

OBSAH

	Úvod
I	Akutní toxicita pro ryby
II	Akutní toxicita pro dafnie
III	Inhibice růstu řas
IV	Stanovení snadné biologické rozložitelnosti
	Obecné úvahy
	IV. A Zkouška úbytku DOC
	IV. B Modifikovaná vyhledávací zkouška OECD - úbytek DOC
	IV. C Zkouška vývinu oxidu uhličitého
	IV. D Manometrická respirometrická zkouška
	IV. E Zkouška v uzavřených lahvičkách
	IV. F Zkouška MÍTI
V	Rozložitelnost - biologická spotřeba kyslíku
VI	Rozložitelnost - chemická spotřeba kyslíku
VII	Rozložitelnost - abiotická hydrolýza jako funkce pH
VIII	Toxicita pro žížaly - zkouška na umělé půdě
IX	Biologická rozložitelnost - Zahn-Wellensova metoda
X	Biologická rozložitelnost - simulační zkouška s aktivovaným kalem
XI	Biologická rozložitelnost - zkouška inhibice dýchání aktivovaného kalu
XII	Modifikovaná zkouška SCAS
XIII	Biologická rozložitelnost neiontových povrchově aktivních látek
XIV	Biologická rozložitelnost aniontových povrchově aktivních látek

ÚVOD

Metody zkoušení vlastností, látek a přípravků, nebezpečných pro životní prostředí, popsané v této příloze vyhlášky MŽP, jsou shodné s obdobnými metodami stanovenými přílohou směrnice Komise ES č. 87/302/EHS a přílohou směrnice Komise ES č. 92/69/EHS. Souvztažnost metod je následující:

Označení metody podle přílohy k vyhlášce MŽP	Označení metody podle přílohy směrnice ES 92/69/ES
I	C. 1
II	C. 2
III	C. 3
IV	C. 4
IV. A	C. 4 - A
IV. B	C. 4 - B
IV. C	C. 4 - C
IV. D	C. 4 - D
IV. E	C. 4 - E
IV. F	C. 4 - F
V	C. 5
VI	C. 6
VII	C. 7

Metody převzaté z přílohy směrnice 87/302/EHS nejsou v této příloze číselným kódem označeny.

Poznámka:

Pokud pro stanovení vlastnosti existuje platný český právní nebo technický předpis (např. ČSN) vyhovující obecným podmínkám provedení zkoušky podle vyhlášky MŽP, je možné postupovat při zkoušení podle tohoto předpisu. Tato skutečnost musí být uvedena do protokolu o zkoušce. Na vyžádání musí zkušební laboratoř doložit, že jí použitý postup měření poskytuje shodné výsledky s postupem podle vyhlášky MŽP.

I AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY

1 METODA

1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je určit akutí letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Aby se co nejvíce usnadnil výběr nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) a zajistily se dostatečně konstantní koncentrace zkoušené látky po celou dobu experimentu, je nutné mít v co nejúplnější míře k dispozici údaje o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi páry, o chemické stabilitě, o disociační konstantě a o biologické rozložitelnosti zkoumané látky.

Jak při plánování tak i při interpretaci výsledků je třeba brát v úvahu další potřebné údaje (např. strukturální vzorec, stupeň čistoty, druh a procentuální podíl významných nečistot, přítomnost a množství aditiv, jakož i rozdělovací koeficient n - oktanol/voda).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zjevný nežádoucí účinek, který v organismu vyvolá během krátké doby působení (řádově dny) daná látka. Při této zkoušce se vyjadřuje akutní toxicita jako střední letální koncentrace (LC_{50}); to je taková koncentrace látky ve vodě, která během trvalé expozice po určitou dobu usmrtí 50 % jedinců zkušební skupiny ryb.

Koncentrace zkoušené látky se udávají jako hmotnost na objem ($mg.l^{-1}$). Mohou se také vyjádřit ve hmotnostních podílech ($mg.kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Aby se prokázalo, že se reakce zkušebních druhů ryb za experimentálních podmínek v laboratoři podstatně nezměnila, je možné provést kontrolní zkoušku s referenční látkou.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

1.4 PRINCIP METODY

Aby se prokázalo, že LC_{50} je vyšší než $100 mg.l^{-1}$ může se provést limitní zkouška. Ryby se vystaví účinku různých koncentrací studované látky přidané do vody po dobu 96 hodin. Úhyny se zjišťují nejméně každých 24 hodin a pokud je to možné, vypočtou se při každém pozorování také koncentrace, které usmrtí 50 % ryb (LC_{50}).

1.5 KRITÉRIA KVALITY

Kritéria kvality se vztahují na limitní zkoušku i na úplnou zkoušku.

Úhyn v kontrolních skupinách nesmí přesáhnout 10 % (nebo jednu rybu, pokud se použije skupina menší než deset jedinců) až do konce zkoušky.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku se musí udržet na 60 % hodnot nasycení vzduchem.

Koncentrace zkoušených látek by neměla poklesnout pod 80 % původních koncentrací po celou dobu trvání zkoušky.

U látek, které se lehce rozpouštějí ve zkušebním médiu a dávají stabilní roztoky (netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují se či se neadsorbují) se počáteční koncentrace může pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. To, že se koncentrace udržela na určité úrovni po celou dobu zkoušky a že kritéria kvality byla dodržena musí být dokladováno.

Pro látky, které jsou:

- (i) slabě rozpustné ve zkušebním médiu, nebo
- (ii) schopné vytvářet stabilní emulze nebo disperze, nebo
- (iii) nestabilní ve vodných roztocích,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená na začátku zkoušky. Koncentrace musí být stanovována po určitém období jejího ustálení, ale před vložením ryb.

Za účelem stanovení aktuální expoziční koncentrace a kontroly dodržení kritérií kvality se musí ve všech případech provádět další měření koncentrace během zkoušky.

pH by se nemělo změnit o více než o 1 jednotku.

1. 6 **POPIS METODY**

Zkouška může být provedena jednou ze tří metod:

- Statická metoda: Zkouška, při které zkoušený roztok neprotéká. (Roztoky se nemění během celé doby trvání zkoušky.)
- Semistatická metoda: Zkouška bez průtoku zkoušeného roztoku, ale s jeho pravidelnou obměnou po delších časových úsecích (např. po 24 hodinách).
- Průtoková metoda: Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádobách neustále obměňuje, přičemž studovaná látka se přivádí s vodou pro obnovu zkušebního média

1. 6. 1 **Činidla**

1. 6. 1. 1 **Roztoky zkoušených látek**

Základní roztoky požadované síly jsou připravovány rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle odstavce 1.6.1.2

Zvolené koncentrace jsou připravovány zředěním základního roztoku. Když jsou zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze tuto látku přímo naředit na potřebnou koncentraci.

Látky by měly být zkoušeny až do hranice jejich rozpustnosti. U některých látek (např. s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokým Pow, nebo spíše tvořících stabilní disperze než pravé roztoky ve vodě) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší než je hranice rozpustnosti, abychom si zajistili, že bude dosažena maximální rozpustná/stabilní koncentrace. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu oxysličení vody, atd).

Pro přípravu základních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě se mohou použít ultrazvuková dispergace, organická rozpouštědla či emulgační látky. Když jsou použity pomocné látky měly by všechny zkoušené vzorky a koncentrace, včetně kontrol, obsahovat těchto látek stejné množství. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla přesáhnout 100 mg.l⁻¹ zkoušeného média.

Zkouška by se měla provádět bez korekcí pH. Dochází-li k výrazné změně pH, doporučuje se provést znovu zkoušku s korekcí pH a výsledky zaznamenat.

V těchto případech by měla být hodnota pH základního roztoku přizpůsobena pH rozpouštědla (vody); pokud neexistují specifické důvody tak neučinit . Přednost se dává použití HCl a NaOH. Přizpůsobení pH nesmí ovlivnit významně koncentraci zkoušené látky v základním roztoku. Vznik chemické reakce nebo fyzikální precipitace ve zkušebním médiu jako následek přizpůsobení pH se musí zaznamenat.

1. 6. 1. 2 **Voda pro chov ryb a zřed'ování**

Je možné používat pitnou vodu (nekontaminovanou škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní vodu nebo upravenou vodu (viz příloha 1). Nejlépe se hodí voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg.l⁻¹ (vztaženo na CaCO₃) a pH od 6,0 do 8,5.

1. 6. 2 **Přístroje**

Všechny přístroje musí být z chemicky inertního materiálu:

- zařízení pro automatické zřed'ování (pro průtokovou metodu),
- přístroj pro měření koncentrace kyslíku,
- přístroj pro stanovení tvrdosti vody,
- přístroj pro měření teploty,
- přístroj pro měření pH

1. 6. 3 **Pokusné ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

Použitý druh by měl být zvolen dle praktických kritérií jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoliv další významné ekonomické a biologické faktory Také by měl být brát ohled na potřebu srovnatelnosti získaných dat a na mezinárodní spolupráci (1) při volbě používaného druhu ryb.

Seznam doporučených druhů ryb pro provádění zkoušek je uveden v příloze 2; preferovanými druhy

jsou danio pruhované a pstruh duhový.

1. 6. 3. 1

Chov

Je třeba, aby ryby pocházely pokud možno z jednoho chovu a byly přibližně stejné délky a stejného stáří. Nejméně 12 dní je třeba je chovat v těchto podmínkách:

Nádoby:

Pro ryby žijící ve studené vodě se doporučují nádoby o minimálním obsahu 300 l, pro ryby žijící v teplé vodě nádoby o minimálním obsahu 100 l.

Počet ryb (obsádka):

Podle metody (recirkulační nebo průtokové zařízení) a druhu ryb,

Voda:

Viz 1. 6. 1. 1

Osvětlení

12 až 16 hodin světla denně

Koncentrace rozpuštěného kyslíku

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem

Krmení

Třikrát týdně nebo jednou denně; vysazení krmení 24 hodin před začátkem experimentu

1. 6. 3. 2

Mortalita

Po aklimatizační době 48 hodin se sleduje mortalita a používají se tato kritéria:

- úhyny činí více než 10 % populace za 7 dní:
celá obsádka ryb se musí vyřadit;
- úhyny činí 5 až 10 % populace:
dobu chovu je třeba prodloužit o dalších 7 dní. Pokud nedojde k dalším případům úhynu, je rybí obsádka pro zkoušku použitelná, jinak nikoli;
- úhyny činí méně než 5 % populace:
rybí obsádka je pro zkoušku použitelná.

1. 6. 4

Aklimatizace

Všechny ryby je třeba nasadit nejméně na 7 dnů před použitím pro zkoušku do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se má používat při zkoušce.

1.6.5

Provedení zkoušky

Před vlastní zkouškou je možno provést zkoušku předběžnou. Tato předběžná zkouška poskytuje informace o rozsahu koncentrací pro vlastní zkoušku.

Mimo zkoušky s různými koncentracemi zkoušené látky je třeba provést kontrolní zkoušky bez zkoušené látky a kontrolní zkoušky s nosičem, pokud se nějaký použije, avšak bez zkoušené látky

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené látky se zvolí statický, semistatický či průtokový systém a dbá se na dodržení kritérií kvality.

Ryby se exponují zkoušené látce, jak je popsáno dále:

Trvání: 96 hodin

Počet jedinců : Nejméně 7 na každou koncentraci.

Nádrže: Vhodný objem vzhledem k doporučenému počtu ryb (obsádce)

Počet ryb: Jako největší množství ryb se ve statickém a semistatickém uspořádání doporučuje 1,0 g.l⁻¹, v průtokovém uspořádání je možné množství větší.

Koncentrace při zkoušce: Nejméně 5 různých koncentrací, které jsou odstupňovány činitelem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah 0 % až 100 % mortality.

Voda: Viz 1. 6. 1. 2.

Osvětlení: 12 až 16 hodin světla denně

Teplota: Podle druhu ryb (příloha 2), kolísající v mezích ± 1 °C při každé jednotlivé zkoušce.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku: Ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě.

Krmení: Žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 - 4 hodinách a dále nejméně každých 24 hodin. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby je třeba odstranit ihned jakmile se zpozorují, a je třeba o tom učinit záznam.

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

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty je nutné provádět denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodice se může provést limitní zkouška při koncentraci 100 mg.l⁻¹ za účelem prokázání skutečnosti, že LC₅₀ je vyšší než tato koncentrace.

Jestliže je povaha zkoušené látky taková, že nelze ve vodě dosáhnout koncentrace 100 mg.l⁻¹, měla by být provedena 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 by měla být prováděna na 7 až 10 rybách a při stejném počtu ryb v kontrolách. (Podle binomické teorie použití 10 ryb s nulovým úhynem znamená 99,9 % pravděpodobnost, že LC₅₀ je větší než 100 mg.l⁻¹. Žádný úhyn ve zkouškách na 7, 8 nebo 9 rybách znamená nejméně 99 % pravděpodobnost, že LC₅₀ je větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.

Jestliže dojde k úhynům, musí se provést úplné zkoušení. Jsou-li pozorovány subletální účinky, musí být zaznamenány.

2 ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní lognormální papír se pro každou doporučenou a skutečně prověřovanou délku expozice (24, 48, 72 a 96 hodin) vynese úhyn proti koncentraci.

Pokud je to možné, mělo by se pro každou délku expozice stanovit LC₅₀ a hranice spolehlivosti ($p = 0,05$). Tyto hodnoty se zaokrouhlí na jedno, případně dvě desetinná místa.

V případech, kdy je úhel stoupání křivky závislosti procenta úhynů na koncentraci látky příliš strmý a hodnoty LC₅₀ nelze vypočítat, stačí grafický odhad těchto hodnot.

Když dvě po sobě jdoucí koncentrace odlišené činitelem 2,2 vyvolávají úhyn 0 a 100 % je zřejmé, že LC₅₀ se nachází mezi těmito hodnotami.

Pokud není možné udržet stabilitu nebo homogenitu studované látky, je třeba to zmínit ve zprávě z experimentu a interpretace výsledků by měla být opatrná.

3 ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Pokud je to možné, obsahuje závěrečná zpráva následující informace:

- údaje o použitých rybách (vědecký název, kmen, dodavatel nebo zdroj odběru, předchozí ošetřené velikost a počet při jednotlivých koncentracích při experimentu),
- původ zředovací vody a její nejdůležitější chemické vlastnosti (pH, tvrdost, teplota),
- u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy základních a zkušebních roztoků,
- koncentrace všech pomocných látek,
- přehled použitých koncentrací a veškeré informace, které jsou k dispozici o stabilitě zkoušené látky při použitých koncentracích,
- při provádění chemických analýz údaje o použitých metodách a výsledky,
- výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,
- důvody pro volbu a podrobnosti provedení zkoušky (např. trvání zkoušky, statické nebo semistatické uspořádání, rychlost dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována; počet ryb, atd.),
- popis zkušebního zařízení,
- světelný režim,

- koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota roztoků při zkoušce každých 24 hodin,
- důkaz, že byla splněna kritéria kvality,
- tabulka kumulativních úhynů při každé koncentrace a při kontrolní zkoušce (případně i při kontrolní zkoušce s nosičem) při každé z doporučených dob pozorování,
- grafické znázornění křivky závislosti účinku na koncentraci na konci zkoušky,
- hodnoty LC₅₀ při každé z doporučených dob pozorování (pokud možno s 95% mezi spolehlivostí),
- použité statistické metody stanovení hodnot LC₅₀,
- při použití referenční látky údaj o výsledcích zkoušky s touto látkou,
- nejvyšší koncentrace bez úhynu ryb po dobu zkoušky,
- nejnižší koncentrace se 100 % úhynem ryb v době zkoušky.

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 a /3 - Water Quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton - Buchanan - *Teleostei, Cypridinae*). 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*.
- (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, January, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA -600/4 - 78 - 012., 1978
- (11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979,
- (12) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater 14th edition, 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. CEE Study D. 8368, 22 March 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamt zum akuten Fisch - Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments. I. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, s. 99.
- (16) Finney, D. I. 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, vol. 3, 793 - 821.
- (18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3 - 32.
- (19) Stephan, C. E, Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W., A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

Upravená voda

Příklad vhodné zředovací vody

Všechny chemikálie musí být analytické čistoty.

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.

Základní roztoky:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - dihydrát chloridu vápenatého 11,76 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - heptahydrát síranu hořečnatého 4,93 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

NaHCO_3 - hydrogenuhličitan sodný 2,59 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

KCl - chlorid draselný 0,23 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

Upravená zředovací voda

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

Provzdušňuje se tak dlouho, až koncentrace rozpuštěného kyslíku odpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

Hodnota pH musí činit $7,8 \pm 0,2$.

Pokud je třeba, upraví se pH pomocí NaOH (hydroxidem sodným) nebo HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Tato zředovací voda se nechá 12 hodin stát bez dalšího provzdušňování.

Úhrn iontů Ca a Mg v tomto roztoku činí $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poměr iontů Ca : Mg činí 4 : 1 a poměr iontů

Na : K činí 10 : 1. Celková alkalita tohoto roztoku činí $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Odchylná příprava zředovací vody nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

PŘÍLOHA 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušku

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)	20 až 24	$5,0 \pm 2,0$
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linne 1758) Kapr	20 až 24	$6,0 \pm 2,0$
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Halančík japonský	20 až 24	$3,0 \pm 1,0$
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Živorodka duhová (gupka)	20 až 24	$3,0 \pm 1,0$
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linne 1758) Slunečnice modrá	20 až 24	$5,0 \pm 2,0$

Salmo gairdneri (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (Richardson 1836) Pstruh (americký duhový)	13 až 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linne 1758) Jelec jesen	20 až 24	6,0 ± 2,0

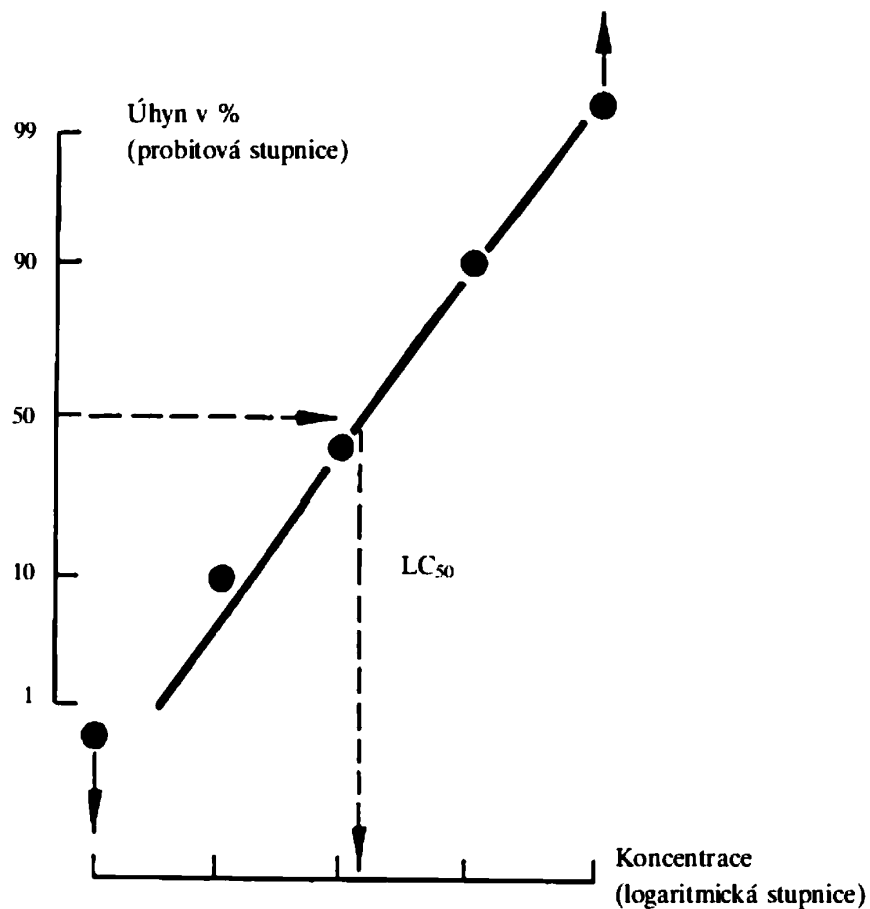
Získávání

Výše uvedené druhy ryb lze snadno chovat a/nebo jsou po celý rok lehce dostupné. Dají se chovat v zařízeních pro chov ryb nebo v laboratoři za podmínek kontroly nemocí a parazitů, takže jsou zdravé a známého původu.

Tyto druhy ryb lze získat v mnoha částech světa.

PŘÍLOHA 3

Příklad křivky závislosti mortality na koncentraci
Příklad stanovení LC₅₀ na pravděpodobnostním papíře



II AKUTNÍ TOXICITA PRO DAFNIE

1 METODA

1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit střední účinnou koncentraci zkoušené látky pro mobilizaci (EC_{50}) dafnií ve sladkovodním prostředí. Před začátkem experimentu je třeba mít v co nejúplnější míře k dispozici údaje o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi páry, o chemické stabilitě, o disociační konstantě a o biologické rozložitelnosti zkoušené látky.

Jak při plánování, tak i při interpretaci výsledků zkoušek je třeba brát v úvahu další údaje, jako např. strukturální vzorec, stupeň čistoty, druh a procentuální podíl významných nečistot, přítomnost a množství přídatných látek, jakož i rozdělovací koeficient n-oktanol/voda.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Požadavek předpisů na stanovení LC_{50} pro dafnie se naplňuje stanovením EC_{50} , jak je popsáno v této zkušební metodě.

Ve smyslu této zkušební metody se rozumí akutní toxicitou imobilizace dafnií střední efektivní (účinnou) koncentrací (EC_{50}). Je to taková koncentrace (vztaheno na výchozí koncentraci), která imobilizuje 50 % dafnií zkušební skupiny během doby působení (doby expozice).

Neschopnost plavání - imobilizace

Za neschopné plavání se považují ty dafnie, které po lehkém pohybu experimentální nádobou nevykazují během 15 sekund žádné plavací pohyby.

Veškeré koncentrace zkoušené látky se vyjadřují jako hmotnost na objemy ($mg.l^{-1}$) nebo hmotnost na hmotnost ($mg.kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Aby se prokázalo, že se reakce zkušebních dafnií za experimentálních podmínek v laboratoři podstatně nezměnila je možné provést kontrolní zkoušku s referenční látkou.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

Souhrn výsledků okružního testu laboratoři EHS s použitím 4 různých látek je uveden v příloze 2.

1.4 PRINCIP METODY

Aby se prokázalo, že EC_{50} je vyšší než $100 mg.l^{-1}$, může se provést limitní zkouška. Dafnie se vystaví na 48 hodin účinku zkoušené látky přidané v různých koncentracích do vody. Použije-li se doba kratší, zdůvodní se ve zprávě.

Za jinak stejných experimentálních podmínek a v odpovídajícím rozmezí zkoušených koncentrací působí různé koncentrace dané zkoušené látky na schopnost plavání dafnií rozdílně. Při různých koncentracích se pak po uplynutí zkušební doby objeví vždy určité procentuální podíly dafnií neschopných plavání. Koncentrace způsobující neschopnost plavání u 0 % resp. 100 % se získají přímo pozorováním, zatímco hodnota EC_{50} pro 48 hodin se získá, pokud je to možné, výpočtem.

Při této metodě se používá statický postup. Experimentální roztoky se tedy během doby expozice neobnovují.

1.5 KRITÉRIA KVALITY

Kritéria kvality se vztahují na limitní i úplnou zkoušku.

Imobilizace v kontrolních skupinách nesmí přesáhnout 10 % na konci zkoušky.

Dafnie v kontrolních skupinách nesmí být zachyceny na povrchu vody.

Je žádoucí, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku ve zkušebních nádobách zůstala vyšší než $3 mg.l^{-1}$ po celou dobu zkoušky. Za žádných okolností nesmí poklesnout pod $2 mg.l^{-1}$.

Koncentrace zkoušených látek by se měla udržet v rozmezí 80 % původních koncentrací po celou dobu trvání zkoušky.

U látek, které se lehce rozpouštějí ve zkušebním médiu a dávají stabilní roztoky (netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují či se neadsorbují), se počáteční koncentrace může pokládat za

ekvivalentní nominální koncentraci. To, že se koncentrace udržela na určité úrovni po celou dobu zkoušky a že kritéria kvality byla dodržena musí být dokladováno.

Pro látky, které jsou:

- (i) slabě rozpustné ve zkušebním médiu, nebo
- (ii) schopné vytvářet stabilní emulze nebo disperze, nebo
- (iii) nestabilní vodné roztoky,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená na začátku zkoušky. Koncentrace musí být stanovována po určitém období ustálení, ale před vnesením dafnií.

Ve všech případech se musí provádět další měření koncentrace během zkoušky za účelem stanovení aktuální expoziční koncentrace a kontroly dodržení kritérií kvality.

pH by se nemělo změnit o více než 1 jednotku.

1. 6 POPIS METODY

1. 6. 1 Činidla

1. 6. 1. 1 *Roztoky zkoušených látek*

Základní roztoky v požadovaných koncentracích se přepraví rozpuštěním zkoušené látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1. 6. 1. 2.

Zvolené zkoušené koncentrace se připraví zředěním základního roztoku. Když se zkoušejí vysoké koncentrace, látka se může rozpustit přímo ve vodě.

Látky by měly být zkoušeny až do hranice jejich rozpustnosti. U některých látek (např. s nízkou rozpustností ve vodě, nebo vysokým P_{ow} nebo spíše tvořících stabilní disperze než pravé roztoky ve vodě) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší než je hranice rozpustnosti, abychom si zajistili, že bude dosažena maximální rozpustná/stabilní koncentrace. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícím oxysličení vody, atd).

Pro přípravu základních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě se mohou použít ultrazvuková dispergace, organická rozpouštědla či emulgační látky. Když jsou použity pomocné látky měly by všechny zkoušené vzorky a koncentrace, včetně kontrol obsahovat těchto látek stejné množství. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla přesáhnout 100 mg.l⁻¹ zkoušeného média.

Zkouška by se měla provádět bez korekcí pH. Dochází-li k výrazné změně pH, doporučuje se provést znovu zkoušku s korekcí pH a výsledky zaznamenat. V těchto případech by měla být hodnota pH základního roztoku přizpůsobena pH rozpouštědla (vody), pokud neexistují specifické důvody tak neučinít. Přednost se dává použití HCl a NaOH. Přizpůsobení pH nesmí ovlivnit významně koncentraci zkoušené látky v základním roztoku. Vznik chemické reakce nebo fyzikální precipitace ve zkušebním médiu jako následek přizpůsobení pH se musí zaznamenat.

1.6.1. 2 *Voda pro kultivaci a zředování*

Pro tuto zkoušku je možné používat každou vodu vhodnou ke kultivaci dafnií, ať je to přírodní nebo upravená voda (viz příloha 1, literatura (2): ISO 6341)

Aby nebylo nutné aklimatizovat dafnie na experimentální podmínky, doporučuje se pro kultivaci používat stejnou vodu jako pro zkoušku.

1. 6. 2 Přístroje

Používají se obvyklé přístroje a vybavení experimentálních pracovišť. Části, které přicházejí do styku se zkoušenými roztoky mají být nejlépe celé ze skla:

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

1. 6. 3 Pokusné organismy

Přednost se dává druhu *Daphnia magna*. Povolen je také druh *Daphnia pulex*. Jedinci musí být na začátku zkoušky mladší než 24 hodin, laboratorně odchovaní, bez zjevných nemocí, známého původu (např. chov - předchozí Ošetření, ; manipulace).

1. 6. 4

Provedení zkoušky

Před vlastní zkouškou je možné provést předběžnou zkoušku. Touto předběžnou zkouškou se zjišťují informace o rozsahu koncentrací, které je možné použít ve vlastní zkoušce.

Mimo zkoušky s různými koncentracemi zkoušené látky je třeba provést kontrolní zkoušku bez zkoušené látky a kontrolní zkoušku s nosičem, pokud se nějaký při zkoušení používá.

Dafnie se exponují zkoušené látce, jak je popsáno dále:

Doba:

Nejlépe 48 hodin.

Počet jedinců:

Nejméně 20 na každou koncentraci, nejlépe rozděleně ve 4 skupinách po 5 dafniích nebo ve 2 skupinách po 10 dafniích.

Množství média:

Nejméně 2 ml zkušební roztoku na 1 dafnii.

Koncentrace při zkoušce:

Zkušební roztok je třeba připravit bezprostředně před nasazením dafnií, pokud možno jen s vodou jako jedinými rozpouštědlem. Koncentrace se připraví jako geometrická řada s činitelem nepřevyšujícím 2,2. Spolu s kontrolní zkouškou je třeba použít koncentrace, které dostačují k vyvolání 0 % a 100 % neschopnosti plavání, jakož i řadu koncentrací mezi těmito hodnotami, umožňující výpočet hodnoty EC₅₀ pro 48 hodin

Voda: Viz 1. 6. 1. 2.

Světlo: žádoucí je cyklus světla a tmy.

Teplota: Teplota musí být v rozmezí od 18 °C do 22 °C. Pro každou jednotlivou zkoušku má však zůstat konstantní v mezích ± 1 °C.

Provzdušňování: Zkušební roztoky je třeba provzdušňovat jen lehce. Nesmí být provzdušňovány probubláváním.

Krmení : Žádné.

