



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ VLIVU MONOMERŮ FORMALDEHYDOVÝCH PRYSKYŘIC NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF FORMALDEHYDE RESIN MONOMERS ON THE
ENVIRONMENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. GABRIELA KALČÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0280/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Bc. Gabriela Kalčíková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce: doc. dr. Andreja Žgajnar Gotvajn, Ph.D.

Název diplomové práce:

Posouzení vlivu monomerů formaldehydových pryskyřic na životní prostředí

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Provedení vybraných testů ekotoxicity a testů biodegradability
3. Zhodnocení získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Gabriela Kalčíková
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V současné době jsou každoročně produkovány tisíce nových látek jejichž vliv na životní prostředí není znám. Mnohé z těchto látek jsou záměrně nebo lidskou nedbalostí vypouštěny do přírody, kde mohou být transportovány a degradovány různými mechanismy. Tyto látky mohou mít vliv na různé druhy organismů a také na člověka. Z tohoto důvodu narůstají celosvětově problémy se znečišťováním všech složek životního prostředí.

Tato diplomová práce posuzuje vliv monomerů formaldehydových pryskyřic, které jsou běžně komerčně vyráběny, na životní prostředí. Pro účely ekotoxikologického hodnocení vzorků melamin-formaldehydové a močovino-formaldehydové pryskyřice byly zvoleny tři testy: akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*, akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri* a akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem. Pro komplexnější posouzení vlivu těchto látek na životní prostředí byla také testována biodegradabilita. Obě testované látky vykazovaly efekt na testovací organismy, avšak z výsledků testů ekotoxicity a biodegradability můžeme usuzovat, že by tyto látky neměly představovat významné riziko pro životní prostředí.

ABSTRACT

Thousand of new substances with unknown environmental effect are produced and used daily. Many of them are deliberately or by negligence released and deposited into the environment where they could undergo different transport and degradation mechanisms. They are able to affect different types of organisms, as well as humans. For this reason, the awareness of the problems, associated with pollution of all environmental compartments is growing.

The environmental impact of monomer formaldehyde resins, which are produced for commercial use, on the environment were studied in this research. For the purposes of ecotoxicological evaluation samples of melamine-formaldehyde and urea-formaldehyde resin were chosen and three toxicity tests were run: acute test with measurement of inhibition of the mobility of *Daphnia magna*, the acute test with luminescent bacteria *Vibrio fischeri* and acute test with measurement of inhibition of oxygen consumption by activated sludge. For more comprehensive assessment of the impact of these substances on the environment, biodegradability was also determined. Both tested substances showed minor hazardous impact to testing organisms and it can be concluded, that these substances should not present a significant risk to the environment.

KLÍČOVÁ SLOVA

biodegradabilita, ekotoxicita, monomery formaldehydových pryskyřic, testy ekotoxicity

KEYWORDS

biodegradability, ecotoxicity, formaldehyde resin monomers, tests of ecotoxicity

KALČÍKOVÁ, G. *Posouzení vlivu monomerů formaldehydových pryskyřic na životní prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 90 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. dr. Andreje Žgajnar Gotvajn, Ph.D za pomoc, odborné vedení, podněty a rady při provádění experimentální části a MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D především za trpělivost, vstřícnost a cenné připomínky, které mi pomohly dokončit tuto diplomovou práci. Chtěla bych také poděkovat všem zaměstnancům Fakulty chemie a chemických technologií na Univerzitě v Lublani a zaměstnancům Chemického institutu, kteří mi všestranně pomáhali při práci v laboratoři.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Polymery	8
2.1.1	Monomery	8
2.1.2	Formaldehydové pryskyřice.....	9
2.1.2.1	Močovino-formaldehydová pryskyřice.....	9
2.1.2.2	Melamin-formaldehydová pryskyřice	10
2.1.3	Adheze a adheziva.....	12
2.1.3.1	Definice adheze.....	12
2.1.3.2	Adheziva na bázi močovina-formaldehyd.....	13
2.1.3.3	Adheziva na bázi melamin-formaldehyd.....	13
2.2	Ekotoxikologie.....	14
2.2.1	Testování ekotoxicity	15
2.2.2	Ekotoxikologické biotesty.....	15
2.2.2.1	Akutní testy toxicity.....	17
2.2.2.2	Subakutní testy toxicity	17
2.2.2.3	Chronické testy toxicity.....	18
2.2.3	Vybrané testy ekotoxicity	19
2.2.3.1	Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	19
2.2.3.2	Akutní test s luminiscenčními bakteriemi <i>Vibrio fischeri</i>	21
2.2.3.3	Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem.....	24
2.3	Biodegradace.....	27
2.3.1	Biodegradace za různých podmínek	28
2.3.1.1	Aerobní degradace polutantů	28
2.3.1.2	Anaerobní degradace polutantů	28
2.3.2	Mechanismus biodegradace	28
2.3.3	Faktory ovlivňující biodegradaci	29
2.3.3.1	Živiny.....	29
2.3.3.2	Fyzikálně-chemické podmínky	30
2.3.3.3	Mikroorganismy.....	30
2.3.3.4	Organické látky.....	31
2.3.4	Stanovení biodegradability organických látek.....	32
2.4	Klasifikace látek na základě testování ekotoxicity a biodegradability	35
3	Experimentální část.....	37
3.1	Stanovení ekotoxicity vzorků	38
3.1.1	Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	38
3.1.2	Akutní test s luminiscenčními bakteriemi <i>Vibrio fischeri</i>	39
3.1.3	Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem.....	41
3.2	Stanovení biodegradability vzorků	46

4	Výsledky a diskuze	51
4.1	Močovino-formaldehydová pryskyřice.....	54
4.1.1	Ekotoxikologické hodnocení vzorku.....	54
4.1.1.1	<i>Akutní imobilizační test na perloočkách Daphnia magna</i>	54
4.1.1.2	<i>Akutní test s luminiscenčními bakteriemi Vibrio fischeri</i>	55
4.1.1.3	<i>Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem</i>	57
4.1.2	Test biodegradability.....	65
4.2	Melamin-formaldehydová pryskyřice.....	67
4.2.1	Ekotoxikologické hodnocení vzorku.....	67
4.2.1.1	<i>Akutní imobilizační test na perloočkách Daphnia magna</i>	67
4.2.1.2	<i>Akutní test s luminiscenčními bakteriemi Vibrio fischeri</i>	68
4.2.1.3	<i>Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem</i>	70
4.2.2	Test biodegradability.....	78
4.3	Shrnutí výsledků	79
5	Závěr.....	83
6	Seznam použitých zdrojů.....	85
7	Seznam zkratk a symbolů.....	90

1 ÚVOD

Člověk je od pradávna součástí přírody, z přírody čerpal znalosti, naučil se jak přírodní materiály zpracovávat, zušlechťovat a účinně používat, ale také jak vyrábět materiály z látek, kterých je přírodě dostatek, tj. vyrábět umělé hmoty nebo dokonce látky, které v přírodě neexistují, tzv. syntetické materiály – syntetické polymery.

V současné době je známo asi 18 milionů sloučenin a jejich počet se každým rokem zvyšuje asi o jeden milion. Valná většina těchto látek je vyráběna v nepatrném množství v laboratořích a do průmyslové výroby se dostanou jen ty z nich, pro něž se najde nějaké praktické využití, ale i počet průmyslově vyráběných chemických látek rok od roku narůstá, což může představovat vážné riziko pro životní prostředí i pro člověka. Nejen konečné produkty využívané v průmyslu mohou být nebezpečné, ale také látky, z nichž jsou vyráběny.

Hodnocení vlivu látek na životní prostředí obvykle začíná stanovením koncentrace látky ve sledované lokalitě. Znalost reálné koncentrace polutantu je základem monitoringu životního prostředí, přesto však pouhá znalost i třeba dlouhodobé koncentrace polutantu nám neposkytne informaci o skutečném vlivu látky na živé organismy, resp. ekosystémy.

Právě ekotoxikologické testy se zabývají hodnocením negativních účinků různých látek na životní prostředí. Účelem těchto testů je klasifikovat chemické látky a přípravky a zařadit je do příslušných skupin nebezpečnosti (např. látky nebezpečné pro životní prostředí). Pro komplexní posouzení těchto látek je důležité kombinovat ekotoxikologické testy spolu s testy biodegradability. V současné době je věnována nejvyšší pozornost látkám, které mají schopnost se kumulovat v potravních řetězcích a představují nebezpečí dlouhodobé kontaminace životního prostředí. Je tedy důležité zjistit nejen ekotoxicitu, ale také i schopnost biodegradace těchto látek v prostředí a tím posoudit, zda jsou trvalou hrozbou pro životní prostředí.

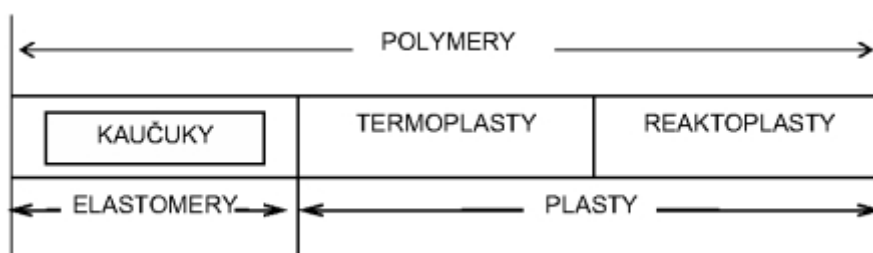
Nařízení REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) má za úkol vylepšit starý legislativní systém Evropské unie. Je to nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, které vstoupilo v platnost 1. června 2007. V Evropské unii by realizací REACH mělo být dosaženo do roku 2020 používání a dovážení pouze těch chemikálií, jež mají známé vlastnosti a jejich bezpečnost bude předem prověřena.

Z těchto důvodů vzrůstá zájem o ekotoxikologické testy a testy biodegradability. Z výsledků těchto testů můžeme komplexněji posoudit vliv testovaných látek na životní prostředí a následně zavést taková opatření, aby tyto látky nemohly vyvolat okamžité či opožděné účinky na životní prostředí a tím také na člověka [1, 2, 3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polymery

Polymery jsou chemické látky neobvykle široké škály vlastností, obsahující ve svých molekulách většinou atomy uhlíku, vodíku a kyslíku, často dusíku, chloru i jiných prvků. Pro polymery je charakteristické mnohonásobné opakování jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin atomů. Polymery vznikají procesem polymerizace, v jehož průběhu se monomer nebo směs monomerů přeměňuje na polymer. Syntetické polymery dělíme na plasty a elastomery (obr.1) [1, 4, 5].



Obrázek 1: Rozdělení polymerů [1].

Elastomery jsou vysoce elastické polymery, které můžeme za běžných podmínek malou silou značně deformovat bez porušení struktury, přičemž deformace je převážně vratná. Jsou amorfními polymery. Nejpočetnější podmnnožinou elastomerů jsou kaučuky, z nichž se vyrábí pryž.

Plasty jsou polymery za běžných podmínek většinou tvrdé, často i křehké. Při zvýšené teplotě se stávají plastickými a tvarovatelnými. Pokud je změna z plastického do tuhého stavu vratná – opakovatelná, nazýváme je termoplasty. K nejdůležitějším termoplastům patří polyetylen, polypropylen, polystyren, polyamid, polyvinylchlorid a polymethylmetakrylát. Pokud jde o změnu nevratnou – trvalou, která je výsledkem chemické reakce, mluvíme o reaktoplastech. Děj je nevratný, což znamená, že reaktoplasty lze tvarovat jen jednou. K nejvýznamnějším reaktoplastům patří formaldehydové pryskyřice a epoxidové pryskyřice [1, 4].

2.1.1 Monomery

Monomery jsou výchozí nízkomolekulární sloučeniny a stavební jednotky polymerního řetězce. Monomerem může být jakákoliv chemická látka, která obsahuje jedno či více vazebných míst, na které se mohou vázat další monomerní jednotky a vytvářet polymerní řetězce [6, 7].

2.1.2 Formaldehydové pryskyřice

Formaldehyd je nejvýznamnějším komerčně vyráběným aldehydem, který je produkován v obrovském množství. Formaldehyd má několik základních využití:

- je meziproduktem při výrobě pryskyřic;
- je meziproduktem při výrobě důležitých průmyslových chemikálií;
- používá se jako baktericid a fungicid;
- je produktem pro koncového zákazníka.

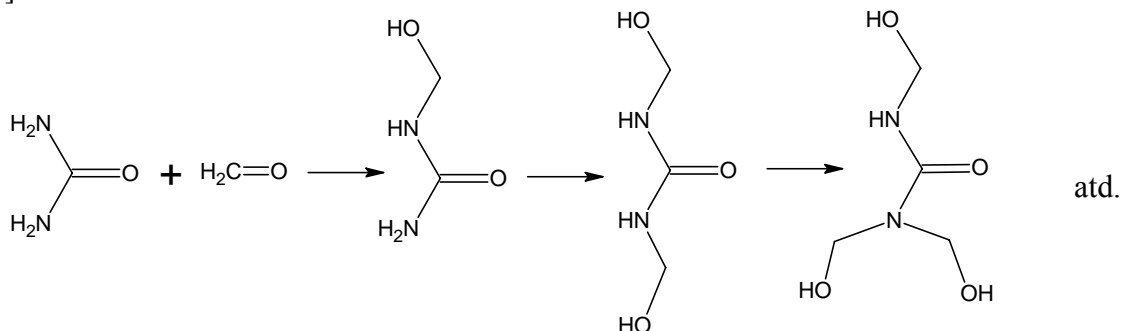
Téměř polovina produkce formaldehydu je používána při výrobě formaldehydových pryskyřic. Reakcí formaldehydu jsou vyráběny dva typy formaldehydových pryskyřic: aminoplasty a fenoplasty, které patří do různých, avšak podobných tříd polymerů nazývaných reaktoplasty. Aminoplasty jsou vyráběny kondenzační reakcí mezi močovinou nebo melaminem a formaldehydem. Fenoplasty neboli fenolické pryskyřice jsou připravovány kondenzací fenolu nebo resorcinu a formaldehydu.

Mezi nejvýznamnější průmyslově vyráběné aminoplasty patří močovino-formaldehydové a melamin-formaldehydové pryskyřice [7, 8, 9].

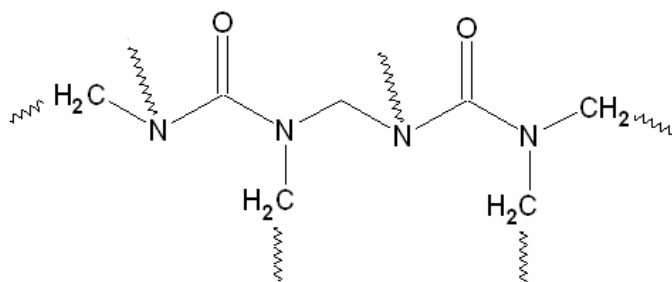
2.1.2.1 Močovino-formaldehydová pryskyřice

Močovino-formaldehydové pryskyřice jsou jedny z nejdéle komerčně vyráběných plastů. Mezi reaktoplasty jsou objemem výroby na třetím místě. Mechanismus polymerizace je u močoviny a melaminu velmi podobný a proto jsou obvykle označovány společně jako amino-pryskyřice [10].

Při výrobě močovino-formaldehydové pryskyřice dochází ke kondenzaci formaldehydu s močovinou. Amino skupiny močoviny velmi snadno reagují s formaldehydem a dochází ke vzniku methylol močoviny (obr. 2). První fáze reakce probíhá v rozmezí 1/1.3 – 1/1.2 poměru močoviny a formaldehydu, při pH 7,5 – 8,0. Při této kondenzaci dojde ke vzniku oligomerů, které jsou za kyselé katalýzy a zvýšené teploty polymerizovány na výsledný produkt (obr. 3). Pro různé aplikace může být upraven poměr močoviny a formaldehydu [10, 11].



Obrázek 2: Reakce formaldehydu s močovinou (upraveno dle10).



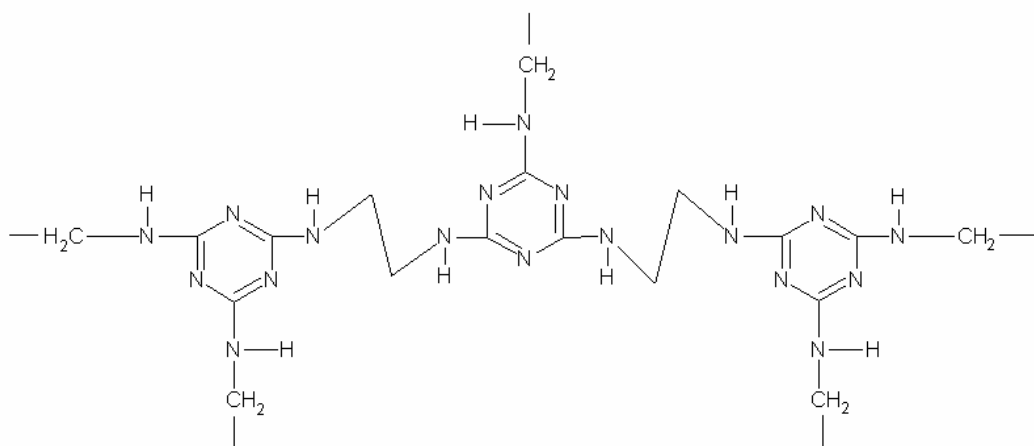
Obrázek 3: Schéma močovino-formaldehydové pryskyřice (upraveno dle 10).

Hlavní použití močovino-formaldehydových pryskyřic je při lepení dřeva, nábytku a podlah, tedy při výrobě překližek a adheziv. Pryskyřice je citlivá na vlhkost a proto se výrobky mohou používat výhradně ve vnitřních prostorách.

Dále jsou močovino-formaldehydové pryskyřice využívány pro zvýšení pevnosti papíru, u bavlněných a vlněných tkanin zvyšují pevnost, snižují tvorbu záhybů a výrobky se nemusí žehlit [10].

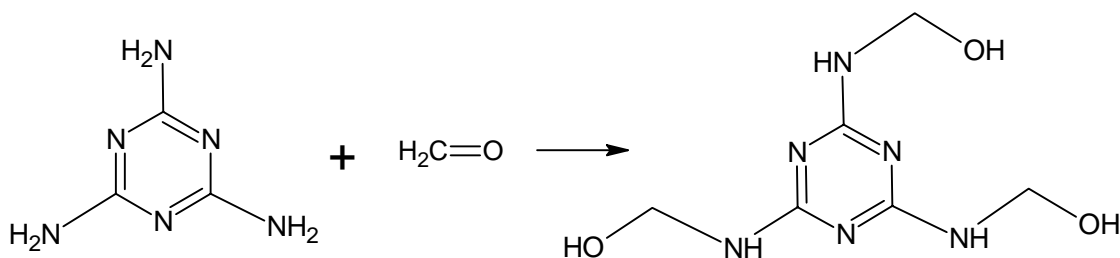
2.1.2.2 Melamin-formaldehydová pryskyřice

Stejně jako močovino-formaldehydová pryskyřice patří melamin-formaldehydová pryskyřice (obr. 4) do skupiny amino-pryskyřic. Melamin-formaldehydová pryskyřice vyniká odolností proti teplu, vlhku, nepříznivým vlivům počasí, ale je zároveň výrazně dražší než močovino-formaldehydová pryskyřice. Proto je používána pouze pokud jsou její speciální vlastnosti vyžadovány.

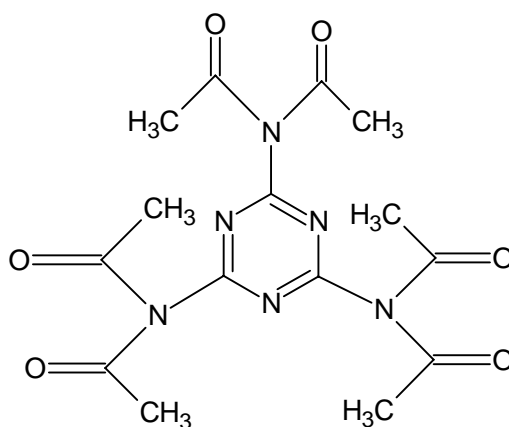


Obrázek 4: Schéma melamin-formaldehydové pryskyřice (upraveno dle 12).

Výroba probíhá téměř totožně jako u močovino-formaldehydové pryskyřice. Melamin obsahuje šest amino vodíků a každý může velmi snadno reagovat s formaldehydem za vzniku methylol melaminu (obr. 5). Pro různé aplikace je stupeň methylolace kontrolován poměrem melaminu a formaldehydu, pH, teplotou a časem polymerizace. Polymerizace obvykle probíhá v rozmezí pH 8 – 10 a 80 – 100 °C. Při snížení pH a zvýšení teploty dochází ke zrychlení reakce. Výroba trimethylol melaminu je běžnější, ale hexamethoxymethyl melamine (HMMM) je často využíván při výrobě nátěrů a povlaků, kvůli jeho vyšší stabilitě a vyšší rozpustnosti v organických rozpouštědlech (obr. 6) [10].



Obrázek 5: Reakce melaminu s formaldehydem (upraveno dle 10).



Obrázek 6: Schéma hexamethoxymethyl melaminu (upraveno dle 10).

Melamin-formaldehydové pryskyřice jsou využívány na impregnaci barevného papíru a aplikovány jako povrchová vrstva na lamináty pro zvýšení odolnosti proti poškrábání, teple, UV záření, vodě, rozpouštědlům a skvrnám.

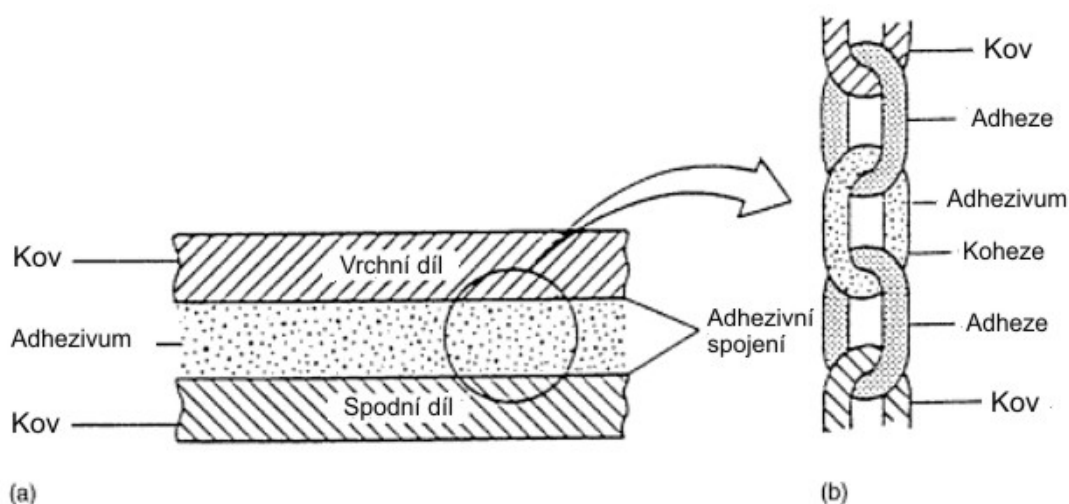
Další využití melamin-formaldehydových pryskyřic je při výrobě kuchyňského nádobí jako jsou talíře, misky a sklenice. Tyto výrobky jsou lehčí a odolnější než běžně používané nádobí. Menší množství, asi 7 % produkce, je využíváno při výrobě knoflíků, klik a dřezů [10].

2.1.3 Adheze a adheziva

Jak již bylo uvedeno v předcházející kapitole (kap. 2.1.2), formaldehydové pryskyřice jsou především využívány jako adheziva.

2.1.3.1 Definice adheze

Adheze je definována jako přilnavost dvou rozdílných látek v důsledku intermolekulárních sil mezi látkami. Naproti tomu koheze je definována jako soudržná síla uvnitř látky mezi molekulami (obr.7) [13].



Obrázek 7: Ideální spojení adherentu a adheziva. Adhezivní spojení (a) může být rozděleno nejméně do šesti částí, které jsou podobné článkům řetězce (b) (upraveno dle 13).

Do dnešní doby bylo formulováno mnoho teorií adheze, avšak dnes nejvíce přijímanou je adsorpční teorie adheze, která vychází z analogie jevu smáčení adsorpce a adheze. Za nejvýznamnější síly uplatňující se v lepeném spoji přes fázové rozhraní jsou pokládány van der Waalsovy síly, tedy síly působící na krátké vzdálenosti. Ty vzhledem k jejich univerzálnímu charakteru a četnosti jsou považovány, přes poměrně nízký energetický obsah, za postačující k dosažení dobré pevnosti adhezivního spojení [14].

V procesu adhezního spojování jsou rozeznána dvě stádia:

- v první fázi převažuje transport molekul adheziva k povrchu adherentu na vzdálenost umožňující vzájemnou interakci obou fází van der Waalsovými silami. Toto stádium je urychleno všemi faktory, které zvyšují pohyblivost molekul, tedy zvýšením teploty, tlaku, dobrým smáčením povrchu adherentu kapalným adhezivem atd;
- v okamžiku kdy se molekuly adherentu a adheziva přiblíží na vzdálenost, při které začínají působit van der Waalsovy síly, nastává druhá fáze. Tato fáze je analogická sorpci a je časově podstatně méně náročná.

