

**MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ ČESKÉ REPUBLIKY**

**Odbor odpadů**

**Metodický pokyn odboru odpadů  
ke stanovení ekotoxicity odpadů**

**Praha, únor 2007**

## Obsah

1	Předmluva .....	3
2	Úvod.....	3
2.1	Oblast použití.....	3
2.2	Použité podklady .....	4
2.2.1	<i>Související právní předpisy</i> .....	4
2.2.2	<i>Související technické normy</i> .....	5
2.2.3	<i>Ostatní</i> .....	5
2.3	Seznam použitých zkratk.....	5
2.4	Termíny a definice.....	6
3	Postup stanovení ekotoxicity odpadů .....	7
3.1.	Princip postupu .....	7
3.2	Odběr, úprava a uchování vzorků .....	8
3.3	Příprava vodného výluhu odpadu pro testy ekotoxicity .....	8
3.3.1	<i>Úprava vodného výluhu odpadu pro testy na akvarijních rybách, perloočkách a semenech</i> .....	8
3.3.2	<i>Úprava vodného výluhu odpadu pro test na zelených řasách</i> .....	9
3.4	Metodiky testů ekotoxicity.....	9
3.4.1	<i>Test na akvarijních rybách</i> .....	11
3.4.2	<i>Test na perloočkách</i> .....	11
3.4.3	<i>Test na sladkovodních řasách</i> .....	11
3.4.4	<i>Test na semenech vyšších rostlin</i> .....	12
4	Hodnocení odpadů pro jejich využívání na povrchu terénu .....	12
4.1	Odpady mohou být využity při uzavírání skládky k vytváření ochranné vrstvy kryjící těsnicí vrstvu skládky a svrchní rekultivační vrstvy skládky jestliže: .....	12
4.2	Odpady mohou být využity k rekultivaci vytěžených povrchových důlních děl (povrchové doly, lomy, pískovny) jestliže: .....	12
4.3	Odpady mohou být využity na povrchu terénu k terénním úpravám nebo rekultivacím lidskou činností postižených pozemků (s výjimkou rekultivace skládek) jestliže: .....	13
5	Potvrzení nebo vyloučení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti .....	14
6	Dokumentace a interpretace výsledků .....	14
	PŘÍLOHA č. 1 Test na semenech hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ).....	14
	PŘÍLOHA č. 2 Parametry pro udržování a chov živorodky duhové ( <i>Poecilia reticulata</i> Peters. – Teleostei, Poeciliidae) (informativní).....	17

## 1 Předmluva

Ministerstvo životního prostředí, vědomo si požadavku na dosažení co nejvyšší shodnosti postupů používaných při stanovení ekotoxicity odpadů, vydává tento metodický pokyn. Jeho vydáním končí platnost Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů, který byl zveřejněn ve Věstníku MŽP, ročník XIII, částka 6, v červnu 2003 a vycházel z právní úpravy v souladu se zákonem č. 185/2001 Sb., o odpadech.

V metodickém pokynu jsou zohledněny a ujasněny požadavky vycházející z ustanovení § 6 a zvláště z ustanovení přílohy č. 3 vyhlášky č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, v platném znění, a dále z ustanovení přílohy č. 10 vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, vydaných k provedení zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, (dále jen zákon). Ustanovení citovaných příloh vyhlášek se na dosud platný metodický pokyn odkazuje. Jelikož stanovení ekotoxicity odpadů ve smyslu citovaných vyhlášek představuje speciální postup zjištění a hodnocení, který není v České republice jako celek normalizován, byl v roce 2003 vypracován metodický pokyn, který již není plně v souladu s účinnou právní úpravou, a je proto nahrazován tímto metodickým pokynem.

## 2 Úvod

Předmětem metodického pokynu je postup pro stanovení a hodnocení ekotoxicity odpadů v souladu s požadavky vyhlášky č. 294/2005 Sb., a ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita, v souladu s požadavky vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2]. Cílem metodického pokynu je sjednocení postupu tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší míry srovnatelnosti výsledků v jednotlivých laboratořích, a tím i co nejvyšší objektivnosti těchto výsledků pro posuzování odpadů ve smyslu výše uváděných vyhlášek.

Stanovení ekotoxicity je prováděno jednotnými metodami na předepsaných organismech (příloha č. 1 a č. 3 k vyhlášce č. 376/2001 Sb. [2]):

- a) *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod.),
- b) *Daphnia magna* (doba působení 48 hod.),
- c) *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) (dříve *Selenastrum capricornutum*) (doba působení 72 hod.),
- d) *Sinapis alba* (*semeno*) (doba působení 72 hod.).

Výsledky zkoušek jsou využitelné jak pro hodnocení odpadů využívaných na povrchu terénu, tak pro hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita.

### 2.1 **Oblast použití**

Metodický pokyn je určen pracovníkům veřejné a státní správy, pracovníkům laboratoří, osobám pověřeným k hodnocení nebezpečných vlastností odpadu a rovněž osobám, jejichž pracovní náplň a rozhodování je ovlivňováno ustanoveními zákona a předpisů vydaných k jeho provedení.

Postup určený tímto metodickým pokynem platí pro stanovení ekotoxicity odpadů na základě výsledků zkoušek akutní toxicity jejich vodných výluhů na určených zkušebních organismech. Toto stanovení v laboratorních podmínkách modeluje účinky odpadů při jejich kontaktu s vodou, kde dochází k uvolňování rozpustných složek odpadů, které ovlivňují organismy nacházející se ve vodním prostředí. Jedná se o uzanční postup, který může vést

k výsledkům lišícím se od reálné skutečnosti. Vodný výluh zkoušeného odpadu se připraví dle ČSN EN 12457-4 [17].