Na konci zkoušky je třeba stanovit pH a obsah rozpuštěného kyslíku pro kontrolní zkoušky a pro každou koncentraci. Hodnota pH zkušebních roztoků se nesmí změnit.

Těkavé sloučeniny je třeba zkoušet v uzavřených nádobách naplněných po okraj, dostatečně velkých, aby se vyloučil nedostatek kyslíku.

Dafnie se pozorují nejpozději po 24 hodinách a znovu po 48 hodinách expoziční doby.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodice se může provádět limitní zkouška při 100 mg.l⁻¹ za účelem prokázání faktu, že EC₅₀ je vyšší než tato koncentrace.

Jestliže je povaha zkoušené látky taková, že nelze dosáhnout ve vodě koncentrace 100 mg.l⁻¹ měla by být provedena limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stabilní disperzi v použitém médiu (viz také bod 1. 6. 1. 1)).

Limitní zkouška by měla být prováděna na 20 dafniích, rozdělených do 4 skupin, se stejným počtem v kontrolní skupině. Jestliže dojde k imobilizaci, musí se provést úplné zkoušení.

2

ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Neschopnost plavání pro každou koncentraci po 24 a 48 hodinách expoziční doby se vynese na papír s pravděpodobnostním rastrem proti koncentraci. Body se propojí přímkou. Odečte se koncentrace, která odpovídá 50 %-nímu účinku.

Pro každou dobu pozorování se stanoví standardními metodami, pokud to dovolují získané údaje, EC_{50} a rozsah její spolehlivosti ($P = 0,05$); výsledky se zaokrouhlují na jedno nebo nejvýše na dvě významná místa (příklad zaokrouhlování na dvě místa: 170 pro 173,5; 0,13 pro 0,127; 1,2 pro 1,21)

Pokud je průběh křivky závislosti účinku na koncentraci pro výpočet EC_{50} příliš strmý, stačí grafický odhad této hodnoty.

Vyvolávají-li dvě po sobě následující koncentrace, které se liší o činitele 2,2, neschopnost plavání 0 % a 100 %, pak je to postačujícím průkazem toho, že EC_{50} leží v této oblasti.

Pokud se pozoruje, že není možné zachovat stabilitu nebo homogenitu zkoušené látky, je to třeba uvést ve zprávě z experimentu a příslušným způsobem to zohlednit při interpretaci výsledků.

3

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Závěrečná zpráva má, je-li to možné, obsahovat:

- údaje o použitých organismech (vědecký název, kmen, chovatel nebo zdroj odběru, zacházení před zkouškou, metoda odchovu včetně původu, druh a množství potravy frekvence krmení),
- počet dafnií použitých při každé zkušební koncentraci,
- přehled použitých koncentrací a veškeré informace, které jsou k dispozici o stabilitě zkoušené látky v použitých roztocích,
- popis experimentálních nádob, objem příslušného zkušebního média, počet jedinců na nádobu,
- při provádění chemických analýz údaj o použitých metodách a výsledky,
- původ zředovací vody a její nejdůležitější chemické vlastnosti (pH, teplota, tvrdost),
- metody popravky základních a zkušebních roztoků v případě zkoušení ve vodě málo rozpustné látky,
- koncentrace všech nosičů (organická rozpouštědla, dispergační činidla, apod.),
- poměry osvětlení,
- nejvyšší použitá zkušební koncentrace, při které v průběhu zkoušky nedošlo k inhibici dafnií,
- nejnižší použitá zkušební koncentrace, při které v průběhu zkoušky došlo ke 100 % inhibici dafnií,
- tabulku kumulativní neschopnosti plavání při kontrolní zkoušce, při kontrolním zkoušce s nosičem a při každé zkušební koncentraci v doporučených intervalech pozorování (24 hodin nebo 24 a 48 hodin),
- hodnoty EC_{50} v každém doporučeném intervalu pozorování (pokud možno s 95 % mezi spolehlivostí),
- grafické znázornění křivky závislosti účinku na koncentraci na konci zkoušky,
- je-li to možné, stoupání a 95 % mez spolehlivosti
- použité statistické metody stanovení hodnot EC_{50} ,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota v roztocích při testu,
- při použití referenční látky údaj o výsledcích,
- důkaz, že byla splněna kritéria kvality,
- popis vybavení,
- výsledky limitního zkoušky.

4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council, C (81) 30 final.
- (2) International Standard ISO, Water Quality - Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341 - 1959.
- (3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera - crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
- (4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamt zum akuten Fisch - Test. Rudolph.P. und Boje, R: Okotoxikologie, Grundlagen für ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1955.
- (5) DIV Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) a (L 11).

- (6) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U K.. 1978.
- (7) Latchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments. J. Pharm Exp. Therap.. VOL 96, 1949, s 99.
- (8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity, Water Res., 1969, vol. 3, 793 - 821.
- (9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3 - 32.
- (10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84
- (11) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

PŘÍLOHA 1

Upravená voda

Příklad vhodné zředovací vody (podle ISO 6341)

Všechny chemikálie musí být analytické čistoty

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.

Základní roztoky:

CaCl₂ · 2H₂O - dihydrát chloridu vápenatého. 11, 76 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

MgSO₄ · 7H₂O - heptahydrát síranu hořečnatého 4, 939

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

NaHCO₃ - hydrogenuhličitan sodný 2, 59 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

KCl - chlorid draselný 0, 23 g

Rozpustí se ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

Upravená zředovací voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř základních roztoků a doplní se vodou na 1 litr. Provzdušňuje se tak dlouho, až koncentrace rozpuštěného kyslíku odpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

Hodnota pH musí činit 7,5 ± 0,2.

Pokud je třeba, upraví se pH pomocí NaOH (hydroxidem sodným) nebo HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Tato zředovací voda se nechá 12 hodin stát bez dalšího provzdušňování.

Úhrn iontů Ca a Mg v tomto roztoku činí 2,5 mmol.l⁻¹. Poměr iontů Ca : Mg činí 4 : 1 a poměr iontů

Na : K činí 10 : 1. Celková alkalita tohoto roztoku činí 0,8 mmol.l⁻¹.

Odchylná příprava zředovací vody nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

PŘÍLOHA 2

Souhrn výsledků EEC kruhového testu prováděného v roce 1978 (2).

Upozornění: účelem tohoto kruhového testu bylo stanovení EC₅₀ 24 hod.

Použité látky :

- 1) Dichroman draselný
- 2) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová
- 3) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová, sodná sůl

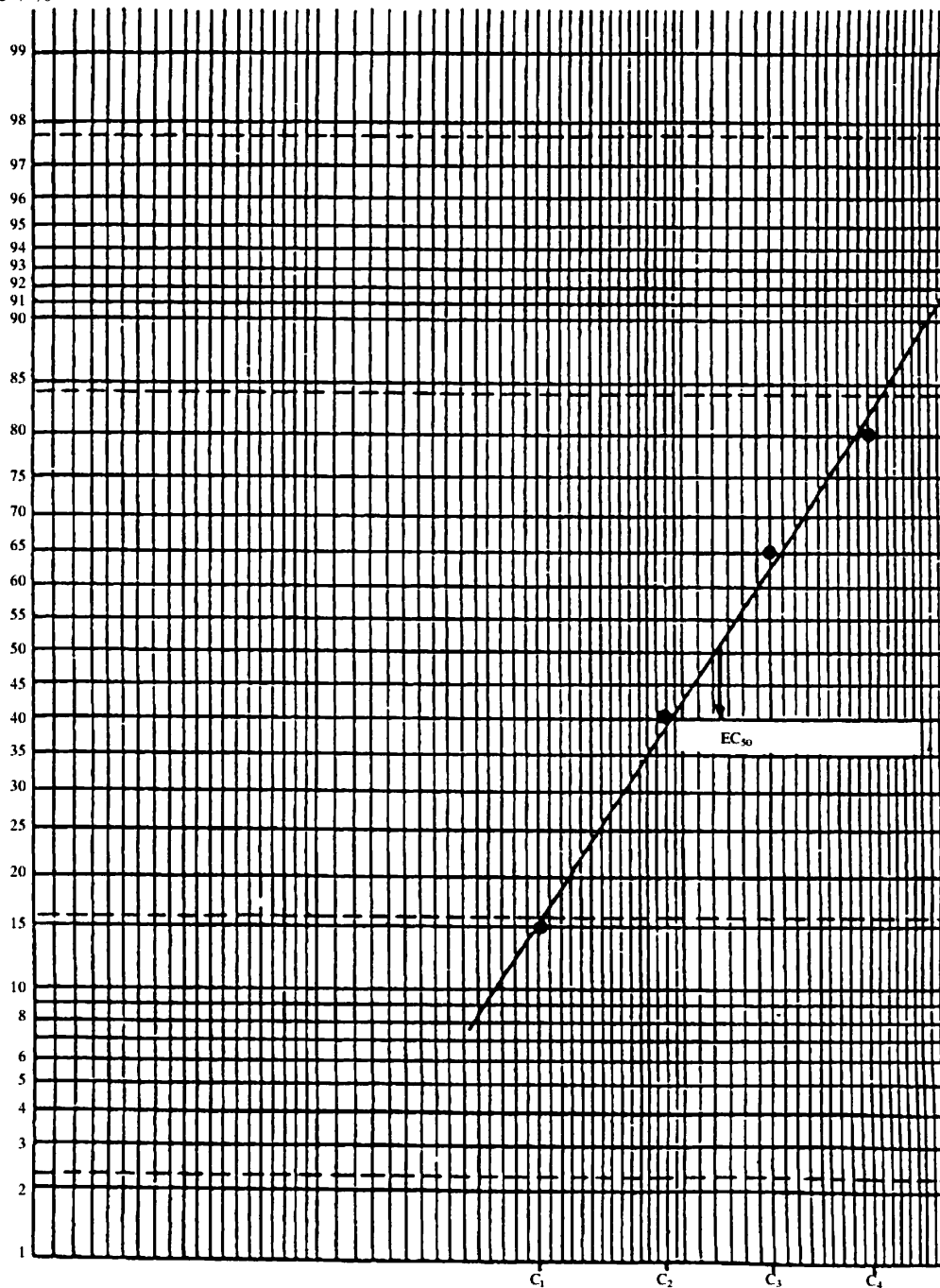
4) Kyselina trichloro-2, 4, 5 - fenoxyoctová, draselná sůl

Látka	Počet účastníků se laboratoří	Počet výsledků	EC ₅₀ 24 hod. mg.l ⁻¹
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

PŘÍLOHA 3

Příklad závislosti procenta imobilizace dafnií na koncentraci zkoušené látky
Příklad stanovení EC_{50} s použitím log-probitového papíru

Imobilizace v %



III ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU ŘAS

1 METODA

1.1 ÚVOD

Cílem zkoušky je určení vlivu látky na růst jednobuněčných zelených řas. Relativně krátkodobé pokusy (72 hodin) mohou být použity na zhodnocení účinků na několik generací řas. Tato metoda může být upravena pro použití na několika druzích řas, přičemž protokol o zkoušce musí obsahovat popis metodiky.

Metoda je vhodná zejména pro stabilní látky rozpustné za podmínek zkoušky ve vodě.

Metoda je použitelná pro látky, které přímo neinterferují s měřením růstu řas.

Pokud je to možné, je žádoucí mít ještě před začátkem testu informace o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, o chemické stabilitě, o disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti odbouratelnosti látky.

Jak při plánování zkoušky, tak při interpretaci výsledků by měly být brány v úvahu další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty látky, podstata a procento znečištění látky, přítomnost a množství aditiv, rozdělovací koeficient n-oktanol/voda).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Hustota buněk: počet buněk na 1 ml.

Růst: zvyšování hustoty buněk během doby trvání zkoušky.

Rychlost růstu: přírůstek hustoty buněk za jednotku času.

EC₅₀: koncentrace zkoušené látky, která inhibuje růst buněk nebo snižuje růstovou rychlost o 50 % ve srovnání s kontrolou.

NOEC (no observed effect concentration): je nejvyšší zkoumaná koncentrace, při které nedochází k žádnému statisticky zjiřitelnému snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látka může být použita jako prostředek na ověření faktů, že za laboratorních podmínek zkoušky se citlivost zkušebních organismů významně nezměnila.

Použití referenční látky je nutné uvést do protokolu o zkoušce. Jako referenční látka může být použit dichroman draselný, ale jeho barva může ovlivnit kvalitu a integritu světla dostupného buňkám a také spektrofotometrická měření. Dichroman draselný byl použit v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách (viz.(3) a příloha 2).

1.4 PRINCIP METODY

Za účelem prokázání, že EC₅₀ je vyšší než 100 mg.l⁻¹ je možné provést limitní zkoušku při této koncentraci.

Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou vystaveny účinku různých koncentrací zkoušené látky za definovaných podmínek.

Zkoušené roztoky se inkubují 72 hodin, během nichž se měří hustota buněk v každém roztoku přinejmenším každých 24 hodin. Je stanovována inhibice růstu ve vztahu ke kontrolní kultuře

1.5 KRITÉRIA KVALITY

Kritéria kvality se vztahují na limitní zkoušku i na úplnou zkoušku.

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

Koncentrace zkoušených látek by se měla udržet v rozmezí 80 % původní koncentrace po celou dobu trvání zkoušky.

U látek, které se lehce rozpouštějí ve zkušebním médiu a dávají stabilní roztoky (netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují či adsorbují), se počáteční koncentrace může pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. To, že se koncentrace udržela na určité úrovni po celou dobu zkoušky a že kritéria kvality byla dodržena, musí být dokladováno.

Pro látky, které jsou:

- (i) slabě rozpustné ve zkušebním médiu, nebo

- (ii) schopné vytvářet stabilní emulze nebo disperze, nebo
- (iii) nestabilní vodné roztoky,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená na začátku zkoušky. Koncentrace musí být stanovována po jejím ustálení.

Ve všech případech se musí provádět další měření koncentrace během zkoušky za účelem stanovení aktuální expoziční koncentrace a kontroly dodržení kritérií kvality.

Je známo, že podstatná část zkoušené látky se může během zkoušky zabudovat do biomasy řas. Proto by se za účelem prokázání dodržení kritérií kvality mělo brát v úvahu jak množství látky inkorporované do biomasy řas, tak látka v roztoku (nebo, když to není technicky možné změřit, ve vodním sloupci). Protože však stanovení koncentrace látky v biomase řas může představovat technické obtíže, dodržení kritérií kvality může být prokázáno změřením nejvyšší koncentrace látky ve zkušební nádobě bez řas a stanovením koncentrace v roztoku (nebo, jestliže to není technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku a na konci zkoušky.

1. 6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1. 6. 1 Reagencie

1. 6. 1. 1 *Roztoky zkoušených látek*

Základní roztoky požadované síly jsou připravovány rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo vodě podle odstavce 1. 6. 1. 2.

Zvolené koncentrace jsou připravovány přidáním odpovídajícího množství látky k předkulturám řas (viz příloha 1).

Látky by měly být zkoušeny až do hranice jejich rozpustnosti. Abychom si zajistili, že bude dosažena maximální rozpustná/stabilní koncentrace je možné u některých látek (např. s nízkou rozpustností ve vodě, nebo vysokým P_{ow} , nebo spíše tvořících stabilní disperze než pravé roztoky ve vodě) provést zkoušku při koncentraci vyšší než je hranice rozpustnosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícím oksylčení vody, atd).

Pro přípravu základních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě se mohou použít ultrazvuková dispergace, organická rozpouštědla či emulgační látky. Když jsou použity pomocné látky měly by všechny zkoušené vzorky a koncentrace, včetně kontrol obsahovat těchto látek stejné množství. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla přesáhnout 100 mg.l⁻¹ zkoušeného média.

Zkouška by se měla provádět bez korekcí pH. Dochází-li k výrazné změně pH, doporučuje se provést znovu zkoušku s korekcí pH a výsledky zaznamenat.

V těchto případech by měla být hodnota pH základního roztoku přizpůsobena pH rozpouštědla (vody), pokud neexistují specifické důvody tak neučinit. Přednost se dává použití HCl a NaOH. Přizpůsobení pH nesmí významně ovlivnit koncentraci zkoušené látky v základním roztoku. Vznik chemické reakce nebo fyzikální precipitace ve zkušebním médiu jako následek přizpůsobení pH se musí zaznamenat.

1. 6. 1. 2 *Zkušební médium*

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

Destilační aparát nesmí obsahovat měděné části.

Doporučováno je následující médium:

Připraví se čtyři zásobní roztoky dle následující tabulky. Tyto roztoky se sterilizují membránovou filtrací nebo autoklávováním 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.

Živiny	Koncentrace základních roztoků	Konečné koncentrace zkušebních roztoků
Zásobní roztok č.1: makroživiny		
NH ₄ Cl	1,5 g.l ⁻¹	15 mg.l ⁻¹
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,2 g.l ⁻¹	12 mg.l ⁻¹

CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,8 g.l ⁻¹	18 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g.l ⁻¹	15 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g.l ⁻¹	1,6 mg.l ⁻¹
Zásobní roztok č.2: Fe - EDTA		
FeCl ₃ · 6H ₂ O	80 mg.l ⁻¹	0,08 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg.l ⁻¹	0,1 mg.l ⁻¹
Zásobní roztok č.3: stopové prvky		
H ₃ BO ₃	185 mg.l ⁻¹	0,185 mg.l ⁻¹
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415 mg.l ⁻¹	0,415 mg.l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg.l ⁻¹	3 · 10 ⁻³ mg.l ⁻¹
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mg.l ⁻¹	1,5 · 10 ⁻³ mg.l ⁻¹
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 mg.l ⁻¹	1 · 10 ⁻⁵ mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7 mg.l ⁻¹	7 · 10 ⁻³ mg.l ⁻¹
Zásobní roztok č.4: NaHCO₃		
NaHCO ₃	50 g.l ⁻¹	50 mg.l ⁻¹

Po provzdušnění by mělo mít živné médium hodnotu pH přibližně 8.

1. 6. 2

Přístroje

- běžné laboratorní vybavení.
- kultivační baňky o vhodném objemu (např. Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml se 100 ml zkoušeného roztoku). Všechny používané baňky by měly být identické co se týče materiálu a rozměrů.
- kultivační zařízení: klimatizovaná místnost nebo box s teplotou 21 - 25 °C ± 2 °C a stálým osvětlením ve spektrálním rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm. Jestliže řasy v kontrolních kulturách dosáhnou doporučené rychlosti růstu, můžeme předpokládat, že podmínky pro jejich růst, včetně intenzity světla jsou odpovídající.
Při průměrných hladinách zkoušených roztoků se doporučuje použít světelnou intenzitu v rozmezí 60 - 120 μE.m⁻². s⁻¹ (35 - 70 · 10¹⁸ fotonů , m⁻² s⁻¹) při měření vhodným zařízením v rozsahu 400 - 700 nm. Při měření intenzity luxmetry je vyhovující oblast 6000 - 10 000 lx.
Této světelné intenzity ke dosáhnout umístěním čtyř až sedmi 30 W zářivek univerzálního bílého typu (barevná teplota přibližně 4 300 K) ve vzdálenosti 0,35 m od kultury řas.
- měření hustoty buněk by se mělo provádět přímým počítáním živých buněk, např. pomocí mikroskopu a počítacích komůrek. Za předpokladu dostatečné citlivosti a korelace s buněčnou hustotou mohou být použity i další postupy (fotometrie, turbidimetrie, ...).

1. 6. 3

Zkušební organismy

Předpokládá se, že použité druhy zelených řas jsou rychle rostoucí, vhodné pro kultivaci a zkoušení. Doporučovány jsou zejména následující druhy:

- *Selenastrum capricornutum*, např. ATCC 22662 nebo CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, např. 86, 81 SAG.

Poznámka:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A)

CCAP = Culture Centra of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)

Použití jiného druhu řas musí být uvedeno ve zprávě.

1. 6. 4

Postup zkoušky

Koncentrační rozmezí, ve kterém je účinky látek nejlépe zjišťovat, se určí orientační zkouškou.

Dva způsoby měření růstu (biomasa a rychlost růstu) mohou poskytovat zcela rozdílné míry inhibice růstu; v orientační vyhledávací zkoušce se použijí oba, aby mohlo být umožněno se ubezpečit, že geometrický růst koncentrace dovolí odhadnout jak E_bC₅₀ tak E_{T50}.

Počáteční hustota buněk

Doporučuje se, aby počáteční hustota buněk řasy *Selenastrum capricornutum* a řasy *Scenedesmus*

subspicatus ve zkušebních roztocích byla přibližně 10^4 buněk ml^{-1} . Použije-li se jiný druh řasy, měla by být počáteční hustota biomasy srovnatelná.

Koncentrace zkoušené látky

Do zkoušky se nasazuje nejméně pět různých koncentrací zkoušené látky v geometrické řadě s koeficientem nepřevyšujícím 2,2. Nejnižší použitá 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 když zastaví růst zcela.

Opakování a kontroly

Plán zkoušky musí zahrnovat tři opakování každé zkušební koncentrace, tři kontroly a je-li použita pomocná látka též tři kontroly s přidavkem této látky. Je-li pro to důvod, může být plán zkoušky upraven tak, že se použije více koncentračních úrovní a sníží se počet opakování zkoušky v každé nasazené koncentraci.

Provedení zkoušky

Zkušební roztoky o určité koncentraci zkoušené látky se připraví smícháním naředěného množství zásobního roztoku zkoušené látky s roztokem živin, inokula a vody (viz příloha).

Kultivační baňky se protřepají a umístí se do kultivačního zařízení. Řasové buňky se udržují v suspens třepáním, mícháním nebo probubláváním vzduchem, čímž se zlepšuje výměna plynů a zmenšují se změny pH zkušebních roztoků. Kultury se inkubují při teplotě 21 - 25 °C udržované s přesností ± 2 °C.

Hustota buněk se v každé baňce odečítá nejméně po 24, 48 a 72 h po zahájení zkoušky. Používá-li se k měření hustoty buněk jiné metody než je jejich přímé počítání použije se jako srovnávací vzorek filtrovaný řasový roztok obsahující příslušnou koncentraci zkoušené chemikálie.

pH se měří na začátku zkoušky a po 72 hodinách.

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

Zkoušení těkavých látek

V současné době neexistuje obecně přijatelný způsob zkoušení těkavých látek. Je-li známo, že má látka tendenci se snadno vypařovat, mohou být použity uzavřené kultivační nádoby se zvětšeným parním prostorem. Při stanovování objemu parního prostoru kultivačních baněk se musí zohlednit potřeba odvodu CO_2 ze zkoušeného roztoku. Byla navržena řada variant této metody (4).

Měla by být vyvinuta snaha o stanovení množství zkoušené látky, která v roztoku zůstala. V každém případě by měly být výsledky zkoušení těkavých látek v uzavřených systémech mimořádně opatrně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodice se může provádět limitní zkouška při 100 mg.l^{-1} za účelem prokázání skutečnosti, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Jestliže je povaha zkoušené látky taková že nelze ve vodě dosáhnout koncentrace 100 mg.l^{-1} , měla by být provedena limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stabilní dispersi) (viz také bod 1. 6. 1.1).

Limitní zkouška by měla být prováděna minimálně ve třech vzorcích se stejným počtem kontrol. Limitní zkouškou by měly být stanoveny obě měřítka růstu (biomasa a rychlost růstu).

V případě, že se limitní zkouškou prokáže pokles růstu biomasy nebo rychlosti růstu o 25 % a více ve srovnání s kontrolními vzorky, je nutné provést úplné zkoušení.

2

DATA A VYHODNOCENÍ

Naměřené hustoty buněk ve zkušební kultuře a v kontrolách jsou spolu s poslušnými koncentracemi a sledovanými parametry zapisovány do tabulek. Sestrojí se růstová křivka pro každou zkoušenou koncentraci a kontrolu v podobě grafu střední hustoty buněk v závislosti na čase.

Vztah mezi koncentrací účinkem je stanovován dvěma následujícími postupy.

Některé látky mohou při nízkých koncentracích simulovat růst. V úvahu by měla být brána jenom data indikující inhibici mezi 0 a 100 %.

2. 1

SROVNÁNÍ PLOCH POD RŮSTOVOU KŘIVKOU

Plocha mezi růstovou křivkou a vodorovnou čarou $N = N_0$ se vypočítá podle následující rovnice:

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

kde je

A - plocha

N_0 - počet buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$ v čase t_0 (na počátku zkoušky)

N_1 - změřená hustota buněk v čase t_1 ,

N_n - změřená hustota buněk 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

Inhibice růstu v % (I_a) pro každou koncentraci zkoušené látky se vypočítá podle rovnice:

$$I_a = \frac{A_c - A_t}{A_c} \cdot 100$$

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 semilogaritmicko-probitový papír proti jednotlivým koncentracím. Po vynesení bodů na papír se tyto spojí od oka nebo vypočtenou regresní přímkou.

Hodnota EC_{50} se odečítá na průsečíku regresní čáry a rovnoběžky s osou x v bodě $I_a = 50\%$. Abychom tuto hodnotu označili jednoznačně podle použité metody vyhodnocení doporučuje se použít symbol E_bC_{50} . Důležité je, že hodnota E_bC_{50} je spojena s označením příslušné expoziční doby tj. $E_bC_{50}(0-72h)$.

2. 2

SROVNÁNÍ RYCHLOSTI RŮSTU

Průměrná specifická rychlost růstu (μ) pro exponenciálně rostoucí kultury se vypočte jako:

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

kde t_0 je čas počátku zkoušky.

Procento inhibice specifické rychlosti růstu při každé koncentraci zkoušené látky ($I_{\mu t}$) se vypočte podle vzorce:

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

kde

μ_c = průměrná specifická rychlost růstu kontrol,

μ_t = průměrná specifická rychlost růstu při koncentraci t.

Snížený průměrný růst v % ve srovnání s kontrolní hodnotou, při všech koncentracích zkoušené látky se nanese proti logaritmu koncentrace. Z takto vzniklého grafického znázornění lze odečíst hodnoty EC_{50} . Pro přesné označení bodu EC_{50} zjištěného touto metodou se doporučuje použít symbol E_rC_{50} . Musí se uvést časy pozorování, tzn. hodnoty vztažené k dobách 0 - 72 h se označí symbolem $E_rC_{50}(0-72h)$:

Poznámka : Specifická rychlost růstu je logaritmický výraz, nepatrné změny rychlosti růstu mohou odpovídat velkým změnám biomasy- Hodnoty E_bC a E_rC jsou proto numericky nesrovnatelné.

2. 3

VÝPOČET NOEC

Hodnota NOEC se stanoví vhodnou statistickou metodou pro mnohočetné srovnávání vzorků (např. analýza variance a Dunnettův test) s využitím jednotlivých hodnot ploch oblasti pod růstovými

křivkami A (viz bod 2. 1) nebo specifických rychlosti růstu μ (viz bod 2.2).

3

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Ve zprávě je dobré uvést, pokud možno následující údaje:

- zkoušená látka: údaje o chemické identifikaci
- zkušební organismy: původ, laboratorní kultura, číslo kmene, metoda kultivace
- zkušební podmínky:
 - datum zahájení a ukončení zkoušky, doba zkoušení
 - teplota,
 - složení média,
 - kultivační zařízení,
 - hodnoty pH roztoku na počátku a na konci zkoušky (změní-li se hodnota pH o více než 1,5 jednotky, měly by se uvést důvody, proč k tomu došlo),
 - nosič a metoda rozpouštění zkoušené látky, koncentrace nosiče ve zkušebních roztocích,
 - intenzita a kvalita světla,
 - zkoumané koncentrace (měřené nebo nominální).
- výsledky:
 - koncentrace buněk v jednotlivých baňkách v každé době měření, metoda měření koncentrace buněk,
 - průměrné hodnoty koncentrace buněk,
 - růstové křivky,
 - grafické znázornění vztahu koncentrace - účinek,
 - hodnoty EC a metoda výpočtu,
 - NOEC,
 - další pozorované účinky.

4

LITERATURA

- (1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 201
- (2) Umweltbundesamt, Berlín, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, v: 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 and M. Vishi - Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123 - 1126.

PŘÍLOHA 1

Příklad postupu pro kultivaci řas

Obecně

Účelem kultivace dále popsaným postupem je získání řasových kultur pro zkoušky toxicity.

Metody použité k tomuto účelu musí zaručit, aby kultury řas nebyly infikovány bakteriemi (ISO 4833)

Za určitých okolností mohou být žádoucí i axenické kultury, avšak základem jsou jednodruhové kultury,

Aby nemohlo dojít ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami, provádějí se všechny pracovní kroky za sterilních podmínek.

Postupy při získání řasových kultur

Příprava živných roztoků (média)

Médium může být připraveno zředěním koncentrovaných základních roztoků živin.

K získání pevného média se přidává 0,8 % agaru. Použité médium by mělo být sterilní. Sterilizace autoklávem může vést ke ztrátě NH_3 .

Kmenová kultura

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se přenášejí pravidelně do čerstvého média. Slouží jako výchozí zkušební materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, vyočkovávají se na šikmý agar a pak se přenášejí nejméně jednou za dva měsíce do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmayerových baňkách obsahujících vhodné mediurn (přibližně objem 100 ml). Jsou-li řasy inkubovány 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 výchozí koncentrace činila u rychle rostoucího druhu řas asi 1/100 koncentrace kultury staré.

Rychlost růstu daného druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Z této růstové křivky lze 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 zkušebních kultur. Předkultura se inkubuje 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 vyhodit.

