříve vypočítat k_2 pouze z dat vylučování a následně vypočítat k_1 z dat příjmu pomocí nelineární regrese.

XIV. METODA PRO STANOVENÍ RŮSTU NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH – metoda C.14 podle přílohy směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o

sblížení správních a právních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek (dále jen „směrnice 2001/59/ES“)

XIV.1 **METODA**

Metoda růstové zkoušky pro stanovení toxicity je replikou metody OECD TG 215 (2000).

XIV.1.1 **ÚVOD**

Zkouška je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickým látkám na růst nedospělých ryb. Je založena na metodě pro posouzení účinků chemických látek na růst nedospělého pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) při průtokových podmínkách, která byla vyvinuta v Evropské unii a testována v okružních testech (1, 3). Mohou být použity také jiné dobře popsání druhy. Byly například získány zkušenosti z růstových zkoušek s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) (2, 4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8).

Viz také obecný úvod, část C.

XIV.1.2 **DEFINICE**

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (*Lowest observed effect concentration, LOEC*): je nejnižší zkoušená koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na úrovni pravděpodobnosti falešně pozitivního hodnocení $p < 0,05$). Všechny zkoušené koncentrace vyšší než LOEC musí mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než účinky pozorované při koncentraci LOEC.

NOEC (*no observed effect concentration, koncentrace bez pozorovaných účinků*): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

EC_x: je pro tuto metodu koncentrace zkoušené látky, která vyvolává x% změnu rychlosti růstu ryb ve srovnání s kontrolami.

Velikost násady: je živá hmotnost ryb v jednotce objemu vody.

Hustota obsádky: je počet ryb v jednotce objemu vody.

Individuální specifická rychlost růstu ryby: vyjadřuje rychlost růstu jedince vycházející z jeho výchozí hmotnosti.

Průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž: vyjadřuje střední rychlost růstu populace v nádrži při určité koncentraci.

Pseudospecifická rychlost růstu: vyjadřuje rychlost růstu jednotlivce vycházející ze střední počáteční hmotnosti populace v nádrži.

XIV.1.3 **PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY**

Nedospělé ryby v exponenciální fázi růstu se po zvážení umístí do zkušebních nádrží a vystaví se řadě subletálních koncentrací zkoušené látky nejlépe za průtokových podmínek, nebo, pokud možno za vhodných semistatických podmínek (statické podmínky s obnovením média). Zkouška trvá 28 dnů. Ryby se krmí denně. Přisun potravy se řídí počáteční hmotností ryb a může být po 14 dnech nově vypočten. Na konci zkoušky se ryby opět zváží. Účinky na rychlost růstu se analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x% změnu rychlosti růstu, tj. EC_x (např. EC₁₀, EC₂₀ nebo EC₃₀). Data mohou být popřípadě porovnána s hodnotami pro kontrolní skupiny s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC) a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC).

XIV.1.4 **INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTKE**

Výsledky zkoušky akutní toxicity (viz zkušební metoda C.1) provedené nejlépe na druhu zvolenému pro tuto zkoušku již musí být předloženy. To znamená, že jsou známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a je k dispozici

vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti. Užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota látky, její stálost ve vodě a na světle, pK_a , $P_{o/v}$ a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz zkušební metoda C.4).

XIV.1.5 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny následující podmínky:

- mortalita v kontrolních zkouškách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %,
- nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (skupinách) musí být dostatečný na to, aby umožnil rozeznat minimální významnou změnu rychlosti růstu. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového musí střední hmotnost ryb v kontrolních skupinách vzrůst alespoň o polovinu (tj. o 50 %) jejich počáteční hmotnosti za 28 dnů; např. počáteční hmotnost: 1 g/rybu (= 100 %), konečná hmotnost po 28 dnech: $\geq 1,5$ g/rybu (≥ 150 %),
- koncentrace rozpuštěného kyslíku musí dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,
- teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi lišit o více než ± 1 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v rozsahu teplot stanovených pro zkušební druh (dodatek 1).

XIV.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XIV.1.6.1 Přístroje a pomůcky

Normální laboratorní vybavení a zejména:

- a) oxymetr a pH metr;
- b) vybavení pro stanovení tvrdosti vody a alkality;
- c) vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržitě sledování;
- d) nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučenému nasazování a obsádce (viz bod 1.8.5 a dodatek 1);
- e) vhodné přesné váhy (tj. vážící s přesností na $\pm 0,5$ %).

XIV.1.6.2 Voda

Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH vody by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako CaCO_3). S cílem zajistit, aby ředící voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkušební látky), by měly být v určitých intervalech odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky přijatelné ředící vody jsou uvedeny v dodatku 2.

XIV.1.6.3 Zkušební roztoky

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven nejlépe jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředící vodě (např. mechanickým mícháním nebo sonifikací). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity saturační kolony.

V některých případech může být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné použití rozpouštědel nebo dispergátorů (solubilizačních činidel). Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky rozložitelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těžké sloučeniny je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na růst ryb ani viditelné nepříznivé účinky na nedospělé ryby, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu.

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dává a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, saturační systém). Průtok zásobních roztoků a ředící vody by měl být v průběhu zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je přijatelná výměna vody 6 litrů na gram ryb za den (viz bod 1.8.2.2).

U semistatických zkoušek (s obnovením média) bude častost obnovování média záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat vodu denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje se v intervalu 80 – 120 % nominální koncentrace nebo klesá pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zvážena průtoková zkouška.

XIV.1.6.4 **Výběr druhů**

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) je doporučeným druhem pro tuto zkoušku, neboť u něj bylo v okružních testech získáno nejvíce zkušeností (1, 3). Mohou však být použity jiné dobře popsané druhy, může však být nutné zkušební postup upravit, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. Jsou například zkušenosti s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) (4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8). V takovém případě by měly být uvedeny v závěrečné zprávě důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

XIV.1.6.5 **Chov ryb**

Testovací ryby by měly pocházet z jednoho chovu (nejlépe ze stejného tření), který se alespoň dva týdny před zkouškou udržuje v podmínkách kvality vody a osvětlení, které jsou podobné podmínkám použitým ve zkoušce. V průběhu chovu a v průběhu zkoušky by měly být krmeny množstvím potravy odpovídajícím minimálně 2 % tělesné hmotnosti za den a nejlépe 4 % tělesné hmotnosti za den.

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se následující kritéria:

- mortality vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku;
- mortality od 5 % do 10 % populace: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,
- mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se přijme.

Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

XIV.1.7 USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

„Uspořádáním zkoušky“ se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet ryb v nádrži. Uspořádání by mělo být v ideálním případě zvoleno s ohledem na:

- a) cíl studie;
- b) metodu statistické analýzy, která bude použita;
- c) dostupnost a cenu prostředků pro experiment.

Požadováno je stanovení statistické významnosti, s jakou má být daná velikost změny (např. změny rychlosti růstu) rozeznána, nebo přesnost, s jakou má být odhadnuta hodnota EC_x (např. $x = 10, 20$ nebo 30 , pokud možno ne méně než 10). Bez toho nelze stanovit přesný rozsah studie.

Je důležité vzít na vědomí, že uspořádání, které je optimální při použití jedné metody statistické analýzy (nejlépe využívá prostředky), není nezbytně optimální pro jinou metodu. Doporučené uspořádání pro odhad LOEC/NOEC tedy nebývá stejné jako uspořádání pro analýzu regresí.

V mnoha případech se regresní analýze dává přednost před analýzou variance, a to z důvodů diskutovaných Stephanem a Rogersem (9). Není-li však nalezen vhodný regresní model ($r^2 < 0,9$), měl by být stanoven poměr NOEC/LOEC.

XIV.1.7.1 Uspořádání pro analýzu regresí

Pro uspořádání zkoušky, která má být analyzována regresí, jsou důležité tyto zřetele:

- a) koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. $EC_{10,20,30}$) a rozsah koncentrací, při nichž dochází ke sledovanému účinku. Přesnost, s jakou mohou být odhadnuty koncentrace vyvolávající účinek, bude nejlepší, bude-li koncentrace vyvolávající účinek ležet uprostřed rozsahu zkušebních koncentrací. Při výběru vhodných zkušebních koncentrací mohou být užitečné předběžné orientační zkoušky.
- b) aby mohl být vytvořen uspokojivý statistický model, měla by zkouška zahrnovat alespoň jednu kontrolní nádrž a pět dalších nádrží o různých koncentracích. Podle vhodnosti by při použití solubilizačního činidla měla být vedle zkušebních skupin nasazena jedna kontrolní skupina vystavená koncentraci solubilizačního činidla použité při nejvyšší zkušební koncentraci (viz body 1.8.3 a 1.8.4);
- c) může být použita vhodná geometrická nebo logaritmická řada koncentrací (10) (viz dodatek 3). Upřednostňuje se logaritmické stupňování koncentrací;
- d) je-li k dispozici více než šest nádrží, měly by být další nádrže použity buď pro duplicitní stanovení, nebo by měly být použity pro koncentrace rozložené v rozsahu koncentrací tak, aby se zmenšily rozestupy mezi koncentracemi. Obě použití lze doporučit stejnou měrou.

XIV.1.7.2 Uspořádání pro odhad NOEC/LOEC analýzou variance (ANOVA)

Pro každou koncentraci by měly být nejlépe k dispozici nádrže pro duplicitní stanovení, statistická analýza by měla být provedena pro každou jednotlivou nádrž (11). Bez duplicitních nádrží není možné zohlednit jinou variabilitu mezi nádržemi, než jaká je důsledkem rozdílů mezi jednotlivými rybami. Zkušenosti ale ukazují (12), že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Relativně přijatelnou alternativou je tedy provedení statistické analýzy pro jednotlivé ryby.

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2.

Provádí-li se zkouška s duplicitními nádržemi, měl by být počet duplicitních kontrolních nádrží, a tedy i počet ryb, dvojnásobkem počtu ryb pro každou zkoušenou koncentraci, který by měl být pro všechny koncentrace stejný (13, 14, 15). Nejsou-li naproti tomu duplicitní nádrže použity, měl by být v kontrolní skupině stejný počet ryb jako ve skupině pro každou zkušební koncentraci.

Je-li ANOVA založena na nádržích namísto jednotlivých rybách (což by znamenalo buď ryby jednotlivě označit nebo použít „pseudospecifickou“ rychlost růstu (viz bod 2.1.2)), je nezbytné počet nádrží dostatečně znásobit, aby bylo možné stanovit odchylku pro nádrže v rámci jednotlivé koncentrace. To znamená, že by měl být počet stupňů volnosti pro chybu v analýze variance alespoň 5 (11). Jsou-li duplicitně použity pouze kontroly, existuje nebezpečí, že bude variabilita chyby vychýlena, neboť může narůstat se střední hodnotou dotýčné rychlosti růstu. Vzhledem k tomu, že rychlost růstu s největší pravděpodobností klesá s rostoucí koncentrací, povede to k nadhodnocení variability.

XIV.1.8 POSTUP

XIV.1.8.1 **Výběr a vážení testovacích ryb**

Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 1. Rozpětí individuálních hmotností na začátku zkoušky by mělo být pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce nejlépe $\pm 10\%$ aritmetického průměru hmotností a v žádném případě by nemělo překročit 25% . Doporučuje se zvážit před zkouškou menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti.

24 hodin před zahájením zkoušky se obsádka ryb přestane krmit. Poté se provede náhodný výběr ryb. Za použití běžného anestetika (např. vodný roztok trikainmethansulfonátu (MS 222) o koncentraci 100 mg/l neutralizovaný přídatkem dvou dílů hydrogenuhličitanu sodného na jeden díl MS 222) se ryby jednotlivě s přesností uvedenou v dodatku 1 zváží za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha). Ryby s hmotností v požadovaném rozsahu se náhodně rozdělí do nádrží. Zaznamená se celková živá hmotnost ryb v každé zkušební nádrži. Při manipulaci s rybami za použití anestetik (včetně osušení a zvážení) může u nedospělých ryb, a zejména u druhů o malé velikosti, dojít ke stresu a poranění. S nedospělými rybami se tedy musí manipulovat s nejvyšší opatrností, aby nedošlo u zkušebních ryb ke stresu a poranění.

Ryby se opět zváží po 28 dnech zkoušky (viz bod 1.8.6). Považuje-li se však za nezbytné nově vypočítat přísun potravy, mohou být ryby opět zváženy po 14 dnech zkoušky (viz bod 1.8.2.3). Ke stanovení změn velikosti ryb, na jejichž základě se upravuje přísun potravy, může být použita jiná metoda, např. fotografická metoda.

XIV.1.8.2 **Podmínky expozice**

XIV.1.8.2.1 *Délka expozice*

Zkouška trvá více než 28 dnů.

XIV.1.8.2.2 *Velikost násady a hustota obsádky*

Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky vyhovovaly použitému zkušebnímu druhu (viz dodatek 1). Je-li hustota obsádky příliš vysoká, dojde ke stísnění vedoucímu ke snížené rychlosti růstu a popřípadě k nemocem. Je-li příliš nízká, může vyvolat teritoriální chování, což by mohlo rovněž ovlivnit růst. V každém případě by měla být velikost násady tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60% ASV bez provzdušňování. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je velikost násady 16 ryb o

hmotnosti 3 – 5 g do objemu 40 litrů přijatelná. Doporučené obnovování vody během zkoušky je 6 litrů na gram ryb za den.

XIV.1.8.2.3 *Krmení*

Ryby by měly být krmeny dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 1), aby byla umožněna přijatelná rychlost růstu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. U pstruha duhového by mělo těmto požadavkům vyhovovat množství odpovídající 4 % jejich tělesné hmotnosti za den (3, 16, 17, 18). Denní množství může být rozděleno na dva stejné podíly a podáno rybám dvakrát za den s odstupem alespoň pěti hodin.

Množství se řídí počáteční hmotností ryb v jednotlivé zkušební nádrži. Ryby se opět zváží 14. den a množství se nově vypočte. 24 hodin před vážením se ryby přestanou krmit. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží každý den odstraní důkladným odsátím ze dna každé nádrže.

XIV.1.8.2.4 *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (dodatek 1).

XIV.1.8.3 **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nutných pět koncentrací zkoušené látky, a to bez ohledu na uspořádání zkoušky (viz bod 1.7.2). Při volbě vhodných zkušebních koncentrací by měla pomoci předcházející znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií). Použije-li se méně než pět koncentrací, mělo by být uvedeno odůvodnění. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo, neměla by být jeho konečná koncentrace vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná (viz bod 1.6.3). Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

XIV.1.8.4 **Kontrolní skupiny**

Počet kontrolních skupin v ředící vodě závisí na uspořádání zkoušky (viz body 1.7 až 1.7.2). Použije-li se solubilizační činidlo, měl by být nasazen stejný počet kontrolních skupin se solubilizačním činidlem jako s ředící vodou.

XIV.1.8.5 **Častost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se v pravidelných intervalech (viz níže) stanovují koncentrace zkoušené látky

Při průtokových zkouškách se průtok zásobních roztoků toxické látky a ředící vody kontroluje v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Očekávají-li se změny koncentrace zkoušené látky v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. od 80 – 120 %, viz body 1.6.2 a 1.6.3), doporučuje se, aby byly nejnižší a nejvyšší zkoušené koncentrace analyzovány na začátku zkoušky a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se (na základě dat o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to stejně často jako u stabilních látek. U semistatických zkoušek (s obnovením média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se doporučuje analyzovat nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie ihned po jejich přípravě a bezprostředně před obnovením a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, musí být všechny koncentrace analyzovány stejně často jako u stabilnějších látek.

Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace zkoušené látky v roztoku uspokojivě udržována v rozmezí $\pm 20\%$ nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených hodnotách.

Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr velikostí pórů $0,45\ \mu\text{m}$) nebo odstředit. Doporučuje se odstředování. Filtrace je přípustná jen nedsorbuje-li se zkoušená látka na filtry.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost, alkalita a popřípadě solnost se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a solnost (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, nejlépe před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každé výměny vody u statických zkoušek a alespoň týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody a alkalita se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

XIV.1.8.6 **Pozorování**

Hmotnost: na konci každé zkoušky se musí ryby, které přežily, zvážit za účelem XIV.stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha), a to buď jako skupina pro každou zkušební nádrž, nebo jednotlivě. Vážení ryb jako skupin se upřednostňuje před vážení jednotlivých ryb, které vyžaduje, aby byly ryby jednotlivě označeny. V případě vážení jednotlivých ryb pro stanovení individuální specifické rychlosti růstu by neměla zvolená technika označení vyvolávat u ryb stres (alternativou ke značení ryb vymražením značky může být popřípadě použití barevného rybářského vlasce).

Ryby se v průběhu zkoušky vyšetřují denně a zaznamenávají se jakékoli odchylky (hemoragie, odbarvení) a neobvyklé chování. Každý úhyn se zaznamená a uhynulé ryby se co nejdříve odstraní. Uhynulé ryby se nenahrazují, neboť velikost násady a hustota obsádky by měly být dostatečné na to, aby nedošlo k ovlivnění růstu v důsledku změn počtu ryb. Bude však nutné upravit množství krmiva.

XIV.2

DATA A ZPRÁVY

XIV.2.1

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Doporučuje se, aby se návrhu zkoušky i analýzy výsledků zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, v počtu ryb. Pokud jde o možnosti uspořádání zkoušky, nejsou zde uvedeny žádné pokyny.

Rychlost růstu se nevypočítává pro zkušební nádrže, v nichž mortalita překročila 10% . Velikost mortality se ale uvede pro všechny zkušební koncentrace.

Bez ohledu na použitou metodu je hlavním ukazatelem specifická rychlost růstu r od okamžiku t_1 do t_2 . Může být definována několika způsoby v závislosti na tom, zda jsou či nejsou ryby individuálně značeny nebo zda se požaduje průměrná hodnota pro nádrž.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde:

r_1 = individuální specifická rychlost růstu ryby

r_2 = průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž

r_3 = „pseudospecifická“ rychlost růstu

w_1, w_2 = hmotnosti určité ryby v čase t_1 a t_2

$\log_e w_1$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na začátku vyšetřovacího intervalu

$\log_e w_2$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na konci vyšetřovacího intervalu

$\overline{\log_e w_1}$ = průměr logaritmů hodnot w_1 pro ryby v nádrži na začátku vyšetřovacího intervalu

$\overline{\log_e w_2}$ = průměr logaritmů hodnot w_2 pro ryby v nádrži na konci vyšetřovacího intervalu

t_1, t_2 = čas (ve dnech) začátku a konce vyšetřovacího intervalu

r_1, r_2, r_3 mohou být vypočteny pro interval 0 – 28 dnů a popřípadě (bylo-li provedeno měření 14. den) pro intervaly 0 – 14 a 14 – 28 dnů.

XIV.2.1.1 **Analýza výsledků regrese (modelování závislosti koncentrace – odezva)**

Touto metodou se závislostí mezi specifickou rychlostí růstu a koncentrací proloží vhodná matematická funkce, a to umožní odhadnout „ EC_x “, tj. jakoukoli požadovanou hodnotu EC . U této metody není nutný výpočet r pro jednotlivou rybu (r_1) a namísto toho se analýza založí na průměrné hodnotě r (r_2) pro nádrž. Dává se přednost poslední uvedené metodě. Je také vhodnější při použití velmi malých druhů.

Průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (r_2) se graficky vynesou proti koncentraci kvůli kontrole závislosti odezvy.

K vyjádření závislosti r_2 na koncentraci se zvolí vhodný model; jeho volba musí být řádně zdůvodněna.

Liší-li se pro jednotlivé nádrže počty ryb, které přežily, prokládá se vážený model s cílem zohlednit různé velikosti skupin.

Metoda proložení modelu musí umožnit odhadnout například hodnotu EC_{20} a stanovit její rozptyl (buď směrodatnou odchylku nebo interval spolehlivosti). Graf proloženého modelu se vynesou spolu s daty, aby byla zřejmá vhodnost použitého modelu (9, 19, 20, 21).

XIV.2.1.2 **Analýza výsledků pro stanovení LOEC**

Bylo-li ve zkoušce použito pro každou koncentraci více nádrží, může být odhad LOEC založen na analýze variance (ANOVA) průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (viz bod 2.1) následované vhodným srovnáním průměrné hodnoty r pro každou koncentraci s průměrnou hodnotou r pro kontrolní skupiny (např. Dunnettovým nebo Williamsovým testem (13, 14, 15, 22)), aby se zjistila nejmenší koncentrace, u níž je na úrovni pravděpodobnosti 0,05 rozdíl významný. Nejsou-li předpoklady pro použití parametrických metod splněny, kvůli jinému než normálnímu rozdělení (např. se použije Shapiro-Wilkův test) nebo kvůli heterogennímu rozptylu (Bartlettův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace dat za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA.

Není-li pro každou koncentraci počet nádrží znásoben, nebude ANOVA u jednotlivé nádrže citlivá nebo bude nemožná. V takovém případě je přijatelným

kompromisem založit ANOVA na „pseudospecifické“ rychlosti růstu r_3 nebo na jednotlivých rybách.

Průměrná hodnota r_3 pro každou koncentraci může být poté porovnána s průměrnou hodnotou r_3 pro kontrolní skupiny. Hodnotu LOEC lze poté nalézt výše uvedeným způsobem. Je třeba vzít na vědomí, že tato metoda neumožňuje zohlednit variabilitu mezi nádržemi ve větší míře, než s jakou se počítá v důsledku variability mezi rybami, a ani před ní nechrání. Ukázalo se však (9), že variabilita mezi nádržemi byla ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami) velmi malá. Nejsou-li v analýze využity jednotlivé ryby, musí být ve zprávě uvedena metoda nalezení odlehklých hodnot a její použití musí být zdůvodněno.

XIV.2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky je třeba interpretovat opatrně, leží-li naměřené hodnoty koncentrací toxické látky v roztocích blízko meze stanovitelnosti analytické metody, nebo klesá-li u semistatických zkoušek koncentrace zkoušené látky od okamžiku přípravy roztoku do jeho obnovení.

XIV.2.3 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XIV.2.3.1 Zkoušená látka

- fyzikální stav a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- údaje o chemické identitě včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

XIV.2.3.2 Testovací druh

- vědecký název, podle možnosti,
- kmen, velikost, původ, jakákoli příprava atd.,

XIV.2.3.3 Zkušební podmínky

- použitý zkušební postup (např. semistatický/s obnovením, průtokový, nasazování, hustota obsádky atd.),
- uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží, zkušební koncentrace a znásobení počtu nádrží, počet ryb v nádrži),
- metoda přípravy zásobních roztoků a častost obnovování (je-li použito, uveďte se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- nominální zkušební koncentrace, střední hodnota naměřených hodnot v jednotlivých nádržích, její směrodatná odchylka a metody jejich stanovení a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené látky v pravém roztoku,
- charakteristiky ředící vody: pH, alkalita, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě solnost zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

XIV.2.3.4 Výsledky

- doklady o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kritériu přežití, a data o mortalitě pro každou zkušební koncentraci,
- použité metody statistické analýzy, statistiky založené na znásobeném počtu nádrží nebo na jednotlivých rybách, zpracování dat a zdůvodnění použitých metod,

- data ve formě tabulky o individuálních a středních hodnotách hmotností ryb v den 0, 14 (bylo-li prováděno vážení) a 28, hodnoty průměrných rychlostí růstu pro nádrž nebo popřípadě pseudospecifických rychlostí růstu pro intervaly 0 – 28 dnů nebo popřípadě 0 – 14 a 14 – 28 dnů,
- výsledky statistické analýzy (tj. regresní analýzy nebo ANOVA) nejlépe ve formě tabulky nebo v grafické formě a hodnota LOEC ($p = 0,05$) a NOEC nebo EC_x , popřípadě se směrodatnými odchylkami,
- výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou látkou.

XIV.3

LITERATURA

- (1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.
- (2) Meyer, A., Bierman, C. H., Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252, 231-236.
- (3) Ashley S., Mallett M. J., Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, 1855-1870.
- (5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N., Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, 157-164.
- (6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japonsko.
- (7) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N., Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 287-297.
- (8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W., Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (9) Stephan C. E., Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner, D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Filadelfie, 328-338.
- (10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 str.
- (11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10.– 12. prosinec 1991.

- (13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 20, 482-491.
- (15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 27, 103-117.
- (16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture*, 120, 123-133.
- (17) Quinton, J. C., Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 str.
- (19) Bruce, R. D., Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D., McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 str.
- (22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 28, 510-531.

DODATEK 1

DRUHY RYB DOPORUČNÉ KE ZKOUŠENÍ A VHODNÉ ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Druhy	Doporučený rozsah zkušební teploty (°C)	Fotoperioda (h)	Doporučené rozpětí počáteční hmotnosti ryb (g)	Doporučená přesnost měření	Velikost násady (g/l)	Hustota obsádky (l ⁻¹)	Krmivo	Délka zkoušky (d)
Doporučené druhy: <i>Oncorhynchus mykiss</i> pstruh duhový	12,5-16,0	12-16	1-5	na 100 mg	1,2-2,0	4	sušené krmivo pro plůdek lososovitých ryb	≥ 28
Jiné dobře popsané druhy: <i>Danio rerio</i> danio pruhované	21-25	12-16	0,050-0,100	na 1 mg	0,2-1,0	5-10	živé krmivo (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> halančík japonský	21-25	12-16	0,050-0,100	na 1 mg	0,2-1,0	5-20	živé krmivo (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

DODATEK 2
NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrace
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Nedisociovaný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenylly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

DODATEK 3
LOGARITMICKÁ ŘADA KONCENTRACÍ VHODNÁ PRO ZKOUŠKU TOXICITY (9)

Sloupec (počet koncentrací mezi 100 a 10, nebo mezi 10 a 1) (1)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

¹ Ze sloupců může být zvolena řada pěti (nebo více) po sobě jdoucích koncentrací. Mezilehlé body pro koncentrace ve sloupci (x) jsou uvedeny ve sloupci (2x + 1). Uvedené hodnoty mohou být koncentracemi vyjádřenými v objemových nebo hmotnostních procentech (mg/l nebo µg/l). Hodnoty mohou být podle potřeby násobeny nebo děleny jakoukoli mocninou 10. Řada ve sloupci 1 by mohla být použita při značné nejistotě, pokud jde stupeň toxicity.

XV. METODA PRO STANOVENÍ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH A POTĚRU - KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA – metoda C.15 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XV.1 METODA

Tato zkouška krátkodobé toxicity je replikou metody OECD TG 212 (1998).

XV.1.1 ÚVOD

Tato zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku je krátkodobou zkouškou, při níž jsou exponována životní stádia od čerstvě oplodněných jiker do stadia váčkových plůdků. Při zkoušce na embryu a

na váčkovém plůdku se nekrmí, zkouška by tedy měla být ukončena dokud je váčkový plůdek stále vyživován ze žloutkového váčku.

Zkouška je určena k zjištění letálních a v omezené míře subletálních účinků chemických látek na specifická stadia a testovací druhy. Tato zkouška by měla poskytnout užitečné informace, neboť by a) mohla být přechodem mezi letálními a subletálními zkouškami, b) mohla být použita jako screeningová zkouška pro úplnou zkoušku toxicity na časných vývojových stádiích nebo pro zkoušky chronické toxicity a c) mohla by být použita pro zkoušení na druzích, u nichž nejsou dostatečně rozvinuty chovné techniky, aby pokryly období od endogenního k exogennímu vyživování.

Je třeba mít na paměti, že pouze zkoušky pokrývající celý životní cyklus ryb obecně umožňují odhadnout chronickou toxicitu chemické látky pro ryby a že jakékoli omezení expozice nějakého životního stadia může snížit citlivost a tím podhodnotit chronickou toxicitu. Očekává se tedy, že zkouška na embryu a váčkovém plůdku je méně citlivá než úplná zkouška na časných vývojových stádiích, zejména pokud jde o vysoce lipofilní chemické látky ($\log P_{o/v} > 4$) a chemické látky se specifickým mechanismem účinku. V citlivostech těchto dvou zkoušek se však očekávají menší rozdíly v případě chemických látek s nespecifickým, narkotickým mechanismem účinku (1).

Před publikováním této zkoušky bylo nejvíce zkušeností s touto zkouškou na embryu a váčkovém plůdku získáno u sladkovodní ryby *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae* – obecný název danio pruhované). Podrobnější pokyny pro zkoušku s tímto druhem jsou tedy uvedeny v dodatku 1. To nevylučuje použití jiného druhu, pro který jsou zkušenosti rovněž k dispozici (tabulky IA a IB).

XV.1.2 DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (*Lowest observed effect concentration, LOEC*): je nejnižší zkoušená koncentrace zkoušené látky, při níž jsou pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na úrovni pravděpodobnosti falešně pozitivního hodnocení $p < 0,05$). Všechny zkoušené koncentrace vyšší než LOEC musí mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než účinky pozorované při koncentraci LOEC.

NOEC (*no observed effect concentration, koncentrace bez pozorovaných účinků*): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

XV.1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Embrya a váčkové plůdky se vystaví rozsahu koncentrací zkoušené látky rozpuštěné ve vodě. Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním. Volba závisí na povaze zkoušené látky. Zkouška se zahájí umístěním oplodněných jiker do zkušebních nádrží a ukončí se těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku čerstvých plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Posoudí se letální a subletální účinky a porovnají se s kontrolními hodnotami s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky, tedy koncentraci bez pozorovaných účinků. Účinky mohou být eventuálně analyzovány za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci,

kteřá způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek (tj. LC/EC_x, kde x je definovaný procentuální účinek).

XV.1.4 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být dostupné výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.1) provedené nejlépe na druhu zvolenému pro tuto zkoušku. Výsledky mohou být užitečné při výběru vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkoušce na časných vývojových stádiích. Měly by být známy rozpustnost látky ve vodě (včetně rozpustnosti ve zkušební vodě) a tlak par látky. Měla by být k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek jsou strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, pK_a, P_{o/v} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

XV.1.5 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny následující podmínky:

- celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách a podle potřeby v nádržích, do nichž bylo přidáno pouze rozpouštědlo, musí být vyšší nebo rovna limitům stanoveným v dodatcích 2 a 3,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku musí ležet mezi 60 a 100 % nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,
- teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi nebo den ode dne lišit o více než ± 1,5 °C a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro zkušební druh (dodatky 2 a 3).

XV.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XV.1.6.1 Zkušební nádrže

Mohou být použity jakékoli nádrže ze skla nebo z jiného inertního materiálu. Rozměry zkušebních nádrží by měly být dostatečné k tomu, aby vyhovovaly velikosti násady (viz bod 1.7.1.2). Doporučuje se, aby byly nádrže umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Uspořádání do náhodných bloků s možností expozice v každém bloku se upřednostňuje před zcela náhodným uspořádáním, když existují systémové účinky v laboratoři, které mohou být blokovým uspořádáním kontrolovány. Je-li použito blokové uspořádání, mělo by být zohledněno při následné analýze dat. Nádrže by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy.

XV.1.6.2 Výběr druhů ryb

Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v tabulce 1A. To nevylučuje použití jiného druhu (příklady jsou uvedeny v tabulce 1B), zkušební postup musí být ale upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

XV.1.6.3 Chov matečných ryb

Podrobnosti o chovu matečných ryb v uspokojivých podmínkách jsou uvedeny v metodě OECD TG 210 ⁽¹⁾ a v literatuře (2, 3, 4, 5, 6).

XV.1.6.4 Chov embryí a plůdků

Embrya a čerstvě vykulené plůdky mohou být exponovány v hlavní nádrži v menších nádobách s pletivovými stěnami nebo uzávěry, aby jimi mohl proudit zkušební roztok. Nevířivého průtoku nádobami lze dosáhnout

⁽¹⁾ OECD, Paris 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Toxicity Test

jejich zavěšení do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny; lze rovněž použít syfonový systém přítoku a výpusti. Oplodněné jikry lososovitých ryb mohou ležet na podložce nebo pletivu s dostatečně velkými oky, aby jimi mohly plůdky po vylíhnutí propadnout. K přemístění embryí a plůdků v semistatické zkoušce s každodenní úplnou výměnou média je vhodné použít Pasteurovy pipety. (viz bod 1.6.6).

Jsou-li k udržení jiker v hlavní nádrži použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny ⁽¹⁾, pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku ryb. Je-li třeba plůdky přemístit, neměly by být vystaveny vzduchu a neměly by se k jejich vytažení z nádob používat síťky (taková opatrnost není nutná u méně křehkých druhů, např. u kapra). Okamžik přemístění se liší podle druhu a nemusí být vždy nutný. U semistatických technik mohou být použity kádinky nebo mělké nádoby a podle potřeby mohou být opatřeny sítím umístěným nepatrně nad dnem kádinky. Je-li objem těchto nádob dostatečný, aby vyhovoval požadavkům na nasazování (viz bod 1.7.1.2) nemusí být přemístění embryí nebo plůdků nutné.

XV.1.6.5 **Voda**

Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoliv voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přijatelné ředící vody, jak jsou uvedeny v dodatku 4 a v níž testovací druhy kontrolních skupin přežívají alespoň tak, jak je uvedeno v dodatcích 2 a 3. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. pH by se nemělo měnit o více než $\pm 0,5$. Pro ujištění, že ředící voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO₄), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

XV.1.6.6 **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být nejlépe připraven jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředící vodě (např. mechanickým mícháním a sonifikací). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity saturační kolony. Neměla by být používána rozpouštědla nebo dispergátory (solubilizační činidla), v některých případech však může být použití takových látek pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky rozložitelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba

používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na časná vývojová stádia, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědлу. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

U semistatických technik mohou být použity dva různé postupy obměny; buď i) se do čistých nádob připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se s malým objemem starého roztoku opatrně přemístí do nových nádob, aniž by se vystavily vzduchu, nebo ii) se testovací organismy ponechají v nádobě a vymění se určitý podíl (alespoň tři čtvrtiny) zkušební vody. Častost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat médium denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje se v intervalu 80 – 120 % nominální koncentrace nebo klesá pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zvážena průtoková zkouška. V každém případě je třeba dbát na to, aby plůdky nebyly při obnovování vody vystaveny stresu.

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, saturační systém). Průtok zásobních roztoků a ředící vody by měl být kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Jako vhodný by shledán průtok zajišťující výměnu alespoň pěti objemů nádrže za 24 h (2).

XV.1.7 POSTUP

Užitečné informace o provádění zkoušek toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku jsou dostupné v literatuře, přičemž některé literární zdroje (7, 8, 9) jsou uvedeny v tomto textu v oddílu s literaturou.

XV.1.7.1 **Podmínky expozice**

XV.1.7.1.1 *Délka expozice*

Zkouška se zahájí nejlépe do 30 minut po oplodnění jiker. Embrya se ponoří do zkušební roztoku před započítáním rýhování blastuly, nebo co nejdříve po něm, a v každém případě před počátkem stádia gastruly. U jiker získaných od komerčního dodavatele nemusí být možné zahájit zkoušku ihned po oplodnění. Vzhledem k tomu, že citlivost zkoušky může být závažně ovlivněna zpožděním začátku zkoušky, měla by být zkouška zahájena do osmi hodin po oplodnění. Vzhledem k tomu, že se plůdky v průběhu expozice nekrmí, ukončí se zkouška těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku u plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Délka zkoušky bude záviset na použitém druhu. Některé doporučené délky zkoušky jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3.

XV.1.7.1.2 *Nasazování*

Počet oplodněných jiker na začátku zkoušky by měl být dostatečný ke splnění statistických požadavků. Měly by být k expozici náhodně rozděleny a na jednu koncentraci by mělo být rozděleno alespoň 30 jiker rovným dílem (nebo alespoň jak je to jen možné s ohledem na to, že u některých druhů může být obtížné získat stejně velké podíly) mezi alespoň

tři další zkušební nádrže. Velikost násady (biomasa v jednotce objemu) by měla být tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % ASV bez provzdušňování. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřekračující 0,5 g/l za 24 h a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku (2).

XV.1.7.1.3 *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota zkušební vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (dodatky 2 a 3). Pro sledování teploty může sloužit další zkušební nádrž.

XV.1.7.2 **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nezbytných pět koncentrací zkoušené látky lišících se od sebe faktorem nepřekračujícím 3,2. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měla být zohledněna křivka závislosti hodnoty LC_{50} na délce expozice ve studii akutní toxicity. Za určitých okolností může být oprávněné použít méně než pět koncentrací, např. v limitní zkoušce, a užší rozsah koncentrací. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Koncentrace látky, které jsou vyšší než 96hodinová LC_{50} nebo vyšší než 100 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušební vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo (viz bod 1.6.6), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádrži vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná.

XV.1.7.3 **Kontrolní skupiny**

Jako další zkušební sady by měly být nasazeny kontrolní skupina v ředici vodě (příslušným způsobem znásobená) a podle potřeby také jedna kontrolní skupina se solubilizačním činidlem (příslušným způsobem znásobená).

XV.1.7.4 **Častost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek, pokud se předpokládá, že se bude zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí $\pm 20\%$ nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 %, viz bod 1.4 a 1.6.6), se doporučuje analyzovat nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie ihned po jejich přípravě a bezprostředně před obnovením alespoň v nejméně třech nádržích (tj. analýzy se provedou na vzorku téhož roztoku – ihned po jeho přípravě a při jeho výměně).

U zkoušek, u nichž se (na základě dat o stálosti látky) předpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí větším než $\pm 20\%$ nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkoušené koncentrace ihned po jejich přípravě a před jejich výměnou, a to stejně často (tj. alespoň ve třech okamžicích rovnoměrně rozložených přes celkovou dobu zkoušky). Stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením je třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádrže. Stanovení se provádějí v odstupu ne více než 7 dnů. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace uspokojivě udržována v rozmezí

± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách.

Pro průtokové zkoušky je vhodný podobný vzorkovací režim, jako je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Je-li zkouška delší než sedm dnů, doporučuje se zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé.

Může být nezbytné vzorky odstředit nebo filtrovat (např. přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm). Vzhledem k tomu, že však odstředění ani filtrace vždy neoddelí od sebe biologicky dostupný a biologicky nedostupný podíl zkušební látky, nemusí být vzorky takto zpracovány.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost a solnost se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a solnost (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, nejlépe před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každé výměny vody u semistatických zkoušek a alespoň týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří denně, nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

XV.1.7.5 **Pozorování**

XV.1.7.5.1 *Stádia vývoje embrya*

Embryonální stádium (tj. stadium gastruly) na začátku expozice zkoušené látky by mělo být identifikováno co nejpřesněji. Lze to provést za použití reprezentativního vzorku vhodně uchovávaných a očištěných jiker. Popis a vyobrazení embryonálních stádií lze také nalézt v literatuře (2, 5, 10, 11).