Využití pokynu je doporučeno zejména při:

- hodnocení odpadů z hlediska naplnění kritérií stanovených pro jejich využívání na povrch terénu v souladu s požadavky vyhlášky č. 294/2005 Sb. [3],
- hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadů H14 Ekotoxicita v souladu s požadavky vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2].

Metodický pokyn lze přiměřeně využívat pro zjišťování nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita pro kapalné odpady a kaly, které sedimentací uvolňují kapalnou fázi.

Metodický pokyn není možné využívat pro zjišťování ekotoxicity odpadů, z nichž nelze odebrat reprezentativní vzorek pro přípravu vodného výluhu a odpadů, z nichž nelze připravit vodný výluh (např. gelující látky).

Pro hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita se kapalný odpad, pokud jeho základní složkou je voda, považuje za výluh připravený k ekotoxikologickému testování. Při hodnocení kapalného odpadu musí být využívána kritéria stanovená pro odpady (nikoliv pro odpadní vody). V případě, že se nebezpečná vlastnost H14 Ekotoxicita posuzuje u kalu, který uvolňuje kapalnou fázi, zkouší a hodnotí se postupem stanoveným pro hodnocení nebezpečných vlastností kapalná i pevná fáze samostatně. Pro vyloučení nebezpečné vlastnosti u dotčeného odpadu je nutné vyloučit nebezpečnou vlastnost u kapalně i pevně fáze.

V případě, že kapalný odpad obsahuje jinou kapalinu, než je voda, postupuje se v souladu s požadavky zvláštního předpisu (zákona č. 356/2003 Sb. [7]).

V případě pochybností o možnosti odebrat reprezentativní vzorek odpadu pro přípravu výluhu ke stanovení ekotoxicity, rozhodne o této skutečnosti osoba oprávněná k odběru vzorků odpadů vždy ve spolupráci s příslušnou laboratoří.

Pokud není možno použít postup pro přípravu výluhu v souladu s metodickým pokynem k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů [18], může postup přípravy výluhu (pro hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita) stanovit příslušná laboratoř ve spolupráci s pověřenou osobou. Tyto skutečnosti musí být uvedeny v Protokolu o zkoušce.

## **2.2 Použité podklady**

### **2.2.1 Související právní předpisy**

- [1] Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, v platném znění.
- [2] Vyhláška MŽP a MZ č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, v platném znění.
- [3] Vyhláška MŽP č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady.
- [4] Vyhláška MŽP č. 381/2001 Sb., kterou se stanoví Katalog odpadů, Seznam nebezpečných odpadů a seznamy odpadů a států pro účely vývozu, dovozu a tranzitu odpadů a postup při udělování souhlasu k vývozu, dovozu a tranzitu odpadů (Katalog odpadů), v platném znění.
- [5] Vyhláška MŽP č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, v platném znění.
- [6] Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů, v platném znění.

[7] Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, v platném znění.

## 2.2.2 *Související technické normy*

Mimo normy citované v souvisejících právních předpisech jde zejména o normy:

- [8] ČSN 018003 Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.
- [9] ČSN 015110 Vzkovávání materiálů. Základní ustanovení.
- [10] ČSN ISO 3696 Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody.
- [11] ČSN ISO 11465 Kvalita půdy. Stanovení hmotnostního podílu sušiny a hmotnostní vlhkosti půdy. Gravimetrická metoda.
- [12] ČSN EN ISO 5667-3 Jakost vod. Odběr vzorků. Část 3: Návod pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi.
- [13] ČSN 83 0905 Ochrana vody před znečištěním ze skládek.
- [14] ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity.
- [15] ČSN EN ISO 8692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas.
- [16] ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – Část 2: Obnovovací metoda.
- [17] ČSN EN 12457-4 Charakterizace odpadů - Vyluhování – Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů – Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalné a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm (bez zmenšení velikosti částic, nebo s ním).

## 2.2.3 *Ostatní*

- [18] Metodický pokyn k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. Věstník MŽP, ročník XII, částka 12, prosinec 2002.
- [19] Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí Vzkovávání odpadů. Věstník MŽP, ročník XI, částka 5, květen 2001.
- [20] Máchová, J., Svobodová, Z., Vykusová, B.: Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů. Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, 1994.
- [21] Metodický pokyn ke stanovení ekotoxicity odpadů. Věstník MŽP, ročník XIII, částka 6, červen 2003.

## 2.3 **Seznam použitých zkratk**

EN	Evropská norma
ČSN	Česká technická norma
ISO	Mezinárodní norma (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
EC 50	koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50% úhyn nebo inhibici pohyblivosti (imobilizaci) perlooček ( <i>Daphnia magna</i> ) ve srovnání s kontrolou v podmínkách určených jednotlivými metodikami testů v [ml.l <sup>-1</sup> ]
IC 50	koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí 50% inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50% inhibici růstu kořene semen <i>Sinapis alba</i> ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku v podmínkách určených jednotlivými metodikami testů v [ml.l <sup>-1</sup> ]
LC 50	koncentrace vodného výluhu odpadu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ve zvoleném časovém úseku

MŽP Ministerstvo životního prostředí  
MZ Ministerstvo zdravotnictví

## 2.4 Termíny a definice

Termíny a jejich definice používané pro účely tohoto metodického pokynu jsou převážně převzaty ze souvisejících právních předpisů a technických norem. Pro potřeby metodického pokynu jsou některé z nich blíže vysvětleny.