PŘÍLOHA 2

ISO 8692 - Kvalita vody - Růstová inhibiční zkouška na sladkovodních řasách *Scenedesmus subspicatus* uvádí výsledky mezilaboratorních zkoušek dichromanu draselného provedených 16 laboratořemi.

	Průměry (mg.l ⁻¹)	Rozsah (mg.l ⁻¹)
E _r C ₅₀ (0 - 72 hod)	0,84	0,60 - 1,03
E _b C ₅₀ (0 - 72 hod)	0,53	0,20 - 0,75

IV STANOVENÍ SNADNÉ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

I OBECNÉ ÚVAHY

I. 1 ÚVOD

Je popsáno šest zkušebních metod, které umožňují vyhledávací posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí.

- (A) úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC)
- (B) Modifikovaná vyhledávací zkouška OECD - úbytek DOC
- (C) Uvolňování oxidu uhličitého (CO₂) (modifikovaná Sturmova zkouška)
- (D) Manometrická respirometrie
- (E) Zkouška v uzavřených lahvičkách
- (F) Zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu - Japonsko)

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 orientační poznámky.

Mezilaboratorní srovnávací pokus OECD, provedený v roce 1988, ukázal, že uvedené metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru zkoušené látky však může být v daném případě nejvhodnější určitá konkrétní metoda.

I. 2 VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvýhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, o tenzi par a o adsorpční charakteristice dané chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO₂, DOC, TOC, CHSK (viz přílohy 1 a 2) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkoušené chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě činí alespoň 100 mg.l⁻¹, je možné zkoušet všemi metodami za předpokladu, že jsou netěkavé a neadsorbují se. Pro látky málo rozpustné ve vodě, těkavé nebo adsorbovatelné jsou vhodné metody uvedeny v tabulce 1. Způsob, kterým je třeba zacházet s látkami málo rozpustnými ve vodě a těkavými, je popsán v příloze 3. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) existuje dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro podchycení případné fyzikální ztráty.

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

Pro volbu vhodných koncentrací pro zkoušku mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro bakterie (příloha 4). Tyto informace mohou mít zásadní význam pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

Tabulka 1: Použitelnost zkušebních metod

Zkušební metoda	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		málo rozpustné	těkavé	adsorbující
IV - A	DOC	–	–	+ / –
IV - B	DOC	–	–	+ / –
IV - C	Respirometrie : vývin CO ₂	+	–	+
IV - D	Manometrická respirometrie : vývin CO ₂	+	+ / –	+
IV - E	Respirometrie : rozpuštěný kyslík	+ / –	+	+
IV - F	Respirometrie : spotřeba kyslíku	+	+ / –	+

I. 3 **REFERENČNÍ LÁTKY**

Pro ověření postupu se zkoušejí souběžně se studovanou látkou referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě predestilovaný), octan sodný a benzoan sodný. Tyto referenční chemické látky se uvedenými metodami všechny rozkládají i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Bylo navrženo hledat referenční chemickou látku, která by byla pohotově rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Byl navržen hydrogenftalát draselný. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou příjem kyslíku ovlivnit látky obsahující dusík v důsledku nitrifikace (viz přílohy 2 a 5).

I. 4 **PRINCIP ZKUŠEBNÍCH METOD**

Roztok nebo suspenze zkoušené látky v minerálním prostředí se naočkuje a inkubuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difúzním světle. Množství DOC připadající ve zkoušeném roztoku na inokulum je třeba udržovat ve srovnání s DOC připadajícím na zkoušenou látku co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě paralelní slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky. Přitom endogenní aktivita buněk v přítomnosti zkoušené látky neodpovídá přesné aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se provádí souběžně zkouška s referenční látkou.

Obecně řečeno po rozkladu následuje stanovení parametrů jako DOC, tvorba CO₂ a příjem kyslíku. Měření se provádí v dostatečně častých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se měří doplňkově k jinému parametru DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konce zkoušky. Je rovněž možné použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziprojektu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška normálně trvá 28 dní. Měření je však možné ukončit před uplynutím 28 dní, tj. jakmile křivka biologického rozkladu dosáhla na základě nejméně tří stanovení fáze vodorovného průběhu. Měření je také možné prodloužit i po 28 dnech, vyplývá-li z křivky, že biologický rozklad začal, avšak že v 28. den nebylo ještě dosaženo vodorovné části křivky.

I. 5 **KRITÉRIA KVALITY**

I. 5. 1 **Reprodukovatelnost**

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populace bakterií používaných jako inokula je nutné provádět stanovení nejméně dvojmo.

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

I. 5. 2 **Platnost zkoušky**

Zkouška se považuje za platnou, je-li rozdíl krajních hodnot výsledků replikovaných měření rozkladu zkoušené látky na vodorovné části křivky, buď na konci zkoušky nebo na konci 100-denního okénka, podle toho, která z těchto eventualit přichází v úvahu, menší než 20 %, a dosáhl-li procentuální stupeň rozkladu referenční látky úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Nemí-li splněna kterákoli z těchto podmínek, je nutné měření opakovat. Vzhledem k náročnosti metod neznamenají nízké hodnoty nutně, že studovaná látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale ukazují, že k zajištění biologického rozkladu je třeba více práce.

Jestliže ve zkoušce toxicity, zahrnující jak studovanou látku, tak referenční chemickou látku, došlo během 14 dnů k méně než 35 % rozkladu (na bázi DOC) nebo k méně než 25 % rozkladu (na bázi TSK nebo TCO₂), je možné zkoušené chemické látky považovat za inhibující (viz také přílohu 4. Sérii měření je třeba opakovat, pokud možno s nižší koncentrací studované chemické látky a (nebo) vyšší

koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg tuhých látek v litru.

I. 6 VŠEOBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVY

Obecné podmínky pro zkoušky jsou přehledně uvedeny v tabulce 2. Aparatury a další experimentální podmínky, specifické pro jednotlivé metody, jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.

I. 6.1 Zřed'ovací voda

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda, prostá inhibujících koncentrací toxických látek (např. Iontů Cu^{-}). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku, vneseného zkoušenou látkou. Aby se vyloučily vysoké hodnoty ve slepých pokusech je nutná vysoká čistota vody pro zkoušky. Ke kontaminaci může dojít přítomnými nečistotami ze studované látky a z iontoměnných pryskyřic a rozkladnými látkami z bakterií a řas. Pro každou sérii měření je třeba používat pouze jednu šarži vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených láhvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

Tabulka 2: Experimentální podmínky v jednotlivých zkouškách

Zkouška	Úbytek DOC	Uvolňování CO_2	Manometrická respirometrie	Modifikovaná vyhledávací OECD zkouška	Uzavřené lahvičky	Zkouška MITI (I)
	C 4. - A	C 4. - C	C 4. - D	C 4. - B	C 4. - E	C 4. F
Koncentrace zkoušené látky mg.l^{-1} mg DOC. l^{-1} mg ThOD. l^{-1} Koncentrace inokula (buňky. l^{-1})	10 - 40	10 - 20 $\leq 30 \text{ mg.l}^{-1}$ SL nebo $\leq 100 \text{ ml}$ výtoku. l^{-1} (10 - 10^8)	100 50 - 100	10 - 40 $\leq 0,5 \text{ ml}$ sekund. výtoku. l^{-1} (10^5)	2 - 10 5 - 10 $\leq 0,5 \text{ ml}$ výtoku. l^{-1} (10^4 - 10^6)	100 30 mg.l^{-1} SL (10- 10^8)
Koncentrace prvku v minerálním mediu (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 \pm 0,2					nejlépe 7,0
teplota	22 \pm 2 °C					25 \pm 1 °C
DOC = rozpuštěný organický kyslík ThOC = teoretická spotřeba kyslíku SL = suspendované látky						

I. 6.2 Zásobní roztoky minerálních složek

Pro přípravu zkušebních roztoků se připravují zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zřed'ovacích faktorech) pro metody úbytku DOC, pro modifikovanou vyhledávací metodu OECD, pro metodu uvolňování CO_2 , pro manometrickou respirometrii a pro uzavřené lahvičky.

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

Zásobní roztoky:

Zásobní roztoky se připravují s použitím činidel analytické čistoty.

(a)	dihydrogenorthofosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	monohydrogenorthofosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	dihydrátmonohydrogenorthofosforečnan disodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
	chlorid amonný, NH_4Cl	0,50 g

Rozpusť se ve vodě a doplň na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4

(b)	chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2	27,50 g
	nebo dihydrát chloridu vápenatého, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g

Rozpusť se ve vodě a doplň na 1 litr.

(c)	heptahydrát síranu hořečnatého, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
-------	---	---------

Rozpusť se ve vodě a doplň na 1 litr.

(d)	hexahydrát chloridu železitého, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
-------	---	--------

Rozpusť se ve vodě a doplň 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.

I. 6. 3 **Zásobní roztoky chemických látek**

Pokud je rozpustnost vyšší než 1 g.l^{-1} , rozpustí se například 1 - 10 g (podle potřeby) zkoušené nebo referenční látky v deionizované vodě a doplň se na 1 litr. Jinak se připravují zásobní roztoky v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud se týká práce s méně rozpustnými chemickými látkami, viz přílohu 3. Ve zkoušce MITI (metoda IV-F) nelze používat ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

I. 6. 4 **Inokula**

Inokulum je možné získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z poruchových vod a půd, nebo jako jejich směsi. Používá-li se aktivovaný kal ve zkoušce úbytku DOC, uvolňování CO_2 a manometrické respirometrie, je třeba jej odebírat z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované vyhledávací zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je třeba zředěnější inokulum bez vloček kalu. 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 kapitole o této zkoušce.

I. 6. 4. 1 *Inokulum z aktivovaných kalů*

Je třeba odebrat čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Je-li třeba, odstraní se hrubé částice filtrací jemným sítem a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Alternativním způsobem je odsazení nebo zcentrifugování (např. při 1 100 g po dobu 10 min.) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se slije. Kal je možno promýt minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3 - 5 g suspendovaných tuhých látek na litr a provzdušňuje se až do použití.

Kal je třeba odebrat z dobře pracující konvenční čistírny. Je-li nutné kal odebrat z čistírny s vysokým prosazením nebo předpokládá-li se, že obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Znovu suspendovaný kal se po důkladném promíchání nechá usadit nebo se zcentrifuguje, voda nad usazeninou se slije a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, až se kal považuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po dokonalém suspendování nebo z neupraveného kalu se odebere těsně před použitím vzorek pro stanovení sušiny suspendovaných tuhých látek.

Další alternativou je homogenizace aktivovaného kalu (3 - 5 g suspendovaných látek v litru). Kal se

zpracuje v mechanickém míšiči po dobu 2 min. při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá usadit po dobu 30 min nebo v případě potřeby déle a kapalina se slije pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml.l⁻¹ minerálního média.

I. 6. 4. 2. *Jiné zdroje inokula*

Inokulum je možné získat z výstupu druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky, pracujících převážně s domovními odpadními vodami. Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se po dobu 1 hodiny usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a slitá kapalina nebo filtrát se udržuje v aerobních podmínkách až do použití. Tohoto typu inokula je možné použít až 100 ml na 1 litr média.

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

I. 6. 5 **Předběžné kondicionování inokula**

Inokula je možné předběžně kondicionovat na experimentální podmínky, ale ne předběžně adaptovat na zkoušenou látku. Předběžná kondicionace spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5 - 7 dní při teplotě zkoušky. Předběžné kondicionování někdy zlepšuje přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předběžně kondicionovat inokulum MITI se nepovažuje za nutné.

I. 6. 6 **Abiotické kontrolní zkoušky**

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkoušené látky stanovením úbytku DOC, příjmu kyslíku nebo tvorby oxidu uhličitého ve sterilních kontrolních pokusech bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací membránou (0,2 - 0,45 μm) nebo přidáním vhodné toxické látky v příslušné koncentraci. Používá-li se membránové filtrace, odebírají se vzorky asepticky za účelem zachování sterility. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkoušené látky, musí zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotický kontrolní pokus, který byl naočkován a intoxikován.

I. 6. 7 **Počet nasazených baněk**

Počet použitých nádob (nasazených pokusů) v typické zkoušce je uveden v kapitolách pro jednotlivé zkoušky.

Lze používat tyto typy nasazených nádob:

Zkoušená suspenze : obsahuje zkoušenou látku a inokulum

Slepá zkouška s inokulem : obsahuje pouze inokulum

Kontrola postupu : obsahuje referenční látku a inokulum

Abiotická sterilní kontrola : sterilní, obsahuje zkoušenou látku (viz 1.6.6)

Kontrola pro adsorpci: obsahuje zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo. Kontrola toxicity : obsahuje zkoušenou látku, referenční látku a inokulum

Stanovení ve zkoušené suspenzi a slepý pokus s inokulem se musí povinně provádět souběžně. Stanovení v ostatních nádobách se doporučuje provádět rovněž souběžně.

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

I. 7 **VÝSLEDKY A JEJICH VYHODNOCENÍ**

Při výpočtu D_t, procentního úbytku, se používají střední hodnoty z dvojích měření daného parametru v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu pro inokulum. Příslušné vzorce jsou uvedeny dále v kapitolách pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a označí se 10-denní okénko. Vypočte a uveďte se procentní úbytek dosažený na konci 10-denního okénka a hodnota pro vodorovnou část křivky nebo na konci zkoušky podle toho, která z nich je vhodnější.

V respirometrických zkouškách mohou látky obsahující dusík ovlivnit příjem kyslíku v důsledku nitrifikace (viz příloha 2 a 5).

I. 7. 1 Rozklad zjišťovaný na základě stanovení DOC

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz 1.5.2) se musí v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat oddělené pro každou nádobu obsahující zkoušenou látku, pomocí středních hodnot dvojic měření DOC, procentní rozklad, D_t . Vypočte se podle rovnice

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

kde

D_t = procento rozkladu v čase t ,

C_0 = střední počáteční koncentrace DOC v naočkovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku (mg DOC.l⁻¹),

C_t = střední koncentrace DOC v naočkovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku v čase t (mg DOC.l⁻¹),

C_{b0} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém naočkovaném minerálním médiu (mg DOC.l⁻¹).

C_{bt} = střední koncentrace DOC ve slepém naočkovaném minerálním médiu v čase t (mg DOC.l⁻¹)

Všechny koncentrace se zjišťují experimentálně.

I.7.2 Rozklad měřený pomocí specifické analýzy

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

$$D_t = \frac{(S_b - S_a)}{S_b} \cdot 100$$

kde

D_t = procento rozkladu v čase t , obvykle 28 dní

S_a = zbylé množství zkoušené látky v médiu s inokulem na konce pokusu (mg),

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

I. 7. 3 Abiotický rozklad

Používá-li se abiotická sterilní kontrolní zkouška, vypočte se procentní abiotický rozklad podle rovnice:

$$\% \text{ abiotického rozkladu} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \cdot 100$$

kde:

$C_{s(0)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrolní zkoušce v den 0

$C_{s(t)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrolní zkoušce v den t

I. 8 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má obsahovat, je-li to možné, tyto údaje:

- zkoušená a referenční chemická látka, jejich čistota;
- podmínky při zkoušce;
- inokulum: charakter a místo (místa) odběru, koncentrace a předběžná kondicionace;
- podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy;
- doba trvání zkoušky a teplota;
- v případě málo rozpustných zkoušených látek použitý způsob zacházení;
- použitá metoda zkoušení; je třeba uvést vědecké důvody a vysvětlení pro každou změnu postupu;
- přehled dat;
- veškeré pozorované projevy inhibice;
- jakýkoliv pozorovaný abiotický rozklad;
- analytické údaje o meziproduktech, pokud existují;
- graf procentního rozkladu v závislosti na čase pro zkoušenou a referenční látku, je třeba zřetelně označit fázi zdržení, fázi rozkladu, 10-denní okénko a směrnici (příloha 1). Byla-li při zkoušce splněna kritéria kvality, je možné pro graf použít střední hodnotu procentního rozkladu v baňkách

- obsahujících zkoušenou látku;
- procentní rozklad po 10-denním okénku, na vodorovné části křivky a na konci zkoušky.

IV. A ZKOUŠKA ÚBYTKU DOC

II. 1 PRINCIP METODY

Změřený objem naočkovaného minerálního média, obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10 - 40 mg DOC.l⁻¹) jako jmenovitý jediný zdroj organického uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difúzním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje v časech intervalech během 28-denního období analýzou DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočítá tak, že se koncentrace rozloženého DOC (opravená na koncentraci v kontrolní zkoušce s inokulem) vyjádří jako procento koncentrace přítomné na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu je rovněž možné vypočítat z doplňkové chemické analýzy, provedené na začátku a na konci inkubace.

II. 2 POPIS METODY

II. 2. 1 Aparatura

- (a) Erlenmeyerovy baňky, např. od 250 ml do 2 l, podle objemu potřebného pro analýzu DOC.
- (b) 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.
- (c) Filtrační aparatura s vhodnými membránami.
- (d) Analyzátor DOC.
- (e) Přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku.
- (f) Odstředivka.

II. 2. 2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků viz I. 6. 2.

Smísí se 10 ml roztoku (a) s 800 ml zředovací vody, přidá se 1 ml roztoků (b) až (d) a doplní se na 1 l zředovací vodou.

II. 2. 3 Příprava a předběžná kondicionace inokula

Inokulum je možné získat z řady zdrojů: aktivovaný kal; splaškové odpadní vody; povrchové vody; půda nebo směs z uvedených typů.

Viz I. 6. 4, I. 6. 4. 1, I. 6. 4. 2 a I. 6. 5.

II. 2. 4 Příprava baněk

Je například možné naplnit podíly po 800 ml minerálního média do 21 Erlenmeyerových baněk a do jednotlivých baněk přidat dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10 - 40 mg DOC.l⁻¹. Zkontrolují se hodnoty pH a případně se upraví na 7,4. Baňky se naočkují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I. 6. 4), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30,mg suspendovaných tuhých látek na litr. Připraví se rovněž kontrolní zkoušky s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky. V případě potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního efektu zkoušené látky naočkováním roztoku, který v minerálním médiu obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené tak referenční látky.

Je-li třeba, použije se rovněž další, sterilní, baňka s roztokem dané chemické látky bez inokula (viz I. 6, 6) ke kontrole zda je zkoušená chemická látka rozkládána abioticky.

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

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1l a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz příloha 2, odst. 4). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla možná volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Pak se nádoby umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

- II. 2. 5 **Počet baněk v typické zkoušce**
 Baňka 1 a 2: Zkoušená suspenze
 Baňka 3 a 4: Slepý pokus s inokulem
 Baňka 5: Kontrola postupu
 Pokud možno a je-li třeba:
 Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola
 Baňka 7: Kontrola adsorpce
 Baňka 8: Kontrola toxicity
 Viz také bod I. 6. 7.

- II. 2. 6 **Provedení zkoušky**
 Během zkoušky se ve známých časových intervalech stanoví dvojmo koncentrace DOC v každé balice, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10-denního okénka a procentní úbytek na konci 10-denního okénka. Pro každé stanovení je třeba odebírat pouze minimální nutné množství zkoušené suspenze.
 Před odběrem vzorků se případně nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství zředovací vody (I. 6. 1). Před odběrem vzorků je třeba kultivační médium dobře promíchat a zajistit, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspenze. Ihned po odběru je třeba vzorky zfiltrovat přes membránu nebo zcentrifugovat (viz přílohu 2. 4). Zfiltrované resp. zcentrifugované vzorky je třeba analyzovat týž den, jinak je možné je přechovávat nejdéle 48 hodin při 2 - 4 °C nebo po delší dobu při teplotě nižší než - 18 °C.

II. 3 VÝSLEDKY A ZPRÁVA

- II.3. 1 **Zpracování výsledků**
 Procentní rozklad v čase t se vypočte, jak je uvedeno v bodě I. 7. 1. (stanovení DOC) nebo případně v bodě I. 7. 2 (specifická analýza)
 Všechny výsledky se uvedou na položených přehledech dat.

- II. 3. 2 **Platnost výsledků**
 Viz bod I. 5. 2.

- II. 3. 3 **Protokol o zkoušce**
 Viz bod I. 8.

- II. 4 **PŘEHLED DAT**
 Příklad přehledu výsledků může být následující:

ZKOUŠKA ÚBYTKU DOC

- LABORATOŘ
- DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY
- ZKOUŠENÁ LÁTKA
 Název:
 Koncentrace zásobního roztoku: mg.l^{-1} jako chemická látka
 Počáteční koncentrace v médiu, t_0 : mg.l^{-1} jako chemická látka
- INOKULUM
 Zdroj:
 Provedená úprava: Předběžná kondicionace, pokud byla provedena:
 Koncentrace suspendovaných tuhých látek v reakční směsi: mg.l^{-1}
- STANOVENÍ UHLÍKU

Zkoušená látka	Baňka č.	DOC po n dnech (mg.l^{-1})					
		a_1	0	n_1	n_2	n_3	n_x
	1	a_2					

a inokulum		a, průměr $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, průměr $C_{b(t)}$					
Čisté inokulum bez zkoušené látky	3	c_1					
		c_2					
		c, průměr $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, průměr $C_{d(t)}$					
$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$							

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH ÚDAJŮ

Baňka č.		DOC po n dnech ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \cdot 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \cdot 100$	0				
Průměr*	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

* D_1 a D_2 nesmí být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Doba (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zbývající množství zkoušené chemikálie na konci zkoušky ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	% primárního rozkladu
Sterilní kontrola	S_b	
Neočkované zkušební médium	S_a	$((S_b - S_a) / S_b) \cdot 100$

IV. B MODIFIKOVANÁ VYHLEDÁVACÍ ZKOUŠKA OECD

III. 1 PRINCIP METODY

Změřený objem minerálního média, obsahujícího známou koncentraci zkoušené Jaty (10 - 40 mg DOC.l⁻¹) jako výhradně jediného zdroje organického uhlíku se naočkuje 0,5 ml přečištěné odpadní vody na 1 litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difúzním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje analýzou DOC v častých intervalech během 28-denního období. Stupeň biologického rozkladu se vypočítá tak, že se koncentrace odstraněného DOC (korigovaná na koncentraci ve slepém pokusu s inokulem) vyjádří jako procento koncentrace přítomné na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu je rovněž možné vypočítat z doplňkové chemické analýzy, provedené na začátku a na konci inkubace.

III. 2 POPIS METODY

III. 2. 1 Aparatura

- Erlenmeyerovy baňky, např. od 250 ml do 2l, 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.

III.2. 2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků viz I. 6. 2.

Smísí se 10 ml roztoku (a) s 80 ml zředovací vody, přidá se 1 ml roztoků (b) až (d) a doplní na 1 l zředovací vodou.

Tato metoda používá jako inokulum pouze 0,5 ml přečištěné odpadní vody a proto je nutné médium dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na 1 litr výsledného média:

Roztok stopových prvků:

Tetrahydrát síranu manganatého, MnSO ₄ · 4H ₂ O	39,9 mg
Kyselina boritá, H ₃ BO ₃	57,2 mg
Heptahydrát síranu zinečnatého, ZnSO ₄ · 7H ₂ O	42,8 mg
Chelát Fe (FeCl ₃ s ethylendiamintetraoctovou kyselinou)	100,0 mg

Rozpustí se ve zředovací vodě a doplní se na 1000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt	15,7 mg
-------------------	---------

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

III. 2. 3 Příprava a předběžná kondicionace 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.

III. 2. 4 Příprava baněk

Je například možné naplnit podíly po 800 ml minerálního média do 2l Erlenmeyerových baněk a do jednotlivých baněk přidat dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10 - 40 mg DOC.l⁻¹). Zkontrolují se hodnoty pH a případně se upraví na 7,4. Baňky se naočkují výtokem z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I. 6. 4. 2). Připraví se rovněž kontrolní pokusy s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

V případě potřeby se použije jedna baňka ke kontrole možného inhibičního efektu zkoušené látky naočkováním roztoku, který v minerálním médiu obsahuje srovnatelné koncentrace jak zkoušené, tak referenční látky.

Je-li třeba, použije se rovněž další, sterilní, baňka ke kontrole, zda je zkoušená chemická látka rozkládána abioticky, pomocí roztoku dané chemické látky bez inokula (viz I. 6. 6).

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

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 11 a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz příloha 2. 4) Ústi baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla možná volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Pak se nádoby umístí do třepačky, čímž se zahájí zkouška

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

Baňka 1 a 2: Zkoušená suspenze

Baňka 3 a 4: Slepý pokus s inokulem

Baňka 5: Kontrola postupu

Pokud možno a je-li třeba:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I. 6.7

III. 2.6 **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech stanoví dvojmo koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možno určit začátek 10-denního okénka a procentní úbytek na konce 10-denního okénka. Pro každé stanovení je třeba odebírat pouze minimální nutné množství zkoušené suspenze.

Před odběrem vzorků se případně nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství zředovací vody (I. 6. 1). Před odběrem vzorků je třeba kultivační médium dobře promíchat a zajistit, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspenze. Ihned po odběru je třeba vzorky zfiltrovat přes membránu nebo zcentrifugovat (viz přílohu 2. 4). Zfiltrované resp. zcentrifugované vzorky je třeba analyzovat týž den, jinak je možné je přechovávat nejdéle 48 hodin při 2 - 4 °C nebo po delší dobu při teplotě nižší než - 18 °C.

III. 3 **DATA A PROTOKOL**

III. 3.1 **Zpracování výsledků**

Procentní rozklad v čase t se vypočte, jak je uvedeno v bodě I. 7. 1. (stanovení DOC) nebo případně v bodě I. 7. 2. (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na přiložených přehledech dat.

III. 3.2 **Platnost výsledků**

Viz bod I. 5. 2,

III. 3.3 **Protokol**

Viz bod 1. 8.

III. 4 **PŘEHLED ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ**

Příklad přehledu výsledků:

MODIFIKOVANÁ VYHLEDÁVACÍ ZKOUŠKA OECD

1. LABORATOŘ
2. DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY

3. ZKOUŠENÁ LÁTKA

Název:

Koncentrace zásobního rodu: mg.l⁻¹ jako chemická látka

Počáteční koncentrace v médiu, t₀: mg.l⁻¹ jako chemická látka

4. INOKULUM

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná kondicionace, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných tuhých látek v reakční směsi: mg.l⁻¹

5. STANOVENÍ UHLÍKU

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg.l ⁻¹)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Zkoušená látka a inokulum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, průměr C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, průměr C _{b(t)}					
Čisté inokulum bez zkoušené látky	3	c ₁					
		c ₂					
		c, průměr C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, průměr C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH ÚDAJŮ

Baňka č		DOC po n dnech (mg.l ⁻¹)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \cdot 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \cdot 100$	0				
Průměr*	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

* D₁ a D₂ nesmí být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: obdobný vzor může být použit i pro referenční látku a pro kontrolu toxicity.

7 ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Doba (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	C _{s(0)}	C _{s(t)}

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zbývající množství	% primárního rozkladu
--	--------------------	-----------------------

	zkoušené chemikálie na konci zkoušky (mg.l ⁻¹)	
Sterilní kontrola	S _b	
Neočkované zkušební médium	S _a	$((S_b - S_a) / S_b) \cdot 100$

IV. C ZKOUŠKA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

IV. 1 PRINCIP METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média se známou koncentrací zkoušené látky (10 - 20 mg.l⁻¹), která je jediným zdrojem uhlíku je provzdušňován ve tmě nebo v difusním světle řízeným proudem vzduchu prostého CO₂. Rozklad je sledován po dobu 28 dnů podle množství prokukovaného CO₂ jímaného v roztoku hydroxidu sodného nebo barnatého, kde je titračně stanoven jako anorganický uhlík. Množství uvolněného CO₂, po korekci na slepý pokus, je vyjadřováno jako % TCO₂. Stípeň biologického rozkladu může být také stanoven podle DOC stanoveného na začátku a na konce pokusu.

IV. 2 POPIS METODY

IV. 2. 1 Aparatura

- baňky 2 - 5 l vybavené vzduchovací trubicí, která dosahuje až ke dnu nádoby, a vypustí;
- magnetická míchačka pro zkoušení špatně rozpustných látek;
- absorpční nádoby;
- zařízení pro řízení a měření množství vzduchu;
- zařízení pro praní vzduchu, pro přípravu CO₂ prostého vzduchu, případně alternativně směšovací zařízení na směs CO₂ prostého kyslíku a CO₂ prostého dusíku z lahví. Má se používat správný poměr 20 % kyslíku a 80 % dusíku;
- zařízení na stanovení CO₂ buď titračně nebo pomocí analyzátorů anorganického uhlíku;
- zařízení pro membránovou filtraci (nepovinně);
- analyzátor DOC (nepovinně)

IV. 2. 2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I. 6. 2.

Roztok (a) v množství 10 ml se smíchá s 800 ml zřed'ovací vody, přidá se 1 ml roztoků (b) až (d) a doplní do 1 l zřed'ovací vodou.

IV. 2. 3 Příprava a předúprava inokula

Inokulum má pocházet z různých zdrojů: aktivovaný kal, odtok z městské čistírny, povrchová voda, půdy či směs z uvedených.

Viz. část 1. 6. 4, I. 6. 4. 1, I. 6. 4. 2 a I. 6. 5.

IV. 2. 4 Příprava baněk

Jako příklad je uváděno uspořádání pro 5 l baňky s obsahem 3 l suspenze.