Za předpokladu dostatečného kontaktu adherentu a adheziva postačují tyto síly k dobré pevnosti adhezního spojení. Příčina malé pevnosti adhezního spoje je především v omezeném kontaktu adherentu a adheziva.

Adheze se využívá v průmyslu, dochází-li ke kontaktu tuhých povrchů nebo při opatřování tuhých povrchů ochrannými nátěry. Spojování dílců lepením, tedy adhezní spojování dílců, je technika, která z části nebo plně nahrazuje v současných průmyslových technologiích klasické způsoby spojování materiálů a rozšiřuje se i do dalších, neprůmyslových oblastí, jako je například zubní lékařství nebo chirurgie [14].

2.1.3.2 Adheziva na bázi močovina-formaldehyd

Adheziva na bázi močovino-formaldehydových polykondenzátů se připravují reakcí močoviny a formaldehydu v alkalickém prostředí a při teplotě 90 – 95 °C. Po nanesení adheziva se adhezní spoje zalisují při tlaku 0,2 – 3,4 MPa a při teplotách 150 – 200 °C. Nevýhodou těchto adheziv je postupné uvolňování formaldehydu, který může pocházet z nezreagovaného formaldehydu v adhezivu – především těsně po výrobě, nebo může být uvolňován postupnou degradací adhezního filmu po celou dobu životnosti adhezního spoje. Množství uvolňovaného formaldehydu závisí na teplotním namáhání spoje a na okolní vlhkosti.

Hlavním využitím tohoto adheziva je při výrobě překližek. Zředěním vodou a nanášením stříkáním se používají pro výrobu dřevotřískových desek, obvykle s přídavkem insekticidů a retardátorů hoření [14, 15].

2.1.3.3 Adheziva na bázi melamin-formaldehyd

Jak již bylo v předešlých kapitolách zmíněno, melamin reaguje s formaldehydem podobně jako močovina. Melamin-formaldehydové polykondenzáty jsou méně rozpustné ve vodě než močovino-formaldehydové polykondenzáty. Reakce probíhá rychleji a snadněji.

Kvůli poměrně vysoké ceně se adheziva používají v kombinacích pouhým smísením polykondenzátů obou typů nebo kopolymerací močoviny s melaminem a formaldehydem.

Melamin-formaldehydová adheziva se uplatňují v podobných případech jako adheziva močovino-formaldehydová, především pro spojování adherentů typu nemodifikované a nedegradovatelné celulosy. Spoje jsou odolnější obzvláště proti horké vodě [14, 15].

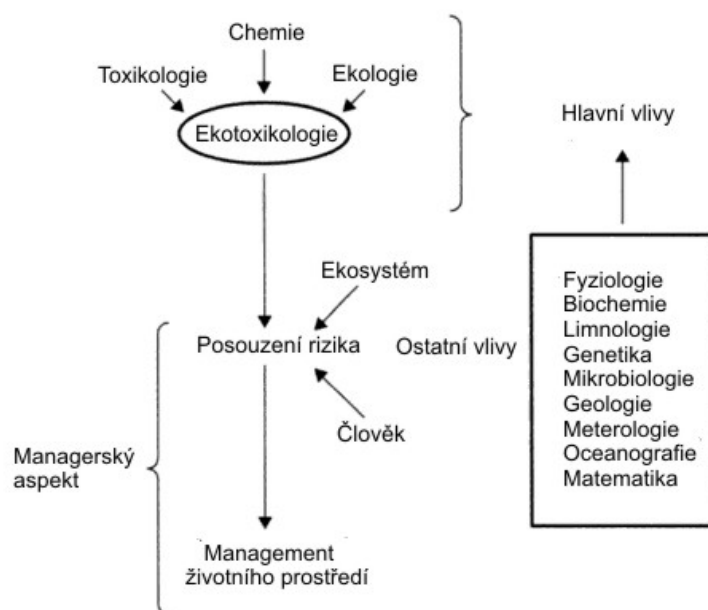
2.2 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie, neboli environmentální toxikologie, je vědní disciplína zabývající se studiem toxického působení látek antropogenního či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Ekotoxikologie byla poprvé definována profesorem R. Truhautem v roce 1965. Později, v roce 1978, Butler definoval ekotoxikologii jako obor, který se zabývá studiem toxického efektu přírodních nebo antropogenních látek na živé systémy, tedy zvířata nebo rostliny, terestrické nebo akvatické, které tvoří biosféru [16, 17].

Cílem oboru je vyvíjet takové metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy a jejich společenstva za standardních reprodukovatelných podmínek. Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek či různých organismů mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří [18].

Ekotoxikologie je multidisciplinární vědou tvořenou převážně:

- ekologií, která se zabývá studiem životního prostředí;
- toxikologií, která se zabývá efekty toxických látek na individuální živé organismy (obr.8).

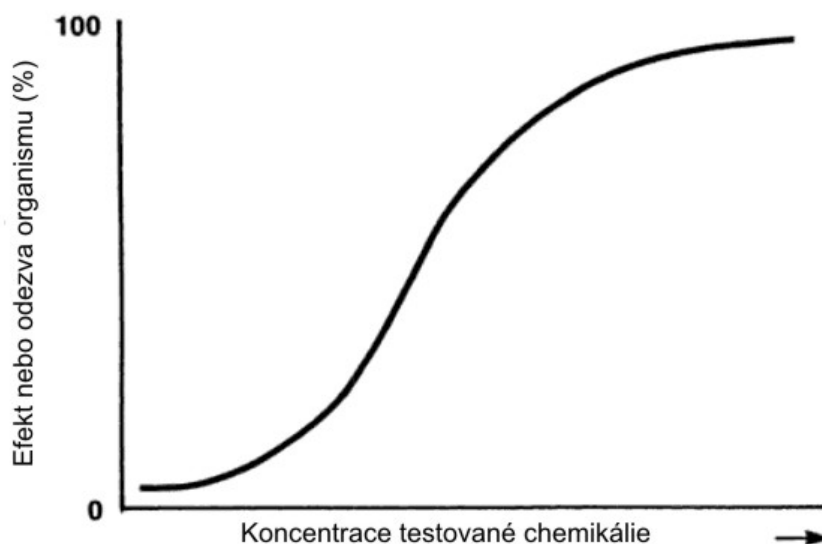


Obrázek 8: Multidisciplinární charakter ekotoxikologie (upraveno dle 17).

Toxikologie se zaměřuje na ochranu člověka před expozicí toxickými látkami o koncentraci, která může být spojována s nepříznivým účinkem na člověka. Zatímco ekotoxikologie se zaměřuje na ochranu populací a společenství druhů před expozicí toxickými látkami o koncentraci, která může být spojována s nepříznivým účinkem na životní prostředí [16].

2.2.1 Testování ekotoxicity

Základním principem, na kterém jsou založeny všechny testy toxicity, je zjištění, že odezva živého organismu při expozici toxickou látkou je závislá na dávce této látky. Na základě tohoto principu jsou v testech ekotoxicity sestrojovány křivky, které ukazují vztah koncentrace toxické látky a efektu na testovaný organismus (obr. 9) [19].



Obrázek 9: Typická křivka závislosti koncentrace chemické látky a efektu na testovaném organismu (upraveno dle 16).

Vyhodnocení akutních testů toxicity je obvykle prováděno sčítáním organismů, které přežily expozici toxickou látkou, zatímco vyhodnocení testů chronické toxicity probíhá porovnáním změn v růstu, reprodukci, chování nebo efektů na biochemické úrovni [19].

2.2.2 Ekotoxikologické biotesty

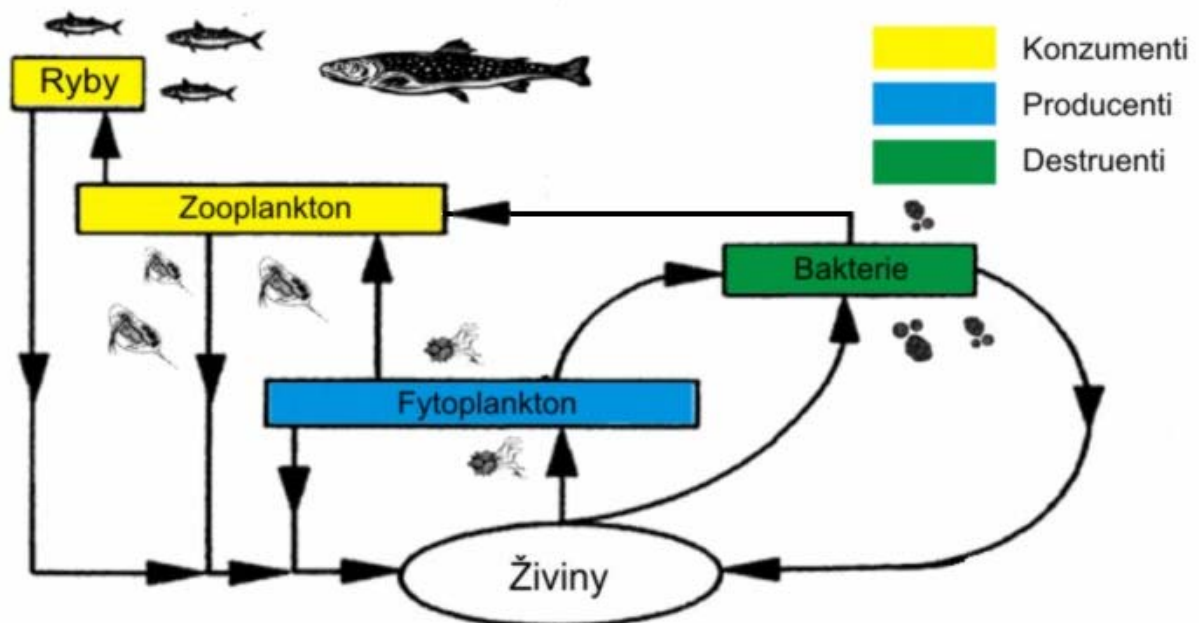
Podstatou ekotoxikologie jsou testy toxicity – biotesty. Tyto biotesty slouží ke zjištění či odhadu možného toxického vlivu testovaných látek na živé organismy. Biotest lze definovat jako proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace, ekosystém apod.) exponován za přesně definovaných podmínek různými koncentracemi zkoumané chemické látky, chemického přípravku, směsného či přírodního vzorku nebo výluhu odpadů. Biotest zahrnuje expozici a odpověď testovaného organismu.

Biotesty jsou nespecifické – zachycují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovaných vzorcích bez nutné bližší znalosti jejich složení či chemické struktury, rychlé a relativně levné screeningové testy.

Principem biotestů je kontakt testované látky, směsného či přírodního vzorku za určitých, předem definovaných a kontrolovatelných podmínek s detekčním systémem, který je relevantní – umožňuje interpretaci a má dostatečnou výpovědní hodnotu. Z jeho reakce potom usuzujeme, zda je testovaná látka toxická.

Biotesty jsou prováděny na různých organismech. Výběr testovacího organismu závisí na vzorku, který bude testován – voda, půda, sediment, odpad, chemická látka apod. Tyto organismy zastupují různé trofické úrovně a jsou významnými články potravního řetězce (obr. 10):

- destruenti – bakterie;
- producenti – fytoplankton, vyšší rostliny;
- konzumenti – zooplankton a ryby.



Obrázek 10: Schéma potravního řetězce s různými trofickými úrovněmi (upraveno dle 20).

V dnešní době jsou používány tři generace biotestů. První generace zahrnuje klasické biotesty, které jsou nejrozšířenější a uznávané mezinárodní legislativou. Druhou generací jsou mikrobiotesty, které zaručí okamžité a velmi jednoduché testování látek a třetí generací jsou nejnověji používané biosondy, biosenzory a biomarkery, které jsou prozatím ve stádiu základního výzkumu [18, 21, 22].

Všechny níže popsané testy toxicity tj. akutní, subakutní, chronické, mohou být prováděny v různém uspořádání:

- statický test – organismy jsou po celou dobu expozice vystaveny účinkům testované látky o určité koncentraci. Roztok testované látky a kontrola nejsou po celou dobu trvání testu měněny. Tento uspořádání testu je nejčastěji používáno pro testování akutní toxicity;
- semi-statický test – je prováděn podobně jako statický test, protože testované organismy jsou po celou dobu expozice vystaveny účinkům testované látky, ale roztok testované látky je periodicky měněn – většinou jednou za 24 hodin;
- průtočný test – roztok testované látky je kontinuálně přiváděn a odváděn do a z nádoby, ve které dochází k expozici testovaných organismů. Toto uspořádání testu se nejčastěji využívá pro testování chronické toxicity [16, 19].

2.2.2.1 Akutní testy toxicity

Při testování akutní toxicity je měřen efekt toxické látky na testovacích organismech po jednorázovém podání toxické látky. Doba expozice toxickou látkou závisí na druhu testovacího organismu, obvykle jsou testy vyhodnocovány po 24 až 96 hodinách, ale např. při testování ekotoxicity s použitím bakterií *Vibrio fischeri* je doba expozice 30 minut. Při vyhodnocení je zjišťováno kolik jedinců přežilo expozici toxickou látkou. Z výsledků se určí obvykle koncentrace, která způsobí úmrtí nebo imobilizaci 50 % exponovaných organismů – tedy hodnoty LC_{50} nebo EC_{50} .

Při testování akutní toxicity je používáno několik koncentrací testované látky a kontrola, která obsahuje pouze médium bez přítomnosti testované látky. Pro test se obecně používá 10 až 20 organismů pro každou koncentraci. Výjimku tvoří akutní testy, při kterých jsou používány mikroorganismy např. bakterie, kde se používá určitá koncentrace testovacích organismů [16, 19, 23].

2.2.2.2 Subakutní testy toxicity

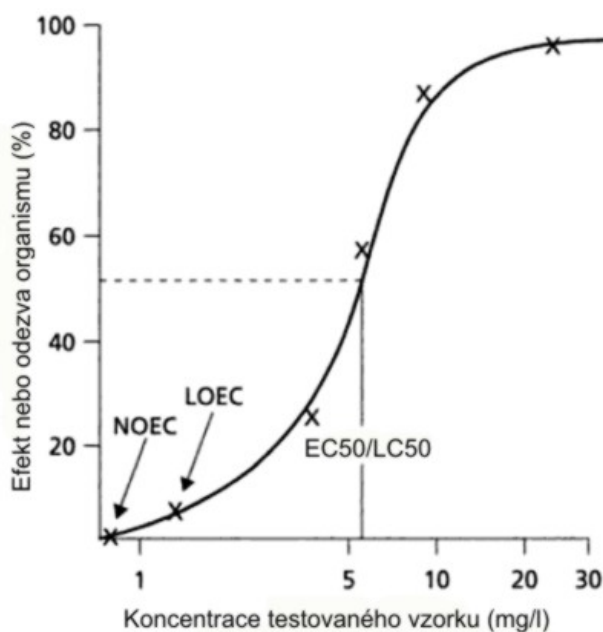
Při subakutních testech toxicity, neboli subchronických testech toxicity, dochází k expozici testovaných organismů po dobu delší než 96 hodin. Testované organismy jsou exponovány testovanou látkou opakovaně, obvykle v jednodenních intervalech.

Výsledky mohou být vyjádřeny pomocí hodnot EC_{50} nebo LC_{50} , jako je tomu u akutních testů toxicity, nebo mohou být vyjádřeny stejným způsobem jako je tomu u testů chronické toxicity (viz. kapitola 2.2.2.3). Tyto testy slouží ke studiu nejvýznamnějších toxických změn při opakované expozici dané látky, nemusí však odhalit následky dlouhodobého působení – k čemuž slouží testy chronické toxicity [23, 24].

2.2.2.3 Chronické testy toxicity

Zjištění, že chemikálie nemají akutní toxický účinek na testované organismy nemusí znamenat, že nejsou toxické. Chronické testy toxicity vyhodnocují možný nepříznivý účinek testovaných látek po dlouhou dobu – někdy i po celou dobu života testovaného organismu u expozice o subletální koncentraci. V chronickém testu toxicity, který se zabývá sledování nepříznivého účinku látky po celou dobu života organismu, jsou testované organismy vystaveny účinkům látky již od počátku života; exponována jsou vajíčka nebo zárodky, expozice pokračuje během růstu, dospívání jedince, také během reprodukce a produkce sekundární generace. Běžně jsou také používány testy chronické toxicity, které sledují pouze několik citlivých životních stádií testovaného organismu např. během reprodukce, při prvních stádiích života.

Výsledky testu slouží pro zjištění nejvyšší koncentrace látky, která nezpůsobí žádný efekt – NOEC (No-Observed Effect Concentration) a pro zjištění nejnižší koncentrace látky, u které byl zpozorován efekt na testovaných organismech – LOEC (the Lowest Observed Effect Level) (obr. 11) [16, 23].



Obrázek 11: Grafické vyjádření hodnot LOEC/NOEC a LC₅₀/EC₅₀ (upraveno dle 17).

2.2.3 Vybrané testy ekotoxicity

Pro testování chemických látek, chemických přípravků, směsného či přírodního vzorku nebo výluhu odpadů můžeme použít velké množství biotestů.

Nejvyužívanějšími biotesty jsou standardní laboratorní testy toxicity. Ve světě existuje celá řada ekotoxikologických metodik. Zpracováním těchto metodik se zabývají Mezinárodní organizace pro normalizaci ISO (International organization for standardization) a Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj OECD (Organisation for economic co-operation and development). Vzorek je testován na organismech, které zastupují všechny trofické úrovně potravního řetězce tj. destruenti, producenti a konzumenti z důvodů odhadu účinků látek na biocenózu. Nejpožívanějšími testy jsou testy na bakteriích (luminiscenční bakterie *Vibrio Fischeri*, testy s aktivovaným kalem), testy toxicity na řasách (chlorkokální druh *Scenedesmus quadricauda*), testy inhibice růstu kořene (testy na semenech *Sinapis alba*), testy na bezobratlých (korýši např. perloočka *Daphnia magna*) a testy toxicity na rybách (nejčastěji *Poecilia reticulata* či *Brachydanio rerio*). Hlavní výhodou těchto testů je, že jsou uznávány mezinárodními legislativami. Na druhé straně jejich provedení je poměrně náročné. Kultury organismů je nutné dlouhodobě udržovat, samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru a dochází ke spotřebě velkého množství testovaného materiálu. Z těchto důvodů došlo k vývoji alternativních testů toxicity [21, 25].

Alternativní testy ekotoxicity – mikrobiotesty se v poslední době těší zvýšené pozornosti. Produkce nových látek neustále narůstá, je tedy nutné testovat tyto látky efektivněji, a proto narůstá zájem o zapojení rychlých, relativně levných a zároveň ekologicky spolehlivých testů. Testovací organismy využívané v mikrobiotestech mohou představovat bakterie, prvoky, řasy, bezobratlé apod. Tyto organismy jsou dlouhodobě uchovávány v klidových stádiích – bezobratlí, v lyofilizovaném stavu – bakterie, nebo v imobilizované formě – řasy a podle potřeby se mohou oživit. Nejvyužívanějšími mikrobiotesty jsou toxikity, které využívají klidových stádií zooplanktonu. Tyto testy jsou k dispozici v komerčním balení, které obsahuje všechny materiál k jejich provedení: kultivační nádoby, pipety, testovací destičky, živné médium, standardní toxikant, klidové stádia testovacích organismů, protokol o provedené zkoušce a návod k použití [21].

2.2.3.1 Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Daphnia magna (obr. 12) je velmi často využívaným organismem pro testování vod. Využívá se pro testování akutní i chronické toxicity. Je možné ji kultivovat v laboratorních podmínkách. *Daphnia magna* je jedním z největších druhů dafnií, je tedy možné ji pozorovat pouhým okem. Dafnie jsou také velmi významným článkem potravního řetězce – konzumentem I. řádu [26].

Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* je standardizovanou metodikou OECD. Z této metodiky vychází česká norma ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) [27, 28].



Obrázek 12: Testovací organismus *Daphnia magna* [29].

Podstata testu

Principem testu je sledování inhibice pohybu jedinců druhu *Daphnia magna*, kteří jsou vystaveni působení toxických látek ve vzorku po dobu 24 hodin (24hEC₅₀) nebo pokud je to možné a je to zapotřebí, působení toxických látek ve vzorku po dobu 48 hodin (48hEC₅₀).

Zkouška se provádí v jednom nebo dvou stupních:

- předběžný test, který poskytuje předběžnou hodnotu 24hEC₅₀ (popř. 48hEC₅₀) a stanovuje rozsah koncentrací pro základní test;
- v případech, kdy přibližná hodnota z předběžného testu nedostačuje, provádí se základní test, ze kterého se použijí hodnoty 24hEC₅₀ (popř. 48hEC₅₀) nebo koncentrace odpovídající imobilizaci 0 % a 100 %.

Podmínky testu

Skladování roztoků a expozice organismů se provádí ve tmě nebo při fotoperiodě 16 h světla/8 h tmy. Zkouška by měla být prováděna při teplotě vzduchu 20 °C ± 2 °C. Jedinci používaní ke zkoušce musí být mladší 24 hodin.

Platnost testu

Výsledky je možné považovat za platné při splnění těchto podmínek: koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky je větší nebo rovna 2 mg.l⁻¹, procento imobilizovaných jedinců v kontrolním vzorku je menší nebo rovno 10 % a hodnota 24hEC₅₀ pro referenční látku - dichroman draselný je v rozsahu od 0,6 mg.l⁻¹ do 1,7 mg.l⁻¹ [27, 28].

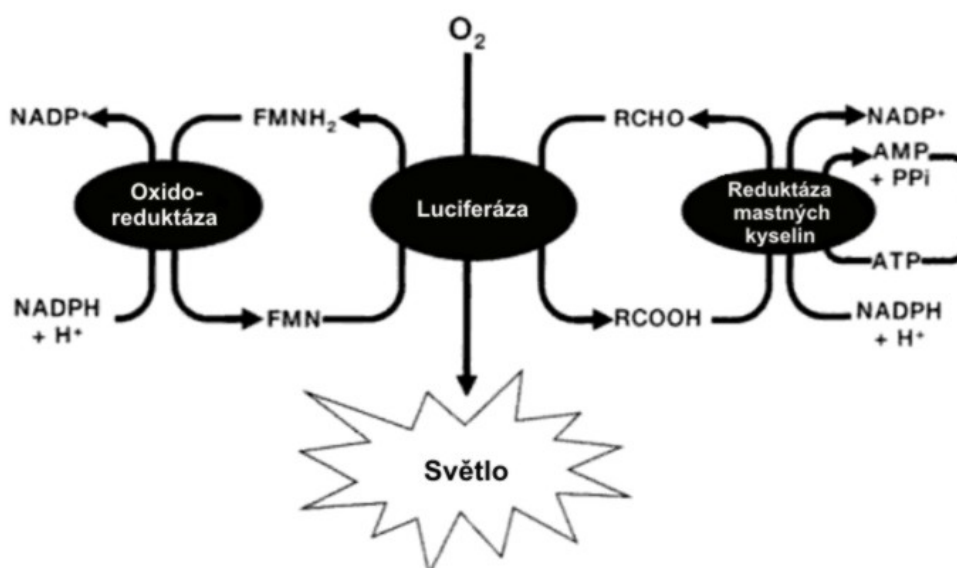
Vyhodnocení testu

Výsledky se zpracovávají pomocí výpočetní techniky. Koncentrace testované látky se vyjádří v logaritmických hodnotách ($\log c$), imobilizace se vyjádří v procentech a získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je $\log c$ (osa x) a závisle proměnnou je imobilizace vyjádřená v procentech (osa y). Vynesenými body se proloží regresní přímka. Z rovnice regrese se vypočítá $\log c$ pro inhibici 50 % ($y = 50$). Odlogaritmováním hodnoty $\log c$ se získá hledaná koncentrace EC_{50} . Pro výpočet je také možné využít jinou statistickou metodu např. probitovou analýzu, která vhodným způsobem transformuje procenta inhibice na tzv. probity. Vyhodnocení probíhá stejně jako u výše popsané metody pouze s rozdílem, že závisle proměnou se stávají procenta inhibice přepočítané na probity [30, 31].

2.2.3.2 Akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*

Bakterie *Vibrio fischeri* patří mezi halofilní bakterie. Tyto bakterie se nacházejí v mořích a oceánech a jako mnohé bakterie tohoto druhu jsou schopné bioluminiscence – tedy produkce světla [32].

Za mechanismus bakteriální bioluminiscence je odpovědný enzym luciferáza, který katalyzuje oxidaci redukovaného flavin mononukleotidu ($FMNH_2$) a alifatického aldehydu s dlouhým řetězcem (RCHO) jako je tetradekanal (obr. 13). Dochází k produkci molekuly, která je v excitovaném stavu a tím k produkci modrozeleného světla o vlnové délce kolem 480 nm [33].