XV.1.7.5.2 *Líhnutí a přežívání*

Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Může být žádoucí provádět na začátku zkoušky častější pozorování (např. každých 30 min během prvních tří hodin), neboť v některých případech mohou být důležitější doby přežití než pouhé počty úhynů (např. dochází-li k akutním toxickým účinkům). Uhynulá embrya a plůdky se odstraní ihned po nalezení, neboť se rychle rozkládají. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se nezasáhlo do sousedních jiker/plůdků nebo aby se tyto fyzicky nepoškodily, neboť jsou mimořádně subtilní a citlivé. Kritéria uhynutí se u životních stádií liší:

- **u jiker:** zejména v časných stádiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolané koagulací a/nebo sražením bílkovin vedoucími k bílému zakalení,
- **u embryí:** absence pohybu nebo tepu srdce nebo neprůsvitné zbarvení u druhů, jejichž embrya jsou za normálních okolností průsvitná,
- **u plůdků:** nepohyblivost nebo absence dýchacích pohybů nebo tepu srdce nebo bílé neprůsvitné zbarvení centrálního nervového systému a nedostatečná reakce na mechanické podněty.

XV.1.7.5.3 *Neobvyklý vzhled*

Počet plůdků vykazujících neobvyklý tělesný vzhled nebo pigmentaci a stav absorpce žloutkového váčku se zaznamenávají v přiměřených intervalech závislejících na délce zkoušky a na povaze popisované odchylky. Je třeba si uvědomit, že neobvyklá embrya a plůdky se přirozeně vyskytují a u některých druhů jich může být v kontrolních skupinách řádově několik procent. Neobvyklí jedinci by měli být ze zkušební nádrže odstraněni pouze v případě uhynutí.

XV.1.7.5.4 *Neobvyklé chování*

Odchylky, např. hyperventilace, nekoordinované plavání a netypická nečinnost se zaznamenávají v přiměřených intervalech závislejících na délce zkoušky. Tyto účinky, přestože je obtížné je kvantifikovat, mohou – jsou-li pozorovány – napomoci interpretovat data o mortalitě, tj. mohou poskytnout informace o mechanismu toxického působení látky.

XV.1.7.5.5 *Tělesná délka*

Na konci zkoušky se doporučuje změřit individuální délku: může být změřena standardní délka, délka těla (the fork length) nebo celková délka. Došlo-li však k uhnutí ocasní ploutve nebo k erozi ploutví, použije se standardní délka. Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro délku mezi jednotlivými kontrolními skupinami $\leq 20\%$.

XV.1.7.5.6 *Hmotnost*

Na konci se zkoušky lze stanovit jednotlivé hmotnosti; hmotnost za sucha (24 h při 60 °C) se upřednostňuje před živou váhou (po osušení do sucha). Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro hmotnost mezi jednotlivými kontrolními skupinami $\leq 20\%$.

Tato pozorování povedou k některým nebo ke všem následujícím údajům, které budou k dispozici pro statistickou analýzu:

- kumulativní mortalita,
- počet zdravých plůdků na konci zkoušky,
- čas začátku líhnutí a konce líhnutí (tj. 90% vylíhnutí v každé paralelní skupině),
- počet plůdků vylíhnutých každý den,
- délka (a hmotnost) ryb, které přežily do konce zkoušky,
- počet plůdků, které jsou deformované nebo mají neobvyklý vzhled,
- počet plůdků vykazujících neobvyklé chování.

XV.2 **DATA A ZPRÁVY**

XV.2.1 **ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Doporučuje se, aby se návrhu zkoušky i analýzy výsledků zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, ve výchozím počtu oplodněných jiker v měřených parametrech. Pokud jde o možnosti uspořádání zkoušky, nejsou zde uvedeny žádné pokyny.

Mají-li být odhadnuty hodnoty LOEC/NOEC, bude nezbytné analyzovat odchylky pro každou sadu paralelních skupin pomocí analýzy variance (ANOVA) nebo pomocí kontingenční tabulky. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny může být užitečný Dunnettův test (12, 13). K dispozici jsou další užitečné příklady (14, 15). Vypočte se a uveďte stupeň účinku, který lze prokázat pomocí ANOVA nebo jiných metod (tj. vypovídací schopnost zkoušky).

Je třeba si uvědomit, že ne všechna pozorování uvedená v bodě 1.7.5.6 jsou vhodná pro statistickou analýzu pomocí ANOVA. Například kumulativní mortalita a počet zdravých plůdků na konci zkoušky by mohly být analyzovány probitovými metodami.

Mají-li být odhadnuty LC nebo EC_x , proloží se daty vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logaritmická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka nebo křivky by měly být tak parametrizovány, aby bylo možné přímo odhadnout požadované hodnoty LC nebo EC_x a jejich směrodatné odchylky. To značně usnadňuje výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnoty LC nebo EC_x . Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uvede se oboustranný 95% interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. Proložení lze provést graficky. Regresní analýza je vhodná pro všechna pozorování uvedená v bodě 1.7.5.6.

XV.2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace toxické látky ve zkušebních roztocích pohybují na úrovních blízkých mezi stanovitelnosti analytické metody. Interpretace výsledků pro koncentrace vyšší než je rozpustnost látky ve vodě by měla být rovněž opatrná.

XV.2.3 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XV.2.3.1 **Zkoušená látka**

- fyzikální stav a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- údaje o chemické identitě včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

XV.2.3.2 **Testovací druh**

- vědecký název, kmen, počet matečných ryb (tj. kolik samic bylo ve zkoušce použito pro opatření požadovaného počtu jiker), zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

XV.2.3.3 **Zkušební podmínky**

- použitá zkušební metoda (např. semistatická nebo průtoková metoda, doba od oplodnění do začátku zkoušky, nasazování atd.),
- fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží a jejich znásobení, počet embryí v nádrži),
- metoda přípravy zásobních roztoků a častost obnovení (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- nominální zkušební koncentrace, naměřené hodnoty ve zkušebních nádržích, jejich střední hodnoty a směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a je-li zkoušená látka rozpustná ve vodě v koncentracích nižších, než jsou vyšetřované koncentrace, uvede se důkaz toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentraci zkoušené látky v roztoku,
- charakteristiky ředící vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah

suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

- kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku.

XV.2.3.4 **Výsledky**

- výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,
- doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily obecné požadavky na přijatelnost přežití pro testovací druh (dodatky 2 a 3),
- údaje o mortalitě nebo přežití v embryonálním stádiu a ve stádiu plůdku a údaje o celkové mortalitě nebo přežití,
- doba do vylíhnutí, počet vylíhnutých jedinců,
- údaje o délce (a hmotnosti),
- výskyt a popis morfologických odchylek, pokud se vyskytly,
- výskyt a popis účinků na chování, pokud se vyskytly,
- statistická analýza a zpracování dat,
- u zkoušek analyzovaných pomocí ANOVA nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na úrovni pravděpodobnosti falešně pozitivního hodnocení $p = 0,05$ a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou reakci, včetně popisu použité statistické metody a údaje o tom, jak velký účinek bylo možné odhalit,
- u zkoušek analyzovaných pomocí regresních metod, hodnoty LC a EC_x a intervaly spolehlivosti a graf proloženého modelu použitého pro jejich výpočet,
- vysvětlení jakékoli odchylky od této zkušební metody.

XV.3 **LITERATURA**

- (1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 str., červen 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 str.
- (3) Brauhn J. L., Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. str. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A., Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. str. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. *A Literature Review. J. Biol.* 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *Copeia*, 4, 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B., Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 61-71.

- (8) Birge J. W., Black J. A., Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, 807-821.
- (9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A., Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Aquatic Toxicology*, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R. V., W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V., W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 str.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H., Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfie.
- (15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M., Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, prosinec 1992, 81 str.
- (17) Dave G., Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H., Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F., Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 32, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, prosinec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H., Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1189-1203.

- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 str.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, v: W. S. Hoar, D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, 1-58.

TABULKA 1A: Druhy ryb doporučené pro zkoušku

Sladkovodní
<i>Oncorhynchus mykiss</i> pstruh duhový (9, 16)
<i>Danio rerio</i> danio pruhované (7, 17, 18)
<i>Cyprinus caprio</i> kapr obecný (8, 19)
<i>Oryzias latipes</i> halančík japonský (20, 21)
<i>Pimephales promelas</i> střevle (8, 22)

TABULKA 1B: Příklady dalších dobře popsanych druhů, které byly také použity

Sladkovodní	Mořské
<i>Carassius auratus</i> karas zlatý (8)	<i>Menidia peninsulae</i> (23, 24, 25)
<i>Lepomis macrochirus</i> slunečnice modrá (8)	<i>Clupea harengus</i> sleď (24, 25)
	<i>Gadus morhua</i> treska (24, 25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> (23, 24, 25)

DODATEK 1

NÁVOD K PROVEDENÍ ZKOUŠKY TOXICITY NA EMBRYÍCH A VÁČKOVÝCH PLŮDCÍCH DANIA PRUHOVANÉHO (*BRACHYDANIO RERIO*)

ÚVOD

Danio pruhované pochází z indického pobřeží Coromandel, kde žije v bystrinách. Je běžnou akvarijní rybou z čeledi kaprovitých. Informace o péči o něj a o jeho chovu jsou uvedeny v standardních příručkách o tropických rybách. Přehled jeho biologie a použití ve výzkumu ryb podává Laale (1).

Ryba zřídka dorůstá délky více než 45 mm. Má válcové tělo se 7 – 9 horizontálními tmavě modrými stříbřitými pruhy. Pruhy pokračují přes ocasní a řitní ploutve. Hřbet má olivově zelený. Samečci jsou štíhlejší než samičky. Samičky jsou stříbrnější a mají rozšířené břicho, zejména před třením.

Dospělé ryby dokáží snášet velké kolísání teploty, pH a tvrdosti vody. Mají-li se získat zdravé ryby poskytující jikry dobré kvality, měly by být zajištěny optimální podmínky.

Při tření sameček sleduje samičku, doráží na ni a při vypuzení jiker je oplodní. Jikry, které jsou průsvitné a nejsou přilnavé, dopadají na dno, kde mohou být požřeny

rodiči. Na tření má vliv světlo. Při odpovídajícím ranním světle se ryby třou v prvních hodinách po rozednění.

Samička může klást v odstupu jednoho týdne dávky o několika tisících jiker.

PODMÍNKY PRO MATEČNÉ RYBY, REPRODUKCE A ČASNÁ VÝVOJOVÁ STÁDIA

Vybere se vhodný počet zdravých ryb, které se alespoň dva týdny před předpokládaným třením udržují ve vhodné vodě (např. dodatek 4). Skupiny ryb by měly mít možnost se před kladením jiker pro zkoušku alespoň jednou vytřít. Hustota obsádky ryb by v tomto období neměla přesáhnout 1 gram ryb na litr. Pravidelná výměna vody nebo použití přečišťovacího systému umožní obsádku zvýšit. Teplota v chovných nádržích se má udržovat na 25 ± 2 °C. Ryby by měly dostávat rozmanitou stravu, která může obsahovat například komerční suché krmivo, čerstvě vylíhnuté *Artemia*, chironomidy, dafnie, bílé červy (Enchytraeids).

Dále jsou uvedeny dvě metody, které v praxi vedly k získání dostatečného množství zdravých oplodněných jiker pro provedení zkoušky:

- i) Osm samiček a 16 samečků se umístí do nádrže obsahující 50 litrů ředící vody, chráněné před přímým světlem a ponechají se alespoň 48 h co nejvíce v klidu. Na dno nádrže se odpoledne v den před započítáním zkoušky umístí podložka pro tření. Podložka pro tření se skládá z 5 – 7 mm vysokého rámu (z plexiskla nebo jiného vhodného materiálu) s 2 – 5mm hrubým roštem nahoře a s 10 – 30µm jemným roštem vespod. Na hrubém roštu je připevněn třecí substrát vyrobený z nylonových vláken. Poté co byly ryby drženy 12 h v temnu se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Dvě až čtyři hodiny po vytření se podložka pro tření vyjme a jikry se seberou. Podložka pro tření zabrání rybám v požívání jiker a zároveň umožní snadný sběr jiker. Skupiny ryb by se měly před třením určeným k produkci jiker pro zkoušku vytřít alespoň jednou.
- ii) Pět až deset samečků a samiček se alespoň dva týdny před zamýšleným třením chová odděleně. Po 5 až 10 dnech se břicha samiček rozšíří a zviditelní se jejich pohlavní papily. Samečci papily nemají. Tření se provede v třech nádržích opatřených falešným dnem z pletiva (jako výše). Nádrž se naplní ředící vodou tak, aby voda sahala 5 – 10 cm nad rošt. Jedna samička a dva samečci se umístí do nádrže den před zamýšleným třením. Teplota vody se postupně zvýší jeden stupeň nad aklimatizační teplotu. Vypne se osvětlení a nádrž se ponechá co nejvíce v klidu. Ráno se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Po 2 – 4 h se ryby vyjmou a jikry se seberou. Je-li potřeba více dávek jiker, než lze získat od jedné samičky, nasadí se paralelně dostatečný počet třecích nádrží. Zaznamenáním reprodukční úspěšnosti (množství a kvality) jednotlivých samiček před zkouškou, lze vybrat pro chov samičky s nejvyšší úspěšností.

Jikry se přenesou do zkušebních nádrží skleněnou trubičkou (o vnitřním průměru ne menším než 4 mm) opatřenou pružným nasávacím balónkem. Množství vody, které se přenáší s jikrami, by mělo být co nejmenší. Jikry jsou těžší než voda a z trubičky vypadnou do vody. Je třeba zabránit tomu, aby jikry (a plůdky) přišly do kontaktu se vzduchem. Mikroskopickým vyšetřením vzorku (vzorků) jiker se ověří, že v prvních stádiích vývoje nedošlo k nepravidelnostem. Desinfekce jiker není přípustná.

Mortalita jiker je nejvyšší během prvních 24 h po oplodnění. V této době je často pozorována mortalita 5 – 40 %. Jikry degenerují v důsledku neúspěšného oplodnění nebo vývojových vad. Zdá se, že kvalita dávek jiker závisí na samičce, neboť některé

samičky soustavně kladou jikry dobré kvality, jakou jiné samičky neposkytují. Rovněž rychlost vývoje a líhnutí se mezi snůškami liší. Úspěšně oplodněné jikry a plůdky se žloutkovým váčkem přežívají dobře, obvykle jich přežívá více než 90 %. Při 25 °C se z jiker líhnou jedinci po 3 – 5 dnech po oplodnění a žloutkový váček je absorbován přibližně po 13 dnech po oplodnění.

Embryonální vývoj byl dobře popsán Hisaokou a Battlem (2). Díky průsvitnosti jiker a plůdků čerstvě po vylíhnutí lze vývoj ryb dobře sledovat a lze pozorovat malformace. Přibližně čtyři hodiny po vytření lze rozlišit neoplozené jikry od oplodněných (3). K tomuto vyšetření se jikry a plůdky umístí do nádobky o malém objemu a prohlížejí se pod mikroskopem.

Zkušební podmínky požadované pro časná vývojová stádia jsou uvedena v dodatku 2. Optimální hodnoty pH a tvrdosti vody jsou 7,8 a 250 mg/l, vyjádřeno jako CaCO₃.

VÝPOČTY A STATISTIKA

Navrhuje se dvoufázový přístup. V první fázi se statisticky analyzují data o mortalitě, nenormálním vývoji a době líhnutí. Poté se pro ty koncentrace, při nichž nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na tyto parametry, statisticky vyhodnotí tělesná délka. Tento přístup se doporučuje, neboť toxická látka může selektivně usmrcovat menší ryby, prodlužovat dobu líhnutí a indukovat makroskopické malformace a tedy zkreslovat délku. Kromě toho tak bude pro každou expozici měřen zhruba stejný počet ryb, čímž se zajistí validita statistiky zkoušky.

STANOVENÍ LC₅₀ a EC₅₀

Procento přežití jiker a čerstvých plůdků se vypočte a zkoriguje na mortalitu v kontrolních skupinách podle Abbottovy rovnice (4):

$$P = 100 - \frac{C - P'}{C} \times 100$$

kde:

P = korigované procento přežití

P' = procento přežití pozorované ve zkušební koncentraci

C = procento přežití v kontrolní skupině

Podle možnosti se vhodnou metodou stanoví hodnota LC₅₀ na konci zkoušky.

Požaduje-li se, aby byly do statistiky pro EC₅₀ zahrnuty morfologické odchylky, lze k tomu nalézt návod v práci Stephana (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Cílem zkoušky na jikrách a váčkových plůdkách je porovnat koncentrace, u nichž byl pozorovatelný účinek, s kontrolními skupinami, tj. stanovit LOEC. Použije se tedy metoda vícenásobného srovnání (6, 7, 8, 9, 10).

LITERATURA

- (1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Fish Biol.* 10, 121-173.
- (2) Hisaoka K. K., Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), *J. Morph.*, 102, 311 str.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrab%orbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). *J. Appl. Ichthyol.*, 2, 173-181.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, 1-333.

- (5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster, W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, 69-81.
- (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 20, 482-491.
- (8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 27, 103-117.
- (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 28, 519-531.
- (10) Sokal R. R., Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman, Co., San Francisco.

DODATEK 2

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (h)	Délka stádií (d)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
SLADKOVODNÍ								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio pruhoané	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8 - 10 dnů)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh duhový	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0(3)	30-35	25-30	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50 - 55 dnů)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Kapr obecný	21-25	—	12-16	5	> 4	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Halančik japonský	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13 - 16 dnů)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Střevle	25 ± 2	—	16	4-5	5	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů)	60	70

¹ Pro embryo.

² Pro plůdky.

³ Temno pro embryo a plůdky do jednoho týdne po vylíhnutí, s výjimkou okamžiků prohlídky. Poté po dobu zkoušky tlumené světlo.

DODATEK 3

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO JINÉ DOBŘE POPSANÉ DRUHY

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (h)	Délka stádií (d)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
SLADKOVODNÍ								
<i>Carassius auratus</i> karas zlatý	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> slunečnice modrá	21 ± 1	—	16	3	> 4	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	75
MOŘSKÝ								
<i>Menidia peninsulae</i>	22-25	15-22	12	1,5	10	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (6 - 7 dnů)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Sleď	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (23 - 27 dnů)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Treska	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (18 dnů)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i>	25 ± 1	15-30	12	—	—	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4/7 dnů po vylíhnutí (28 dnů)	> 75	80

DODATEK 4

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrace
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Nedisociovaný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

XVI. METODA PRO STANOVENÍ AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VĚLU MEDONOSNOU – metoda C.16 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XVI.1 METODA

Tato zkouška akutní toxicity je replikou metody OECD TG 213 (1998).

XVI.1.1 ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení orální akutní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dospělou dělnici včely medonosné.

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní orální toxicity pro včelu medonosnou, např. může-li dojít k expozici včel dané chemické látky. Zkouška akutní orální toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro formulování potřeby dalšího posuzování. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě formulovaných přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušební metody se použije referenční látka.

XVI.1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: je nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 h od orálního podání jedné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství požití zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje hmotností (µg) zkoušené látky na jeden testovací organismus (µg na včelu). Skutečnou dávku u každé včely nelze vypočítat, neboť se včely krmí kolektivně. Lze však odhadnout průměrnou dávku (celkové požití množství zkoušené látky dělené počtem včel v kličce).

LD₅₀ (střední letální dávka) orálně: je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po orálním podání způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje v µg zkoušenou látky na jednu včelu. U pesticidů může být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.) nebo formulovaný přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulý, jeli zcela nepohyblivý.

XVI.1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dospělé dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozptýlené do cukerného roztoku. Včely jsou poté krmeny

stejným roztokem neobsahujícím zkoušenou látku. Mortalita se zaznamenává denně během alespoň 48 hodin a porovnává se s kontrolními hodnotami. Jestliže mortalita v průběhu 24 a 48 h roste, zatímco kontrolní mortalita zůstává na přijatelné úrovni, tj. $\leq 10\%$, je vhodné zkoušku prodloužit na maximálně 96 h. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD_{50} pro 24 h a 48 h a v případě prodloužené studie pro 72 h a 96 h.

XVI.1.4 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny následující podmínky:

- průměrná mortalita u všech kontrolních skupin nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,
- LD_{50} pro referenční látku odpovídá předpokládané hodnotě .

XVI.1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XVI.1.5.1 Včelstvo

Použijí se mladé dospělé včely dělnice z téhož plemena, tj. včely stejného stáří, stejně krmené, stejného druhu atd. Včely by měly být získány z přiměřeně krmeného, zdravého včelstva s matkou, pokud možno bez nemoci a se známou anamnézou a fyziologickým stavem. Měly by být vybrány ráno v den zkoušky nebo by měly být vybrány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely z plástů bez plůdků. Včely by neměly být vybírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť se během těchto období fyziologicky mění. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, měly by se včely vylíhnout v inkubátoru a měly by být živeny plástovým pylem (pyl sebraný z plástu) a cukrovým roztokem. Včely ošetřované chemickými látkami, jako jsou antibiotika a prostředky proti varoáze, by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

XVI.1.5.2 Podmínky chovu a krmení

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozi-vzdorné oceli, pletiva, plastu nebo jednorázové dřevěné klícky atd. Nasazují se pokud možno skupiny po 10 včelách. Velikost zkušebních klíček by měla vyhovovat počtu včel, tj. měla by poskytovat dostatek prostoru.

Včely by měly být drženy v temnu v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50 – 70 %. Obsluha, včetně exponování a pozorování, může být prováděna za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný roztok cukru o konečné koncentraci $500 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (50% (m/V)). Po podání zkušební dávky se podává potrava podle libosti. Systém krmení by měl umožňovat zaznamenání příjmu potravy pro každou klíčku (viz bod 1.6.3.1). Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

XVI.1.5.3 Příprava včel

Shromážděné včely se náhodně rozdělí do klíček, které se náhodně umístí v experimentální místnosti.

Před začátkem zkoušky mohou včely až 2 h hladovět. Doporučuje se, aby nebyla včelám před expozicí podávána potrava, aby byly na začátku zkoušky rovnocenné, pokud jde o obsah zažívacího ústrojí. Včely v agónii se před zahájením zkoušky nahradí zdravými včelami.

XVI.1.5.4 **Příprava dávek**

Je-li zkoušená látka mísitelná s vodou, může být rozptýlena přímo v 50% cukerném roztoku. U technických přípravků a látek s nízkou rozpustností ve vodě mohou být použita vehikula, jakou jsou organická rozpouštědla, emulgátory nebo dispergátory s nízkou toxicitou pro včely (např. aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Koncentrace vehikula závisí na rozpustnosti zkoušené látky a měla by být stejná pro všechny zkoušené koncentrace. Obecně je přiměřená 1% koncentrace vehikula a neměla by být překračována.

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. Použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: roztok ve vodě a cukerný roztok s rozpouštědlem/nosičem v koncentraci použité v dávkách.

XVI.1.6 **POSTUP**

XVI.1.6.1 **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD₅₀ na úrovni spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD₅₀. Ředící faktor a počet koncentrací pro dávkování se však stanoví s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné koncentrace pro dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem paralelním zkušební skupinám o 10 včelách. Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Nasadí se také zkušební skupiny pro použité rozpouštědlo nebo nosič (viz bod 1.5.4).

XVI.1.6.2 **Referenční látka**

V rámci zkušebních skupin se použije referenční látka. Vyberou se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD₅₀. Pro každou zkušební dávku se nasadí alespoň tři paralelní klícky po deseti včelách. Přednostní referenční látkou je dimethoát, pro nějž se uvádí LD₅₀, 24 h, orálně v rozmezí 0,10 – 0,35 µg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné referenční látky, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

XVI.1.6.3 **Expozice**

XVI.1.6.3.1 *Podávání dávek*

Každé zkušební skupině včel se podá 100 – 200 µl 50% vodného cukerného roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci. Větší objem je nezbytný u látek s nízkou rozpustností, nízkou toxicitou nebo nízkou koncentrací ve formulaci, neboť v cukerném roztoku musí být použit větší podíl. Sleduje se množství spotřebované potravy se zkoušenou látkou. Po spotřebování potravy (obvykle do 3 – 4 h) se z klícky odebere krmicí zařízení a nahradí se krmicím zařízením obsahujícím pouze cukerný roztok. Cukerný roztok se poté podává podle libosti. U některých sloučenin může vést odmítnutí potravy s vysokými koncentracemi k tomu, že je spotřebováno málo potravy nebo že se nespoteřebuje žádná potrava. Po maximálně 6 h se nespotebovaná potrava se zkoušenou látkou nahradí samotným cukerným roztokem. Stanoví se

množství spotřebované potravy se zkoušenou látkou (např. měřením objemu nebo zvážení nespoteřebované stravy).

XVI.1.6.3.2 *Délka zkoušky*

Zkouška trvá 48 h od okamžiku, kdy byl zkušební roztok nahrazen samotným cukerným roztokem. Vzroste-li mortalita během prvních 24 h o 10 %, zkouška se prodlouží na 96 h, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekročí 10 %.

XVI.1.6.4 **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 h od zahájení zkoušky a poté po 24 h a 48 h (rozumí se po podání dávky). Jeli nezbytné pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech až do maximálně 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Odhadne se množství spotřebované potravy. Porovnáním rychlostí spotřebování potravy se zkoušenou látkou a bez ní lze získat informaci o přijatelnosti potravy se zkoušenou látkou. Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

XVI.1.6.5 **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD₅₀ je vyšší než tato hodnota. Při ní se postupuje stejným způsobem, tj. nasadí se tři paralelní zkušební skupiny pro každou zkušební koncentraci, odpovídající kontrolní skupiny, stanoví se množství spotřebované potravy s účinnou látkou a použije se referenční látka. Dojde-li k úhynům, musí se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

XVI.2 **DATA A ZPRÁVY**

XVI.2.1 DATA

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny s referenční látkou uvede počet použitých včel, mortalita v každém pozorovacím čase a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-odezva pro každý čas pozorování a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD₅₀) s 95% intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu ve kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). Pokud nebyla potrava zcela spotřebována, stanoví se spotřebovaná dávka zkoušené látky na skupinu. LD₅₀ se vyjádří v µg zkoušené látky na včelu.

XVI.2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XVI.2.2.1 **Zkoušená látka**

- fyzikální stav a relevantní fyzikálněchemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),
- údaje o chemické identitě včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identita a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

XVI.2.2.2 **Testovací druh**

- vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda výběru včel, datum výběru,

- informace o včelstvech použitých pro výběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o případné přípravě atd.

XVI.2.2.3 Zkušební podmínky

- teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,
- podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klíček,
- metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků (jeli použito, uvede se rozpouštědlo a jeho koncentrace),
- metoda přípravy zásobních roztoků a častost obnovení (jeli použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- uspořádání zkoušky, např. použité zkušební koncentrace a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou koncentraci a kontrolu počet paralelních klíček a počet včel na klíčku,
- datum zkoušky.

XVI.2.2.4 Výsledky

- výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,
- primární údaje: mortalita pro každou zkoušenou koncentraci v každém čase pozorování,
- graf křivek závislosti dávka-odezva na konci zkoušky,
- hodnoty LD₅₀ s 95% intervaly spolehlivosti pro každý doporučený čas pozorování a to pro zkoušenou látku a pro referenční látku,
- statistické metody použité pro stanovení LD₅₀,
- mortalita v kontrolních skupinách,
- jiné pozorované nebo naměřené biologické účinky, např. neobvyklé chování včel (včetně odmítnutí zkušební dávky), rychlost spotřebování potravy v exponovaných a neexponovaných skupinách,
- jakákoli odchylka od zde popsaného zkušebního postupu a jiné důležité informace.

XVI.3 LITERATURA

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, str. 151 – 165. březen 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981 – 1992. *J. Apicultur. Res.* 22, str. 119 – 125.
- (3) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exper. Ther.*, 96, str. 99 – 113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, str. 265 – 267.

XVII. METODA PRO STANOVENÍ AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU – metoda C.17 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XVII.1 METODA

Tato zkouška akutní toxicity je replikou metody OECD TG 214 (1998).

XVII.1.1 ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení akutní kontaktní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dospělou dělnici včely medonosné.

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní kontaktní toxicity pro včelu medonosnou, např. může-li dojít k expozici včel dané chemické látky. Zkouška akutní kontaktní toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro formulování potřeby dalšího posuzování. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě formulovaných přípravků. K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušební postupu se použije referenční látka.

XVII.1.2 DEFINICE

Akutní kontaktní toxicita: je nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 h od lokální aplikace jedné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství aplikované zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho zkušebního živočicha (μg na včelu).

LD₅₀ (střední letální dávka) kontaktně: je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po kontaktní aplikaci způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů může být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.) nebo formulovaný přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulý, je-li zcela nepohyblivý.

XVII.1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dospělé dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozpuštěné ve vhodném nosiči přímou aplikací na hrudník (jako kapičky). Zkouška trvá 48 h. Jestliže mortalita v průběhu 24 a 48 h roste, zatímco kontrolní mortalita zůstává na přijatelné úrovni, tj. $\leq 10\%$, je vhodné zkoušku prodloužit na maximálně 96 h. Mortalita se zaznamenává denně a porovnává se s kontrolními hodnotami. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD₅₀ pro 24 h a 48 h a v případě prodloužené studie pro 72 h a 96 h.

XVII.1.4 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny následující podmínky:

- průměrná mortalita u všech kontrolních skupin nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,
- LD₅₀ pro referenční standard odpovídá specifikovanému rozsahu.

XVII.1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XVII.1.5.1 Výběr včel

Použijí se mladé dospělé včely dělnice z téhož plemena, tj. včely stejného stáří, stejně krmené, stejného druhu atd. Včely by měly být získány z přiměřeně krmeného, zdravého včelstva s matkou, pokud možno bez

nemocí a se známou anamnézou a fyziologickým stavem. Měly by být vybrány ráno v den zkoušky nebo by měly být vybrány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely z plástů bez plůdků. Včely by neměly být vybírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť se během těchto období fyziologicky mění. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, měly by se včely vylíhnout v inkubátoru a měly by být živěny plástovým pylem (pyl sebraný z plástu) a cukrovým roztokem. Včely ošetřované chemickými látkami, jako jsou antibiotika a prostředky proti varoáze, by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

XVII.1.5.2 **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozivzdorné oceli, pletiva, plastu nebo jednorázové dřevěné klícky atd. Velikost zkušebních klíček by měla vyhovovat počtu včel, tj. klícky by měly poskytovat dostatek prostoru. Nasazují se pokud možno skupiny po 10 včelách.

Včely by měly být drženy v temnu v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50 – 70 %. Obsluha, včetně exponování a pozorování, může být prováděna za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný roztok cukru o konečné koncentraci $500 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (50% (m/V)) a podává se za použití včelího krmítka po dobu zkoušky podle libosti. Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

XVII.1.5.3 **Příprava včel**

Shromážděné včely mohou být za účelem aplikace zkušební látky narkotizovány oxidem uhličitým nebo dusíkem. Množství anestetika v době expozice by mělo být minimalizováno. Včely v agónii se před zahájením zkoušky nahradí zdravými včelami.

XVII.1.5.4 **Příprava dávek**

Zkušební látka se aplikuje jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle nebo ve vodě se smáčedlem. Jako organické rozpouštědlo se upřednostňuje aceton, mohou však být použity i jiná rozpouštědla s nízkou toxicitou pro včely (např. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). U formulovaných přípravků dispergovaných ve vodě a u silně polárních organických látek nerozpustných v organických nosičových rozpouštědlech lze aplikaci usnadnit jejich rozpuštění ve slabém roztoku komerčního smáčedla (např. smáčedla Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkušební látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: roztok ve vodě a roztok s rozpouštědlem/nosičem.

XVII.1.6 **POSTUP**

XVII.1.6.1 **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich paralelních experimentů by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50} . Počet dávek se však stanoví s ohledem na

směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem paralelním zkušební skupinám o 10 včelách.

Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Je-li použito organické rozpouštědlo nebo smáčedlo, zařadí se další tři kontrolní skupiny po 10 včelách pro rozpouštědlo a smáčedlo.

XVII.1.6.2 **Referenční látka**

V rámci zkušebních skupin musí být použita referenční látka. Vyberou se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD₅₀. Pro každou zkušební dávku se nasadí alespoň tři paralelní klíčky po 10 včelách. Upřednostňovanou referenční látkou je dimethoát, pro nějž se uvádí LD₅₀, 24 h, kontaktně v rozmezí 0,10 – 0,30 µg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné referenční látky, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

XVII.1.6.3 **Expozice**

XVII.1.6.3.1 *Podávání dávek*

U narkotizovaných včel se jednotlivě provede lokální aplikace. Včely se náhodně rozdělí do různých zkušebních a kontrolních skupin. Objem 1 µl roztoku obsahující zkušební látku ve vhodné koncentraci se aplikuje mikroaplikátorem na zádovou oblast hrudníku každé včely. Mohou být použity i jiné objemy, je-li to opodstatněné. Po aplikaci se včely umístí do zkušebních klíček a zásobí se cukerným roztokem.

XVII.1.6.3.2 *Délka expozice*

Zkouška má trvat nejlépe 48 h. Jestliže mortalita v průběhu 24 a 48 h roste, je vhodné zkoušku prodloužit na maximálně 96 h, pokud kontrolní mortalita nepřekračuje 10 %.

XVII.1.6.4 **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 h od aplikace a poté po 24 h a 48 h. Je-li nezbytné pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech až do maximálně 96 h, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

XVII.1.6.5 **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD₅₀ je vyšší než tato hodnota. Postupuje se stejným způsobem, včetně nasazení tří paralelních zkušebních skupin pro každou zkušební dávku, odpovídajících kontrolních skupin a použití referenční látky. Dojde-li k úhynům, musí se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

XVII.2. **DATA A ZPRÁVY**

XVII.2.1 **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny s referenční látkou uvede počet použitých včel, mortalita v každém pozorovacím čase a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky

závislosti dávka-reakce pro každý čas pozorování (tj. 24 h, 48 h a podle potřeby 72 h, 96 h) a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95% intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). LD_{50} se vyjádří v μg zkušební látky na včelu.

XVII.2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XVII.2.2.1 Zkoušená látka

- fyzikální stav a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),
- údaje o chemické identitě včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identita a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

XVII.2.2.2 Testovací druh

- vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda výběru shromáždění včel, datum výběru,
- informace o včelstvech použitých pro shromáždění testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o případné přípravě atd.

XVII.2.2.3 Zkušební podmínky

- teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,
- podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klíček,
- metody aplikace zkoušené látky, např. použité nosné rozpouštědlo, aplikovaný objem zkušební roztoku, použité anestetikum,
- uspořádání zkoušky, např. použité zkušební dávky a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou dávku a kontrolu počet paralelních klíček a počet včel na klíčku,
- datum zkoušky.

XVII.2.2.4 Výsledky

- výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,
- primární data: data: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každém čase pozorování,
- graf křivek závislosti dávka-odezva na konci zkoušky;
- hodnoty LD_{50} s 95% intervaly spolehlivosti pro každý doporučený čas pozorování, a to pro zkoušenou látku a referenční látku,
- statistické metody použité pro stanovení LD_{50} ,
- mortalita v kontrolních skupinách,
- jiné pozorované nebo změřené biologické účinky a jakékoli neobvyklé reakce včel,
- jakákoli odchylka od zde popsaného zkušební postupu metody a jiné důležité informace.

XVII.3 LITERATURA

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, str. 151 – 165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981 – 1992. *J. Apicultur. Research* 22, str. 119 – 125.

- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 96, str. 99 – 113.
- (4) Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, str. 265 – 267.

XVIII. METODA PRO STANOVENÍ ADSORPCE / DESORPCE V ROVNOVÁŽNÉM STAVU – metoda C.18 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XVIII.1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 106 pro stanovení půdní adsorpce/desorpce násadovou rovnovážnou metodou (Batch Equilibrium Method) (2000).

XVIII.1.1 ÚVOD

Tato metoda se opírá o okružní testy a seminář o výběru půd pro vývoj zkoušky adsorpce (1, 2, 3, 4) a rovněž o existující národní metodiky (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Studie adsorpce/desorpce jsou užitečné pro získávání důležitých informací o mobilitě a distribuci chemických látek v půdních, vodních a vzdušných složkách biosféry (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Informace lze použít k předpovědi nebo např. odhadu dostupnosti chemické látky pro rozklad, (22, 23), transformace a příjmu organismy (24), vymývání půdním profilem, (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28); těkání z půdy (21, 29, 30); odtoku z půdního povrchu do vod (18, 31, 32). Data o adsorpci mohou být použita pro účely porovnání a modelování (19, 33, 34, 35).

Rozdělení chemické látky mezi půdu a vodní fázi je složitý proces, který závisí na řadě různých faktorů: na chemické povaze látky (12, 36, 37, 38, 39, 40), na charakteristikách půdy (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) a na klimatických faktorech, jako jsou srážky, teplota, sluneční svit a vítr. Početné fenomény a mechanismy účastníci se adsorpce chemické látky v půdě tedy nelze v celém rozsahu definovat zjednodušeným laboratorním modelem, na jakém je založena tato metoda. Přestože nelze tímto pokusem podchytit všechny možné případy z životního prostředí, poskytuje cenné informace o významnosti adsorpce chemické látky z hlediska životního prostředí. Viz také obecný úvod.

XVIII.1.2 POUŽITÍ

Tato metoda je zaměřena na odhad adsorpčního/desorpčního chování látky v půdách. Cílem je získat sorpční charakteristiky, které lze použít pro předpověď rozdělení za nejrůznějších podmínek v životním prostředí; k tomuto účelu se pro chemickou látku stanovují rovnovážné adsorpční koeficienty v různých půdách jako funkce půdních charakteristik (např. obsahu organického uhlíku, obsahu jílu, půdní textury a pH). Pro co nejširšího podchycení interakcí dané látky s půdami vyskytujícími se v přírodě musí být použity při zkoušce různé druhy půd.