V případě použití jiných objemů se hodnoty úměrně upraví tak, aby se zapsalo přesné měření vytvořeného CO₂.

Do každé 5 l baňky se vnese 2400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I. 6. 4. 1 a I. 6. 5) tak, aby koncentrace aktivovaného kalu byla 30 mg.l⁻¹ v konečném objemu 3 l inokulované směs. Alternativně lze zředit kal tak, aby se získala suspenze 500 - 1000 mg.l⁻¹ v minerálním médiu a to ještě před přidávkem alikvotní části do 5 l baňky k dosažení koncentrace 30 mg.l⁻¹. Tento postup zajišťuje větší přesnost. Mohou být použita i jiná inokula (viz 1. 6. 4. 2).

Inokulovaná směs se přes noc probublává vzduchem prostým CO₂ k odstranění absorbovaného CO₂.

Přidá se známý objem zásobního roztoku zkoušené látky a referenční látky, čímž se vytvoří dvojice baněk se živnou koncentrací ze zkoušené a referenční látky v rozmezí 10 až 20 mg.l⁻¹ DOC nebo TOC. Některé lahve se nasazují jako kontrola a to bez chemikálií. Špatně rozpustné látky se přidávají přímo do baněk na hmotnostní nebo objemové bázi nebo se postupuje podle přílohy 3.

Jestliže je to požadováno, použije se 1 sterilní baňka bez inokula ke zjištění abiotického rozkladu (viz I. 6. 6). Sterilizace se provádí pomocí vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 l přidávkem minerálního média prostého CO₂ Mohou se odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz příloha 2) a/nebo specifickou analýzu. Pak se připojí absorpční nádoby.

V případě použití hydroxidu barnatého se spojují 3 nádoby, každá s obsahem 100 ml 0,0125 mol.l⁻¹. Ba(OH)₂ v sérii pro každou 5 l baňku. Roztok musí být prostý sraženiny síranu a uhličitanu barnatého a bezprostředně před použitím musí být stanovena jeho koncentrace. V případě použití hydroxidu sodného spojují se 2 jednotky, z nichž druhá slouží jako kontrola, že všechny CO₂ byl absorbován v první nádobce. Jako uzávěry absorpčních nádobek jsou vhodné sérové uzávěry. Do každé nádoby se přidá po 200 ml 0,05 mol NaOH, což je dostatečné k absorpci veškerého CO₂, který se uvolní při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitanů, což se koriguje odečtením slepého pokusu.

IV. 2. 5 **Počet baněk v typickém pokusu**

Baňka č. 1 a 2: Zkoušená suspenze

Baňka č. 3 a 4: Slepý pokus inokula

Baňka č. 5: Kontrola postupu

a dále s výhodou a když je to potřebné:

Baňka č. 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka č. 7: Kontrola toxicity

Viz. také část I. 6. 7.

IV. 2. 6 **Provedení zkoušky**

Zkouška se zahajuje probubláváním suspenze vzduchem prostým CO₂ rychlostí 30 - 100 ml.min⁻¹. Pravidelně se odebírají a analyzují vzorky absorbátu CO₂. Doporučuje se, aby v průběhu prvních 10 dnů byly analýzy prováděny každý druhý až třetí den a dále každý pátý den až do 28. dne, což umožňuje určení periody 10 denního okna.

Na konci pokusu, 28. den, může být odebrán vzorek na stanovení DOC a/nebo na specifickou analýzu, změří se pH suspenze a pak se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl. Provzdušňuje se přes noc k odstranění v suspenzi přítomného CO₂. Poslední analýza CO₂ se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se měří CO₂ se odpojuje ten absorbér, který je nejbližší baňce a roztok hydroxidu se titruje 0,05 mol HCl na fenolftalein. Zbývající absorbér se posune o jedno místo blíže k láhvi a nový absorbér se 100 ml čerstvě připraveného 0,0125 mol.l⁻¹ hydroxidu barnatého se zapojí na místě posunutého, na konec série. Potřebné titrace se provádí tehdy, je-li pozorována sraženina v prvním absorbéru a před tím než je pozorovatelná ve druhém, nebo nejméně jednou týdně.

Alternativně, v případě použití NaOH jako absorbentu, se pomocí injekční stříkačky odebere z absorbéru, který je nejbližší baňce malý vzorek, který se nastříkne přímo do analyzátoru uhlíku.

Druhý absorbér se analyzuje pouze na konci zkoušky, aby se tak mohl korigovat únik CO₂.

IV. 3 **VÝSLEDKY A ZPRÁVA**

IV. 3. 1 **Zpracování výsledků**

Množství CO₂ zachyceného v absorbéru je při titraci dáno:

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

kde

V = spotřeba HCl pro titraci 100 ml v absorbéru

C_B - koncentrace roztoku Ba(OH)₂ v mol.l⁻¹

C_A = koncentrace HCl v mol.l⁻¹

V případě, že C_B je 0,0125 mol a C_A 0,05 mol je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku Ba(OH)₂ 50 ml a hmotnost CO₂ je dána

$$\frac{0,05}{2} \cdot 44 \cdot \text{mlHCl} = 1,1 \cdot \text{mlHCl}$$

Tedy, v tomto případě se hmotnost produkovaného CO₂ získá násobením spotřeby HCl faktorem 1,1. Vypočítá se hmotnost CO₂ vyprodukovaného samotným inokulem, inokulem se zkoušenou látkou s použitím příslušných výsledků titrace. Jejich rozdíl je hmotnost CO₂, který byl vyprodukován samotnou zkoušenou látkou.

Např. když samotné inokulum poskytuje titraci 48 ml a inokulum se zkoušenou látkou 45 ml,

CO₂ z inokula = 1,1 (50 - 48) - 2,2 mg

CO₂ z inokula a zkoušené látky = 1,1. (50 - 45) = 5,5 mg

a z toho hmotnost CO₂ vyprodukovaná zkoušenou látkou je 3,3 mg.

Procentní biologická rozložitelnost se vypočítá z:

$$\% \text{ rozkladu} = (\text{mg CO}_2 \cdot 100) / (\text{TCO}_2 \cdot \text{mg zkoušené látky})$$

nebo

$$\% \text{ rozkladu} = (\text{mg CO}_2 \cdot 100) / (\text{mg TOC} \cdot 3,67)$$

kde 3,67 je přepočítací koeficient 44/12 pro uhlík na CO₂.

Takto se postupuje pro každé měření jež se provádělo po celou dobu zkoušky vždy s dosazením TCO₂ spočítané pro každý den..

Při absorpci do NaOH se vypočítá hmotnost produkovaného CO₂, vyjádřeného jako anorganický uhlík, vynásobením této koncentrace objemem absorpčního roztoku.

Procento rozkladu se vypočítá ze vztahu:

$$\% \text{ TCO}_2 = [(\text{mg IC ze zk. b.} - \text{mg IC ze sl. p.}) / \text{mg TOC ve zk. l}] \cdot 100$$

kde

IC = anorganický uhlík,

sl.p. = slepý pokus,

zk. b. = zkušební baňka

zk. l. = zkoušená látka

Úbytek DOC se může spočítat podle části I. Všechny výsledky se zapisují do sestavy dat.

IV. 3. 2

Platnost výsledků

Počáteční hmotnost anorganického uhlíku ve zkušební suspenzi v minerálním médiu nesmí být na počátku pokusu větší než 5 % celkového uhlíku. Celkové množství CO₂ vyvinutého v inokulovaném slepém pokusu nesmí překročit na konci pokusu 40 mg na litr média. V případě, že se získají hodnoty větší než 70 mg CO₂ · l⁻¹, měly by se experimentální postup i výsledky kriticky posoudit.

Viz také I. 5. 2.

IV 3. 3

Zpráva o výsledcích

Viz Část I. 8.

IV. 4

Přehled získaných výsledků

Příklad přehledu výsledků:

ZKOUŠKA VÝVINU OXIDU UHLIČITÉHO

1 LABORATOŘ

2. DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY

3. ZKOUŠENÁ LÁTKA

Název:

Koncentrace zásobního roztoku: mg látky na litr

Počáteční koncentrace v médiu: mg látky v médiu

Množství celkového uhlíku nasazeného do baňky: mg C

TCO₂: mg CO₂

4 INOKULUM

Zdroj:

Způsob úpravy:

Předúprava : pokud byla

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg CO:

5 TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A ROZLOŽITELNOST

Metoda: Ba(OH)₂ / NaOH / jiná

Čas (dny)	mg CO ₂ vyvinutého ve zkoušce	mg CO ₂ vyvinutého ve slepém pokuse	kumulativní množství vyvinutého CO ₂ (průměr)	TCO ₂ <u>Kumulativní CO₂.100</u> TCO ₂
--------------	---	--	---	---

							ve zkoušce mínus průměr ve slepém pokuse)				
	1	2	průměr	3	4	průměr	1	2	1	2	průměr
0											
n ₁											
n ₂											
n ₃											
28											

Poznámka: podobné uspořádání lze použít i pro referenční látku a pro kontrolu toxicity.

6. ANALÝZA UHLÍKU (nepovinně)

Analyzátor uhlíku:

Čas (den)	Slepý pokus, mg.l ⁻¹	Zkoušená látka, mg.l ⁻¹
0	C _{b(0)}	C ₀
20 (*)	C _{b(t)}	C _t
(*) nebo na konci inkubace		

7. ABIOTICKÝ ROZKLAD (nepovinně) % abiot. rozkladu = (produkce mg CO₂ ve steril. podm. po 28 dnech / TCO₂) . 100

$$\% \text{odstr. DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}} \right) \cdot 100$$

IV. D MANOMETRICKÁ RESPIROMETRICKÁ ZKOUŠKA

V. 1 PRINCIP METODY

Změřený objem inokulovaného minerálního média, jež obsahuje známou koncentraci zkoušené látky (100 mg.l⁻¹ látky, jež poskytují nejméně 50-100 mg.l⁻¹ TSK) jako jediný zdroj uhlíku je míchán v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (± 1 °C nebo lepší) po dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanovuje jednak měřením množství elektrolyticky produkovaného kyslíku, který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce nebo ze změny objemu nebo tlaku nebo obou v aparatuře. Vyvinutý CO₂ je absorbován v roztoku KOH nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, jenž je zkoušenou látkou spotřebován, korigované o spotřebu slepého pokusu jenž běží paralelně se vyjadřuje jako procento TSK nebo CHSK. Případně může být z doprovodné specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace počítána primární biologická rozložitelnost a z analýzy DOC úplný rozklad.

V. 2 POPIS METODY

V. 2. 1 Zařízení

- vhodný respirometr,
- regulátor teploty s přesností ± 1 °C nebo lepší,
- aparatura pro membránovou filtraci,
- analýzátor DOC (nepovinné),

V. 2. 2 Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I. 6. 2

Smíchá se 10 ml roztoku (a) s 800 ml zředěvací vody a přidá se po 1 ml roztoků (b) až (d) a doplní se do 1 l zředěvací vodou.

V. 2. 3 Příprava a předúprava inokula

Inokulum má být získáno z různých zdrojů: aktivovaný kal, vyčištěná městská odpadní voda, povrchová voda a půda nebo jejich směs.

Viz část I. 6. 4, I. 6. 4. 2 a I. 6. 5.

V. 2. 4 Příprava nádobek

S použitím zásobních roztoků se připraví roztoky zkoušené a referenční látky v minerálním médiu, koncentračně ekvivalentní 50 - 100 mg.l⁻¹ TSK.

V případech, kdy lze vyloučit nitrifikaci vypočítá se TSK za předpokladu tvorby amoniových solí, v opačném případě na bázi tvorby dusičnanů (viz příloha 2.2). 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 zkoušené látky připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční a zkoušenou látku dohromady a to ve stejných koncentracích jako v individuálních roztocích.

Je-li požadováno stanovení fyzikálně-chemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkoušené látky při obvyklé koncentraci 100 mg TSK.l⁻¹ sterilizovaný přidávkem vhodné toxické látky (viz I. 6. 6)

Připravené roztoky zkoušené a referenční látky se vnesou, nejméně v duplikátech, do nádobek. Do dalších nádobek se vnese pro kontrolu inokula pouze minerální médium a v případě, že je to požadováno, směs zkoušené látky a referenční látky a sterilní roztok.

V případě, že je zkoušená látka špatně rozpustná, přidává se v této fázi přímo navážením nebo odměřením objemu nebo se postupuje podle přílohy 3. Do absorbéru CO₂ se přidá KOH, pelety NaOH nebo jiný absorbent.

V. 2. 5 Počet nádobek v typické zkoušce

Nádobka č. 1 a 2: zkoušená suspenze

Nádobka č. 3 a 4: slepý pokus

Nádobka č. 5: kontrola postupu
když je to potřebné:
Nádobka č 6: sterilní kontrola
Nádobka č. 7: kontrola toxicity
Viz část I. 6. 7.

V. 2. 6

Provedení zkoušky

Po vytemperování nádobek na zvolenou teplotu se do vybraných nádobek přidá inokulum tak, aby se ustavila koncentrace suspendovaných látek ne větší než 30 mg.l⁻¹. Nádobka se zkompletuje, přezkouší na těsnost, pustí se míchání a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není potřebné věnovat pokusu žádnou jinou pozornost vyjma denních odečtů a kontroly teploty a míchání.

Vypočítá se spotřeba kyslíku z pravidelných a občasných odečtů postupem, jenž doporučuje výrobce přístroje. Na konce inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v nádobkách a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK počítaná na vznik amoniaku (platí pro látky s obsahem dusíku).

Je-li to požadováno, odebírá se vzorek z nádobek ke stanovení DOC nebo specifickou analýzu - viz příloha 2. Při prvním odběru z nádoby je nutné znát zbývající objem v nádobce. V případě zkoušky s dusíkatými látkami stanovuje se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů v průběhu 28 dnů a z nich se počítá korekce spotřeby kyslíku podle přílohy 5

V. 3.

VÝSLEDKY A ZPRÁVA

V. 3. 1.

Zpracování výsledků

Spotřeba kyslíku zkoušenou látkou po zvoleném času a po korekci na slepý pokus se dělí hmotností zkoušené látky v nádobce.

To poskytuje BSK vyjádřenou jako mg.mg⁻¹:

$$BSK = \frac{SK_{ZL} - SK_0}{m} (\text{mg.mg}^{-1})$$

kde

SK_{ZL} = spotřeba kyslíku zkoušenou látkou (mg),

SK₀ = spotřeba kyslíku ve slepém pokusu (mg),

m = hmotnost zkoušené látky v nádobce.

Procentní biologický rozklad se vypočte z rovnice

$$\% \text{ biologického rozkladu} = \% \text{ TSK} = \frac{BSK}{TSK} \cdot 100$$

nebo ze vztahu

$$\% \text{ CHSK} = \frac{BSK}{CHSK} \cdot 100$$

Je nutné poznamenat, že oba metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; upřednostňuje se použití první metody.

Pro látky, jež obsahují dusík se používá vhodné TSK (pro NH₄ nebo NO₃) podle toho co je známo nebo odhadováno o výskytu nitrifikace (příloha 2). Jestliže se nitrifikace vyskytuje, ale není úplná, koriguje se spotřeba kyslíku podle změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha 5).

V případě, že se stanovuje organický uhlík a /nebo se provedla specifická analýza, počítá se stupeň rozkladu podle odstavce I.7.

Všechny výsledky se zapisují do tabulkových sestav.

V. 3. 2

Platnost zkoušky

Normální spotřeba kyslíku inokulem je 20 - 30 mg.l⁻¹ a nemá být větší než 60 mg.l⁻¹ v průběhu 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg.l⁻¹ vyžadují kritické hodnocení výsledků a experimentální techniky.

V případě, že pH je mimo rozsah 6 - 8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 % je

nutno zkoušku opakovat s nižší koncentrací zkoušené látky.
Viz odst. I.

V. 3. 3

Protokol o zkoušce

Dále je uveden příklad protokolu.

MANOMETRICKÁ RESPIROMETRICKÁ ZKOUŠKA

1. LABORATOŘ
2. DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY
3. ZKOUŠENÁ LÁTKA
Název:
Koncentrace zásobního roztoku:
Počáteční koncentrace v médiu:
Objem v nádobce:
TSK nebo CHSK v $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ zkoušené látky (NH_4 , NO_3):
4. INOKULUM
Zdroj:
Provedená úprava
Předúprava, pokud byla provedena.
Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi:
5. TABULKA SPOTŘEB KYSLÍKU

		Čas (dny)									
		0		7		14		21		28	
spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou	1										
	2										
	a, průměr										
spotřeba kyslíku (mg) ve slepém pokusu	3										
	4										
	b, průměr										
opravená BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$										
	$(a_2 - b_m)$										
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a_1 - b_m)}{C_0 V}$										
	$\frac{(a_2 - b_m)}{C_0 V}$										
	$D_1 (a_1)$										
	$D_2 (a_2)$										
% rozkladu (BSK/TSK).100	průměr*										

V = objem media ve zkušební nádobě

* pokud je mezi D1 a D2 výrazný rozdíl, nemůže být počítán jejich průměr

Poznámka: Obdobný formulář může být použit pro referenční látku a pro kontrolu toxicity

6 OPRAVA NA NITRIFIKACI (Viz příloha 5)

Den	0	28	Rozdíl
(i) Koncentrace dusičnanů ($\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$)			(N)
(ii) Kyslíkový ekvivalent ($4,57 \cdot \text{N} \cdot \text{V}$) (mg)	-	-	
(iii) Koncentrace dusitanů ($\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$)			(N)
(iv) Kyslíkový ekvivalent ($3,43 \cdot \text{N} \cdot \text{V}$) (mg)	-	-	
(ii + iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	-	-	

7 ANALÝZA UHLÍKU (nepovinná)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus (mg.l ⁻¹)	Zkoušená látka (mg.l ⁻¹)
0	(C _{SPO})	(C ₀)
28*	(C _{SPT})	(C _t)
* nebo na konci inkubace		

$$\% \text{ odstr. DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{SPT}}{C_0 - C_{SPO}} \right) \cdot 100$$

8. ROZKLAD VÝCHOZÍ LÁTKY (nepovinně)

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

S_a = koncentrace v inokulované nádobě po 28 dnech

$$\% \text{ BR} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \cdot 100$$

kde

% BR = biologický rozklad výchozí látky vyjádřený v %.

9. ABIOTICKÝ ROZKLAD

a = spotřeba kyslíku ve sterilní kontrole po 28 dnech, (mg)

spotřeba kyslíku na mg chemické látky = a / C₀V

(viz část 1 a 3)

$$\% \text{ abiotického rozkladu} = a / (C_0V)$$

IV. E ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

VI. 1. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkoušené látky, obvykle 2 - 5 mg.l⁻¹ v minerálním médiu, se inokuluje malým množstvím směrné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvích, bez přístupu světla, při konstantní teplotě.

Rozklad se sleduje analýzou rozpuštěného kyslíku v průběhu 28 dnů. Množství spotřebovaného kyslíku po korekce na slepý pokus, který se provádí paralelně, se vyjadřuje jako procento TSK nebo CHSK.

VI. 2 POPIS METODY

VI. 2. 1 Přístroje

- BSK lahvičky se sponkami, 250 - 300 ml.
- Vodní lázeň nebo inkubátor, ve kterých se lahvičky udržují při konstantní teplotě (+ 1°C nebo lepší) za nepřístupu světla.
- Velké skleněné lahve 2 - 5 l pro přípravu média a pro naplnění lahviček.
- Kyslíková elektroda a oximetr nebo vybavení a chemikálie pro Winklerovu metodu.

VI. 2. 2 Příprava minerálního média

Zásobní roztoky se připravuje podle I. 6. 2.

Smíchá se 1 ml roztoků (a) až (d) a doplní se do I I zředovací vodou.

VI. 2. 3 Příprava inokula

Inokulum se běžně získává z odtoku z biologické čistírny nebo z laboratorní jednotky, které čistí převážně komunální odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Běžně se užívá jedna kapka až 5 ml filtrátu na 1 l média. Vhodné množství inokula se musí vyzkoušet (viz. I. 6. 4. 2 a I. 6. 5)

VI. 2. 4 Příprava lahví

Minerální médium se silně provzdušňuje po dobu 20 minut. V jedné zkoušce je nutné použít jedno minerální médium. Obecně je médium připraveno pro práci po 20 h stání při pracovní teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu. Jeho obsah by měl být okolo 9 mg.l⁻¹ při 20 °C. Všechny operace s médiem nasyceným vzduchem se provádí tak, aby nevznikly bublinky, např. se použije sifon.

Připravují se paralelní skupiny BSK lahviček pro simultánní měření zkoušené látky a referenční látky. Připraví se dostatečný počet lahviček, včetně slepých pokusů tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů byly k dispozici vždy alespoň 2 lahvičky. K tomu, aby bylo možné určit 10 denní okno je potřeba více lahviček.

Do velkých lahví se do 1/3 naplní provzdušněné médium, pak se přidá zásobní roztok zkoušené látky a referenční látky do zvláštní lahve tak, aby konečná koncentrace látek byla max. 10 mg.l⁻¹. Slepý pokus se nasazuje bez zkoušené a referenční látky.

Ke zjištění, zda aktivita inokula není limitující, nesmí koncentrace kyslíku v lahvičkách klesnout pod 0,5 mg.l⁻¹. Toto omezuje koncentraci zkoušené látky na 2 mg.l⁻¹. Ovšem pro látky těžce rozpustné ve vodě a s nízkou TSK lze použít koncentraci 5 - 10 mg.l⁻¹. V některých případech lze doporučit provádět paralelně měření při 2 koncentracích studované látky např. 2 a 5 mg.l⁻¹. Běžně se TSK počítá pro tvorbu amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace, počítá se TSK pro tvorbu dusičnanů (viz příloha 2). V případech, kdy nitrifikace není úplná, počítá se korekce z analytických koncentrací dusičnanů.

V případě, že zkoušená látka je toxická (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), musí se nasadit nové série lahviček.

Nasazuje se za stejných podmínek jako v předchozím případě.

Roztok ve velkých lahvích se inokuluje odtokem z biologické čistírny (1 kapka až 5 ml) nebo jiným inokulem jako např. říční vodou (viz I. 6. 4. 2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným

médiem a s pomocí hadičky, která sahá na dno, se připraví homogenní roztok.

VI. 2. 5 **Počet lahvíček běžného pokusu**

V běžném pokusu se používají následující lahvičky:

nejméně 10 se zkoušenou látkou a inokulem,

nejméně 10 jen s inokulem,

nejméně 10 s obsahem referenční látky a inokulem

a dále, je-li to zapotřebí 6 lahvíček obsahujících zkoušenou látku, referenční látku a inokulum (kontrola toxicity). Pro zjištění 10 denního okna je zapotřebí dvojnásobný počet lahvíček.

VI. 2. 6 **Provedení zkoušky**

Připravený roztok se ihned po přípravě plní do příslušné skupiny lahvíček a to ze spodní čtvrtiny láhve (nikoliv ze dna), tak, aby se všechny lahvičky úplně naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. Lahvičky určené pro počátek pokusu se ihned analyzují na obsah kyslíku Winklerovou metodou nebo pomocí oximetru. Obsah lahvíček lze konzervovat pro pozdější analýzu přidáním síranu manganatého a hydroxidu sodného: Takto fixované lahvičky, které obsahují hnědě zbarvené hydratované oxidy Mn^{3+} se skladují na temném místě při teplotě 10 -20 °C nejdéle po dobu 24 h. Zbývající lahvičky se uzavřou (bez bublinek) a inkubují se při 20 °C ve tmě. Každá série musí být doprovázena slepým pokusem, který kontroluje inokulum.

V duplicitních lahvíčkách se nejméně 1 x týdně stanovuje kyslík a to po celou dobu 28 dnů.

Týdenní vzorky umožňují stanovení 14 denního okna, kdežto vzorky každé 3 - 4 dny dovolují stanovit 10 denní okno, což vyžaduje dvojnásobný počet lahvíček.

Pro látky, které obsahují dusík se musí provést korekce na nitrifikaci. To se provádí tak, že se změří kyslík pomocí oximetru a pak se stanoví dusičnany a dusitany.

Spotřeba kyslíku na tuto oxidaci se počká podle přílohy 5.

VI. 3 **VÝSLEDKY A ZPRÁVA**

VI. 3. 1 **Zpracování výsledků**

Nejprve se vypočte BSK po každé časové periodě tak, že se odečte spotřeba kyslíku v $mg.l^{-1}$ slepého pokusu od spotřeby se zkoušenou látkou. Takto získaný výsledek se dělí koncentrací zkoušené látky a tím se získá specifická BSK v mg kyslíku na mg látky. Pak se vypočítá procentní biologická rozložitelnost jako podíl specifické BSK a specifické TSK (počítané podle přílohy 2. 2) nebo CHSK (stanovené analyticky podle přílohy 2. 3).

$$BSK = \frac{mg\ O_2(zk.l.) - mg\ O_2(sl.p.)}{mg\ zk.l.\ v\ lahvi} = mg\ kyslíku\ na\ mg\ látky$$

$$\% \text{ rozkladu} = \frac{BSK\ (mg\ kyslíku\ na\ mg\ zk.l.)}{TSK\ (mg\ kyslíku\ na\ mg\ zk.l.)} \cdot 100$$

nebo

$$\% \text{ rozkladu} = \frac{BSK\ (mg\ kyslíku\ na\ mg\ zk.l.)}{CHSK\ (mg\ kyslíku\ na\ mg\ zk.l.)} \cdot 100$$

kde

zk.l. = zkoušená látka

sl.p. = slepý pokus

Je potřeba podotknout, že tyto dvě metody neposkytují nezbytně stejné výsledky. Upřednostnit by se měla metoda s použitím TSK.

Pro zkoušenou látku obsahující dusík se používá vhodná TSK (NH_4 nebo NO_3) podle toho, co se ví nebo očekává o výskytu nitrifikace (viz příloha 5). V případě, že se nitrifikace vyskytuje, ale není úplná, koriguje se spotřeba kyslíku podle analytických koncentrací dusitanů a dusičnanů.

VI. 3. 2

Platnost výsledků

Spotřeba kyslíku ve slepých pokusech nesmí být vyšší než 1,5 mg.l⁻¹ po 28 dnech. Vyšší hodnoty vyžadují prozkoumání použité experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku v lahvičkách nesmí být nižší než 0,5 mg.l⁻¹ v jakémkoliv časovém úseku zkoušky. Tyto kyslíkové hladiny jsou platné jen v případě, že metoda, jíž se stanovuje kyslík, je schopná tyto koncentrace přesně měřit. Viz také část I. 5. 2

VI. 3. 3

Závěrečná zpráva

Viz I. 8

VI. 4

PŘEHLED VÝSLEDKŮ

Příklad uspořádání výsledků může být následující:

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. LABORATOŘ
2. DATUM ZAČÁTKU ZKOUŠKY
3. ZKOUŠENÁ LÁTKA
Název:
Koncentrace zásobního roztoku: mg.l⁻¹
Počáteční koncentrace v lahvičce mg.l⁻¹
TSK nebo CHSK: mg O₂ . mg zkoušené látky⁻¹
4. INOKULUM
Zdroj:
Úprava:
Předúprava v případě, že byla použita:
Koncentrace v reakční směsi: mg/l
5. PROVEDENÁ STANOVENÍ
Metoda: Winkler / oximetr

			Stanoveno (mg.l ⁻¹)			
			0	n ₁	n ₂	
Slepý pokus	1	C ₁				
	2	C ₂				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkoušená látka	1	a ₁				
	2	a ₂				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka : Podobný vzor může být použit i pro referenční láku a pro kontrolu toxicity

6. OPRAVA NA NITRIFIKACI

Doba inkubace (dny)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Koncentrace dusičnanů (mg N.l ⁻¹)				
(ii) Změna koncentrace dusičnanů (mg N.l ⁻¹)				
(iii) Kyslíkový ekvivalent (mg.l ⁻¹)				
(iv) Koncentrace dusitanů (mg N.l ⁻¹)				
(v) Změna v koncentraci dusitanů (mg N.l ⁻¹)				
(vi) Kyslíkový ekvivalent (mg.l ⁻¹)				
(iii + vi) Celkový kyslíkový ekvivalent (mg.l ⁻¹)				

7. DOSAŽENÉ ODSTRANĚNÍ: % ROZKLADU

	Odstranění po n dnech (mg.l ⁻¹)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
Lahev 1: (m _{t0} - m _{tx}) - (m _{b0} - m _{bx})				
Lahev 2: (m _{t0} - m _{tx}) - (m _{b0} - m _{bx})				
Lahev 1: % D ₁ = $\frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \cdot 100}{\text{konc. ve zk.} \cdot \text{TSK}}$				
Lahev 2: % D ₂ = $\frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \cdot 100}{\text{konc. ve zk.} \cdot \text{TSK}}$				
% D prům. = $\frac{D_1 + D_2}{2}$				

Průměr nelze počítat v případě velkých diferencí replikátů.

m_{t0} = hodnota ve zkušební lahvičce v čase 0

m_{tx} = hodnota ve zkušební lahvičce v čase x

m_{b0} = hodnota slepého pokusu v čase 0

m_{bx} = hodnota slepého pokusu v čase x

Uplatní se všechny korekce na nitrifikaci iii + vi z části 6

8. SPOTŘEBA 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.

IV. F ZKOUŠKA MITI

VII. 1 PRINCIP METODY

Měření spotřeby kyslíku míchaného roztoku nebo suspenze zkoušené látky v minerálním médiu, které je inokulováno speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů je prováděno automaticky po dobu 28 dnů ve stíněném uzavřeném respirometru při 25 ± 1 °C. Uvolněný CO₂ je absorbován v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost je vyjádřena jako procentický úbytek kyslíku (korigovaný slepým pokusem) teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Procento primární biologické rozložitelnosti lze také počkat z doprovodné chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace, případně podle analýzy DOC.

