



# Hodnocení ekotoxicity odpadů kinetickou zkouškou s luminiscenčními bakteriemi

Simona Vosáhlová, Vít Matějů, Robin Kycil a Martina  
Mazalová

ABITEC, s.r.o., [info@abitec.cz](mailto:info@abitec.cz), [laborator@abitec.cz](mailto:laborator@abitec.cz)

# Provedení a výhody zkoušky

- ▶ **ČSN ISO 21338 (2013)** = modifikace ČSN EN ISO 11348-1,2,3
- ▶ Zkouška vhodná pro zbarvené a zakalené vzorky.
- ▶ Lze měřit suspenzi pevných vzorků o koncentraci 20 % i vyšší.
- ▶ Zahrnuta i toxicita ve vodě nerozpustných látek.
- ▶ Luminometr kyvetový nebo mikrodestičkový s injektorem, zaznamenávání luminiscence kontinuálně po dobu nejméně 5 s v intervalech 0,2 s nebo kratších.
- ▶ Bakterie *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*) čerstvě připravené, sušené nebo lyofilizované.
- ▶ Doba expozice 15 min, 30 min, volitelně 5 min
- ▶ Podle ISO 21338 se vzorek považuje za netoxický, u kterého nelze dosáhnout 20 % inhibice při nejvyšší možné koncentraci suspenze.

# Rušivé vlivy podle ISO 21338

- ▶ koncentrace rozpuštěného kyslíku  $< 3 \text{ mg.L}^{-1}$
- ▶ pH mimo rozmezí 6,0 až 8,5
- ▶ osmolarita vzorku vyšší než  $35 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$
- ▶ přítomnost těkavých látek, snadno biodegradovatelných látek
- ▶ maximální hodnota signálu vzorku (peak value) musí být větší než 5 % maximální hodnoty signálu kontroly, jinak se musí vzorek ředit.

# Vliv předsoušení vzorku

- Charakteristika 7 vzorků zahuštěných kalů z čistíren odpadních vod původních a po předsušení

Vzorek	Původní vzorek			Předsušený vzorek			pH
	X [%]	$\kappa$ [mS.m <sup>-1</sup> ]	AHB [KTJ.g <sub>suš</sub> <sup>-1</sup> ]	X [%]	$\kappa$ [mS.m <sup>-1</sup> ]	AHB [KTJ.g <sub>suš</sub> <sup>-1</sup> ]	
V1	29,7	392	<b>7,1.10<sup>12</sup></b>	91,8	254	<b>7,7.10<sup>7</sup></b>	7,5
V2	22,3	423	5,5.10 <sup>8</sup>	91,4	365	2,5.10 <sup>6</sup>	7,6
V3	19,7	387	3,4.10 <sup>9</sup>	91,6	225	4,3.10 <sup>6</sup>	7,9
V4	28,9	495	6,8.10 <sup>10</sup>	93,8	327	4,6.10 <sup>8</sup>	7,8
V5	55,8	763	7,5.10 <sup>9</sup>	91,5	514	6,5.10 <sup>6</sup>	7,1
V6	20,5	539	1,1.10 <sup>9</sup>	90,1	352	7,0.10 <sup>7</sup>	8,1
V7	22,4	<b>381</b>	2,5.10 <sup>8</sup>	93,8	<b>174</b>	2,3.10 <sup>6</sup>	6,7

Vysvětlivky: X – sušina,  $\kappa$  – konduktivita vodného výluhu, AHB – aerobní heterotrofní bakterie, KTJ – kolonii tvořící jednotka

# Vliv předsušení vzorku na toxicitu

Vzorek	Původní vzorek		Předsušený vzorek	
	Luminiscenční bakterie, kinetický test, ISO 21338 EC <sub>50</sub> [g <sub>suš.</sub> ·L <sup>-1</sup> ]			
	15 min	30 min	15 min	30 min
V1 ↓	21,8	80,5	32,7	102,6
V2	17,2	44,3	16,1	20,2
V3 ↓	2,3	4,3	23,1	33,0
V4 ↓	0,3	0,2	0,5	0,5
V5	2,1	2,4	1,7	2,5
V6	12,9	13,1	4,8	4,4
V7 ↓	2,0	1,9	14,6	47,7



# Vliv předsušení vzorku na toxicitu

- Rozdíly v toxicitě nesusušených a sušených vzorků mohou souviset buď se ztrátou některých látek při sušení nebo se změnou sorpčních schopností některých látek nebo s rozdílnou velikostí částic.
- Výhodou předsušení vzorků je omezení vlivu koncentrace rozpuštěného kyslíku na průběh zkoušky. Snížení spotřeby rozpuštěného kyslíku v předsušených vzorcích lze očekávat v souvislosti s poklesem počtu životaschopných buněk bakterií.