V této metodě vyjadřuje adsorpce proces vázání chemické látky na půdní povrch; nerozlišuje se mezi různými adsorpčními procesy (fyzikální a chemickou adsorpcí) a procesy, jako jsou povrchově katalyzované

rozklad, adsorpce velkých množství nebo chemická reakce. Adsorpce na koloidních částicích (průměr < 0,2 μm) vznikajících v půdě se nebere v úvahu.

Půdními parametry, které jsou považovány za nejdůležitější, jsou: obsah organického uhlíku (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), obsah jílu a půdní textura (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) a pro disociující sloučeniny také pH (3, 4, 42). Dalšími půdními parametry, které mohou mít vliv na adsorpci/desorpci určité látky jsou efektivní kationtová výměnná kapacita (ECEC), obsah amorfních oxidů železa a hliníku, zejména u vulkanických a tropických půd (4) a rovněž měrný povrch (49). Zkouška je navržena pro posouzení adsorpce chemické látky na různých druzích půd s různým obsahem organického uhlíku, jílu, různou půdní texturou a různým pH. Je trojstupňová:

- Stupeň 1:** Předběžná zkouška za účelem stanovení:
- poměru půda/roztok,
 - rovnovážného adsorpčního času a množství zkoušené látky adsorbovaného v rovnováze,
 - adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušební nádoby a stálosti zkoušené látky v průběhu zkoušky.
- Stupeň 2:** Screeningová zkouška: studie adsorpční kinetiky a stanovení distribučních koeficientů K_d a K_{ou} pro pět druhů půd a jednu koncentraci.
- Stupeň 3:** Stanovení Freundlichových isotherm za účelem zjištění vlivu koncentrace na velikost adsorpce na půdách.

Studie desorpce prostřednictvím desorpční kinetiky/ Freundlichových desorpčních isotherm (dodatek 1).

XVIII.1.3 DEFINICE A JEDNOTKY

Symbol	Definice	Jednotky
A_i	procento adsorpce v čase t_i	%
A_{eq}	procento adsorpce v adsorpční rovnováze	%
$m_p^{ads}(t_i)$	množství zkoušené látky adsorbované na půdě v čase t_i	μg
$m_p^{ads}(\Delta t_i)$	množství zkoušené látky adsorbované na půdě za časový interval Δt_i	μg
$m_p^{ads}(eq)$	množství zkoušené látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze	μg
m_0	množství zkoušené látky ve zkušební nádobě na začátku adsorpční zkoušky	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	množství zkoušené látky naměřené v podílu (v_a^A) v okamžiku t_i	μg
$m_v^{ads}(eq)$	množství zkoušené látky v roztoku v adsorpční rovnováze	μg
$m_{půda}$	množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy	g
$C_{zás}$	hmotnostní koncentrace zásobního roztoku látky	μg·cm ⁻³
C_0	počáteční hmotnostní koncentrace zkušební roztoku v kontaktu s půdou	μg·cm ⁻³
$C_{vod}^{ads}(t_i)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i , kdy je prováděna analýza	μg·cm ⁻³
$C_p^{ads}(eq)$	množství látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze	μg·cm ⁻³

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v adsorpční rovnováze	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
V_0	počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou během adsorpční zkoušky	cm^3
v_a^A	objem podílu, ve kterém je látka stanovována	cm^3
K_d	distribuční koeficient pro adsorpci	$\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$
K_{ou}	adsorpční koeficient normalizovaný na organický uhlík	$\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$
K_{om}	distribuční koeficient normalizovaný na obsah organického materiálu	$\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichův adsorpční koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\cdot\text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichův exponent	
D_{t_i}	procento desorpce v čase t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procento desorpce za časový interval Δt_i	%
K_{des}	zdánlivý desorpční koeficient	$\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlichův desorpční koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\cdot\text{g}^{-1}$
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$	množství zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i	μg
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	množství zkoušené látky desorbované z půdy za časový interval Δt_i	μg
$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$	analyticky stanovené množství látky ve vodné fázi v desorpční rovnováze	μg
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$	celkové množství zkoušené látky desorbované v desorpční rovnováze	μg
$m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	množství látky, která zůstává adsorbovaná na půdě po uplynutí časového intervalu Δt_i	μg
m_{vod}^A	množství látky, které zbylo (aniž se adsorbovalo) po ustavení adsorpční rovnováhy, a to v důsledku nekvantitativní výměny objemu vodné fáze	μg
$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq})$	množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované na půdě v desorpční rovnováze	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v desorpční rovnováze	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
V_{T}	celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou	cm^3
V_{R}	objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2	cm^3
v_a^D	objem podílu odebraného k analýze od okamžiku t_i během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou	cm^3
V_{r}^i	objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby (i) ke stanovení zkoušené látky v experimentu pro studium desorpční kinetiky (paralelní metoda)	cm^3
V_{r}^F	objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby ke stanovení zkoušené látky v desorpční rovnováze	cm^3
MB	množstevní bilance	%
m_{E}	celkové množství zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádoby ve dvou krocích	μg
V_{rec}	objem supernatantu získaný po dosažení adsorpční rovnováhy	cm^3
P_{ov}	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
$\text{p}K_{\text{a}}$	disociační konstanta	

Symbol	Definice	Jednotky
S_v	rozpuštnost ve vodě	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

XVIII.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Znamé objemy roztoků zkoušené látky o známé koncentraci, značené nebo neznačené radionuklidy, se v 0,01M CaCl_2 přidají k půdním vzorkům o známé sušíně, které byly předběžně uvedeny do rovnováhy s 0,01M CaCl_2 . Směs se přiměřenou dobu protřepává. Půdní suspenze se poté oddělí centrifugací a podle požadavků zfiltruje a vodná fáze se analyzuje. Množství zkoušené látky adsorbované na půdním vzorku se vypočte z rozdílu mezi počátečním množstvím zkoušené látky v roztoku a množstvím, které v něm zbylo na konci experimentu (nepřímá metoda).

Alternativně lze adsorbované množství zkoušené látky stanovit také přímo analýzou půdy (přímá metoda). Tato metoda, která zahrnuje postupnou extrakci vhodným rozpouštědlem se doporučuje v případech, kdy nelze přesně stanovit rozdíl koncentrací látky v roztocích. Jde například o tyto případy: adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušebních nádob, nestálost zkoušené látky v poměru k délce experimentu, nízká adsorpce s malou změnou koncentrace v roztoku a vysoká adsorpce, jejímž důsledkem je nízká koncentrace, kterou nelze přesně stanovit. Použije-li se látka značená radioizotopy, lze extrakci půdy obejít analýzou půdní fáze spočívající v jejím spálení a v měření kapalinovou scintilační spektrometrií. Měření kapalinovou scintilační spektrometrií je nespecifickou technikou, která nerozlišuje mezi mateřskými a transformačními produkty; měla by tedy být použita pouze tehdy, je-li zkoušená chemická látka po celou dobu studie stálá.

XVIII.1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTKE

Chemikálie musí být analytické čistoty. Doporučuje se použití radioizotopově neznačených zkoušených látek se známým složením a alespoň 95% čistotou, nebo zkoušených látek značených radioizotopy, které mají známé složení a jsou radioizotopově čisté. U stopovačů s krátkým poločasem rozpadu musí být provedena korekce na rozpad.

Před prováděním zkoušek adsorpce-desorpce by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

- rozpuštnost ve vodě (A.6);
- tlak par (A.4) a/nebo Henryho konstanta;
- abiotický rozklad: hydrolýza jako funkce pH (C.7);
- rozdělovací koeficient (A.8);
- snadná rozložitelnost (C.4) nebo aerobní a anaerobní transformace v půdě;
- $\text{p}K_a$ disociovatelných látek;
- přímá fotolýza ve vodě (tj. UV-Vis absorpční spektrum ve vodě, kvantový výtěžek) a fotodegradace v půdě.

XVIII.1.6 POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Zkouška je použitelná u látek, pro něž existuje analytická metoda s dostatečnou správností. Důležitým parametrem, který může ovlivnit spolehlivost výsledku, zejména při nepřímé metodě, je stálost zkoušené látky po celou dobu zkoušky. Je tedy nezbytné ověřit stabilitu v předběžné studii; je-li v průběhu zkoušky pozorována transformace látky, doporučuje se, aby byla v hlavní studii provedena analýza jak půdní, tak vodné fáze.

Obtíže mohou nastat při provádění této zkoušky u látek s nízkou rozpustností ve vodě ($S_v < 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a rovněž u silně nabitých látek v důsledku toho, že koncentraci ve vodné fázi nelze změřit s dostatečnou správností. V těchto případech musí být podniknuty další kroky. Doporučení pro řešení těchto problémů je uvedeno v příslušných částech této metody.

Při zkoušení těkavých látek je třeba dbát na to, aby nedošlo v průběhu studie ke ztrátám.

XVIII.1.7 POPIS METODY

XVIII.1.7.1 Přístroje, pomůcky a reakční činidla

Standardní laboratorní vybavení, zejména:

- a) Zkumavky nebo nádoby pro provedení experimentů. Je důležité, aby tyto zkumavky nebo nádoby
 - patřily k centrifuze, aby se minimalizovaly nepřesnosti v důsledku manipulace a přenášení,
 - byly z inertního materiálu, který minimalizuje adsorpci zkoušené látky na jejich stěnách.
- b) Mísicí zařízení: překlápěcí mísič nebo rovnocenné zařízení; mísič musí v průběhu mísení udržovat půdu v suspenzi.
- c) Centrifuga: nejlépe vysokootáčková, např. s odstředivým zrychlením $> 3\ 000 \text{ g}$, s nastavením teploty, schopná odstředit z vodného roztoku částice o průměru větším než $0,2 \mu\text{m}$. Kyvety by měly být během třepání a centrifugace opatřeny víčky, aby nedošlo ke ztrátám těkavých látek a vody; aby se minimalizovala adsorpce na víčkách, použijí se víčka z neadsorbujících materiálů, např. víčka se závitem potažená teflonem.
- d) Volitelné: filtrační zařízení; filtry o velikosti pórů $0,2 \mu\text{m}$, sterilní, na jedno použití. Zvláštní pozornost by měla být věnována volbě filtračního materiálu, aby na něm nedošlo k žádným ztrátám zkoušené látky; u špatně rozpustných zkoušených látek se organický filtrační materiál nedoporučuje.
- e) Analytické přístroje vhodné pro měření koncentrace zkoušené látky.
- f) Laboratorní sušárna umožňující udržovat teplotu od $103 \text{ }^\circ\text{C}$ do $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

XVIII.1.7.2 Charakterizace a výběr půd

Půdy by měly být charakterizovány třemi parametry, které jsou považovány za nejdůležitější pro adsorpční kapacitu: obsahem organického uhlíku, obsahem jílu a půdní texturou a hodnotou pH. Jak již bylo uvedeno, (viz oddíl Použití), mohou mít vliv na další adsorpci/desorpci určité látky fyzikálně-chemické charakteristiky půdy a měly by být v takových případech zohledněny.

Metody použité pro charakterizaci půdy jsou velmi důležité a mohou významně ovlivnit výsledky. Doporučuje se tedy, aby bylo podle odpovídající metody ISO (ISO-10390-1) pH měřeno v $0,01\text{M CaCl}_2$ (jde o roztok použitý při zkoušení adsorpce/desorpce). Doporučuje se rovněž, aby byly ostatní důležité půdní charakteristiky stanoveny standardními metodami (např. ISO „*Handbook of Soil Analysis*“); to umožní, aby byla analýza sorpčních dat založena na mezinárodně standardizovaných půdních parametrech. Některé existující standardní metody analýzy a

charakterizace půdy jsou uvedeny v literatuře (50 – 52). Ke kalibraci metod zkoušení půd se doporučují referenční půdy.

Návod pro výběr půd pro adsorpční/desorpční experimenty je uveden v tabulce 1. Sedm vybraných druhů půd pokrývá půdní druhy vyskytující se v mírném zeměpisném pásmu. V případě disociovatelných zkoušených látek by měly vybrané půdy pokrývat širokých rozsah pH, aby bylo možné hodnotit adsorpci látky v její disociované a nedisociované formě. Návod k volbě počtu různých půd, které mají být použity v jednotlivých stádiích zkoušky, je uveden v bodě 1.9. Provedení zkoušky.

Upřednostňují-li se jiné druhy půd, měly by být charakterizovány stejnými parametry a jejich charakteristiky by se měly pohybovat ve stejném rozpětí jako v tabulce 1, třebaže kritériím neodpovídají přesně.

Tabulka 1: **Návod pro výběr půdních vzorků pro adsorpci/desorpci**

Druh půdy	Rozsah pH (v 0,01M CaCl ₂)	Obsah organického uhlíku (%)	Obsah jílu (%)	Textura půdy ¹
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	jíl
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	jílovitohlinitá
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	prachovitohlinitá
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	hlinitá
5	< 4,0 - 6,0 ²	< 0,5 - 1,5 ^{2,3}	< 10 - 15 ²	hlinitopísčité
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ^{2,3}	40 - 65	jílovitohlinitá/jíl
7	< 4,5	> 10	< 10	písek/hlinitopísčité

¹ Podle FAO a severoamerického systému (85).

² Hodnoty jednotlivých parametrů by měly pokud možno ležet v uvedeném rozsahu. Vyskytnou-li se obtíže při hledání vhodného půdního materiálu, jsou přijatelné hodnoty ležící pod uvedeným minimem.

³ U půd s obsahem organického uhlíku nižším než 0,3 % může být porušena korelace mezi obsahem organického uhlíku a adsorpcí. Doporučují se tedy půdy s minimálním obsahem organického uhlíku 0,3 %.

XVIII.1.7.3 Sběr a uchování půdních vzorků

XVIII.1.7.3.1 Sběr

Není doporučena žádná specifická technika odběru vzorků; technika odběru závisí na účelu studie (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Je třeba zohlednit:

- nezbytné jsou informace o historii lokality; zahrnují informace o lokalitě, vegetaci, použití pesticidů nebo hnojiv, o biologických vnosech nebo náhodné kontaminaci. Pokud jde o popis místa odběru, měla by být dodržena doporučení normy ISO o vzorkování půd (ISO 10381-6);
- místo odběru musí být definováno souřadnicemi UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) nebo zeměpisnými souřadnicemi; to by mohlo umožnit opakovaný odběr dané půdy v budoucnu nebo usnadnit definování půdy podle různých klasifikačních systémů používaných v různých zemích. Kromě toho by měla být vzorkován pouze horizont A do maximální hloubky 20 cm. Zvláště je-li u půdního druhu č. 7 součástí půdy horizont 0_h, měl by být zahrnut do vzorkování.

Půdní vzorky by měly být přepravovány v kontejnerech a za teploty, jež zaručí, že nedojde k výrazné změně původních charakteristik půdy.

XVIII.1.7.3.2 Uchování

Přednost se dává se použití čerstvě odebraných půd. Pouze není-li to možné, mohou být půdy uchovávány při teplotě okolí, případně vysušené na vzduchu. Pro dobu uchovávání neexistuje žádný doporučený limit, ale půdy uchovávané déle než tři roky by měly být před použitím analyzovány na obsah organického uhlíku, pH a CEC (kationtovou výměnnou kapacitu).

XVIII.1.7.3.3 *Zpracování půdních vzorků a jejich příprava ke zkoušce*

Půdy se vysuší na vzduchu při teplotě okolí (nejlépe při 20 – 25 °C). Rozrušení půd se provede minimální silou, aby se původní textura půdy změnila co nejméně. Půdy se prosejí na sítu ≤ 2 mm; při prosévání by měla být dodržována doporučení normy ISO (ISO 10381-6). Doporučuje se opatrná homogenizace, neboť zlepšuje reprodukovatelnost výsledků. Vlhkost každé půdy se stanoví na třech dílčích vzorcích zahříváním na 105 °C, dokud se významně mění hmotnost (přibližně 12 h). Ve všech výpočtech je hmotností půdy hmotnost po sušení (sušina), tj. hmotnost půdy korigovaná na obsah vlhkosti.

XVIII.1.7.4 **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se rozpustí v 0,01M roztoku CaCl_2 v destilované nebo deionisované vodě; roztok CaCl_2 se použije jako vodná rozpouštědlová fáze ke zlepšení centrifugace a minimalizaci kationtové výměny. Koncentrace zásobního roztoku by měla být nejlépe o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti použité analytické metody. Tento práh zabezpečuje přesnost měření s ohledem na metodiku, jež je základem tohoto postupu; kromě toho by měla být koncentrace zásobního roztoku pod rozpustností zkoušené látky ve vodě.

Zásobní roztok se připravuje nejlépe těsně před aplikací na půdní vzorky a uchovává se uzavřený v temnu při 4 °C. Skladovatelnost závisí na stálosti zkoušené látky a na její koncentraci v roztoku.

Pouze u špatně rozpustných látek ($S_v < 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) může být nezbytné použít solubilizační činidlo, je-li obtížné zkoušenou látku rozpustit. Solubilizační činidlo: a) by mělo být mísitelné s vodou, např. methanol nebo acetonitril, b) jeho koncentrace by neměla překročit 1 % celkového objemu zásobního roztoku a ještě méně by ho mělo být v roztoku přicházejícím do kontaktu s půdou (nejlépe v koncentraci nižší než 0,1 %), a c) nemělo by být surfaktantem nebo by nemělo podléhat solvolytickým reakcím se zkoušenou chemickou látkou. Použití solubilizačního činidla by mělo být uvedeno a odůvodněno v přehledu dat.

Jinou možností u špatně rozpustných látek je jejich přimíchání do systému (spiking): zkoušená látka se rozpustí v organickém rozpouštědle a alikvot se přidá do směsi půdy a 0,01M roztoku CaCl_2 v destilované nebo deionisované vodě. Obsah organického rozpouštědla ve vodné fázi by měl být co nejnižší a obvykle by neměl překročit 0,1 %. Nedostatkem přimíchání v organickém rozpouštědle je nereprodukovatelnost objemu. To může znamenat zanesení další nepřesnosti, neboť koncentrace zkoušené látky a spolurozpouštědla nebývají ve všech zkouškách tytéž.

XVIII.1.8 **PŘEDPOKLADY PRO PROVEDENÍ ZKOUŠKY ADSORPCE/DESORPCE**

XVIII.1.8.1 **Analytická metoda**

Klíčovými parametry, které mohou mít vliv na správnost měření sorpce, jsou správnost metody analýzy jak roztoku, tak adsorbované fáze, stálost a

čistota zkoušené látky, dosažení sorpční rovnováhy, velikost změny koncentrace v roztoku, poměr půda/roztok a změny v půdní struktuře během ustavování rovnováhy (35, 59 – 62). Některé příklady týkající se problematiky správnosti jsou uvedeny v dodatku 2.

Spolehlivost použité analytické metody musí být ověřována při koncentracích, které se mohou vyskytnout v průběhu zkoušky. Je na experimentátorovi, aby vyvinul vhodnou metodu s náležitou správností, přesností, reprodukovatelností, mezi stanovitelností a výtěžkem. Návodem k provedení takové zkoušky je níže uvedený experiment.

Vhodný objem 0,01M CaCl_2 , např. 100 cm^3 , se protřepává 4 h s např. 20 g půdy o vysoké adsorpční schopnosti, tj. s vysokým obsahem organického uhlíku a jílu; tato hmotnost a objem se mohou měnit podle požadavků analýzy, avšak poměr půda/roztok 1:5 je vhodnou výchozí hodnotou. Směs se odstředí a vodnou fází lze zfiltrvat. K vodné fázi se přidá určitý objem zásobního roztoku zkoušené látky, aby bylo dosaženo nominální hodnoty v koncentračním rozsahu, který se může vyskytnout v průběhu zkoušky. Tento objem by neměl překročit 10 % konečného objemu vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně. Roztok se analyzuje.

Založí se jeden slepý pokus s půdou a roztokem CaCl_2 (bez zkoušené látky) s cílem odhalit náhodné chyby analytické metody a matricové jevy způsobené půdou.

Mezi analytické metody, které mohou být použity v sorpčních měřeních, patří plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází, (GLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), spektrometrie (např. GC/hmotnostní spektrometrie, HPLC/hmotnostní spektrometrie) a kapalinová scintilační spektrometrie (pro látky značené radioizotopy). Bez ohledu na použitou analytickou metodu se za přiměřené považují výtěžky od 90 % do 110 % nominální hodnoty. Má-li být možné provést stanovení a zhodnocení poté, co dojde k rozdělení, musí být mezi stanovitelností analytické metody alespoň o dva řády nižší než nominální koncentrace.

Charakteristiky a meze stanovitelnosti analytické metody použitelné pro provedení studií adsorpce hrají významnou roli při definování zkušebních podmínek a při celém experimentálním provedení zkoušky. Tato metoda sleduje obecný experimentální postup a obsahuje doporučení a pokyny pro alternativní řešení, jsou-li analytická metoda a laboratorní vybavení omezeny.

XVIII.1.8.2 Výběr optimálních poměrů půda/roztok

Výběr vhodných poměrů půda/roztok pro sorpční studie závisí na distribučním koeficientu K_d a na požadovaném relativním stupni adsorpce. Změna koncentrace látky v roztoku je určující pro statistickou správnost měření v důsledku formy adsorpční rovnice a omezení analytické metodiky při stanovování koncentrace chemické látky v roztoku. V obecné praxi je tedy užitečné určit několik pevných poměrů, pro něž je adsorbovaný podíl vyšší než 20 %, nejlépe > 50 % (62), a dbát na to, aby byla koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi dostatečně vysoká pro její správné změření. To je zvláště důležité u vysokých adsorbovaných podílů.

Vyhovující přístup k výběru vhodných poměrů půda/voda je založen na odhadu hodnoty K_d buď předběžnými studiemi, nebo zavedenými

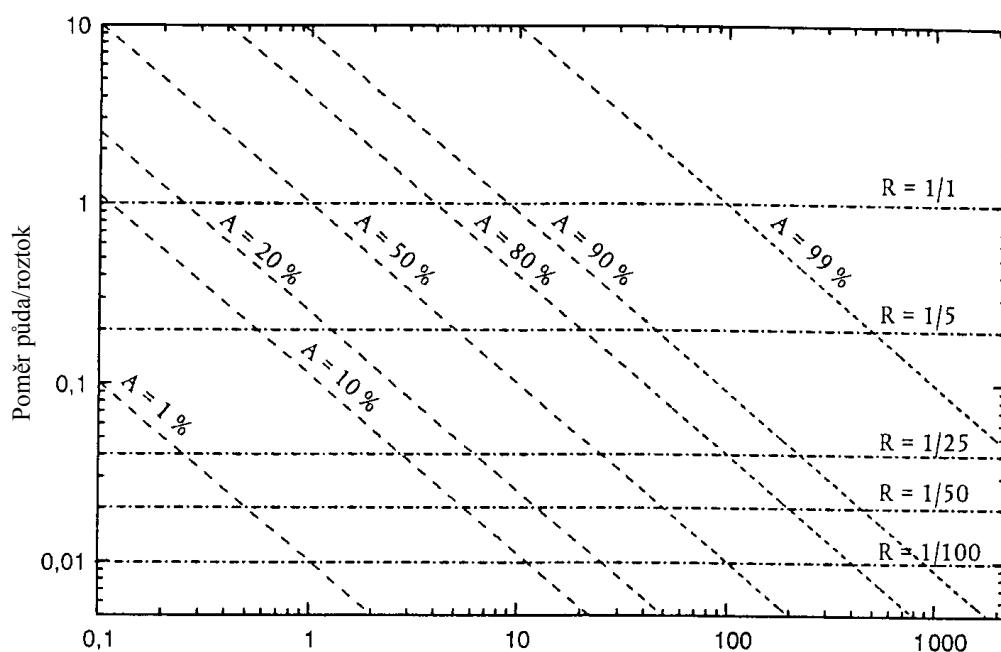
metodami odhadu (dodatek 3). Vhodný poměr lze poté vybrat na základě grafického provedení závislosti poměru půda/roztok na K_d pro daný adsorbovaný podíl (obrázek 1). V tomto grafickém vyjádření se předpokládá, že je adsorpční rovnice lineární¹. Použitelný poměr se získá upravením rovnice pro K_d (4) do tvaru rovnice (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{půda}}} = \left(\frac{m_0}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

nebo do její logaritmické formy při předpokladu

$$R = m_{\text{půda}}/V_0 \text{ a } A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{\left(\frac{A_{\text{eq}} \%}{100} \right)}{\left(1 - \frac{A_{\text{eq}} \%}{100} \right)} \right] \quad (2)$$



Distribuční koeficient K_d ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

Obrázek 1. Vztah mezi poměry půda/roztok a hodnotou K_d při různých adsorbovaných podílech zkoušené látky

Na obrázku 1 jsou uvedeny požadované poměry půda/roztok jako funkce K_d pro různé úrovně adsorpce. Například při poměru půda/roztok 1:5 a při K_d rovno 20 by došlo přibližně k 80% adsorpci. Má-li dojít při téže hodnotě K_d k 50% adsorpci, musí být použit poměr 1:25. Tento přístup k výběru vhodných poměrů půda/roztok umožňuje výzkumníkovi pružně vyhovět experimentálním potřebám.

Obtíže nastávají v oblastech, kdy se chemická látka adsorbuje silně nebo velmi slabě. Je-li adsorpce nízká, doporučuje se poměr půda/roztok 1:1,

¹ $C_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

třebaže u některých vysloveně organických druhů půdy může být k získání suspenze nezbytný nižší poměr. Analytická metodika měření malých změn koncentrace roztoku musí být pečlivá; v opačném případě bude měření nepřesné. Na druhé straně se může při velmi vysokých distribučních koeficientech K_d dospět až k poměru půda/roztok 1:100, má-li v roztoku zůstat významné množství chemické látky. Je však třeba dbát na dobré promíchání a musí být ponechána dostatečná doba k tomu, aby systém dosáhl rovnováhy. Jiným přístupem je v těchto extrémních případech, kdy chybí vhodná metodika, odhadnutí hodnoty K_d metodou založenou například na hodnotách P_{ov} (dodatek 3). Může být užitečný zvláště u slabě adsorbovaných polárních chemických látek s $P_{ov} < 20$ a u lipofilních/silně adsorbovaných chemických látek s $P_{ov} > 10^4$.

XVIII.1.9 PROVEDENÍ ZKOUŠKY

XVIII.1.9.1 Zkušební podmínky

Všechny experimenty se provádějí při teplotě okolí a pokud možno při konstantní teplotě od 20 °C do 25 °C.

Parametry odstředování by měly umožnit odstranit z roztoku částice větší než 0,2 μm. Tuto velikost mají nejmenší částice považované za pevné částice a je hranicí mezi pevnými a koloidními částicemi. Návod ke stanovení parametrů odstředování je uveden v dodatku 4.

Nezaručuje-li centrifuga, že budou částice větší než 0,2 μm odstraněny, mohla by být použita kombinace odstředování a filtrace přes 0,2 μm filtry. Tyto filtry musí být z vhodného inertního materiálu, aby na nich nedošlo k žádným ztrátám zkoušené látky. V každém případě by mělo být ověřeno, že při filtraci nedochází k žádným ztrátám zkoušené látky.

XVIII.1.9.2 Stupeň 1 – předběžná studie

Účel provedení předběžné studie byl již uveden v oddíle Použití. Návodem pro založení takové studie je níže navržený experiment.

XVIII.1.9.2.1 Výběr optimálních poměrů půda/roztok

Použijí se dva půdní druhy a tři poměry půda/roztok (šest experimentů). Jeden půdní druh s vysokým obsahem organického uhlíku a nízkým obsahem jílu a druhý půdní druh s nízkým obsahem organického uhlíku a vysokým obsahem jílu. Jsou navrženy následující poměry půda/roztok:

- 50 g půdy a 50 cm³ vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/1),
- 10 g půdy a 50 cm³ vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/5),
- 2 g půdy a 50 cm³ vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/25).

Minimální množství půdy, se kterým lze experiment provést, závisí na laboratorním vybavení a na účinnostních charakteristikách použitých analytických metod. Doporučuje se však použít alespoň 1 g, a nejlépe 2 g, aby zkouška poskytla spolehlivé výsledky.

Jeden kontrolní vzorek obsahující pouze zkoušenou látku v 0,01M CaCl₂ (bez půdy) se podrobí naprosto stejným krokům jako zkušební systémy, s cílem ověřit stálost zkoušené látky v roztoku CaCl₂ a její možnou adsorpci na stěnách zkušební nádoby.

Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí slepý vzorek s každou půdou a celkem 50 cm³ 0,01M roztoku CaCl₂ (bez zkoušené látky). Účelem je kontrola pozadových hodnot během analýzy s cílem detekovat interferující látky nebo rozeznat kontaminované půdy.

Všechny experimenty včetně kontrolních a slepých vzorků se provedou alespoň dvojmo. Celkový počet vzorků, které by měly být pro studii připraveny, lze odvodit z metodiky, podle které bude postupováno.

Metody pro předběžnou studii a hlavní studii jsou zpravidla stejné, výjimky jsou podle potřeby uvedeny.

Vzorky vysušené na vzduchu se den před experimentem uvedou přes noc (12 h) do rovnováhy protřepáváním s 45 cm³ 0,01M CaCl₂. Poté se určitým objemem zásobního roztoku zkoušené látky upraví konečný objem na 50 cm³. Tento objem přidaného zásobního roztoku: a) by neměl být vyšší než 10 % konečného objemu 50 cm³ vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně; a b) měl by zajistit, že bude počáteční koncentrace zkoušené látky v kontaktu s půdou (C_0) alespoň o dva řády vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody; tento práh zabezpečuje možnost provést přesné měření i při vysoké adsorpci (> 90 %) a později stanovit adsorpční izotermu. Doporučuje se rovněž, aby počáteční koncentrace látky (C_0) pokud možno nepřekračovala polovinu hodnoty rozpustnosti látky.

Příklad výpočtu koncentrace zásobního roztoku látky ($C_{z\acute{a}s}$) je uveden níže. Předpokládá se mez stanovitelnosti 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a 90% adsorpce; počáteční koncentrace zkoušené látky v kontaktu s půdou by tedy měla být nejlépe 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (o dva řády vyšší, než je mez stanovitelnosti). Za předpokladu, že bude přidán maximální doporučený objem zásobního roztoku, tj. 5 cm³ do 45 cm³ 0,01M roztoku CaCl₂ pro ustavení rovnováhy, (= 10% přídavek zásobního roztoku v celkovém objemu vodné fáze 50 cm³), by měla být koncentrace zásobního roztoku 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; je o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody. Hodnota pH vodné fáze se měří před kontaktem s půdou a po něm, neboť hraje významnou roli v celém adsorpčním procesu, zvláště u disociujících látek.

Směs se protřepává, dokud se neustaví adsorpční rovnováha. Doba nezbytná k dosažení rovnováhy v půdě silně kolísá v závislosti na chemické látce a půdě; zpravidla stačí 24 h (77). V předběžné studii lze vzorky odebírat postupně v průběhu míchání po 48 h (například 4, 8, 24, 48 h). Čas analýzy by měl být volen pružně s ohledem na pracovní plán laboratoře.

Existují dvě možnosti, jak provádět analýzu zkoušené látky ve vodném roztoku: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Je třeba zdůraznit, že ačkoli je paralelní metoda experimentálně náročnější, je její matematické zpracování jednodušší (dodatek 5). Volba metodiky, podle které bude postupováno, se však ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit dostupné laboratorní vybavení a prostředky.

- a) Paralelní metoda: pro každý poměr půda/roztok se připraví tolik vzorků, kolik bude časů, v nichž se má provést vyšetření adsorpční kinetiky. Po centrifugaci a podle požadavku po filtraci se z první zkušební nádoby odebere pokud možno celá vodná fáze a měří se např. po 4 h; vodná fáze druhé zkušební nádoby se takto zpracuje a změří po 8 h, vodná fáze třetí zkušební nádoby se takto zpracuje a změří po 24 h atd.
- b) Sériová metoda: pro každý poměr půda/roztok se připraví pouze dva vzorky. V definovaných časových intervalech se směs zcentrifuguje

a fáze se oddělí. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Následuje-li po centrifugaci filtrace, měla by mít laboratoř zařízení pro filtraci malých podílů vodné fáze. Doporučuje se, aby celkový objem odebraného podílu nepřesahoval 1 % celkového objemu roztoku, aby se významně nezměnil poměr půda/roztok a aby se nesnížilo množství rozpuštěné látky dostupné během zkoušky pro adsorpci.

Procento adsorpce A_t se pro každý čas (t_i) vypočte z nominální počáteční koncentrace a naměřené koncentrace v odběrovém čase (t_i) po korekci na hodnoty ze slepého pokusu. Sestrojí se křivky závislosti A_t na čase (obrázek 1 v dodatku 5) za účelem odhadu míry dosažení rovnovážného plató². Rovněž se vypočte hodnota K_d v rovnováze. Na základě této hodnoty K_d se z obrázku 1 vyberou vhodné poměry půda/roztok tak, aby adsorpce dosahovala více než 20 % a nejlépe více než 50 % (61). Všechny příslušné rovnice a zásady pro sestrojování křivek jsou uvedeny v oddíle Data a zprávy a v dodatku 5.

XVIII.1.9.2.2 Stanovení rovnovážného adsorpčního času a množství zkoušené látky adsorbované v rovnováze

Jak již bylo uvedeno, umožňuje křivka závislosti A_t nebo $C_{\text{vod}}^{\text{ads}}$ na čase odhadnout dobu nezbytnou pro dosažení adsorpční rovnováhy a adsorbované množství zkušební látky v rovnováze. Příklady těchto křivek jsou na obrázcích 1 a 2 v dodatku 5. Rovnovážený čas je čas nezbytný k tomu, aby bylo v systému dosaženo plató.

Nevyskytuje-li se u určité půdy plató, ale nepřetržitý nárůst, může to být způsobeno komplikujícími faktory, jako jsou biologický rozklad a pomalá difuze. Biologický rozklad lze prokázat opakováním experimentu se sterilizovaným vzorkem půdy. Není-li ani v tomto případě dosaženo plató, měl by experimentátor pátrat po jiném jevu, ke kterému by mohlo při jeho studiích docházet; může tak učinit vhodnou změnou experimentálních podmínek (teploty, doby protřepávání, poměrů půda/roztok). Ponechává se na rozhodnutí experimentátora, zda bude pokračovat ve zkušebním postupu i přes případné nedosažení rovnováhy.

XVIII.1.9.2.3 Adsorpce na stěnách zkušební nádoby a stálost zkoušené látky

Některé informace o adsorpci zkoušené látky na stěnách zkušební nádoby a rovněž o stálosti zkoušené látky lze odvodit z analýzy kontrolních vzorků. Pozoruje-li se úbytek větší, než by odpovídalo obvyklé chybě analytické metody, může docházet k abiotickému rozkladu a/nebo adsorpci na stěnách zkušební nádoby. Tyto dva jevy lze rozlišit důkladným omytím stěn nádoby známým objemem vhodného rozpouštědla a analýzou výplachu na zkoušenou látku. Není-li zjištěna adsorpce na stěnách zkušební nádoby, je úbytek důkazem abiotické nestálosti zkoušené látky. Je-li zjištěna adsorpce, je nezbytné změnit materiál zkušebních nádob. Data o adsorpci na stěnách zkušebních nádob získaná v tomto experimentu však nelze přímo extrapolovat na experiment půda/roztok. Přítomnost půdy bude mít na tuto adsorpci vliv.

² K odhadu dosažení rovnovážného plató by mohly být rovněž použity křivky závislosti koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi ($C_{\text{vod}}^{\text{ads}}$) na čase

Další informace o stálosti zkoušené látky lze odvodit z množství bilance výchozí látky provedené po určitém čase. To znamená, že se na zkoušenou látku analyzují vodná fáze, extrakty půdy a stěny zkušební nádoby. Rozdíl mezi množstvím přidané zkoušené látky a součtem množství zkoušené látky ve vodné fázi, v extraktech půdy a na stěnách zkušební nádoby je roven množství, které se rozložilo, vytékalo a/nebo se neextrahovalo. Má-li být provedena množství bilance, mělo by být v době experimentu dosaženo adsorpční rovnováhy.

Množství bilance se provede u obou druhů půd a pro jeden poměr půda/roztok u každé půdy, u něhož je úbytek v rovnováze větší než 20 % a nejlépe větší než 50 %. Je-li experiment pro nalezení poměru dokončen analýzou posledního vzorku po 48 hodinách, fáze se oddělí centrifugací a podle požadavků filtrací. Odebere se pokud možno veškerá vodná fáze a k půdě se přidá vhodné extrakční rozpouštědlo (extrakční koeficient alespoň 95 %) za účelem extrakce zkoušené látky. Doporučují se alespoň dvě extrakce za sebou. Stanoví se množství zkoušené látky v půdě a v extraktech ze zkušební nádoby a provede se množství bilance (rovnice 10, Data a zprávy). Je-li nižší než 90 %, považuje se zkoušená látka za nestálou v poměru k délce zkoušky. Studie však může pokračovat, přičemž se zohlední nestálost zkoušené látky; v takovém případě se doporučuje, aby byly v hlavní studii analyzovány obě fáze.

XVIII.1.9.3 **Stupeň 2 – adsorpční kinetika při jedné koncentraci zkoušené látky**

Použije se pět druhů půd vybraných z tabulky 1. Je výhodné zahrnout mezi těchto pět půd některé nebo všechny půdy z předběžné studie. V tomto případě nemusí být stupeň 2 opakován pro půdy použité v předběžné studii.

Rovnovážný čas, poměr půda/roztok, hmotnost půdního vzorku, objem vodné fáze v kontaktu s půdou a koncentrace zkoušené látky v roztoku se volí na základě výsledků předběžné studie. Analýzy se provádějí nejlépe po 2, 4, 6, 8 (podle možnosti také po 10) a 24 h kontaktu s půdou; protřepávání může být prodlouženo až na maximálně 48 h u chemických látek, u nichž je pro dosažení rovnováhy podle výsledků předběžných studií nezbytný delší čas. Časy, kdy má být provedena analýza, lze volit pružně.

Každý experiment (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede alespoň dvojmo, aby bylo možné odhadnout rozptyl výsledků. S každým experimentem se provede slepý pokus. Provede se s půdou a s 0,01M roztokem CaCl_2 bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejněmu zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01M roztoku CaCl_2 (bez půdy), který slouží jako pojistka proti nečekaným výsledkům.