VII. 2 POPIS METODY

VII. 2. 1 Přístroje

- automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr vybavený 6 baňkami, každá objemu 300 ml s uzávěry, které umožňují absorpci CO₂
- místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň s teplotou 25 ± 1 °C,
- zařízení pro filtraci s membránovými filtry (nepovinně),
- analýzátor CO₂ (nepovinně)

VII. 2. 2 Příprava minerálního média

Vždy 3 ml dále uvedených roztoků a, b, c, a d se doplní deionizovanou vodou na objem 1000 ml.

- | | | |
|-----|---|---------|
| (a) | Hydrogenfosforečnan draselný K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| | dihydrogenorthofosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| | dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O | 44,60 g |
| | chlorid amonný, NH ₄ Cl | 0,50 g |
| | se rozpustí v 1000 ml vody. Hodnota pH by měla být 7,2 | |
| (b) | heptahydrát síranu hořečnatého, MgSO ₄ . 7H ₂ O | 22,50 g |
| | se rozpustí v 1000 ml vody | |
| (c) | chlorid vápenatý bezvodý, CaCl ₂ | 27,50 g |
| | se rozpustí v 1000 ml vody | |
| (d) | hexahydrát chloridu železitého, FeCl ₃ . 6H ₂ O | 0,25 g |
| | se rozpustí v 1000 ml vody | |

VII. 2. 3 Příprava inokula

Odeberou se vzorky z nejméně deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemikálie. Z míst jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řek, jezer a moří se odebírá 1 litr kalu, povrchových půd, vody a j., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyflotovaných látek a odstátí se pH supernatantu upraví na 7 ± 1 hydroxidem soleným nebo kyselinou fosforečnou. Do práce se bere vhodný objem tohoto filtrovaného supernatantu a naplní se jím nádoba, která se 23,5 h provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije 1/3 objemu a doplní stejným objemem roztoku, který obsahuje vždy po 0,1% glukosy, peptonu a hydrogenfosforečnanu draselného a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad dobré laboratorní praxe: odtok musí být čirý, teplota musí být udržovaná při 25 ± 2 °C, pH má být 7 ± 1 , kal má dobře sedimentovat, provzdušňování musí být dostatečné za všech okolností, mají být přítomni provoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé 3 měsíce. Takto získané inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace a déle než po čtyřech měsících. Proto je nutné odebírat vzorky ze zvolených 10 míst každé 3 měsíce.

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant starého kalu smíchává se stejným objemem nového kalu a směs se kultivuje podle popsaného postupu. Do práce se kal bere 18 - 24 h po přidávku živin.

VII. 2. 4 Příprava baněk

Připravuje se 6 baněk podle schématu

- č. 1 zkoušená látka ve zředovací vodě 100 mg.l⁻¹
- č. 2, 3, 4 zkoušená látka v minerálním médiu 100 mg.l⁻¹
- č. 5 referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu 100 mg.l⁻¹
- č. 6 minerální médium

Málo rozpustné látky se přidávají přímo odvážením nebo odměřením objemu nebo se zpracují jak je uvedeno v příloze č. 3, s výjimkou těch, u kterých nemohou být použita rozpouštědla nebo emulgátory. Do speciálních uzávěrů lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

VII. 2. 5 **Provedení zkoušky**

Baňky č. 2, 3, 4 (zkušební suspenze), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby výsledná koncentrace kalu byla 30 mg.l⁻¹. Láhev č. 1 je bez inokula, čímž se získává abiotická kontrola. Nasadí se zátky, zkontroluje se těsnost, zapnou se míchadla a započne se s měřením úbytku kyslíku za stíněných podmínek. Denně se kontroluje teplota, míchání, zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenávají se všechny změny barvy obsahu láhve. Při využití 6 křivkového zapisovače se získává přímo křivka BSK. Na konci inkubace, která je obvykle 28 dní, měří se pH v láhvi a stanovuje zbytková koncentrace zkoušené látky a jejich metabolitů a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také DOC (postup podle přílohy 2). V případě těkavých látek se používá speciální postup. V případě výskytu nitrifikace se stanovují, jestliže je to možné, dusičnany a dusitany.

VII. 3. **DATA A ZPRÁVA**

VII. 3. 1 **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku zkoušenou látkou za daný čas v mg, korigovaná slepým pokusem za stejnou dobu, se dělí hmotností zkoušené látky v pokusu. Tento postup poskytuje výsledek vyjádřený jako spotřeba kyslíků v mg. mg⁻¹ zkoušené látky, což je:

$$BSK = \frac{mgO_2(zk.l.) - mgO_2(sl.p.)}{mg\ zk.l.} = mg\ O_2 / mg\ zk.l.$$

kde

zk. l. = zkoušená látka,

sl. p. = slepý pokus,

m = hmotnost zkoušené látky.

Procentický biologický rozklad se získá ze vztahu

$$\% \text{ biolog. rozkladu} = \% \text{ TSK} = \frac{BSK}{TSK} \cdot 100$$

Pro směsi se TSK vypočítává z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché látky. Dosazuje se odpovídající TSK pro NH₄ a NO₃ podle toho, zda se úplná nitrifikace vyskytuje či ne. V případě neúplné nitrifikace se vychází ze změn koncentrace NO₃ a NO₂ podle přílohy 5,

Spočítá se procento primárního biologického rozkladu z úbytku původní chemické látky (viz I.7.2)

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \cdot 100\%$$

V případě, že se v lahvi č.1 zjistí fyzikálně-chemický úbytek původní látky zaznamená se tento jev a za koncentraci zkoušené látky (S_b) po 28 dnech se dosadí tato koncentrace.

V případě stanovení DOC (nepovinné) se úplná procentická biologická rozložitelnost počítá ze vztahu:

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

Jestliže byl zjištěn úbytek DOC v láhvi č. 1, která měří abiotický rozklad, pak se do výpočtu dosazuje koncentrace DOC zjištěná v této láhvi.

Všechny výsledky se zaznamenají do souhrnu, jehož vzor je přiložen.

VII. 3. 2 **Platnost výsledků**

Slepý pokus mívá spotřebu kyslíku inokulem 20 - 30 mg.l⁻¹ a neměl by být větší než 60 mg.l⁻¹ v průběhu 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg.l⁻¹, vyžadují kritické vyhodnocení získaných dat a experimentální techniky. V případě, že pH je mimo rozsah 6 - 8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, zkouška by měla být opakována s nižší koncentrací látky.

Viz také I.5.2.

V případě, že rozklad anilinu, vypočítaný ze spotřeby kyslíku, nedosáhne 40 % po 7 dnech a 65% po 14 dnech, je nutné zkoušku považovat za neplatnou.

VII. 3 3 **Zpráva**

Viz I.8.

VII. 4 **PŘEHLED VÝSLEDKŮ**

Příklad uspořádání je uveden dále:

MITI (I) ZKOUŠKA

1. LABORATOŘ
2. DATUM ZAHÁJENÍ POKUSU
3. ZKOUŠENÁ LÁTKA

Název:

Koncentrace zásobního roztoku: mg.l⁻¹ jako látka

Počáteční koncentrace v médiu, Co : mg.l⁻¹ jako látka

Objem reakční směsi, V : ml

TSK: mg O₂ l⁻¹

4. INOKULUM

Lokality odkud byly získány vzorky :

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

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci na syntetické splašky = ... mg.l⁻¹.

Objem aktivovaného kalu v konečném médiu = ... 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 kyslíku (mg) zkoušenou látkou	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
spotřeba kyslíku (mg) ve slepém pokuse	b					
opravená spotřeba kyslíku (mg)	(a ₁ - b)					
	(a ₂ - b)					
	(a ₃ - b)					
BSK na mg zkoušené látky	(a-b)					
	—	Lahev 1				
	C ₀ V	Lahev 2				
%rozkladu		Lahev 3				
		1				

BSK — .100 TSK	2					
	3					
	průměr*					

Poznámka: Podobný vzor může být použit pro referenční látku

* neprůměrovat, jestliže jsou mezi jednotlivými měřeními velké rozdíly

6. ANALÝZA UHLÍKU (nepovinně)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC			% odstraněného DOC	Průměr
	Změřeno	Opraveno			
Voda + zkoušená látka	a			-	-
Kal + zkoušená látka	b ₁		b ₁ - c		
Kal + zkoušená látka	b ₂		b ₂ - c		
Kal + zkoušená látka	b ₃		b ₃ - c		
Slepý pokus	c			-	-

7. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA

	Zbytek zkoušené chemikálie na konci zkoušky	% rozkladu
slepý pokus s vodou	S _b	
inokulované medium	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ rozkladu} = [(S_b - S_a) / S_b] \cdot 100$$

Počítá se pro láhve č. a1, a2, a3.

8. POZNÁMKY

Je-li k dispozici, může být připojena křivka BSK v závislosti na čase.

PŘÍLOHA 1 Zkratky a definice

- DO:** Rozpuštěný kyslík, dissolved oxygen, (mg.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 oxidace zkoušené látky spotřebováno mikroorganismy. Je také vyjádřena jako spotřeba kyslíku v g na g látky. (Viz metoda V).
- CHSK:** Chemická spotřeba kyslíku, chemical oxygen demand, COD, (g), je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkoušené látky horkým kyselým dichromanem. Poskytuje měřítko o množství oxidovatelných látek, jež jsou přítomny ve vzorku. Vyjadřuje se také v g kyslíku na g látky. (Viz metoda VI).
- DOC:** Rozpuštěný organický uhlík, dissolved organic carbon, je organický uhlík přítomný v roztoku nebo ve filtrátu získaném filtrací přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo jako centrifugát získaný při odstředování po dobu 15 minut při 40 000 m.s⁻² (± 4 000 g).
- TSK:** Teoretická spotřeba kyslíku, theoretical oxygen demand, ThOD, (mg), je celkové množství kyslíku, které je potřebné pro úplnou oxidaci látky. Vypočítává se z molekulového vzorce látky (viz příloha 2. 2) a vyjadřuje se v mg kyslíku na mg látky.
- TCO₂:** Teoretický oxid uhličitý, theoretical carbon dioxide, ThCO₂, je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku v látce za předpokladu její plné mineralizace; vyjadřuje se jako mg oxidu uhličitého povinného 1 mg zkoušené

- látky.
- TOC: Celkový organický uhlík, total organic carbon, ve vzorku je součet organického uhlíku v roztoku a v suspenzi.
- IC: Anorganický uhlík, inorganic carbon.
- TC: Celkový uhlík, total carbon, je součet organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární (základní) biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky podrobené biologickému působení, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný (konečný) biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený v podmínkách jejího úplného zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové buněčné hmoty (biomasy).

Snadná biologická rozložitelnost:

je arbitrážní klasifikací látek, které byly podrobeny vyhledávacím zkouškám úplné biologické rozložitelnosti; výsledky těchto zkoušek jsou natolik přesvědčivé, že lze přijmout předpoklad, že se látky budou ve vodivém prostředí a za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

Inherentní biologická rozložitelnost:

klasifikace chemických látek, pro které jsou nepochybné důkazy o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) při použití kterékoliv metody zkoušení.

Odstranitelnost:

je přístupnost látek možnosti být odstraněny při biologickém čištění odpadních vod bez nepříznivého ovlivňování normálního průběhu čisticích pochodů. Všeobecně, látky snadno biologicky rozložitelné jsou odstranitelné, neplatí to ale pro všechny inherentně rozložitelné látky. Spolupůsobit mohou také abiotické procesy.

Lag(ová) fáze:

je, ve zkoušce úbytku (die-away, odstranění, vymizení), doba od inokulace do dosažení alespoň 10 % biologického rozkladu. Lag fáze je obvykle velmi variabilní a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce lag fáze do dosažení 90 % maximálně dosažitelného rozkladu.

10 denní okno

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

PŘÍLOHA 2

Výpočet a stanovení vhodných skupinových parametrů

V závislosti na zvolené zkušební metodě je požadována znalost některých úhrnných parametrů. V další části přílohy jsou popsány některé postupy jak takovéto parametry odvodit. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. *Obsah uhlíku*

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví elementární analýzou zkoušené látky.

2. *Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)*

Teoretická spotřeba kyslíku (TSK) může být spočítána ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků elementární analýzy. Pro látku obecného složení



o molekulové hmotnosti MH, bez nitrifikace,

$$TSK_{NH_4} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{MH} \text{ (mg.mg}^{-1}\text{)}$$

nebo s nitrifikací

$$TSK_{NO_3} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + \frac{5}{2}n + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{MH} \text{ (mg.mg}^{-1}\text{)}$$

3. Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví postupem VI.

4. Rozpuštěný organický uhlík (DOC)

Rozpuštěný organický uhlík je definován jako organický uhlík jakékoliv chemické látky nebo směsi ve vodě, který projde filtrem s velikostí pórů 0,45 µm.

Vzorky ze zkušebních nádob se filtrují bezprostředně po odběru ve filtrační aparatuře přes vhodný filtr. Prvních 20 ml (toto množství může být zmenšeno při použití malých filtrů) se vylije. Objemy 10 - 20 ml nebo menší, v případě nástřiku (objem závisí na potřebném objemu pro analýzu), se uschovávají pro analýzu. Koncentrace DOC se stanovuje pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, jež je ekvivalentní nebo menší než 10 procent počáteční koncentrace použité ve zkoušce.

Filtrované vzorky, které není možné analyzovat ve stejný pracovní den mohou být konzervovány uložením v chladu při teplotě 2 - 4 °C po dobu 48 h nebo při teplotách nižších než - 18 °C po dobu delší.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tudíž může obsahovat několik mg rozpustného uhlíku, jenž může interferovat při stanovení biologické rozložitelnosti.

Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením v deionizované vodě 3 krát jednu hodinu. Filtry se pak skladují ve vodě po dobu 1 týdne. Každé balení filtrů musí být zkoušeno, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkoušené látky na filtru. Proto je potřebné tuto možnost ověřit.

Místo filtrace může být použito pro rozlišení mezi TOC a DOC odstředování při 40000 m.s⁻¹ (4000 g) po dobu 15 min. Tato metoda však není vhodná při počáteční koncentraci DOC < 10 mg.l⁻¹, protože nelze odstranit všechny bakterie nebo se může zpětně rozpouštět uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965

Wagner, R. Vom Wasser, 1976, Vol 46, 139

DIN Entwurf 3 8 409, Teil 41 - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwassef- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrossen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H41), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches institut für Normung e. V.

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

PŘÍLOHA 3

Vyhodnocení biologické rozložitelnosti těžce rozpustných látek

Při stanovení biologické rozložitelnosti látek těžce rozpustných ve vodě si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Protože homogenní kapaliny způsobují zřídka problémy při odebrání vzorků doporučuje se tuhé látky nejprve vhodným způsobem homogenizovat a tím zabránit chybám způsobeným nehomogenitou. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům vzorků obsahujících jen několik mg ze směsi látek, které obsahují velká množství nečistot.

V průběhu zkoušek se mají používat různé způsoby míchání. Pozornost musí být věnována tomu, aby míchání bylo přiměřené pro udržení látky v disperzi ale zároveň, aby nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pění a nadměrných střízným silám.

K vytvoření stabilní emulze se může použít emulgátor, který není toxický pro bakterie, není biologicky rozložitelný a nesmí v průběhu zkoušky pění.

Stejná kritéria jako na emulgátory se aplikují na rozpouštědla.

Pro tuhé zkoušené látky se nedoporučují tuhé nosiče. Takovéto nosiče však mohou být vhodné pro zkoušení olejovitých látek.

V případě, že se použijí pomocné látky jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče musí se provést odpovídající slepý pokus.

Pro studium biologické rozložitelnosti těžce rozpustných látek lze použít kteroukoliv ze tří respirometrických zkoušek (CO₂, BSK, MITI).

LITERATURA

de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

PŘÍLOHA 4

Vyhodnocení biologické rozložitelnosti látek potenciálně toxických pro inokulum

V případech, kdy se látka po zkouškách snadné biologické rozložitelnosti jeví jako obtížně rozložitelná, doporučuje se rozlišit, zda jde o inhibiční působení nebo o odolnost látky vůči rozkladu (Reynolds et al., 1987).

Ve zkoušce toxicity a biologické rozložitelnosti se použijí stejná nebo podobná inokula.

Ke zjištění toxicity látky, která se zkouší na snadnou biologickou rozložitelnost (zkoušky podle metod IV. A - F) se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu nebo stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Chceme-li se vyhnout inhibici z důvodu toxicity měla by být koncentrace zkoušené látky použita v pokusech podle metod IV menší než 1/10 EC₅₀ (nebo menší než EC₂₀) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s EC₅₀ > 300 mg.l⁻¹ nemají pravděpodobně toxické účinky při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti podle metod IV. Hodnoty EC₅₀ < 20 mg.l⁻¹ mohou při následném zkoušení pravděpodobně způsobovat potíže. Lze doporučit práci s nízkými koncentracemi, což vyžaduje použít přesné a citlivé zkoušky v uzavřených lahvích IV. E nebo použití ¹⁴C značených látek. Vyšší koncentrace zkoušené látky může případně umožnit použití adaptovaného inokula. V tomto případě se ale přichází o specifitnost zkoušky snadné biologické rozložitelnosti, jako základního klasifikačního kritéria metod zkoušení podle IV.

LITERATURA

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

PŘÍLOHA 5

Oprava na spotřebu kyslíku při nitrifikaci

Chyby při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, jsou málo významné (ne větší než 5 procent) i když dochází k nepravidelné oxidaci amoniakálního dusíku ve slepém pokusu a v řádné zkoušce. Ovšem zkoušení látek, obsahujících dusík může být provázeno vážnými chybami.

V případě, že je pozorována neúplná nitrifikace, musí být spotřeba kyslíku měřenou směsí opravena o spotřebu na oxidaci amoniaku a amoniakálních iontů na dusitanů a dusičnanů, vycházející z předpokladu platnosti následujících rovnic:



Celkově:



Z rovnice (1) vychází spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, což je faktor 3,43 (96:28). Stejným způsobem lze z rovnice (3) vypočítat spotřebu kyslíku na oxidaci amoniakálního dusíku na dusičnan 128 g, což dává faktor 4,57 (128:28).

Protože popsané reakce jsou následné, působené určitými různými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat, při jejím poklesu dochází ke vzniku určité koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku na tvorbu dusičnanů se získá násobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, spotřeba kyslíku na zvýšení obsahu dusitanů se získá násobením tohoto přírůstku faktorem 3,43 nebo při poklesu obsahu dusitanů jsou ztráty kyslíku přepočitatelné faktorem -3,43.

To znamená:

Kyslík spotřebovaný pro tvorbu dusičnanů = 4,57 . přírůstek koncentrace dusičnanů

Kyslík spotřebovaný pro tvorbu dusitanů = 3,43 . přírůstek koncentrace dusitanů

Kyslík ztracený při úbytku NO: = - 3,43 . přírůstek koncentrace dusičnanů

Takže

spotřeba kyslíku na nitrifikaci = $\pm 3,43$. změna koncentrace dusitanů + 4,57 . změna koncentrace dusičnanů

a z toho

spotřeba kyslíku pro oxidaci uhlíku = celková spotřeba - spotřeba na nitrifikaci.

Alternativně v případech, kdy se stanoví pouze celkový oxidovaný dusík může se spotřeba kyslíku na nitrifikaci v prvním přiblížení získat násobením přírůstku koncentrace oxidovaného dusíku faktorem 4,57.

Opravená spotřeba kyslíku příslušná oxidaci uhlíku se pak srovnává s TSK NH_3 , jak je uvedeno v příloze 2.

V **ROZLOŽITELNOST - BIOLOGICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU**

1 **METODA**

1.1 **ÚVOD**

Cílem této metody je měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) tuhých nebo kapalných organických látek. Výsledky dosažitelné touto metodou platí v první řadě pro lásky rozpustné ve vodě, v zásadě lze touto metodou zkoušet i těkavé a ve vodě obtížně rozpustné látky.

Metodu lze použít jen pro organické látky, které v koncentracích používaných při zkoušce nemají žádný inhibiční účinek na inokulum. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, je pro zajištění její dostatečné dispergace případně třeba použít zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Při interpretaci nižších hodnot získaných jako výsledek zkoušky a při volbě vhodných koncentrací při zkoušení může být užitečná znalost údajů o toxicitě zkoušené látky

1.2 **DEFINICE A JEDNOTKY**

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

Výsledky se udávají jako g spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkoušené látky.

1.3 **REFERENČNÍ LÁTKY**

Doporučuje se použít vhodnou referenční látku pro přezkoušení aktivity inokula.

1.4 **PRINCIP METODY**

Určité množství zkoušené látky se rozpustí nebo disperguje ve vhodném živném médiu bohatém na kyslík, poté se naočkuje inokulem a za stálé předepsané teploty se ve tmě inkubuje. BSK se stanoví na základě rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku před začátkem a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně 5 dní, avšak ne více než 28 dní.

Souběžně s touto zkouškou je třeba provést slepý pokus bez zkoušené látky.

1.5 **KRITÉRIA KVALITY**

Stanovení BSK není možné považovat za bezpečné stanovení biologické rozložitelnosti dané látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za první posouzení (vyhledávací, skríningovou).

1.6 **POPIS METODY**

Připraví se roztok nebo disperze zkoušené látky o vhodné koncentraci. Poté se stanoví BSK pomocí některé vhodné národní nebo mezinárodní standardizované metody.

2 **ÚDAJE A VYHODNOCENÍ**

BSK zkoušené látky se vypočítá podle zvolené metody a vyjádří se s/ g spotřeby kyslíku na 1 g zkoušené látky.

3 **ZÁVĚREČNÁ ZPRAVA**

Uvede se použitá metoda. Jako biochemická spotřeba kyslíku se uvede průměrná hodnota zejména tří platných výsledků měření. Je třeba uvést všechny informace a poznámky důležité pro interpretaci výsledků, zejména co se týká nečistot, skupenství, toxických účinků a složení zkoušené látky, které by mohly ovlivnit výsledek.

Pokud bylo použito aditivum pro inhibici biologické nitrifikace, je třeba to uvést.

4 **LITERATURA**

Seznam normovaných metod, např..

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 ROZLOŽITELNOST - CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1 METODA

1.1 ÚVOD

Účelem metody je stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK) tuhých nebo kapalných organických látek za určených standardizovaných laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků je užitečné znát údaje o chemickém vzorci zkoušené látky (např. obsah halidů, organické sole železa nebo chlorované uhlovodíky).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky. Vyjadřuje se jako množství kyslíku oxidačního činidla, které spotřebuje oxidovaná látka za určených laboratorních podmínek.

Výsledek zkoušky se udává v g spotřeby kyslíku na 1 g zkoušené látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Pokud se studuje nová látka, není nutné vždy používat referenční látky. Referenční látky by měly sloužit především k občasné kontrole měřicí metody a k vzájemnému porovnávání výsledků získaných různými metodami.

1.4 PRINCIP METODY

Určité množství látky, rozpuštěné nebo rozptýlené ve vodě, se oxiduje zahříváním s dichromanem draselným v prostředí silné kyseliny sírové pod zpětným chladičem za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru. Přebytečný dichroman se stanoví titrací standardním roztokem síranu železnatoamonného.

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

1.5 KRITÉRIA KVALITY

CHSK je „indikátorem oxidovatelnosti“ a jako taková je využívána jako praktický nástroj ke stanovení obsahu organických látek.

Výsledek zkoušky mohou zkreslit chloridy. Rovněž anorganické redukující nebo oxidující látky mohou stanovení chemické spotřeby kyslíku zkreslit.

Některé cyklické sloučeniny a mnoho sloučenin těkaných (např. nižší mastné kyseliny) se v této zkoušce neoxidují úplně.

1.6 POPIS METODY

Nejprve se připraví roztok nebo disperze zkoušené látky tak, aby se dosáhlo CHSK mezi 250 a 600 mg. l⁻¹.

Poznámka:

V případě špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek je možné odvážit a vnést přímo do zkušební baňky s vodou množství práškovité nebo kapalné látky odpovídající přibližně 5 mg CHSK.

CHSK je často možné s výhodou, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit variantní metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnavačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto modifikací se obvykle úspěšně stanoví i látky obtížně stanovitelné konvenční metodou - např. kyselina octová.

Metoda vyhovuje i v případě pyridinu. Jestliže se koncentrace dichromanu draselného zvýší na 0,0416 mol.l⁻¹, (0,25 N), může se zvýšit přímo navažované množství látek na 5 - 10 mg, což usnadňuje stanovení látek obtížně rozpustných ve vodě

V ostatních případech se CHSK stanout vhodnou národní nebo mezinárodní metodou.

2 ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Experimentálně zjištěná hodnota CHSK se vypočítá pomocí příslušné standardizované metody a vyjádří se v g chemické spotřeby kyslíku na g zkoušené látky.

3 ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Mělo by se uvést, která referenční metoda byla použita.

Chemickou spotřebu kyslíku je třeba určit nejméně ze tří výsledků měření. Zpráva má obsahovat všechny informace a poznámky důležité pro interpretaci výsledků, např. o nečistotách zkoušené látky nebo o fyzikálním stavu a složení látky, pokud tyto faktory ovlivňují výsledky.

Je třeba uvést použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chloridy.

4

LITERATURA

(1) Kelkenberger, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

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

Seznam normovaných metod, např.:

NBN T 91- 201 Determination of the Chemical Oxygen Demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical Oxygen Demand (dichromat valme) 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/l

GEN 3235 5. 3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik

ISO DP 6060 Water Quality: Chemical oxygen Demand Dichromate Methods

VII ROZLOŽITELNOST - ABIOTICKÁ HYDROLÝZA JAKO FUNKCE pH

1 METODA

Metoda je založena na doporučeních OECD (1).

1.1 ÚVOD

Hydrolýza je důležitá reakce ovlivňující abiotický rozklad. U látek, které jsou jen málo biologicky rozložitelné má obzvláštní význam a může ovlivnit persistenci dané látky v životním prostředí.

Většina hydrolyzních reakcí probíhá jako reakce pseudoprvního řádu, takže poločasy jsou nezávislé na koncentraci. To zpravidla dovoluje extrapolaci výsledků z koncentrací použitých v laboratoři na podmínky životního prostředí.

Mimo to byly u řady chemických sloučenin uvedeny příklady uspokojivé shody dat naměřených v čisté a v přírodní vodě (2).

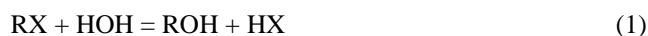
Pro používání této zkušební metody je užitečné znát již předem údaj o tenzi par dané látky.

Metoda je vhodná jen pro látky rozpustné ve vodě. Nečistoty zpravidla ovlivňují výsledky.

Chování látek při hydrolýze je nutno zkoumat při hodnotách pH obvykle se vyskytujících v životním prostředí (pH 4 - 9).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Hydrolýzou se rozumí reakce látky RX s vodou, která se dá znázornit výměnou skupiny X za skupinu OH:



Rychlost, kterou ubývá koncentrace RX, je dána vztahem:

$$\text{rychlost} = k \cdot [H_2O] \cdot [RX] \quad (2)$$

Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce v přebytku, popisuje se tento typ reakce obvykle jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je zjištěná rychlostní konstanta dána výrazem:

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [H_2O] \quad (3)$$

a lze ji určit pro dané pH a teplotu T z výrazu:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad (4)$$

kde

t = čas,

C₀ = koncentrace látky v čase nula,

C_t = koncentrace látky v čase t,

2,303 = přepočítací faktor mezi přirozeným logaritmem a logaritmem při základu 10.

Koncentrace je možné udávat v g. l⁻¹ nebo v mol . l⁻¹.

Jednotkou konstanty k_{obs} je (čas)⁻¹.

„Poločas“, t_{1/2}, je definován jako doba, po jejímž uplynutí je počáteční množství látky sníženo o 50 %:

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

Z rovnic (4) a (5) plyne, že

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

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Pokud se studuje nová látka, není nutné vždy používat referenční látky. Referenční látky by měly sloužit především k občasné kontrole měřicí metody a k vzájemnému porovnávání výsledků získaných různými metodami.

Jako standardní látky byly použity (1):

Kyselina acetylsalicylová (aspirin),

0, 0 - diethyl - 0 - (6 - methyl-2-(1methylethyl)- 4 - pyrimidinyl) - ester kyseliny thiofosforečné (Dimpylat, Diazinon).

1. 4 **PRINCIP METODY**

Látka se rozpustí v malé koncentraci ve vodě; kontrolují se pH a teplota.

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

Logaritmy koncentrace se vynesou proti času. Je-li získaná závislost lineární, je možné získat rychlostní konstantu 1. řádu ze směrnice přímky (viz odst. 2).

Není-li možné rychlostní konstantu zjistit při zadané teplotě přímo, je obvykle možné ji odhadnout podle Arrheniova vztahu, který udává teplotní závislost rychlostních konstant. Za tím účelem se vynesou logaritmy rychlostních konstant získaných při jiných teplotách proti reciproké hodnotě absolutní teploty (K).