**Ekotoxicita** – vlastnost odpadu, představující akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Jde o ukazatel využívaný k hodnocení odpadů z hlediska možnosti jejich využití na povrchu terénu dle vyhlášky č. 294/2005 Sb. [3] a k hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadu H14 Ekotoxicita podle vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2].

**Vodný výluh odpadu** – roztok získaný postupem podle ČSN EN 12457-4 [17]

**Voda** – destilovaná, demineralizovaná nebo deionizovaná voda odpovídající 3. stupni jakosti podle ČSN ISO 3696 [10]. Použití demineralizované vody se vylučuje v případě, že se k její přípravě používá lokální zdroj vody, kde není zaručena jakost vody po stránce mikrobiologické. Voda nesmí obsahovat chlór ani jiné toxické látky (stopové koncentrace kovů, pesticidů, amoniaku apod.).

**Ředící voda** – normalizovaným postupem připravený roztok solí ve vodě [14] [15] [16].

**Vodný výluh (testovaný<sup>\*)</sup> roztok** – vodný výluh odpadu obohacený zásobními roztoky a v případě potřeby ředěný ředící vodou na zvolenou koncentraci, připravený pro testy ekotoxicity.

**Testovací<sup>\*)</sup> organismus** – organismus, který je za konstantních podmínek, určených jednotlivými metodikami testů akutní toxicity a inhibice růstu, vystaven působení vodného výluhu.

**Úvodní test<sup>\*)</sup>** – test sloužící pro odhad ekotoxicity neředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) na testovací organismus.

**Předběžný test<sup>\*)</sup>** – test sloužící k vyhledání intervalu koncentrací ředěného vodného výluhu (testovaného roztoku) pro provedení základního testu ekotoxicity.

**Základní test<sup>\*)</sup>** – test sloužící ke stanovení hodnoty LC (EC, IC) 50.

**Ověřovací test<sup>\*)</sup>** – ověřuje, že neředěný vodný výluh (testovaný roztok) nevykazuje toxické účinky na předepsaných testovacích organismech.

**Kontrola** – testování<sup>\*)</sup> organismů v prostředí ředící vody bez přídavku vodného výluhu odpadu za stejných podmínek jako probíhá test (úvodní, předběžný, základní, ověřovací), pro nějž je kontrola využívána.

**Mortalita** – toxický účinek vodného výluhu (testovaného roztoku), který se projeví smrtí testovacího organismu.

**Inhibice pohyblivosti (imobilizace)** – toxický účinek vodného výluhu (testovaného roztoku), který se projeví neschopností prostorového pohybu testovacího organismu specifikovaného normou ČSN EN ISO 6341 [14].

**Inhibice růstu** – toxický účinek vodného výluhu (testovaného roztoku), který se projeví snížením hodnot parametrů, specifikovaných normou ČSN EN ISO 8692 [15], či metodikou uvedenou v příloze č. 1 tohoto pokynu, ve srovnání s kontrolou.

**Stimulace růstu** – toxický účinek vodného výluhu (testovaného roztoku), který se projeví zvýšením hodnot parametrů, specifikovaných normou ČSN EN ISO 8692 [15], či metodikou uvedenou v příloze č. 1 tohoto pokynu, ve srovnání s kontrolou.

**Pevný odpad** – odpad, který si jako celek a nebo jako jeho jednotlivé části (např. pevný sypký odpad) uchovává svůj tvar a objem za normálních atmosférických podmínek.

**Kapalný odpad** – odpad ve skupenství kapalném podle ČSN EN 12457-4, příloha B [17]

**Kal** – směs kapalin a pevných částic oddělených z různých typů kapalin jako výsledek přírodních nebo umělých procesů).

**Kal uvolňující kapalnou fází** – pro hodnocení nebezpečných vlastností H14 Ekotoxicita se kapalná i pevná fáze stanoveným postupem zkouší a hodnotí samostatně. Pro vyloučení nebezpečné vlastnosti u daného odpadu je nutné vyloučit nebezpečnou vlastnost u kapalně i pevné fáze.

**Pověřená osoba** – právnická osoba nebo fyzická osoba pověřená MŽP nebo MZ k hodnocení příslušných nebezpečných vlastností odpadů. Pověřená osoba je osobou oprávněnou k odběru vzorků odpadu pro hodnocení jejich nebezpečných vlastností (viz § 5, odst. 4 vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2]).

**Osoba kvalifikovaná k odběru vzorků odpadů** – fyzická osoba, která má dokončené vysokoškolské vzdělání technického nebo přírodovědného směru a nejméně 3 roky praxe v oboru odpadového hospodářství v posledních 10 letech, nebo střední vzdělání technického nebo přírodovědného (případně zdravotnického) směru ukončené maturitou a nejméně 5 let praxe v oboru odpadového hospodářství v posledních 10 letech a jejíž kvalifikace je doložena následujícími dokumenty:

- odborný životopis,
- záznamy o absolvování kurzů vztahujících se ke vzorkování (včetně vnitropodnikových zaškolovacích kurzů a kurzů sponzorovaných výrobcí zařízení),
- záznamy o účasti na odborných seminářích,
- záznamy o absolvování školení nových vzorkovacích technik a přístrojů.

**Osoba kvalifikovaná k odběru vzorků odpadů**

- odstraňovaných uložení na skládky odpadů a/nebo využívaných na povrchu terénu dle požadavku vyhlášky č. 294/2005 Sb. [3]

**Osoba oprávněná k odběru vzorků odpadů**

- pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadů splňující požadavek § 5, odst. 4 vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2], je osobou, která absolvovala školení pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, jehož náplň schválilo MŽP nebo MZ.