Procento absorpce se vypočte pro každý čas (A_t) a pro každý interval ($A_{\Delta t}$) (podle potřeby) a vynese se proti času. Rovněž se vypočtou distribuční koeficient K_d v rovnováze a adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku K_{ou} (pro nepolární organické chemické látky).

Výsledky zkoušky adsorpční kinetiky

Pro popis sorpčního chování v půdě je zpravidla dostatečně přesný lineární model K_d (35, 78), který je výrazem vlastní mobility chemických

látek v půdě. Například chemické látky s $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ jsou v zásadě považovány za zcela mobilní. Podobně byla MacCallem *et al* (16) vyvinuto klasifikační schéma mobility založené na hodnotách K_{ou} . Kromě toho existuje klasifikační schéma vymývateľnosti založené na vztahu mezi K_{ou} a DT-50¹ (1, 32, 79).

Podle studií statistických chyb (61) nelze z poklesu koncentrace ve vodné fázi přesně odhadnout hodnoty K_d nižší než $0,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, a to ani při nejpriznivějším (z hlediska správnosti) poměru půda/roztok, tj. při poměru 1:1. V takovém případě se doporučuje analýza obou fází – půdy i roztoku. S ohledem na výše uvedené poznámky se doporučuje pokračovat ve studii adsorpčního chování chemické látky v půdě a její případné mobility stanovením Freundlichových adsorpčních isotherm pro ty systémy, u nichž je přesné stanovení K_d možné postupem, popsaným v této zkušební metodě. Přesné stanovení je možné, je-li součin hodnoty K_d a poměru půda/roztok $> 0,3$ při měření založeném na poklesu koncentrace ve vodné fázi (nepřímá metoda), nebo je-li $> 0,1$ při analýze obou fází (přímá metoda) (61).

XVIII.1.9.4 **Stupeň 3 – adsorpční isothermy a desorpční kinetika/desorpční isothermy**

XVIII.1.9.4.1 *Adsorpční isothermy*

Použije se pět koncentrací zkoušené látky, nejlépe v rozsahu dvou řádů; při volbě koncentrací se zohlední rozpustnost ve vodě a výsledná rovnovážná koncentrace ve vodné fázi. V průběhu zkoušky se u každé půdy použije tentýž poměr půda/roztok. Adsorpční zkouška se provede výše uvedenou metodou pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou po uplynutí doby, která je nezbytná pro dosažení rovnováhy a která byla stanovena dříve ve stupni 2. Stanoví se rovnovážné koncentrace v roztoku a adsorbované množství se vypočte z úbytku zkoušené látky v roztoku nebo přímou metodou. Adsorbované množství na jednotku množství půdy se vynese jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky (viz oddíl Data a zprávy).

Výsledky z experimentu pro stanovení adsorpčních isotherm

Z dosud navržených matematických modelů adsorpčních isotherm se k popisu adsorpčních procesů používá Freundlichova isotherma nejčastěji. Podrobnější informace o interpretaci a významu adsorpčních modelů jsou uvedeny v literatuře (41, 45, 80, 81, 82).

Poznámka: Je třeba poznamenat, že hodnoty K_F (Freundlichových adsorpčních koeficientů) pro různé látky lze porovnávat pouze tehdy, jsou-li hodnoty K_F vyjádřeny ve stejných jednotkách (83).

XVIII.1.9.4.2 **Desorpční kinetika**

Účelem tohoto experimentu je vyšetřit, zda je chemická látka adsorbována na půdě vratně nebo nevratně. Tato informace je důležitá, neboť desorpční proces hraje také důležitou roli v chování chemické látky v půdě. Desorpční data jsou kromě toho užitečným vstupem pro počítačové modelování vyluhování a pro simulaci vyplavování rozpuštěných látek. Je-li studie desorpce požadována, doporučuje se, aby byla níže popsaná studie provedena na každém systému, na kterém bylo v předchozím experimentu pro studii adsorpční kinetiky možné provést přesné stanovení K_d .

¹ DT-50: doba rozkladu 50 % zkoušené látky.

Podobně jako u studie adsorpční kinetiky existují dvě možnosti, jak postupovat při experimentu pro studium desorpční kinetiky: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Volba metodiky, podle které bude postupováno, se ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit dostupné laboratorní vybavení a prostředky.

- a) Paralelní metoda: pro každou půdu zvolenou pro pokračení do studie desorpce se připraví tolik vzorků se stejným poměrem půda/roztok, kolik bude časů, v nichž se má studovat desorpční kinetika. Zvolí se nejlépe stejné časové intervaly, jako u experimentu pro studium adsorpční kinetiky; celkový čas se však prodlouží podle potřeby, aby v systému bylo dosaženo rovnováhy. S každým experimentem (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede slepý pokus. Provede se s půdou a s 0,01M roztokem CaCl_2 bez zkoušené látky se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejněmu zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01M roztoku CaCl_2 (bez půdy). Všechny směsi půdy s roztokem se protřepávají do ustavení adsorpční rovnováhy (která se zjišťuje postupem uvedeným dříve ve stupni 2). Poté se fáze oddělí centrifugací a vodná fáze se pokud možno kvantitativně odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01M CaCl_2 bez zkoušené látky a nová směs se opět protřepává. Kupříkladu po 2 h se pokud možno kvantitativně odebere a změří vodná fáze první zkušební nádoby, totéž se provede s vodnou fází druhé zkušební nádoby po 4 h, s vodnou fází třetí zkušební nádoby po 6 h atd., až do dosažení desorpční rovnováhy.
- b) Sériová metoda: po experimentu pro stanovení adsorpční kinetiky se směs zcentrifuguje a vodná fáze se pokud možno kvantitativně odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01M CaCl_2 bez zkoušené látky. Nová směs se protřepává až do ustavení desorpční rovnováhy. Během této doby se ve stanovených časových intervalech směs centrifuguje za účelem oddělení fází. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Objem každého jednotlivého podílu by měl být menší než 1 % celkového objemu. Ke směsi se přidá stejný objem čerstvého 0,01M roztoku CaCl_2 , aby se zachoval poměr půda/roztok, a v protřepávání se pokračuje po další časový interval.

Procento desorpce se vypočte pro každý čas (D_{t_i}) a pro každý interval ($D_{\Delta t_i}$) (podle potřeb studie) a vynese se proti času. Rovněž se vypočte hodnota desorpčního koeficientu K_{des} v rovnováze. Všechny příslušné rovnice jsou uvedeny v oddíle Data a zprávy a v dodatku 5.

Výsledky z experimentu pro studium desorpční kinetiky

Společný graf křivek závislostí procenta desorpce D_{t_i} a adsorpce A_{t_i} na čase umožní posoudit vratnost adsorpčního procesu. Je-li desorpční rovnováhy dosaženo do dvojnásobku času potřebného pro adsorpční rovnováhu a je-li celková desorpce vyšší než 75 % adsorbovaného množství, považuje se adsorpce za vratnou.

XVIII.1.9.4.3 Desorpční isothermy

Freundlichovy desorpční isothermy se vyšetřují na půdách použitých ke stanovení adsorpčních isotherm. Zkouška desorpce se provede způsobem popsaným v oddíle Desorpční kinetika, pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou, a to v desorpční rovnováze. Vypočte se desorbované množství zkoušené látky. Množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované na půdě po dosažení desorpční rovnováhy se vynesou jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky v roztoku (viz oddíl Data a zprávy a dodatek 5).

XVIII.2 DATA A ZPRÁVY

Data z analýzy se předloží ve formě tabulky (viz dodatek 6). Uvedou se jednotlivá měření a vypočtené průměrné hodnoty. Předloží se grafy adsorpčních isotherm. Výpočty se provedou níže uvedeným způsobem.

Pro účely zkoušky se předpokládá, že hmotnost 1 cm³ vodného roztoku je 1 g. Poměr půda/roztok může být vyjádřen stejným číslem pro rozměr hmot./hmot. i pro rozměr hmot./obj.

XVIII.2.1 ADSORPCE

Adsorpce (A_t) je definována jako procentuální podíl látky z celkového množství látky na začátku zkoušky, který se za zkušebních podmínek naadsorboval na půdě. Je-li zkoušená látka stálá a neadsorbuje se významně na stěnách nádoby, vypočte se A_t pro každý čas z rovnice:

$$A_t = \frac{m_p^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

kde:

- A_t = procento adsorpce v čase t_i (%);
- $m_p^{\text{ads}}(t_i)$ = množství zkoušené látky adsorbované na půdě v čase t_i (μg);
- m_0 = množství zkoušené látky ve zkumavce na začátku zkoušky (μg);

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce A_t pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Distribuční koeficient K_d je poměr mezi množstvím látky v půdě a hmotnostní koncentrací látky ve vodném roztoku za zkušebních podmínek a při dosažení adsorpční rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{půda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

kde:

- $C_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze (μg·g⁻¹)
- $C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v adsorpční rovnováze (μg·cm⁻³). Tato koncentrace se stanoví analyticky a zohlední se hodnoty ze slepých pokusů
- $m_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze (μg)
- $m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky v roztoku v adsorpční

$m_{\text{půda}}$ = rovnováže (μg)
 = množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti
 půdy (g)
 v_0 = počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou
 (cm^3).

Vztah mezi A_{eq} a K_d je dán rovnicí:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{půda}}} \left(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (5)$$

kde:

A_{eq} = procento adsorpce v adsorpční rovnováze, %.

Vztah adsorpčního koeficientu normalizovaného na obsah organického uhlíku K_{ou} , distribučního koeficientu K_d a obsahu organického uhlíku v půdním vzorku je následující:

$$K_{\text{ou}} = K_d \cdot \frac{100}{\% \text{ ou}} \left(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (6)$$

kde:

% ou = procentuální obsah organického uhlíku v půdním vzorku ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Koeficient K_{ou} je jedinou veličinou, která charakterizuje rozdělení hlavně anorganických nepolárních látek mezi organickým uhlíkem v půdě nebo sedimentu a vodou. Adsorpce těchto chemických látek koreluje s obsahem pevného sorbujícího organického materiálu (7); hodnoty K_{ou} závisí na specifických charakteristikách humózních frakcí, jejichž sorpční kapacit se významně liší z důvodu původu, vzniku atd.

XVIII.2.1.1 Adsorpční isothermy

Rovnice Freundlichových adsorpčních isotherm vyjadřují vztah mezi adsorbovaným množstvím zkoušené látky a koncentrací zkoušené látky v roztoku v rovnováze (rovnice 8).

Data se zpracovávají jako v oddíle o adsorpci a pro každou zkušební nádobu se vypočte množství zkoušené látky adsorbované na půdě po adsorpční zkoušce (C_p^{ads} (eq)), jinde označeno jako x/m). Předpokládá se, že rovnováhy bylo dosaženo a že C_p^{ads} (eq) představuje rovnovážnou hodnotu:

$$C_p^{\text{ads}} (\text{eq}) = \frac{m_p^{\text{ads}} (\text{eq})}{m_{\text{půda}}} = \frac{[C_0 - C_{\text{vod}}^{\text{ads}} (\text{eq})] \cdot V_0}{m_{\text{půda}}} \left(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpční rovnice má tento tvar (8):

$$C_p^{\text{ads}} (\text{eq}) = K_F^{\text{ads}} \cdot C_{\text{vod}}^{\text{ads}} (\text{eq})^{1/n} \left(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (8)$$

nebo v lineární formě:

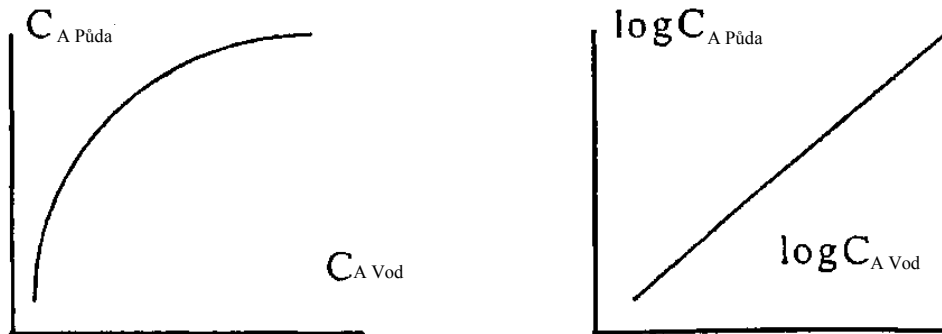
$$\log C_p^{\text{ads}} (\text{eq}) = \log K_F^{\text{ads}} + 1/n \cdot \log C_{\text{vod}}^{\text{ads}} (\text{eq}) \quad (9)$$

kde:

K_F^{ads} = Freundlichův adsorpční koeficient; má rozměr $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ pouze tehdy, je-li $1/n = 1$; v ostatních případech se směrnice $1/n$ projeví v rozměru $K_F^{\text{ads}} \left[\mu\text{g}^{1-1/n} \left(\text{cm}^3 \right)^{1/n} \cdot \text{g}^{-1} \right]$

n = regresní konstanta; $1/n$ se zpravidla pohybuje od 0,7 do 1,0, což znamená, že jsou sorpční data často nelineární.

Rovnice (8) a (9) se vyjádří graficky a hodnoty K_F^{ads} a $1/n$ se zjistí regresní analýzou s ohledem na rovnici 9. Vypočte se rovněž korelační koeficient r^2 proložení logaritmické rovnice. Příklad takové křivky je uveden na obrázku 2.



Obrázek 2 Freundlichovy adsorpční křivky, normální a linearizovaná forma

XVIII.2.1.2 Hmotnostní bilance

Hmotnostní bilance (MB) je definována jako procentuální podíl látky z nominálního množství látky na začátku zkoušky, který lze znovu analyticky vyzískat po adsorpční zkoušce.

Zpracování dat se bude lišit podle toho, zda je rozpouštědlo neomezeně mísitelné s vodou. V případě rozpouštědel mísitelných s vodou mohou být data zpracována pro stanovení množství látky znovu získané extrakcí rozpouštědlem stejným způsobem, jako v oddíle o desorpci. Je-li rozpouštědlo mísitelné s vodou omezeně, musí být provedeno stanovení množství znovu získané látky.

Hmotnostní bilance pro adsorpci se vypočte níže uvedeným způsobem; jako m_E se označí součet množství zkušební látky extrahovaných organickým rozpouštědlem z půdy a ze stěn zkušební nádoby:

$$MB = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kde:

- MB = hmotnostní bilance (%)
- m_E = celkové množství zkušební látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádoby ve dvou krocích (μg)
- C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušební roztoku v kontaktu s půdou ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
- V_{rec} = objem supernatantu vyzískaný po dosažení adsorpční rovnováhy (cm^{-3})

XVIII.2.2 DESORPCE

Desorpce (D) je definována jako podíl zkušební látky z dříve adsorbovaného množství, který se za zkušebních podmínek desorboval:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{v}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

kde:

- D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%)
- $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$ = množství zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i (μg)
- $m_{\text{půda}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze (μg)

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta desorpce D_{t_i} pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Zdánlivý desorpční koeficient (K_{des}) je za zkušebních podmínek poměr mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala v půdě a hmotnostní koncentrací desorbované látky ve vodném roztoku po dosažení desorpční rovnováhy:

$$K_{\text{des}} = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})} \frac{V_{\text{T}}}{m_{\text{půda}}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

kde:

- K_{des} = desorpční koeficient ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
- $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = celkové množství zkoušené látky desorbované z půdy v desorpční rovnováze (μg)
- V_{T} = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během zkoušky desorpční kinetiky (cm^3)

Návod pro výpočet hodnoty $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ je uveden v dodatku 5 v oddíle o desorpci.

Poznámka:

Provede-li se předcházející adsorpční zkouška paralelní metodou, je objem V_{T} v rovnici 12 roven V_0 .

XVIII.2.2.1 Desorpční isothermy

Rovnice Freundlichových desorpčních isotherm vyjadřují vztah mezi množstvím zkoušené látky, které zůstalo adsorbované na půdě a koncentrací zkoušené látky v roztoku v desorpční rovnováze (rovnice 16). Pro každou zkušební nádobu se množství zkoušené látky, které zůstalo v desorpční rovnováze adsorbované na půdě, vypočte takto:

$$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{půda}}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (13)$$

množství $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ je definováno takto:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{r}}} - m_{\text{vod}}^{\text{A}} (\mu\text{g}) \quad (14)$$

kde:

- $C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované na půdě v desorpční rovnováze ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
- $m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = analyticky stanovené množství látky ve vodné fázi v desorpční rovnováze (μg)
- $m_{\text{vod}}^{\text{A}}$ = množství látky, které zbylo (aniž se adsorbovalo) po ustavení adsorpční rovnováhy, a to v důsledku

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = nekvantitativní výměny objemu vodné fáze, (μg)
 množství látky v roztoku v adsorpční rovnováze (μg)

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{r}^{F} = objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby ke stanovení zkoušené látky v desorpční rovnováze (cm^3)

V_{R} = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2 (cm^3)

Freundlichova desorpční rovnice vypadá takto (16):

$$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (16)$$

a v lineární formě:

$$\log C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

kde:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlichův desorpční koeficient

n = regresní konstanta

$C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v desorpční rovnováze ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Rovnice 16 a 17 se vyjádří graficky a hodnoty $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ a $1/n$ se zjistí regresní analýzou s ohledem na rovnici 17.

Poznámka:

Je-li Freundlichův adsorpční nebo desorpční exponent $1/n$ roven 1, bude Freundlichova adsorpční nebo desorpční konstanta ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ a $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) rovna adsorpční resp. desorpční rovnovážné konstantě (K_{d} resp. K_{des}) a křivky závislosti C_{s} na C_{aq} budou lineární. Nejsou-li exponenty rovny 1, křivky závislosti C_{p} na C_{vod} budou nelineární a adsorpční a desorpční konstanty se budou podél isotherem lišit.

XVIII.2.2.2 Zpráva o zkoušce

Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

- úplná identifikace použitých půdních vzorků včetně:
 - zeměpisné informace o lokalitě (zeměpisná šířka, zeměpisná délka),
 - datum odběru vzorku,
 - využití půdy (např. zemědělská půda, lesní půda atd.),
 - hloubka odběru vzorků,
 - obsah písku/prachových částic/jílu,
 - pH (v 0,01M CaCl_2)
 - obsah organického uhlíku,
 - obsah organického materiálu,
 - obsah dusíku,
 - poměr C/N,
 - kationtová výměnná kapacita (mmol/kg),
 - všechny informace týkající se sběru a uchování vzorků,

- podle potřeby všechny informace pro interpretaci adsorpce/desorpce zkoušené látky,
- odkaz na metody reference použité pro stanovení jednotlivých parametrů,
- podle potřeby informace o zkoušené látce,
- teplota při experimentu,
- parametry centrifugace,
- analytický postup použitý při analýze zkoušené látky,
- odůvodnění jakéhokoli použití solubilizačního činidla při přípravě zásobního roztoku zkoušené látky,
- vysvětlení korekcí provedených ve výpočtech, je-li to důležité,
- data podle formuláře (dodatek 6) a grafická znázornění,
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků zkoušky.

XVIII.3 LITERATURA

- (1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
- (2) Fränzle O., Kuhnt G., Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
- (3) Kuhnt G., Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
- (5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
- (6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- (7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{ou}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- (11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

- (12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in *Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil* (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in *Interactions between herbicides and the soil.* (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, str. 83 – 122.
- (14) Hasset J. J., Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils.* Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, str. 31 – 44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol. 38(1), str. 29 – 35.
- (16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in *Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants.* Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S. M., Porter P. E., Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. *Weeds*, 13, str. 185 – 190.
- (18) Rhodes R. C., Belasco I. J., Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. *J. Agric. Food Chem.*, 18, str. 524 – 528.
- (19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in *Environmental Behavior of Agrochemicals* (ed. T. R. Roberts, P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W., Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). *Pure Appl. Chem.*, 60, str. 901 – 932.
- (21) Guth J. A., Burkhard N., D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides*, str. 137 – 157, BCPC, Surrey, UK.
- (22) Furminge C. G. L., Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. *J. Sci. Fd. Agric.*, 18, str. 269 – 273.
- (23) Burkhard N., Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. *Pestic. Sci.* 12, str. 45 – 52.
- (24) Guth J. A., Gerber H. R., Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.*, 3, str. 961 – 971.
- (25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. *Pestic. Sci.*, 4, str. 247 – 258.

- (26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, str. 143 – 154.
- (27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in *Environmental Dynamics of Pesticides* (eds R. Haque, V. H. Freed), str. 135 – 172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35, str. 732 – 210.
- (29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in *Organic chemicals in the soil environment* (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, str. 49 – 143.
- (30) Burkhard N., Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. *Pestic. Sci.* 12, str. 37 – 44.
- (31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, str. 297 – 325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. *J. Environ. Toxic. Chem.*, 8(4), str. 339 – 357.
- (33) Leistra M., Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. *J. Soil Sci.*, 28, str. 340 – 350.
- (34) Bromilov R. H., Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. *Pest. Sci.*, 11, str. 389 – 395.
- (35) Green R. E., Karickhoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in *Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2*, str. 80 – 101,
- (36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. *J. Agri. Food Chem.*, 15, str. 572 – 576.
- (37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. *J. Agri. Food Chem.*, 17, str. 667 – 668.
- (38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. *Nature*, 223, 1288. (39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. *J. Agric. Food Chem.*, 29, str. 1050 – 1059.
- (40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. *J. Agric. Food Chem.*, 32, str. 243 – 246.

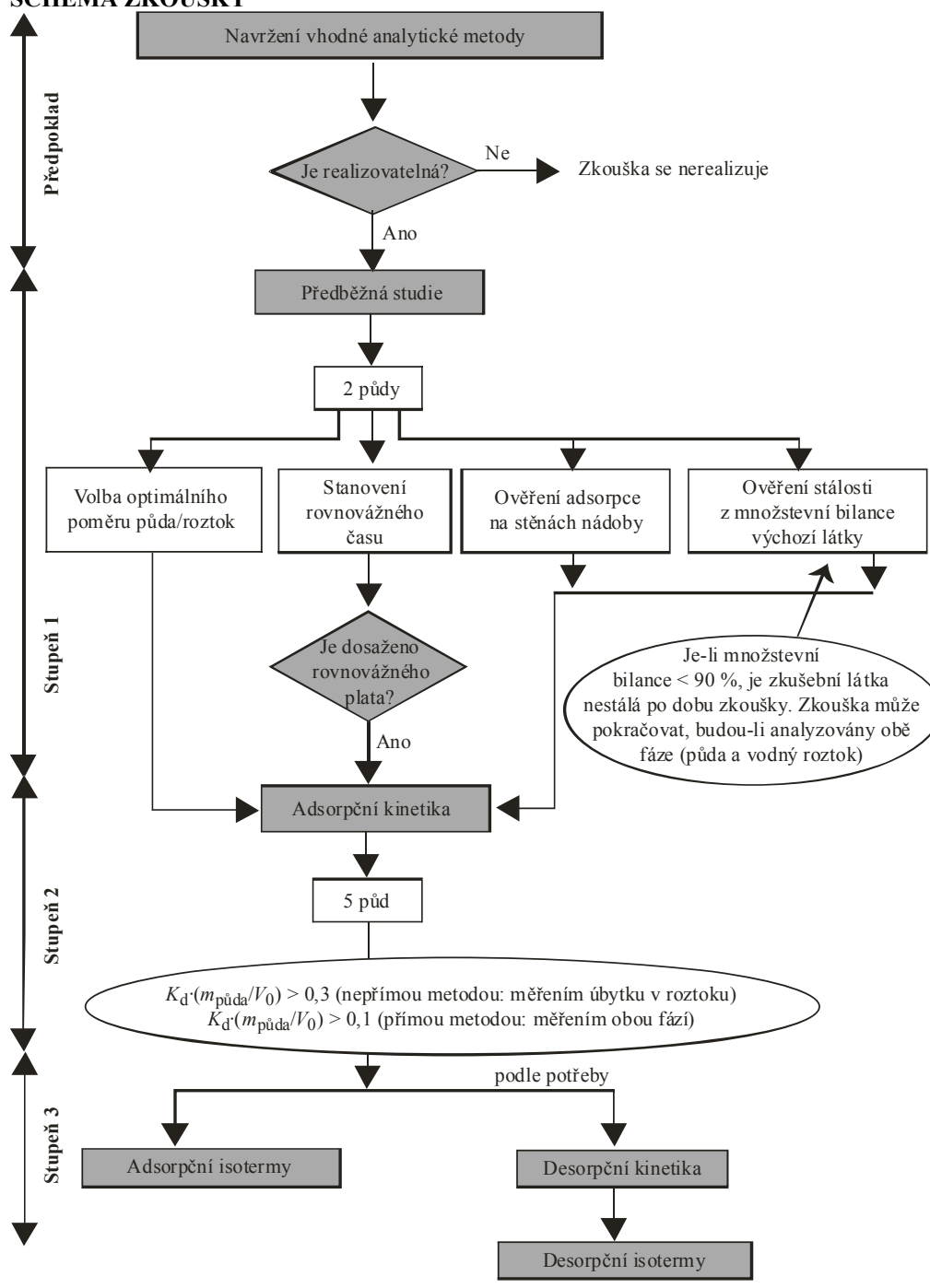
- (41) Bailey G. W., White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. *Residue Rev.*, 32, str. 29 – 92.
- (42) Bailey G. W., J. L. White, Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montmorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32: str. 222 – 234.
- (43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere* 10, str. 833 – 846.
- (44) Paya-Perez A., Riaz M., Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. *Environ. Toxicol. Safety* 21, str. 1 – 17.
- (45) Hamaker J. W., Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals“ in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C. A. I., Hamaker J. W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, str. 49 – 143.
- (46) Deli J., Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. *Weed Sci.* 19: str. 67 – 69.
- (47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M., Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. *Weed Sci.*, Vol. 23, str. 454 – 457.
- (48) Haues M. H. B., Stacey M., Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- (49) Pionke H. B., Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- (50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- (51) Scheffer F., Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- (52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 a 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
- (53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

- (58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R. E., Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements“. *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, str. 353 – 354.
- (60) Grover R., Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. *Soil Sci.*, str. 109 – 138.
- (61) Boesten, J. J. T. I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. *Pest. Sci.* 1990, 30, str. 31 – 41.
- (62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106,„. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26 – 29 April 1994.
- (63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. *Weed Res.* 21, str. 227 – 231.
- (64) Brown D. S., Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. *J. Environ. Qual.*, 10(3), str. 382 – 386.
- (65) Chiou C. T., Porter P. E., Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), str. 227 – 231.
- (66) Gerstl Z., Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. *J. Environ. Sci. Health*, B19 (3), str. 297 – 312.
- (67) Vowles P. D., Mantoura R. F. C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. *Chemosphere*, 16(1), str. 109 – 116.
- (68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E. E., Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), str.78 – 115, ASTM STP 707, Philadelphia.
- (70) Chiou C. T., Peters L. J., Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. *Science*, Vol. 206, str. 831 – 832.
- (71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., Means J. C., (1981), „Sorption of *p*-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, str. 38 – 42.
- (72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere*, Vol. 10(8), str. 833 – 846.
- (73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité“. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), str. 319 – 322.

- (74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. *Chemosphere*, 32(12), str. 2493 – 2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test“. *Chemosphere* 30 (7), str. 1373 – 1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases“. *Chemosphere* 27 (12), str. 2341 – 2352.
- (77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. *Weed Res.*, Vol. 7, str. 29 – 36.
- (78) Koskinen W. C., Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural use“, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, str.297 – 325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC. (80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherm“ in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, str. 14 – 32.
- (81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N., Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soil“. *J. Chem. Soc.*, str. 3973 – 93.
- (82) Calvet R., TercE M., Arvien J. C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption“. *Ann. Agron.* 31: str. 239 – 251.
- (83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13 – 15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- (84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1 – 3, Canterbury, UK.
- (85) *Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

DODATEK 1

SCHÉMA ZKOUŠKY



DODATEK 2

VLIV SPRÁVNOSTI ANALYTICKÉ METODY A ZMĚNY KONCENTRACE NA SPRÁVNOST VÝSLEDKŮ ADSORPČNÍ STUDIE

Z následující tabulky (84) je zřejmé, že je-li rozdíl mezi počáteční hmotností zkoušené látky ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) a její rovnovážnou hmotností v roztoku ($m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$), je důsledkem 5% chyby měření rovnovážné koncentrace 50% chyba ve výpočtu hmotnosti zkoušené látky adsorbované na půdě ($m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})$) a 52,4% chyba ve výpočtu K_d .

Množství půdy $m_{p\grave{u}da} = 10 \text{ g}$

Objem roztoku $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_v^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	R	$m_p^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_p^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	R^{\pm}	K_d^*	R^{\pm}
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100$	PRO A = 9 %							
	100	1,000	skutečná hodnota	10	1,00	skutečná hodnota	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100$	PRO A = 55 %							
	50,0	0,500	skutečná hodnota	60,0	6,00	skutečná hodnota	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100$	PRO A = 99 %							
	1,100	0,011	skutečná hodnota	108,9	10,89	skutečná hodnota	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

kde:

$$* m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_v^{\text{ads}}(\text{eq}), C_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})]V_0}{m_{\text{bodem}}}, K_d = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_v^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{bodem}}}$$

$m_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky v půdě v rovnováze, μg

$m_v^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky ve vodné fázi v rovnováze, μg

$C_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky v půdě v rovnováze, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

$C_v^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky ve vodné fázi v rovnováze, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

R = analytická chyba stanovení $m_v^{\text{ads}}(\text{eq})$

R^{\pm} = vypočtená chyba vyplývající z analytické chyby R .

DODATEK 3

METODY ODHADU K_d

1. Metody odhadu umožňují předpovědět K_d na základě korelací například s hodnotami P_{ov} (12, 39, 63 – 68), s daty o rozpustnosti (12, 19, 21, 39, 68 – 73) nebo s daty o polaritě získanými při použití HPLC s obrácenou fází (74 – 76). Jak je patrné z tabulky 1 a 2, vypočtou se z takových rovnic hodnoty K_{ou} nebo K_{om} a poté nepřímo hodnoty K_d z rovnic:

$$K_{\text{ou}} = K_d \cdot \frac{100}{\% \text{ou}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad K_{\text{om}} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\% \text{ou}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$$

2. Tyto korelace jsou založeny na dvou předpokladech: 1) adsorpci látky nejvíce ovlivňuje organický materiál v půdě a 2) mechanismus interakce je převážně nepolární. V důsledku toho tyto korelace 1) nejsou použitelné na polární látky (nebo jsou použitelné jen do určité míry) a 2) nejsou použitelné v případech, kdy je obsah organického materiálu v půdě velmi malý (12). Kromě toho, ačkoli byla zjištěna uspokojivá korelace mezi P_{ov} a adsorpcí

(19), nelze totéž říci o korelaci mezi rozpustností ve vodě a mírou adsorpce (19, 21); v tomto ohledu jsou tyto studie protichůdné.

3. Některé příklady korelace mezi adsorpčním koeficientem a rozdělovacím poměrem oktanol/voda nebo rozpustností ve vodě jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda; další příklady jsou uvedeny v literatuře (12, 68)

Látky	Korelace	Autoři
Substituovaná močovina	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ov}$	Briggs (1981) (39)
Chlorované aromatické sloučeniny	$\log K_{ou} = -0,779 + 0,904 \log P_{ov}$	Chiou et al. (1983) (65)
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ov}$	Gerstl a Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhlovodíky	$\log K_{ou} = -2,53 + 1,15 \log P_{ov}$	Vowles a Mantoura (1987) (67)

Tabulka 2. Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozpustností ve vodě; další příklady jsou uvedeny v literatuře (68, 69)

Sloučeniny	Korelace	Autoři
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_v$	Gerstl a Mingelgrin (1984) (66)
Chlorované alifatické a aromatické látky	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_v$	Chiou et al. (1979) (70)
α -Naftol	$\log K_{ou} = 4,273 - 0,686 \log S_v$	Hasset et al. (1981) (71)
Cyklické, alifatické a aromatické látky	$\log K_{ou} = -1,405 - 0,921 \log S_v - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Různé látky	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_v$	Moreale van Blade (1982) (73)

DODATEK 4

VÝPOČTY PRO STANOVENÍ PARAMETRŮ CENTRIFUGACE

1. Centrifugační doba se za předpokladu, že jsou částice kulové, vypočte podle následující rovnice:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_p - \rho_{\text{vod}})} \right] \ln \left(\frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1)$$

Pro zjednodušení nejsou parametry uvedeny v základních jednotkách SI (ale v jednotkách soustavy CGS).

kde:

ω	=	úhlová rychlost (= $2 \pi \cdot (rpm)/60$), $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$
rpm	=	počet otáček za minutu
η	=	viskozita roztoku, $\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
r_p	=	poloměr částic, cm
ρ_p	=	hustota pŕdy, $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
ρ_{vod}	=	hustota roztoku, $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
R_t	=	vzdálenost od středu rotoru centrifugy k hladině roztoku v centrifugační kyvetě, cm
R_b	=	vzdálenost od středu rotoru centrifugy ke dnu centrifugační kyvetě, cm

$R_b - R_t$ = výška sloupce směsi půda/roztok v centrifugační kyvetě, cm.

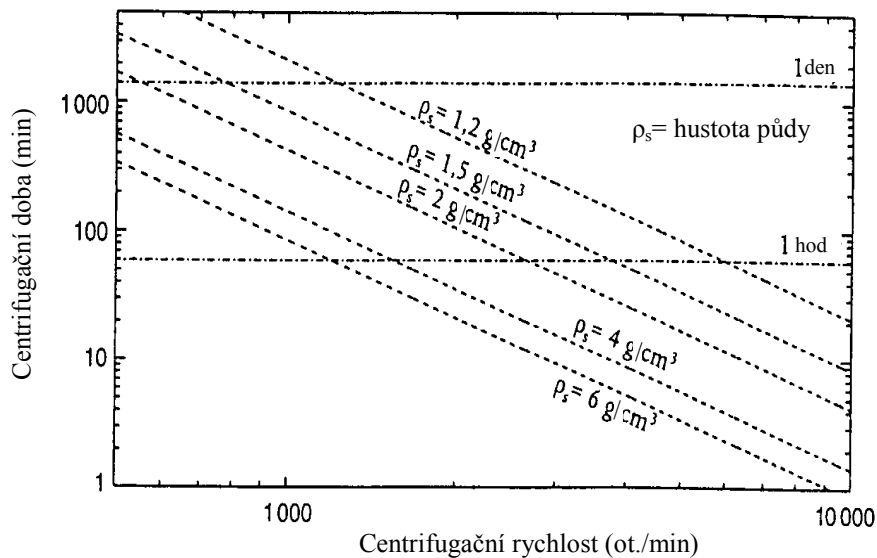
V praxi se k zajištění úplného oddělení volí dvojnásobek vypočteného času.

2. Rovnici (1) lze dále zjednodušit, jestliže se položí viskozita (η) a hustota (ρ_{vod}) roztoku rovny viskozitě a hustotě vody při 25 °C; tedy $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

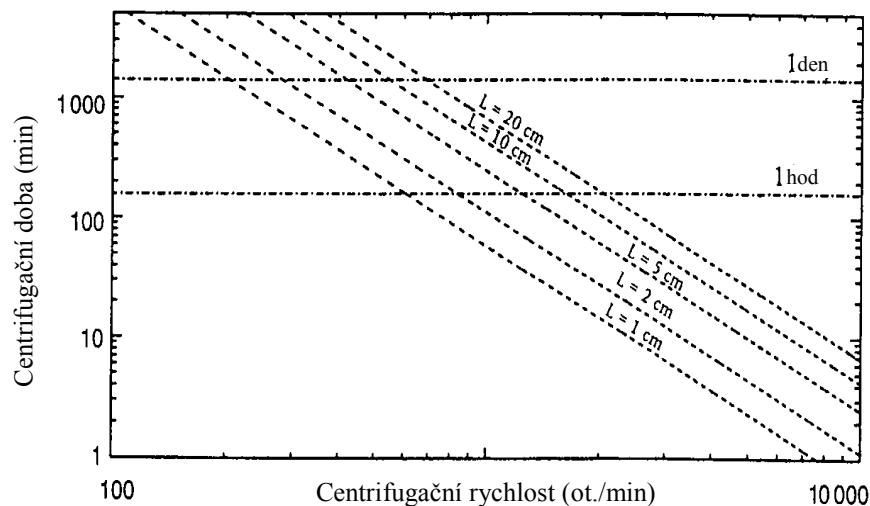
Centrifugační doba je poté dána rovnicí (2):

$$t = \frac{3,7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_p - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Z rovnice 2 vyplývá, že pro účely oddělení částic o určité velikosti (v našem případě o poloměru 0,1 μm) jsou pro stanovení parametrů centrifugace, tj. doby (t) a počtu otáček za minutu (rpm), důležité dvě charakteristiky: 1) hustota půdy a 2) výška sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$), tj. vzdálenost, kterou půdní částice urazí mezi hladinou v kyvetě a jejím dnem; výška sloupce směsi v kyvetě bude při pevně stanoveném objemu samozřejmě záviset na druhé mocnině poloměru kyvety.
4. Na obrázku 1 jsou znázorněny změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (rpm) pro různé hustoty půdy (ρ_p) (obrázek 1a) a pro různé výšky sloupce směsi v centrifugačních kyvetách (obrázek 1b). Z obrázku 1a je zřejmý vliv hustoty půdy; např. při obvyklých 3 000 ot./min je centrifugační doba přibližně 240 min pro hustotu půdy 1,2 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, ale pouze 50 min pro 2,0 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Podobně je podle obrázku 1b při obvyklých 3 000 ot./min centrifugační doba přibližně 50 min pro výšku sloupce směsi 10 cm a pouze 7 min pro výšku sloupce 1 cm. Je však důležité nalézt optimální poměr mezi centrifugací, která vyžaduje co nejmenší výšku sloupce, a snadností, s jakou může experimentátor oddělovat fáze po centrifugaci.
5. Kromě toho je při stanovování experimentálních podmínek při oddělování fází půda/roztok důležité počítat s možnou přítomností třetí „pseudofáze“, koloidu. Koloidní částice s velikostí menší než 0,2 μm mohou mít značný vliv na celý mechanismus adsorpce látky v půdní suspenzi. Při centrifugaci, jak je popsána výše, zůstanou koloidní částice ve vodné fázi a analyzují se společně s vodnou fází. Informace o jejich vlivu se tedy ztratí. Má-li laboratoř, která studii provádí, zařízení pro ultracentrifugaci nebo ultrafiltraci, mohla by být adsorpce/desorpce studována hlouběji včetně informací o adsorpci látky na koloidních částicích. V takovém případě se k oddělení tří fází – půdy, koloidních částic a roztoku, použije ultracentrifugace při 60 000 ot./min nebo ultrafiltrace na filtru zachycujícím částice o velikosti 100 000 daltonů. Protokol o zkoušce by měl být také odpovídajícím způsobem pozměněn, mají-li být analyzovány všechny tři fáze.