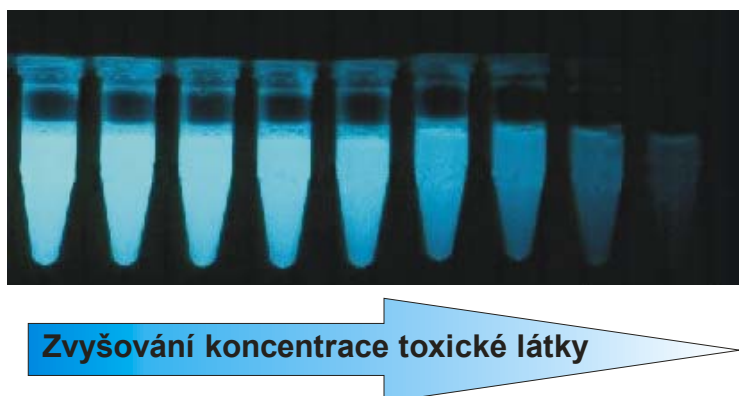


Obrázek 13: Schéma reakcí bakteriální bioluminiscence (upraveno dle 33).

Akutní test s bakteriemi *Vibrio fischeri* je jedním z velmi často využívaných bakteriálních testů toxicity. Je také mezinárodním standardizovaným testem [34].

Podstata testu

Principem je využití inhibice světla emitovaného mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri* (obr. 14). Pro provedení testu je zapotřebí speciálního přístroje, který dokáže fotometricky měřit úbytek intenzity světla produkovaného bakteriemi při expozici toxickou látkou. Nejčastěji je měřen úbytek emitovaného světla po 15 nebo 30 minutách. Inhibiční efekt je vyjádřen hodnotou EC_{50} .



Obrázek 14: Snižování intenzity bioluminiscence při zvyšování koncentrace toxické látky (upraveno dle 35).

Podmínky testu

Je nezbytné aby pH vzorku bylo upraveno pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu $pH\ 7,0 \pm 0,2$. Optimální podmínky pro halofilní bakterie ve vzorku zajišťuje přidavek 20 g NaCl na litr, tj. 2% koncentrace NaCl v testovaném vzorku. Testovací nádoby obsahují kontrolní roztok NaCl a vzorky musí být před měřením temperovány na $15\ ^\circ C \pm 1\ ^\circ C$.

Platnost testu

Výsledky je možné považovat za platné při splnění těchto podmínek: pokud se paralelní stanovení neodchyluje od jejich průměru více než o 3 % pro kontrolní vzorek, referenční látky o koncentraci 4,5 mg/l 3,5-dichlorofenolu, 25 mg/l Zn(II) (ekvivalentní 109,9 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 4 mg/l Cr(VI) (ekvivalentní 11,3 mg/l $K_2Cr_2O_7$) způsobí inhibici od 20 % do 80 % po 30 minutové inkubaci, hodnota korekčního faktoru f_{kt} po 15 nebo 30 minutové inkubaci se pohybuje v rozmezí od 0,8 do 1,2.

Vyhodnocení testu

Vyhodnocení se zpracovává pomocí výpočetní techniky, použitím rovnic (1), (2), (3).

Korekční faktor (f_{kt}) z měřené intenzity luminiscence se vypočítá pomocí rovnice (1):

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}, \text{ kde} \quad (1)$$

f_{kt} je korekční faktor pro kontaktní čas 5 min, 15 min nebo 30 min;

I_{kt} je intenzita luminiscence vzorku naměřená po 5 min, 15 min nebo 30 min inkubaci v relativních luminiscenčních jednotkách;

I_0 je intenzita luminiscence vzorku okamžitě neměřená po přidání diluentu (2% NaCl) v relativních luminiscenčních jednotkách.

Při výpočtu teoretické intenzity luminiscence ve vzorcích po 5 min, 15 min nebo 30 min inkubaci použijeme korekční faktor v rovnici (2):

$$I_{ct} = I_0 \cdot \bar{f}_{kt}, \text{ kde} \quad (2)$$

\bar{f}_{kt} je průměr hodnot všech měření f_{kt} ;

I_0 je intenzita luminiscence vzorku naměřená okamžitě před přidáním testované látky v relativních luminiscenčních jednotkách;

I_{ct} je korekční hodnota I_0 pro vzorek těsně před přidáním testované látky.

Inhibiční efekt testovaného vzorku se vypočítá dle rovnice (3):

$$H_l = \left[\frac{(I_{ct} - I_l)}{I_{ct}} \cdot 100 \right], \text{ kde} \quad (3)$$

H_l inhibiční efekt testovaného vzorku pro kontaktní čas 5 min, 15 min nebo 30 min v procentech;

I_{ct} viz. rovnice (2);

I_l je intenzita luminiscence testovaného vzorku naměřená po 5 min, 15 min nebo 30 min inkubaci v relativních luminiscenčních jednotkách.

Koncentrace testované látky se vyjádří v logaritmických hodnotách ($\log c$), inhibice luminiscence se vyjádří v procentech a získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je $\log c$ (osa x) a závisle proměnnou je inhibice bioluminiscence vyjádřená v procentech (osa y). Vynesenými body se proloží regresní přímka. Z rovnice regrese se vypočítá $\log c$ pro inhibici 50 % ($y = 50$). Odlogaritmováním hodnoty $\log c$ se získá hledaná koncentrace EC_{50} [31, 36, 37].

2.2.3.3 Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem

Pro test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem je používána smíšená populace mikroorganismů nacházejících se v aktivovaném kalu, který je odebírán z čistíren odpadních vod. Složení aktivovaného kalu v čistírnách odpadních vod je poměrně různorodé. Nejčastěji byly nalezeny bakterie rodu *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Nocardia* a *Lophomonas*. Spolu s bakteriemi, houbami, plísněmi můžeme v biomase aktivovaného kalu najít také řadu kvasinek, různé vláknité organismy jako *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Leptomitus* nebo množství prvoků jako jsou *Vorticella* a *Opercularia* [38, 39, 40].

Tento test je používán pro stanovení toxicity různých vzorků, jak čistých chemických látek, tak i odpadních vod a je mezinárodně uznávaným standardem (ISO, OECD) [41].

Podstata testu

Aktivovaný kal spotřebovává kyslík velmi rychle v přítomnosti látky, která je schopná snadné biodegradace. Přidáme-li do systému toxickou látku, dojde k negativnímu ovlivnění mikroorganismů aktivovaného kalu a tím ke snížení rychlosti spotřeby kyslíku. Procentuální inhibice spotřeby kyslíku je vyhodnocena porovnáním s rychlostí spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez dodání toxické látky.

Inhibice spotřeby kyslíku může být měřena odděleně, buď pomocí všech mikroorganismů přítomných v aktivovaném kalu, organismů heterotrofních nebo nitrifikačních. Po přidání specifického inhibitoru oxidace amoniaku na dusitany – *N*-allylthiourey (ATU) neprobíhá nitrifikace a je měřena inhibice spotřeby kyslíku jen pomocí heterotrofních organismů. Z rozdílu mezi inhibicí spotřeby kyslíku měřenou pomocí všech mikroorganismů a heterotrofních mikroorganismů (tedy po přidání ATU) vypočítáme inhibici spotřeby kyslíku pro nitrifikační mikroorganismy. Při testu je nutné měřit také spotřebu kyslíku během abiotického procesu, protože některé vzorky jsou schopné spotřebovat kyslík i bez přítomnosti mikroorganismů aktivovaného kalu např. odpadní vody nebo látky se silnými redukčními vlastnostmi. Abiotická kontrola obsahuje testovaný materiál, syntetické médium a vodu. Výsledkem měření je stanovení hodnoty EC_{50} , nejčastěji po 30minutové inkubaci.

Podmínky testu

Test by měl být prováděn při teplotě $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a v místnosti neobsahující prach a toxické výpary.

Platnost testu

Citlivost aktivovaného kalu by měla být ověřena s použitím referenční látky. Pro inhibici spotřeby kyslíku měřeného všemi mikroorganismy je to 3,5-dichlorofenol (3,5-DCF). Hodnota EC_{50} po 30 minutové inkubaci by se měla pohybovat mezi 2 až 25 $mg.l^{-1}$. Spotřeba kyslíku pro kontrolní vzorek musí být vyšší než 20 $mg.g^{-1}$ suché váhy aktivovaného kalu za hodinu.

Vyhodnocení testu

Vyhodnocení se zpracovává pomocí výpočetní techniky, použitím rovnic (5), (6), (7).

Specifická respirační rychlost (R_S), vyjádřena jako množství kyslíku spotřebovaného suchou váhou aktivovaného kalu za hodinu, se vypočítá pomocí rovnice (4):

$$R_S = \frac{R}{\rho_{SS}}, \text{ kde} \quad (4)$$

R_S je specifická respirační rychlost ($mg.g^{-1}.h^{-1}$);

R je rychlost spotřeby kyslíku ($mg.l^{-1}.h^{-1}$);

ρ_{SS} je koncentrace aktivovaného kalu v testu ($g.l^{-1}$).

Hodnota R_S vyšší než 20 $mg.g^{-1}.h^{-1}$ pro kontrolní vzorek je podmínkou platnosti testu.

Inhibice spotřeby kyslíku vyjádřená v procentech měřená pomocí všech mikroorganismů (I) pro každou koncentraci testované látky se vypočítá pomocí rovnice (5):

$$I = \left[1 - \frac{R_T - R_{TA}}{R_{TB}} \right] \cdot 100, \text{ kde} \quad (5)$$

I je inhibice spotřeby kyslíku měřená pomocí všech mikroorganismů (MO) (%);

R_T je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí všech MO pro určitou koncentraci toxické látky ($mg.l^{-1}.h^{-1}$);

R_{TA} je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí všech MO pro abiotický vzorek ($mg.l^{-1}.h^{-1}$);

R_{TB} je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí všech MO pro kontrolní vzorek ($mg.l^{-1}.h^{-1}$).

Inhibice spotřeby kyslíku, vyjádřená v procentech měřená pomocí heterotrofních MO (I_H) pro každou koncentraci testované látky, se vypočítá pomocí rovnice (6):

$$I_H = \left[1 - \frac{R_H - R_{HA}}{R_{HB}} \right] \cdot 100, \text{ kde} \quad (6)$$

I_H je inhibice spotřeby kyslíku měřená pomocí heterotrofních MO (%);

R_H je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí heterotrofních MO pro určitou koncentraci toxické látky ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

R_{HA} je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí heterotrofních MO pro abiotickou kontrolu ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

R_{HB} je rychlost spotřeby kyslíku měřená pomocí heterotrofních MO pro slepý vzorek ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Inhibice spotřeby kyslíku, vyjádřená v procentech měřená pomocí nitrifikačních MO (I_N) pro každou koncentraci testované látky, se vypočítá pomocí rovnice (7):

$$I_N = \left[1 - \frac{R_T - R_H}{R_{TB} - R_{HB}} \right] \cdot 100, \text{ kde} \quad (7)$$

I_N je inhibice spotřeby kyslíku měřená pomocí nitrifikačních MO (%);

R_T viz rovnice (5);

R_H viz rovnice (6);

R_{TB} viz rovnice (5);

R_{HB} viz rovnice (6).

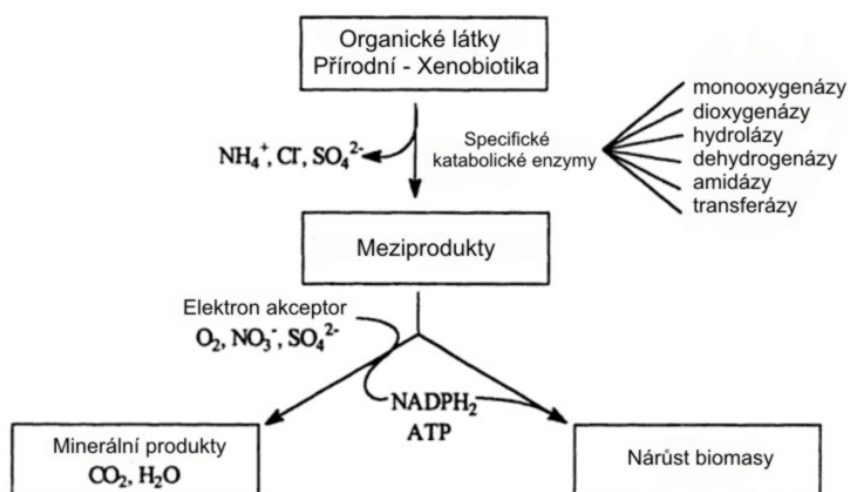
Koncentrace testované látky se vyjádří v logaritmických hodnotách ($\log c$), inhibice spotřeby kyslíku se vyjádří v procentech a získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je $\log c$ (osa x) a závisle proměnnou je inhibice spotřeby kyslíku vyjádřená v procentech (osa y). Vynesenými body se proloží regresní přímka. Z rovnice regrese se vypočítá $\log c$ pro inhibici 50 % ($y = 50$). Odlogaritmováním hodnoty $\log c$ se získá hledaná koncentrace EC_{50} .

Často jsou výsledky stanovení poměrně variabilní. V těchto případech může být hodnota EC_{50} vyjádřena v určitém rozsahu např. $EC_{50} < 1$ mg/l, EC_{50} je od 1mg/l do 10mg/l, EC_{50} je od 10 mg/l do 100 mg/l [31, 41].

2.3 Biodegradace

Nejvýznamnějším procesem pro odstraňování polutantů z životního prostředí je biodegradace. Biodegradace může být definována jako biologicky katalyzované reakce, při kterých dochází ke změně ve struktuře organické látky. Biodegradace velmi často, ne však vždy, vede ke kompletní přeměně výchozích organických látek na anorganické produkty. Pokud dojde k jakékoliv změně ve struktuře výchozí látky mluvíme o biodegradaci, pokud však dojde k úplnému rozkladu výchozí látky na anorganické produkty (CO_2 , H_2O , NO_3^- atd.) mluvíme o mineralizaci (obr. 15).

Bakterie, v menší míře houby, řasy, kvasinky, hrají hlavní roli při mineralizaci organických látek v životním prostředí. Sloučeniny přírodního původu jsou velmi rychle degradovány a mineralizovány těmito mikroorganismy. Xenobiotika nejsou vždy lehce biologicky degradovatelné, a z tohoto důvodu velmi často vykazují perzistenci v životním prostředí [42].



Obrázek 15: Schéma biodegradace polutantů (upraveno dle 42).

Biodegradace není vždy pozitivním procesem. V některých případech mohou vzniknout z relativně neškodných výchozích látek toxičtější produkty, např. rtuť je v sedimentech pomocí mikroorganismů přeměněna na mono nebo dimethyl rtuť, která je více nebezpečná pro životní prostředí [43].

2.3.1 Biodegradace za různých podmínek

Biodegradace organických látek může probíhat různými způsoby, které jsou dány okolními podmínkami, zejména přítomností kyslíku při biodegradačních reakcích [43].

2.3.1.1 Aerobní degradace polutantů

Mnoho druhů mikroorganismů roste za aerobních podmínek, tedy za přítomnosti kyslíku. Při biodegradaci dochází k produkci energie z oxidace organických látek na CO₂ a asimilaci části uhlíku do nového buněčného materiálu. Organické látky jsou zdrojem uhlíku i zdrojem energie. Aerobní mikroorganismy využívají kyslík jako konečný akceptor elektronů. Za aerobních podmínek může být mnoho polutantů využito mikroorganismy jako zdroj uhlíku a energie např. vinylchlorid, benzen, toluen, fenol, naftalen. Růst na těchto polutantech znamená, že mikroorganismy jsou schopné produkovat enzymy, které je rozkládají na netoxické meziproducty využívané v mikrobiálním metabolismu [42].

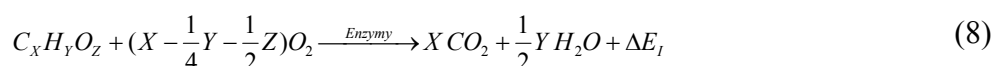
2.3.1.2 Anaerobní degradace polutantů

Anaerobní degradace může být definována jako degradace organických látek za podmínek, kde kyslík není používán jako konečný akceptor elektronů. Sloučeniny jako sulfáty, dusičnany, CO₂ a polutanty jsou redukovány elektrony, které pochází z oxidace organických látek, tedy fungují jako akceptory elektronů. Některé procesy např. denitrifikace – redukce dusičnanů na molekulární dusík, mohou probíhat jak u aerobních tak i u anaerobních bakterií. Příkladem mohou být některé druhy denitrifikačních bakterií, které jsou schopné oxidovat benzen za nepřítomnosti kyslíku, avšak za přítomnosti dusičnanů.

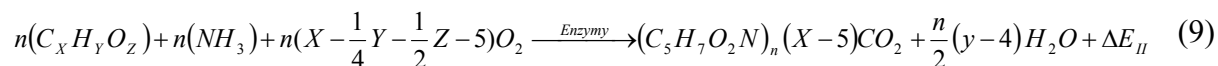
2.3.2 Mechanismus biodegradace

Biodegradace organických látek zahrnuje řadu reakcí, ty jsou ve velké míře závislé na fyziologii heterotrofních mikroorganismů, které v přítomnosti kyslíku používají organické látky jako zdroj uhlíku pro syntézu biomasy a jako zdroj energie [43].

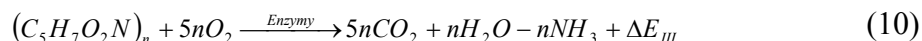
Oxidace organických látek mikroorganismy, pomocí enzymů jako katalyzátorů, je vyjádřena reakcí (8):



Syntéza nové biomasy je vyjádřena reakcí (9):



Endogenní respirace, představující část kyslíku, který je potřebný na vlastní dýchání mikroorganismů, je vyjádřena reakcí (10):



V rovnicích (8), (9) a (10) symbol ΔE značí změnu energie v systému [43].

2.3.3 Faktory ovlivňující biodegradaci

Rychlost a efektivita biodegradace organických látek závisí na mnoha faktorech. Pokud uvažujeme biodegradaci v přírodě, tak tyto faktory můžeme rozdělit do tří skupin: mikroorganismy, které jsou schopné degradovat specifické chemické struktury, podmínky okolního prostředí dovolující růst mikroorganismů a tvorbu degradačních enzymů a dobrý fyzický kontakt mezi organickým substrátem a organismem. Z hlediska experimentálního stanovení biodegradace můžeme tyto faktory rozdělit do čtyř odlišných skupin: živiny, fyzikálně-chemické podmínky, mikroorganismy a organické látky [42, 43, 44].

2.3.3.1 Živiny

Růst a životní funkce bakterií jsou závislé na přítomnosti živin. Optimální množství a druh živin závisí od druhů mikroorganismů a mechanismu degradace substrátu. Pro bakterie jsou životně důležité fosfáty, sulfáty, NaCl, vápník, amoniak, hořčík a železo. Kromě těchto hlavních živin, bakterie potřebují také mikroelementy jako jsou železo, měď, bor, mangan, zinek, molybden. Koncentrace živin v životním prostředí je poměrně proměnlivá, závislá na ročních obdobích, mění se během dne v důsledku změn fyzikálně-chemických vlivů a je proměnlivá také ve vodním sloupci v různých hloubkách.

Živiny, které mají největší vliv na biodegradaci, jsou dusík a fosfor. Ovlivňují buněčný růst, mají tedy vliv na tvorbu biomasy, která zintenzivňuje proces biodegradace. Zvláště fosfor je velmi důležitý, protože je limitním faktorem biodegradace.

Ve standardních testech biodegradace je fosfor přidáván ve větším množství, nejčastěji jako K_2HPO_4/KH_2PO_4 . Díky své pufrací kapacitě stabilizuje pH hodnotu systému [43].

2.3.3.2 Fyzikálně-chemické podmínky

Pro optimální průběh biodegradace musí být splněno několik fyzikálně chemických podmínek.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku

Koncentrace kyslíku má vliv na růst bakterií a na jejich respiraci. Jako kritická koncentrace kyslíku je definována taková koncentrace kyslíku, při které je respirace buněk poloviční oproti hodnotě naměřené při normální koncentraci kyslíku. Při koncentraci rozpuštěného kyslíku nižší než 1 mg.l^{-1} dochází k zastavení biodegradace, především aromatických polutantů, u nichž je kyslík využíván jako kosubstrát.

Hodnota pH

Při optimální hodnotě pH dochází k maximálnímu množení mikroorganismů. Hodnota pH je důležitá při jednotlivých enzymatických procesech. Obecně je optimální pH v neutrální oblasti a to mezi pH 6 – 8. Ve standardizovaných testech biodegradace je při dodání pufru ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) hodnota pH 7,4.

Teplota

Na biodegradaci má velmi významný vliv teplota, ovlivňuje zejména rozpustnost kyslíku, složení biomasy, dostupnost živin a má také vliv na metabolické dráhy. Teplota, stejně jako pH, zvyšuje rychlost biodegradace. Testy biodegradability jsou prováděny při teplotě v rozmezí 20 – 25 °C. Pro správnost výsledků je velmi důležité udržet konstantní teplotu po celou dobu měření.

Světlo

Biodegradace se měří ve tmě nebo v zatemněném prostoru, protože světlo může způsobit fotochemický rozklad látek a také může zvýšit fotosyntézu řas (fytoplanktonu), což vede k nesprávnému měření spotřeby kyslíku a tím také k nesprávnému posouzení biodegradability [43].

2.3.3.3 Mikroorganismy

Na biodegradaci organických látek ve vodném prostředí mají výrazný vliv přítomné mikroorganismy. Při testování biodegradability musí být tyto mikroorganismy přidávány do testovaného systému. Důležitý je zdroj těchto mikroorganismů, množství a předcházející úprava, zejména aklimatizace a adaptace.

Zdroj mikroorganismů

Organické látky v odpadní vodě může degradovat čistá nebo smíšená kultura mikroorganismů. Biodegradace s čistými kulturami mikroorganismů se využívá převážně při studiu mechanismů degradace jednotlivých chemických látek, umožňující čištění specifických znečištění *In situ*. Při běžném posouzení biodegradace se využívá smíšených bakteriálních kultur. Schopnost biodegradace je při použití smíšených kultur vyšší, kultura je více odolná a v neposlední řadě je schopná degradovat xenobiotika kombinovaně – za použití více druhů mikroorganismů. Při standardních testech biodegradability se jako zdroj bakterií používá aktivovaný kal z komunálních čistíren odpadních vod.

Množství

Množství bakterií v přírodních vodách se poměrně liší. Při testování biodegradability se nejčastěji využívají bakterie aktivovaného kalu, jejichž koncentrace se v aktivovaném kalu pohybuje mezi 10^7 a 10^9 buněk.ml⁻¹. Ve standardních testech biodegradability se využívá široké spektrum koncentrací, záleží na účelu použitého testu.

Aklimatizace a adaptace mikroorganismů

Aklimatizace umožňuje mikroorganismům předcházet stresu při přechodu z jednoho prostředí do druhého, především vzhledem k různým fyzikálně-chemickým podmínkám. Adaptace začíná po přidání mikroorganismů do systému při tzv. lag-fázi. Adaptované organismy jsou takové, které zvyšují biodegradaci organických látek [43, 45].

2.3.3.4 Organické látky

Rychlost a rozsah biodegradace organických látek ve vodném prostředí je ve velké míře závislá na struktuře, rozpustnosti, těkavosti, toxicitě a také na koncentraci této látky. Těkavost a rozpustnost látek představují velký problém při posouzení biodegradability.

Vliv struktury organické látky

V posledních desetiletích řada autorů získala korelaci mezi strukturou organických látek a jejichmi vlastnostmi, jako je toxicita, bioakumulace, biodegradace. Existuje mnoho obecných pravidel pro určení biodegradace organických látek z jejich struktury např. čím vyšší molekulová hmotnost, tím hůř je látka degradována, látky ve vodě dobře rozpustné se snadněji degradují než látky ve vodě nerozpustné, látky s vyšším počtem benzenových jader snižují biodegradaci, heterocyklické sloučeniny se sírou jsou hůř degradovatelné než jejich analogy bez přítomnosti síry, čím více substituentů molekula obsahuje, tím hůř podléhá biodegradaci.

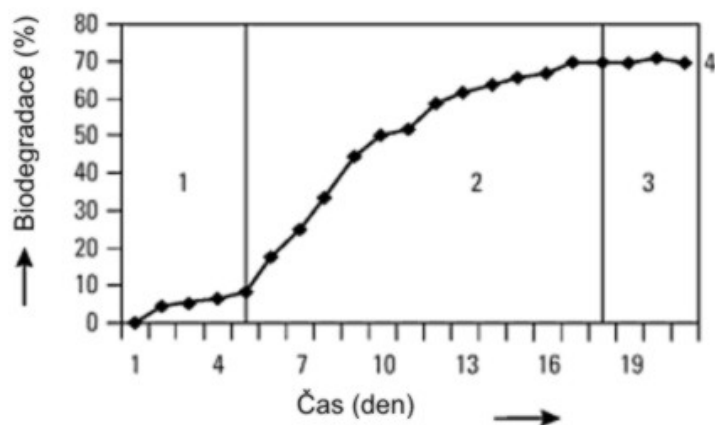
Vliv koncentrace organické látky

Koncentrace organické látky je velmi důležitá při testech biodegradability. Pro řadu látek existují kritické koncentrace, při kterých dochází k dobré biodegradaci těchto látek. Pokud je koncentrace látky nižší než kritická, mikroorganismy nemohou využít tolik energie z uhlíku, kolik potřebují na růst a udržení životních funkcí. Pokud je testovaná organická látka příliš toxická, vysoká koncentrace této látky v systému může mít negativní vliv na metabolismus mikroorganismů a tím i na výsledky celého testu. Koncentrace látky, která je v testu biodegradability použita, je závislá na toxicitě posuzované látky na zvolené metodě a na účelu testu [43].