*\*) termín test, testování, testovací, testovaný je identický s termínem zkouška, zkoušení, zkušební, zkoušený, jak jsou užívány v technických normách.*

### **3 Postup stanovení ekotoxicity odpadů**

#### **3.1. Princip postupu**

Ekotoxicita se stanovuje pomocí testů akutní toxicity, kterým je podroben vodný výluh (testovaný roztok). Testy se provádějí na zástupcích ryb, zooplanktonu, fytoplanktonu a vyšších rostlin, uvedených v definici nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita v příloze č. 1

vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2]. Testované organismy reprezentují důležité články ekosystémů s možnou rozdílnou citlivostí k různým látkám obsaženým v odpadu a uvolněným do vodného výluhu odpadu. Pro stanovení ekotoxicity jsou rozhodující výsledky testu nejcitlivěji reagujícího organismu.

Testy akutní toxicity se provádějí podle aktuálně platných ČSN Jakost vod, uvedených v bodě 7 přílohy č. 3 k vyhlášce č. 376/2001 Sb. [2] (ČSN EN ISO 6341 [14], ČSN EN ISO 8692 [15], ČSN EN ISO 7346-2 [16]). Pro semena *Sinapis alba* tento pokyn uvádí v příloze č. 1 zvláštní postup stanovení.

### 3.2 Odběr, úprava a uchovávání vzorků

Odběr a úprava vzorků odpadů se řídí zásadami uvedenými v metodickém pokynu ke vzorkování odpadů [19] a v metodickém pokynu k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů [18]. Z důvodu větší časové náročnosti ekotoxikologických testů a potřeby uchovávání vzorků pro případné ověření výsledků stanovení ekotoxicity se prodlužuje doba jejich skladování na dobu nezbytně nutnou pro možné opakování testů. Vzorky se uchovávají v těsně uzavřených nádobách, v temnu, při teplotě do 4 °C.

### 3.3 Příprava vodného výluhu odpadu pro testy ekotoxicity

Vodný výluh odpadu se připraví ve shodě s ČSN EN 12457- 4 [17]. Z důvodu možné nestálosti složení vodného výluhu odpadu v delším časovém období se pro testy ekotoxicity připraví vždy jen takové jeho množství, které bude spotřebováno. Pro nové či opakované testy se připravuje vždy čerstvý vodný výluh odpadu.

K loužení odpadu se používá voda (viz. kap. 2.4). Pro vyloučení možného negativního vlivu nízkého osmotického tlaku vody na testovací organismy, je nutné před zahájením testů potřebné množství vodného výluhu odpadu obohatit solemi pomocí zásobních roztoků.

Při přípravě ředící vody pro testy na jednotlivých testovacích organismech se do vody dávkuje stejné množství zásobních roztoků stejným postupem, jak je popsáno pro úpravu vodného výluhu odpadu pro testy na jednotlivých testovacích organismech.

#### 3.3.1 Úprava vodného výluhu odpadu pro testy na akvarijních rybách, perloočkách a semenech

Pro přípravu vodného výluhu (testovaného roztoku) se používají následující zásobní roztoky solí, jejichž konečné koncentrace odpovídají požadavkům ČSN EN ISO 7346-2 [16] a ČSN EN ISO 6341 [14]:

**Zásobní roztok č. 1:** 117,6 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na objem 1 litru.

**Zásobní roztok č. 2:** 49,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na objem 1 litru.

**Zásobní roztok č. 3:** 25,9 g  $\text{NaHCO}_3$  se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na objem 1 litru.

**Zásobní roztok č. 4:** 2,3 g  $\text{KCl}$  se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na objem 1 litru.

Vodný výluh odpadu se uvedenými čtyřmi zásobními roztoky obohacuje následujícím způsobem. Odměrná nádoba potřebného objemu se částečně naplní vodným výluhem odpadu, poté se do ní dávkuje po 2,5 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků na 1 litr požadovaného objemu vodného výluhu (testovaného roztoku) a na tento požadovaný objem se nádoba doplní vodným výluhem odpadu. Vodný výluh (testovaný roztok) je třeba před každým použitím důkladně protřepat, aby byla zaručena jeho homogenita.



### 3.3.2 Úprava vodného výluhu odpad pro test na zelených řasách

Pro úpravu vodného výluhu odpadu se používají následující zásobní roztoky solí, jejichž konečné koncentrace odpovídají požadavkům ČSN EN ISO 8692 [15].

**Zásobní roztok č. 1 – živiny** (navážky na 1 litr zásobního roztoku):

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g

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

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	64 mg
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O <sup>*)</sup>	100 mg

<sup>\*)</sup> sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

**Zásobní roztok č. 3 – stopové prvky** (navážky na 1 litr zásobního roztoku):

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>*)</sup>	185 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	415 mg
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7 mg

<sup>\*)</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> může být rozpuštěna přidáním 0,1 mol/l NaOH