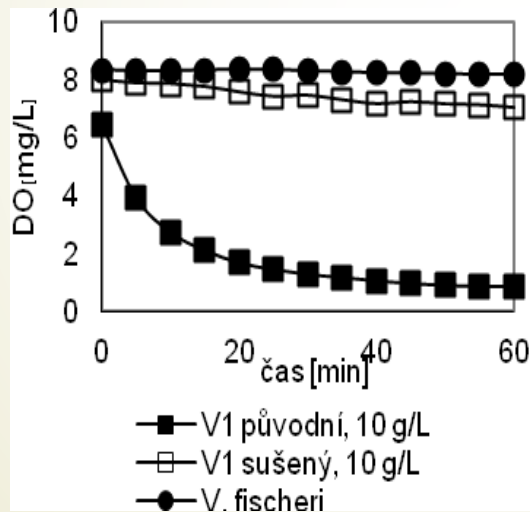


# Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku

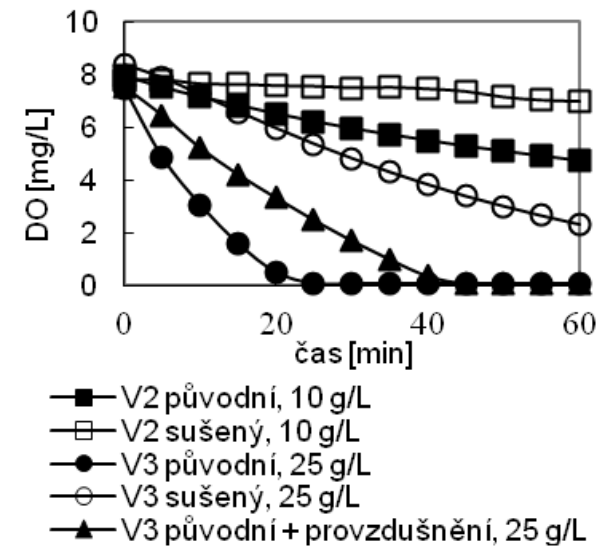
- ▶ Doporučení podle ISO 21338: pokud je v neředěném vzorku koncentrace rozpuštěného kyslíku menší než  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ , použije se přiměřený postup aerace vzorku.
- ▶ Ověření vlivu koncentrace rozpuštěného kyslíku se 7 vzorky kalů.
- ▶ Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla sledována 60 min v suspenzi vzorků původních i předsušených.
- ▶ Koncentrace zkoušené suspenze v  $\text{g.L}^{-1}$  odpovídala maximální zkoušené koncentraci vzorku v kinetickém luminiscenčním testu v závislosti na toxicitě vzorků.

# Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku

Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DO) v suspenzi vzorku 1 a bakterií *V. fischeri*



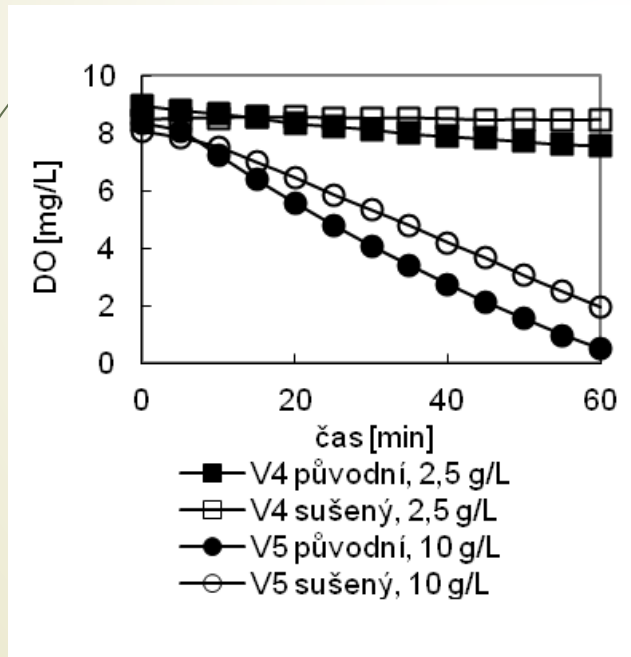
Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DO) v suspenzi vzorků 2 a 3