Z lineárního průběhu je možné extrapolovat nebo interpolovat hodnoty těch rychlostních konstant, které nebyly určeny přímo.

1. 5 **KRITÉRIA KVALITY**

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

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

1. 6 **POPIS METODY**

1. 6. 1 **Činidla**

1. 6. 1. 1 *Tlumivé roztoky*

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

Pro tento účel je třeba připravit tlumivé roztoky za použití chemikálií čistoty pro analýzu a destilované nebo deionizované vody. V příloze jsou uvedeny některé příklady těchto systémů.

Použitý tlumivý roztok může ovlivnit rychlost hydrolýzy. Při tomto zjištění je třeba zvolit jiný tlumivý roztok. V literatuře (2) se doporučuje použít místo fosforečnanových boritanové a acetátové tlumivé roztoky.

Není-li známo pH tlumivých roztoků pro příslušnou teplotu zkoušky, je nutné ho stanovit cejchovaným pH - metrem při zvolené teplotě s přesností na 0,1 jednotek pH.

1. 6. 1. 2 *Zkoušené roztoky*

Zkoušená látka se rozpustí ve zvoleném tlumivém roztoku. Koncentrace by neměla překročit 0,01 mol. l⁻¹ nebo polovinu nasycené koncentrace, podle toho, která z těchto hodnot je nižší.

Používání organických rozpouštědel mísitelných s vodou se doporučuje jen pro látky s nižší rozpustností ve vodě. Množství látky zprostředkující rozpouštění má být menší než 1% a nemá ovlivnit průběh hydrolýzy.

1. 6. 2 **Aparatura**

Používají se skleněné baňky se zátkami (bez tuku).

Pokud jsou látka nebo složky tlumivého roztoku těkavé, nebo pracuje-li se při vyšších teplotách, měly by se přednostně používat zkušební nádoby utěsněné nebo uzavřené septem, s co nejmenším objemem plynu nad kapalinou v nádobě.

1. 6. 3 **Analytická metoda**

Použitá analytická metoda je dána druhem zkoušené látky. Musí být dostatečně přesná a citlivá, aby dokázala zjistit úbytek počáteční koncentrace o 10 %. Musí být dostatečně specifická, aby umožnila stanovení zkoušené látky v koncentraci zkušební roztoku a může být tvořena kombinací vhodných analytických technik.

1. 6. 4 **Zkušební podmínky**

Zkoušky se provádějí za použití zařízení s kontrolou teploty nebo s použitím termostatované lázně, nastavené na 0,5 °C přesně. Vhodnými opatřeními je nutné zabránit fotolytickým vlivům.

Dále je nutné učinit veškerá vhodná opatření, aby se odstranil rozpuštěný kyslík (např. se po 5 minut před přípravou roztoku nechá procházet dusík nebo argon).

1. 6. 5 **Metoda měření**

1. 6. 5. 1 *Předběžná zkouška*

Pro všechny látky se musí provést předběžná zkouška při $50 \pm 0,5$ °C a při každé ze tří hodnot pH : 4,0; 7,0 a 9,0. Je třeba provést dostatečný počet měření, aby bylo možné pro každé pH rozhodnout, zda při 50 °C je poločas ($t_{1/2}$) menší než 2,4 hodiny nebo zda po 5 dnech zhydrolyzuje méně než 10 %. (Je možné odvodit že tyto hodnoty odpovídají za podmínek, které se nejčastěji vyskytují v životním prostředí (25 °C), poločasu kratšímu než jeden den nebo delšímu než 1 rok).

Jestliže se v předběžném experimentu prokáže, že při 50 °C se za 2,4 hodiny zhydrolyzuje 50 % nebo více zkoušené látky nebo po 5 dnech méně než 10 % při všech třech hodnotách pH (4,0; 7,0; 9,0), nejsou další experimenty nutné.

V ostatních případech a v případech jednotlivých hodnot pH, pro která tomu tak není se provede zkouška č. 1.

1. 6. 5. 2 *Zkouška č. 1*

Při hodnotách pH, pro které se v předběžné zkoušce ukázala nutnost dalších zkoušek, provede se zkouška č. 1. Pracuje se při jedné teplotě, nejlépe při 50 °C \pm 0,5 °C a pokud možno ve sterilních podmínkách.

Za účelem prověření průběhu reakce podle pseudo prvního řádu se pro každou zvolenou hodnotu pH bere pro pokrytí oblasti mezi 20 % a 70 % hydrolyzy dostatečný počet vzorků (ne méně než 4).

Pro každé pH, při kterém se provádí zkouška č. 1, se stanoví řád reakce.

Odhad rychlostních konstant při 25 °C:

Rozhodnutí o dalším experimentálním postupu závisí na tom, zda ze zkoušky 6. 1 lze usuzovat na reakci pseudoprvního řádu nebo ne.

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

Vyplývá-li ze zkoušky č. 1 s jistotou reakce pseudoprvního řádu, provedou se další experimenty podle zkoušky č. 3 (alternativně je možné za zvláštních okolností vypočítat rychlostní konstanty při 25 °C z konstant při 50 °C vypočtených s použitím údajů ze zkoušky č. 1, viz odstavec 3. 2).

1. 6. 5. 3 *Zkouška č. 2*

Tato zkouška se provádí při každém pH, pro které se to na základě výsledků zkoušky č. 1 ukázalo potřebným:

- 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 i každé teplotě, při kterých se provádí zkouška č. 2, je třeba provést v nejméně 6 přiměřených časových intervalech měření v oblastí stupně hydrolyzy 20 až 70 %

Při každém pH se provede opakované měření při jedné teplotě. Pokud se zkouška č. 2 provádí při dvou teplotách nad 50 °C, je vhodné opakovat měření nejlépe při nižší z těchto dvou teplot.

Pro každé pH a každou teplotu, pro které se provádí zkouška č. 2, je třeba, pokud je to možné, provést grafický odhad poločasu ($t_{1/2}$).

1. 6. 5. 4 *Zkouška č. 3*

Zkouška se provede při každém pH, pro které se to ukázalo potřebným na základě výsledků zkoušky č. 1:

- 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 kterých se provádí zkouška č. 3 se zvolí tři měřicí body, první v čase 0, druhý a třetí při stupni hydrolýzy vyšším než 30 %; spočítá se konstanta k_{obs} a $t_{1/2}$.

2 ÚDAJE

Při reakčním chování podle pseudoprvního řádu je možné konstanty reakční rychlosti k_{obs} vypočítat pro každé pH a každou teplotu regresní analýzou nebo je zjistit graficky vynesáním logaritmu koncentraci proti času, přičemž se použije výrazu:

$$k_{\text{obs}} = - \text{směrnice} \cdot 2,303$$

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

Je-li to možné, stanovit k_{25} (pro 25 °C) použitím Arrheniovy rovnice.

Pokud chování neodpovídá pseudoprvnímu řádu, viz 3. 1.

3 ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

3. 1 ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Zpráva o průběhu pokusu by měla pokud možno obsahovat tyto údaje:

- popis látky,
- výsledky získané s referenčními látkami,
- princip a detaily použité analytické metody,
- pro každý experiment : teplotu, pH, složení tlumivého roztoku, tabulku se všemi údaji koncentrace - čas,
- u reakci pseudoprvního řádu hodnoty k_{obs} a $t_{1/2}$ včetně metody výpočtu,
- u reakce, která neodpovídá pseudoprvnímu řádu, grafické znázornění vztahu logaritmu koncentrace proti času,
- všechny údaje a pozorování potřebné pro interpretaci výsledků

3. 2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Může existovat možnost vypočítat přijatelné hodnoty rychlostních konstant (při 25 °C) zkoušených látek za předpokladu, že pro podobné třídy látek již existují experimentální údaje pro aktivační energii a za předpokladu, že je možné očekávat, že aktivační energie zkoušené látky je stejné velikosti.

4 LITERATURA

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

PŘÍLOHA TLUMIVÉ ROZTOKY

A. CLARK A LUBS

Hodnoty pH, uvedené v tabulkách, byly vypočteny na záhadě měření potenciálu za použití Sørensenových standardních rovnic. Skutečné hodnoty pH leží o 0,04 jednotky nad hodnotami v tabulce.

Složení	pH
hydrogenftalát draselný (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
hydrogenftalát draselný (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 VLEESCHOUWER

Složení	pH
Monokaliumcitrát ((0,1 mol . l ⁻¹) a NaOH (0,1 mol . l ⁻¹) při 18 °C (je třeba přidat malý krystalek thymolu, aby se předešlo tvorbě plísni):	
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
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	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
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
9,00	1,00	9,36	9,42	9,18	8,94
8,00	2,00	9,50	9,57	9,30	9,02
7,00	3,00	9,68	9,76	9,44	9,12

VIII TOXICITA PRO ŽÍZALY - ZKOUŠKA NA UMĚLÉ PŮDĚ

1 METODA

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.

1.2 JEDNOTKY A DEFINICE

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

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

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

Jako referenční látka se doporučuje chloracetamid analytické čistoty

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.

1.5 KRITÉRIA KVALITY

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

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 Látky

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 voditelných 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 % uhličitany 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 umělá půda musí být zvlhčena tak, aby neobsahovala stojící vodu. Je třeba věnovat péči míšení, aby se dosáhlo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. Způsob 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.

1. 6. 1. 2 *Nádoby pro zkoušku*
Skleněné nádoby o obsahu asi jednoho litru (řáděně 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.

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.

1. 6. 3 **Pracovní postup**

Zkoušené koncentrace

Koncentrace zkoušené látky se vyjadřují jako hmotnost látky na hmotnost sušiny základního substrátu (mg 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 mg látky.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 žížalách.

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 žížalách. 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 žížal, které byly před použitím kondicionovány po 24 hodiny v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaveny 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. Žížaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žížaly 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 žížaly se znovu vloží na povrch téhož substrátu.

1. 6. 4 **Organismy použité ve zkoušce**

Ke zkoušce musí být použity dospělé žížaly *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.)

2 **VÝSLEDKY**

2. 1 **ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Uvedou se koncentrace zkoušené látky s odpovídajícím procentem mrtvých žížal.

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 koncentraci je pro výpočet 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} .

3 **ZPRÁVA**

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 LC_{50} ,
- výsledky zkoušky včetně všech použitých údajů,
- popis pozorovaných symptomů nebo změn v chování organismů použitých ve zkoušce,
- úhyn v kontrolních zkouškách,
- LC_{50} 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 z dřívějších zkoušek kontroly jakosti.

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 Han. London.
- (3) Bouche, M.B., 1972, Lombriciens de France, Écolo giect Systématique, Intitut 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, Verfah rensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in kunstlichem 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 zátoček 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 uhličitánem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mmhos nebo 0,5 % koncentraci solí).

Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrý.

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 BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST - ZAHN - WELLENSOVA METODA

1 METODA

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 zředovány v koncentracích odpovídajících hodnotám DOC nebo TOC od 50 do 400 mg.l⁻¹ nebo hodnotám CHSK 100 - 1 000 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.

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 zaokrouhluje 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).

1.3 STANDARDNÍ LÁTKY

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

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 difúzním světle nebo temnu. Rozklad je sledován denně nebo v jinak vhodné 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.

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.

1. 6 **POSTUP ZKOUŠENÍ**

1. 6. 1 **Příprava**

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 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 NH₄Cl p.a. 38,5 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O p.a. 33,4 g

KH₂PO₄ p.a. 8,5 g

K₂HPO₄ p.a. 21,75

Tento roztok slouží zároveň jako tlumič pH.

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 pórů 0,45 μm, který během filtrace neuvolňuje a neabsorbuje uhlík.

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

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.

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.

1. 6. 2 **Pracovní postup**

Kultivační nádoby se inkubují při difuzním světle nebo v tmavé komoře při teplotě 20 - 25 °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 hodnota 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 promývaném papírovém filtru. Prvních 5 ml filtrátu se vylévá. Kaly, které se špatně filtrují mohou být odděleny 10 min odstředěním. Stanovení NOC 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 grafů. 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 prodloužena 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 párují 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 přístrolem 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.

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. Takto 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.

3 ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

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 dávka s popisem,
- datum a zdroj odběru kalu, stav adaptace, použitá koncentrace atd.,
- vědecké odůvodnění případných změn v provedení zkoušky,

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 projevat 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.

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 84/449EWG (Amtsblatt den Europäischen Gemeinschaften Nr. L 251 vom 19. September

1984).

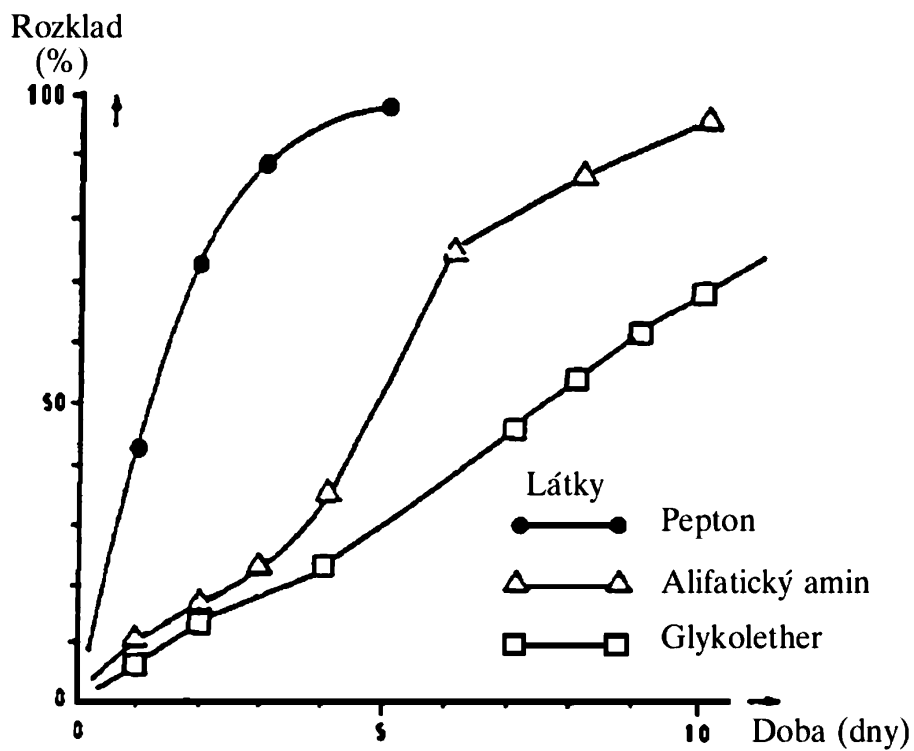
PŘÍLOHA PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

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

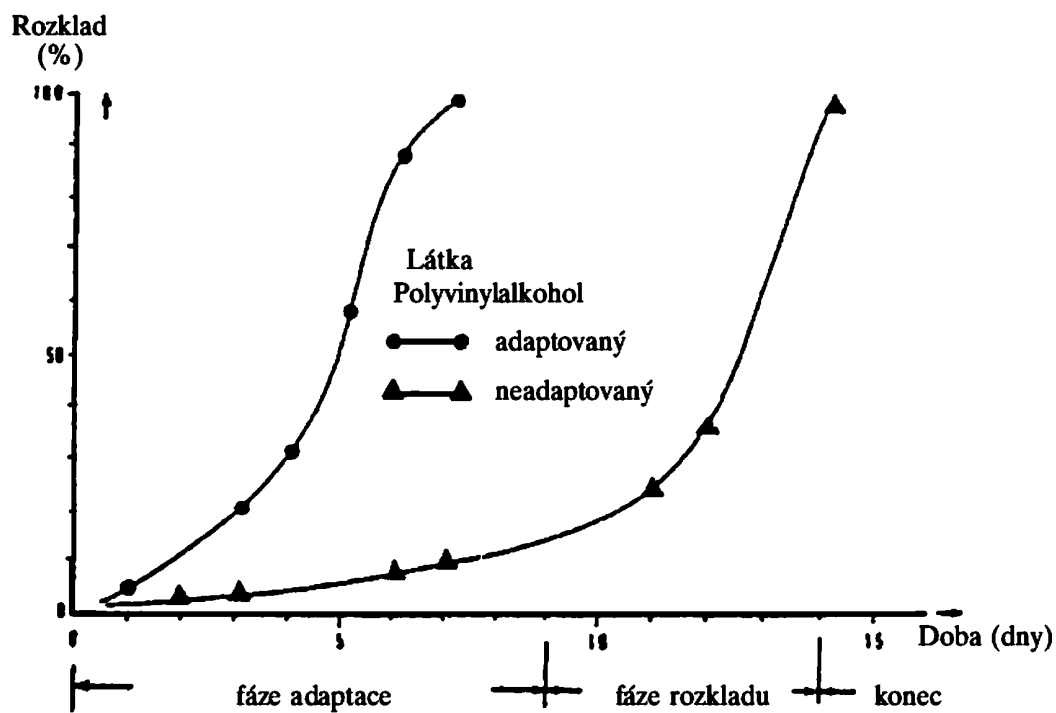
Doba zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	sl.p. mg.l ⁻¹	DOC mg.l ⁻¹	DOCn mg.l ⁻¹	Rozklad %	DOC mg.l ⁻¹	DOCn mg.l ⁻¹	Rozklad %
0	-	-	300	-	-	390	-
3 h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 den	6,1	288,3	282,3	6	373,3	367,2	6
2 dny	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dnů	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	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	20,2	2,0	99

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

Obrázek 1
Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2
Příklad adaptace kalu



X **BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST - SIMULAČNÍ ZKOUŠKA S AKTIVOVANÝM KALEM**

1 **METODA**

1. 1 **ÚVOD**

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.

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.

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.

1. 2 **DEFINICE A JEDNOTKY**

1. 2. 1 **Analýza DOC/CHSK**

Úbytek látky je vyjádřen vztahem:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \cdot 100\% \quad (1 a)$$

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,

E₀ = 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.

1. 2. 2 **Specifická analýza**

Procentuální odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_w) během udaného času prodlení:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \cdot 100\% \quad (1 b)$$

C₁ = koncentrace zkoušené látky v přítoku do zkušebního zařízení (v mg.l⁻¹) stanovená specifickou

analýzou,
 C_0 = koncentrace zkoušené látky na odtoku ze zkušebního zařízení (v mg.l^{-1}) stanovená specifickou analýzou,

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při zkoušení nových látek je někdy vhodné použít referenční látku. Specifické referenční látky doposud nejsou doporučeny.

1.4 PRINCIP ZKUŠEBNÍCH METOD

Ke stanovení úplné biologická rozložitelnosti se používají dvě paralelně pracující modelová zařízení s aktivovaným kalem (potvrzující zkouška OECD nebo zařízení s porézní 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.

1.5 KRITÉRIA KVALITY

Koncentrace zkoušené látky se volí s ohledem na druh analytické metody a její mez stanovitelnosti.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 Příprava

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 zjišťující 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 nádoby se čistí natočením na 24 hodin do roztoku chlornanu sodného a promytím pitnou vodou.

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.

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 · 7H ₂ O	2 mg
K ₂ HPO ₄	28 mg

Komunální odpadní vody:

Odebírají se čerstvé každý den z přeřadu mechanického stupně čistírny, která čistí převážně městské odpadní vody.

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.

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 vyleje. 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 nechlóvané pitné vody (nehodné jsou zeminy s vysokým obsahem jílu, písku a humusu). Po zamíchání se nechá suspenze 30 minut dekantovat. Kapalná fáze se přefiltruje, prvních 200 ml se vyleje. Filtrát se ihned provzdušňuje až do okamžiku použití. Inokulum je možné použít pouze ten den, kdy bylo připraveno.

Inokulum z povrchové vody:

Další díl směšného inokula se získává z mesosaprobních povrchovým vod.

Odebraný vzorek se filtruje, prvních 200 ml se vyleje. Až do okamžiku použití se filtrát udržuje v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito pouze ten den, kdy bylo připraveno.

Směšné inokulum se získá smísením a dobrým promícháním stejných objemových dílů všech tří dílčích inokulí. K očkování se používají nejméně 3 ml směšného 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.

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.

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.

Rozebňová fáze začíná první vsádkou zkoušené lásky a končí dobou, kdy naměřený úbytek zkoušené lásky dosáhne relativně konstantní hodnoty. Tato fáze by neměla trvat déle než 6 týdnů.

Hodnotící fáze je doba trvající 3 týdny od okamžiku kdy úbytek zkoušené lásky dosáhl relativně konstantní zpravidla vysoké, hodnoty. Pro látky, které se během šest týdnů trvající rozebňové 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 lásky do aerační nádoby se udržuje na rychlosti 1.h⁻¹ nebo 1/2 1.h⁻¹; doba zdržení tak dosáhne 3 h nebo 6 h.

Intenzita provzdušňování musí být regulována tak, aby se udržoval obsah aerační nádoby ve vznosu 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 vhodných způsobem.

Jestliže kal špatně sedimentuje lze zvýšit jeho hustotu přidávkem 2 ml 5% roztoku chloridu železného. 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 sestaví se 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 μ m. Prvních 20 ml filtrátu se vyleje.

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 kapalné fáze v sedimentační nádobě atd.) dvou jednotek dostatečně stabilní, může být zahájeno přidávání zkoušené lásky dle kap. 1. 6. 2. 2

do nátoku 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.

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 přimichává 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 natričného 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 i 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 aerobní nádoby druhého zařízení.

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 zvláště množství látky adsorbované na aktivovaný kal.

2 **DATA A VYHODNOCENÍ**

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)

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR}_c - DR_{ci})^2}{n-1}} \quad (4)$$

kde:

S_{DRc} = standardní odchylka,

\overline{DR}_c = průměr hodnot DR_{ci} ,

n = počet stanovení.

Odlehlé hodnoty DR_{ci} 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_{ci} :

Výsledek se vyjádří dle (5):

$$DR_c = \overline{DR}_c \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad (5)$$

kde

$t_{n-1; \alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot e a E_0 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_{ci} 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.

2.2 NESPŘAŽENÁ ZAŘÍZENÍ

Provozní výkon zařízení může být ověřen následovně:

% odstranění CHSK nebo DOC =

$= (CHSK \text{ nebo } DOC \text{ odp. vody} - CHSK \text{ nebo } DOC \text{ výtoku}) \cdot 100 / (CHSK \text{ nebo } DOC \text{ odp. vody})$

Vynášením denně naměřených úbytků do grafu se zdůrazní všechny trendy, např. adaptace.

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_0 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.

2. 2. 2

Použití výsledků specifické analýzy

Odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_w) v % se počítá podle 1. 2. 2.

3

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

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: sprážená nebo nespřážená 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.

3. 2

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

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.

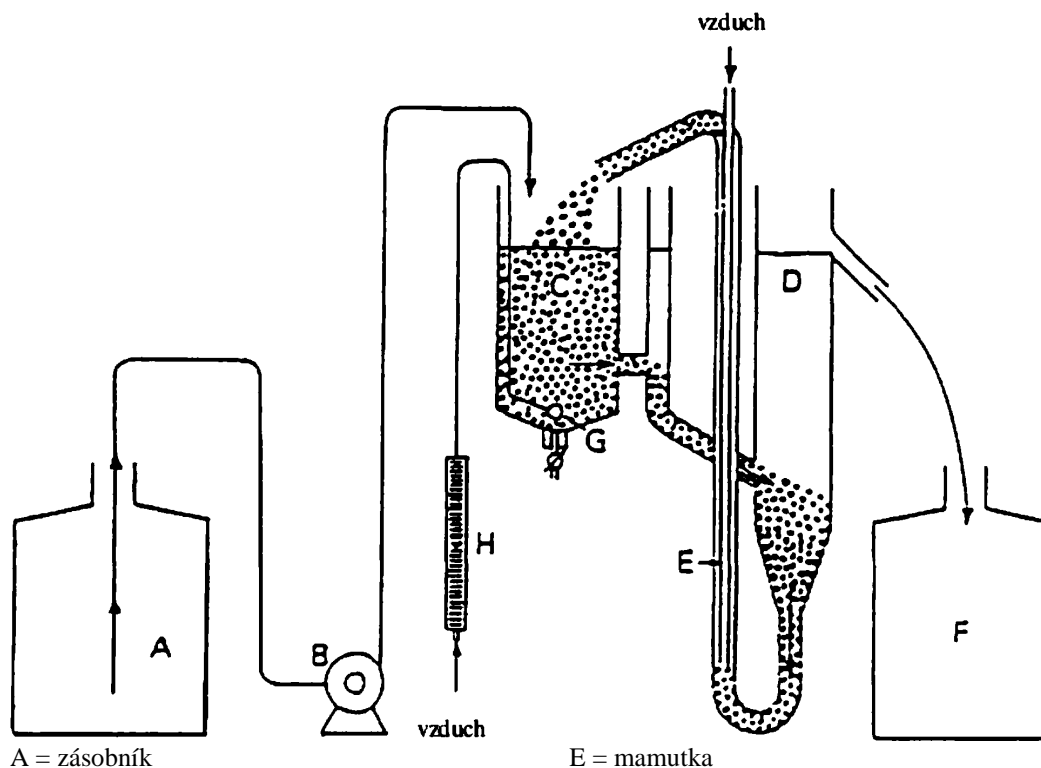
4

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

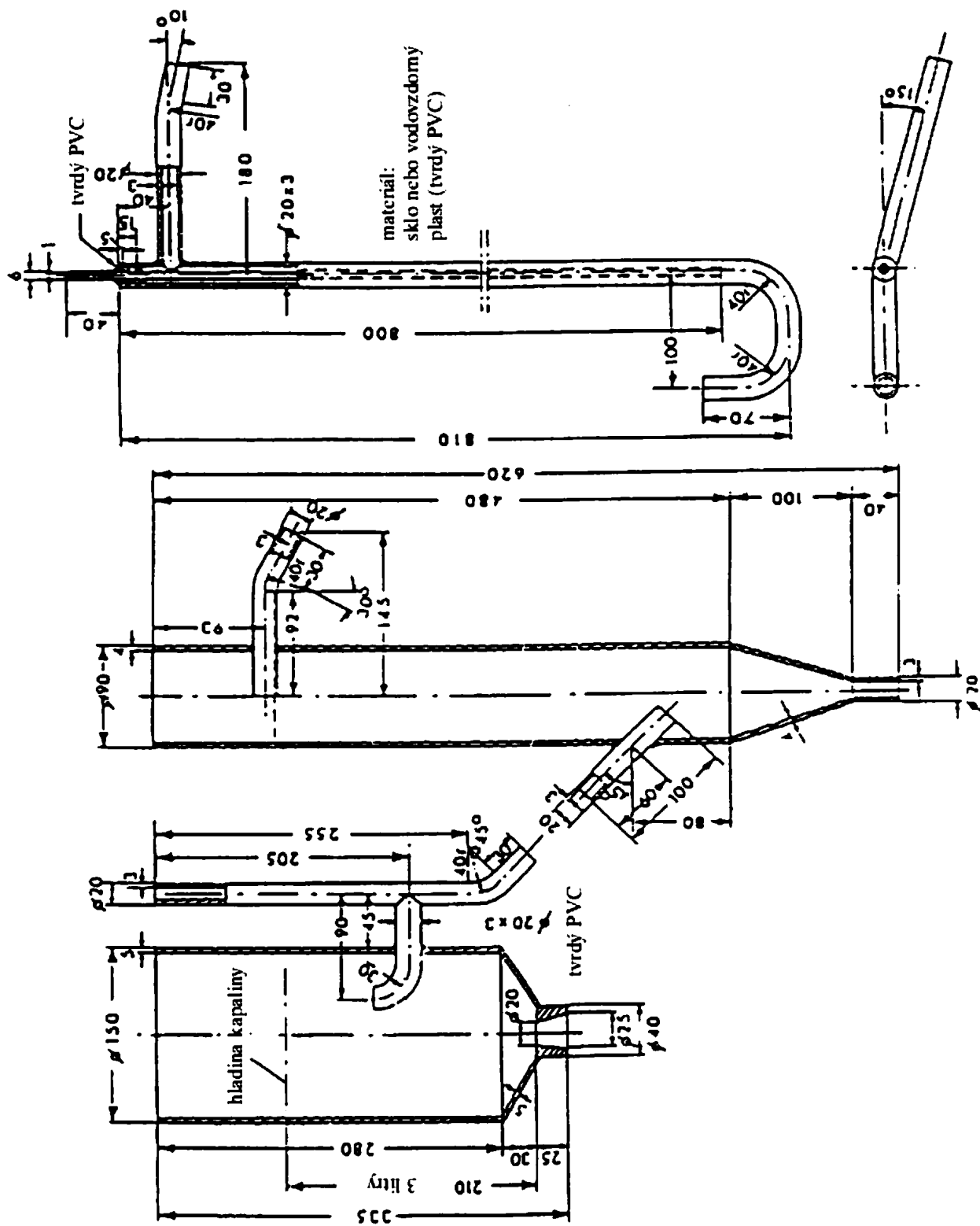
Obrázek 1



B = dávkovací zařízení
C = aeretační komora
D = sedimentační nádoba

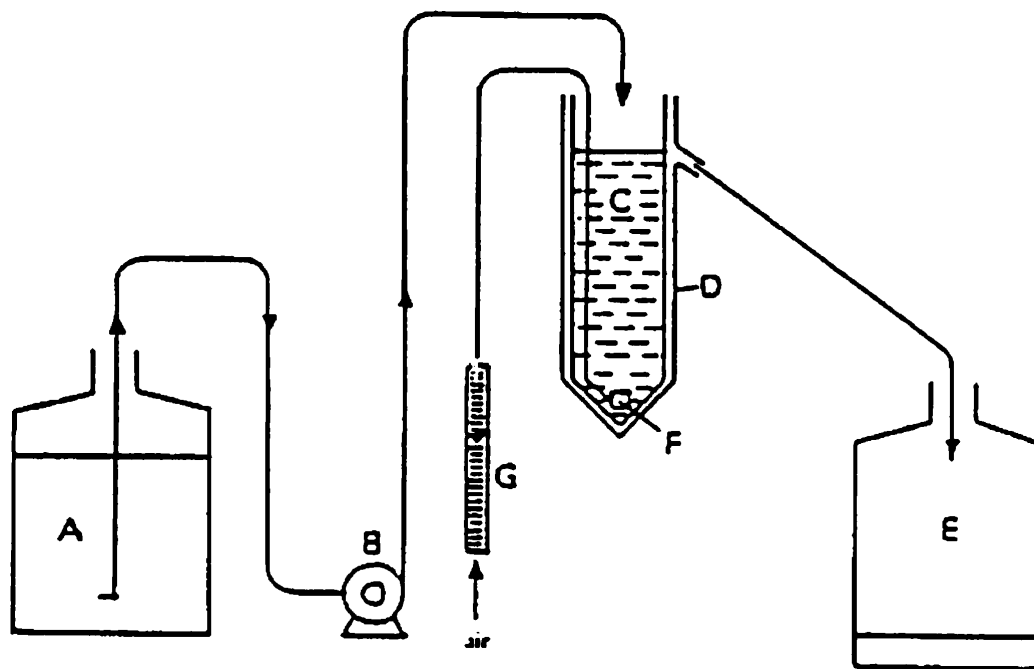
F = zásobník na výtok
G = aerátor
H = průtokoměr (nepovinné)