**Zásobní roztok č. 4 – NaHCO<sub>3</sub>** (navážka na 1 litr zásobního roztoku):

NaHCO <sub>3</sub>	50 g
--------------------	------

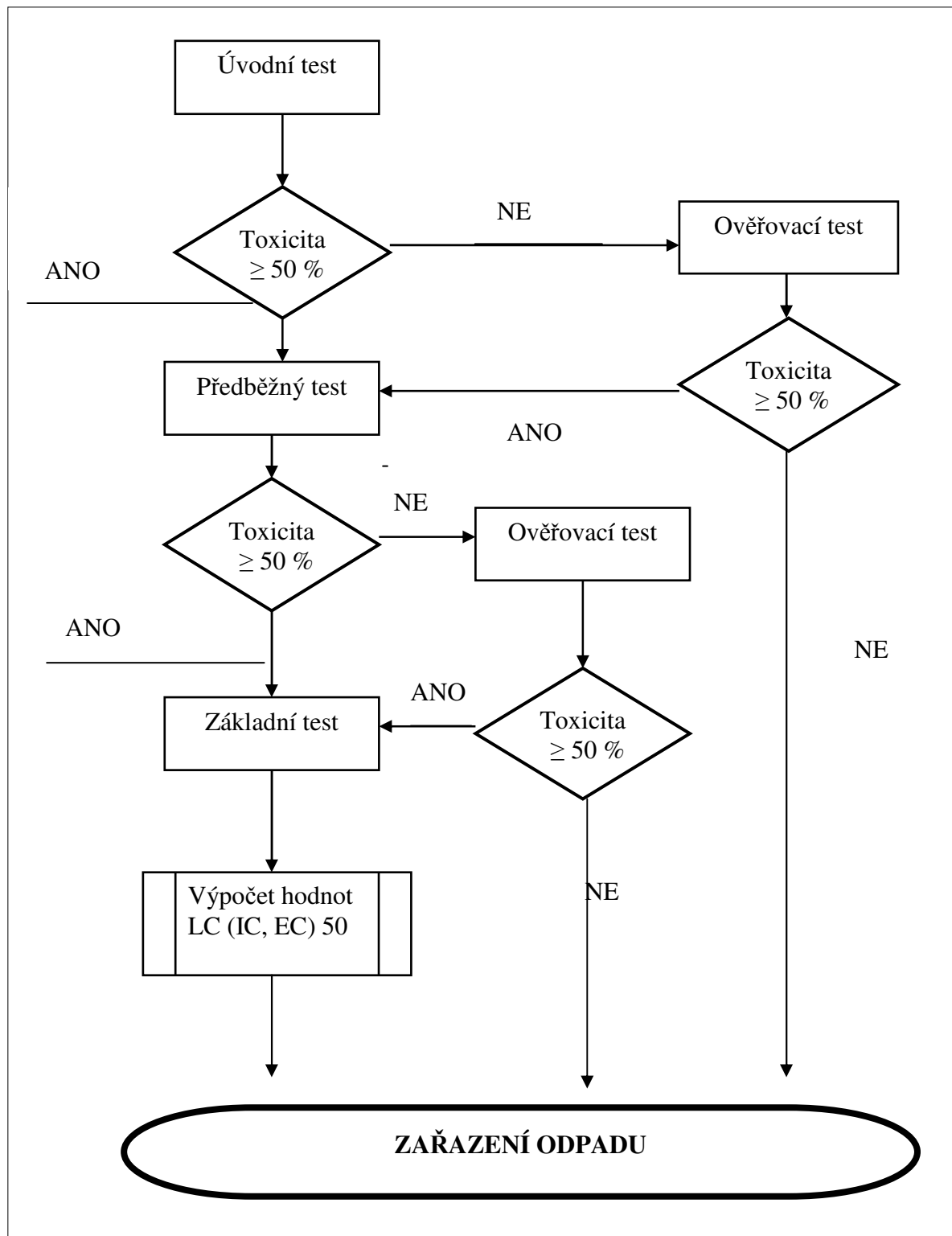
Navážky chemikálií pro jednotlivé zásobní roztoky se rozpustí ve vodě a roztoky se doplní do 1 litru vodou. Zásobní roztoky č. 1 – č. 3 se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min.). Roztok č. 4 se nesterilizuje v autoklávu, ale pouze filtrací přes membránový filtr. Po sterilizaci se roztoky skladují ve tmě při teplotě 4 °C.

Vodný výluh odpadu se obohacuje uvedenými čtyřmi zásobními roztoky následujícím způsobem. Odměrná nádoba potřebného objemu se částečně naplní vodným výluhem odpadu, poté se do ní dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml zásobních roztoků č. 2, 3, a 4 na 1 litr požadovaného objemu vodného výluhu (testovaného roztoku) a na tento požadovaný objem se nádoba doplní vodným výluhem odpadu. Vodný výluh (testovaný roztok) je třeba před každým použitím důkladně protřepat, aby byla zaručena jeho homogenita.

### 3.4 Metodiky testů ekotoxicity

Testy ekotoxicity vodného výluhu (testovaného roztoku) se provádějí na všech testovacích organismech postupem, jak je znázorněn na následujícím obrázku č. 1.

**Obrázek č. 1** – Postupový diagram testů k hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita



Testy ekotoxicity se zahajují úvodním testem. Úvodnímu testu je vystaven testovaný roztok připravený z neředěného vodného výluhu odpadu. Do testu se nasazují organismy v počtech, odpovídajících požadavkům pro předběžné testy daným metodikami pro jednotlivé testovací organismy. Ověřovací testy se provádějí s nejméně trojnásobným množstvím organismů proti počtům organismů požadovaným při základních testech.

Projeví-li se v průběhu úvodního testu toxický účinek pro  $\geq 50$  % testovacích organismů, provede se předběžný test s využitím vhodně zvolené škály koncentrací vodného výluhu. Za vhodně zvolenou koncentrační řadu vodného výluhu pro předběžný test se považuje řada zahrnující koncentrace s toxickým účinkem pro 0 – 100 % testovacích organismů. Základní test se naplánuje na základě výsledků předběžného testu.