2.3.4 Stanovení biodegradability organických látek

Testy biodegradability jsou používány za účelem zjištění schopnosti biodegradace chemických látek a také k předpovědi chování těchto látek v životním prostředí. Cílem každé testovací metody by měla být simulace procesů probíhajících v přírodě [46].

Při stanovení biodegradability se nyní jeví jako nejvhodnější a nejjednodušší respirometrická metoda, při které je jako výsledek biodegradability v závislosti na čase měřena změna tlaku v uzavřeném systému (obr. 16). Při stanovení biodegradability jsou využívány mikroorganismy aktivovaného kalu z biologického stupně čistírny odpadních vod [37].



Obrázek 16: Biodegradační křivka znázorňující lag-fázi 1), fázi exponenciálního růstu 2) a stacionární fázi 3) lehce biodegradovatelné látky 4) (upraveno dle 47).

Podstata zkoušky

Podstatou je posouzení biodegradability organických látek pomocí aerobních mikroorganismů. Pro zajištění optimálních podmínek těchto mikroorganismů v testu jsou do systému přidávána živná média složená z anorganických solí. Organické látky jsou v tomto testu zdrojem uhlíku a energie v médiu. Koncentrace testované látky je obvykle 100 mg.l^{-1} , teoretická spotřeba kyslíku by měla být také 100 mg.l^{-1} . Médium naočkované bakteriemi je mícháno v uzavřené láhvi a spotřeba kyslíku je stanovena měřením změny tlaku v aparátu. CO_2 je absorbován KOH uloženým ve víčku láhve. Biodegradace organických látek je měřena 28 dní, pokud je to nezbytné tak i déle.

Podmínky zkoušky

Test musí být prováděn ve tmě, v místnosti neobsahující toxické výpary a při teplotě mezi 20°C až 25°C , teplota se však nesmí změnit o více než $\pm 1^\circ \text{C}$.

Platnost zkoušky

Test musí být prováděn paralelně s referenční látkou. Procentuální degradace referenční látky octanu sodného (CH_3COONa) musí překročit po 5 dnech 50 %.

Vyhodnocení zkoušky

Hodnoty spotřeby kyslíku jsou počítány pro každou láhev zvlášť. Výpočet degradace organické látky závisí na zvolené metodě. Pro respirometrické měření biodegradace je objem vzorku vybrán na základě očekávané spotřeby kyslíku (tabulka 1).

Tabulka 1: Výběr objemu vzorku na základě očekávané spotřeby kyslíku

Očekávaná spotřeba (mg/l)	Objem (ml)	Faktor pro výpočet
0 – 40	432,0	1
0 – 80	365,0	2
0 – 200	250,0	5
0 – 400	164,0	10
0 – 800	97,0	20
0 – 2000	43,5	50
0 – 4000	22,5	100

Reálná spotřeba kyslíku odečtená z měřicího zařízení je vynásobena faktorem, který je použit dle objemu testované směsi v barometrické sklenici. Z této hodnoty můžeme vypočítat procentní biodegradaci v každém časovém okamžiku dle rovnice (11):

$$D_t = \frac{SK_{vz} - SK_{sl}}{TSK} \cdot 100, \text{ kde} \quad (11)$$

D_t je biodegradace v čase t (%);

SK_{vz} je spotřeba kyslíku ve vzorku v čase t ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$);

SK_{sl} je spotřeba kyslíku v kontrolním vzorku v čase t ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$);

TSK je teoretická spotřeba kyslíku ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Abiotickou tj. fyzikálně-chemickou degradaci vypočítáme pomocí rovnice (12):

$$D_t = \frac{SK_{abiot}}{TSK} \cdot 100, \text{ kde} \quad (12)$$

D_t viz. rovnice (11);

SK_{abiot} spotřeba kyslíku v abiotickém vzorku v čase t (mg/l);

TSK viz. rovnice (11).

Výsledky se zpracovávají pomocí výpočetní techniky. Ze získaných hodnot se sestrojí biodegradační křivka, kde nezávisle proměnnou je čas (osa x) a závisle proměnnou je biodegradace v procentech (osa y).

Pokud je to možné, tak se z biodegradační křivky odečte oblast lag-fáze, maximální biodegradace a celkový čas degradace [37, 48].

2.4 Klasifikace látek na základě testování ekotoxicity a biodegradability

Zákon 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů, vymezuje povinnosti právnických osob nebo podnikajících fyzických osob při klasifikaci a zkoušení nebezpečných vlastností, balení a označování, uvádění na trh nebo do oběhu a při vývozu a dovozu chemických látek a chemických přípravků, při oznamování a registraci chemických látek a vymezuje působnost správních orgánů při zajišťování ochrany zdraví a životního prostředí před škodlivými účinky chemických látek a chemických přípravků [49].

Podle tohoto zákona chemické látky jsou chemické prvky a jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem včetně případných přísad nezbytných pro uchování jejich stability a jakýchkoliv nečistot vznikajících ve výrobním procesu. Chemické přípravky jsou směsi nebo roztoky složené ze dvou nebo více chemických látek. Klasifikace těchto látek a přípravků je postup zjišťování nebezpečných vlastností látky nebo přípravku, hodnocení zjištěných vlastností a následné zařazení takové látky nebo přípravku do jednotlivých skupin nebezpečnosti. Nebezpečné látky nebo přípravky jsou takové látky nebo přípravky, které za podmínek stanovených tímto zákonem mají jednu nebo více nebezpečných vlastností.

Na základě výsledků testů toxicity se specifickými testovacími organismy, tedy hodnot LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} a na základě výsledků testů biodegradability můžeme odhadovat vliv těchto látek na životní prostředí. Třídy, do kterých tyto látky zařazujeme na základě jejich potenciálního vlivu na životní prostředí jsou uvedeny v tabulce 2. Pro klasifikaci látek se využívají druhy organismů, které vykazují nejvyšší citlivost.

Specifickou rizikovost označují R- věty, které upozorňují na nebezpečí látek nebo přípravků a jsou používány mezinárodně [49, 50].

Tabulka 2: Rozdělení látek dle specifické rizikovosti (upraveno dle 37, 50).

R-věty	Popis	Dobrá bio-degradace	log P _{ow}	BCF	Řasy 72hIC ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Dafnie 48hEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Ryby 96hLC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
R53	Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí	Ne	> 3	>100	Potvrzená perzistence nebo bioakumulace látky, možnost výskytu opožděných nebo chronických následků		
R50/53	Vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí	Ne	< 3	< 100	< 1	< 1	< 1
		Ano	> 3	> 100			
		Ne	> 3	> 100			
R50	Vysoce toxický pro vodní organismy	/	/	/	< 1	< 1	< 1
R51/53	Toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí	Ne	< 3	< 100	1 - 10	1 - 10	1 - 10
		Ano	> 3	> 100			
		Ne	> 3	> 100			
R51	Toxický pro vodní organismy	/					
R52/53*	Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí	Ne	> 3	> 100	10 - 100	10 - 100	10 - 100
R52	Škodlivý pro vodní organismy	/					

* Látka bude zařazena do této kategorie, i když nesplňuje kritéria R52/53 pokud existují jiné údaje o nebezpečí pro vodní prostředí.

/ Hodnoty nejsou definovány

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem zadané diplomové práce bylo posouzení vlivu monomerů formaldehydových pryskyřic na životní prostředí. Vzorky byly odebrány ze společnosti zabývající se výrobou melamin-formaldehydových a močovino-formaldehydových pryskyřic, které jsou využívány jako adheziva. Odebírání vzorků probíhalo během výrobního procesu. Odebrané vzorky byly označeny za monomery (resp. směsi monomerů). Jejich vlastnosti nebyly blíže specifikovány.

Pro komplexnější posouzení vlivu těchto látek na životní prostředí byla testována ekotoxicita a také biodegradabilita. Pro účely ekotoxikologického hodnocení byly zvoleny tři testy, a to akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*, akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri* a akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem. Pro posouzení biodegradability byla vybrána metoda stanovení spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Všechny tyto testy jsou standardními testy. Na základě výsledků těchto testů byl posouzen vliv testovaných vzorků na životní prostředí.

Močovino-formaldehydová pryskyřice byla v kapalném stavu. Vzorek měl vysokou viskozitu a bílou barvu. Vzorek byl naředěn destilovanou vodou na koncentraci 0,1 obj % a kvůli problémům s rozpustností byla přidána kyselina chlorovodíková a následně bylo pH upraveno na hodnotu pH 6 – 7 pomocí 1M NaOH.

Melamin-formaldehydová pryskyřice byla v pevném stavu. Vzorek byl bílý a pudrovitý. Vzorek byl převeden do roztoku o koncentraci 1 g.l⁻¹ v destilované vodě. I u tohoto vzorku se také objevily problémy s rozpustností, postup rozpouštění byl stejný jako u předešlého vzorku (obr. 17).



Obrázek 17: Testované vzorky.

3.1 Stanovení ekotoxicity vzorků

3.1.1 Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Testovací organismy

Pro testování byly použity perloočky *Daphnia magna* z vlastního chovu. Perloočky byly chovány v akváriích v médiu M4 [51] v místnosti o teplotě $20 \pm 2^\circ \text{C}$ při fotoperiodě 16 hodin světla/ 8 hodin tmy, krmeny suspenzí řas *Desmodesmus subspicatus* (obr. 18).



Obrázek 18: Chovné nádrže pro perloočky *Daphnia magna*

Testovací médium

Jako testovací médium byla použita standardní ředící voda připravená ze čtyř zásobních roztoků: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $11,76 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $4,93 \text{ g.l}^{-1}$, NaHCO_3 o koncentraci $2,59 \text{ g.l}^{-1}$, KCl o koncentraci $0,23 \text{ g.l}^{-1}$. Objem 25 ml každého ze čtyř zásobních roztoků se smíchá a doplní vodou do 1 litru. Hodnota pH takto připravené ředící vody musí být $7,8 \pm 0,2$ a koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 7 mg.l^{-1} [28].

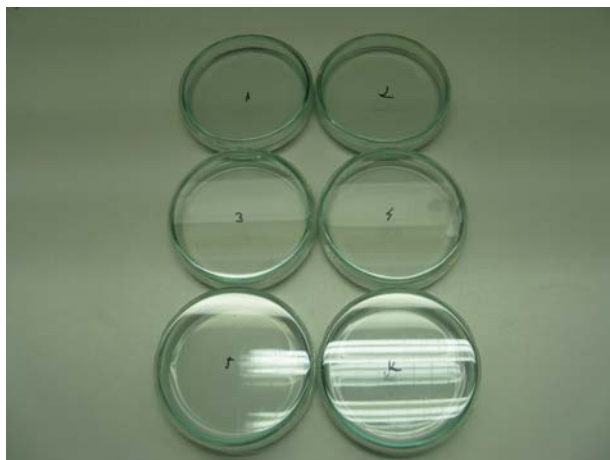
Provedení testu

Pro testování vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice byly zvoleny pro předběžný test koncentrace 0, 1, 30, 60, 90 obj. %. Pro přípravu těchto koncentrací bylo odebráno 1, 30, 60, 90 ml zásobního roztoku o koncentraci 1 ml.l^{-1} a doplněno ředící vodou do 100 ml.

Pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice byly zvoleny pro předběžný test koncentrace 0, 10, 100, 150, 200 ml.l^{-1} . Pro přípravu těchto koncentrací bylo odebráno 1, 10, 15 a 20 ml zásobního roztoku o koncentraci 1 g.l^{-1} a doplněno ředící vodou do 100 ml.

Od každé koncentrace testovaného vzorku bylo odpipetováno 30 ml do Petriho misek. Test byl prováděn ve dvou paralelních stanoveních. V kontrolním vzorku byla použita ředící voda.

Do každé koncentrace testovaných látek bylo nasazeno 10 perlooček mladších 24 hodin (obr. 19).



Obrázek 19: Test s *Daphnia magna*

Na základě výsledků předběžného testu byly připraveny individuální série koncentrací pro každou testovanou látku.

Vyhodnocení testu

Po 24 hodinách byl v každé koncentraci testovaných látek zjištěn počet imobilizovaných jedinců. Perloočky, které nebyly schopné plavat po promíchání kapaliny, byly považovány za imobilizované. Z celkového počtu imobilizovaných jedinců bylo pro každou koncentraci testovaných látek vypočítáno procento úmrtnosti vztažené na celkový počet jedinců v této koncentraci. Ze získaných výsledků byla stanovena hodnota 24hEC₅₀ [28].

3.1.2 Akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*

Testovací organismy

Testovacími organismy jsou luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*, které jsou spolu s reaktivačním roztokem uchovávány při teplotě -18°C.

Testovací médium

Jako kontrolní vzorek byl použit 2% roztok NaCl. Při stanovení byly do 100 ml vzorku přidány 2 g NaCl, hodnota pH vzorků bylo upraveno na $7,0 \pm 0,2$ pomocí 0,1M HCl nebo 0,1M NaOH.

Provedení testu

Měření probíhalo na luminometru LUMIStox 300, obsahující dvě jednotky: jednou jsou měřeny vzorky a druhá jednotka sloužící k inkubaci vzorků (obr. 20). Suspenze bakterií a vzorek byly ponechány v termostatu při teplotě 15 °C. Postupným ředěním výchozího vzorku byla připravena sada pro měření:

- Do kyvety (A1) byly přidány 4 ml testovacího média (2% NaCl)
- Do kyvety (A2) byly přidány 4 ml vzorku
- Do kyvety (A3 – A10) byl přidán 1,5 ml testovacího média
- Bylo odebráno 1,5 ml vzorku z kyvety (A2) a přidáno do kyvety (A3)
- Bylo odebráno 1,5 ml směsi vzorku a testovacího média z kyvety (A3) a přidáno do kyvety (A4)
- Ředění vzorku pokračovalo stejným způsobem z kyvety (A4) až do kyvety (A10)

Do každé kyvety paralelní sady B a C bylo přidáno 0,5 ml suspenze bakterií. Okamžitě byla měřena bioluminiscence suspenze bakterií (I_0). Následně byly přidány různé koncentrace vzorku ze sady A a po 30 minutách byla opět měřena bioluminiscence (I_{30}). Inhibice intenzity bioluminiscence byla měřena z rozdílů intenzit na začátku měření a po 30 minutové inkubaci [36].



Obrázek 20: Luminometr LUMIStox 300

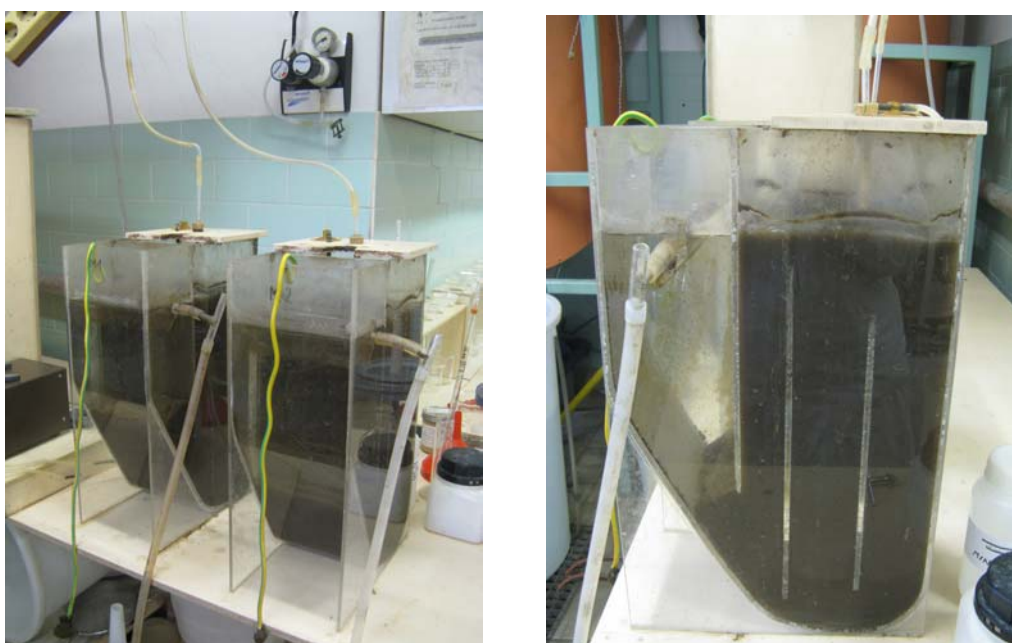
Vyhodnocení testu

Vyhodnocení probíhalo počítačovým programem pomocí přístroje LUMIStox 300 na základě rovnic (1), (2), (3). Výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty 30minEC₅₀ [36].

3.1.3 Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem

Testovací organismy

Při tomto testu byl použit aktivovaný kal z aerobních reaktorů laboratorní čistírny odpadní vody (obr. 21). Aerobní reaktory měly objem 8,3 litrů a sekundární čičič 2,2 litrů. Teplota systému byla 20 ± 2 °C a aerační zařízení zajišťovalo koncentraci rozpuštěného kyslíku v systému nejméně 2 mg.l^{-1} . Čas zdržení aktivovaného kalu byl 9 – 11 dní a hydraulický čas zdržení byl 6 – 7 dní. Do aerobních reaktorů přitékala syntetická komunální odpadní voda složená ze 70 % destilované vody a z 30 % komunální odpadní vody. Do systému bylo přidáno 130 mg.l^{-1} peptonu a $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ fosforu ve formě KH_2PO_4 . Parametry čistírny komunální odpadní vody jsou popsány v tabulce 3 [52].



Obrázek 21: Laboratorní aerobní reaktory s aktivovaným kalem.

Tabulka 3: Parametry laboratorní čistírny komunálních odpadních vod [52].

Parametry	Hodnoty
Přítok	$22,0 \pm 2,0 \text{ (l.den}^{-1}\text{)}$
Čas zdržení	0,01 (h)
Objemový index aktivovaného kalu	$88 \pm 13 \text{ (ml.g}^{-1}\text{)}$
Chemická spotřeba kyslíku	$130 \pm 12 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$
Koncentrace aktivovaného kalu	$3,2 \pm 0,2 \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$

Všechny testy byly prováděny s neadaptovaným aktivovaným kalem.

V závislosti na rychlosti sedimentace byl odebraný aktivovaný kal ponechán sedimentovat, obvykle asi 10 min. Voda nad usazeným aktivovaným kalem byla slita a kal byl několikrát proplachován vodovodní vodou zbavenou chloru. Po posledním usazení byla voda opět slita, tímto způsobem byl aktivovaný kal zakoncentrován a připraven pro testování.

Pro zjištění koncentrace aktivovaného kalu bylo filtrováno 20 ml zakoncentrovaného kalu přes předem zvážený a předsušený filtrační papír s velikostí pórů 2 μm . Filtrační papír se suspendovanými částicemi aktivovaného kalu byl sušen při 105 °C do konstantní váhy. Koncentrace aktivovaného kalu byla vypočítána pomocí rovnic (13) a (14):

$$m = m_{f+ak} - m_f, \text{ kde} \quad (13)$$

m je hmotnost suspendovaných částic aktivovaného kalu (g);

m_{f+ak} je hmotnost suspendovaných částic aktivovaného kalu a filtračního papíru (g);

m_f je hmotnost filtračního papíru (g).

$$X = \frac{m}{V}, \text{ kde} \quad (14)$$

X je koncentrace aktivovaného kalu (g.l^{-1});

m viz rovnice (13);

V je objem zakoncentrovaného aktivovaného kalu (l).

Testovací médium

Do všech testovaných vzorků bylo přidáno živné médium pro mikroorganismy aktivovaného kalu. Živné médium se skládá z anorganických solí a organických látek (tabulka 4).

Tabulka 4: Složení živného média.

Název	Vzorec	Množství (g)
Močovina	$[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	3,0
Chlorid sodný	NaCl	0,7
Chlorid vápenatý dihydrát	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4
Síran manganatý heptahydrát	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Hydrogenfosforečnan draselný	K_2HPO_4	2,8
Všechny soli byly rozpuštěny v destilované vodě, celkový objem směsi byl doplněn na 1 litr destilovanou vodou.		

Samostatně byl připraven roztok lehce biodegradovatelné látky – peptonu o koncentraci 20 g.l^{-1} .

Provedení testu

V 500 ml kádinkách byly připraveny různé koncentrace testovaných látek, kontrolní a abiotický vzorek. První test byl prováděn s referenční látkou 3,5-dichlorofenolem. Koncentrace zásobního roztoku referenční látky byla 1g.l^{-1} .

Byly připraveny zásobní roztoky testovaných vzorků: močovino-formaldehydová pryskyřice o koncentraci 0,1 obj. % a melamin-formaldehydová pryskyřice o koncentraci 2g.l^{-1} . K testovaným vzorkům o různých koncentracích bylo přidáno 16 ml živného média (Tabulka 4), aktivovaný kal o koncentraci 800mg.l^{-1} a 16 ml peptonu. Inhibice spotřeby kyslíku byla měřena nejdřív bez přídavku ATU ($c = 11,6\text{mg.l}^{-1}$) a následně s přídavkem 5 ml ATU. V systému bez ATU byla měřena inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů a v systému s přídavkem ATU inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů.

Kontrolní vzorek obsahoval živné médium, aktivovaný kal o stejné koncentraci jako v předešlém testu a pepton. Do systému nebyly přidány testované vzorky. Test byl také prováděn bez ATU a následně s přídavkem ATU.

Abiotický vzorek obsahovat živné médium, pepton a testovanou látku. Test byl také prováděn bez ATU a následně s přídavkem ATU.

Připravené směsi obsahující různé koncentrace testovaných vzorků, kontrolní a abiotický vzorek byly provzdušňovány kyslíkem po dobu 30 minut (obr. 22).



Obrázek 22: Inkubace kyslíkem připravených směsí.

Po 30-ti minutové inkubaci byla každá směs přelita do kyslíkových skleniček. Spotřeba kyslíku byla měřena kyslíkovou sondou. Každých 30 sekund byla odečítána hodnota kyslíku ve směsích po dobu 6 minut (obr. 23).



Obrázek 23: Měření spotřeby kyslíku kyslíkovou sondou.

Přesné složení směsí pro testování vzorků je zaznamenáno v tabulkách 5 – 9.

Tabulka 5: Složení směsi při testování referenční látky 3,5-DCF.

Koncentrace referenční látky 3,5-DCF v testu	živné médium (ml)	pepton (ml)	aktivovaný kal (mg.l^{-1})	Vzorek (ml)	celkový objem (ml)
0 mg.l^{-1} - kontrolní vzorek	16	16	800	/	500
2 mg.l^{-1}	16	16	800	1	500
10 mg.l^{-1}	16	16	800	5	500
20 mg.l^{-1}	16	16	800	10	500
20 mg.l^{-1} - abiotický vzorek	16	16	/	10	500

/ bez přídavku

Tabulka 6: Složení směsi při testování vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice bez
přídavku ATU.

Koncentrace močovino- formaldehydové pryskyřice v testu	živné médium (ml)	pepton (ml)	aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Vzorek (ml)	celkový objem (ml)
0 obj. % - kontrolní vzorek	16	16	800	/	500
7 obj.%	16	16	800	35	500
11 obj.%	16	16	800	55	500
15 obj.%	16	16	800	75	500
15 obj. % - abiotický vzorek	16	16	/	75	500

/ bez přídavku

Tabulka 7: Složení směsi při testování vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice s
přídavkem ATU.

Koncentrace močovino- formaldehydové pryskyřice v testu	živné médium (ml)	pepton (ml)	aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Vzorek (ml)	celkový objem (ml)	ATU (ml)
0 obj. % - kontrolní vzorek	16	16	800	/	500	5
7 obj. %	16	16	800	35	500	5
11 obj. %	16	16	800	55	500	5
15 obj. %	16	16	800	75	500	5
15 obj. % - abiotický vzorek	16	16	/	75	500	5

/ bez přídavku

Tabulka 8: Složení směsi při testování vzorku melamin-formaldehydové pryskyřice bez
přídavku ATU.

Koncentrace melamin- formaldehydová pryskyřice	živné médium (ml)	pepton (ml)	aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Vzorek (ml)	celkový objem (ml)
0 mg.l ⁻¹ - kontrolní vzorek	16	16	800	/	500
700 mg.l ⁻¹	16	16	800	87,5	500
1000 mg.l ⁻¹	16	16	800	125,0	500
1500 mg.l ⁻¹	16	16	800	187,5	500
1500 mg.l ⁻¹ - abiotický vzorek	16	16	/	187,5	500

/ bez přídavku

Tabulka 9: Složení směsi při testování vzorku melamin-formaldehydové pryskyřice s
přídavkem ATU.