Obrázek 2



PŘÍLOHA 2

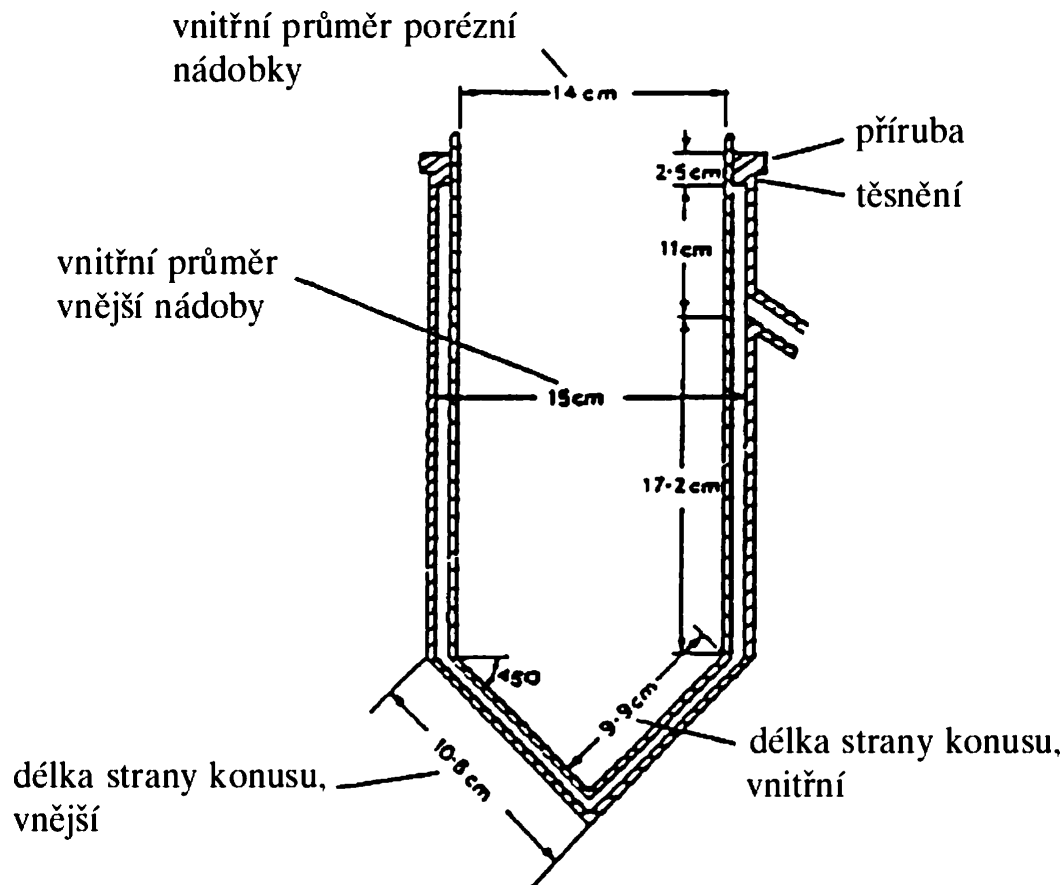
Obrázek 1
Zařízení používané pro stanovení biologické rozložitelnosti



A = zásobník
B = dávkovací čerpadlo
C = porézní aretační 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	<input type="checkbox"/>
zařízení s porézní nádobkou	<input type="checkbox"/>
Způsob provozu:	
samostatná jednotka	<input type="checkbox"/>
spřažená zařízení	<input type="checkbox"/>
nespřažená zařízení	<input type="checkbox"/>
Přeočkování:	
žádné	<input type="checkbox"/>
aktivované kalem	<input type="checkbox"/>
kapalnou fází vzniklou odsedimentováním	<input type="checkbox"/>
Střední doba zdržení:	
3 hodiny	<input type="checkbox"/>
6 hodin	<input type="checkbox"/>
Živné médium:	
komunální odpadní voda	<input type="checkbox"/>

syntetická odpadní voda

--

Inokulum:

z čistírny odpadních vod

--

směsné inokulum

--

aktivovaný kal

--

Přidání zkoušené látky:

na začátku

--

postupně

--

po vytvoření kalu

--

Analýzy:

specifická

--

CHSK

--

DOC

--

XI **BIOLOGICKÝ ROZKLAD - ZKOUŠKA INHIBICE DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU**

1 **METODA**

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 EC₅₀.

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,
- tenze par,
- strukturální vzorec,
- čistota zkoušené látky.

Doporučení:

Aktivovaný kal může obsahovat potenciálně patogenní organizmy a je třeba s ním zacházet opatrně.

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:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \cdot 100 = \% \text{inhibice}$$

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 popsaných v této metodě

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.

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 EC_{50} se vypočítá ze stanovení při různých koncentracích.

1. 5 **KRITÉRIA KVALITY**

Výsledky zkoušky jsou platné, jestliže:

- respirační rychlosti dvou kontrolních pokusů se od sebe liší nejvýše o 15 %,
- EC_{50} (pro 30 minut nebo pro 3 hodiny) 3,5-dichlorfenolu leží v přijatém rozmezí 5 - 30 $mg.l^{-1}$.

1. 6 **POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**

1. 6. 1 **Činidla**

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 $g.l^{-1}$.

1. 6. 1. 2 *Roztok zkoušené 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 H_2SO_4 do bodu začínajícího srážení (je třeba asi 8 ml 0,5 M H_2SO_4) a konečným doplněním směsi destilovanou vodou na 1 litr. pH musí potom ležet mezi 7 a 8.

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 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 2,9 g K_2HPO_4

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 přidavkem 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.

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.

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.

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, prost 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:	Roztok 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 15 minutových intervalech tak, že doba kontaktu v každé nádobě je tři hodiny.

Referenční látka se zkouší na každé dávce mikrobiálního inokula týmž 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).

2 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Rychlost dýchání se vypočítá ze záznamu zapisovače mezi přibližně na 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-normální (nebo logaritmicko- pravděpodobnostním) papíru a odečte se hodnota EC₅₀.

Standardními postupy je možné stanovit pro hodnoty EC₅₀ 95% meze spolehlivosti.

3 ZPRÁVA

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,
 - doba 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.

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.

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 MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS

1 METODA

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 kapalné 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 přečistění 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 vázku 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.

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:

$$D_{\text{da}} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \cdot 100 \quad (1)$$

kde D_{da} = rozklad/denní přídavek

2. Procentický úbytek D_{ssd} množství látky přítomného na začátku každého dne:

$$D_{\text{ssd}} = \frac{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{C_T + C_{t_i} - C_{c_i}} \cdot 100 \quad (2(a))$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \cdot 100 \quad (2(b))$$

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.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při studiu nové látky užitečné referenční látky. Pro tuto zkoušku není dosud žádná referenční látka stanovena.

Jsou uvedeny hodnoty pro několik sloučenin vyhodnocených v okružních zkouškách (viz příloha 1), takže je možné provést občasnou kalibraci metody a porovnat výsledky získané jinými metodami.

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 vychozí chemické látky v důsledku biologického rozkladu (primární biologický rozklad)

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 přesnost stanovení rozpuštěného organického uhlíku a obsahem zkoušené látky v kapalině na začátku každého cyklu.

1.6 POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU

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 prost 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 směrné kapaliny.

Zásobní roztoky zkoušené lásky 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.

1. 6. 2

Experimentální podmínky

Zkoušku je třeba provádět při 20 - 25 °C.

Používá se vysoká koncentrace aerobních mikroorganismů (1 - 4 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.

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 otevřou 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 sěrka 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 neméně 12 týdnů, avšak ne déle než 26 týdnů.

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).

3

ZPRÁVA

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.

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.

4 **LITERATURA**

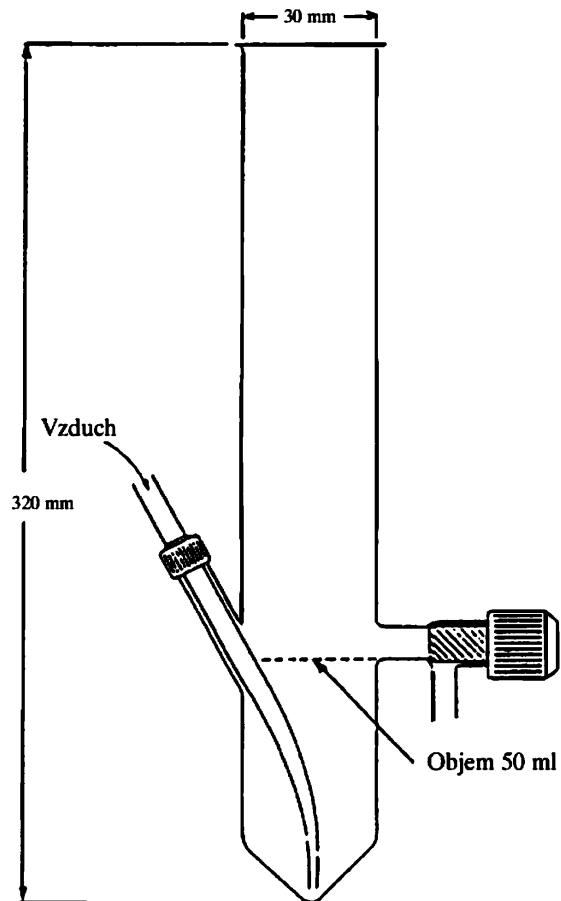
- (1) OECD, Paris, 1981. Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

PŘÍLOHA 1 **Zkouška SCAS: příklad výsledků**

Látka	C_T (mg.l^{-1})	$C_t - C_c$ (mg.l^{-1})	Procento biol. 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 - nitrofenodiethylenglykoll	16,9	0,8	95,3	40
diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40

anilin	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentantetra-karbohydrát	17,9	3,2	81,1	120

PŘÍLOHA 2
Příklad zkušební aparatury



XIII STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI NEIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK

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 kapitole 3.

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 přítok 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 kabelu. Množství vzduchu prošlé provzdušňovačem se sleduje průtokoměrem H.

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) a 10 ± 1 mg BiAS.

BiAS se extrahuje ze zkoušeného výrobku metodou uvedenou v kapitole 2.

Syntetická odpadní voda se připravuje denně čerstvá.

1. 4 PŘÍRAVA VZORKŮ

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.

1. 4. 2 Kombinované výrobky se analyzují na obsah BiAS, MBAS a mýdla. Musí se extrahovat alkoholem a separovat BiAS (viz kapitolu 2). Obsah BiAS v extraktu je nutné znát k přípravě syntetické odpadní vody.

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 $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. 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 seškrabáním 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.

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 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).

Zbytek 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 7,5 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).

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 zaokrouhlené 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.

PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA ZKOUŠENÝCH VZORKŮ

2.1 ÚVODNÍ POZNÁMKY

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 Kombinované detergenty	Žádné Extrakce alkoholem, následovaná separací neiontových povrchově aktivních látek na iontoměničích

Účelem extrakce alkoholem je odstranit nerozpuštěné a anorganické složky v komerčním výrobku, které by za určitých okolností mohly narušit zkoušky biologické rozložitelnosti.

2.1.2. Separace na iontoměničích

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 elučnic

činidel pro frakční eluci. Lze tak jedním postupem izolovat mýdlo a aniontové a neiontové povrchově aktivní látky.

2. 1. 3 **Analytická kontrola**

Po homogenizaci se stanoví koncentrace neiontových a aniontových 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.

2. 2 **PRINCIP**

Z homogenního vzorku (prášky, vysušené pasty a odparek) se získá etanolový extrakt, který obsahuje povrchově aktivní látky, mýdlo a další složky vzorku detergentu, rozpustné v alkoholu.

Etanolový 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.

2. 3 **ČINIDLA A VYBAVENÍ**

2. 3. 1 Deionizovaná voda.

2. 3. 2 Etanol, 95% (obj.) C₂H₅OH
(povolené denaturační prostředky methylethylketon nebo metanol).

2. 3. 3 Směs izopropanol/voda (50/50 obj.):
50 obj. dílů izopropanolu (CH₃CHOH.CH₃) a
50 obj. dílů vody (2. 3. 1).

2. 3. 4 Roztok hydrogenumičitanu amonného (60/40 obj.):
0,3 mol NH₄HCO₃ v 1000 ml směsi izopropanol/voda, tvořené 60 obj. díly izopropanolu a 40 obj. díly vody (2. 3. 1).

2. 3. 5 Katex (KAT). silně kyselý, odolný vůči alkoholu (50 - 109 mesh).

2. 3. 6 Anex (AAT), makroporézní, Merck Lewatit MP 7080 (70 - 150 mesh) nebo ekvivalentní.

2. 3. 7 Kyselina chlorovodíková, 10 % HCl (hm.).

2. 3. 8 2000 ml baňka s kulatým dnem se zabroušenou zátkou a zpětným chladičem.

2. 3. 9 Váčkový filtr (ohřívateľný) o průměru 90 mm na filtrační papíry.

2. 3. 10 2009 ml filtrační baňka.

2. 3. 11 Ionexové kolony s ohřívacím pláštěm a kohoutkem; vnitřní trubice průměru 69 mm a výšky 450 mm (obr. 4).

2. 3. 12 Vodní lázeň.

2. 3. 13 Vakuová sušárna.

2. 3. 14 Termostat.

2. 3. 15 Rotační odparka.

2. 4 **PŘÍPRAVA EXTRAKTU A SEPARACE NEIONTOVÝCH AKTIVNÍCH LÁTEK**

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.

2. 4. 2 **Izolace složek rozpustných v alkoholu**

250 g analyzovaného syntetického detergentu se přidá k 1250 ml etanolu, 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 etanolu. Filtrát a etanol 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 neiontové povrchově aktivní látky a 35 g mýdla. Tento odvážený vzorek se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 500 ml etanolu a postupuje se výše popsaným způsobem.

V případě prášků o nízké sytné hustotě (< 300 g.l⁻¹) se doporučuje zvýšit podíl etanolu na poměr 20:1. Etanolový filtrát se odpaří do sucha, nejlépe v rotační odparce. Je-li třeba většího množství extraktů, postup se opakuje. Odparek se rozpustí v 5000 ml směsi izopropanol/voda.

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 sleje a pomocí deionizované vody se pryskyřice převede do kolony (2. 3.11). V koloně musí být zátka 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.

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 rychlost 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 kapitole 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).

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 neiontových povrchově aktivních látek (test s metylenovou modří). Poté se anex promyje 2000 ml směsí izopropanol/voda (2. 3 . 3). Anex je opět připraven k provozu.

STANOVENÍ NEIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK V ROZTOCÍCH PŘI ZKOUŠCE BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

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 etylnatém.

Po oddělení fázi 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 vinanu amonného. Vismut v roztoku se ztitruje 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.

3. 2 **ČINIDLA A VYBAVENÍ**

Pro přípravu činidel se používá deionizovaná voda.

3. 2. 1 Čistý octan etylnatý, čerstvě předestilovaný.

3. 2. 2 Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃) p.a.

3. 2. 3 Zředěná kyselina chlorovodíková (20 ml koncentrované kyseliny (HCl) zředěné vodou na 1000 ml).

3. 2. 4 Methanol p.a., čerstvě předestilovaný, přechovávaný ve skleněné lahvi.

3. 2. 5 Bromkrezolová červec, 0,1 g ve 100 ml ethanolu.

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. (BiONO₃. H₂O) 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.

3. 2. 6. 2 **R o z t o k B**

290 g chloridu barnatého (BaCl₂. 2H₂O) p.a. se rozpustí v 1000 ml vody.

3. 2. 7 Ledová kyselina octová 99 - 100 % (nižší koncentrace nejsou vhodné)
3. 2. 8 Roztok vínanu amonného: 12,4 g kyseliny vinné p.a. a 12,4 ml roztoku amoniaku p.a. ($d = 0,910 \text{ g.ml}^{-1}$) se smísí a doplní vodou na 1000 ml (nebo se použije ekvivalentní množství vínanu amonného p.a.)
3. 2. 9 Zředěný roztok amoniaku: 40 ml roztoku amoniaku p.a. ($d = 0,910 \text{ g.ml}^{-1}$) se zředí vodou na 1000 ml.
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.
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.
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 měďatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 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.
3. 2. 13 Chlorid sodný p. a.
3. 2. 14 Přístroj pro stripování plynem (viz obr. 5)
Průměr porézního (fritového) kotouče musí být stejný jako vnitřní průměr válce.
3. 2. 15 Dělicí nálevka 250 ml
3. 2. 16 Magnetické míchadlo s magnetem 25 - 30 mm,
3. 2. 17 Goochův kelímek, průměr perforovaného dna = 25 mm, typ G 4.
3. 2. 18 Kruhové papírové filtry se skelným vláknem o průměru 27 mm s průměrem vlákna 0,5 - 1,5 μm .
3. 2. 19 Dvě filtrační baňky s adaptéry a pryžovými manžetami, 500 a 250 ml.
3. 2. 20 Registrační potenciometr, vybavený hladkou platinovou indikační elektrodou a kalomelovou nebo sřibro/chloridostřibrnou referenční elektrodou o rozsahu 250 mV, s automatickou byretou o objemu 20 - 25 ml, nebo odpovídajícím zařízením s ruční obsluhou.

3. 3 METODA

3. 3. 1 Koncentrace a separace povrchově aktivní látky

Vodný roztok se zfiltruje přes jakostní filtrační papír. Prvních 100 ml filtrátu se vyleje.

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 rozpouštěním ve vodě většímu než 10%, 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.

3. 3. 2 **Srážení a filtrace**

Suchý odparek dle 3. 3. 1 se rozpustí v 5 ml metanolu, 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).

Sraženina se vytvoří po opakovaném míchání. Po 10 minutách míchání se směs nechá nejméně pět minut stát.

Směs se zfiltruje přes Goochův kelímeček, 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 kelímeček ledovou kyselinou octovou, již je třeba asi 40 - 50 ml. Sraženinu ulpělou 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.

3. 3. 3 **Rožpuštění 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 odsátním 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.

3. 3. 4 **Titrace**

Roztok se promíchá magnetickým míchadlem (3. 2. 1. 6), přidá se několik kapek bromkrezolové červení (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).

3. 3. 5 **Slepá stanovení**

Souběžně s celým postupem se provádí slepé stanovení s 5 ml metanolu 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.

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 ztitruje 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.

3. 4 **VÝPOČET VÝSLEDKŮ**

Každá neiontová poruchově aktivní látka má svůj vlastní faktor, závislý na jejím složení, zejména na délce alkenoxidového řetězce. Koncentrace neiontové povrchové 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),

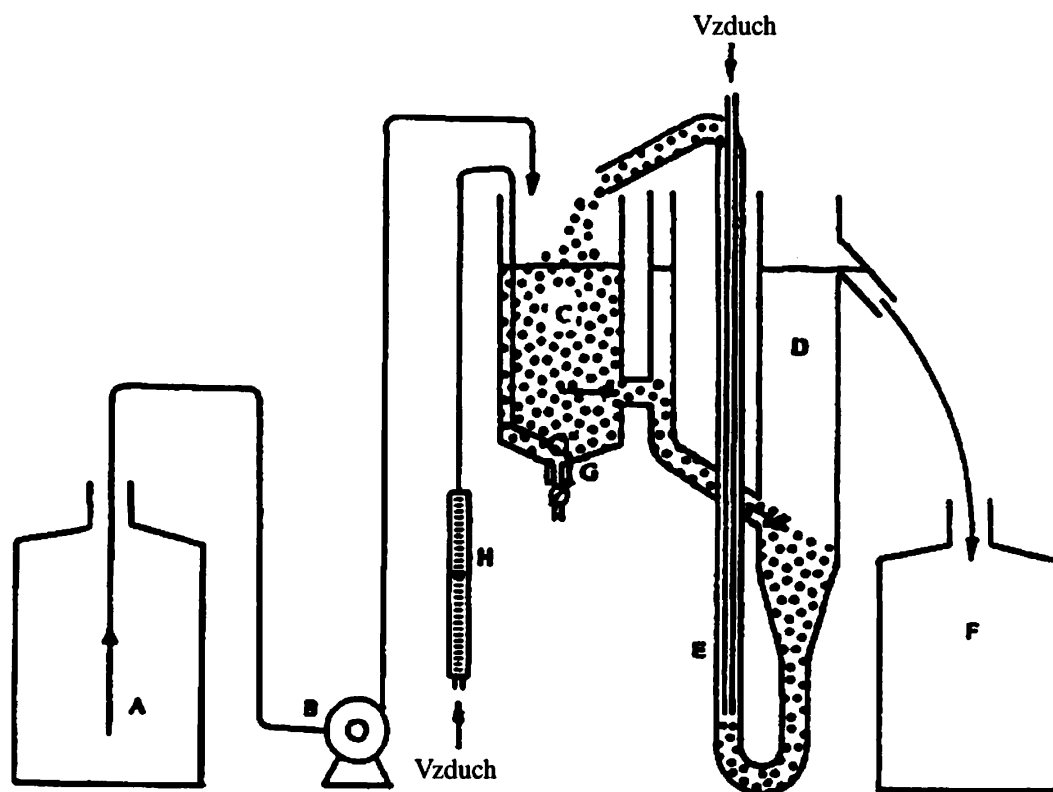
c = objem „karbátového roztoku“, spotřebovaného při slepém stanovení (ml),

f = faktor „karbátového roztoku“.

3. 5 **VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky se vyjádří v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ jako NP 10 zaokrouhleně na nejbližší 0,1.

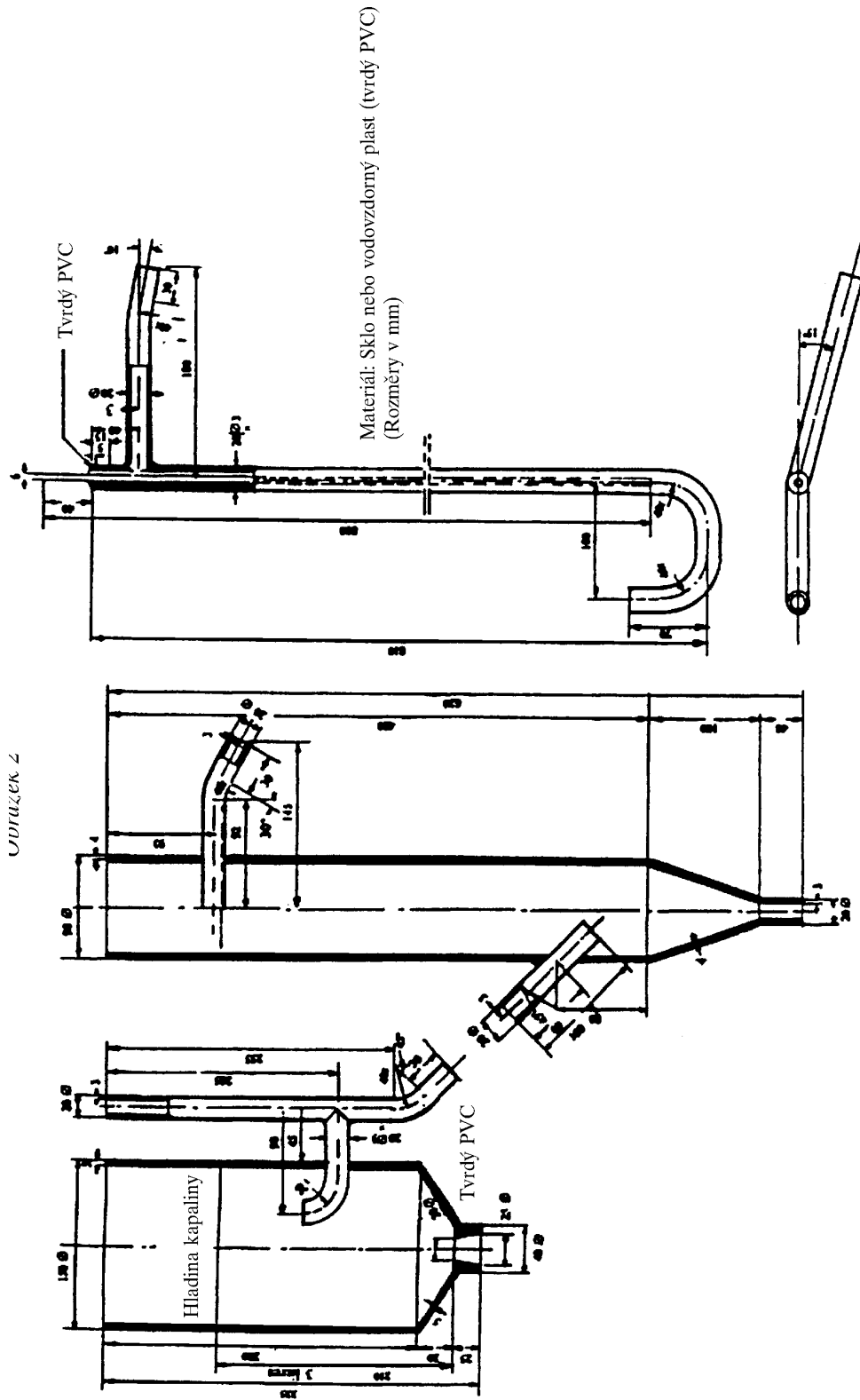
Obrázek 1



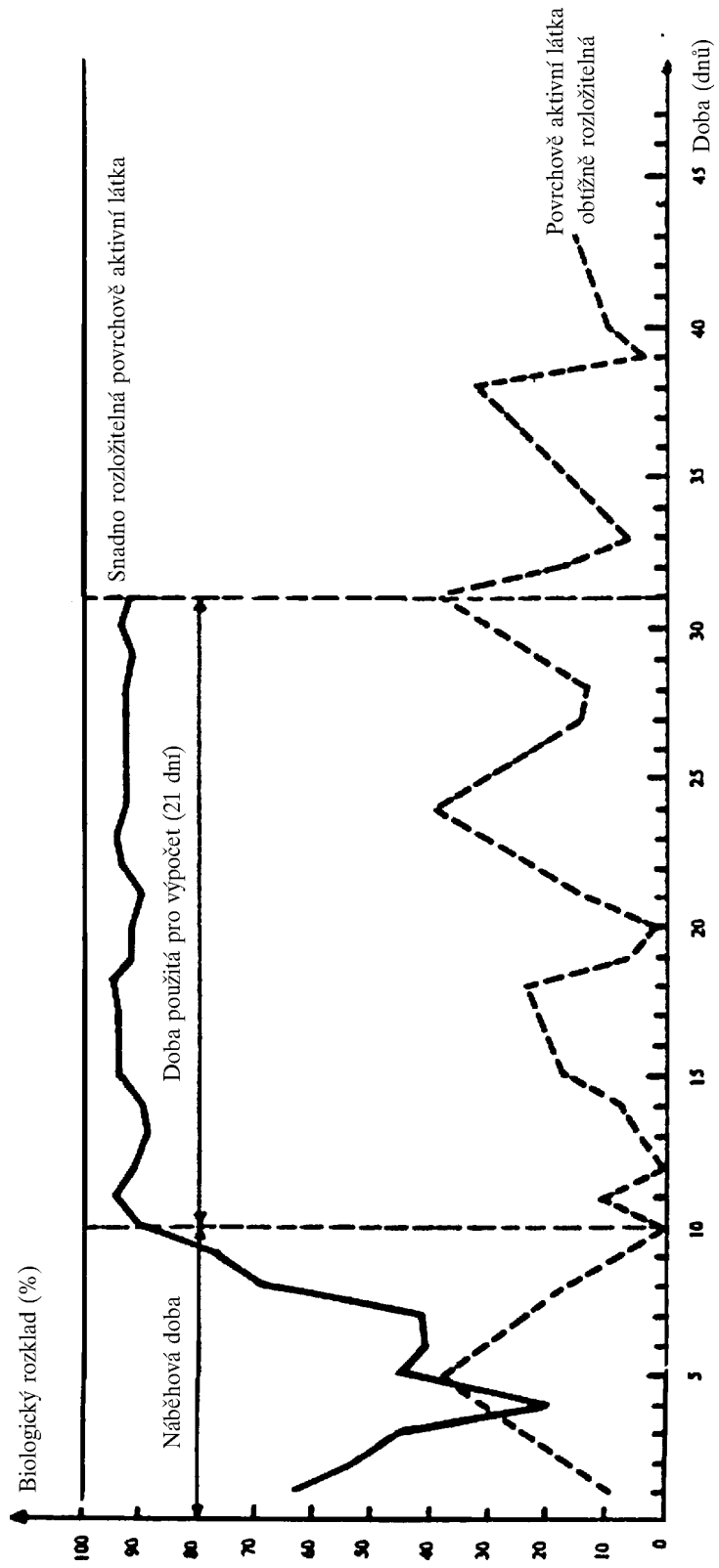
A - Zásobní nádoba
B - Dávkovací zařízení
C - Provzdušňovací komora
D - Usazovací nádoba