Vyplyne-li z výsledků předběžného testu, že základním testem nebude možno stanovit hodnotu LC (EC, IC) 50, provede se ověřovací test. V ostatních případech slouží výsledky předběžného testu pro stanovení rozsahu koncentrací pro test základní.

V každém testu se nasazuje rovněž kontrola s počtem organismů, odpovídajícím metodice daného testu.

Zařazení odpadu na základě výsledků ekotoxikologických testů pro využití na povrchu terénu se pak provede podle postupu uvedeného v kapitole 4 tohoto metodického pokynu.

#### **3.4.1 Test na akvarijních rybách**

Test se provádí na akvarijní rybě živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) podle ČSN EN ISO 7346-2 [16] s expoziční dobou 96 hodin. Perioda výměny roztoků je 48 hodin.

Poznámka 1: Pro předběžný test platí podmínky orientační zkoušky, specifikované v technické normě [16].

Poznámka 2: Při testování vodného výluhu odpadu je výsledek LC 50 uváděn v ml vodného výluhu odpadu přítomného v 1 l vodného výluhu (testovaného roztoku) v  $[\text{ml.l}^{-1}]$ .

#### **3.4.2 Test na perloočkách**

Test se provádí na korýši z podtřídy lupenonožců, perloočce (*Daphnia magna*) podle ČSN EN ISO 6341 [14] s expoziční dobou 48 hodin.

Poznámka 3: Pro základní test platí podmínky vlastní zkoušky, specifikované v technické normě [14].

Poznámka 4: Při testování vodného výluhu odpadu je výsledek EC 50 uváděn v ml vodného výluhu odpadu přítomného v 1 l vodného výluhu (testovaného roztoku) v  $[\text{ml.l}^{-1}]$ .

#### **3.4.3 Test na sladkovodních řasách**

Test se provádí na zelené řase *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) (dříve *Selenastrum capricornutum*) podle ČSN EN ISO 8692 [15] (doba působení 72 hodin)

Poznámka 5: Pro stanovení IC 50 platí postupy stanovení  $E_rC_{50}$ , specifikované v technické normě [15].

Poznámka 6: Při testování vodného výluhu odpadu je výsledek IC 50 uváděn v ml vodného výluhu odpadu přítomného v 1 l vodného výluhu (testovaného roztoku) v  $[\text{ml.l}^{-1}]$ .

### 3.4.4 Test na semenech vyšších rostlin

Test se provádí podle postupu, uvedeného v příloze č. 1 tohoto metodického pokynu na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*) s expoziční dobou 72 hodin.

**Poznámka 7:** Při testování vodného výluhu odpadů je výsledek IC 50 uváděn v ml vodného výluhu odpadu přítomného v 1 l vodného výluhu (testovaného roztoku) [ml.l<sup>-1</sup>].

## 4 Hodnocení odpadů pro jejich využívání na povrchu terénu

viz Tabulka č. 1 Požadavky a výsledky ekotoxikologických testů

### 4.1 Odpady mohou být využity při uzavírání skládky k vytváření ochranné vrstvy kryjící těsnicí vrstvu skládky a svrchní rekultivační vrstvy skládky jestliže:

- a) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na rybách (viz kap. 3.4.1) nevykazují ryby žádné výrazné změny v chování ve srovnání s kontrolními vzorky a během testu neuhyne žádná ryba (tabulka č. 1 sloupec I),
- b) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na perloočkách (viz kap. 3.4.2) zjištěné procento imobilizace nepřesáhne 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1 sloupec I),
- c) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na řasách (viz kap. 3.4.3) se neprokáže inhibice růstu větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (může být stimulace),
- d) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na semenech hořčice bílé (viz kap. 3.4.4) se neprokáže inhibice růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (může být stimulace).

### 4.2 Odpady mohou být využity k rekultivaci vytěžených povrchových důlních děl (povrchové doly, lomy, pískovny) jestliže:

- a) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na rybách (viz kap. 3.4.1) nevykazují ryby žádné výrazné změny v chování ve srovnání s kontrolními vzorky a během testu neuhyne žádná ryba (tabulka č. 1, sloupec II),
- b) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na perloočkách (viz kap. 3.4.2) zjištěné procento imobilizace nepřesáhne 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II),
- c) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na řasách (viz kap. 3.4.3) se neprokáže inhibice nebo stimulace růstu větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II).

V horní rekultivační vrstvě v mocnosti minimálně 1 m od povrchu terénu musí výsledky testů splňovat požadavky stanovené v tabulce č. 1, sloupec I – inhibice růstu řasy nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 %, stimulace není omezujícím faktorem.

- d) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na semenech hořčice bílé (viz kap. 3.4.4) se neprokáže inhibice nebo stimulace růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II)

V horní rekultivační vrstvě v mocnosti minimálně 1 m od povrchu terénu musí výsledky testů splňovat požadavky stanovené v tabulce č. 1, sloupec I – inhibice růstu kořene semene nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 %, stimulace není omezujícím faktorem.

**4.3 Odpady mohou být využity na povrchu terénu k terénním úpravám nebo rekultivacím lidskou činností postižených pozemků (s výjimkou rekultivace skládek) jestliže:**

- a) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na rybách (viz kap. 3.4.1) nevykazují ryby žádné výrazné změny v chování ve srovnání s kontrolními vzorky a během testu neuhyne žádná ryba (tabulka č. 1, sloupec II),
- b) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na perloočkách (viz kap. 3.4.2) zjištěné procento imobilizace nepřesáhne 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II),
- c) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na řasách (viz kap. 3.4.3) se neprokáže inhibice nebo stimulace růstu větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II).