Koncentrace melamin- formaldehydová pryskyřice	živné médiu (ml)	pepton (ml)	aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Vzorek (ml)	celkový objem (ml)	ATU (ml)
0 mg.l ⁻¹ - kontrolní vzorek	16	16	800	/	500	5
700 mg.l ⁻¹	16	16	800	87,5	500	5
1000 mg.l ⁻¹	16	16	800	125,0	500	5
1500 mg.l ⁻¹	16	16	800	187,5	500	5
1500 mg.l ⁻¹ - abiotický vzorek	16	16	/	187,5	500	5

/ bez přídavku

Vyhodnocení testu

Pro každou koncentraci testovaných látek byl sestaven diagram závislosti měřené koncentrace kyslíku na čase. Na základě rovnic (5), (6) a (7) byla vypočítána inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů, dále heterotrofních a nitrifikačních mikroorganismů. Výsledkem měření byla hodnota 30minEC₅₀ [41].

3.2 Stanovení biodegradability vzorků

Při stanovení biodegradability byla měřena spotřeba kyslíku v uzavřeném respirometru OxiTop®. Pro test byl použit aktivovaný kal obsahující mikroorganismy, které jsou schopné biodegradovat organické látky. Aktivovaný kal byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.1.3. Koncentrace aktivovaného kalu v systému byla 30 mg.l⁻¹.

Testovací médium

K vzorkům byly přidány čtyři druhy živného média, které jsou složeny z různých anorganických solí (tabulka 10 - 13). Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml živného média a, a 1 ml živných médií b, c, d.

Tabulka 10: Složení živného média a.

Název	Vzorec	Koncentrace (g.l ⁻¹)
Dihydrogen fosforečnan draselný	KH ₂ PO ₄	8,50
Hydrohen fosforečnan draselný	K ₂ HPO ₄	21,75
Hydrogen fosforečnan sodný dihydrát	NaHPO ₄ .2H ₂ O	33,40
Chlorid amonný	NH ₄ Cl	0,50

Tabulka 11: Složení živného média b.

Název	Vzorec	Koncentrace (g.l ⁻¹)
Síran hořečnatý heptahydrát	MgSO ₄ .7H ₂ O	22,50

Tabulka 12: Složení živného média c.

Název	Vzorec	Koncentrace (g.l ⁻¹)
Chlorid vápenatý	CaCl ₂	27,50

Tabulka 13: Složení živného média d.

Název	Vzorec	Koncentrace (g.l ⁻¹)
Chlorid železitý	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25

Provedení testu

Byly připraveny zásobní roztoky testovaných vzorků: močovino-formaldehydová pryskyřice o koncentraci 0,1 obj. % a melamin-formaldehydová pryskyřice o koncentraci 1 g.l⁻¹. V litrových odměrných baňkách byly připraveny testované roztoky, kontrolní, abiotické vzorky a vzorek obsahující referenční látku. Koncentrace vzorků v systému byla stanovena na základě chemické spotřeby kyslíku dle normy [53] a z výsledků testů toxicity s aktivovaným kalem tak, aby koncentrace testované látky nebyla toxická pro mikroorganismy, nacházející se v aktivovaném kalu.

K testovaným vzorkům byly přidány živná média a, b, c, d a aktivovaný kal o koncentraci 30 mg.l⁻¹.

Kontrolní vzorek obsahoval živná média a, b, c, d, a aktivovaný kal o stejné koncentraci jako při testování vzorků.

Referenční vzorek obsahoval živná média a, b, c, d, a aktivovaný kal o stejné koncentraci jako v předešlých testech. Jako referenční látka byl použit octan sodný (CH₃COONa). Octan sodný je lehce biodegradovatelná látka, která v několika dnech dosáhne 90% biodegradace.

Abiotický vzorek obsahoval živné média a, b, c, d, testované látky a chlorid rtuťnatý (HgCl₂). Abiotický test slouží ke zjištění podílu fyzikálně-chemické degradace.

Přesný objem (365 ml) připravených směsí byl přelit do barometrických sklenic, bylo přidáno magnetické míchadlo a do hrdla byla vložena pryžová zátka, která obsahovala KOH. Na hrdlo sklenice bylo připevněno měřicí zařízení OxiTop® (obr. 24). Po dvou hodinách v místnosti s konstantní teplotou (20 ± 2 °C) začalo měření. Sklenice byly po dobu 28 dní v temném prostoru s konstantní teplotou. Hodnoty z měřicího zařízení byly odečítány každý den (obr. 25).



Obrázek 24: Inkubace vzorků s měřicím zařízením OxiTop®.



Obrázek 25: Odečítání hodnot ze zařízení OxiTop®.

Koncentrace testované látky by měla být zvolena tak, aby její koncentrace v systému odpovídala maximálně hodnotě 30minEC_{20} při stanovení toxicity s použitím aktivovaného kalu. Z důvodů vyšší toxicity vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice byly zvoleny dvě různé koncentrace, které byly použity při testu biodegradability. První koncentrace odpovídala $30\text{minEC}_{20} = 6,5 \text{ obj. } \%$, ale TSK byla pouze 29 mg.l^{-1} , z toho důvodu byla zvolena druhá koncentrace $30\text{minEC}_{50} = 10 \text{ obj. } \%$ s TSK = 44 mg.l^{-1} .

Přesné složení směsí pro testování biodegradability vzorků je zaznamenáno v tabulkách 14 – 16.

Tabulka 14: Složení směsi při stanovení biodegradability kontrolního vzorku a referenční látky.

Název	Množství testované látky (mg)	TSK (mg.l ⁻¹)	Živné médium a (ml)	Živné média b, c, d (ml)	HgCl ₂ (ml)	Aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Celkový objem (ml)
Kontrolní vzorek	/	/	10	1	/	30	1000
Referenční vzorek	100	78	10	1	/	30	1000

/ bez přídavku

Tabulka 15: Složení směsi při stanovení biodegradability vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice

Koncentrace zásobního roztoku testované látky	Množství testované látky (ml)	TSK (mg.l ⁻¹)	Živné médium a (ml)	Živné média b, c, d (ml)	HgCl ₂ (ml)	Aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Celkový objem (ml)
6,5 obj %	65	29	10	1	/	30	1000
10 obj %	100	44	10	1	/	30	1000
abiotický vzorek 10 obj %	100	44	10	1	10	30	1000

/ bez přídavku

Tabulka 16: Složení směsi při stanovení biodegradability vzorku melamin-formaldehydové pryskyřice

Koncentrace zásobního roztoku testované látky	Množství testované látky (ml)	TSK (mg.l ⁻¹)	Živné médium a (ml)	Živné média b, c, d (ml)	HgCl ₂ (ml)	Aktivovaný kal (mg.l ⁻¹)	Celkový objem (ml)
400 mg.l ⁻¹	200	62	10	1	/	30	1000
abiotický vzorek 400 mg.l ⁻¹	200	62	10	1	10	30	1000

/ bez přídavku

Vyhodnocení testu

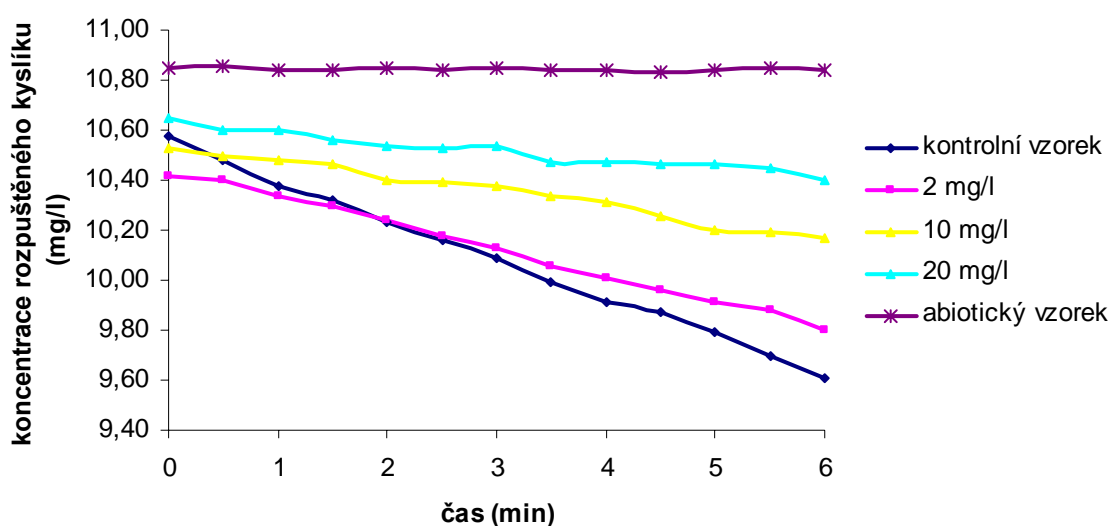
Z hodnot odečtených z měřicího systému a použitím rovnic (11) a (12) byly sestrojeny křivky biodegradability testovaných látek. Na základě těchto křivek byla posouzena biodegradabilita vzorků [48].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Testování ekotoxicity

Ekotoxicita vzorků byla hodnocena pomocí tří standardních testů. Jako první byl použit akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*, dále akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri* a posledním testem byl akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem. Výsledkem bylo stanovení hodnot EC_{50} pro každý testovaný vzorek.

U testu s aktivovaným kalem bylo nutno provést referenční test, protože kvalita aktivovaného kalu se v různých obdobích značně liší. Jako referenční látka byl použit 3,5-dichlorofenol o koncentraci zásobního roztoku 1 g.l^{-1} (graf 1). Pro testování byly zvoleny koncentrace 2 mg.l^{-1} , 10 mg.l^{-1} a 20 mg.l^{-1} 3,5-DCF. Test byl prováděn dle metodiky a za stejných podmínek jako následující testy vzorků.



Graf 1: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase při testování referenční látky 3,5-DCF.

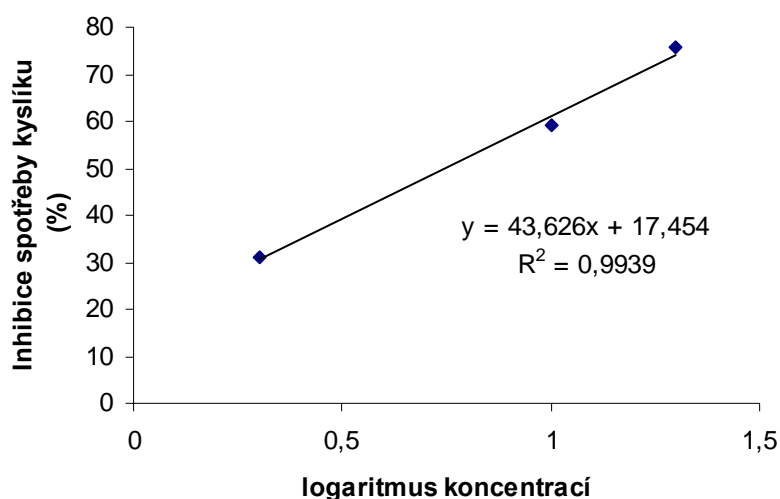
Z grafu 1 byly získány rovnice regrese pro každý vzorek. Z rovnic regrese byly odečteny hodnoty R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$), což jsou spotřeby kyslíku aktivovaným kalem v jednom litru směsi za minutu. Ty byly přepočítány na spotřebu kyslíku za hodinu R ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Z těchto hodnot byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku (tabulka 17) použitím rovnice (5).

Tabulka 17: Rychlost a inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při testování referenční látky 3,5-DCF.

Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,1565x + 10,555$	0,1565	9,390	/
2 mg.l^{-1}	$y = -0,1059x + 10,443$	0,1059	6,354	31,2
10 mg.l^{-1}	$y = -0,0622x + 10,541$	0,0622	3,732	59,1
20 mg.l^{-1}	$y = -0,0364x + 10,627$	0,0364	2,184	75,6
Abiotický vzorek	$y = -0,0018x + 10,849$	0,0018	0,108	/

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testované referenční látky byl sestrojen graf a rovnice regrese. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 5,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (graf 2). Hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 2 – 20 mg.l^{-1} .



Graf 2: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu koncentrace při testování referenční látky 3,5-DCF.

Na základě hodnoty R pro kontrolní vzorek byla vypočítána specifická respirační rychlost aktivovaného kalu (R_S) použitím rovnice (4). Specifická respirační rychlost byla $R_S = 23,5 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Hodnota by měla být vyšší než $20 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

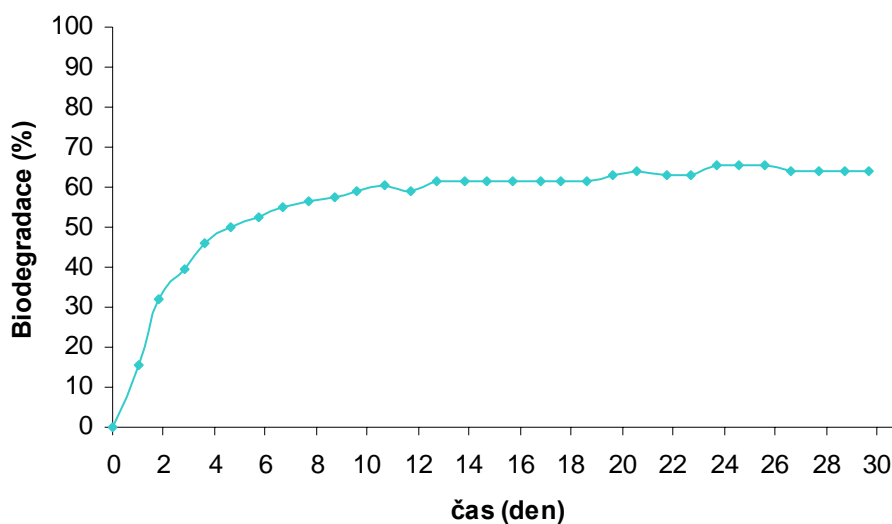
Stanovení hodnoty 30minEC_{50} pro referenční látku 3,5-DCF a stanovení specifické respirační rychlosti jsou podmínkami platnosti testu a vyhovovaly limitům uvedeným pro tento standard [41]. Aktivovaný kal tedy mohl být využit při testování toxicity.

Perloočky *Daphnia magna* a luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri* nebyly před použitím testovány referenčními látkami. Jejich testování probíhá v laboratořích průběžně a hodnoty z těchto standardních testů dlouhodobě vyhovují limitům v normách [28, 36].

Testování biodegradability

Pro stanovení biodegradability vzorků byl použit test spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Výsledkem bylo posouzení biodegradability vzorku.

Pro splnění platnosti testu byla vyhodnocena biodegradabilita referenční látky octanu sodného (graf 3).



Graf 3: Biodegradace referenční látky v závislosti na čase.

Z grafu 3 byla odečtena hodnota biodegradace referenční látky po 5 dnech. Biodegradace přesáhla 50 %, podmínka platnosti tedy byla splněna. Mikroorganismy aktivovaného kalu jsou schopné degradovat organické látky a aktivovaný kal může být použit pro další testování.

4.1 Močovino-formaldehydová pryskyřice

4.1.1 Ekotoxikologické hodnocení vzorku

4.1.1.1 Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 3.1.1. Na základě výsledků těchto testů byl připraven základní test. Pro kontrolu výsledků byl základní test prováděn dvakrát.

Výsledky z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 18, výsledky ze základního testu v tabulce 19 a 20. Imobilizace v kontrole byla vždy 0 %.

Tabulka 18: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v předběžném testu

Koncentrace (obj. %)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h	
		(ks)	(%)
0	10	0	0
1	10	0	0
30	10	0	0
60	10	10	100
90	10	10	100

Ze získaných výsledků z předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test na 35 obj. % až 55 obj. %.

Tabulka 19: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v základním testu č. 1.

Koncentrace (obj. %)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h		Probity
		(ks)	(%)	
0	10	0	0	0
35	10	2	20	4,16
40	10	4	40	4,75
45	10	7	70	5,52
50	10	9	90	6,28
55	10	10	100	8,09

Tabulka 20: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v základním testu č. 2.

Koncentrace (obj. %)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h		Probity
		(ks)	(%)	
0	10	0	0	0
35	10	2	20	4,16
40	10	5	50	5,00
45	10	7	70	5,52
50	10	8	80	5,84
55	10	10	100	8,09

V základním testu č. 1 byla pomocí rovnice regresní přímky vypočítána hodnota $24hEC_{50} = 41,2$ obj. %, pomocí probitové analýzy byla stanovena hodnota $24hEC_{50} = 40,5$ obj. %. V základním testu č. 2 byla pomocí rovnice regresní přímky vypočítána hodnota $24hEC_{50} = 40,9$ obj. %, pomocí probitové analýzy byla stanovena hodnota $24hEC_{50} = 40,4$ obj. %. Porovnáním výsledků (tabulka 21) lze říci, že výsledky obou stanovení se výrazně neliší.

Tabulka 21: Výsledky testů s *Daphnia magna* pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice.

Základní test	Hodnota $24hEC_{50}$ (obj. %)	
	A*	B*
č. 1	41,2	40,5
č. 2	40,9	40,4

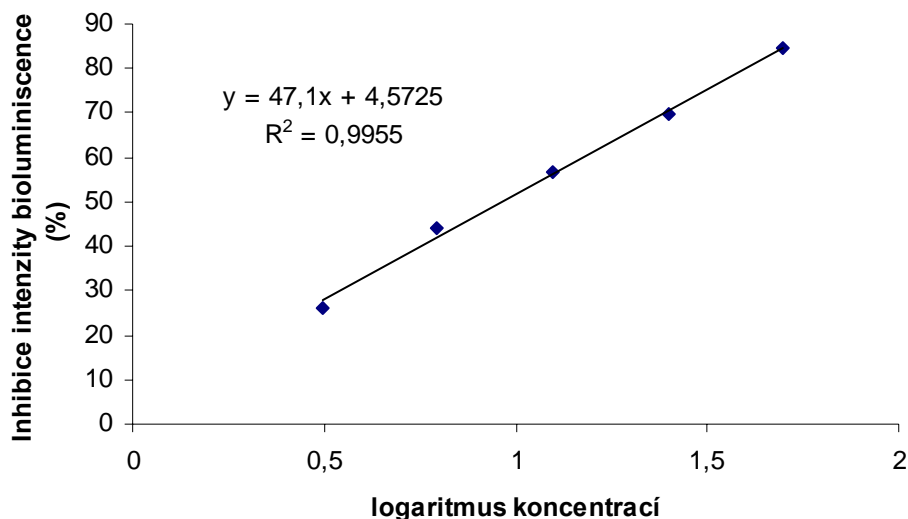
* A – hodnota $24hEC_{50}$ zjištěná pomocí regresní přímky

B – hodnota $24hEC_{50}$ zjištěná pomocí probitové analýzy

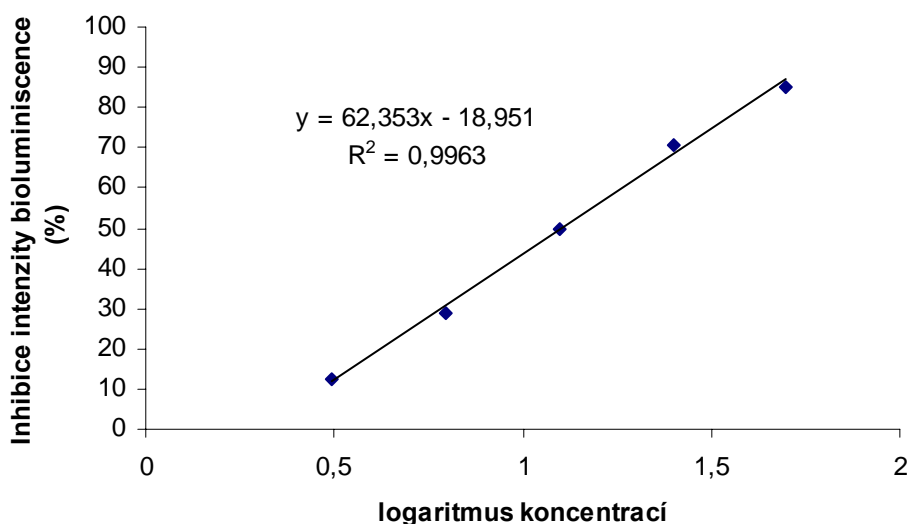
4.1.1.2 Akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*

Pro provedení akutního testu s luminiscenčními bakteriemi byly připraveny dvě paralelní sady vzorků. Ředěním byly připraveny koncentrace 50; 25; 12; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39 a 0,2 obj. %. Pro kontrolu výsledků byl test proveden dvakrát.

Hodnota $30minEC_{50}$ byla stanovena kalkulací přístrojem LUMISTox 300, výsledky byly také vyhodnoceny sestavením regresních přímek (graf 4) z testu č. 1 a (graf 5) z testu č. 2.



Graf 4: Závislost inhibice intenzity luminiscence na logaritmu koncentrace v testu č. 1.



Graf 5: Závislost inhibice intenzity luminiscence na logaritmu koncentrace v testu č. 2.

V testu č. 1 byla pomocí rovnice regresní přímky vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 9,2$ obj. %, kalkulací přístrojem LUMISTox300 byla zjištěna hodnota $30\text{minEC}_{50} = 9,1$ obj. %. V testu č. 2 byla pomocí rovnice regresní přímky vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 12,7$ obj. %, kalkulací přístrojem LUMISTox 300 byla zjištěna hodnota $30\text{minEC}_{50} = 8,1$ obj. %. Korekční faktor (f_{kt}) byl počítán pomocí přístroje LUMISTox 300 na základě rovnice (1).

Porovnáním výsledků (tabulka 22) lze říci, že výsledky obou stanovení se výrazně neliší. Pouze hodnota $30\text{minEC}_{50} = 12,7$ obj. % zjištěná pomocí regresní přímky z testu č. 2 se mírně odchyluje.

Může to být způsobeno rušivými vlivy během měření nebo také tím, že přístroj LUMISTox 30 vyhodnocuje data komplexněji, než jsme schopní vyhodnotit pomocí regresní přímky. Korekční faktor vyhovoval stanovenému rozmezí.

Tabulka 22: Výsledky testů s *Vibrio fischeri* pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice.

Test	Hodnota 24hEC ₅₀ (obj. %)		Korekční faktor
	A*	B*	
č. 1	9,2	9,1	0,86
č. 2	12,7	8,1	1,01

* A – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky

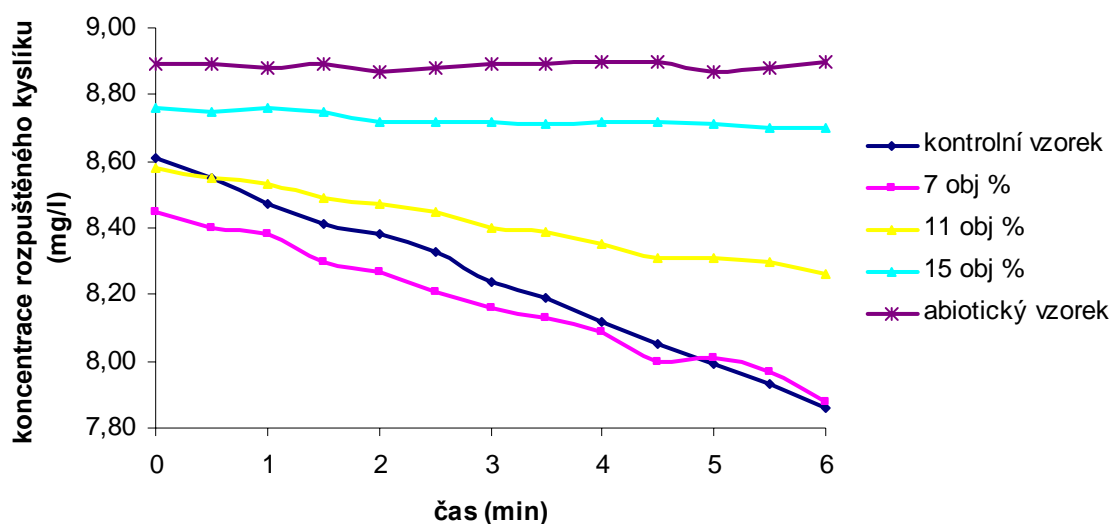
B – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí přístroje LUMISTox 300

4.1.1.3 Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem

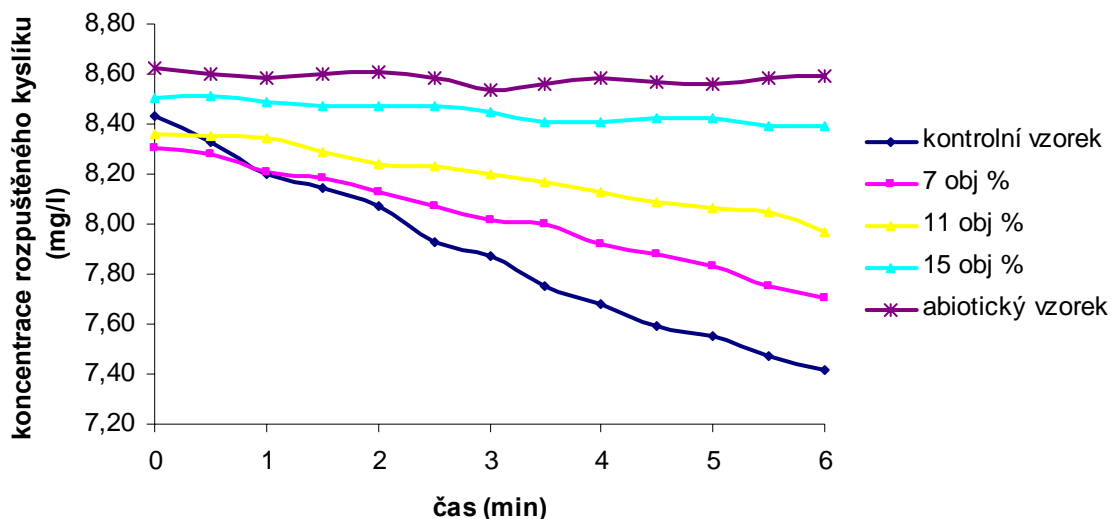
Pro stanovení inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem byly při praveny tři koncentrace testovaného vzorku 7, 11 a 15 obj. %. Spolu s testováním těchto koncentrací byl připraven kontrolní a abiotický vzorek. Pro kontrolu výsledků byl test prováděn dvakrát.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů

Nejdříve byla měřena inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů přítomných v aktivovaném kalu. Z výsledků měření byly sestaveny grafy závislosti koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase (graf 6) pro test č. 1 a (graf 7) pro test č. 2.