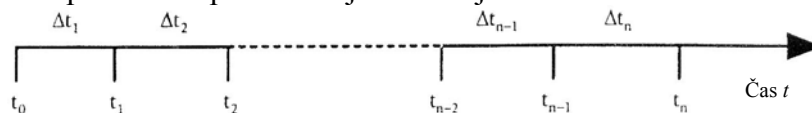
Obrázek 1a Změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot./min) pro různé hustoty půdy (ρ_p). $R_t = 10$ cm, $R_b - R_t = 10$ cm, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ při 25°C .



Obrázek 1b Změna centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot./min) pro různé výšky sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10$ cm, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ při 25°C a $\rho_p = 2,0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

DODATEK 5 VÝPOČET ADSORPCE A (%) A DESORPCE D (%)

Časové schéma průběhu experimentu je následující:



U všech výpočtů se předpokládá, že zkoušená látka je stálá a že se významně neadsorbují na stěnách nádoby.

ADSORPCE (A%)

a) *Paralelní metoda*

Procento adsorpce se vypočte pro každou zkušební nádobu (i) pro každý čas (t_i) podle následující rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)$$

Veličiny v této rovnici lze vyčíslit takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

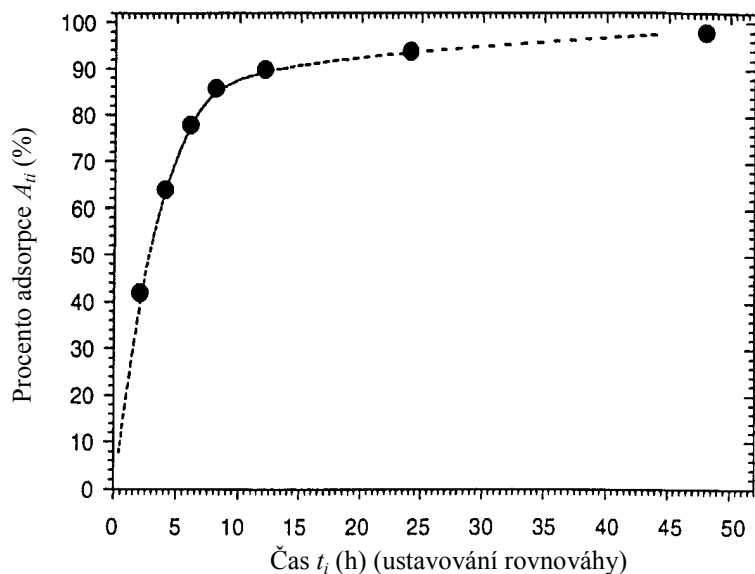
$$m_p^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kde:

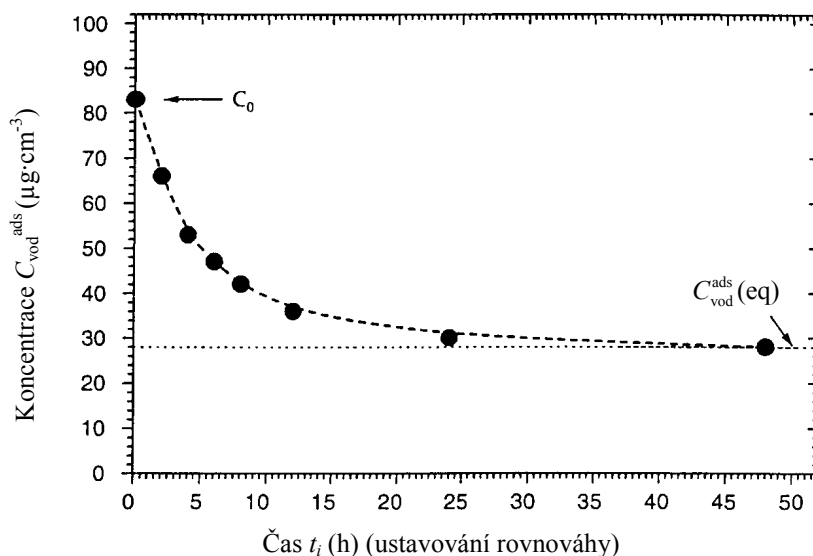
A_{t_i}	=	procento adsorpce (%) v čase t_i
$m_p^{\text{ads}}(t_i)$	=	množství zkoušené látky na půdě v čase t_i , kdy je prováděna analýza (μg)
m_0	=	množství zkoušené látky v nádobě na začátku zkoušky (μg)
C_0	=	počáteční hmotnostní koncentrace zkušební roztoku v kontaktu s půdou ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$	=	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i , kdy je prováděna analýza, ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$); Tato koncentrace se stanoví analyticky a koriguje se na hodnoty ze slepých pokusů
V_0	=	počáteční objem zkušební roztoku v kontaktu s půdou (cm^3).

Hodnoty adsorpčního procenta A_{t_i} nebo $C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$ se vynesou proti času a zjistí se doba, po níž se ustavila sorpční rovnováha. Příklady takových křivek jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2.

³ Rovnice je použitelná jak pro přímou, tak pro nepřímou metodu. Všechny ostatní metody jsou použitelné pouze pro nepřímou metodu.



Obrázek 1 Křivka ustavování adsorpční rovnáhy



Obrázek 2. Závislost hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi (C_{vod}) na čase
b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že se při studii adsorpce provádějí měření zkoušené látky v malých podílech vodné fáze v určitých časových intervalech.

— Pro každý časový interval se množství látky adsorbované na půdě vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— pro třetí časový interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— pro n -tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Procento adsorpce v každém časové intervalu $A_{\Delta t_i}$ se vypočte z následující rovnice:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

zatímco procento adsorpce (A_i) v čase t_i je dáno rovnicí:

$$A_i = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_p^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Hodnoty procenta adsorpce A_i nebo $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou proti času a stanoví se doba, po níž se ustavila sorpční rovnováha.

— V čase ustavení rovnováhy t_{eq} :

— je množství zkoušené látky adsorbované na půdě:

$$m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

— množství zkoušené látky v roztoku:

$$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a procento adsorpce v rovnováze:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Výše uvedené veličiny jsou definovány takto:

$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = množství látky adsorbované na půdě za časový interval $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$, (μg)

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = množství látky naměřené v podílu (v_a^A) v okamžiku t_1, t_2, \dots, t_n , (μg)

⁴ Rovnice je použitelná jak pro přímou, tak pro nepřímou metodu. Všechny ostatní metody jsou použitelné pouze pro nepřímou metodu

$m_p^{\text{ads}}(\text{eq})$	= množství zkoušené látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze, (μg)
$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	= množství zkoušené látky v roztoku v adsorpční rovnováze, (μg)
v_a^A	= objem podílu, ve kterém je látka stanovována, (cm^3)
$A_{\Delta t_i}$	= procento adsorpce odpovídající časovému intervalu Δt_i , (%)
A_{eq}	= procento adsorpce v adsorpční rovnováze

DESORPCE (%)

Časem t_0 , v němž se zahájí experiment pro studium desorpční kinetiky, je okamžik, kdy je co největší objem roztoku zkoušené látky (po dosažení adsorpční rovnováhy) nahrazen stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2 .

a) Paralelní metoda

V čase t_i se změří množství zkoušené látky ve vodné fázi odebrané ze zkušební nádoby i (V_r^i) a desorbované množství se vypočte z rovnice:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{vod}}^A \quad (13)$$

V desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{\text{eq}}$, a tedy $m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$.

Množství zkušební látky desorbované během časového intervalu (Δt_i) je dáno rovnicí:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{vod}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Procento desorpce se vypočte takto:

— v čase t_i z rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

— a během časového intervalu (Δt_i) z rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

kde:

D_{t_i}	= procento desorpce v čase t_i , (%)
$D_{\Delta t_i}$	= procento desorpce za časový interval Δt_i , (%)
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$	= množství zkoušené látky desorbované v čase t_i , (μg)
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	= množství zkoušené látky desorbované během

- časového intervalu Δt_i , (μg)
- $m_m^{\text{des}}(t_i)$ = množství zkoušené látky analyticky změřené v čase t_i v roztoku o objemu V_r^i , který byl odebrán k analýze, (μg)
- $m_{\text{vod}}^{\text{A}}$ = množství látky, které zbylo (aniž se adsorbovalo) po ustavení adsorpční rovnováhy, a to v důsledku nekvantitativní výměny objemu vodné fáze, (μg)

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

- $m_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky v roztoku v adsorpční rovnováze, (μg)
- V_{R} = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2 (cm^3)
- V_r^i = objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby (i) ke stanovení zkoušené látky v experimentu pro studium desorpční kinetiky (cm^3).

Hodnoty procenta desorpce D_{t_i} nebo $D_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou proti času a stanoví se doba, po níž se ustavila desorpční rovnováha.

b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že byla při předcházející studii adsorpce prováděna měření zkoušené látky v malých podílech v_a^{A} vodné fáze (sériová metoda v bodě 1.9 Provedení zkoušky) Předpokládá se, že a) objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po experimentu pro studium adsorpční kinetiky byl nahrazen stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2 (V_{R}) a b) celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (V_{T}) během experimentu pro studium desorpční kinetiky zůstává konstantní a je dán rovnicí:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

V čase t_i :

- množství zkoušené látky se měří v malých podílech (v_a^{D}) a desorbované množství se vypočte z následující rovnice:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^{\text{D}}} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (i-1) \cdot v_a^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad (19)$$

- v desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{\text{eq}}$, a tedy $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$
- procento desorpce D_{t_i} se vypočte z následující rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (20)$$

Za časový interval (Δt_i):

Pro každý časový interval se desorbované množství látky vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{A}} \quad \text{a} \quad m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{p}}^{\text{vod}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right)$$

a

$$m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

pro n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

a

$$m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Procento desorpce za každý časový interval $D_{\Delta t_i}$ se nakonec vypočte z následující rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

zatímco procento desorpce (D_{t_i}) v čase t_i je dáno rovnicí:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{\text{vod}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

přičemž jsou výše použité veličiny definovány takto:

$m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = množství látky, která zůstala adsorbovaná na půdě po časových intervalech $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$, (μg)

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = množství látky desorbované za časové intervaly $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$, (μg)

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1), m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2), \dots, m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n)$ = množství látky naměřené v podílu v_{a}^{D} v okamžicích t_1, t_2, \dots, t_n , (μg)

V_{T} = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou (cm^3)

$m_{\text{vod}}^{\text{A}}$ = množství látky, které zbylo (aniž se adsorbovalo) po ustavení adsorpční

rovnováhy, a to v důsledku nekvantitativní výměny objemu vodné fáze, (μg)

$$m_{\text{vod}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01M roztoku CaCl_2 (cm^3)

v_a^D = objem alikvotu odebraného k analýze ze zkušební nádoby (i) během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

DODATEK 6

ADSORPCE – DESORPCE V PŮDÁCH: FORMULÁŘE PRO PŘEDLOŽENÍ DAT

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Podíl sušiny v půdě (105 °C, 12 h):%

Teplota:°C

Použitelnost analytické metody

Navážka půdy	g	
Půda: suchá hmotnost	g	
Objem roztoku CaCl_2	cm^3	
Nominální koncentrace připraveného roztoku	$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	
Analytická koncentrace připraveného roztoku	$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	

Podstata použité analytické metody:

Kalibrace analytické metody:

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Podíl sušiny v půdě (105 °C, 12 h):.....%

Teplota:.....°C

Adsorpční zkouška: slepý pokus a kontrolní vzorky

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Zkušební nádoba č.								
Navážka půdy		g					0	0
Množství vody v navážce půdy (vypočtené)		cm ³					—	—
Přidaný objem 0,01M roztoku CaCl ₂		cm ³						
Přidaný objem zásobního roztoku zkušební látky		cm ³	0	0				
Celkový objem vodné fáze (vypočtený)		cm ³					—	—
Počáteční hodnota zkušební látky ve vodné fázi		µg·cm ⁻³						
Po protřepávání a centrifugaci								
Koncentrace ve vodné fázi		µg·cm ⁻³						

Poznámka: Podle potřeby lze přidat sloupce.

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Podíl sušiny v půdě (105 °C, 12 h):.....%

Teplota:.....°C

Množstevní bilance

	Symbol	Jednotky				
Zkušební nádoba č.						
Navážka půdy	—	g				
Půda: suchá hmotnost	$m_{\text{půda}}$	g)				
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	ml				
Objem 0,01M roztoku CaCl ₂ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		ml				
Objem zásobního roztoku		cm ³				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm ³				
Počáteční koncentrace zkoušeného roztoku	C_0	μg·cm ⁻³				
Čas (v průběhu ustavování rovnováhy)	—	h				
Po protřepávání a centrifugaci						
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi v adsorpční rovnováze, po korekci na slepý pokus	$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	μg·cm ⁻³				
Rovnovážný čas	t_{eq}	h				
První přidání rozpouštědla						
Odebraný objem vodné fáze	V_{rec}	cm ³				
Přidaný objem rozpouštědla	ΔV	cm ³				
První extrakce rozpouštědlem						
Velikost signálu měřidla při analýze rozpouštědla	S_{E1}	různé				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E1}	μg·cm ⁻³				
Množství látky extrahované z půdy a stěn nádoby	m_{E1}	μg				
Druhá extrakce rozpouštědlem						
Odebraný objem rozpouštědla	ΔV_{rozp}	cm ³				
Přidaný objem rozpouštědla	$\Delta V'$	cm ³				
Druhá extrakce rozpouštědlem						
Velikost signálu měřidla při analýze rozpouštědlové fáze	S_{E2}	různé				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E2}	μg·cm ⁻³				
Množství látky extrahované z půdy a stěn nádoby	m_{E2}	μg				
Celkové množství zkoušené látky extrahované ve dvou krocích	m_{E}	μg				
Hmotnostní bilance	MB	%				

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Podíl sušiny v půdě (105 °C, 12 h):.....%

Teplota:.....°C

Adsorpční isothermy

	Symbol	Jednotky								
Zkušební nádoba č.										
Navážka půdy	—	g								
Půda: suchá hmotnost	E	g								
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm ³								
Objem 0,01M roztoku CaCl ₂ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm ³								
Přidaný objem zásobního roztoku		cm ³								
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (vypočtený)	V_0	cm ³								
Koncentrace roztoku	C_0	μg·cm ⁻³								
Čas (v průběhu ustavování rovnováhy)	—	h								

Po protřepávání a centrifugaci

Koncentrace látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	μg·cm ⁻³								
Teplota		°C								
Adsorbované množství na jednotku množství půdy	$C_p^{\text{ads}}(\text{eq})$	μg·g ⁻¹								

Regresní analýza:

hodnota K_F^{ads} :

hodnota $1/n$:

regresní koeficient r^2 :

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Podíl sušiny v půdě (105 °C, 12 h):.....%

Teplota:.....°C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá Paralelní Sériová

Desorpční zkouška

	Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Číslo zkušební nádoby z adsorpčního experimentu						
Množství látky adsorbované na půdě v adsorpční rovnováze	$m_p^{ads} (eq)$	µg				
Odebraný objem vodné fáze nahrazený 0,01M CaCl ₂	V_R	cm ³				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	PM V_0	cm ³				
	SM V_T	cm ³				
Množství látky, které zbylo (aniž se adsorbovalo) po ustavení adsorpční rovnováhy, a to v důsledku nekvantitativní výměny objemu vodné fáze	m_{vod}^A	µg				
Desorpční kinetika						
Naměřené množství látky desorbované z půdy v čase t_i	$m_m^{des} (t_i)$	µg				
Objem roztoku odebraný ze zkušební nádoby (i) pro měření zkoušené látky	PM V_r^i	cm ³				
	SM V_a^D	cm ³				
Množství látky desorbované z půdy v čase t_i (vypočtené)	$m_{vod}^{des} (t_i)$	µg				
Množství látky desorbované z půdy během časového intervalu Δt_i (vypočtené)	$m_{vod}^{des} (\Delta t_i)$	µg				
Procento desorpce						
Desorpce v čase t_i	D_{t_i}	%				
Desorpce za časový interval Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdánlivý desorpční koeficient	K_{des}					

PM: paralelní metoda

SM: sériová metoda

XIX. METODA PRO STANOVENÍ ODHADU ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{OU}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ (HPLC) – metoda C.19 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XIX.1 METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG121 (2000).

XIX.1.1 ÚVOD

Sorpční chování látek v půdách a v čistírenských kalech může být popsáno parametry experimentálně stanovenými zkušební metodou C.18. Důležitým parametrem je adsorpční koeficient, který je definován jako poměr koncentrace látky v půdě nebo kalu a koncentrace látky ve vodné fázi v rovnováze. Adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku v půdě K_{ou} je užitečným ukazatelem schopnosti chemické látky vázat se na organické látky v půdě a v čistírenském kalu a umožňuje porovnat různé chemické látky. Tento parametr lze odhadnout z korelace s rozpustností ve vodě a s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Experimentální metoda popsaná v této zkoušce používá k odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} v půdě a v čistírenských kalech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (8). Tyto odhady jsou spolehlivější než odhady z výpočtů pomocí metodiky QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) (9). Jako metoda založená na odhadu nemůže plně nahradit násadové experimenty stanovení adsorpční/desorpční rovnováhy podle metody C.18. Odhady K_{ou} však mohou být užitečné pro volbu vhodných parametrů pro adsorpční/desorpční studie podle zkušební metody C.18, a to vypočtením K_d (distribučního koeficientu) nebo K_F (Freundlichova adsorpčního koeficientu) z rovnice 3 (viz bod 1.2).

XIX.1.2 DEFINICE

K_d : Distribuční koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací C rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému skládajícím se ze sorbentu (půda nebo čistírenský kal) a vodné fáze; je bezrozměrný, jsou-li koncentrace v obou fázích vyjádřeny jako hmotnostní podíly. Je-li koncentrace ve vodné fázi vyjádřena v jednotce hmotnosti na jednotku objemu, je jednotkou $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$. K_d se může měnit s vlastnostmi sorbentu a může záviset na koncentraci.

$$K_d = \frac{C_{\text{půda}}}{C_{\text{vod}}} \quad \text{nebo} \quad \frac{C_{\text{kal}}}{C_{\text{vod}}} \quad (1)$$

kde:

$C_{\text{půda}}$ = koncentrace zkoušené látky v půdě v rovnováze ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

C_{kal} = koncentrace zkoušené látky v kalu v rovnováze ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi v rovnováze ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

K_F : Freundlichův adsorpční koeficient je definován jako koncentrace zkoušené látky v půdě nebo v čistírenském kalu (x/m), je-li rovnovážná koncentrace C_{vod} ve vodné fázi rovna jedné; vyjadřuje se v μg na gram sorbentu. Hodnota se může měnit s vlastnostmi sorbentu.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_F + \frac{1}{n} \cdot \log C_{\text{vod}} \quad (2)$$

kde:

x/m = množství zkoušené látky x (μg) adsorbované
v rovnováze na určitém množství sorbentu m (g)
 $1/n$ = směrnice Freundlichovy adsorpční isothermy
 C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi v rovnováze
($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Při $C_{\text{vod}} = 1$: $\log K_F = \log \frac{x}{m}$

K_{ou} : Distribuční koeficient (K_d) nebo Freundlichův adsorpční koeficient (K_F) normalizovaný na obsah organického uhlíku (f_{ou}) v sorbentu; zejména u nedisociujících chemických látek je přibližným ukazatelem míry adsorpce látky na sorbentu a umožňuje provést porovnání různých chemických látek. V závislosti na rozměru K_d a K_F může být K_{ou} bezrozměrný nebo může být jeho jednotkou $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ nebo $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ organického materiálu.

$$K_{\text{ou}} = \frac{K_d}{f_{\text{ou}}} \text{ (bezrozměrný nebo v } \text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} \text{ nebo } \frac{K_F}{f_{\text{ou}}} \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Vztah mezi K_{ou} a K_d není vždy lineární, hodnoty K_{ou} se mohou pro jednotlivé půdy měnit, avšak jejich kolísání je ve srovnání s hodnotami K_d nebo K_F silně omezeno.

Adsorpční koeficient (K_{ou}) lze odečíst pomocí kapacitního faktoru (k') z kalibrační křivky $\log k'$ versus $\log K_{\text{ou}}$ pro vybrané referenční sloučeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R : retenční časy zkoušené a referenční látky pro HPLC (min)

t_0 : mrtvá doba HPLC (min) (viz bod 1.8.2).

P_{ov} : Rozdělovací koeficient oktanol/voda je definován jako poměr koncentrací rozpuštěné látky v n-oktanolu a ve vodě; je bezrozměrný.

$$P_{\text{ov}} = \frac{C_{\text{oktanol}}}{C_{\text{voda}}} (= K_{\text{ov}}) \quad (5)$$

XIX.1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

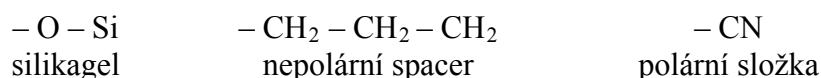
Pře použitím metody by měly být známy strukturní vzorec, čistota a disociační konstanta (podle potřeby). Užitečné jsou informace o rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech, o rozdělovacím koeficientu oktanol-voda a o chování při hydrolýze.

Mají-li být uvedena do korelace naměřená retenční data z HPLC pro zkoušenou látku a její adsorpční koeficient, musí být vytvořen kalibrační graf $\log K_{\text{ou}}$ versus $\log k'$. Použije se minimálně šest referenčních bodů, alespoň po jednom nad a pod očekávanou hodnotou pro zkoušenou látku. Správnost metody se významně zlepší, budou-li použity referenční látky strukturně příbuzné se zkoušenou látkou. Nejsou-li taková data známa, ponechává se na experimentátorovi, aby vybral vhodné kalibrační látky. V takovém případě by měla být vybrána obecnější sada strukturně heterogenních látek. Látky a hodnoty K_{ou} , které mohou být použity, jsou

uvedeny v dodatku, a to v tabulce 1 pro čistírenský kal a v tabulce 3 pro půdu. Volba jiných kalibračních látek by měla být zdůvodněna.

XIX.1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupným kyanopropylem jako pevnou fází, obsahujícím lipofilní a polární složky. Použije se mírně polární stacionární fáze na silikagelové matrici:



Podstata zkušební metody je obdobná jako ve zkušební metodě A.8 (rozdělovací koeficient, metoda HPLC). Při průchodu kolonou v mobilní fázi zkoušená látka interaguje se stacionární fází. V důsledku rozdělování mezi mobilní a stacionární fází se postup zkoušené látky zpomaluje. Dvojití složení stacionární fáze s polárními a nepolárními skupinami umožňuje, aby polární a nepolární skupiny molekuly interagovaly podobným způsobem, jako je tomu u organického materiálu v půdě nebo čistírenském kalu. To umožňuje stanovit vztah mezi retenčním časem na koloně a adsorpčním koeficientem na organickém materiálu.

Na sorpční chování zejména u polárních látek má významný vliv pH. V případě zemědělských půd nebo nádrží s čistírenskými kaly se pH normálně pohybuje od pH 5,5 do 7,5. U disociujících látek se ve vhodném pufracím roztoku provedenou dvě zkoušky, a to jak s disociovanou formou, tak s nedisociovanou formou, avšak pouze v případě, že v rozmezí pH 5,5 až 7,5 disociuje alespoň 10 % zkoušené sloučeniny.

Vzhledem k tomu, že se k hodnocení použije pouze vztah mezi retencí na koloně HPLC a adsorpčním koeficientem, není nutná žádná kvantitativní metoda, nýbrž pouze stanovení retenčního času. Je-li k dispozici vhodná sada referenčních látek a lze-li realizovat standardní experimentální podmínky, je metoda rychlým a účinným způsobem odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} .

XIX.1.5 POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Metoda HPLC je použitelná pro chemické látky (radioizotopově značené i neznačené), pro něž je k dispozici vhodný detekční systém (např. spektrofotometr, detektor radioaktivního záření) a jež jsou po dobu experimentu dostatečně stabilní. Může být zvláště užitečná pro chemické látky, jejichž studium je v jiných experimentálních systémech obtížné (tj. pro těkavé látky, které nejsou rozpustné ve vodě v koncentraci, kterou lze analyticky měřit, pro látky s vysokou afinitou k povrchu inkubačních systémů). Metoda může být použita pro směsi, které dávají nerozlišitelný eluční pás. V takovém případě se stanoví horní a dolní meze hodnot $\log K_{ou}$ pro sloučeniny přítomné ve směsi.

Při interpretaci výsledků HPLC mohou někdy působit problémy nečistoty. Jejich vliv je však malý, neboť zkoušené látky lze jasně analyticky identifikovat a od nečistot oddělit.

Metoda je validována pro látky uvedené v tabulce 1 v dodatku a byla rovněž použita u řady jiných chemických látek z následujících chemických tříd:

- aromatické aminy (např. trifluralin (1-(dipropylamino)-2,6-dinitro-4-(trifluormethyl)benzen), 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, *N*-methylanilin, 1-nafylamin),
- estery aromatických karoxylových kyselin (např. methyl-benzoát, ethyl-3,5-dinitrobenzoát),
- aromatické uhlovodíky (např. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen),
- estery aryloxyfenoxypropanové kyseliny (např. diklofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),
- benzimidazolové a imidazolové fungicidy (např. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),
- amidy karboxylových kyselin (např. 2-chlorbenzamid, *N,N*-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, *N*-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),
- chlorované uhlovodíky (např. endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, kvintozen, 1,2,3-trichlorbenzen),
- organofosforové insekticidy (např. azinfos-methyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos),
- fenoly (např. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 1-naftol),
- deriváty fenylnmočoviny (např. isoproturon, monolinuron, pencykuron),
- pigmentová barviva (např. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),
- polyaromatické uhlovodíky (např. acenaften, naftalen),
- 1,3,5-triazinové herbicidy (např. prometryn, propazin, simazin, terbutryn),
- triazolové deriváty (např. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoda není použitelná u látek, které reagují s eluentem nebo stacionární fází. Není rovněž použitelná u látek, které interagují specifickým způsobem s anorganickými složkami (např. tvoří klastrové komplexy s minerály jílu). Metoda nemusí být použitelná u povrchově aktivních látek, anorganických látek a mírných nebo silných organických kyselina a zásad. Lze stanovit K_{ou} s hodnotami $\log K_{ou}$ od 1,5 do 5,0. Disociující látky musí být měřeny s pufovanou mobilní fází, avšak je třeba dbát na to aby nedošlo ke srážení složek pufru nebo zkoušené látky.

XIX.1.6 KRITÉRIA JAKOSTI

XIX.1.6.1 **Správnost**

Obvykle lze adsorpční koeficient zkoušené látky stanovit v rozmezí $\pm 0,5$ řádu hodnoty stanovené násadovou rovnovážnou metodou (viz tabulka 1 v dodatku). Vyšší míry správnosti lze dosáhnout, jsou-li použité referenční látky strukturně příbuzné se zkoušenou látkou.

XIX.1.6.2 **Opakovatelnost**

Stanovení se provedou alespoň dvojmo. Hodnoty $\log K_{ou}$ získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí $\pm 0,1$.

XIX.1.6.3 **Reprodukovatelnost**

Dosud získané zkušenosti s použitím metody svědčí o její validitě. Ověřování metody HPLC za použití 48 látek (převážně pesticidů), u nichž

byla k dispozici spolehlivá data o K_{ou} v půdě, vedlo ke korelačnímu koeficientu $R = 0,95$ (10, 11).

Pro zlepšení a validaci metody bylo proveden mezilaboratorní test za účasti 11 laboratoří (12). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 v dodatku.

XIX.1.7 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XIX.1.7.1 **Předběžný odhad adsorpčního koeficientu**

Rozdělovací poměr oktanol-voda P_{ov} ($=K_{ow}$) a do určité míry i rozpustnost ve vodě mohou být použity jako indikátory rozsahu adsorpce zejména u nedisociujících látek a mohou tedy být použity pro jeho předběžné nalezení. Pro různé skupiny chemických látek byla publikována řada užitečných korelací (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

XIX.1.7.2 **Přístroje a pomůcky**

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulsním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovací smyčkou. Použije se komerční kyanopropylové chemicky vázané pryskyřice na silikagelu (např. Hypersil a Zorbax CN). Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona ze stejného materiálu. Kolony od různých dodavatelů se mohou podstatně lišit, pokud jde o účinnost. Pro orientaci by měly být dosaženy následující kapacitní faktory: $\log k' > 0,0$ pro $\log K_{ou} = 3,0$ a $\log k' > 0,4$ pro $\log K_{ou} = 2,0$ při použití směsi methanol/voda 55/45 % jako mobilní fáze.

XIX.1.7.3 **Mobilní fáze**

Bylo testováno několik mobilních fází a doporučují se následující dvě mobilní fáze:

- methanol/voda (55/45 % obj.),
- methanol/0,01M citrátový pufr pH 6,0 (55/45 % obj.).

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol a voda nebo citrátový pufr čistoty pro HPLC. Směs se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Nevyhovuje-li směs methanol/voda, lze vyzkoušet směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. ethanol/voda nebo acetonitril/voda. U disociujících sloučenin se doporučuje použití puфраčního roztoku ke stabilizaci pH. Je nezbytné dbát na to, aby nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s puфраčním roztokem. Nesmí být použity žádné přísady, jako jsou iontově párová činidla, neboť mohou ovlivnit sorpční vlastnosti stacionární fáze. Takové změny stacionární fáze mohou být nevratné. Z tohoto důvodu musí být experimenty s použitím přísad prováděny na zvláštních kolonách.

XIX.1.7.4 **Rozpouštěné látky**

Zkušební a referenční látky se rozpustí v mobilní fázi.

XIX.1.8 PROVEDENÍ ZKOUŠKY

XIX.1.8.1 **Zkušební podmínky**

Během měření se zaznamenává teplota. Pro zajištění konstantních podmínek během kalibrace a předběžných měření a během měření zkoušené látky se velmi doporučuje použití kolony s regulací teploty.

XIX.1.8.2 **Stanovení mrtvé doby t_0**

Pro stanovení mrtvé doby lze použít dvě různé metody (viz také bod 1.2).

XIX.1.8.2.1 *Stanovení mrtvé doby t_0 pomocí homologické řady*

Je ověřeno, že tato metoda poskytuje spolehlivé a standardisované hodnoty t_0 . Podrobnosti viz zkušební metoda A.8: Rozdělovací koeficient (n -oktanol/voda) metodou za použití HPLC.

XIX.1.8.2.2 Stanovení mrtvé doby t_0 pomocí inertních látek, které nejsou kolonou zadržovány

Tato technika je založena na nástřiku roztoků formamidu, močoviny nebo dusičnanu sodného. Měření se provedou alespoň dvojmo.

XIX.1.8.3 Stanovení retenčních časů t_R

Referenční látky se vyberou tak, jak je uvedeno v bodě 1.3. Pro stanovení jejich retenčních časů mohou být nástříknuty jako směsný standard za předpokladu, že je ověřeno, že retenční čas žádného referenčního standardu není ovlivňován přítomností jiných referenčních standardů. Kalibrace by měla být prováděna pravidelně, alespoň dvakrát denně, aby se zachytily nečekané změny účinnosti kolony. Nástřiky pro kalibraci by měly být prováděny nejlépe před nástřikem zkoušené látky a po něm, aby se ověřilo, že nedošlo ke změně retenčních časů. Zkoušené látky se nástříknou odděleně v co nejmenších množstvích (aby se kolona nezahltila) a stanoví se jejich retenční časy.

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena alespoň opakovaná stanovení. Hodnoty $\log K_{ou}$ získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí $\pm 0,25$.

XIX.1.8.4 Hodnocení

Kapacitní faktory k' se vypočtou z mrtvé doby t_0 a retenčních časů t_R vybraných referenčních látek podle rovnice 4 (viz bod 1.2). Hodnoty $\log k'$ referenčních látek se poté vynesou proti jejich hodnotám $\log K_{ou}$ z násadových rovnovážných experimentů uvedených v tabulkách 1 a 3 v dodatku. Z této křivky se poté pomocí hodnoty $\log k'$ zkoušené látky odečte její hodnota $\log K_{ou}$. Je-li z aktuálních výsledků zřejmé, že hodnota $\log K_{ou}$ leží mimo obor kalibrační křivky, zkouška se opakuje s vhodnějšími referenčními látkami.

XIX.2 DATA A ZPRÁVY

Zpráva musí obsahovat následující informace:

- identita zkoušené látky a referenčních látek, jejich čistota a podle potřeby hodnoty pK_a ,
- popis zařízení a pracovních podmínek, např. typ a velikost analytické (a ochranné) kolony, detekční zařízení, mobilní fáze (poměr složek a pH), rozpětí teploty během měření,
- mrtvá doba a použité metody jejího stanovení,
- množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,
- retenční časy referenčních sloučenin použitých ke kalibraci,
- charakteristiky proložené regresní křivky ($\log k'$ versus $\log K_{ou}$) a graf regresní křivky,
- průměrná retenční data a odhad hodnoty $\log K_{ou}$ zkoušené sloučeniny.
- chromatogramy.

XIX.3 LITERATURA

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed.). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, kap. 4, McGraw-Hill, New York.

- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{ou}) for soils by HPLC. *Chemosphere*, 17, 1 67.
- (3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *J. Agric. Food Chem.*, 29, str. 1050 – 1059.
- (4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci. Technol.*, 17, str. 227 – 231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. *J. Environm. Sci. Health*, B19, str. 297 – 312.
- (6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, str. 831 – 832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, str. 833 – 846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), str. 121 – 128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), str. 2493 – 2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), str. 2341 – 2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, str. 285 – 304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), str. 1373 – 1384.

DODATEK

TABULKA 1

Porovnání hodnot K_{ou} pro půdy a čistírenské kaly a hodnot vypočtených skreeningovou metodou s HPLC ^{1,2}

Látka	Číslo CAS	Log K_{ou} pro čistírenské kaly	Log K_{ou} pomocí HPLC	Δ	Log K_{ou} pro půdy	Log K_{ou} pomocí HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenyl-benzoát	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27

Látka	Číslo CAS	Log K_{ou} pro čistírenské kaly	Log K_{ou} pomocí HPLC	Δ	Log K_{ou} pro půdy	Log K_{ou} pomocí HPLC	Δ
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

¹ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), str. 121-128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. *Chemosphere*, 35 (1/2), str. 107-119.

TABULKA 2

Výsledky mezilaboratorního porovnávacího testu provedeného za účelem zlepšení a validace metody s HPLC (11 zúčastněných laboratoří)¹

Látka	Číslo CAS	Log K_{ou} (OECD 106)	K_{ou}	Log K_{ou}
			Metoda založená na HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), str. 1373-1384.

TABULKA 3

Referenční látky doporučené pro screeningovou metodu s HPLC na základě adsorpčních dat pro půdu

Referenční látka	Číslo CAS	Logaritmy středních hodnot z násadové rovnovážné metody	Počet hodnot K_{ou}	Logaritmus směrodatné odchylky	Zdroj
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a)
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	b)
<i>N,N</i> -Dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	a)
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	a)
Methylbenzoát	93-58-3	1,80	4	1,08	a)
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	c)
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	b)
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	a)
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	b)
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	c)
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c)
Methiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	a)
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	a)
γ -HCH (lindan)	58-89-9	3,23	5	2,94	a)

Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	a)
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c)
a-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	c)
Diklofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	c)
Fenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	a)
Basic Blue 41 (směs)	26850-47-5	4,89	4	4,46	a)
	12270-13-2				
DDT	50-29-3	5,63	1	—	b)

- a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). *Chemosphere*, 22, str. 285-304.
c) Data poskytnutá přímým způsobem.

XX. METODA PRO STANOVENÍ TOXICITY PRO REPRODUKCI U *DAPHNIA MAGNA* – metoda C.20 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

XX.1 METODA

Tato zkouška toxicity pro reprodukci je replikou metody OECD TG 211 (1998).

XX.1.1 ÚVOD

Hlavním cílem zkoušky je posoudit účinky chemických látek na reprodukční schopnost druhu *Daphnia magna*.

XX.1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Matečné organismy: dafnie samičího pohlaví, které jsou přítomné na začátku zkoušky a jejich reprodukční schopnost je předmětem studie.

Potomstvo: mladé dafnie pocházející z matečných organismů v průběhu zkoušky.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (*lowest observed effect concentration*, LOEC): je nejnižší zkoušená koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na reprodukci a na mortalitu matečných organismů (na úrovni pravděpodobnosti falešně pozitivního hodnocení $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou, v průběhu stanovené expoziční doby. Všechny zkoušené koncentrace vyšší než LOEC musí mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí podrobně vysvětleno jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (*no observed effect concentration*, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolní skupinou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek ($p < 0,05$).

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve vodě, která pro danou expoziční dobu vede k x% snížení reprodukce dafnií *Daphnia magna*.

Imanentní růst populace: je míra růstu populace, v níž je zahrnuta reprodukční schopnost a mortalita specifická z hlediska stáří (20, 21, 22). V ustáleném stavu bude nulový. Pro rostoucí populaci bude kladný a pro snižující se populaci bude záporný. Je zřejmé, že při záporném růstu nelze druh zachovat a nakonec dojde k jeho vyhynutí.

Mez detekovatelnosti: je nejnižší koncentrace, v níž lze látku detekovat, nikoli však stanovit.

Mez stanovitelnosti: je nejnižší koncentrace, v níž lze látku kvantitativně naměřit.

Mortalita: organismus se zaznamená jako mrtvý, je-li nepohyblivý, tj. není-li schopen plavat nebo není-li u končetin (přívěsků) nebo u postabdomen pozorován pohyb do 15 s po lehkém zatřepání zkušební nádobou. (Použije-li se jiná definice, musí být uvedena společně s literární odkazem.)