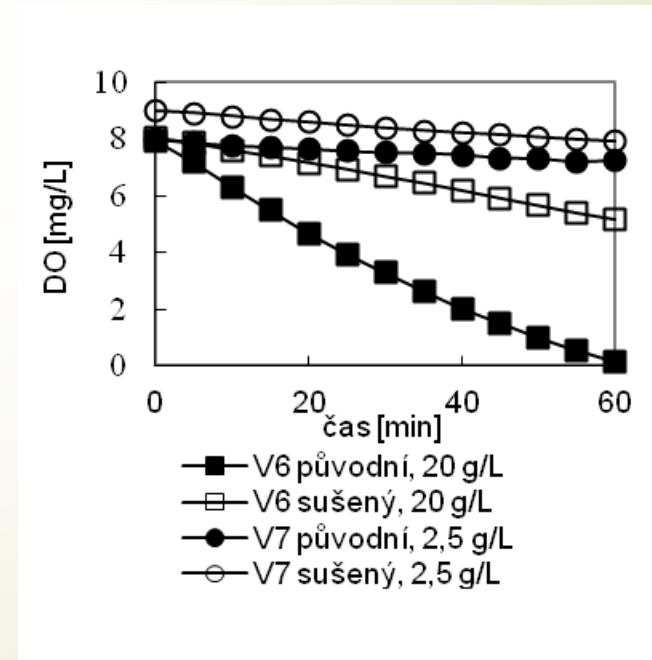


# Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku

Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DO) v suspenzi vzorků 4 a 5



Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DO) v suspenzi vzorků 6 a 7





# Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku

- ▶ I ve vysoce ředěných vzorcích může koncentrace rozpuštěného kyslíku klesnout pod doporučený limit.
- ▶ Předsoušení vzorků pozitivně ovlivňuje přítomnost rozpuštěného kyslíku v suspenzi vzorků. Pouze v sušeném vzorku V3 klesla koncentrace rozpuštěného kyslíku pod  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  po 50 min, zatímco u původního vzorku již po 10 min. Pokud byl před zahájením původní vzorek provzdušněn, klesla koncentrace rozpuštěného kyslíku pod  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  až po 20 min.
- ▶ Pokles koncentrace rozpuštěného kyslíku nebyl zaznamenán v suspenzi bakterií *V. fischeri*.

# Vliv zrnitosti vzorku


- ▶ ČSN ISO 21338 doporučuje prosévání vzorku sítím **2 mm**, zatímco pro ostatní terestrické zkoušky se vzorek obvykle prosévá sítím 4 mm.
- ▶ Byla proto kinetickým testem stanovena hodnota  $EC_{50}$  pro vybrané vzorky odpadů se zrnitostí < 4mm a < 2mm.

Zrnitost	< 4 mm		< 2 mm	
	$EC_{50}$ [ $g_{\text{suš}} \cdot L^{-1}$ ]		$EC_{50}$ [ $g_{\text{suš}} \cdot L^{-1}$ ]	
Vzorek	15 min	30 min	15 min	30 min
V8	6,2	6,4	0,3	0,3
V9	21,5	21,9	11,1	12,8
V10	26,0	33,3	12,9	16,4
V11	189,6	163,4	89,2	52,5

- ▶ Snížení zrnitosti zvýšilo toxicitu všech vzorků.
- ▶ Větší zrnitost způsobuje problémy při pipetování vzorků při přípravě ředicích řad.
- ▶ Při porovnání s výsledky ostatních zkoušek by se měl vzít v úvahu vliv zrnitosti materiálu.

# Porovnání toxicity podle ISO 21338 s akvatickými zkouškami ekotoxicity

Vzorek	Dafnie	Řasy	Luminiscenční bakterie		Luminiscenční bakterie, kinetický test	
	ISO 6341	ISO 8692	ISO 11348-2		ISO 21338	
	48 h	EC <sub>50</sub> [mL.L <sup>-1</sup> ] 72 h	15 min	30 min	EC <sub>50</sub> [g <sub>suš.</sub> .L <sup>-1</sup> ] 15 min	30 min
V1	353,5	544,2	n	n	21,8	80,5
V2	149,7	316,1	n	n	17,2	44,3
V3	134,5	313,9	234,1	367,0	2,3	4,3
V4	135,3	340,6	143,2	226,2	0,3	0,2
V5	83,5	414,3	8,0	8,9	2,1	2,4
V6	95,3	287,7	728,0	n	12,9	13,1
V7	73,8	41,3	77,9	85,6	2,0	1,9



# Porovnání toxicity podle ISO 21338 s akvatickými a terestrickými zkouškami ekotoxicity

- ▶ Zemina kontaminovaná PAU, ve které ostatní sledované ukazatele vyhověly vyhlášce č. 294/2005 Sb., příloha č.10, tabulka č.10.1.
- ▶ Limitní hodnoty uvedené v ISO 17616 a vyhlášce č. 294/2005 Sb.
- ▶ Toxicitu vzorku prokázal jedině kinetický test s luminiscenčními bakteriemi.