Graf 6: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 7: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Z grafů 6 a 7 byly získány rovnice regrese pro každý vzorek. Z rovnic regrese byly odečteny hodnoty R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Ty byly přepočítány na spotřebu kyslíku za hodinu R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Z těchto hodnot byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů v aktivovaném kalu (tabulka 23) pro test č.1 a (tabulka 24) pro test č. 2 použitím rovnice (5).

Tabulka 23: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.

Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = - 0,1237x + 8,6120$	0,1237	7,422	/
7 obj. %	$y = - 0,0922x + 8,4497$	0,0922	5,532	24,8
11 obj. %	$y = - 0,0537x + 8,5758$	0,0537	3,222	55,9
15 obj. %	$y = - 0,0100x + 8,7562$	0,0100	0,600	91,3
Abiotický vzorek	$y = - 0,0008x + 8,8846$	0,0008	0,048	/

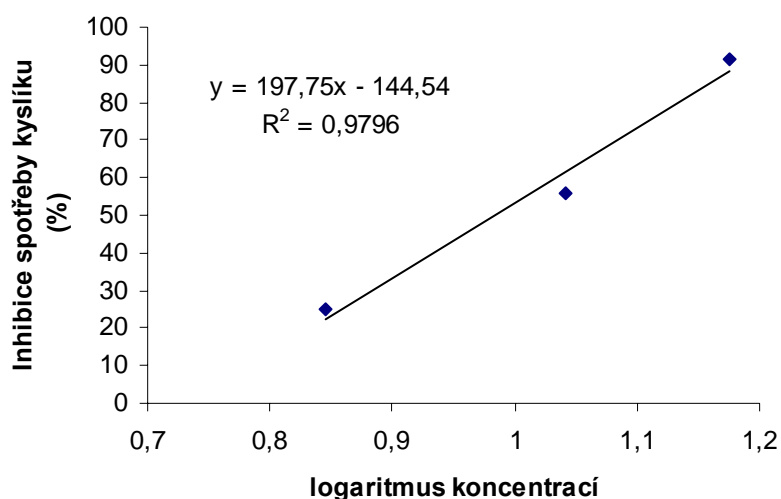
/ nepočítáno

Tabulka 24: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

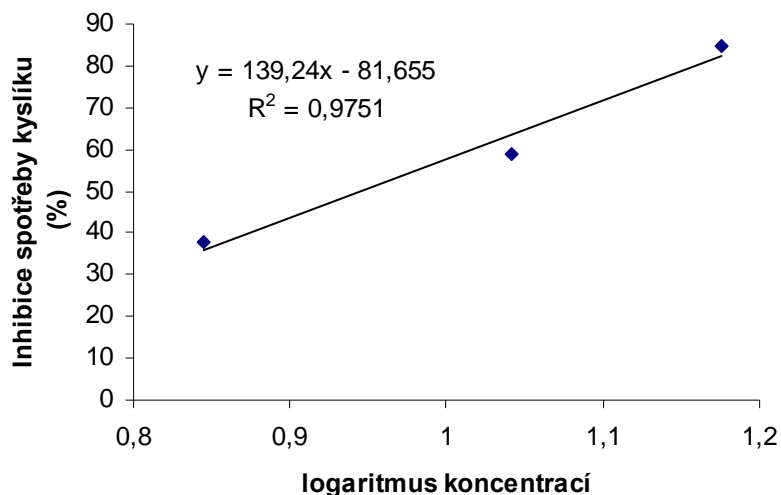
Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,1711x + 8,3925$	0,1711	10,266	/
7 obj. %	$y = -0,1007x + 8,3227$	0,1007	6,042	37,8
11 obj. %	$y = -0,0642x + 8,3833$	0,0642	3,852	59,1
15 obj. %	$y = -0,0205x + 8,5078$	0,0205	1,230	84,6
Abiotický vzorek	$y = -0,0058x + 8,5998$	0,0058	0,348	/

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 9,6$ obj. % pro test č.1 (graf 8) a $30\text{minEC}_{50} = 8,8$ obj. % pro test č. 2 (graf 9).



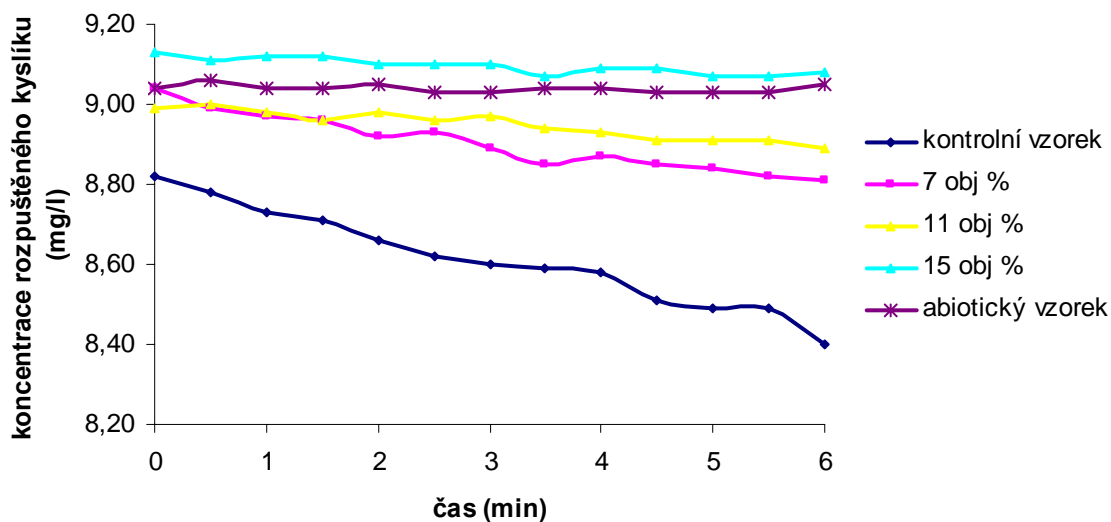
Graf 8: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



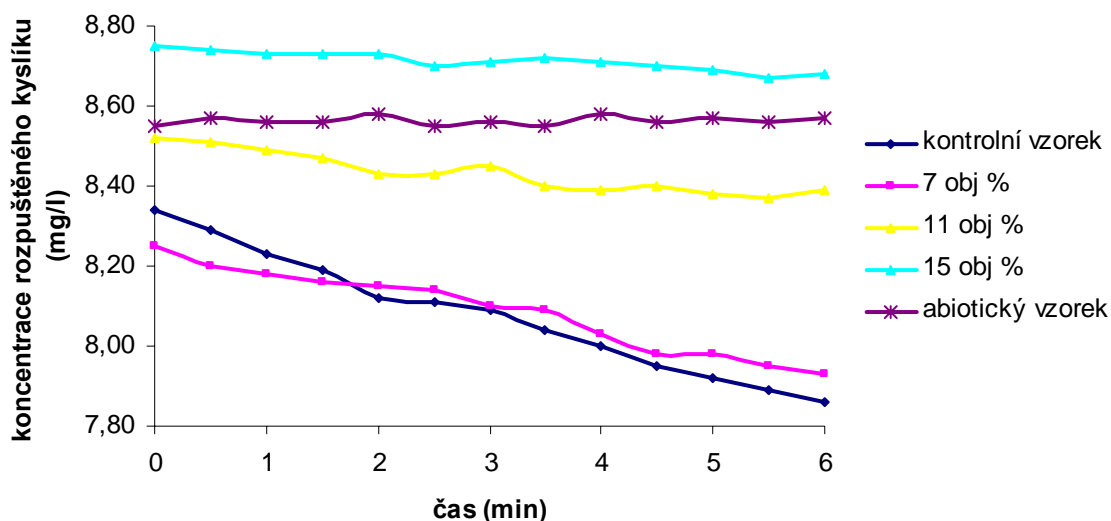
Graf 9: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů

Při měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu byl přidán do systému ATU, potlačující nitrifikaci. Z výsledků měření byly sestaveny grafy závislosti koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase (graf 10) pro test č. 1 a (graf 11) pro test č. 2.



Graf 10: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 11: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Z grafů 10 a 11 byly získány rovnice regrese pro každý vzorek. Z rovnic regrese byly odečteny hodnoty R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Ty byly přepočítány na spotřebu kyslíku za hodinu R ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Z těchto hodnot byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů v aktivovaném kalu (tabulka 25) pro test č.1 a (tabulka 26) pro test č. 2 použitím rovnice (6).

Tabulka 25: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.

Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,0629x + 8,8024$	0,0629	3,774	/
7 obj %	$y = -0,0358x + 9,0105$	0,0358	2,148	46,1
11 obj %	$y = -0,0176x + 9,0012$	0,0176	1,056	75,0
15 obj %	$y = -0,0092x + 9,1238$	0,0092	0,552	88,4
Abiotický vzorek	$y = -0,0019x + 9,0448$	0,0019	0,114	/

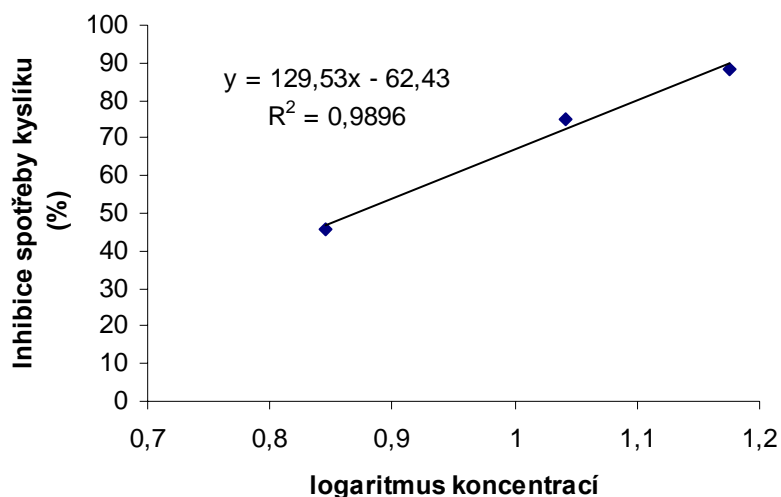
/ nepočítáno

Tabulka 26: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

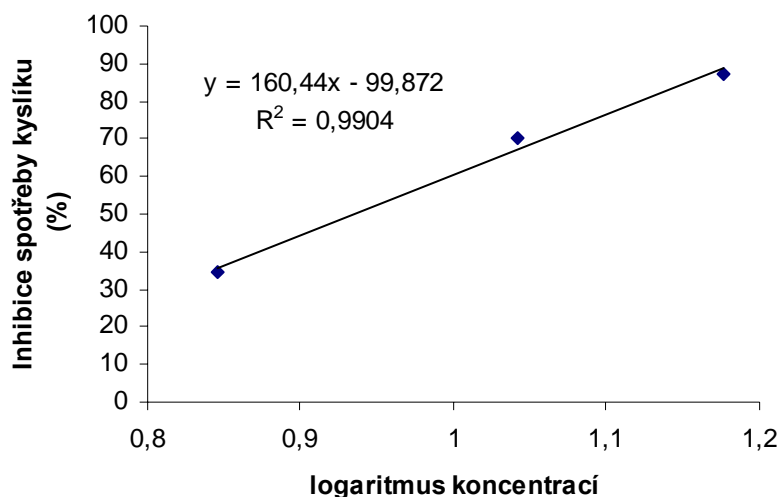
Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,0786x + 8,3149$	0,0786	4,716	/
7 obj %	$y = -0,0527x + 8,2459$	0,0527	3,162	34,5
11 obj %	$y = -0,0246x + 8,5069$	0,0246	1,476	70,2
15 obj %	$y = -0,0114x + 8,7466$	0,0114	0,684	87,0
Abiotický vzorek	$y = -0,0012x + 8,5595$	0,0012	0,072	/

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 7,6$ obj. % pro test č.1 (graf 12) a $30\text{minEC}_{50} = 8,5$ obj. % pro test č. 2 (graf 13).



Graf 12: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 13: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů

Jako poslední byla na základě předešlých měření vypočítána inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu. Byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku použitím rovnice (7), které jsou uvedeny v tabulkách 27 a 28 pro test č. 1 a 2.

Tabulka 27: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu pro test č. 1.

Název	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	7,422	3,774	/
7 obj. %	5,532	2,148	7,2
11 obj. %	3,222	1,056	40,6
15 obj. %	0,600	0,552	98,7

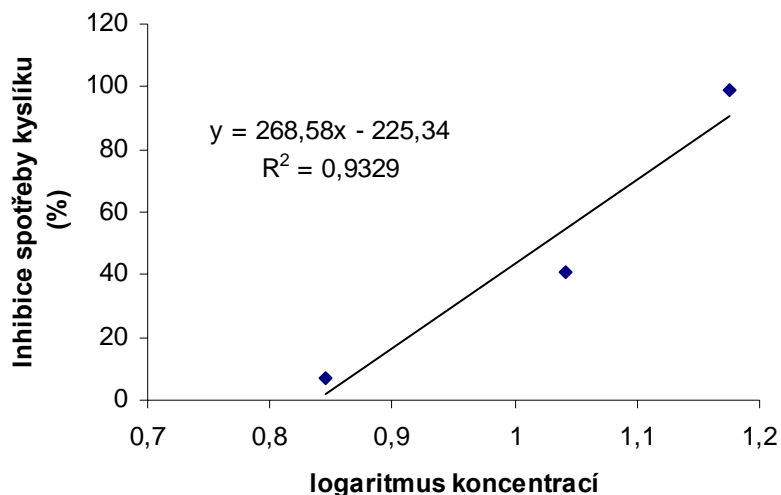
/ nepočítáno

Tabulka 28: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu pro test č. 2.

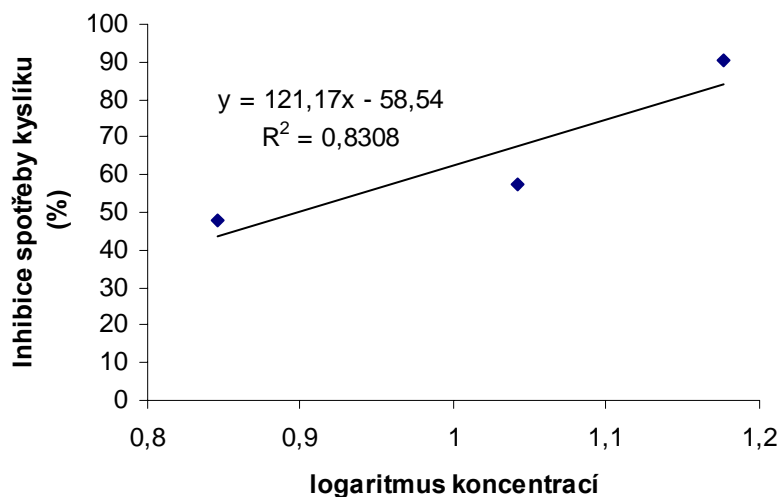
Název	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	10,266	4,716	/
7 obj. %	6,042	3,162	48,1
11 obj. %	3,852	1,476	57,1
15 obj. %	1,230	0,684	90,2

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 10,6$ obj. % pro test č.1 (graf 14) a $30\text{minEC}_{50} = 7,9$ obj. % pro test č. 2 (graf 15).



Graf 14: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 15: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Porovnáním výsledků (tabulka 29) lze říci, že výsledky obou stanovení se výrazně neliší. Nebyl pozorován výrazný rozdíl v inhibici spotřeby kyslíku pomocí všech, heterotrofních nebo nitrifikačních mikroorganismů.

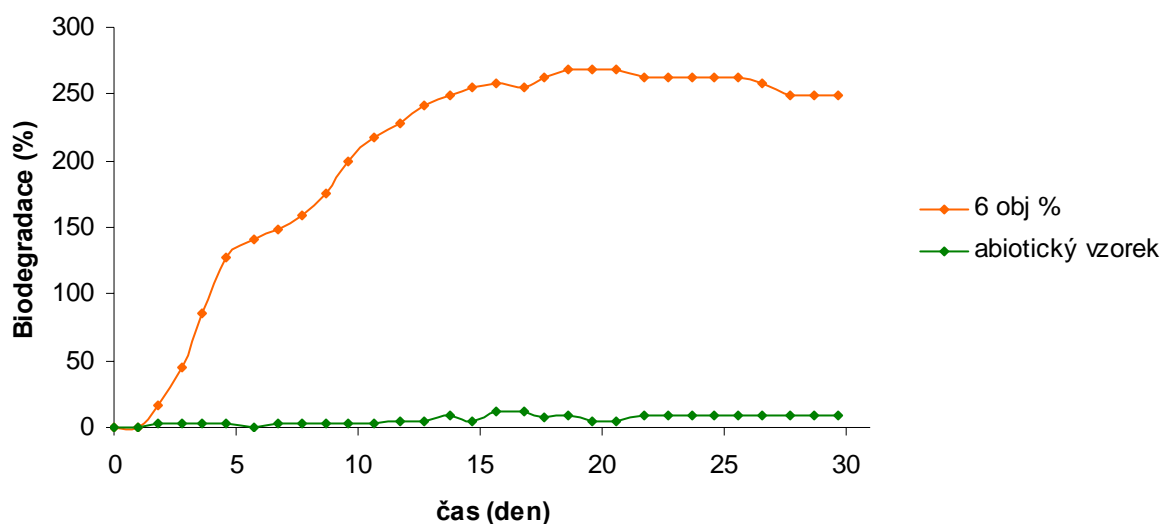
Tabulka 29: Výsledky testů s aktivovaným kalem pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice.

Test	Hodnota 30minEC ₅₀ (obj. %)		
	Všechny MO	Heterotrofní MO	Nitrifikační MO
č. 1	9,6	7,6	10,6
č. 2	8,8	8,5	7,9

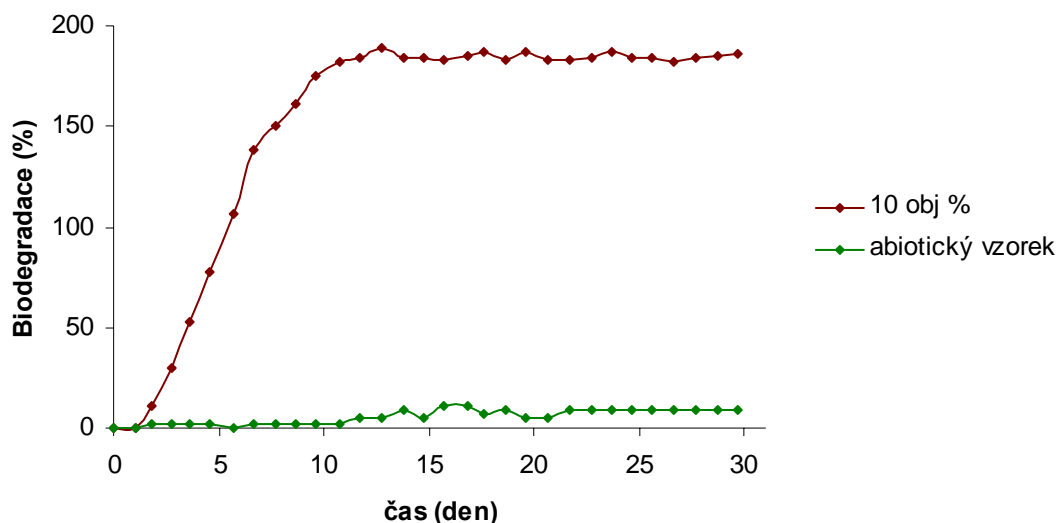
4.1.2 Test biodegradability

Pro stanovení biodegradability vzorku byla použita metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Hodnoty spotřeby kyslíku byly odečítány z měřicího zařízení a přepočítány na procenta biodegradace pomocí rovnic (11) a (12).

Z důvodů vyšší toxicity byly zvoleny dvě koncentrace testovaného vzorku 6,5 obj. % (graf 16) a 10 obj. % (graf 17).



Graf 16: Křivka biodegradability pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice o koncentraci 6 obj. %.



Graf 17: Křivka biodegradability pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice o koncentraci 10 obj. %.

Při měření dochází ke spotřebě kyslíků z důvodů degradace organických látek. Po několika dnech testu pravděpodobně došlo k adaptaci nitrifikačních organismů. Testovaný vzorek obsahuje dusík a proto začala probíhala nitrifikace. Tím došlo ke zvyšování spotřeby kyslíku v systému a zkreslení biodegradační křivky.

Při porovnání grafů 16 a 17 je zřejmé, že vzorek o koncentraci 6 obj. % byl degradován rychleji než vzorek o koncentraci 10 obj. %. Vzorek o koncentraci 10 obj. % vykazoval toxický efekt nejen při adaptaci mikroorganismů, ale i v průběhu celého testu, kdy ovlivňoval nitrifikační mikroorganismy. Při měření nedocházelo k abiotické degradaci.

4.2 Melamin-formaldehydová pryskyřice

4.2.1 Ekotoxikologické hodnocení vzorku

4.2.1.1 Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 3.1.1. Na základě výsledků těchto testů byl připraven základní test. Pro kontrolu výsledků byl základní test prováděn dvakrát.

Výsledky z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 30, výsledky ze základního testu v tabulce 31 a 32. Imobilizace v kontrole byla vždy 0 %.

Tabulka 30: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v předběžném testu

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h	
		(ks)	(%)
0	10	0	0
10	10	0	0
100	10	0	0
150	10	5	50
200	10	10	100

Ze získaných výsledků z předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test na 130 mg.l⁻¹ až 170 mg.l⁻¹.

Tabulka 31: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v základním testu č. 1.

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h		Probity
		(ks)	(%)	
0	10	0	0	0
130	10	2	20	4,16
140	10	6	60	5,25
150	10	8	80	5,81
160	10	9	90	6,28
170	10	10	100	8,09

Tabulka 32: Imobilizace perlooček *Daphnia magna* v základním testu č. 2.

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Počet nasazených organismů	Imobilizace po 24h		Probity
		(ks)	(%)	
0	10	0	0	0
130	10	3	30	4,48
140	10	6	60	5,25
150	10	7	70	5,52
160	10	9	90	6,28
170	10	10	100	8,09

V základním testu č. 1 byla vypočítána hodnota $24hEC_{50} = 134,9 \text{ mg.l}^{-1}$ pomocí rovnice regresní přímky, pomocí probitové analýzy byla vypočítána hodnota $24hEC_{50} = 139,3 \text{ mg.l}^{-1}$. V základním testu č. 2 byla vypočítána hodnota $24hEC_{50} = 147,9 \text{ mg.l}^{-1}$ pomocí rovnice regresní přímky, pomocí probitové analýzy byla stanovena hodnota $24hEC_{50} = 138,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Porovnáním výsledků (tabulka 33) lze říci, že výsledky obou stanovení se výrazně neliší, kromě výsledku v základním testu č. 2, který byl zjištěn pomocí regresní přímky. Výsledky z probitové analýzy můžeme považovat za směrodatné, protože tento způsob vyhodnocení hodnot EC_{50} pro organismus *Daphnia magna* je vhodnější než metoda regresní přímky.

Tabulka 33: Výsledky testů s *Daphnia magna* pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice.