XX.1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé samičí dafnie (matečné organismy) na začátku zkoušky mladší než 24 h se exponují zkoušené látce přidané do vody v určitém rozsahu koncentrací. Zkouška trvá 21 dní. Na konci zkoušky se odhadne celkový počet vylíhnutých živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky. To znamená, že nedospělé dafnie pocházející z dospělých dafnií, které v průběhu zkoušky uhynuly, se z odhadů vyloučí. Reprodukční schopnost matečných organismů lze vyjádřit jiným způsobem (např. jako počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu za den, a to od prvního dne, kdy bylo potomstvo pozorováno), který se však uvede doplňkově vedle celkového počtu nedospělých dafnií pocházejících z jedné matečné dafnie živé na konci zkoušky. Reprodukční schopnost organismů exponovaných zkoušené látce se porovná s reprodukční schopností kontrolní skupiny (kontrolních skupin) s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC) a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC). Kromě toho se data pokud možno analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x% snížení reprodukční schopnosti, (tj. EC_{50} , EC_{20} nebo EC_{10}).

Musí být rovněž uvedeno přežití matečných organismů a okamžik narození vylíhnutí prvních potomků. Zkoumány mohou být také jiné účinky vyvolané látkou, které mají vliv na charakteristiky, jako jsou růst (např. vliv na délku) a případně imanentní růst populace.

XX.1.4 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTKE

Měly by být k dispozici výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.2, část I) provedené u *Daphnia magna*. Výsledky mohou být užitečné pro volbu vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkouškách toxicity pro reprodukci. Měly by být známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženým výtěžkem a mezi stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, pK_a , P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

XX.1.5 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolní skupiny (kontrolních skupin) splněna následující kritéria reprodukční schopnosti:

- mortalita matečných organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20 %,
- střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je ≥ 60 .

XX.1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

XX.1.6.1 **Přístroje a pomůcky**

Zkušební nádoby nebo jiné přístroje a pomůcky, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být skleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami jsou obvykle skleněné kádinky.

Kromě toho bude nezbytné některé nebo veškeré následující zařízení:

- přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou, nebo jiný vhodný přístroj na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),
- vhodný přístroj pro regulaci teploty,
- pH-metr,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody,
- zařízení pro stanovení celkového organického uhlíku (TOC) ve vodě nebo zařízení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK),
- vhodné zařízení pro ovládání režimu osvětlení a pro měření intenzity světla.

XX.1.6.2 **Testovací organismy**

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna* Straus. Jiné druhy dafnií mohou být použity, pokud splňují případná kritéria validity (kritérium validity týkající se reprodukční schopnosti kontrolních skupin by mělo být relevantní pro daný druh dafnií). Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno.

Klon by měl být identifikován nejlépe uvedením genotypu. Výzkum ukázal (1), že reprodukční schopnost klonu A (který pochází z institutu IRCHA ve Francii) (3) stabilně splňuje kritérium validity, jímž je ≥ 60 potomků na přeživší matečný organismus při kultivaci za podmínek popsanych v této metodě. Splňuje-li kultura dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku jsou přijatelné i jiné klony.

Na začátku zkoušky musí být dafnie 24 h staré a nesmí být první generací. Musí pocházet ze zdravé kultury (tj. nesmí vykazovat známky stresu projevující se vysokou mortalitou, přítomnost jedinců samčího pohlaví a epifií, zpoždění produkce prvních potomků, přítomnost jinak zbarvených jedinců atd.). Organismy ze zásobní kultury musí být chovány v podmínkách podobných těm, které mají být použity při zkoušce (osvětlení, teplota, médium, krmění a počet dafnií na jednotku objemu). Liší-li se kultivační médium pro dafnie, které má být použito při zkoušce, od média používaného k rutinní kultivaci dafnií, doporučuje se zařadit před zkouškou obvykle třítydenní aklimatizační období (tj. v délce odpovídající jedné generaci), aby nedošlo u matečných organismů ke stresu.

XX.1.6.3 **Zkušební médium**

Doporučuje se, aby bylo v této zkoušce použito přesně definované médium. Tím se lze vyhnout použití přísad, které je obtížné charakterizovat (např. mořských řas, půdy, extraktu atd.) a zvýšit vyhlídky mezilaboratorní standardizace. Jako vyhovující pro tento účel byla shledána Elendtova média M4 (4) a M7. Přijatelná jsou však i jiná média (např. (5, 6)), splňuje-li při jejich použití reprodukční schopnost kultury dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku.

Použije-li se médium, které obsahuje nedostatečně charakterizovatelné přísady, měly by být tyto přísady jasně specifikovány a v protokolu o

zkoušce se uvedou informace o jejich složení, to zejména o obsahu organického uhlíku, neboť může přispívat k dodávané stravě. Doporučuje se, aby byl stanoven celkový organický uhlík (TOC) a/nebo chemická spotřeba kyslíku (CHSK) výchozí formy organické přísady a aby byl odhadnut výsledný příspěvek k TOC nebo CHSK ve zkušebním médiu. Doporučuje se, aby byly úrovně TOC v médiu (tj. před přidáním řas) nižší než $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (7).

Při zkoušení látek obsahujících kovy je důležité si uvědomit, že vlastnosti zkušebního média (např. tvrdost, chelatační schopnosti) mohou mít vliv na toxicitu látky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby bylo médium přesně definováno. V současnosti jsou však jedinými přesně definovanými médii, o nichž je známo, že jsou vhodná pro dlouhodobou kultivaci kultury druhu *Daphnia magna*, Elendtova média M4 a M7. Obě média obsahují chelatační činidlo EDTA. Práce (2) ukázala, že provádí-li se zkouška v médiích M4 a M7, je „zdánlivá toxicita“ kadmia zpravidla nižší než v médiu, které neobsahuje EDTA. Média M4 a M7 se tedy nedoporučují pro zkoušení látek obsahujících kovy a neměla by se používat ani jiná média obsahující činidla známá svojí chelatační schopností. V případě látek obsahujících kovy se doporučuje používat jiné médium, například rekonstituovanou tvrdou sladkou vodu podle ASTM (7), která neobsahuje EDTA a do níž je přidán extrakt z řas (8). Tato kombinace rekonstituované tvrdé sladké vody podle ASTM a extraktu z řas je také vhodná pro dlouhodobou kultivaci druhu *Daphnia magna* (2) a pro zkoušení na tomto druhu, přestože vykazuje slabé chelatační účinky způsobené organickými složkami přidaného extraktu z řas.

Na začátku zkoušky a v jejím průběhu by měla být koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. pH by mělo být v rozmezí 6 až 9 a zpravidla by se nemělo v žádné zkoušce měnit o více než 1,5. Doporučuje se tvrdost nad $140 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (jako CaCO_3). Ve zkouškách při této a vyšší tvrdosti reprodukční schopnost prokazatelně vyhovovala kritériím validity (9, 10).

XX.1.6.4 **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se obvykle připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky se připraví nejlépe rozpuštěním látky ve zkušebním médiu.

Pro přípravu vhodně koncentrovaného zásobního roztoku může být někdy nezbytné použití organických rozpouštědel nebo dispergátorů, měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, 0,01% methylcellulosa a HCO-40. V žádném případě by však neměl být obsah zkušební látky ve zkušebních roztocích vyšší než je její rozpustnost ve zkušebním médiu.

K přípravě zásobního roztoku, který lze přesně dávkovat do vody, se použijí rozpouštědla. Při doporučené koncentraci rozpouštědla v konečném zkušebním médiu (tj. $\leq 0,1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) nejsou výše uvedená rozpouštědla toxická a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

Dispersanty mohou usnadnit přesné dávkování a dispergaci. Při doporučené koncentraci v konečném zkušebním médiu (tj. $\leq 0,1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$)

nejsou výše uvedené dispergátory toxické a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

XX.1.7 USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Expozice se rozvrhne pro jednotlivé zkušební nádoby a veškeré další obsluhování zkušebních nádob se provádí náhodně. Nedodržení této zásady může vést k jednostrannému vychýlení, které může být považováno za účinek koncentrace. Jsou-li například experimentální jednotky obsluhovány v pořadí zahájení expozice nebo v pořadí koncentrací, mohl by nějaký časově podmíněný efekt, např. únava obsluhy nebo jiné pochybení, vést k vyšším účinkům při vyšších koncentracích. Mohou-li být dále výsledky ovlivněny počátečními podmínkami zkoušky nebo okolními podmínkami, jako je např. umístění v laboratoři, mělo by být zváženo blokové uspořádání zkoušky.

XX.1.8 POSTUP

XX.1.8.1 **Podmínky expozice**

XX.1.8.1.1 *Délka expozice*

Zkouška trvá 21 dní.

XX.1.8.1.2 *Nasazování*

Matečné organismy se umístí po jednom do zkušebních nádob s 50 až 100 ml média.

Aby bylo možné splnit požadavky analytické metody použité pro stanovení koncentrace zkoušené látky, může být v některých případech nezbytné použít větší objemy, přípustné je rovněž sdružování paralelních vzorků k chemické analýze. Jsou-li použity objemy větší než 100 ml, může být nezbytné zvýšit krmné dávky podávané dafniím, aby se zajistila odpovídající dostupnost stravy a splnila kritéria validity. U průtokových zkoušek mohou být z technických důvodů zvážena jiná uspořádání (např. čtyři skupiny po 10 organismech ve větším zkušebním objemu), avšak jakékoli změny uspořádání zkoušky musí být ale uvedeny v závěrečné zprávě.

XX.1.8.1.3 *Počet organismů*

U semistatických zkoušek se nasadí jednotlivě alespoň 10 organismů pro každou zkušební koncentraci a alespoň 10 organismů jednotlivě do zkušebních skupin.

U průtokových zkoušek se ukázalo vhodným rozdělit pro každou koncentraci 40 organismů do čtyř skupin po 10 organismech (1). Může být použit menší počet zkušebních organismů, přičemž se doporučuje na jednu koncentraci rozdělit minimálně 20 organismů do dvou nebo více paralelních skupin o stejném počtu organismů (např. čtyři paralelní skupiny po pěti dafniích). Je třeba poznamenat, že u zkoušek, při níž se organismy nasazují jako skupiny, nebude možné vyjádřit reprodukční schopnost jako počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky v případě, že matečný organismus uhynie. V takovém případě se reprodukční schopnost vyjádří jako „celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu přítomného na začátku zkoušky“.

XX.1.8.1.4 *Krmení*

U semistatických zkoušek se dafnie krmí nejlépe denně, alespoň však třikrát týdně (tj. s výměnou média). Odchylky od této praxe (např. u průtokových zkoušek) se uvedou ve zprávě.

Strava matečných organismů během zkoušky by měla sestávat nejlépe z živých buněk řas jednoho nebo více následujících druhů: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (nyní *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) a *Scenedesmus subspicatus*. Množství dodávané stravy by mělo vycházet z množství organického uhlíku (C) dodávaného na jeden matečný organismus. Výzkum (12) ukázal, že u druhu *Daphnia magna* je postačující pro dosažení dostatečného potomstva nezbytného pro splnění kritérií validity množství stravy od 0,1 do 0,2 mg C na dafnii za den. Strava může být dodávána buď ve stejných dávkách po celou dobu zkoušky, nebo podle požadavku v nižších dávkách na začátku zkoušky a poté ve zvyšujících se dávkách s ohledem na růst matečných organismů. V takovém případě by mělo množství stravy po celou dobu zůstat v doporučeném rozmezí 0,1 až 0,2 mg C na dafnii za den.

Použije-li se k určení potřebného množství stravy zástupný ukazatel, jako je počet buněk řas nebo absorbance ve viditelném světle, musí každá laboratoř vytvořit vlastní nomogram vztahu zástupného ukazatele a obsahu uhlíku v kultuře řas (viz dodatek 2 s návodem na vytvoření nomogramu). Nomogramy by měly být ověřovány jednou ročně a častěji v případě, že se změní podmínky kultivace řas. Absorbance ve viditelném světle byla shledána lepším zástupným ukazatelem celkového obsahu uhlíku, než počet buněk (13).

Dafniím by měla být dodávána koncentrovaná suspenze řas, aby se minimalizoval objem kultivačního média řas uváděný do zkušební nádoby. Zkoncentrování řas lze dosáhnout centrifugací a následnou resuspenzí v destilované vodě, v deionisované vodě nebo v kultivačním médiu dafnií.

XX.1.8.1.5 *Osvětlení*

16 hodin světla při intenzitě nepřekračující 15 až 20 $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

XX.1.8.1.6 *Teplota*

Teplota zkušebního média by se měla pohybovat v rozmezí 18 až 22 °C. V žádné zkoušce by však teplota neměla v těchto mezích kolísat o více než 2 °C (např. 18 až 20, 19 až 21 nebo 20 až 22 °C). Pro účely sledování teploty může být vhodné použít další zkušební nádobu.

XX.1.8.1.7 *Provzdušňování*

Zkušební nádoby nesmí být v průběhu zkoušky provzdušňovány.

XX.1.8.2 **Zkušební koncentrace**

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2 a přiměřený počet paralelních zkušebních skupin v rámci každé zkušební koncentrace (viz bod 1.8.1.3). Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušebním médiu.

Při volbě rozsahu koncentrací by měly být zohledněny následující zásady:

- i) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejnižší zkušební koncentrace dostatečně nízká, aby nebyla plodnost při této koncentraci významně nižší, než plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se sníženou nejnižší koncentrací;
- ii) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejvyšší zkušební koncentrace dostatečně vysoká, aby byla plodnost při této

koncentraci významně nižší, než plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se zvýšenou nejvyšší koncentrací;

- iii) má-li být pro účinky na reprodukci odhadnuta EC_x , doporučuje se, aby byl použit dostatečný počet koncentrací s cílem zjistit EC_x s přijatelným intervalem spolehlivosti. Je-li znám odhad EC_{50} pro účinky na reprodukci, doporučuje se, aby byla nejvyšší zkušební koncentrace vyšší než tato EC_{50} . Jinak sice bude stále možné odhadnout EC_{50} , interval spolehlivosti však bude velmi široký a nemusí být možné uspokojivé posouzení přiměřenosti navrženého modelu;
- iv) do rozsahu zkušebních koncentrací by nejlépe neměly spadat koncentrace, které mají statisticky významný účinek na přežití dospělců, neboť by mohl být změněn charakter zkoušky z pouhé zkoušky toxicity pro reprodukci na kombinovanou zkoušku toxicity pro reprodukci a mortality, která vyžaduje daleko složitější statistickou analýzu.

Předcházející znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku rozpouštědlo nebo dispergátor (viz bod 1.6.4), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádobě vyšší než $0,1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ a měla by být ve všech zkušebních nádobách stejná.

XX.1.8.3 **Kontrolní skupiny**

Kromě zkušební série se nasadí jedna série kontrolních skupin pro kontrolu zkušebního média a podle potřeby jedna série kontrolních skupin obsahujících rozpouštědlo nebo dispergátor. Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být jejich koncentrace stejná jako koncentrace v nádobách se zkoušenou látkou. Použije se vhodný počet paralelních skupin (viz oddíl 1.8.1.3).

V dobře vedených zkouškách by měl být variační koeficient středního počtu živých potomků narozených každému matečnému organismu v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zpravidla $\leq 25 \%$, a to by mělo být uvedeno v plánu zkoušek s oddělenými jedinci.

XX.1.8.4 **Obnovování zkušebního média**

Častost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, médium se však obnovuje alespoň třikrát týdně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky po maximální dobu mezi obnoveními média (tj. po tři dny) stálá (tj. nepohybuje se v intervalu 80 – 120 % nominální koncentrace nebo klesá pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měl by být zváženo častější obnovování média nebo průtoková zkouška.

Při obnovování média v semistatických zkouškách se připraví druhá série zkušebních nádob a matečné organismy se do nich přenesou např. skleněnou pipetou o vhodném průměru. Objem média přeneseného s dafniemi by měl být co nejmenší.

XX.1.8.5 **Pozorování**

Výsledky pozorování prováděných během zkoušky se zaznamenávají do přehledu dat (viz příklady v dodatcích 3 a 4). Jsou-li požadována další

měření (viz body 1.3 a 1.8.8), může být nezbytné provádět další pozorování.

XX.1.8.6 **Potomstvo**

Potomstvo pocházející z každého matečného organismu se od jeho prvního výskytu nejlépe denně vybírá a počítá, aby nespotřebovávalo potravu určenou pro dospělého jedince. Pro účely této metody je třeba započítat pouze živé potomstvo, avšak zaznamenává se i přítomnost potracených vajíček nebo mrtvého potomstva.

XX.1.8.7 **Mortalita**

Mortalita matečných organismů se zaznamenává nejlépe denně, alespoň současně s počítáním potomstva.

XX.1.8.8 **Další parametry**

Třebaže je tato metoda navržena hlavně k posouzení účinků na reprodukci, je možné, aby byly v míře dostatečné pro statistickou analýzu kvantifikovány i jiné účinky. Užitečné je zvláště měření růstu, neboť poskytuje informaci o možných subletálních účincích. Tato pozorování mohou být užitečnější než samotné měření reprodukce. Doporučuje se změřit na konci zkoušky délku matečných organismů (tj. délku těla bez zadečkového hrotu). K parametrům, které lze měřit nebo vypočítávat patří dále doba do narození prvních plůdků (a následně dalších potomků), počet a velikost potomků na jeden organismus, počet potracených plůdků, přítomnost jedinců samčího pohlaví nebo efipií a imanentní růst populace.

XX.1.8.9 **Častot analytických stanovení a měření**

Alespoň jednou týdně se měří koncentrace kyslíku, teplota, tvrdost a pH v čerstvém a ve starém médiu, v kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

Během zkoušky se v pravidelných intervalech stanoví koncentrace zkoušené látky stanovují

U semistatických zkoušek (s obnovením média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 % – viz body 1.4 a 1.4.8), se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie ihned po jejich přípravě a při obnovování, a to jednou během prvního týdne zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – při jeho přípravě a při obnovování). Tato stanovení se poté opakují alespoň v týdenních intervalech.

U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to ihned po jejich přípravě a při obnovování. U zkoušek, u nichž není naměřená počáteční koncentrace zkoušené látky v rozsahu ± 20 % nominální koncentrace, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé, (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), by mohla být stanovení ve 2. a 3. týdnu zkoušky omezena na nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace. Ve všech případech je stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádoby.

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jako je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Doporučuje se však zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební

koncentrace stálé. V těchto typech zkoušky se průtok ředící vody a zkoušené látky kontroluje denně.

Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí $\pm 20\%$ nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než $\pm 20\%$, vyjádří se výsledky jako časově vážené průměry (viz dodatek 5).

XX.2

DATA A ZPRÁVY

XX.2.1

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené látky na celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky. Celkový počet potomků na matečný organismus se vypočte pro každou zkušební nádobu (tj. pro každou paralelní nádobu). Jestliže v kterékoli paralelní nádobě matečný organismus během zkoušky uhynie nebo se zjistí, že jde o samečka, vyloučí se nádoba z experimentu. Analýza se poté provede se zmenšeným počtem paralelních nádob.

Pro odhad LOEC a tedy i NOEC vztahujících se k účinkům chemické látky na reprodukční schopnosti je nezbytné vypočítat střední hodnotu reprodukční schopnosti přes všechny paralelní nádoby pro každou koncentraci a spojený residuální rozptyl, a to lze provést analýzou rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou mnohonásobného porovnání. Užitečnými mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (14, 15, 16, 17). Je nezbytné ověřit, že je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Doporučuje se provést ověření raději graficky než formálním testem významnosti (18); vhodnou alternativou je Bartlettův test. Není-li tento předpoklad splněn, měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace dat za účelem homogenizace rozptylu, nebo by měla být provedena vážená ANOVA. Vypočte a uveďte se velikost účinku zjištěná pomocí ANOVA (tj. nejmenší významný rozdíl).

Pro odhad koncentrace, která způsobuje 50% snížení reprodukční schopnosti (tj. EC_{50}), se daty proloží vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logaritmická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka by měla být tak parametrizována, aby bylo možné přímo odhadnout EC_{50} a její směrodatnou odchylku. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnotu EC_{50} . Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uveďte se oboustranný 95% interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. To lze provést graficky nebo rozdělením residuálního součtu čtverců na složku „chyby v proložení“ a „náhodné chyby“ a provedením testu významnosti chyby v proložení. Vzhledem k tomu, že u expozičních, jejichž důsledkem je vyšší reprodukční schopnost, je větší rozptyl počtu vylíhnutých potomků než u expozičních vedoucích k nejnižší reprodukční schopnosti, je třeba promyslet vážení pozorovaných hodnot s cílem zohlednit různé rozptyly u různých exponovaných skupin (viz výchozí informace (18)).

Při analýze dat z rozhodujícího okružního testu (2) byl použit následující model prokládající logaritmickou křivku; lze však použít i jiné modely:

$$Y = \frac{c}{1 + \frac{x^b}{x_0}}$$

kde:

Y: celkový počet živých potomků na matečný organismus, který přežil do konce zkoušky (vypočteno pro každou nádobu)

x: koncentrace látky

c: očekávaný počet potomků při $x = 0$

x_0 : EC₅₀ v populaci

b: směrnice.

Tento model bude pravděpodobně vhodný pro velký počet situací, budou však existovat zkoušky, pro něž bude nevhodný. Jak je uvedeno výše, je třeba ověřit validitu modelu. V některých případech může být vhodnější model předpokládající rozmezí, u něhož vedou nižší koncentrace k pozitivním účinkům (19).

Lze rovněž odhadnout další koncentrace s určitým účinkem, např. EC₁₀ nebo EC₂₀, může být však dobré použít jinou parametrizaci modelu, než je použita pro odhad EC₅₀.

XX.2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

XX.2.2.1 **Zkoušená látka:**

- fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- údaje o chemické identitě včetně údaje o čistotě.

XX.2.2.2 **Testovací druhy:**

- klon (byl-li geneticky popsán), dodavatel nebo zdroj (je-li znám) a použité kultivační podmínky. Byl-li použit jiný druh než *Daphnia magna*, musí to být uvedeno a zdůvodněno.

XX.2.2.3 **Zkušební podmínky:**

- použitý zkušební postup (např. semistatická nebo průtoková metoda, objem, velikost obsádky v počtu dafnií na litr),
- fotoperioda a intenzita světla,
- uspořádání zkoušky (např. počet paralelních nádob, počet matečných organismů na jednu paralelní nádobu),
- podrobnosti o použitém kultivačním médiu,
- byly-li použity, přísady organických látek včetně jejich složení, zdroje, metody přípravy, TOC/CHSK výchozích preparátů, odhad výsledného TOC/CHSK ve zkušebním médiu,
- podrobné informace o krmení, včetně množství (v mg C na dafnii za den) a plánu (např. typ krmiva, včetně specifického názvu (druhu) u řas a kmene, je-li znám, kultivační podmínky),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovy (jsou-li použity, uvedou se rozpouštědlo nebo dispergátor a jejich koncentrace),

XX.2.2.4 **Výsledky:**

- výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,
- nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách (viz

- příklad formuláře pro přehled dat v dodatku 4); uvede se také výtěžek metody a mez stanovitelnosti,
- kvalita vody ve zkušebních nádobách (tj. pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a TOC a/nebo CHSK a dále podle potřeby tvrdost) (viz příklad formuláře pro přehled dat v dodatku 3),
 - celkový počet živých potomků na každý matečný organismus (viz příklad formuláře pro přehled dat v dodatku 3),
 - počet uhynulých matečných organismů a den, kdy k úhynu došlo (viz příklad formuláře pro přehled dat v dodatku 3),
 - variační koeficient kontrolní reprodukční schopnosti (založený na celkovém počtu živých potomků na matečný organismus, který přežil do konce zkoušky),
 - křivka závislosti celkovém počtu živých potomků na matečný organismus, který přežil do konce zkoušky (pro každou paralelní nádobu), na koncentraci zkoušené látky
 - nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na reprodukci včetně popisu použitých statistických metod a údaje o velikosti účinku, který by mohl být detekován, a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) na reprodukci; je-li k dispozici, uvede se LOEC/NOEC pro mortalitu matečných organismů,
 - je-li k dispozici, EC_x pro reprodukci a interval spolehlivosti, dále graf křivky modelu použitého pro její výpočet, směrnice křivky závislosti dávka-reakce a její směrodatná odchylka,
 - jiné pozorované biologické účinky a jiná měření: uvedou se jakékoli jiné biologické účinky, které byly pozorovány nebo změřeny (např. růst matečných organismů) včetně přiměřeného zdůvodnění,
 - vysvětlení jakékoli odchylky od této zkušební metody.

XX.3

LITERATURA

- (1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20. – 21. březen 1993.
- (2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paříž 1997.
- (3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M., Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 21, str. 257 – 265.
- (4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, str. 25 – 33.
- (5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- (6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, str. 775 – 782.
- (7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a.

- American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 str.
- (8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C., Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Lokke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), str. 144 – 148.
 - (9) Parkhurst B. R., Forte J. L., Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, str. 1 – 8.
 - (10) Cowgill U. M., Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2), str. 185 – 196.
 - (11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, 209.
 - (12) Sims I. R., Watson S., Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, str. 2053 – 2058.
 - (13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, str. 459 – 466.
 - (14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, str. 1096 – 1121.
 - (15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, str. 482 – 491.
 - (16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, str. 103 – 117.
 - (17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, str. 510 – 531.
 - (18) Draper N. R., Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
 - (19) Brain P., Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, str. 93 – 96.
 - (20) Wilson E. O., Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
 - (21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, str. 532.
 - (22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L., Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology*, 67, str. 1156 – 1166.

DODATEK 1

PŘÍPRAVA PŘESNĚ DEFINOVANÝCH ELENDTOVÝCH MÉDIÍ M7 A M4

Aklimatizace na Elendtova média M7 M4

Některé laboratoře narazily na obtíže při přímém přenosu dafnií do médií M4 (1) a M7. Určitého úspěchu však bylo dosaženo postupnou aklimatizací, tj. přenesením z vlastního média do 30% Elenntova média, poté do 60% Elenntova média a nakonec do 100% Elenntova média. Délky doby aklimatizace mohou být až jeden měsíc.

PŘÍPRAVA

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionisované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reverzní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků (I). Z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) (násobek)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody ($\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 260	20 000	1,0	0,25
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl_2	260	20 000	1,0	1,0
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 000	2 000	—	—
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 991	2 000 n	—	—
Jak roztok Na_2EDTA , tak roztok FeSO_4 se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávuji. Získají se:				
2 litry roztoku Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů následujícím způsobem:

	Množství přidané do vody ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) (násobek)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média ($\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$)	
			M 4	M 7
Zásobní roztok II obsahující kombinaci stopových prvků		20	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

	Množství přidané do vody (mg·l ⁻¹)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) (násobek)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média (ml·l ⁻¹)	
			M 4	M 7
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:				
Thiamin-hydrochlorid	750	10 000	—	—
Kyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uchovává v malých hluboce zmrazených podílech.

Vitaminy se přidávají do média krátce před použitím.

Poznámky: Aby nedošlo při přípravě kompletního média k vysrážení solí, přidají se podíly zásobních roztoků do asi 500 – 800 ml deionisované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, str. 25-33.

DODATEK 2

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (TOC) A VYTVOŘENÍ NOMOGRAMU PRO OBSAH TOC V KRMIVU NA BÁZI ŘAS

Je pochopitelné, že obsah uhlíku v krmivu na bázi řas se nebude normálně měřit přímo, ale stanoví se z korelací (tj. z nomogramů) se zástupnými ukazateli, jako jsou počet buněk řas nebo absorbance ve viditelném světle.

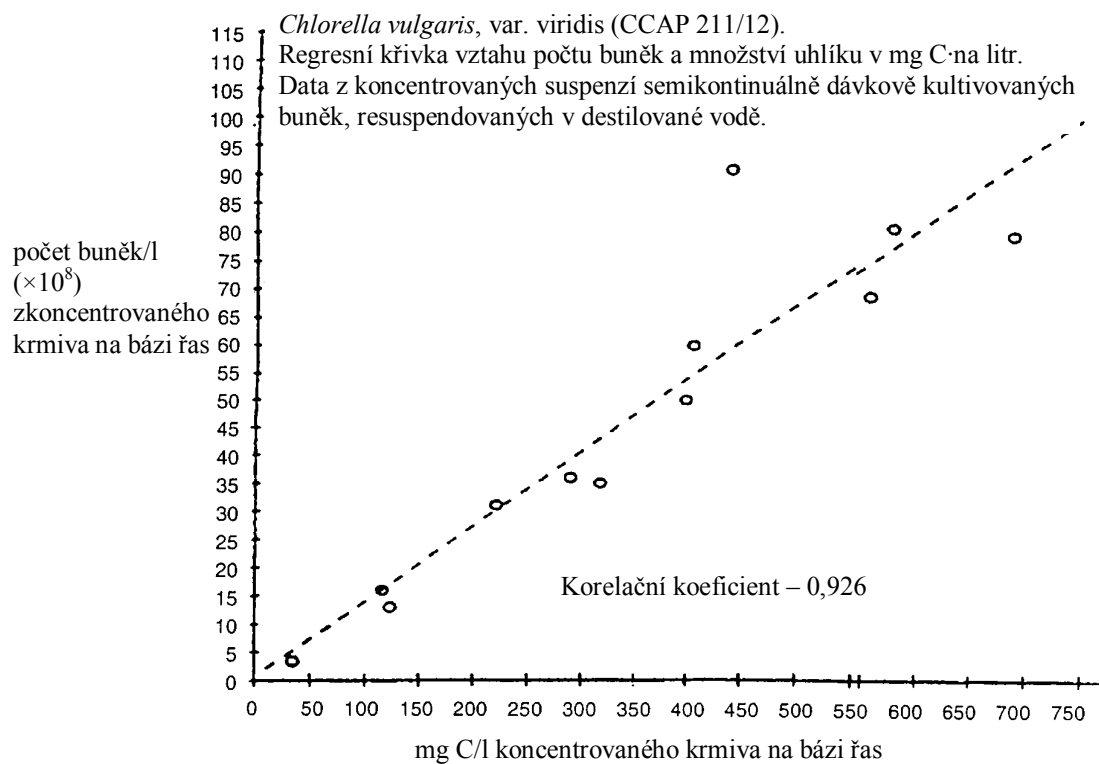
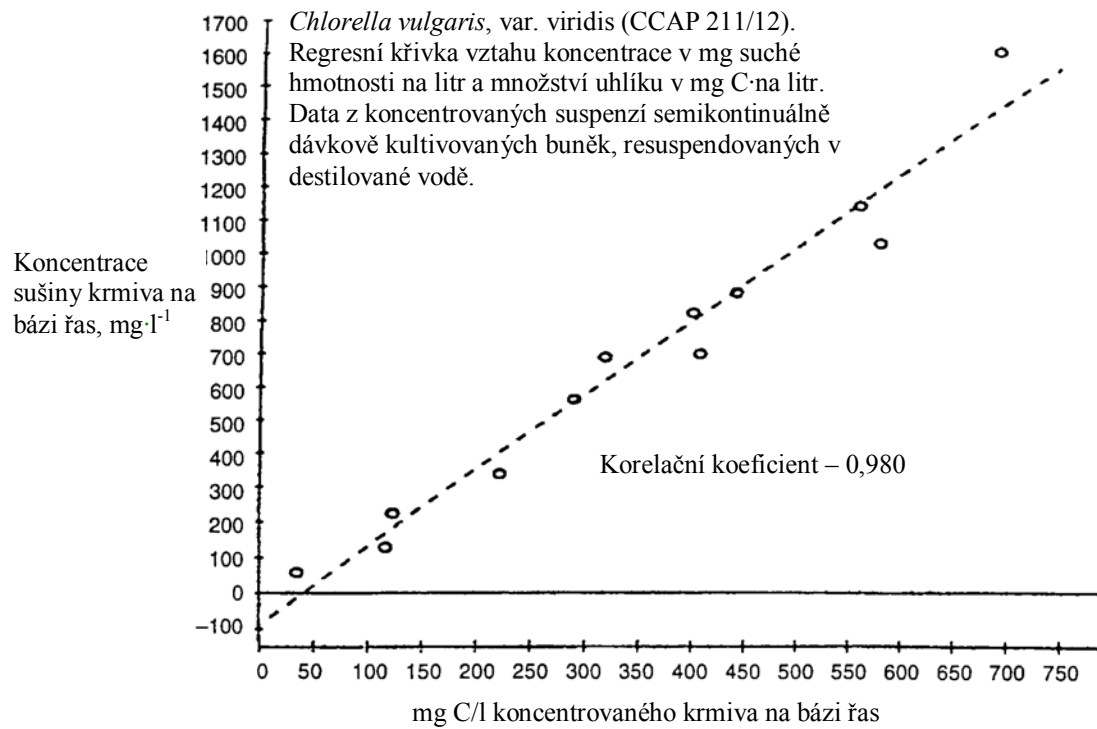
TOC by měl být stanoven spíše vysokoteplotní oxidací než pomocí UV nebo persíranovou metodou. (Viz: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

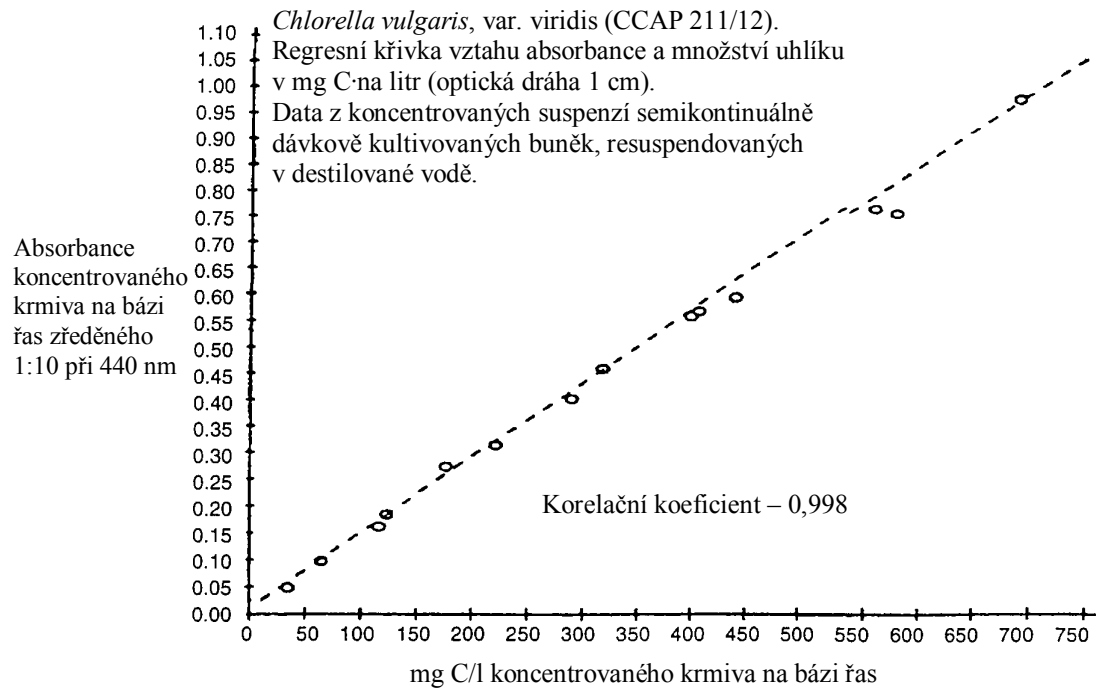
Pro účely vytvoření nomogramu se řasy oddělí od růstového média centrifugací a poté se resuspendují v destilované vodě. Zástupný ukazatel a koncentrace TOC se měří v každém vzorku trojmo.

Provede se analýza slepého pokusu s destilovanou vodou a jeho koncentrace TOC se odečte od koncentrace TOC ve vzorku s řasami.

Nomogram by měl být lineární v požadovaném rozsahu koncentrací uhlíku. Příklady jsou uvedeny níže.

Upozornění: Tyto příklady nelze pro účely přepočtu použít; je důležité, aby si laboratoře připravily vlastní nomogramy.





DODATEK 3

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU DAT PRO ZAZNAMENÁNÍ OBNOVY MÉDIA, SLEDOVANÝCH FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH DAT, KRMENÍ, REPRODUKČNÍ SCHOPNOSTI DAFNÍÍ A MORTALITY DOSPĚLCŮ

Experiment č.: Datum zahájení: Klon: Médium: Typ krmiva: Zkoušená látka: Nominální koncentrace:

Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Obnova média (zaškrtněte)																									
pH ¹																									nové
																									staré
O ₂ mg·l ⁻¹ (1)																									nové
																									staré
Teplota (°C) ¹																									nové
																									staré
Podání krmiva (zaškrtněte)																									
Počet živých potomků ²																									Celkem
Nádoba 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Celkem
Kumulativní mortalita dospělců ³																									

¹ Uvede se, ve které nádobě bylo měření provedeno.

² Do příslušné buňky se zaznamenají potracené plůdky jako „AB“ (*aborted broods*).

³ Do příslušné buňky se zaznamená mortalita dospělců jako „M“.

DODATEK 4

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU DAT PRO ZAZNAMENÁNÍ VÝSLEDKŮ CHEMICKÉ ANALÝZY

a) **Naměřené koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

b) **Naměřené koncentrace vyjádřené v procentech nominální koncentrace**

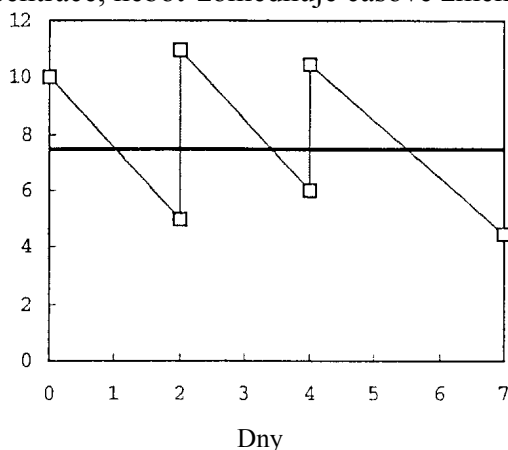
Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

DODATEK 5

VÝPOČET ČASOVĚ VÁŽENÉ STŘEDNÍ HODNOTY

Časově vážená střední hodnota

Vzhledem k tomu, že mezi výměnami média může koncentrace zkoušené látky klesat, je nezbytné zvážit, jaká koncentrace bude považována za reprezentativní pro rozsah koncentrací, jimž byly dospělé dafnie vystaveny. Výběr by měl být založen na biologických i statistických úvahách. Vychází-li se například z toho, že reprodukce je ovlivňována hlavně maximální koncentrací, již byl organismus vystaven, měla by být tedy použita maximální koncentrace. Považuje-li se však za významnější akumulované nebo dlouhodobé působení toxické látky, má větší opodstatnění průměrná koncentrace. V takovém případě je vhodným průměrem časově vážená střední koncentrace, neboť zohledňuje časové změny okamžité koncentrace.