Ukazatel	Koncentrace	Inhibice [%]	Limitní hodnota	Hodnocení
<b>Suma PAU</b>	<b>170 mg.kg<sup>-1</sup></b>		<b>6<sup>a</sup></b>	<b>nevyhovuje</b>
hořčice	1000 mL.L <sup>-1</sup>	16,0	30 <sup>a</sup>	vyhovuje
řasy	1000 mL.L <sup>-1</sup>	2,1	30 <sup>a</sup> , 25 <sup>b</sup>	vyhovuje
dafnie	1000 mL.L <sup>-1</sup>	5,0	30 <sup>a</sup> , 20 <sup>b</sup>	vyhovuje
ryby	1000 mL.L <sup>-1</sup>	0	0 <sup>a</sup>	vyhovuje
luminiscenční bakterie sušené	500 mL.L <sup>-1</sup>	-11,0	20 <sup>b,c</sup>	vyhovuje
luminiscenční bakterie lyofilizované	500 mL.L <sup>-1</sup>	-7,2	20 <sup>b,c</sup>	vyhovuje
luminiscenční bakterie sušené, kinetický test	100 g <sub>suš.</sub> .L <sup>-1</sup>	<b>36,8</b>	20 <sup>c</sup>	<b>nevyhovuje</b>
chvostoskok	500 g <sub>suš.</sub> .kg <sup>-1</sup>	1,1	50 <sup>b</sup>	vyhovuje
roupice	500 g <sub>suš.</sub> .kg <sup>-1</sup>	4,5	50 <sup>b</sup>	vyhovuje
salát	500 g <sub>suš.</sub> .kg <sup>-1</sup>	24,2	30 <sup>b</sup>	vyhovuje
nitrifikace	1000 g <sub>suš.</sub> .kg <sup>-1</sup>	-5,6	10 <sup>b</sup>	vyhovuje

Vysvětlivky: a – limitní hodnoty podle vyhlášky č. 294/2005 Sb.,  
b – limitní hodnoty podle ISO 17616  
c – limitní hodnoty podle výchozí normy

- 8 vzorků pevných odpadů s různou kontaminací

Vzorek	Zkoušky Kontaminace	Akvatické				suspenze		Terestrické	
		Hořčice	Řasy	Dafnie	Lumino	Lumino kinetické	Salát	Roupice	
		Inhibice [%]							
Výkopová zemina	Vyhovuje vyhlášce*	0	0	0	-	<b>-14,3</b>	-14,3	-	
Výkopová zemina	Vyhovuje vyhlášce*	20,6	4,3	4,0	-	<b>-10,9</b>	14,3	-	
Kompost	dioxiny	75,0	6,0	100,0	11,5	<b>32,7</b>	100,0	94,8	
Kal z ČOV	C10-C40, PAU, PCB	-	-	-	-	<b>48,7</b>	28,6	5,4	
Kontaminovaná zemina	C10-C40, PAU, As	-	-	-	-	<b>65,0</b>	42,9	61,8	
Kontaminovaná zemina	PAU	-	15,8	0	30,1	<b>62,2</b>	-	33,0	
		EC <sub>50</sub> [mL.L <sup>-1</sup> / g.L <sup>-1</sup> / g.kg <sup>-1</sup> ]							
Piliny zemina	Cu	-	12,2	2,2	78,3	<b>18,6</b>	-	48,5	
	PCB				n	<b>9,0</b>	745,3	44,7	

Vysvětlivky. \* vyhláška č. 294/2005 Sb., příloha č.10, tabulka č. 10.1

- Kinetický test s luminiscenčními bakteriemi byl nejcitlivější zkouškou pro 4 vzorky z 8, přičemž významný rozdíl v toxicitě byl zjištěn pouze u zeminy kontaminované PCB.

# Závěr

- ▶ Kinetická zkouška s luminiscenčními bakteriemi je **citlivá** zkouška, vhodná pro **rychlé posouzení ekotoxicity** pevných nebo zbarvených vzorků.
- ▶ Při provedení zkoušky doporučujeme použití vzorků **bez předsoušení**.
- ▶ Doporučujeme **kontrolu koncentrace rozpuštěného kyslíku v nejvyšší zkoušené koncentraci suspenze** pro zvolenou dobu expozice, popř. zahrnout provzdušnění suspenze před zahájením zkoušky nebo použít vyšší ředění vzorku. Pokud je přesto zjištěn pokles koncentrace rozpuštěného kyslíku během prvních 15 min expozice větší než 50 %, není tato zkouška pravděpodobně pro daný vzorek vhodná.
- ▶ Za netoxický vzorek doporučujeme považovat vzorek, který **při koncentraci 100 g sušiny na litr suspenze** vykazuje **inhibici nižší než 20 %**.





Děkuji za pozornost