Základní test	Hodnota $24hEC_{50}$ (mg.l ⁻¹)	
	A*	B*
č. 1	134,9	139,3
č. 2	147,9	138,0

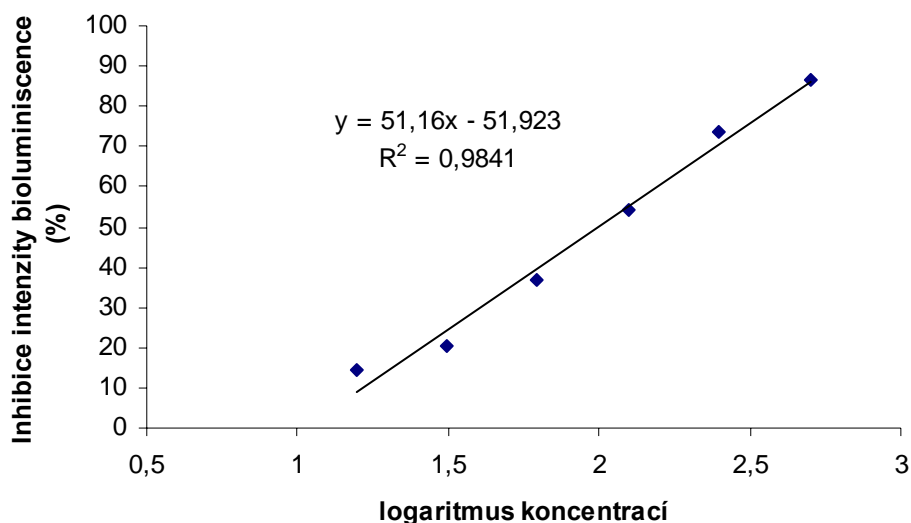
* A – hodnota $24hEC_{50}$ zjištěná pomocí regresní přímky

B – hodnota $24hEC_{50}$ zjištěná pomocí probitové analýzy

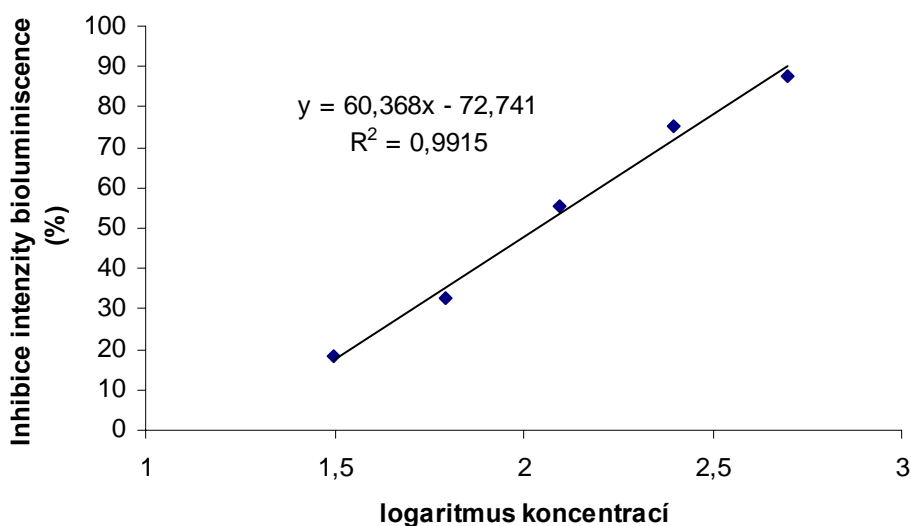
4.2.1.2 Akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*

Pro provedení akutního testu s luminiscenčními bakteriemi byly připraveny dvě paralelní sady vzorků. Ředěním byly připraveny koncentrace 500; 250; 120; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9 a 2,0 mg.l⁻¹. Pro kontrolu výsledků byl test proveden dvakrát.

Hodnota $30minEC_{50}$ byla stanovena kalkulací přístrojem LUMIStox 300, výsledky byly také vyhodnoceny sestavením regresních přímek (graf 18) z testu č. 1 a (graf 19) z testu č. 2.



Graf 18: Závislost inhibice intenzity luminiscence na logaritmu koncentrace v testu č. 1.



Graf 19: Závislost inhibice intenzity luminiscence na logaritmu koncentrace v testu č. 2.

V testu č. 1 byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 98,2 \text{ mg.l}^{-1}$ pomocí rovnice regresní přímky, kalkulací přístrojem LUMISTox300 byla zjištěna hodnota $30\text{minEC}_{50} = 92,8 \text{ mg.l}^{-1}$. V testu č. 2 byla pomocí rovnice regresní přímky vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 107,9 \text{ mg.l}^{-1}$, kalkulací přístrojem LUMISTox 300 byla zjištěna hodnota $30\text{minEC}_{50} = 105,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Korekční faktor (f_{kt}) byl počítán pomocí přístroje LUMISTox 300 na základě rovnice (1).

Porovnáním výsledků (tabulka 34) lze říci, že výsledky z testu č. 2 jsou vyšší než v testu č. 1, nicméně výsledky obou stanovení se výrazně neliší. Korekční faktor vyhovoval stanovenému rozmezí.

Tabulka 34: Výsledky testů s *Vibrio fischeri* pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice.

Test	Hodnota 24hEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)		Korekční faktor
	Regresní přímka	LumiStox 300	
č. 1	98,2	92,8	1,00
č. 2	107,9	105,6	1,04

* A – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky

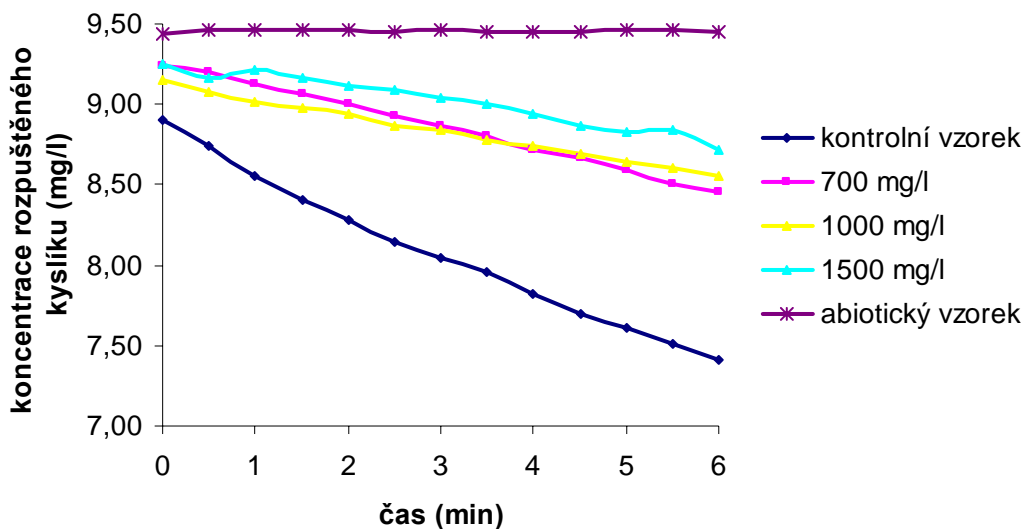
B – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí probitové analýzy

4.2.1.3 Akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem

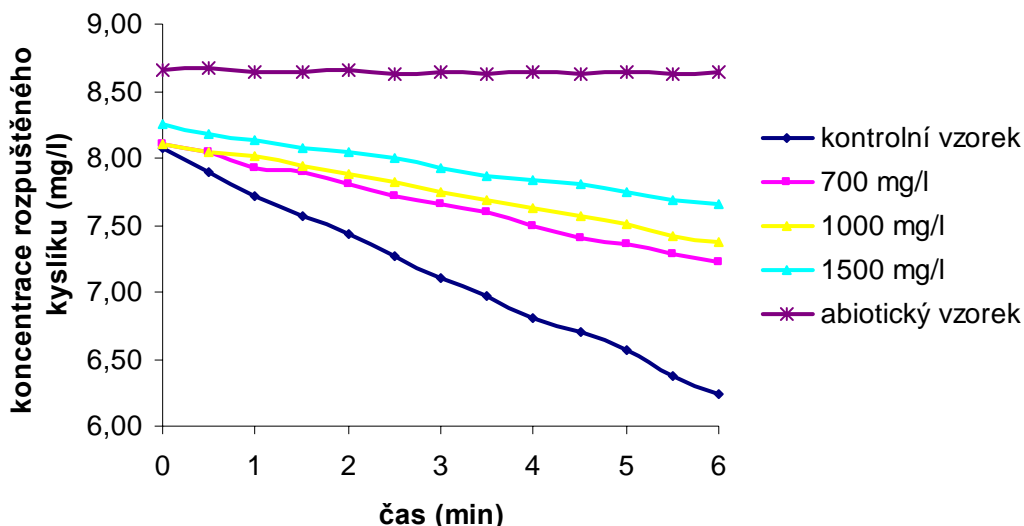
Pro stanovení inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem byly připraveny tři koncentrace testovaného vzorku 700 mg.l⁻¹, 1000 mg.l⁻¹ a 1500 mg.l⁻¹. Spolu s testováním těchto koncentrací byl připraven kontrolní a abiotický vzorek. Pro kontrolu výsledků byl test prováděn dvakrát.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů

Nejdříve byla měřena inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů přítomných v aktivovaném kalu. Z výsledků měření byly sestrojeny grafy závislosti koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase (Graf 20) pro test č. 1 a (Graf 21) pro test č. 2.



Graf 20: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 21: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Z grafů 20 a 21 byly získány rovnice regrese pro každý vzorek. Z rovnic regrese byly odečteny hodnoty R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Ty byly přečítány na spotřebu kyslíku za hodinu R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Z těchto hodnot byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů v aktivovaném kalu (tabulka 35) pro test č.1 a (tabulka 36) pro test č. 2 použitím rovnice (5).

Tabulka 35: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.

Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = - 0,2431x + 8,8131$	0,2431	14,586	/
700 mg.l^{-1}	$y = - 0,1335x + 9,2598$	0,1335	8,010	45,1
1000 mg.l^{-1}	$y = - 0,0970x + 9,1288$	0,0970	5,820	60,1
1500 mg.l^{-1}	$y = - 0,0849x + 9,2733$	0,0849	5,094	65,2
Abiotický vzorek	$y = - 0,0001x + 9,4543$	0,0001	0,006	/

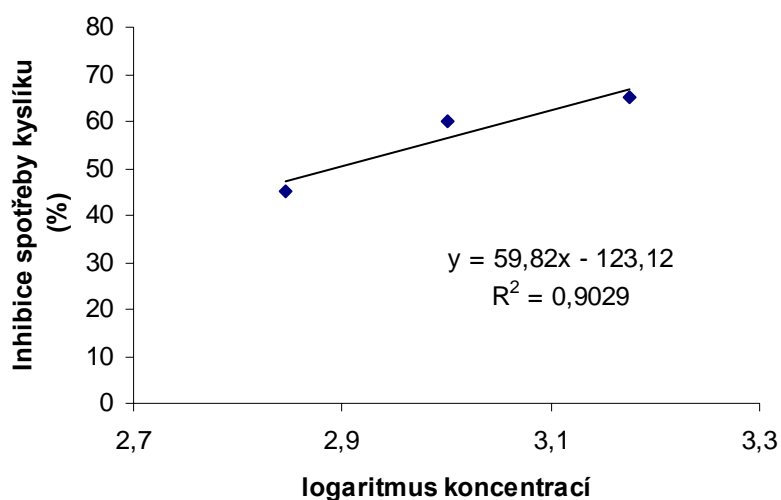
/ nepočítáno

Tabulka 36: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

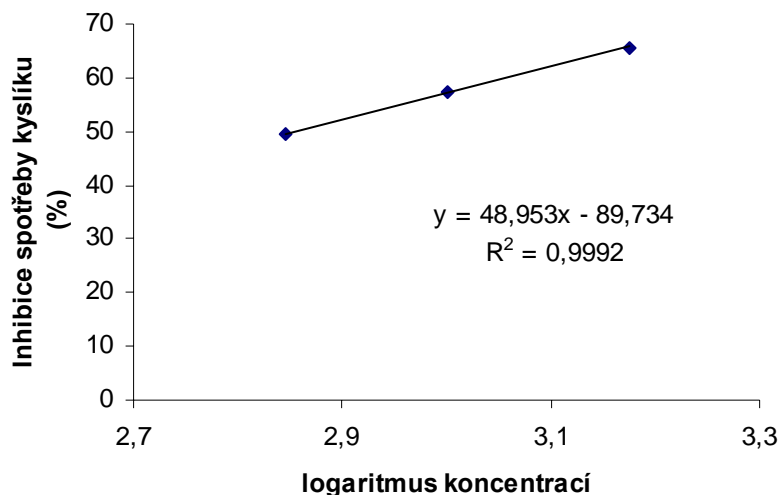
Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,3014x + 8,0374$	0,3014	18,084	/
700 mg.l^{-1}	$y = -0,1484x + 8,1012$	0,1484	8,904	49,4
1000 mg.l^{-1}	$y = -0,1243x + 8,1205$	0,1243	7,458	57,3
1500 mg.l^{-1}	$y = -0,0995x + 8,2360$	0,0995	5,970	65,6
Abiotický vzorek	$y = -0,0041x + 8,6537$	0,0041	0,246	/

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 776,2 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č.1 (graf 22) a $30\text{minEC}_{50} = 707,9 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č. 2 (graf 23).



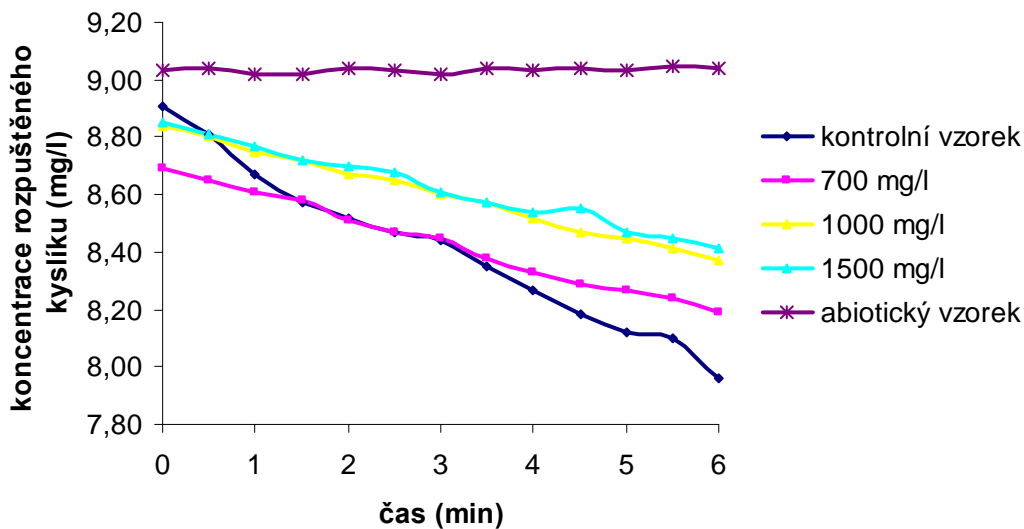
Graf 22: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



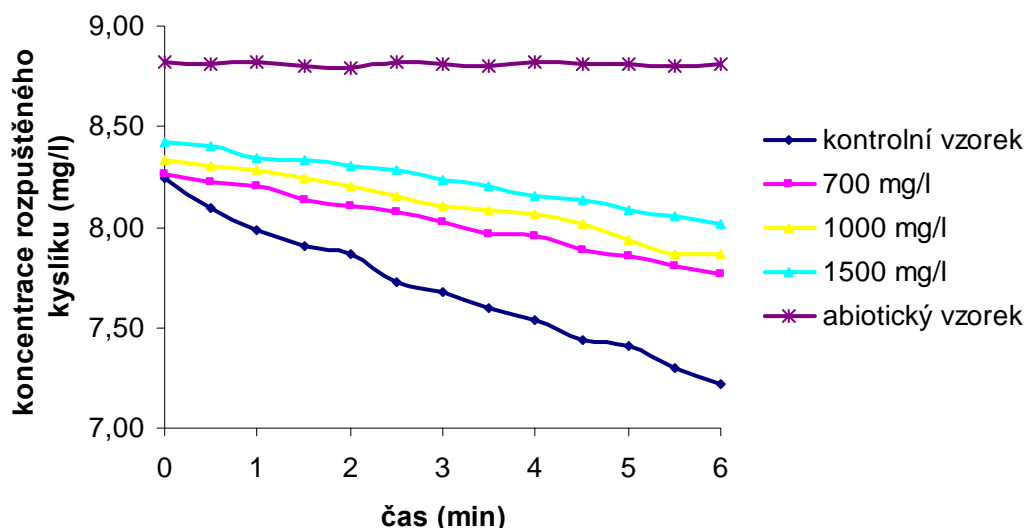
Graf 23: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí všech mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů

Při měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu byl přidán do systému ATU, potlačující nitrifikaci. Z výsledků měření byly sestrojeny grafy závislosti koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase (graf 24) pro test č. 1 a (graf 25) pro test č. 2.



Graf 24: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 25: Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na čase – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Z grafů 24 a 25 byly získány rovnice regrese pro každý vzorek. Z rovnic regrese byly odečteny hodnoty R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Ty byly přepočítány na spotřebu kyslíku za hodinu R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Z těchto hodnot byla vypočítána inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů v aktivovaném kalu (tabulka 37) pro test č.1 a (tabulka 38) pro test č. 2 použitím rovnice (6).

Tabulka 37: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.

Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,1455x + 8,8496$	0,1455	8,730	/
700 mg.l^{-1}	$y = -0,0849x + 8,6902$	0,0849	5,094	43,1
1000 mg.l^{-1}	$y = -0,0780x + 8,8356$	0,0780	4,680	47,9
1500 mg.l^{-1}	$y = -0,0723x + 8,8423$	0,0723	4,338	51,8
Abiotický vzorek	$y = -0,0022x + 9,0265$	0,0022	0,120	/

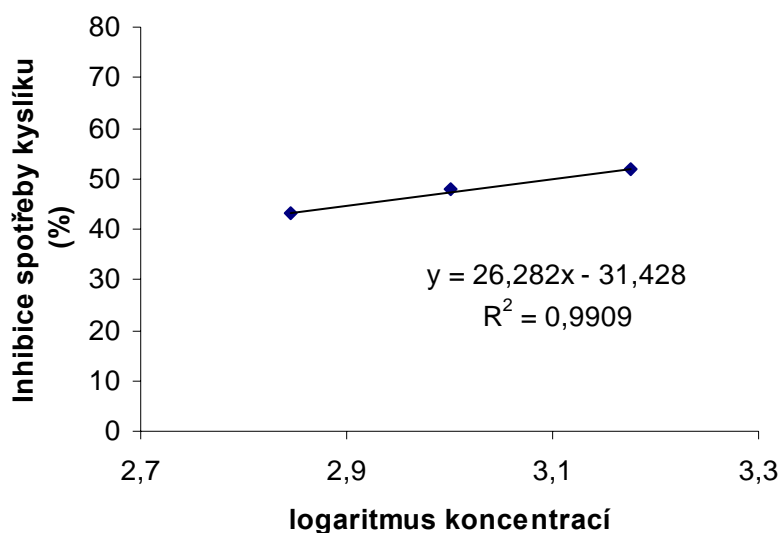
/ nepočítáno

Tabulka 38: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

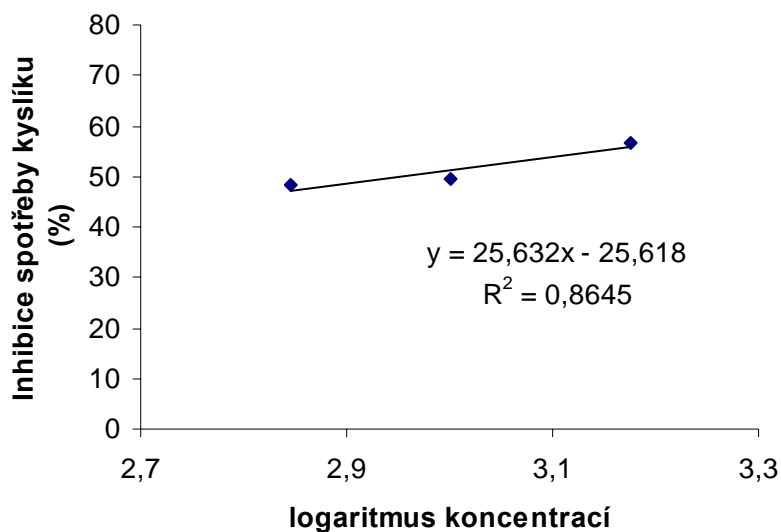
Název	Rovnice regrese	R_m ($\text{mg.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	$y = -0,1603x + 8,1748$	0,1603	9,618	/
700 mg.l^{-1}	$y = -0,0819x + 8,2656$	0,0819	4,914	48,3
1000 mg.l^{-1}	$y = -0,0803x + 8,3510$	0,0803	4,818	49,3
1500 mg.l^{-1}	$y = -0,0685x + 8,4300$	0,0685	4,110	56,7
Abiotický vzorek	$y = -0,0009x + 8,8119$	0,0009	0,054	/

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 1230,3 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č.1 (graf 26) a $30\text{minEC}_{50} = 891,2 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č. 2 (graf 27).



Graf 26: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 27: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Měření inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů

Jako poslední byla na základě předešlých měření vypočítána inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu. Byly vypočítány inhibice spotřeby kyslíku použitím rovnice (7), které jsou uvedeny v tabulkách 39 a 40 pro test č. 1 a 2.

Tabulka 39: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu pro test č. 1.

Název	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	14,586	8,730	/
700 mg.l^{-1}	8,010	5,094	50,2
1000 mg.l^{-1}	5,820	4,680	80,5
1500 mg.l^{-1}	5,094	4,338	87,1

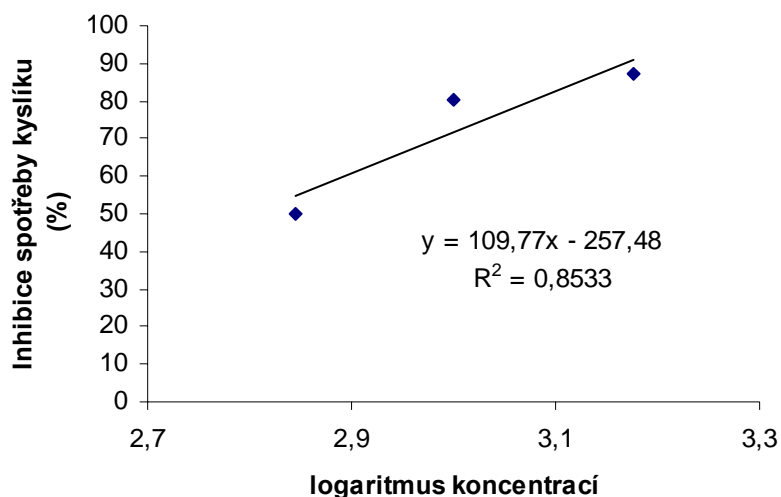
/ nepočítáno

Tabulka 40: Měření rychlosti a inhibice spotřeby kyslíku pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu pro test č. 2.

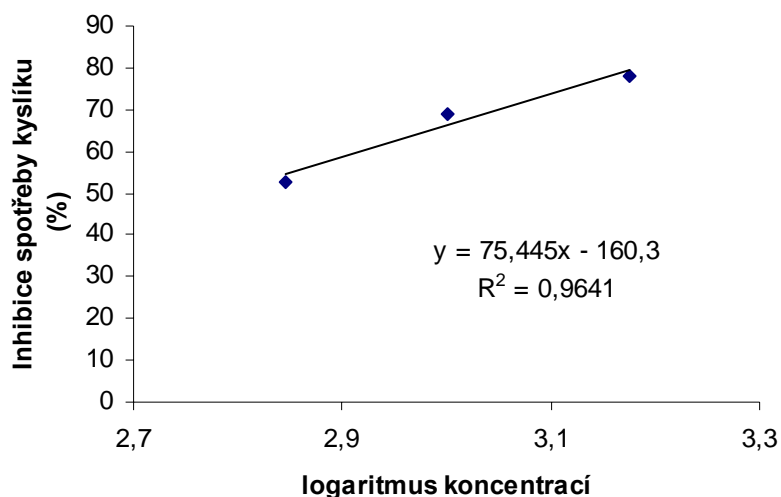
Název	R_T ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	R_H ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Inhibice spotřeby kyslíku (%)
Kontrolní vzorek	18,084	9,618	/
700 mg.l^{-1}	8,904	4,914	52,9
1000 mg.l^{-1}	7,458	4,818	68,8
1500 mg.l^{-1}	5,970	4,110	78,0

/ nepočítáno

Z hodnot inhibice spotřeby kyslíku a logaritmů koncentrací testovaného vzorku byla sestrojena regresní přímka. Z rovnice regrese byla vypočítána hodnota $30\text{minEC}_{50} = 630,9 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č.1 (graf 28) a $30\text{minEC}_{50} = 602,6 \text{ mg.l}^{-1}$ pro test č. 2 (graf 29).



Graf 28: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 1.



Graf 29: Závislost inhibice spotřeby kyslíku aktivovaného kalu na logaritmu – měřeno pomocí nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu v testu č. 2.

Porovnáním výsledků (tabulka 41) lze říci, že pouze hodnota z testu č.1 pro heterotrofní organismy se odchyľuje. Ostatní výsledky obou stanovení se výrazně neliší. Dle testu bylo zjištěno, že nejcitlivějšími jsou nitrifikační mikroorganismy a nejméně citlivými heterotrofní mikroorganismy při expozici vzorkem melamin-formaldehydové pryskyřice.