Obrázek 1: Příklad časově vážené střední hodnoty

Na obrázku 1 je znázorněn příklad (zjednodušené) zkoušky trvající sedm dní s obnovou média v den 0, 2 a 4.

- Tenká klikatá čára znázorňuje koncentraci v kterémkoli okamžiku. Má se za to, že pokles koncentrace sleduje proces exponenciálního rozkladu buněk.
- Šest vyznačených bodů představuje koncentrace naměřené na začátku a na konci období mezi obnoveními média.
- Silná plná čára vyznačuje hodnotu časově vážené střední hodnoty.

Časově vážená střední hodnota je vypočtena tak, aby se plocha pod čarou pro časově váženou střední hodnotu rovnala ploše pod čarou průběhu koncentrace. Výpočet pro výše uvedený příklad je ilustrován v tabulce 1.

Tabulka 1: Výpočet časově vážené střední hodnoty

Obnovení média č.	Dny	$Konc_0$	$Konc_1$	$\ln(Konc_0)$	$\ln(Konc_1)$	Plocha
1	2	10 000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11 000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10 000	4,066	2,303	1,403	19,781
Celkový počet dnů: 7					Celková plocha	50,091
					ČV střední hodnota	7,156

„Dny“ se rozumí počet dnů mezi obnoveními média.

„ $Konc_0$ “ je naměřená koncentrace na začátku období mezi obnoveními média.

„ $Konc_1$ “ je naměřená koncentrace na konci období mezi obnoveními média.

„ $\ln(Konc_0)$ “ je přirozený logaritmus $Konc_0$.

„ $\ln(Konc_1)$ “ je přirozený logaritmus $Konc_1$.

„Plocha“ je plocha pod exponenciální křivkou pro každé období mezi obnoveními média.

Vypočte se z rovnice:

$$Plocha = \frac{Konc_0 - Konc_1}{\ln(Konc_0) - \ln(Konc_1)} \times Dny$$

Časově vážená střední hodnota („ČV střední hodnota“) se vypočte jako podíl „celkové plochy“ a „celkového počtu dnů“.

Pro zkoušku toxicity pro reprodukci na dafních se tabulka pochopitelně rozšíří tak, aby pokrývala 21 dnů.

Je zřejmé, že provádí-li se měření pouze na začátku a na konci období mezi obnoveními média, není možné potvrdit, že proces rozkladu je skutečně exponenciální. Jiná křivka by vedla k jinému způsobu výpočtu „Plochy“. Exponenciální rozklad však není nepřijatelný a jemu odpovídající křivka je pravděpodobně nejideálnější, chybí-li jiné informace.

Je však nezbytné postupovat opatrně, není-li v médiu na konci období mezi jeho obnoveními zjištěno žádné množství zkušební látky. Není-li možné odhadnout, jak rychle látka z roztoku zmizela, není možné získat realistickou plochu pod křivkou a není tedy možné získat rozumnou časově váženou střední hodnotu.

ČÁST II

REFERENČNÍ METODY PRO ZKOUŠENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK

I. REFERENČNÍ METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI NEIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK – metoda podle přílohy směrnice Rady 82/242/EHS ze dne 31. března 1982 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se metod zkoušení biologické rozložitelnosti neiontových povrchově aktivních látek

I.1 ÚVOD

I.1.1 DEFINICE

Neiontové povrchově aktivní látky ve smyslu této směrnice jsou ty povrchově aktivní látky, které se po průchodu měničů kationtů a aniontů stanoví jako látky s aktivní reakcí s bismutem (bismuth - active substance, BiAS) v souladu s analytickým postupem popsáním v části 3.

I.1.2 ZAŘÍZENÍ POTŘEBNÉ PRO MĚŘENÍ

Měřicí metoda používá malé zařízení zpracovávající aktivovaný kal, znázorněné na obr. 1 a podrobněji na obr. 2. Zařízení sestává ze zásobníku syntetické odpadní vody A, dávkovacího čerpadla B, provzdušňovací nádoby C, usazovací nádoby D, mamutky E pro recyklaci aktivovaného kalu a nádoby F pro shromažďování upravené odtokové vody.

Nádoby A a F musí být ze skla nebo z vhodného plastu o obsahu nejméně 24 litrů. Čerpadlo B musí zaručovat konstantní průtok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; tato nádoba obsahuje za normálního provozu tři litry směsné kapaliny. Porézní provzdušňovací kostka G je ponořena v nádobě C u vrcholu kužele. Množství vzduchu prošlé provzdušňovačem se sleduje průtokoměrem H.

I.1.3 SYNTETICKÁ ODPADNÍ VODA

Pro zkoušku se používá syntetická odpadní voda. V jednom litru vodovodní vody se rozpustí:

160 mg	peptonu,
110 mg	masového extraktu,
30 mg	močoviny ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$),
7 mg	chloridu sodného (NaCl),
4 mg	chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
2 mg	síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),
28 mg	hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4)
10 ± 1 mg	BiAS.

BiAS se extrahuje ze zkoušeného výrobku metodou uvedenou v části 2. Syntetická odpadní voda se připravuje denně čerstvá.

I.1.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

I.1.4.1 Nesmíchané povrchově aktivní látky je možné zkoušet v původním stavu. Za účelem přípravy syntetické odpadní vody (1.3) musí být stanoven obsah BiAS.

I.1.4.2 Kombinované výrobky se analyzují na obsah BiAS, MBAS a mýdla. Musí se extrahovat alkoholem a separovat BiAS (viz část 2). Obsah BiAS v extraktu je nutné znát k přípravě syntetické odpadní vody.

I.1.5 POPIS ČINNOSTI ZAŘÍZENÍ

Nejdříve se naplní provzdušňovací nádoba C a usazovací nádoba D syntetickou odpadní vodou. Výšku nádoby D je třeba nastavit tak, aby objem, obsažený v provzdušňovací nádobě C, odpovídal 3 litrům. Naočkování se provede přidáním

3 ml sekundárně vyčištěné odpadní vody dobré kvality, čerstvě odebrané z čistírny pracující převážně s domovní odpadní vodou. Upravenou odpadní vodu je nutno v období mezi odběrem a použitím přechovávat v aerobních podmínkách. Poté se uvede do provozu provzdušňovací zařízení G, mamutka E a dávkovací zařízení B. Syntetická odpadní voda musí protékat provzdušňovací nádobou C rychlostí jednoho litru za hodinu; z toho vyplývá střední doba zdržení 3 hodiny.

Rychlost provzdušňování je nutné regulovat tak, aby obsah nádoby C byl neustále udržován v suspenzi a obsah rozpuštěného kyslíku činil nejméně 2 mg.l^{-1} . Pěnění je nutné předcházet vhodnými prostředky. Nesmějí se používat činidla proti pěnění, která inhibují aktivovaný kal nebo obsahují BiAS. Mamutku E je třeba nastavit tak, aby se aktivovaný kal z usazovací nádoby kontinuálně a rovnoměrně recykloval do provzdušňovací nádoby C, kal na dně usazovací nádoby D nebo v cirkulačním okruhu, musí být vrácen do cirkulace nejméně jednou denně seškrábáním kartáčem nebo jiným vhodným způsobem. Pokud se kal neusazuje, je možno zvýšit jeho schopnost usazování přidávkou 2 ml 5% roztoku chloridu železitého, opakovanými podle potřeby.

Upravená voda, odtékající z usazovací nádoby D, se shromažďuje v nádobě F po dobu 24 hodin, poté se po důkladném promísání odebere vzorek. Nádobu F je pak nutné pečlivě vyčistit.

I.1.6 **KONTROLA MĚŘICÍHO ZAŘÍZENÍ**

Obsah BiAS (v mg.l^{-1}) v syntetické odpadní vodě se stanoví bezprostředně před použitím.

Obsah BiAS (v mg.l^{-1}) ve vodě, shromažďované po dobu 24 hodin v nádobě F, je třeba stanovit analyticky stejnou metodou ihned po shromáždění; jinak se musí vzorky uchovávat, nejlépe zmrazené.

Koncentrace se musí stanovit s přesností na $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ BiAS.

Pro kontrolu účinnosti probíhajícího procesu se nejméně dvakrát týdně měří v odtékající vodě, zfiltrované přes skelnou vatu a shromažďované v nádobě F, a dále i ve zfiltrované syntetické odpadní vodě v nádobě A, chemická spotřeba kyslíku (CHSK) nebo obsah rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

Úbytek CHSK nebo DOC je ustálen, když se dosáhne přibližně pravidelný denní biologický rozklad BiAS na konci záběhové doby, znázorněné na obr. 3.

Obsah sušiny v aktivovaném kalu obsaženém v provzdušňovací nádobě, je nutné stanovovat dvakrát týdně v g.l^{-1} . Činí-li více než $2,5 \text{ g.l}^{-1}$, musí být nadbytečný aktivovaný kal odstraněn.

Zkouška rozkladu se provádí při pokojové teplotě; ta musí být stálá a musí se udržovat mezi 292 a 297 K (19 - 24 °C).

I.1.7 **VÝPOČET BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI**

Výpočet procenta biologického rozkladu BiAS se musí provádět denně na základě obsahu BiAS v mg.l^{-1} v syntetické odpadní vodě a odpovídající odtokové vodě, shromažďované v nádobě F.

Takto získané hodnoty rozkladu se znázorňují graficky, jak je ukázané na obr. 3.

Rozklad BiAS se vypočte jako aritmetický průměr hodnot, získaných během 21 dní následujících po záběhové době, během níž byl rozklad pravidelný a provoz zařízení bezporuchový. V žádném případě nemá trvání záběhové doby přesáhnout šest týdnů.

Denní hodnoty rozkladu se počítají s přesností na 0,1 %, ale konečný výsledek se udává zaokrouhleně na nejbližší celé číslo.

V některých případech je možné připustit nižší frekvenci odběru vzorků, avšak pro výpočet průměrné hodnoty je třeba použít nejméně 14 výsledků, získaných během 21 dní, následujících po záběhové době.

I.2 **PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA ZKOUŠENÝCH VZORKŮ**

I.2.1 **ÚVODNÍ POZNÁMKY**

I.2.1.1 **Zpracování vzorků**

Zpracování neiontových povrchově aktivních činidel a kombinovaných detergentů před stanovením biologické rozložitelnosti v potvrzujícím pokuse je následující:

Výrobky	Zpracování
Neiontové povrchově aktivní látky	Žádné
Kombinované detergenty	Extrakce alkoholem, následovaná separací neiontových povrchově aktivních látek na iontoměniči

Účelem extrakce alkoholem je odstranit nerozpustné a anorganické složky v komerčním výrobku, které by za určitých okolností mohly narušit zkoušky biologické rozložitelnosti.

I.2.1.2 **Separace na iontoměniči**

Pro správné provedení zkoušek biologické rozložitelnosti se vyžaduje izolace a separace neiontových povrchově aktivních látek od mýdla a aniontových a kationtových povrchově aktivních látek.

Toho se dosáhne pomocí iontoměniče typu makroporézní měničové pryskyřice a vhodných elučních činidel pro frakční eluci. Lze tak jedním postupem izolovat mýdlo a aniontové a neiontové povrchově aktivní látky.

I.2.1.3 **Analytická kontrola**

Po homogenizaci se stanoví koncentrace aniontových a neiontových povrchově aktivních látek v syntetickém detergentu analytickým postupem pomocí MBAS a BiAS. Obsah mýdla se stanoví vhodnou analytickou metodou.

Tato analýza výrobků je nutná pro výpočet množství, potřebných k přípravě frakcí pro zkoušky biologické rozložitelnosti.

Kvantitativní extrakce není nutná; je však třeba vyextrahovat nejméně 80 % neiontových povrchově aktivních látek. Obvykle se dosahuje 90 % a více.

I.2.2 **PRINCIP**

Z homogenního vzorku (prášky, vysušené pasty a odparek) se získá ethanolový extrakt, který obsahuje povrchově aktivní látky, mýdlo a další složky vzorku detergentu, rozpustné v alkoholu.

Ethanolový extrakt se odpaří na suchý zbytek, rozpustí ve směsi izopropanol/voda a získaný roztok se vede přes kombinaci silně kyselého katexu a makroporézního anexu, zahřátého na 323 K (50 °C). Tato vysoká teplota je nutná, aby se zabránilo vysrážení případných mastných kyselin, které mohou být přítomny v kyselém prostředí.

Neiontové povrchově aktivní látky se získají z odtokové vody odpařením.

Kationtové povrchově aktivní látky, které by mohly rušit zkoušku rozložitelnosti a analytický postup, se zachytí katexem, zařazeným před anexem.

I.2.3 **ČINIDLA A VYBAVENÍ**

I.2.3.1 Deionizovaná voda.

I.2.3.2 Ethanol, 95% (obj.) C₂H₅OH

(povolené denaturační prostředky: methylethylketon nebo methanol).

I.2.3.3 Směs izopropanol/voda (50/50 obj.):

50 obj. dílů izopropanolu (CH₃CHOH.CH₃) a

50 obj. dílů vody (2. 3. 1).

- I.2.3.4 Roztok hydrogenuhličitanu amonného (60/40 obj.):
0,3 mol NH_4HCO_3 v 1000 ml směsi izopropanol/voda, tvořené 60 obj. díly izopropanolu a 40 obj. díly vody (2. 3. 1).
- I.2.3.5 Katex (KAT), silně kyselý, odolný vůči alkoholu (50 - 100 mesh).
- I.2.3.6 Anex (AAT), makroporézní, Merck Lewatit MP 7080 (70 - 150 mesh) nebo ekvivalentní.
- I.2.3.7 Kyselina chlorovodíková, 10 % HCl (hm.).
- I.2.3.8 2000 ml baňka s kulatým dnem se zabroušenou zátkou a zpětným chladičem.
- I.2.3.9 Vakuový filtr (ohřívateľný) o průměru 90 mm na filtrační papíry.
- I.2.3.10 2000 ml filtrační baňka.
- I.2.3.11 Ionexové kolony s ohřívacím pláštěm a kohoutkem; vnitřní trubice průměru 60 mm a výšky 450 mm (obr. 4).
- I.2.3.12 Vodní lázeň.
- I.2.3.13 Vakuová sušárna.
- I.2.3.14 Termostat.
- I.2.3.15 Rotační odparka.

I.2.4 **PŘÍPRAVA EXTRAKTU A SEPARACE NEIONTOVÝCH AKTIVNÍCH LÁTEK**

I.2.4.1 **Příprava extraktu**

Množství povrchově aktivních látek, potřebných pro zkoušku rozložitelnosti, je asi 25 g BiAS.

Při přípravě extraktů pro zkoušky rozložitelnosti je třeba použité množství výrobku omezit nejvýše na 2000 g. Za účelem získání dostatečného množství vzorku pro zkoušky může být nezbytné provádět postup dvakrát nebo vícekrát. Zkušenost ukázala, že je výhodné používat větší počet malých extrakcí než jednu velkou.

I.2.4.2 **Izolace složek rozpustných v alkoholu**

250 g analyzovaného syntetického detergentu se přidá k 1250 ml ethanolu, směs se zahřeje k bodu varu a za míchání se vaří pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny.

Horký alkoholický roztok se odsaje přes hrubý porézní vakuový filtr zahřátý na 323 K (50 °C), a rychle se zfiltruje. Baňka a vakuový filtr se promyjí přibližně 200 ml horkého ethanolu. Filtrát a ethanol z promytí filtru se ve filtrační baňce spojí.

V případě analýz past nebo kapalných výrobků je třeba se přesvědčit, že ve vzorku není obsaženo více než 25 g aniontové povrchově aktivní látky a 35 g mýdla. Tento odvážený vzorek se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 500 ml ethanolu

a postupuje se výše popsaným způsobem.

V případě prášků o nízké sypané hustotě (< 300 g.l⁻¹) se doporučuje zvýšit podíl ethanolu na poměr 20:1.

Ethanolový filtrát se odpaří do sucha, nejlépe v rotační odparce. Je-li třeba většího množství extraktu, postup se opakuje. Odparek se rozpustí v 5000 ml směsi izopropanol/voda.

I.2.4.3 **Příprava ionexových kolon**

K a t e x o v á k o l o n a

600 ml katexové pryskyřice (2. 3. 5) se nasype do 3000 ml kádinky a přidá se 2000 ml kyseliny chlorovodíkové (2. 3. 7). Nechá se stát nejméně dvě hodiny za občasného promíchání. Kyselina se slije a pomocí deionizované vody se pryskyřice převede do kolony (2. 3.11). V koloně musí být zátko ze skelné vaty.

Kolona se promývá deionizovanou vodou rychlostí 10 - 30 ml.min⁻¹, až je eluát prostý chloridů. Voda se nahradí 2000 ml směsi izopropanol/voda (2. 3. 3) rychlostí 10 - 30 ml.min⁻¹. Tím je ionexová kolona připravena k provozu.

A n e x o v á k o l o n a

600 ml anexové pryskyřice (2. 3. 6) se nasype do kádinky a přidá se 2000 ml deionizované vody. Pryskyřice se nechá nejméně dvě hodiny botnat. Poté se převede pomocí deionizované vody do kolony. V koloně musí být zátka ze skelné vaty.

Kolona se promyje 0,3 M roztokem hydrogenuhličitanu amonného (2. 3. 4), až je prostá chloridů. K tomu je třeba asi 5000 ml roztoku. Znovu se promyje 2000 ml deionizované vody. Voda se nahradí 2000 ml směsi izopropanol/voda (2. 3. 3) rychlostí 10 - 30 ml.min⁻¹. Tím je ionexová kolona ve formě OH připravena k provozu.

I.2.4.4 **Ionexová separace**

Ionexové kolony se spojí tak, aby katexová kolona byla umístěna nad anexovou kolonou. Kolony se zahřejí na 323 K (50 °C) s použitím termostatické kontroly. 5000 ml roztoku, získaného v bodě 2. 4. 2, se zahřeje na 333 K (60 °C) a vede se kombinací kolon rychlostí 20 ml.min⁻¹. Kolony se promyjí 1000 ml horké směsi izopropanol/voda (2. 3. 3).

Pro získání neiontových povrchově aktivních látek se spojí filtrát a roztoky z promývání filtru a odpaří se do sucha, nejlépe v rotační odparce. Odparek obsahuje BiAS. Přidá se deionizovaná voda až do získání určeného objemu, a v alikvotní části se stanoví obsah BiAS, jak je uvedeno v části 3. 3. Roztok se použije jako standardní roztok neiontových syntetických detergentů pro zkoušku rozložitelnosti. Roztok je nutno přechovávat při teplotě pod 278 K (5 °C).

I.2.4.5 **Regenerace iontoměničových pryskyřic**

Katex se po použití odstraní.

Anex se regeneruje promytím asi 5000 - 6000 ml roztoku hydrogenuhličitanu amonného (2. 3. 4) průtokovou rychlostí přibližně 10 ml.min⁻¹, až je eluát prostý aniontových povrchově aktivních látek (test s metylenovou modří). Poté se anex promyje 2000 ml směsi izopropanol/voda (2. 3. 3). Anex je opět připraven k provozu.

3. **STANOVENÍ NEIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK V ROZTOCÍCH PŘI ZKOUŠCE BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI**

I.3.1 **PRINCIP**

Povrchově aktivní látky se zkoncentrují a izolují vypuzováním plynem. Množství neiontových povrchově aktivních látek v použitém vzorku by mělo být v rozmezí 250 - 800 µg.

Povrchově aktivní látka získaná vypuzením plynem se rozpustí v octanu ethylnatém.

Po oddělení fází a odpaření rozpouštědla se neiontová povrchově aktivní látka vysráží z vodného roztoku modifikovaným Dragendorffovým činidlem (KBiJ₄ + BaCl₂ + ledová kyselina octová).

Sraženina se zfiltruje, promyje se ledovou kyselinou octovou a rozpustí se v roztoku vínanu amonného. Bismut v roztoku se titruje potenciometricky roztokem pyrrolidindithiokarbamátu při pH 4 - 5 s použitím hladké platinové indikační elektrody a kalomelové nebo stříbro/chloridostříbrné referenční elektrody.

Metodu lze použít pro neiontové povrchově aktivní látky obsahující 6 - 30 alkenoxidových skupin.

Spotřeba při titraci se pro přepočet na referenční látku, nonylfenol kondenzovaný s 10 moly etylenoxidu (NP 10), vynásobí empirickým faktorem 54.

I.3.2

ČINIDLA A VYBAVENÍ

Pro přípravu činidel se používá deionizovaná voda.

I.3.2.1

Čistý octan etylnatý, čerstvě predestilovaný.

I.3.2.2

Hydrogenuhlíčitan sodný (NaHCO_3) p.a.

I.3.2.3

Zředěná kyselina chlorovodíková (20 ml koncentrované kyseliny (HCl) zředěné vodou na 1000 ml).

I.3.2.4

Methanol p.a., čerstvě predestilovaný, přechováván ve skleněné lahvi.

I.3.2.5

Bromkrezolová červeň, 0,1 g ve 100 ml ethanolu.

I.3.2.6

Srážecí činidlo: srážecí činidlo je směs dvou objemů roztoku A a jednoho objemu roztoku B. Směs se přechovává v hnědé lahvi a lze ji použít do jednoho týdne po smísení.

3.2.6.1

R o z t o k A

1,7 g oxid dusičnanu oxidu bismutu p.a. ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí ve 20 ml ledové kyseliny octové a doplní se vodou na 100 ml. Dále se rozpustí 65 g jodidu draselného p.a. ve 200 ml vody. Tyto dva roztoky se smísí v 1000 ml odměrné baňce, přidá se 200 ml ledové kyseliny octové (3. 2. 7) a doplní se vodou na 1000 ml.

I.3.2.6.2

R o z t o k B

290 g chloridu barnatého ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a. se rozpustí v 1000 ml vody.

I.3.2.7

Ledová kyselina octová 99 - 100 % (nižší koncentrace nejsou vhodné)

I.3.2.8

Roztok vlnanu amonného: 12,4 g kyseliny vinné p.a. a 12,4 ml roztoku amoniaku p.a. ($d = 0,910 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$) se smísí a doplní vodou na 1000 ml (nebo se použije ekvivalentní množství vlnanu amonného p.a.).

I.3.2.9

Zředěný roztok amoniaku: 40 ml roztoku amoniaku p.a. ($d = 0,910 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$) se zředí vodou na 1000 ml.

I.3.2.10

Standardní tlumivý octanový roztok: 40 g tuhého hydroxidu sodného p.a. se rozpustí v kádince v 500 ml vody nechá zchladnout. Přidá se 120 ml ledové kyseliny octové (3. 2. 7). Důkladně se promíchá, ochladí a převede do 1000 ml odměrné baňky. Doplní se vodou po značku.

I.3.2.11

Roztok pyrrolidindithiokarbamátu (známý jako „karbátový roztok“): 103 mg pyrrolidindithiokarbamátu sodného ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaS}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se rozpustí v asi 500 ml vody, přidá se 100 ml n - amylalkoholu p.a. a 0,5 g NaHCO_3 p.a. a doplní se vodou na 1000 ml.

I.3.2.12

Roztok síranu měďnatého (pro standardizaci roztoku 3. 2. 11)

Z á s o b n í r o z t o k

1,249 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a. se smísí s 50 ml 0,5 M roztoku kyseliny sírové a doplní vodou na 1000 ml.

S t a n d a r d n í r o z t o k

50 ml zásobního roztoku se smísí s 10 ml 0,5 M roztoku H_2SO_4 a doplní se vodou na 1000 ml.

I.3.2.13

Chlorid sodný p.a.

I.3.2.14

Přístroj pro stripování plynem (viz obr. 5) Průměr porézního (fritového) kotouče musí být stejný jako vnitřní průměr válce.

I.3.2.15

Dělicí nálevka 250 ml

I.3.2.16

Magnetické míchadlo s magnetem 25 - 30 mm.

I.3.2.17

Goochův kelímek, průměr perforovaného dna = 25 mm, typ G 4.

I.3.2.18

Kruhové papírové filtry se skelným vláknem o průměru 27 mm s průměrem vlákna 0,5 - 1,5 μm .

- I.3.2.19 Dvě filtrační baňky s adaptéry a pryžovými manžetami, 500 a 250 ml.
I.3.2.20 Registrační potenciometr, vybavený hladkou platinovou indikační elektrodou a kalomelovou nebo stříbro/chloridostříbrnou referenční elektrodou o rozsahu 250 mV, s automatickou byretou o objemu 20 - 25 ml, nebo odpovídajícím zařízením s ruční obsluhou.

I.3.3 **METODA**

I.3.3.1 **Koncentrace a separace povrchově aktivní látky**

Vodný roztok se zfiltruje přes jakostní filtrační papír. Prvních 100 ml filtrátu se vylije.

Odměřené množství vzorku, které obsahuje 250 - 800 µg neiontové povrchově aktivní látky, se převede do stripovacího přístroje, který byl předtím promyt octanem etylnatým.

Pro zlepšení separace se přidá 100 g chloridu sodného a 5 g hydrogenuhličitanu sodného.

Je-li objem vzorku větší než 500 ml, přidají se tyto soli do stripovacího přístroje v tuhé formě, a rozpustí se probubláním dusíkem nebo vzduchem.

Použije-li se vzorek o menším objemu, rozpustí se tyto soli ve 400 ml vody a pak se přidají do stripovacího přístroje.

Přidá se voda tak, aby hladina dosáhla k hornímu uzavíracímu kohoutu.

Na vodní hladinu se opatrně přidá 100 ml octanu etylnatého.

Promývačka v části pro plyn (dusík nebo vzduch) se naplní do dvou třetin octanem etylnatým.

Přístrojem se nechá procházet plyn průtokovou rychlostí 30 - 60 l.h⁻¹; doporučuje se zapojení rotačního průtokoměru. Intenzita provzdušňování se musí na počátku zvyšovat postupně. Rychlost průtoku plynu je nutné nastavit tak, aby fáze zůstaly znatelně odděleny z důvodu minimalizace míšení fází a rozpouštění octanu etylnatého ve vodě. Po pěti minutách se průtok plynu zastaví.

Dojde-li k úbytku organické fáze rozpuštěním ve vodě většímu než 20%, je nutno postup opakovat se zvláštní pozorností na rychlost probublání plynu.

Organická fáze se slije do dělicí nálevky. Případná voda v dělicí nálevce z vodné fáze, které by mělo být jen několik ml, se vrátí do stripovacího přístroje. Fáze octanu etylnatého se zfiltruje přes suchý jakostní filtrační papír do 250 ml kádinky.

Do stripovacího přístroje se přidá dalších 100 ml octanu etylnatého a znovu se nechá procházet dusík nebo vzduch po dobu pěti minut. Poté se organická fáze přepraví do dělicí nálevky, použité při prvním dělení, vodná fáze se odstraní a organická fáze se zfiltruje přes týž filtr jako první podíl octanu etylnatého. Dělicí nálevka i filtr se propláchnou asi 20 ml octanu etylnatého.

Etylacetátový extrakt se na vodní lázni odpaří do sucha (v digestoři). Pro urychlení odpařování se na hladinu roztoku zavede jemný proud vzduchu.

I.3.3.2 **Srážení a filtrace**

Suchý odparek dle 3. 3. 1 se rozpustí v 5 ml methanolu, přidá se 40 ml vody a 0,5 ml zředěného roztoku HCl (3. 2. 3), a směs se promíchá magnetickým míchadlem. K tomuto roztoku se z odměrného válce přidá 30 ml srážecího činidla (3. 2. 6). Sráženina se vytvoří po opakovaném míchání. Po 10 minutách míchání se směs nechá nejméně pět minut stát.

Směs se zfiltruje přes Goochův kelímek, na jehož dno se položí filtrační papír ze skelných vláken. Nejdříve se filtr promyje za odsávání asi 2 ml ledové kyseliny octové. Poté se pečlivě omyjí kádinka, magnet a kelímek ledovou kyselinou octovou, již je třeba asi 40 - 50 ml. Sráženinu ulpěnou na stěnách kádinky není

nutné převést na filtr kvantitativně, protože roztok sraženiny se pro titraci vrátí do srážecí kádinky a zbývající sraženina se pak rozpustí.

I.3.3.3

Rozpuštění sraženiny

Sraženina ve filtračním kelímku se rozpustí v horkém roztoku vinanu amonného (asi 80 °C, 353 K) (3. 2. 8), který se přidává ve třech dávkách po 10 ml. Každá dávka se před odsátím filtrem do baňky nechá několik minut stát v kelímku.

Obsah filtrační baňky se převede do kádinky použité ke srážení. Stěny kádinky se opláchnou dalšími 20 ml roztoku vinanu, aby se rozpustil zbytek sraženiny.

Kelímeček, adaptér a filtrační baňka se pečlivě opláchnou 150 - 200 ml vody a tato voda se vrátí do kádinky použité pro srážení.

I.3.3.4

Titrace

Roztok se promíchá magnetickým míchadlem (3. 2. 16), přidá se několik kapek bromkrezolové červeni (3. 2. 5) a přidává se zředěný roztok amoniaku (3. 2. 9), až se zbarvení změní na fialové (roztok je mírně kyselý přítomností zbytku kyseliny octové použité k promytí).

Pak se přidá 10 ml standardního tlumivého octanového roztoku (3. 2. 10), elektrody se ponoří do roztoku a potenciometricky se titruje standardním „karbátovým roztokem“, přičemž ústí byrety je ponořeno do roztoku.

Rychlost titrace nesmí přesáhnout 2 ml.min⁻¹.

Bod ekvivalence je průsečíkem tečen obou větví křivky potenciálu. Někdy se pozoruje plochý průběh inflexe křivky potenciálu; tomu je možné se vyhnout pečlivým očištěním platinové elektrody (vyleštěním smirkovým papírem).

I.3.3.5

Slepá stanovení

Souběžně s celým postupem se provádí slepé stanovení s 5 ml methanolu a 40 ml vody podle návodu uvedeného v bodě 3. 3. 2. Spotřeba při slepé titraci musí být nižší než 1 ml, jinak je podezření na nedostatečnou čistotu činidel (3. 2. 3 - 3. 2. 7 - 3. 2. 8 - 3. 2. 9 - 3. 2. 10), zejména na jejich obsah těžkých kovů, a je nutno je vyměnit. Slepé stanovení je nutné vzít v úvahu při výpočtu výsledků.

I.3.3.6

Kontrola faktoru „karbátového roztoku“

Faktor karbátového roztoku se stanoví v den použití. Po přidání 100 ml vody a 10 ml standardního octanového tlumivého roztoku (3. 2. 10) se titruje 10 ml roztoku síranu měďnatého (3. 2. 12) karbátovým roztokem. Je-li spotřeba „a“ ml, je faktor f:

$$f = \frac{10}{a}$$

a všechny výsledky titrací se násobí tímto činitelem.

I.3.4

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Každá neiontová povrchově aktivní látka má svůj vlastní faktor, závislý na jejím složení, zejména na délce alkenoxidového řetězce. Koncentrace neiontové povrchově aktivní látky se vyjadřuje ve vztahu ke standardní látce - nonylfenolu s 10 etylenoxidovými jednotkami (NP 10) - pro který je přepočítavací faktor 0,054.

S použitím tohoto faktoru se zjistí množství povrchově aktivní látky, přítomné ve vzorku, vyjádřené v mg ekvivalentu NP 10:

$$(b - c) \cdot f \cdot 0,054 = \text{mg neiontové povrchově aktivní látky jako NP 10}$$

kde

b = objem „karbátového roztoku“, spotřebovaného u vzorku (ml),

c = objem „karbátového roztoku“, spotřebovaného při slepém stanovení (ml),

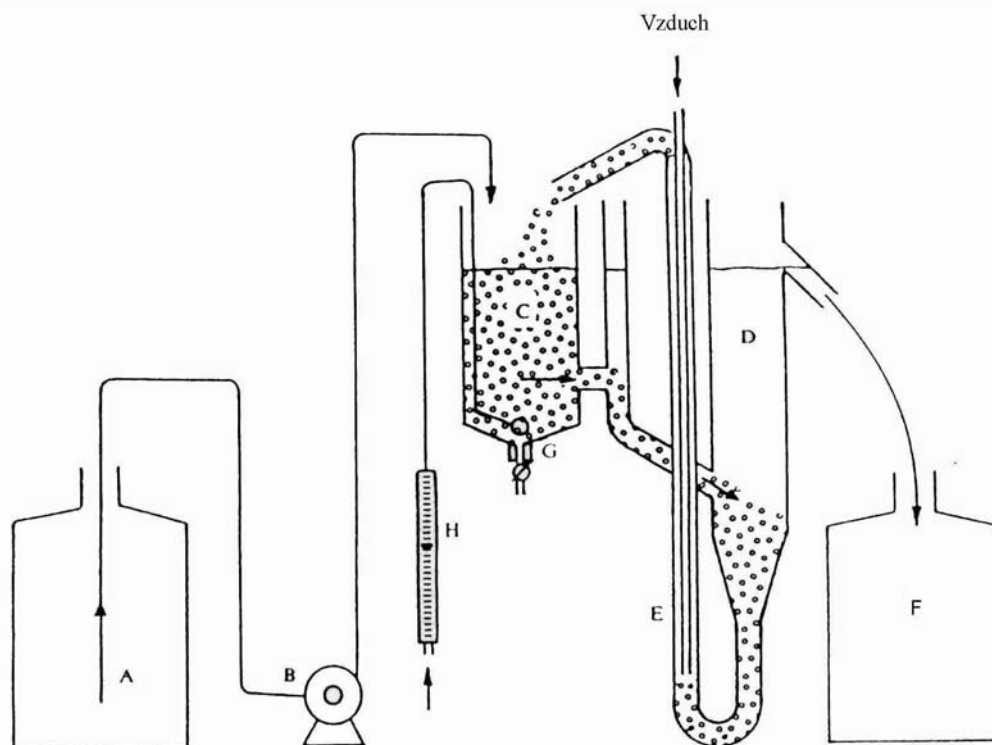
f = faktor „karbátového roztoku“.

I.3.5

VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se vyjádří v mg.l⁻¹ jako NP 10 zaokrouhleně na nejbližší 0,1.