V horní rekultivační vrstvě v mocnosti minimálně 1 m od povrchu terénu musí výsledky testů splňovat požadavky stanovené v tabulce č. 1, sloupec I – inhibice růstu řasy nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 %, stimulace není omezujícím faktorem

- d) v ověřovacím testu s neřaděným vodným výluhem na semenech hořčice bílé (viz kap. 3.4.4) se neprokáže inhibice nebo stimulace růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky (tabulka č. 1, sloupec II).

V horní rekultivační vrstvě v mocnosti minimálně 1 m od povrchu terénu musí výsledky testů splňovat požadavky stanovené v tabulce č. 1, sloupec I – inhibice růstu kořene semene nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 %, stimulace není omezujícím faktorem.

**Tabulka č. 1 Požadavky a výsledky ekotoxikologických testů**

Testovaný organismus	Doba působení (hod.)	I	II
Poecilia reticulata nebo Brachydanio rerio	96	ryby nesmí vykazovat v ověřovacím testu výrazné změny chování ve srovnání s kontrolními vzorky a nesmí uhynout ani jedna ryba	ryby nesmí vykazovat v ověřovacím testu výrazné změny chování ve srovnání s kontrolními vzorky a nesmí uhynout ani jedna ryba
Daphnia magna Straus	48	procento imobilizace perlooček nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	procento imobilizace perlooček nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
Raphidocelis subcapitata (selenastrum capricornatum) nebo Scenedesmus subspicatus	72	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu řasy větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice nebo stimulace růstu řasy větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
semena Sinapis alba	72	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice nebo stimulace růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky

Pokud výsledky testů nespĺňují dané požadavky ve všech čtyřech parametrech hodnocení, nelze odpad využít na povrchu terénu.

## **5 Potvrzení nebo vyloučení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti**

Pro potvrzení nebo vyloučení ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxicita ve smyslu vyhlášky č. 376/2001 Sb. [2], se vychází z definice této vlastnosti uvedené v příloze č. 1 k citované vyhlášce. Nebezpečnou vlastnost H14 Ekotoxicita mají odpady, jejichž vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení na testovací organismus:

*Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod.),

*Daphnia magna* (doba působení 48 hod.),

*Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*) nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) (dříve *Selenastrum capricornutum*) (doba působení 72 hod.) *Sinapis alba* (semeno) (doba působení 72 hod.);

tyto hodnoty: LC (EC, IC)  $50 \leq 10$  ml.l-1.

## **6 Dokumentace a interpretace výsledků**

Mimo předepsané dokumenty související s odběrem a úpravou vzorku testovaného odpadu, s přípravou výluhu a s vlastními testy ekotoxicity (plán odběru vzorků, protokol o odběru vzorku, protokol o zkoušce) je zejména doporučeno důsledně dokumentovat všechny odchylky od standardních postupů odběru vzorků, přípravy vodného výluhu a testů ekotoxicity v rámci příslušných protokolů, aby byla pokud možno zaručena opakovatelnost všech procesů.

### **PŘÍLOHA č. 1 Test na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*)**

Postup vychází z práce Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů [20].

#### **1. Předmět testu**

Stanovení toxického účinku látek obsažených ve vodném výluhu na klíčivost semen a růst kořene v počátečních stádiích vývoje rostliny.

#### **2. Seznam použitých zkratk a značek**

Vysvětlení použitých značek a zkratk je uvedeno v kapitole 2.3 tohoto metodického pokynu.

#### **3. Termíny a definice**

Vysvětlení použitých termínů a definic je uvedeno v kapitole 2.4 tohoto metodického pokynu.

#### **4. Testovací organismus a potřebné chemikálie**

##### **4.1 Testovací organismus**

Testovacím organismem jsou semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) s klíčivostí minimálně 90 %, střední velikosti (1,5 až 2,5 mm), okrově žlutá.

#### **4.2 Voda**

K přípravě ředící vody, zásobních roztoků a vodného výluhu se používá voda v souladu s požadavky uvedenými v kapitole 2.4 tohoto metodického pokynu.

#### **4.3 Chemikálie**

CaCl<sub>2</sub> (p.a.)

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (p.a.)

NaHCO<sub>3</sub> (p.a.)

KCl (p.a.)

#### **4.4 Ředící voda**

Směs zásobních roztoků a vody svým složením odpovídá požadavkům ČSN EN ISO 7346-2 [16] a ČSN EN ISO 6341 [14]. Postup pro přípravu zásobních roztoků je uveden v kapitole 3.3.1 tohoto metodického pokynu.

#### **4.5 Pomůcky a zařízení**

Petriho misky o průměru 120 až 140 mm, filtrační papír větší pórovitosti, pinzeta, pipety, odměrné baňky, milimetrové měřítko, nůžky, termostat pro teplotu 20 °C.

### **5. Podmínky testu**

Teplota: 20 ± 2 °C

Množství vodného výluhu (testovaného roztoku): 10 ml na každou Petriho misku

Počet testovacích jedinců: 30 semen na každé Petriho misce

Délka expozice: 72 hodin

Ostatní podmínky: bez osvětlení

### **6. Pracovní postup**

#### **6.1 Úvodní test**

Test se provádí s neředěným vodným výluhem (testovacím roztokem připraveným z vodného výluhu odpadu obohacením solemi – viz kapitola 3.3.1 tohoto metodického pokynu). Z filtračního papíru se vystříhnou kruhy podle velikosti dna použitých Petriho misek. Ty se vloží na dna Petriho misek a nasatí se 10 ml vodného výluhu nebo ředící vody (kontrola). Na navlhčené filtrační papíry se pinzetou rovnoměrně rozmístí po 30 semenech. Takto připravené Petriho misky se umístí do termostatu s teplotou 20 °C bez přístupu světla. Po 72 hodinách se změří a zaznamená délka všech kořenů semen testovaných ve výluhu i nasazených v kontrole.