E - Mamutka
F - Sběrná nádoba
G - Provzdušňovač
H - Průtokoměr vzduchu

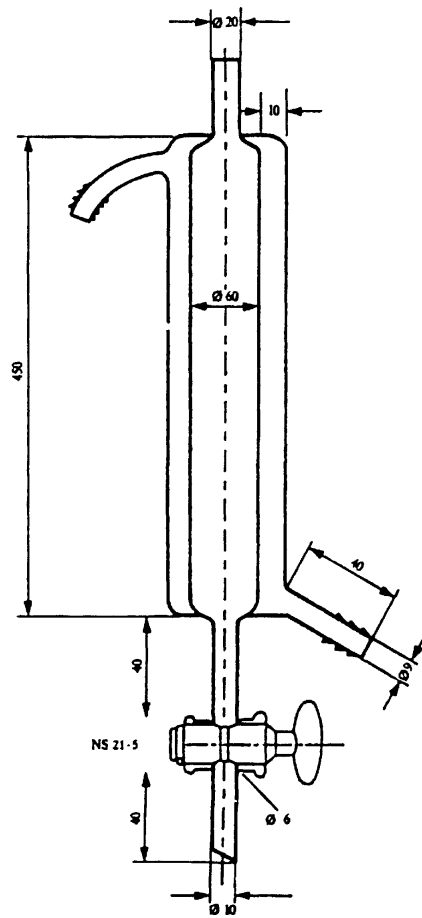
Obrázek 2



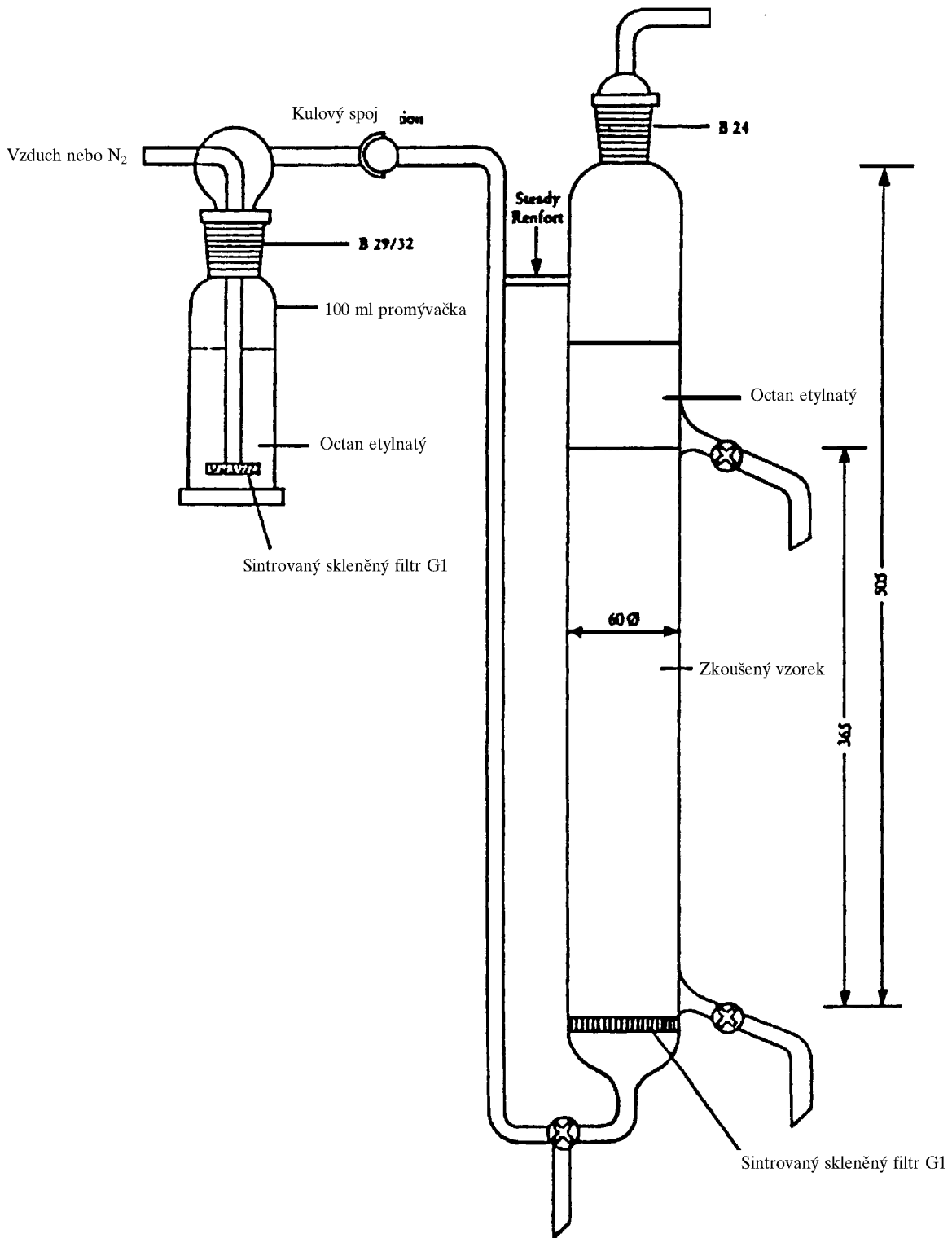
Obrázek 3
Výpočet biologické rozložitelnosti - Potvrzující zkouška



Obrázek 4
Vyhřívaná ionexová kolona
(Rozměry v mm)



Obrázek 5
Zařízení pro stripování plynem
(Rozměry v mm)



XIV STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANIONTOVÝCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK

1. 1 ZAŘÍZENÍ POTŘEBNÉ PRO MĚŘENÍ

Měřicí metoda používá malé zařízení zpracovávající aktivovaný kal, znázorněné na obrázku 1 a podrobněji na obrázku 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.

1. 2 SYNTETICKÁ ODPADNÍ VODA

Pro zkoušku se používá syntetická odpadní voda, připravovaná denně v množství 241 roztoku, který v každém litru vodovodní vody obsahuje následující látky:

- 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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),
- 20 + 2 mg látky aktivní na methylenovou modř (MBAS)

MBAS se extrahuje ze zkoušeného výrobku postupům popsaným v kapitole (2. 1. 2). Syntetická odpadní voda se připravuje denně čerstvá.

1. 3 PŘÍPRAVA VZORKŮ

1. 3. 1 Základní výrobek, obsahující pouze MBAS, může být zkoušen v původním stavu. Pro přípravu zkušebního roztoku (M) musí být stanoven obsah MBAS.

1. 3. 2 Kombinované výrobky se analyzují na obsah MBAS a mýdla. Musí se extrahovat alkoholem v souladu s následujícími podmínkami:

1. 3. 2. 1 Isopropanolová extrakce, jestliže vzorek obsahuje méně mýdla než MBAS (viz kapitola 2).

1. 3. 2. 2 Isopropanolová extrakce a odstranění mýdla, jestliže vzorek obsahuje více mýdla než MBAS (viz kapitola 2). Pro přípravu zkušebních roztoků (M) musí být znám obsah MBAS v obou extraktech.

1. 4 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, byl 3 litry. 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 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pěnění je nutné předcházet vhodnými prostředky.

Nesmějí se používat činidla proti pěnění, 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 nashromáždí kolem horní části provzdušňovací nádoby C, na dně usazovací nádoby Q nebo V cikulačním okruhu, je nutné vracet do cirkulace

nejméně jednou denně seškrabáním kartáčem nebo jiným vhodným způsobem, Pokud se kal neusazuje, je možné zvýšit jeho hustotu přidávkou 2 ml dávek 5 % roztoku chloridu železitého, opakovaných podle potřeby.

Voda odtékající z usazovací nádoby D se shromažďuje v nádobě F při dobu 24 hodin, po této době se po důkladném promísení odebere vzorek.

Nádoby F je pak nutno pečlivě vyčistit.

1. 5 **KONTROLA MĚŘÍCIHO 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 stejnou metodou co nejdříve po shromáždění. Koncentrace musí být stanovena s přesností na 0,1 mg.l⁻¹ MBAS.

Pro kontrolu účinnosti probíhajícího procesu se nejméně dvakrát týdně ve filtrované syntetické odpadní vodě, stejně tak jako v odtokové vodě, shromažďované v nádobě F, změří chemická spotřeba kyslíku (CHSK). Úbytek CHSK se vyjadřuje v procentech.

Úbytek CHSK je ustálen, když se dosáhne přibližně pravidelného denního rozkladu MBAS, tzn. na konci záběhové doby, jak znázorňuje obrázek 3.

Ztráta žíháním sušiny aktivovaného kalu v provzdušňovací nádobě by měla být stanovena dvakrát týdně (v g.l⁻¹). Je-li hodnota vyšší než 2,5 mg.l⁻¹, nadbytečný aktivovaný kal může být odstraněn.

Zkouška se provádí při pokojové teplotě; tato musí být stálá a nesmí klesnout pod 18 °C ani přesáhnout 30 °C.

1. 6 **VÝPOČET BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI**

Každý den se počítají procenta rozkladu MBAS na záhadě stanoveného obsahu MBAS 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 ukázáno na obrázku 3 (poznámka 1. 7. 2).

Rozložitelnost MBAS se vypočte jako aritmetický průměr hodnot získaných během 21 dní, které následují po záběhové době, během nichž byl rozklad pravidelný a provoz zařízení bezporuchový. V žádném případě nemá trvání záběhové doby přesáhnout šest týdnů

1. 7 **POZNÁMKY**

1. 7. 1 Při stanovení biologické rozložitelnosti zohledňují některé předpisy obsah mýdla.

1. 7. 2 V některých případech je možné připustit nižší frekvenci odběru vzorků, např. 1 vzorek za každé dva až tři dny, avšak pro výpočet průměrné hodnoty je třeba použít nejméně 14 výsledků, získaných během 21 dní následujících po záběhové době.

PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA ZKOUŠENÝCH VÝROBKŮ

2. 1 **ALKOHOLICKÝ EXTRAKT**

Účelem extrakce je oddělit z komerčního výrobku nerozpustné a anorganické složky, které by mohly za určitých podmínek narušit zkoušky biologické rozložitelnosti.

Kvantitativní oddělení těchto složek není nutné, není nutná ani kvantitativní extrakce aktivních složek. Je však třeba, aby nejméně 90 % složek aktivních k methylenové modři, z výrobku, který má být zkoušen, bylo zkoncentrováno v extraktu.

Pro přípravu alkoholových extraktů jsou vhodné dvě metody, jedna používající ethanol a druhá používající izopropanol. Izopropanolová metoda je zvláště vhodná, jestliže se jedná o velká množství materiálu, jak vyjadřuje potvrzující zkouška.

2. 1. 1 **Ethanolový extrakt**

2. 1. 1. 1 *Příprava vzorků*

(i) Prášky

Připraví se přibližně 250 g vzorku buď, kvartováním nebo podle Doporučení ISO č. 607.

Vzorek se rozdrtí na domácím rotačním mlýnku tak, aby výsledné částice prachu nebyly větší než 250 mikronů.

Prášek se opatrně promísí a uloží do vhodného obalu.

(ii) Kapaliny

Odváží se asi 40 g homogenizované látky s přesností na 1g a přeneše se do baňky s kulatým dnem, popsané v 2. 1. 1. 2 (iii) níže.

Přidá se 50 ml ethanolu (2. 1. 1. 2) (ii) a odpařuje se na vodní lázni do sucha za současného odsávání těkavých zplodin tak dlouho, až dvě následná vážení se neliší více než o 0,1 g. K vážení může být použita jakákoliv váha s přesností 0,01 g.

2. 1. 1. 2 *Příprava roztoku v ethanolu*

(i) Princip

Ethanolová extrakce dostatečného množství látky pro stanovení obsahu mýdla nebo jiných aniontů nebo pro biologické zkoušky.

(ii) Činidlo 95 % - 96 % ethanol.

(iii) Vybavení

Běžné laboratorní vybavení, které obsahuje především:

baňku objemu 1 l s kulatým dnem, krátkým hrdlem a zábrusem 29/32;

vertikální chladič se zábrusem 29/32 o délce 400 mm;

fritový filtr 10 - 20 mikronů;

odměrnou baňku o objemu 1l.

2. 1. 1. 3 *Postup*

Známa navážka E (tj. 40 g \pm 1 g) látky (2. 1. 1. 1 (i)) se nasype do 1 litrové baňky nebo se použije suchý extrakt, připravený dle 2. 1. 1.1 (ii).

Přidá se 500 ml ethanolu (2.1. 1. 2 (ii)), připojí se chladič a vaří se po dobu 15 minut. Poté se dekantuje kapalná vrstva a horká se odsaje přes fritový filtr. Tento postup se aplikuje na zbytky v baňce 2 x, k čemuž se použije dvou dávek po 200 ml ethanolu. Extrakty se spojí kvantitativně s oplachy filtru v odměrné bažice, doplní do 1 litru ethanolem a opatrně se promísí.

2. 1. 2 **Isopropanolový extrakt**

Potřebné množství, které odpovídá asi 50 g MBAS v extraktu, se vypočítá z obsahu MBAS v komerčním výrobku. Toto množství je dostačující pro dvě potvrzující zkoušky.

2. 1. 2. 1 *Vybavení*

Podle rozsahu stanovení:

Nádoby: objem 3 - 25 litrů, např. dlouhohrdlé lahve nebo smaltované nádoby.

Míchačky: rychloběžná míchadla vrtulového nebo kuličkového typu.

Odsávací nálevky (Büchner): až do průměru 30 cm.

Odsávací baňky: až do objemu 20 litrů.

Dělicí nálevky: až do objemu 20 litrů.

Destilační baňky: až do objemu 10 litrů.

Jímací baňky: až do objemu 10 litrů.

Porcelánové misky: o průměru okolo 20 cm.

Destilační kolony, chladiče, vodní lázně.

2. 1. 2. 2 *Činidla*

Destilovaná nebo domineralizovaná voda.
Isopropanol, čistý.
Uhličitan draselný (K_2CO_3), chemicky čistý.
Hydroxid draselný (KOH), 10 %-ní roztok.
Siřičitan sodný (Na_2SO_3), čistý, bezvodý.

2. 1. 2. 3 *Postup*

(i) Předběžná úprava

Pevné komerční výrobky: smísí se s destilovanou vodou (2.1.2. 4 (i)) na jemnou pastu za účelem rozrušení jakýchkoliv struktur přítomných v pastě (míchá se 10 minut). Na každých 10 g použité vody se přidá 60 g uhličitanu draselného a stále se míchá (10 minut) do rozpuštění.

Kapalné nebo polokapalné komerční výrobky: Upravují se v podstatě stejným způsobem jako pevné výrobky. Kapalný podíl odpařený na vodní lázni, který se stanoví předběžnou zkouškou na přibližně 10 g látky, se považuje za obsah vody, i když jsou zde přítomna těkavá organická rozpouštědla. Množství přidaného uhličitanu draselného bude záviset na obsahu vody, stanoveném, jak je uvedeno výše.

Kyselé suspenze nebo roztoky: neutralizují se přidáním 10%-ního roztoku hydroxidu draselného ještě před přidáním uhličitanu draselného. Komerční výrobky obsahující volný chlor: odstraní se přidávkem siřičitanu sodného k vodné suspenzi nebo roztoku před neutralizací. Nadbytek siřičitanu sodného není škodlivý.

(ii) Extrakce

Přidá se isopropanol, směs se míchá po dobu 30 minut a zfiltruje se odsátím.

Opakovaně se opláchne zbytek na filtru malým množstvím isopropanolu. Filtrát, který se musí v každém případě rozdělit do 2 vrstev v odsávací baňce, se spláchne pomocí isopropanolu do dělicí baňky. Spodní vodná vrstva se odpustí a odstraní: vrchní isopropanolová vrstva se zfiltruje přes skládaný filtr do destilační baňky a poté pokud možno kvantitativně oddestiluje na vodní lázni (2. 1. 2. 4 (iii)). Destilační zbytky se převedou kvantitativně opláchnutím isopropanolem do porcelánové misky a na vodní lázni se obsah za častého míchání zahustí. Zahušťovací proces pokračuje tak dlouho, až následná dvě vážení v rozmezí 1 hodiny nevykazují rozdíl větší než 10 g. Extrakt se rozpustí ve vodě na vodní lázni a v tomto roztoku se stanoví obsah MBAS.

Potom

$((\text{g MBAS v roztoku extraktu}) / (\text{g MBAS v komerčním roztoku})) \cdot 100 = \text{extrakční výtěžek v \% g C}$

2. 1. 2. 4 *Poznámky*

Při provádění extrakce je třeba vzít v úvahu:

(i) Rozdílnost komerčních výrobků je taková, že nelze specifikovat optimální relativní poměry vody a isopropanolu, které se mají použít při zkoušení daného výrobku, protože se mění případ od případu. Nicméně zkušenosti ukázaly, že potřebná množství vody jsou v následujících poměrech:

komerční výrobek (hm. díly)	voda (obj. díly)	isopropanol (obj. díly)
1	0,5 - 2	1 - 2,5

V podstatě však horní limity pro vodu a isopropanol neexistují.

Čím více látky má tendenci se shlukovat do suspenze, tím více je třeba přidat vody; vodu je třeba přidávat, dokud je při míchání na dně sediment.

Objem isopropanolu nemá být menší než uvádí následující vztah:

$$\text{komerční výrobek} : \text{isopropanol} = 1 : 1$$

Větší objem isopropanolu je třeba, jestliže obsah MBAS v komerčním výrobku značně přesáhne 10 %, nebo jestliže při míchání dojde k rychlému oddělení isopropanolové a vodné fáze.

(ii) Vodná fáze musí být nasycena uhličitánem draselným; malý nadbytek není škodlivý. Jestliže koncentrace uhličitánu draselného je příliš malá, pak se fáze buď neoddělí nebo isopropanolová fáze obsahuje příliš mnoho vody, což obojí má nežádoucí vliv na extrakční proces.

(iii) Isopropanolový destilát obsahuje vodu a musí být nasycen uhičitánem draselným; spodní vrstva, která se oddělá musí být odstraněna. Isopropanol který zůstal, může být použit pro čerstvou extrakci. Destiláty, získané při zkoušení kapalných komerčních výrobků se nesmí použít s ohledem na možnou přítomnost jiných rozpouštědel.

2. 2 ODDĚLOVÁNÍ MÝDLA Z ISOPROPANOLU

Zkoušení biologické rozložitelnosti MBAS u komerčních výrobků může být zkráceno, i když se použije isopropanolový (IPA) extrakt. Křivky rozkladu snadno se rozkládajícího MBAS se pak mohou zdát podobné těm, které odpovídají nízké rozložitelnosti TBS. Před zkoušením rozložitelnosti MBAS je nutné oddělit z alkoholického extraktu rušivé mýdlo. Tento postup je určen k zabezpečení preparačního odstraňování dosti velkého množství mýdla z IPA extraktu. Získaný extrakt je používán jen pro zkoušení rozkladu MBAS a nesmí být použit pro další analytická stanovení a separace.

2. 2. 1 Princip oddělování mýdla

Dostatečné množství IPA extraktu k získání nejméně 25 g MBAS se rozpustí v methanolu. Roztok se okyslí kyselinou chlorovodíkovou, aby se uvolnily mastné kyseliny obsažené v mýdle. Po přidání vody v poměru 80 : 20 methanol/voda se mastné kyseliny extrahují petroléterem a extrakt se odstraní. Fáze metanol/voda se opět zalkalizuje a odpaří se do sucha.

Suchý zbytek se po stanovení obsahu MBAS použije přímo pro zkoušku rozložitelnosti.

2. 2. 2 Postup

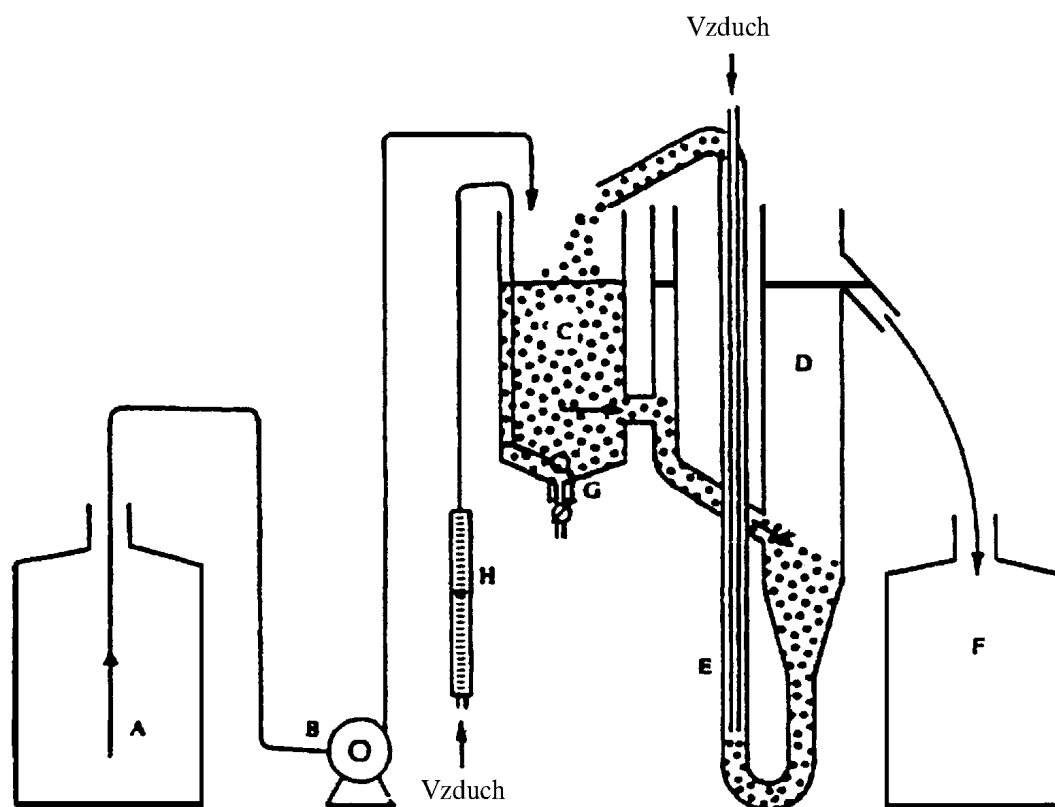
Ve 2litrové Erlenmayerově baňce se rozpustí za mírného zahřívání množství IPA extraktu obsahující nejméně 30 g MBAS v přibližně 100 ml methanolu. Po přidání celkem 800 ml methanolu se přidá 5 - 10 kapek roztoku bromfenolové modři (0,04%) a titruje se na pH 3 (žluté zbarvení) 2 M roztokem kyseliny chlorovodíkové. Po započtení objemu přidané kyseliny chlorovodíkové se doplní destilovanou vodou na celkový objem 1 litru.

Roztok bromfenolové modři: 0,4 g bromfenolové modři se rozpustí ve 200 ml 96%ního ethanolu a doplní se destilovanou vodou do 1 litru.

Za účelem extrakce mastných kyselin se protřepe roztok v dělicí nálevce odpovídající velikosti jednou s 300 ml a dvakrát s 200 ml n-hexanu. Je-li to nutné, může se extrakce provést v několika malých dělicích nálevkách. Když se objeví zakalené přechodné vrstvy, přidají se ke spodní fáze v prvních dvou extrakcích a k vrchní fáze poslední extrakce. Jestliže střední objem roztoku není dostačující pro rozpouštění a extrakci v případě velmi vysokého obsahu mýdla, může se použít odpovídající násobek. n-hexanové frakce se spojí a promyjí se 200 ml směsí methanol-voda (80:20). Zakalené přechodné vrstvy se zachytí v n-hexanové fázi, která se odstraní.

Metanol-vodná fáze se spojí a titruje se na pH 9 1M roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein. Roztok se zahušťuje na vodní lázni tak dlouho, až se metanol odpaří a extrakt se na vodní lázni znovu rozpustí ve vodě. Obsah MBAS tohoto roztoku se stanoví pomocí výše popsané metody.

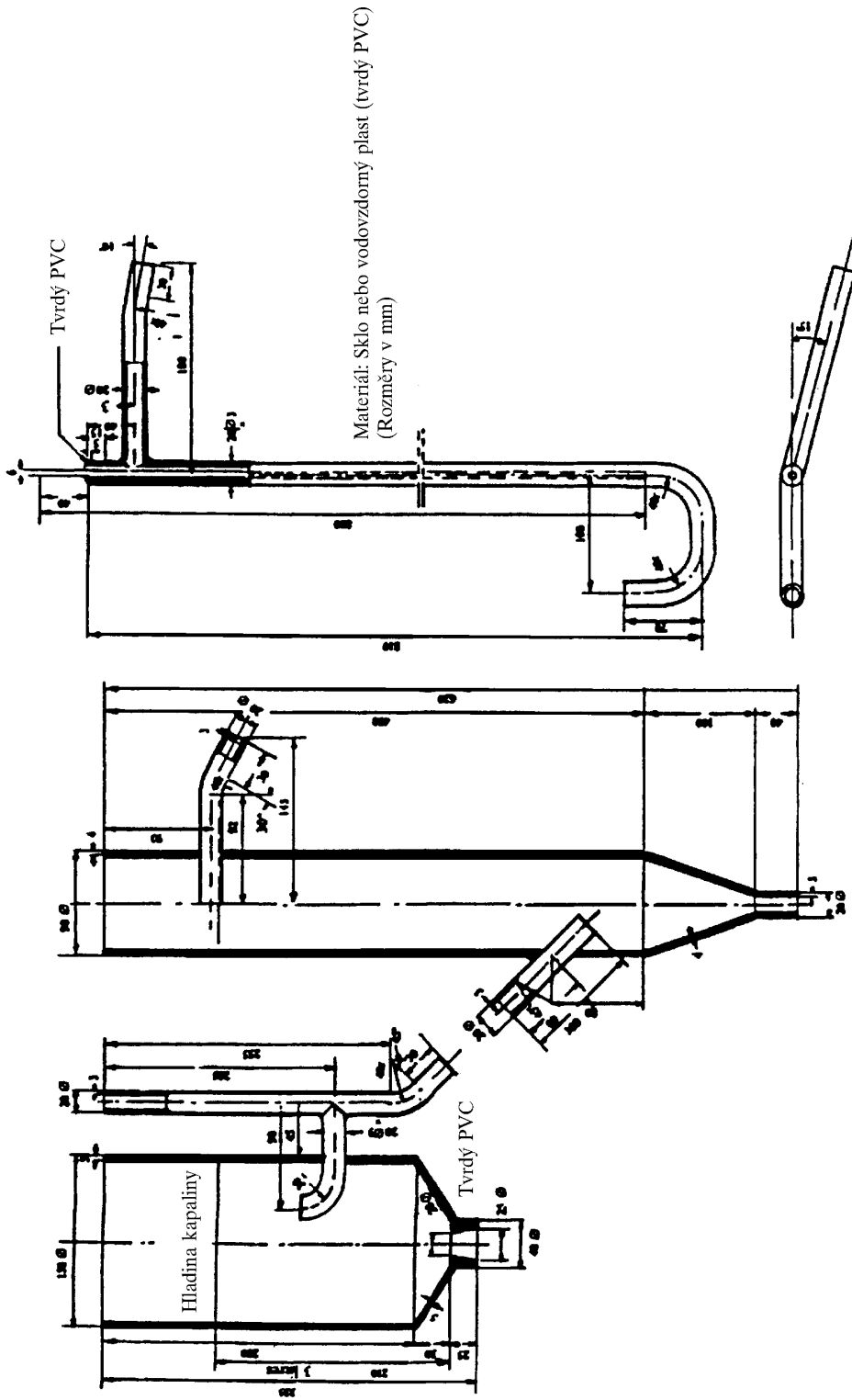
Obrázek 1



A - Zásobní nádoba
B - Dávkovací zařízení
C - Provzdušňovací komora
D - Usazovací nádoba

E - Mamutka
F - Sběrná nádoba
G - Provzdušňovač
H - Průtokoměr vzduchu

Obrázek 2



Obrázek 3
Výpočet biologické rozložitelnosti - Potvrzující zkouška