Obrázek 1

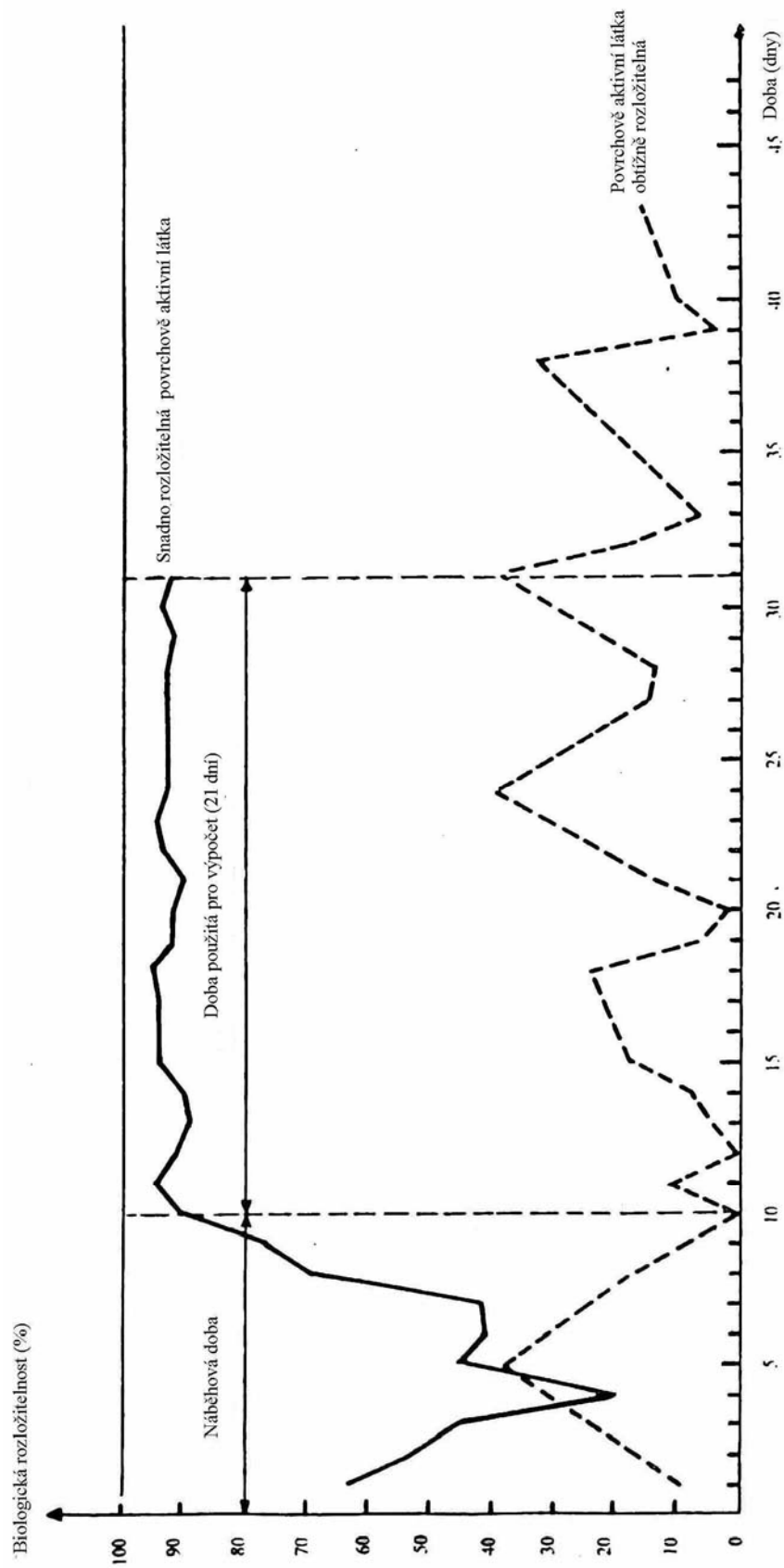


A. Zásobní nádoba
B. Dávkovací zařízení
C. Provdzušňovací komora (objem 3 l)
D. Usazovací nádoba

E. Mamutí čerpadlo
F. Sběrná nádoba
G. Sintrový provdzušňovač
H. Průtokoměr vzduchu

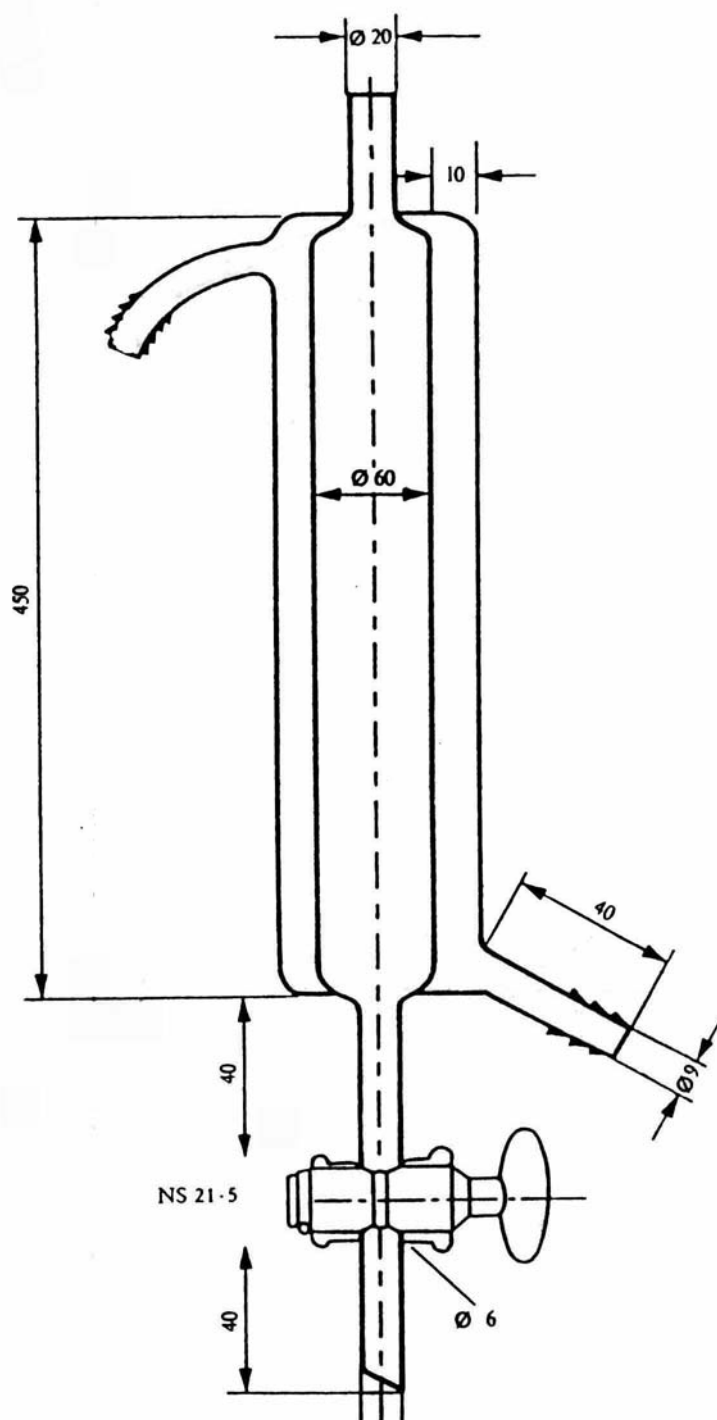
Obrázek 3

Výpočet biologické rozložitelnosti - Potvrzující



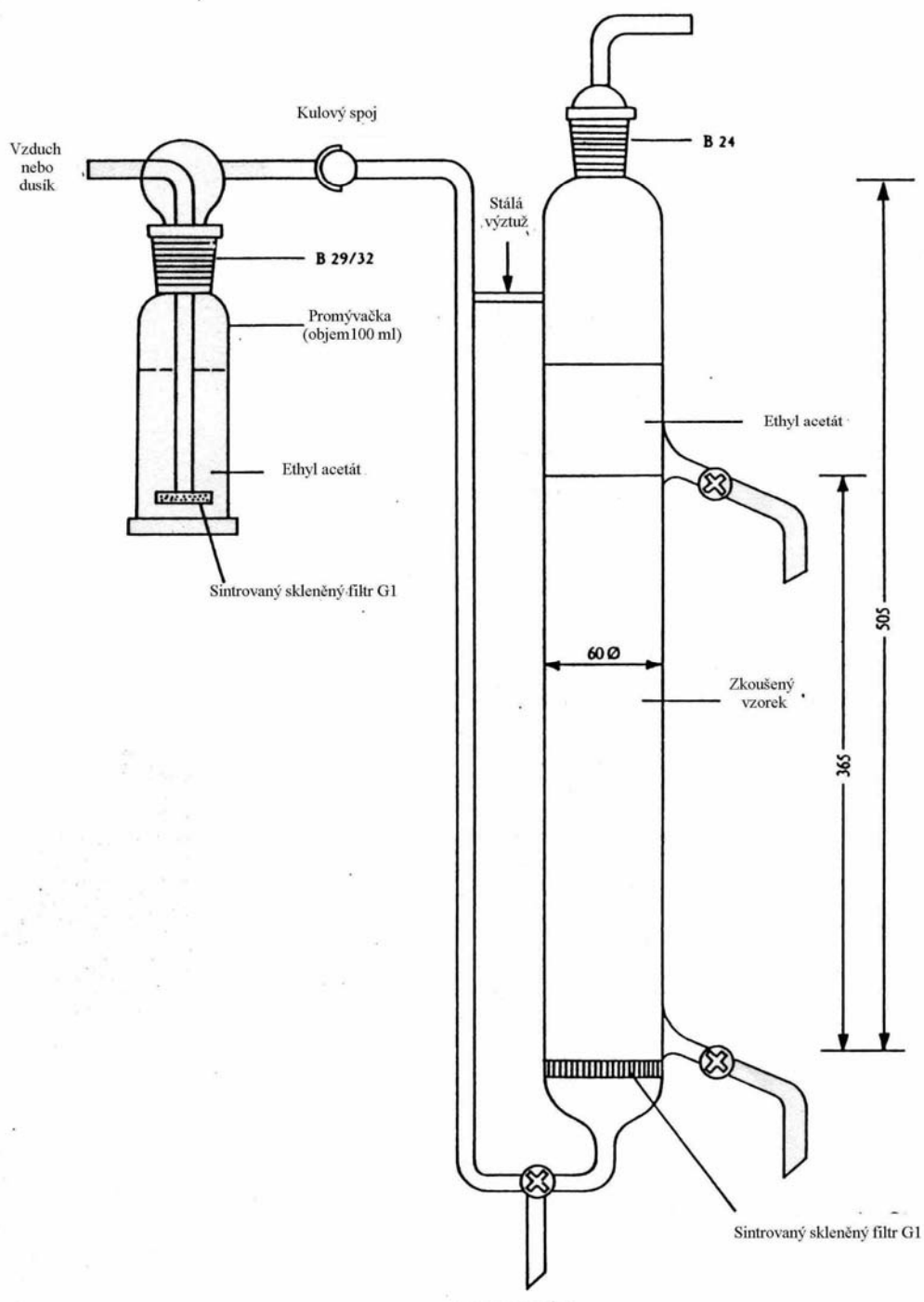
Obrázek 4

Vyhříváná ionexová kolona
(Rozměry v milimetrech)



Obrázek 5

Zařízení pro vypuzování plynem
(Rozměry v milimetrech)



II. REFERENČNÍ METODA PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK –

metoda podle přílohy směrnice Rady 82/243/EHS ze dne 31. března 1982 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se metod zkoušení biologické rozložitelnosti aniontových povrchově aktivních látek

II.1 ÚVOD

II.1.1 Definice

Aniontová povrchově aktivní činidla ve smyslu této Směrnice jsou taková povrchově aktivní činidla, která se po průchodu měniči kationtů a aniontů rozdělí frakční elucí a stanoví se jako látky s aktivní reakcí na methylenovou modř (methylene blue active substance - MBAS) v souladu s analytickým postupem popsáním v kapitole 3.

II.1.2 Zařízení potřebné pro měření

Měřicí metoda používá malé zařízení pracující s aktivovaným kalem, znázorněné na obr. 1 a podrobněji na obr. 2.

Zařízení sestává ze zásobníku syntetické odpadní vody A, dávkovacího čerpadla B, provzdušňovací nádoby C, usazovací nádoby D, mamutky E pro recyklaci aktivovaného kalu a nádoby F pro shromažďování vyčištěné odpadní vody.

Nádoby A a F musí být ze skla nebo vhodného plastu o obsahu nejméně 24 litrů. Čerpadlo B musí zaručovat stálý průtok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; tato nádoba obsahuje za normálního provozu tři litry směsné kapaliny. Sintrovaná provzdušňovací krychlička G je zavěšena v nádobě C ve vrcholu kužele. Množství vzduchu procházejícího provzdušňovačem se sleduje průtokoměrem H.

II.1.3 Syntetická odpadní voda

Při zkoušce se používá syntetická odpadní voda.

V jednom litru vodovodní vody se rozpustí:

160 mg peptonu,

110 mg masového extraktu,

30 mg močoviny $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$,

7 mg chloridu sodného (NaCl),

4 mg chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

2 mg síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),

28 mg hydrogenfosforečnanu didraselného (K_2HPO_4)

a 20 ± 2 mg MBAS.

MBAS se extrahuje ze zkoušeného výrobku metodou uvedenou v kapitole 2. Syntetická odpadní voda se připravuje denně čerstvá.

II.1.4 Příprava vzorků

II.1.4.1 Neformulované povrchově aktivní látky je možno zkoušet v původním stavu. Pro přípravu syntetické odpadní vody (1.3.) je nutno stanovit obsah MBAS.

II.1.4.2 Formulované výrobky jsou analyzovány na MBAS a obsah mýdla. Musí být podrobeny alkoholické extrakci a separaci MBAS (viz kapitolu 2). Obsah MBAS v extraktu musí být znám pro přípravu syntetické odpadní vody.

II.1.5 Činnost zařízení

Provzdušňovací nádoba C a usazovací nádoba D se na počátku naplní syntetickou odpadní vodou. Výšku nádoby D je třeba nastavit tak, aby objem obsažený v provzdušňovací nádobě C odpovídal 3 litrům.

Naočkování se provede přidáním 3 ml sekundární upravené odtokové vody dobré kvality, čerstvě odebrané z čistírny pracující převážně s domovní odpadní vodou. Tuto upravenou odtokovou vodu je nutno v období mezi odběrem a použitím

uchovávat v aerobních podmínkách. Poté se uvede do provozu provzdušňovací zařízení G, mamutka E a dávkovací zařízení B. Syntetická odpadní voda musí protékat provzdušňovací nádobou C rychlostí jednoho litru za hodinu; z toho vyplývá střední retenční doba 3 hodiny.

Rychlost provzdušňování je nutno regulovat tak, aby obsah nádoby C byl neustále udržován v suspenzi a obsah rozpuštěného kyslíku činil nejméně 2 mg.l⁻¹. Vhodnými prostředky je nutno zabránit pění. Nesmějí se používat činidla proti pění, která inhibují aktivovaný kal nebo obsahují MBAS. Mamutku E je třeba nastavit tak, aby se aktivovaný kal z usazovací nádoby kontinuálně a pravidelně recykloval do provzdušňovací nádoby C. Kal, který se nashromáždil kolem horní části provzdušňovací nádoby C, na dně usazovací nádoby D nebo v cirkulačním okruhu, je nutno vracet do cirkulace nejméně jednou denně seškrábáním kartáčem nebo jiným vhodným způsobem. Pokud se kal neusazuje, je možno zvýšit jeho hustotu přidávkou 2 ml dávek 5% roztoku chloridu železitého, opakovanými podle potřeby.

Odtoková voda z usazovací nádoby D se shromažďuje po dobu 24 hodin v nádobě F, poté se po důkladném promíšení odebere vzorek. Nádobu F je pak nutno pečlivě vyčistit.

II.1.6 **Kontrola měřícího zařízení**

Obsah MBAS (v mg.l⁻¹) v syntetické odpadní vodě se stanovuje bezprostředně před použitím.

Obsah MBAS (v mg.l⁻¹) v odtokové vodě shromažďované po dobu 24 hodin v nádobě F je třeba stanovovat analyticky touž metodou ihned po odběru; jinak je nutno vzorky uchovávat, nejlépe zmrazené. Koncentrace je třeba stanovovat s přesností na 0,1 mg MBAS.l⁻¹.

Pro kontrolu účinnosti procesu se nejméně dvakrát týdně měří chemická spotřeba kyslíku (CHSK) nebo obsah rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v odtokové vodě jímané v nádobě F, zfiltrované přes skelnou vatu a ve zfiltrované syntetické odpadní vodě v nádobě A.

Úbytek CHSK nebo DOC by se měl ustálit při dosažení přibližně pravidelného denního biologického rozkládání MBAS, tj. na konci záběhové doby znázorněné na obr. 3.

Obsah sušiny suspendovaných tuhých látek aktivovaného kalu v provzdušňovací nádobě je nutno stanovovat dvakrát týdně (v g.l⁻¹). Je-li to více než 2,5 g.l⁻¹, je třeba nadbytečný aktivovaný kal odstranit.

Test se provádí při pokojové teplotě; tato teplota musí být stálá a musí se udržovat mezi 292 a 297 K (19 - 24 °C).

II.1.7 **Výpočet biologické rozložitelnosti**

Výpočet procentního rozkládání MBAS se provádí denně na základě obsahu MBAS v mg.l⁻¹ v syntetické odpadní vodě a v příslušné odtokové vodě jímané v nádobě F. Takto získané hodnoty rozložitelnosti se znázorňují graficky, jak ukazuje obr. 3.

Rozložitelnost MBAS se vypočte jako aritmetický průměr hodnot získaných během 21 dní následujících po záběhové době, během nichž bylo rozkládání pravidelné a provoz zařízení bezporuchový. V žádném případě nemá trvání záběhové doby přesáhnout šest týdnů.

Denní hodnoty rozkládání se počítají s přesností na 0,1 %, ale konečný výsledek se udává zaokrouhleně na celé číslo.

V některých případech je možno připustit nižší frekvenci odběru vzorků, avšak pro výpočet průměrné hodnoty je třeba použít nejméně 14 hodnot získaných během 21 dní následujících po záběhové době.

II.2 PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA ZKOUŠENÝCH VÝROBKŮ

II.2.1 Úvodní poznámky

II.2.1.1 Úprava vzorků

Úprava aniontových povrchově aktivních činidel a formulovaných detergentů před stanovením biologické rozložitelnosti v potvrzující zkoušce je následující:

Produkty	Úprava
Aniontové povrchově aktivní látky	Žádné
Formulované detergenty	Extrakce alkoholem, následovaná separací aniontových povrchově aktivních látek iontoměničem

Účelem extrakce alkoholem je odstranit nerozpustné a anorganické složky komerčního výrobku, které by za určitých podmínek mohly narušit zkoušku biologické rozložitelnosti.

II.2.1.2 Ionтомěničový postup

Pro správné provedení zkoušek biologické rozložitelnosti se vyžaduje izolace a separace aniontových povrchově aktivních látek od mýdla, neiontových a kationtových povrchově aktivních látek.

Toho se dosáhne pomocí iontoměniče s použitím makroporézní iontoměničové pryskyřice a vhodných elučních činidel pro frakční eluci. Takto lze jedním postupem izolovat mýdlo, aniontové a neiontové povrchově aktivní látky.

II.2.1.3 Analytická kontrola

Po homogenizaci se stanoví koncentrace aniontových povrchově aktivních látek v syntetickém detergentu analytickým postupem pomocí MBAS. Obsah mýdla se stanoví vhodnou analytickou metodou. Tato analýza výrobků je nutná pro výpočet množství potřebných pro přípravu frakcí pro zkoušku biologické rozložitelnosti.

Kvantitativní extrakce není nutná; musí se však vyextrahovat nejméně 80 % aniontových povrchově aktivních látek. Obvykle se dosahuje 90 % nebo více.

II.2.2 Princip

Z homogenního vzorku (prášky, vysušené pasty a vysušené kapaliny) se získá ethanolový extrakt, který obsahuje povrchově aktivní látky, mýdlo a další složky vzorku syntetického detergentu, rozpustné v alkoholu.

Ethanolový extrakt se odpaří do sucha, rozpustí ve směsi isopropanol/voda a získaný roztok se nechá projít kombinací silně kyselého katexu a makroporézního anexu zahřátou na 323 K (50 °C). Tato teplota je nutná, aby se zabránilo vysrážení případných mastných kyselin, které mohou být přítomny v kyselém prostředí.

Veškeré neiontové povrchově aktivní látky zůstanou ve výtokové kapalině.

Mastné kyseliny z mýdla se odseparují elucí ethanolom obsahujícím CO₂.

Aniontové povrchově aktivní látky se získají jako amonné soli elucí vodným isopropanolovým roztokem hydrogenuhličitanu amonného. Tyto amonné soli se používají pro zkoušku rozložitelnosti.

Kationtové povrchově aktivní látky, které by mohly rušit zkoušku biologické rozložitelnosti a analytický postup, se odstraní katexem zařazeným před anexem.

II.2.3 Chemikálie a zařízení

II.2.3.1 Deionizovaná voda

II.2.3.2 Ethanol, 95 % (obj.) C₂H₅OH

(povolené denaturační prostředky: methylethylketon nebo methanol)

- II.2.3.3 Směs isopropanol/voda (50/50 obj.):
50 obj. dílů isopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOH.CH}_3$) a
50 obj. dílů vody (2.3.1.)
- II.2.3.4 Roztok oxidu uhličitého v ethanolu (přibližně 0,1 % CO_2): oxid uhličitý (CO_2) se nechá probublávat pomocí přírodní trubičky se zabudovaným sintrem po dobu 10 minut ethanolem (2.3.2.). Je třeba používat pouze čerstvé roztoky.
- II.2.3.5 Roztok hydrogenuhličitanu amonného (60/40 obj.): 0,3 molu NH_4HCO_3 v 1000 ml směsi isopropanol/voda, tvořené 60 obj. díly isopropanolu a 40 obj. díly vody (2.3.1.)
- II.2.3.6 Katex (KAT), silně kyselý, rezistentní vůči alkoholu (50-100 mesh)
- II.2.3.7 Anex (AAT), makroporézní, Merck Lewatit MP 7080 (70-150 mesh) nebo ekvivalentní
- II.2.3.8 Kyselina chlorovodíková, 10 % HCl (hmotn.)
- II.2.3.9 2000 ml baňka s kulatým dnem se zabroušenou zátkou a zpětným chladičem
- II.2.3.10 Vakuový filtr (ohřívateľný) o průměru 90 mm na filtrační papíry
- II.2.3.11 2000 ml filtrační baňka
- II.2.3.12 Ionexové kolony s ohřívacím pláštěm a kohoutkem; vnitřní trubice průměru 60 mm a výšky 450 mm (obr. 4)
- II.2.3.13 Vodní lázeň
- II.2.3.14 Vakuová sušárna
- II.2.3.15 Termostat
- II.2.3.16 Rotační odparka
- II.2.4 **Příprava extraktu a separace aniontových aktivních činidel**
- II.2.4.1 *Příprava extraktu*
Množství povrchově aktivních látek potřebných pro zkoušku biologické rozložitelnosti odpovídá asi 50 g MBAS.
V normálním případě množství výrobku, které je třeba extrahovat, nepřesáhne 1000 g, ale může být nutné extrahovat další množství vzorku.
Z praktických důvodů by ve většině případů mělo být množství výrobku, použitého pro přípravu extraktů pro zkoušku biologické rozložitelnosti omezeno na 5000 g.
Zkušenost ukázala, že je výhodnější používat větší počet malých extrakcí než jednu velkou extrakci. Specifikovaná množství ionexů odpovídají pracovní kapacitě 600-700 mmolů povrchově aktivních látek a mýdla.
- II.2.4.2 *Izolace složek rozpustných v alkoholu*
250 g analyzovaného syntetického detergentu se přidá k 1250 ml ethanolu, směs se zahřeje k teplotě varu a zahřívá se za míchání pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Horký alkoholický roztok se zfiltruje přes hrubě pórovitý vakuový filtr zahřátý na 323 K (50 °C) a rychle se filtruje. Baňka a vakuový filtr se promyjí přibližně 200 ml horkého ethanolu. Filtrát a ethanol z promytí filtru se shromáždí ve filtrační baňce.
V případě analýz past nebo kapalných výrobků je třeba se přesvědčit, že ve vzorku není obsaženo více než 55 g aniontové povrchově aktivní látky a 35 g mýdla. Tento odvážený vzorek se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 2000 ml ethanolu a postupuje se, jak je popsáno výše.
V případě prášků o nízké sytné hustotě (<300 g/l) se doporučuje zvýšit podíl ethanolu v poměru 20:1.
Ethanolový filtrát se odpaří do sucha, nejlépe v rotační odparce. Je-li třeba většího množství extraktu, postup se opakuje. Zbytek se rozpustí v 5000 ml směsi isopropanol/voda.

II.2.4.3 *Příprava ionexových kolon*

Katexová kolona

600 ml katexové pryskyřice (2.3.6.) se nasype do 3000 ml kádinky a přelije se přidavkem 2000 ml kyseliny chlorovodíkové (2.3.8.). Nechá se stát nejméně dvě hodiny za občasného promíchání. Kyselina se slije a pryskyřice se převede pomocí deionizované vody do kolony (2.3.12.). V koloně musí být zátka ze skelné vaty. Kolona se promyje deionizovanou vodou rychlostí 10-30 ml.min⁻¹, až je eluát prostý chloridů. Voda se vytěsňuje 2000 ml směsí isopropanol/voda (2.3.3.) rychlostí 10-30 ml.min⁻¹. Tím je ionexová kolona připravena k činnosti.

Anexová kolona

600 ml anexové pryskyřice (2.3.7.) se nasype do 3000 ml kádinky a přelije se přidavkem 2000 ml deionizované vody. Pryskyřice se nechá nejméně dvě hodiny bobtnat. Pryskyřice se převede pomocí deionizované vody do kolony. V koloně musí být zátka ze skelné vaty.

Kolona se promývá 0,3 M roztokem hydrogenuhličitanu amonného (2.3.5.), až je prostá chloridů. K tomu je třeba asi 5000 ml roztoku. Znovu se promyje 2000 ml deionizované vody. Voda se vytěsňuje 2000 ml směsí isopropanol/voda (2.3.3.) rychlostí 10-30 ml.min⁻¹. Tím je ionexová kolona ve formě OH a připravena k činnosti.

II.2.4.4 *Iontoměničový postup*

Ionexové kolony se spojí tak, aby katexová kolona byla umístěna před anexovou kolonou. Kolony se zahřejí na 323K (50 °C) s použitím termostatické kontroly. 5000 ml roztoku získaného podle bodu 2.4.2., se zahřeje na 333 K (60 °C) a nechá se projít kombinací kolon rychlostí 20 ml.min⁻¹. Kolony se promyjí 1000 ml horké směsí isopropanol/voda (2.3.3.).

Pro získání aniontových povrchově aktivních látek (MBAS) se kolona KAT odpojí. Mastné kyseliny z mýdla se vymyjí z kolony KAT pomocí 5000 ml roztoku ethanol/CO₂ (323 K; 50 °C) (2.3.4). Eluát se vylije.

MBAS se eluují z kolony AAT pomocí 5000 ml roztoku hydrogenuhličitanu amonného (2.3.5.). Eluát se odpaří do sucha na vodní lázni nebo v rotační odparce. Zbytek obsahuje MBAS (jako amonnou sůl) a případně povrchově neaktivní aniontové látky, které nemají nežádoucí vliv na zkoušku biologické rozložitelnosti. Ke zbytku se přidává deionizovaná voda, až se získá určený objem, a v alikvotu se stanoví obsah MBAS, jak je uvedeno v kapitole 3. Roztok se použije jako standardní roztok aniontových syntetických detergentů pro zkoušku biologické rozložitelnosti. Roztok je nutno přechovávat při teplotě pod 278 K (5 °C).

II.4.5 *Regenerace ionexových pryskyřic*

Katex se po použití odstraní.

Anexová pryskyřice se regeneruje promýváním dalším množstvím roztoku hydrogenuhličitanu amonného (2.3.5.) rychlostí přibližně 10 ml.min⁻¹, až je eluát prostý aniontových povrchově aktivních látek (zkouška s methylenovou modří). Poté se anex promyje 2000 ml směsí isopropanol/voda (2.3.3.). Anex je opět připraven k činnosti.

II.3 **STANOVENÍ ANIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK PŘI ZKOUŠCE BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI**

II.3.1 **Princip**

Metoda je založena na skutečnosti, že kationtové barvivo methylenová modř tvoří modré soli s aniontovými povrchově aktivními látkami, které je možno extrahovat

chloroformem. Aby se vyloučila interference, extrahuje se nejprve z alkalického roztoku a extrakt se pak třepe s kyselým roztokem methylenové modři. Fotometricky se měří absorbance separované organické fáze při vlnové délce maximální absorpce 650 nm.

II.3.2 **Činidla a zařízení**

II.3.2.1 Tlumivý roztok pH 10:

V deionizované vodě se rozpustí 24 g hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3) p.a. a 27 g bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) p.a. a zředí se na 1000 ml.

II.3.2.2 Neutrální roztok methylenové modři:

V deionizované vodě se rozpustí 0,35 g methylenové modři p.a. a zředí se na 1000 ml. Roztok je třeba připravit nejméně 24 hodin před použitím. Absorbance slepé chloroformové fáze, měřená proti chloroformu, nesmí být při 650 nm vyšší než 0,015 na 1 cm tloušťky vrstvy.

II.3.2.3 Kyselý roztok methylenové modři:

V 500 ml deionizované vody se rozpustí 0,35 g methylenové modři p.a. a smísí se s 6,5 ml H_2SO_4 ($d = 1,84 \text{ g.ml}^{-1}$). Deionizovanou vodou se zředí na 1000 ml. Roztok je třeba připravit nejméně 24 hodin před použitím. Absorbance slepého stanovení chloroformové fáze, měřená proti chloroformu, nesmí být při 650 nm vyšší než 0,015 na 1 cm tloušťky vrstvy.

II.3.2.4 Chloroform (trichlormethan) p.a. čerstvě predestilovaný

II.3.2.5 Methylester kyseliny dodecylbenzensulfonové

II.3.2.6 Ethanolový roztok hydroxidu draselného, KOH 0,1 M

II.3.2.7 Ethanol čistý, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

II.3.2.8 Kyselina sírová, H_2SO_4 0,5 M

II.3.2.9 Roztok fenolftaleinu:

1 g fenolftaleinu se rozpustí v 50 ml ethanolu a za stálého míchání se přidá 50 ml deionizované vody. Případné sraženiny se odfiltrují.

II.3.2.10 Kyselina chlorovodíková s methanolem: 250 ml kyseliny chlorovodíkové p.a. a 750 ml methanolu

II.3.2.11 Dělicí nálevka, 250 ml

II.3.2.12 Odměrná baňka, 50 ml

II.3.2.13 Odměrná baňka, 500 ml

II.3.2.14 Odměrná baňka, 1000 ml

II.3.2.15 Baňka s kulatým dnem se zabroušenou zátkou a zpětným chladičem, 250 ml; varné kuličky

II.3.2.16 pH metr

II.3.2.17 Fotometr pro měření při 650 nm, s kyvetami 1 až 5 cm

II.3.2.18 Filtrační papír kvalitní třídy

II.3.3 **Postup**

Vzorky pro analýzu se nesmějí odebírat přes vrstvu pěny.

Zařízení používané pro analýzu je po důkladném vymytí vodou před použitím nutno důkladně vypláchnout kyselinou chlorovodíkovou s methanolem (3.2.10.) a pak deionizovanou vodou.

Vodu vstupující do čistírny pracující s aktivovaným kalem a odtokovou vodu je nutno zfiltrovat ihned při odběru vzorků. Prvních 100 ml filtrátů se vylije.

Odměřený objem vzorku, v případě potřeby zneutralizovaný, se převede do dělicí nálevky (3.2.11). Objem vzorku by měl obsahovat mezi 20 a 150 μg MBAS. Při nižším obsahu MBAS je možno použít až 100ml vzorku. Použije-li se méně než 100 ml, zředí se na 100 ml deionizovanou vodou. Ke vzorku se přidá 10 ml

tlumivého roztoku (3.2.1), 5 ml neutrálního roztoku metylenové modři (3.2.2) a 15 ml chloroformu (3.2.4). Směsí se stejnoměrně a ne příliš prudce třepe jednu minutu. Po oddělení fázi se chloroformová vrstva převede do druhé dělicí nálevky obsahující 110 ml deionizované vody a 5 ml kyselého roztoku metylenové modři (3.2.3). Směsí se třepe 1 minutu. Chloroformová fáze se přefiltruje přes předem promytý vatový filtr navlhčený chloroformem do odměrné baňky (3.2.12).

Alkalický a kyselý roztok se třikrát extrahuje, přičemž pro druhou a třetí extrakci se použije 10 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se zfiltrují přes týž vatový filtr a doplní se v 50 ml baňce (3.2.12) po značku chloroformem použitým k promytí vaty. Měří se absorbance chloroformového roztoku fotometrem při 650 nm v 1 až 5 cm kyvetách proti chloroformu. Provádí se slepé stanovení pro celý postup.

II.3.4 **Kalibrační křivka**

Připraví se kalibrační roztok standardní látky methylesteru kyseliny dodecylbenzensulfonové (tetrapropylenový typ, mol. hmotnost 340) po zmýdelnění na draselnou sůl. MBAS se počítá jako dodecylbenzensulfonan sodný (mol. hmotnost 348).

Z vážicí pipety se naváží 400 až 450 mg methylesteru kyseliny dodecylbenzensulfonové (3.2.5) s přesností na 0,1 mg do baňky s kulatým dnem a přidá se 50 ml ethanolového roztoku hydroxidu draselného (3.2.6) a několik varných kuliček. Po nasazení zpětného chladiče se udržuje při varu jednu hodinu. Po zchlazení se chladič a zabroušený skleněný spoj promyjí asi 30 ml ethanolu, který se přidá k obsahu baňky. Roztok se titruje kyselinou sírovou na fenolftalein do ztráty zabarvení. Tento roztok se převede do 1000 ml odměrné baňky (3.2.14), doplní po značku deionizovanou vodou a promíchá.

Část tohoto zásobního roztoku povrchově aktivní látky se dále zředí. Odebere se 25 ml, převede se do 500 ml odměrné baňky (3.2.13), doplní po značku deionizovanou vodou a promíchá.

Tento standardní roztok obsahuje **Chyba!** mg MBAS v 1 ml, kde E je hmotnost vzorku v mg.

Pro sestrojení kalibrační křivky se odebere postupně 1, 2, 4, 6 a 8 ml standardního roztoku a zředí se vždy na 100 ml deionizovanou vodou. Dále se pokračuje, jak je uvedeno v odst. 3.3, včetně slepého stanovení.

II.3.5 **Výpočet výsledků**

Množství aniontové povrchově aktivní látky (MBAS) ve vzorku se odečte z kalibrační křivky (3.4). Obsah MBAS ve vzorku je dán výrazem:

$$\frac{\text{mg MBAS} \times 1\,000}{V} = \text{MBAS mg.l}^{-1}$$

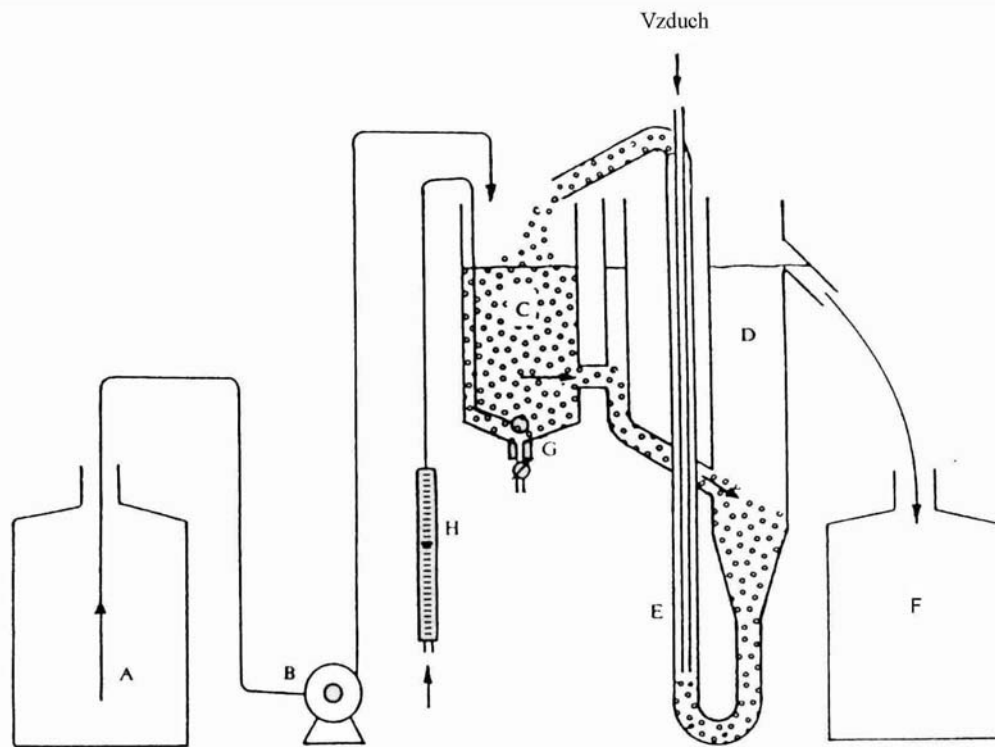
kde V = použitý objem vzorku v ml.

Výsledky se vyjádří jako dodecylbenzensulfonan sodný (mol. hmotnost 348).

II.3.6 **Vyjádření výsledků**

Výsledky se vyjádří jako mg.l⁻¹ MBAS na jedno desetinné místo.

Obrázek 1

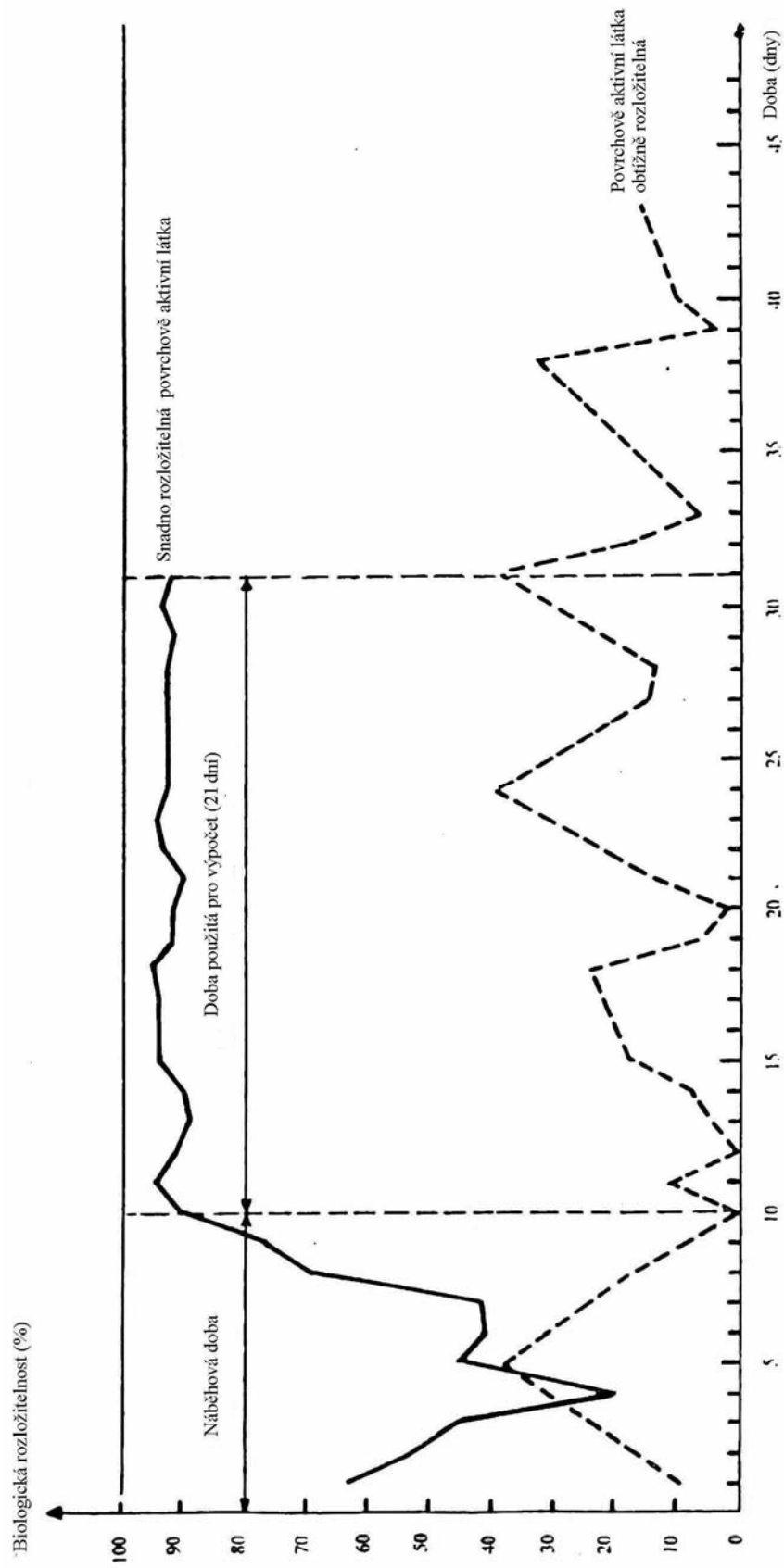


A. Zásobní nádoba
B. Dávkovací zařízení
C. Provdzušňovací komora (objem 3 l)
D. Usazovací nádoba

E. Mamutí čerpadlo
F. Sběrná nádoba
G. Sintrový provzdušňovač
H. Průtokoměr vzduchu

Obrázek 3

Výpočet biologické rozložitelnosti - Potvrzující



Obrázek 4

Vyhřívaná ionexová kolona
(Rozměry v milimetrech)