## 6.2 Předběžný test

Test se provádí v širokém rozsahu koncentrací vodného výluhu (např. 1, 10, 100, 500 mg.l<sup>-1</sup> a neředěný výluh). K ředění vodného výluhu se použije ředící voda. Do misek se za podmínek odpovídajících úvodnímu testu nasazuje 30 semen.

## 6.3 Základní test

Na základě výsledku předběžného testu se připraví vhodná koncentrační řada vodného výluhu (5 či více koncentrací). Pro testování každé koncentrace a pro příslušnou kontrolu se použije 60 semen (ve dvou Petriho miskách). Pracovní postup je analogický s postupem pro úvodní test.

## 6.4 Ověřovací test

Tento test se provádí s neředěným vodným výluhem za podmínek stejných jako u úvodního testu. Do vodného výluhu a do kontroly se nasazuje 90 semen (ve třech Petriho miskách).

## 6.5 Vyhodnocení testů

Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu je průměrná délka kořene. Hodnota stanovená v neředěném vodném výluhu či testovaných koncentracích vodného výluhu se porovnává s kontrolou a vypočítává se procento inhibice (zkrácení) či stimulace (prodloužení kořene). V protokolu o testu se uvádí rovněž počet nevyklíčených semen. Do aritmetického průměru se tato semena započítávají jako semena s nulovou délkou kořene. Jestliže semeno vyklíčí, ale nevytvoří kořínek, započítává se tato hodnota do aritmetického průměru rovněž jako nulová. V testech s více než 30 semeny na testovanou koncentraci vodného výluhu a kontrolu, kdy se nasazují semena do více Petriho misek, nemá být variabilita výsledků v jednotlivých miskách u příslušného roztoku větší než 30 %.

Stanovení hodnoty IC 50 se provede pomocí probitové metody nebo vhodným vyhodnocovacím programem za použití výpočetní techniky.

## 6.6 Test klíčivosti a růstu kořene na standardu

Doporučuje se průběžně ověřovat správnost postupu a kvality semen pomocí testu provedeného na standardu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Testy se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy (hodnoty koncentrací standardu se uvádějí v mg.l<sup>-1</sup>). Podle dosavadních zkušeností se hodnoty IC 50 pohybují v rozmezích stanovených v níže uvedené tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2 Rozmezí 72 IC 50 (při expozici 72 hod.)**

Testovací organismus	Rozmezí hodnot 72 IC 50 (mg.l <sup>-1</sup> )
<i>Sinapis alba</i>	10 – 50

## 7. Platnost testu

Výsledky testů se považují za platné, jestliže jsou splněny následující požadavky:

- klíčivost semen v kontrole je nejméně 90 %,
- stanovená hodnota 72 IC 50 standardu dichromanu draselného (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) pro testovaná semena je v rozmezí uvedeném v kapitole 6.6 této přílohy.



**PŘÍLOHA č. 2 Parametry pro udržování a chov živorodky duhové (*Poecilia reticulata* Peters. – Teleostei, Poeciliidae) (informativní)**

K testům se používají ryby chované v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat. Živorodky se chovají v akváriích o objemu nad 10 litrů při teplotě vody 20 až 25 °C; teplota nesmí dlouhodobě poklesnout pod 16 °C. Voda v akváriích se mírně provzdušňuje. Samečci se zřetelně odlišují od samic. Oplozená samička je nápadná zvětšeným bříškem, na jehož bocích a na spodku se v blízkosti řitní ploutve nachází tmavě zbarvená skvrna březosti – zárodečná skvrna. Samičky rodí podle věku a zdravotního stavu 10 až 50 mlád'at. Doba březosti trvá v průměru čtyři týdny při teplotě vody 25 °C. Samička vypuzuje z těla jikry s úplně vyvinutými mlád'aty, která ihned po vypuštění z těla matky protrhnou blánu jikry, plavou a jsou schopna přijímat i větší potravu. Pro zdárný vývoj však potřebují i potravu rostlinnou. Plůdek je možno krmit jak živou potravou (nitěnky, perloočky), tak i vhodnou krmnou směsí. Potrava nesmí být jednotvárná, doporučuje se převaha živé potravy. Dospělé páry se chovají v oddělených nádržích. Vzhledem k tomu, že páření může nastat již u velmi mladých jedinců, je nutné oddělit samce od samic co nejdříve a ponechat obě pohlaví do doby řádného vzrůstu oddělené. Rybky pohlavně dospívají během tří až čtyř měsíců. Oplodněné samičky se značně zvětšeným bříškem a tmavou skvrnou březosti se oddělují od chovu a dávají se do tzv. porodnic (nádoby o objemu 1 až 5 litrů s možností úkrytů pro plůdek), po porodu se ihned samička od mlád'at oddělí a po uplynutí dvou až tří dnů se opět zařazuje do chovné nádrže. Chovné nádrže je nutno minimálně jedenkrát týdně zbavit usazenin.

V Praze dne 28. února 2007

Ing. Leoš **K ř e n e k**, v.r.  
ředitel odboru odpadů