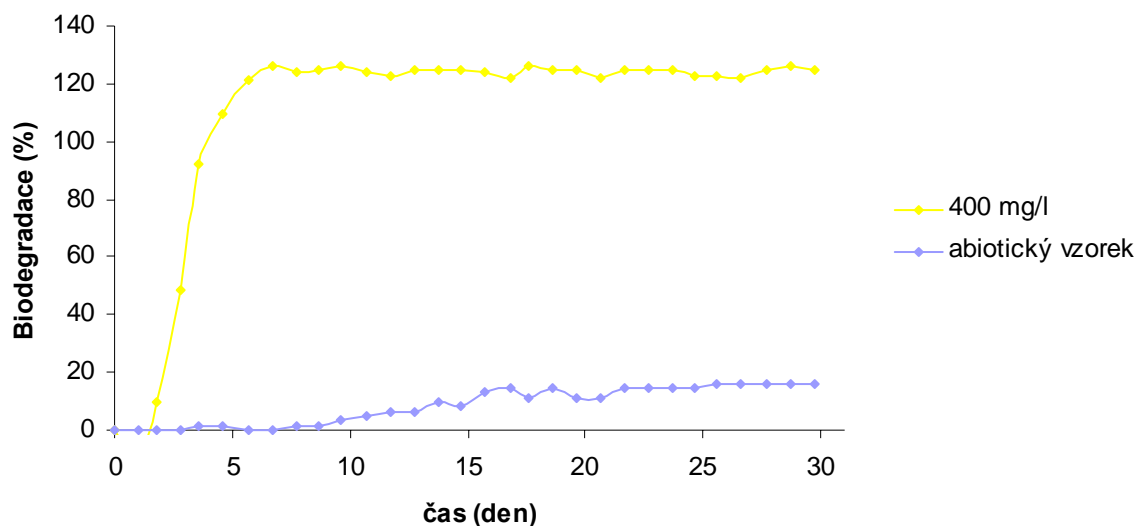
Tabulka 41: Výsledky testů s aktivovaným kalem pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice.

Test	Hodnota 30minEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)		
	Všechny MO	Heterotrofní MO	Nitrifikační MO
č. 1	776,2	1230,3	630,9
č. 2	707,9	891,2	602,6

4.2.2 Test biodegradability

Pro stanovení biodegradability vzorku byla použita metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Hodnoty spotřeby kyslíku byly odečítány z měřícího zařízení a přepočítány na procenta biodegradace pomocí rovnic (11) a (12).

Pro testování byla zvolena koncentrace testovaného vzorku 400 mg.l⁻¹ (graf 30).



Graf 30: Křivka biodegradability pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice o koncentraci 400 mg.l⁻¹.

Biodegradace proběhla podobně jako u prvního vzorku. Po několika dnech byly pravděpodobně adaptovány nitrifikační mikroorganismy a v systému začala probíhat nitrifikace. Při porovnání s předchozím vzorkem močovino-formaldehydové pryskyřice, neměla nitrifikace u tohoto vzorku tak významný vliv na zkeslení biodegradační křivky. Při měření nedocházelo k abiotické degradaci.

4.3 Shrnutí výsledků

Byla posouzena ekotoxicita a biodegradabilita vzorků monomerů močovino-formaldehydové pryskyřice a melamin-formaldehydové pryskyřice. Vzorky byly odebrány během výrobního procesu ve stavu, kdy byly ještě monomery, tedy před výslednou polymerizací. Posouzení vlivu těchto látek na životní prostředí je důležité, protože při výrobě pryskyřic mohou tyto monomery unikat do životního prostředí, resp. do akvatického ekosystému a mohou ho negativně ovlivňovat.

Pro posouzení vlivu těchto látek na životní prostředí byly zvoleny tři standardní testy toxicity dle norem ISO: akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*, akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri*, akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem. Pro posouzení biodegradability byla použita metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respiometru. Pro kontrolu výsledků byly ekotoxikologické testy prováděny dvakrát.

Všechny výsledky z ekotoxikologických testů byly shrnuty do tabulky 42 pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice (vzorek č.1) a do tabulky 43 pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice (vzorek č.2).

Tabulka 42: Výsledné hodnoty EC₅₀ pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice.

Vzorek č.1	<i>Daphnia magna</i> 24hEC ₅₀ (obj. %)		<i>Vibrio fischeri</i> 30minEC ₅₀ (obj. %)		Aktivovaný kal 30minEC ₅₀ (obj. %)		
	A*	B*	C*	D*	Všechny MO	Heterotrofní MO	Nitrifikační MO
Test č. 1	40,5	41,2	9,1	9,2	9,6	7,6	10,6
Test č. 2	40,4	40,9	8,1	12,7	8,8	8,5	7,9
Průměr	40,8		9,8		9,2	8,1	9,3

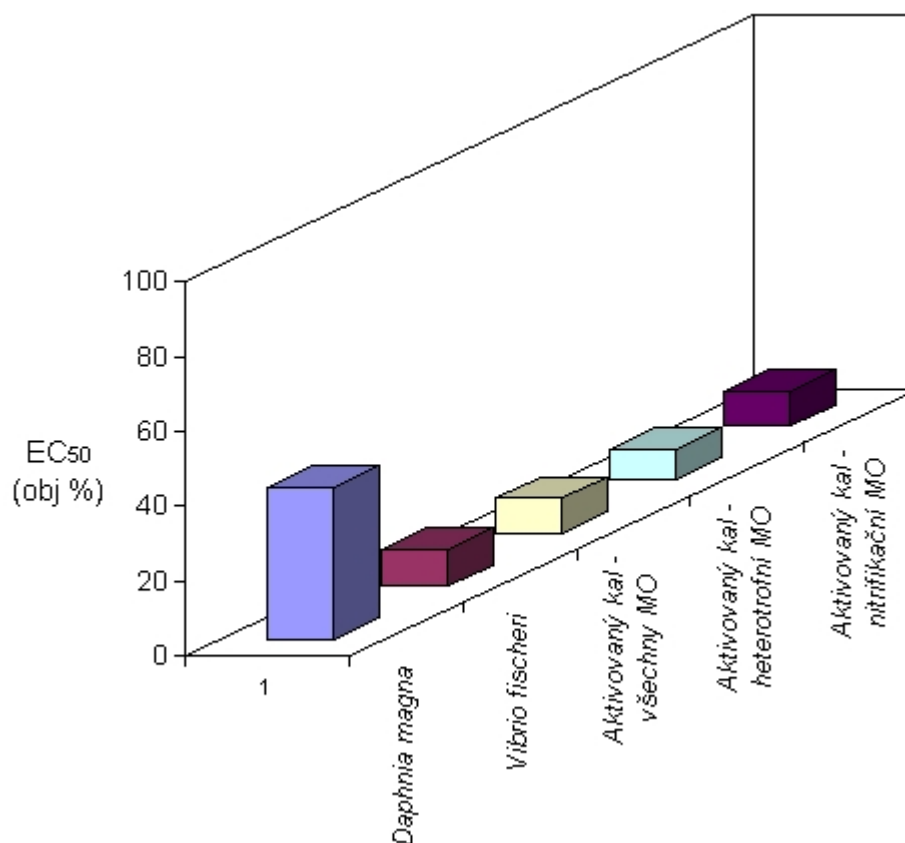
- * A – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí probitové analýzy
 B – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky
 C – hodnota 30minEC₅₀ zjištěná pomocí přístroje LUMISTox 300
 D – hodnota 30minEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky

Tabulka 43: Výsledné hodnoty EC₅₀ pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice.

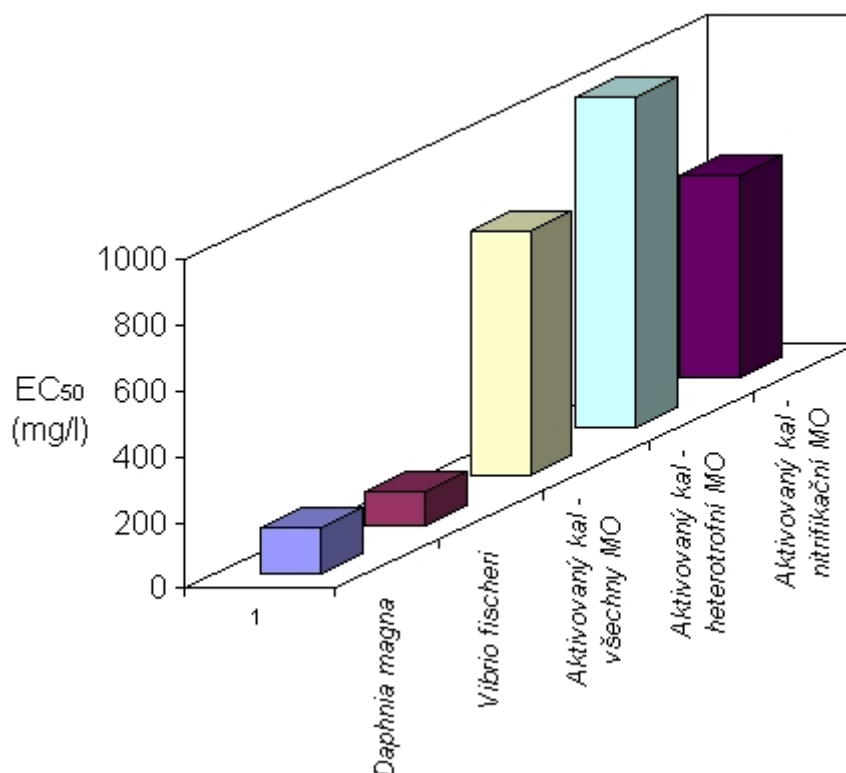
Vzorek č.2	<i>Daphnia magna</i> 24hEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)		<i>Vibrio fischeri</i> 30minEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)		Aktivovaný kal 30minEC ₅₀ (mg.l ⁻¹)		
	A*	B*	C*	D*	Všechny MO	Heterotrofní MO	Nitrifikační MO
Test č. 1	139,3	134,9	92,8	98,2	776,2	1230,3	630,9
Test č. 2	138,0	147,9	105,6	107,9	707,9	891,2	602,6
Průměr	140,0		101,1		742,1	1060,8	616,8

- * A – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí probitové analýzy
 B – hodnota 24hEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky
 C – hodnota 30minEC₅₀ zjištěná pomocí přístroje LUMISTox 300
 D – hodnota 30minEC₅₀ zjištěná pomocí regresní přímky

Průměry hodnot paralelních stanovení byly vyneseny do grafu 31 pro vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice a do grafu 32 pro vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice.



Graf 31: Porovnání toxického vlivu vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice na použité testovací organismy.



Graf 32: Porovnání toxického vlivu vzorku melamin-formaldehydové pryskyřice na použité testovací organismy.

Na základě předložených výsledků je zřejmé, že testovaný vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice vykazuje téměř stejný efekt na bakteriích aktivovaného kalu a na bakteriích *Vibrio fischeri*. Výsledky testů inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem jsou velmi podobné pro všechny mikroorganismy, pouze nepatrně zvýšenou citlivost na tento vzorek vykazují heterotrofní mikroorganismy. Nejnižší toxicitu vykazoval vzorek při testování prostřednictvím perlooček *Daphnia magna*.

Vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice vykazuje výrazný efekt pouze na bakteriích *Vibrio fischeri*. Je možné, že vzorek melamin-formaldehydová pryskyřice pouze inhibuje produkci enzymu luciferázy, a tím dochází k inhibici bioluminiscence, ale respiraci mikroorganismů aktivovaného kalu téměř neovlivňuje. Z výsledků testů inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem můžeme říci, že nitrifikační mikroorganismy vykazovaly nejvyšší citlivost na tento vzorek, naopak nejmenší citlivost byla prokázána u heterotrofních mikroorganismů aktivovaného kalu.

Při porovnání biodegradačních křivek (graf 16, 17 a 30) můžeme říci, že biodegradace obou vzorků probíhá velmi rychle. Po několika dnech došlo pravděpodobně k adaptaci nitrifikačních mikroorganismů aktivovaného kalu a začala probíhat nitrifikace vzorků. Z tohoto důvodu docházelo ke zvyšování spotřeby kyslíku v systému, což způsobilo zkreslení biodegradačních křivek. Z výsledků ekotoxikologických testů je zřejmé že nitrifikační mikroorganismy, v porovnání s ostatními mikroorganismy aktivovaného kalu, vykazují vyšší citlivost na vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice. Nitrifikační mikroorganismy byly pravděpodobně inhibovány vzorkem melamin-formaldehydové pryskyřice a proto u tohoto vzorku nebylo zkreslení biodegradačních křivek tak výrazné jako u vzorku močovino-formaldehydové pryskyřice.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá posouzením vlivu monomerů formaldehydových pryskyřic na životní prostředí. Jednalo se o vzorky melamin-formaldehydové a močovino-formaldehydové pryskyřice, které jsou v dnešní době vyráběny v obrovském množství. Nejen výsledné produkty zpracování mohou být nebezpečné pro životní prostředí, ale také výchozí látky, z nichž jsou vyráběny. U těchto látek nebyla známa přibližná toxicita pro životní prostředí, proto byly vždy provedeny testy předběžné, na jejich základě byl stanoven rozsah koncentrací pro provedení základního testu, jehož výsledky umožnily stanovení základní ekotoxikologické hodnoty EC_{50} .

V teoretické části diplomové práce byla zpracována literární rešerše se zaměřením na ekotoxicitu, testování ekotoxicity a biodegradabilitu. Součástí teoretické části je také bližší popis formaldehydových pryskyřic a jejich využití.

Byly testovány dva vzorky: vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice a vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice, které jsou běžně komerčně vyráběny. Vzorky byly odebrány během výrobního procesu. Jejich vlastnosti nebyly specifikovány. Pro posouzení jejich vlivu na životní prostředí byly stanoveny hodnoty EC_{50} a biodegradabilita. Pro hodnocení ekotoxicity byly vybrány tři standardní testy: akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*, akutní test s luminiscenčními bakteriemi *Vibrio fischeri* a akutní test inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem. Pro kontrolu výsledků byl každý vzorek testován dvakrát. Pro posouzení biodegradability byla použita metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.

Z výsledků testů bylo zjištěno, že vzorek močovino-formaldehydové pryskyřice vykazuje podobný efekt na bakterie *Vibrio fischeri* a na mikroorganismy aktivovaného kalu. Pro bakterie *Vibrio fischeri* byla stanovena průměrná hodnota $30minEC_{50} = 9,8$ obj. %, pro všechny mikroorganismy aktivovaného kalu byla stanovena průměrná hodnota $30minEC_{50} = 9,2$ obj. %, pro heterotrofní mikroorganismy $30minEC_{50} = 8,1$ obj. % a pro nitrifikační mikroorganismy $30minEC_{50} = 9,3$ obj. %. Rozdíly v citlivosti mikroorganismů aktivovaného kalu nejsou pro tento vzorek signifikantní. Nejnižší citlivost na vzorek vykazovaly perloočky *Daphnia magna*, průměrná hodnota byla $24hodEC_{50} = 40,8$ obj. %. Biodegradace vzorku probíhala velmi rychle.

Nejvyšší citlivost testovacích organismů na vzorek melamin-formaldehydové pryskyřice byla zjištěna u bakterií *Vibrio fischeri*. Pro bakterie *Vibrio fischeri* byla stanovena průměrná hodnota $30minEC_{50} = 101,1$ mg.l⁻¹. Naopak mikroorganismy aktivovaného kalu vykazovaly nejnižší citlivost na tento vzorek. Pro všechny mikroorganismy aktivovaného kalu byla stanovena průměrná hodnota $30minEC_{50} = 742,1$ mg.l⁻¹, pro heterotrofní mikroorganismy $30minEC_{50} = 1060,8$ mg.l⁻¹ a pro nitrifikační mikroorganismy $30minEC_{50} = 616,8$ mg.l⁻¹. Z výsledků je zřejmé, že nejcitlivější mikroorganismy aktivovaného kalu byly nitrifikační mikroorganismy. Dále byla stanovena průměrná hodnota $24hodEC_{50} = 140,0$ mg.l⁻¹ pro perloočky *Daphnia magna*. Biodegradace vzorku probíhala velmi rychle.

Porovnáním výsledků ekotoxikologických testů těchto látek s hodnotami pro kategorie nebezpečnosti látek stanovených zákonem č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích [49] a posouzením biodegradability můžeme usuzovat, že tyto látky by neměly představovat významné riziko pro životní prostředí.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery : výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Praha : VŠCHT Praha, 2006. 280 s. ISBN 80-7080-617-6.
- 2 PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. [s.l.] : Grada Publishing a.s., 2004. 178 s. ISBN 8024706083.
- 3 *About REACH* [online]. c2007 , 22/4/2009 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <http://guidance.echa.europa.eu/about_reach_en.htm>.
- 4 PROKOPOVÁ, Irena: *Makromolekulární chemie*. 2. vyd. Praha : VŠCHT Praha, 2007. Str. 207. ISBN 978-80-7080-662-3.
- 5 CAROLE, Daniels. *Polymers : structure and properties*. 1st edition. [s.l.] : CCR Press, 1989. 107 p. ISBN 0877625522.
- 6 NICHOLSON, John. *The chemistry of polymers*. 2 st sdition. [s.l.] : Royal Society of Chemistry, 1997. 190 p. ISBN 0854045589.
- 7 EBEWELE, Robert. *Polymer science and technology*. 1st edition. [s.l.] : CCR Press, 2000. 483 p. ISBN 0849389399.
- 8 National Research Council (U.S.). *Formaldehyde and other aldehydes*. 1st edition. Washington, D.C. : National Academy Press, 1981. 340 p. ISBN 030903146X.
- 9 Occupational Safety & Health Administration. *Properties, Manufacture, and Uses of Formaldehyde* [online]. May 27, 1992 [cit. 2008-12-15]. Dostupný z WWW: <http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=PREAMBLES&p_id=923>.
- 10 HARPER, Charles. *Handbook of plastic technologies : The complete guide to properties and performance*. 1st edition. New York : McGraw-Hill, 2006. 723 p. ISBN 0-07-146068-3.
- 11 *Step-Growth polymerization*. D.H. Solomon. New York : Marcel Dekker, INC., 1972. 396 p. ISBN 0-8247-1640-X.
- 12 HARPER, Charles, PETRIE, Edward. *Plastics Materials and Processes : A Concise Encyclopedia*. [s.l.] : John Wiley and Sons, 2003. 974 s. ISBN 0471456039.
- 13 EDVARD, Petrie. *Handbook of adhesives and sealants*. 2nd edition. New York : McGraw-Hill Profesional, 2006. 1048 p. ISBN 0071479163.
- 14 LANGMAIER, Ferdinand. *Adheze a adheziva*. [s.l.] : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 1999. 106 p. ISBN 80-214-1373-5.

-
- 15 WAKE, William. *Adhesion and the formulation of adhesives*. [s.l.] : Applied science publishers LTD, 1982. 325 p. 2. ISBN 0-85334-134-6.
- 16 RAND, Gary. *Fundamentals of aquatic toxicology : effects, environmental fate, and risk assessment*. [s.l.] : CRC Press, 1995. 1125 p. 2. ISBN 1560320915.
- 17 CONNELL, D.W. *Introduction to ecotoxicology*. [s.l.] : Wiley-Blackwell, 1999. 170 p. ISBN 0632038527.
- 18 KOČÍ , Vladimír. Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In *Ekotoxikologické biotesty: Sborník pracovní konference, Seč u Chrudimi 18 – 19. 9. 2002*. [s.l.] : [s.n.], 2002. s. 3-7.
- 19 HOFFMAN, David, RATTNER, Barnett , BURTON, Allen. *Handbook of ecotoxicology*. [s.l.] : CRC Press, 2003. 1290 p. 2. ISBN 1566705460.
- 20 PERRY, Alfred, VANDERKLEIN, Elizabeth. *Water quality : management of a natural resource*. [s.l.] : Wiley-Blackwell, 1996. 639 p. ISBN 0865424691.
- 21 MARŠÁLEK, Blahoslav. *Mikrobiotesty : Druhá generace ekotoxikologických biotestů* [online]. [2007] [cit. 2009-01-04]. Dostupný z WWW:<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf>.
- 22 MARŠÁLEK, Blahoslav. Ekotoxikologické biotesty : Rozdělení, přehled, použití. In *Ekotoxikologické biotesty : Sborník pracovní konference, Seč u Chrudimi 18. - 19.9 2002*. [s.l.] : [s.n.], 2002. s. 8-24.
- 23 HORÁK , Josef, LINHART, Igor, KLUSOŇ , Petr. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT, 2004. 189 s. ISBN 80-7080-548-X .
- 24 CHADWICK, John. *Principles of environmental toxicology*. [s.l.] : CRC Press, 1998. 216 p. ISBN 0748403566.
- 25 AMBROŽOVÁ, Jana : *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha : VŠCHT, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8.
- 26 ADEMA, D.M.M. *Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests*. *Hydrobiologia*. 1978, vol. 59, no. 2, s. 125-134.
- 27 OECD, (1984). OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 202. *Daphnia sp.* Acute immobilisation test. OECD, Paris, France.

-
- 28 ČSN EN ISO 6341: 2000. Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. Praha: Český normalizační institut, 2000.
- 29 KALMEIJER, Daan. *Daphnia magna* [online]. [2008] , 09/26/2008 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW:<<http://www.kalmeijer.net/album/Other/slides/daphnia%20magna%201400x1040.html>>.
- 30 KOČÍ, Vladimír, RAKOVICKÝ , Tomáš, ŠVAGR, Andrej. *Testy akutní a semichronické toxicity* [online]. 2001 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Obecna.htm>>.
- 31 SVOBODOVÁ, Zdeňka. *Ekotoxikologie : praktická cvičení Část I, Testy toxicity na organizmech vodního prostředí*. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. 70 s. ISBN 80-85114-95-X.
- 32 DWORKIN, Martin, FALKOW, Stanley. *The Prokaryotes : Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology*. [s.l.] : Springer, 2006. 959 p. ISBN 0387254765.
- 33 MUNN, Colin. *Marine Microbiology : Ecology and Applications*. [s.l.] : Taylor & Francis, 2004. 282 p. ISBN 1859962882.
- 34 BESTEN, J, MUNAWAR, M. *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems : emerging techniques, trends, and strategies*. [s.l.] : CRC Press, 2005. 271 p. ISBN 0849335264.
- 35 *University of Aberdeen* [online]. c2006 [cit. 2009-03-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/bch052/aglover-bac.jpg> >.
- 36 ISO 11348, 2007. Water quality – Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacterie test), Part 2: Method using liquid-dried bacteria. ISO, Geneve.
- 37 ZAGORC-KONČAN, Jana, ŽGAJNAR GOTVAJN, Andreja, ROŠ, Milenko. *Vaje iz kemije okolja*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2002. 73 s. ISBN 961-6286-50-1.
- 38 GRAY, N.F. *Water technology: an introduction for environmental scientists and engineers*. [s.l.] : Butterworth-Heinemann, 2005. 645 p. ISBN 0750666331.
- 39 ORHON, Derin, ARTAN, Nazik. *Modelling of activated sludge systems*. [s.l.] : CRC Press, 1997. 589 p. ISBN 1566761018.

-
- 40 SINGH, Vedpal, STAPLETON, Raymond. *Biotransformations: bioremediation technology for health and environmental protection*. [s.l.] : Elsevier, 2002. 614 p. ISBN 0444509976.
- 41 ISO 8192, 2007. Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation. ISO, Geneve.
- 42 AGTEREN, Martin, KEUNING, Sytze, JANSSEN, Dick. *Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds*. [s.l.] : Springer, 1998. 491 p. 3. ISBN 079234989X.
- 43 ŽGAJNAR GOTVAJN, Andreja. *Metodologija vrednotenja biorazgradljivosti kemikalij in odpadnih vod v vodnem mediju*. [s.l.], 1998. 162 s. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Dizertační práce.
- 44 MANAHAN, Stanley. *Toxicological chemistry and biochemistry*. [s.l.] : CRC Press, 2002. 425 p. 3. ISBN 1566706181.
- 45 SEMENOV, S. A., GUMARGALIEVA, Klara, EFREMOVICZAIKOV, Gennadij. *Biodegradation and durability of materials under the effect of microorganisms*. [s.l.] : VSP, 2003. 231 p. ISBN 9067643882.
- 46 ISO/TR 15462, 1997. Water quality – selection of test for biodegradability. ISO, Geneve.
- 47 LEEUWEN, C.J., VERMEIRE, T. *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. [s.l.] : Springer, 2007. 686 p. 2. ISBN 1402061013.
- 48 ISO 9408, 1991. Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” aerobic biodegradability of organic compounds. Method by determination the oxygen demand in a closed respirometer. ISO, Geneve.
- 49 Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích ve znění pozdějších předpisů
- 50 Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích o změně některých zákonů, týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků.
- 51 ČSN ISO 10706: 2001. Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*). Praha: Český normalizační institut, 2001.

-
- 52 ŽGAJNAR GOTVAJN, Andreja, ZAGORC-KONČAN, Jana. Combination of Fenton and biological oxidation for treatment of heavily polluted fermentation waste broth. *Acta chim. slov.*[Taskana izd.], 2005, vol. 52, no. 2, pp. 131-137.
- 53 ISO 6060, 1989. Water quality – Determination of chemical oxygen demand. ISO, Geneve.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek)
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
OECD	Organization for Economical Cooperation of Development (Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj)
LC ₅₀	Koncentrace látky, která vyvolá úhyn 50 % testovacích organismů
EC ₅₀	Koncentrace látky, která vyvolá úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů
NOEC	No-observed effect concentration (Nejvyšší koncentrace látky, která nezpůsobí žádný efekt)
LOEC	The lowest observed effect level (nejnižší koncentrace látky, u které byl zpozorován efekt na testovaných organismech)
MO	Mikroorganismy
HMMM	Hexamethoxymethyl melamine
ATU	<i>N</i> -allylthiourea
3,5-DCF	3,5-dichlorofenol