

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**STRUPENOST IZCEDNE VODE PRED IN PO  
BIOLOŠKEM ČIŠČENJU**

DIPLOMSKO DELO

**Polonca ZEVNIK**

**Mentorica: doc. dr. Tatjana Tišler**

**Nova Gorica, 2009**

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Tatjani Tišler za strokovne napotke, posredovanje literature ter podporo pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala dr. Aniti Jemec in g. Emilu Meden za strokovno vodenje in praktične nasvete med laboratorijskim delom in izvedbi diplomskega dela.

Iskrena hvala tudi staršem in domačim, ki so mi omogočili študij, me potrpežljivo podpirali in verjeli vame.

## POVZETEK

Ohranjanje okolja je zelo pomembno in temelji na stalnem spremljanju trenutnega stanja okolja. V Sloveniji monitoring kakovosti iztokov iz industrijskih obratov in čistilnih naprav po zakonodaji temelji predvsem na fizikalno kemijskih analizah. Dejstvo pa je, da omenjene analize ne razkrivajo kompleksnih interakcij med spojinami, ki lahko spremenijo strupenost iztokov. Biotesti skupaj s fizikalno kemijskimi analizami dajo bolj celovit vpogled v delovanje preiskovanih snovi. Izcedne vode iz odlagališč odpadkov predstavljajo veliko tveganje onesnaženja okolja, zato je potrebno spremljati njihovo kakovost. Diplomsko delo obsega preiskavo strupenosti štirih vzorcev izcednih vod iz komunalnega odlagališča odpadkov v Sloveniji, ki so bili zajeti dvakrat, v različnem časovnem obdobju. Preiskava obsega nekatere fizikalno kemijske analize vzorcev in serijo bioloških testov strupenosti z organizmi iz različnih taksonomskih skupin. Akutna strupenost je bila preiskovana z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*, raki *Daphnia magna*, zarodki ter odraslimi zebričami *Danio rerio*. Kronična strupenost je bila preiskovana z raki *Daphnia magna* in zelenimi algami *Desmodesmus subspicatus*. Fizikalno kemijske analize so v vzorcih iztokov iz biološke čistilne naprave v primerjavi z vzorci vtoka na čistilno napravo pokazale bistveno znižanje nekaterih parametrov (KPK, BPK<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, TC, IC, DOC), kar je vplivalo tudi na strupenost vzorcev. Najbolj občutljiv testni sistem je bil sistem z *D. magna*. Seriji vzorcev sta se po strupenosti razlikovali. Najbolj strupen je bil vzorec prvega vzorčenja vtoka na biološko čistilno napravo (U1), saj so akutni testi strupenosti z *D. magna* pokazali vpliv na vitalne procese organizmov v koncentracijah pod 3,40 vol. %. Kronično strupenost za *D. magna* smo zasledili že pri koncentraciji 0,03 vol. %. Najmanj strupen je bil vzorec drugega vzorčenja iztoka iz biološke čistilne naprave (U4), s kronično strupenostjo za *D. magna* pri 3,10. vol %, in akutno strupenostjo pri 18,60 vol. %. Vtoki na čistilno napravo (U1, U3) se bil bolj strupeni od iztokov (U2, U4). Pri zelo nizkih koncentracijah izcedne vode smo opazili hormezo. Glede na slovensko zakonodajo, izcedne vode niso primerne za odvod neposredno v vode, lahko pa se odvajajo v javno kanalizacijo.

**KLJUČNE BESEDE:** izcedna voda, strupenost, odlagališče komunalnih odpadkov, test strupenosti

## SUMMARY

Preservation of environment is important task. It is based on permanent environmental monitoring, that is based mostly upon physicochemical analyses in Slovenia. The fact is that physicochemical analyses do not provide information about many-sided interactions between different compounds that have influence on toxicity. Bioassays together with physicochemical analyses are proper way to investigate the environmental samples. Landfilling in any waste management strategy can be a hazard for the environment and the potential landfill emissions have to be investigated. In this study toxicity of four landfill leachates, sampled twice at different times, from municipal solid waste landfill in Slovenia was characterized by some of physicochemical analyses and battery of standardized biotests. Several different organisms on different trophic levels of biological organization were applied in biotests ranging from bacteria to fish. Acute toxicity was tested by luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, freshwater crustaceans *Daphnia magna*, zebrafish eggs *Danio rerio* and freshwater fish *Danio rerio*. Chronic toxicity was tested by freshwater crustaceans *Daphnia magna* and green algae *Desmodesmus subspicatus*. Physicochemical parameters showed reduced values of

some parameters in outflow of biological wastewater treatment (COD, BOD<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, TC, IC, DOC). The most sensitive test system was system with *D. magna*. The most toxic sample was inflow on biological wastewater treatment plant from first sampling (U1), with acute toxicity to *D. magna* at 3,40 vol. %, and chronic toxicity to *D. magna* at 0,03 vol.%. The less toxic was wastewater treatment effluent from second sampling (U4) with acute toxicity to *D. magna* at 3,1 vol. %, and chronic toxicity to *D. magna* at 18,60 vol. %. Inflows (U1, U3) were more toxic than effluents (U2, U4) of wastewater treatment plant. At some very low concentrations of landfill leachate the hormesis was found. The limit points of some parameters quoted in the Slovenian legislation were exceeded in samples, and direct conduction of the examined leachate to waters is not permitted. Regarding the measured parameters, it is only permitted to conduct the leachate to public sewage system.

**KEYWORDS:** leachate, toxicity, municipal waste landfill, bioassay

## RAZLAGA OSNOVNIH POJMOV IN KRATIC

Pojmi so povzeti in razloženi po Rand (1995) in Eaton in sod. (2005)

**BIOTEST** -preskus strupenosti preiskovane snovi ali mešanice snovi z živimi organizmi.

**DEFINITIVNI TEST** -test za natančno določanje IC<sub>x</sub> ali EC<sub>x</sub> vrednosti, sledi preliminarnemu testu.

**EC** (effective concentration) -koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči specifične odgovore pri določenem odstotku testnih organizmov (npr. 48 h EC<sub>50</sub> je koncentracija, ki v 48 urah povzroči merjen odziv pri 50% izpostavljenih organizmov).

**IC** (inhibition concentration) -koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči določen odstotek specifičnih odgovorov organizmov (npr. zaviranje encimske aktivnosti), glede na kontrolo (npr. IC<sub>25</sub> je koncentracija, ki povzroči 25% zmanjšanje rasti alg glede na kontrolo).

**IZPOSTAVLJENOST** -kontakt med preiskovano snovjo, medijem in organizmom.

**KONTROLA** -postopek v testu strupenosti s testnimi organizmi, pri katerem so vsi (biotski in abiotski) izpostavitveni pogoji enaki, vendar brez dodane preiskovane snovi. Kontrola nam služi za primerjavo odzivov organizmov v prisotnosti oziroma v odsotnosti preiskovane snovi.

**KRONIČNI TEST STRUPENOSTI** -test strupenosti, v katerem so vključeni dolgotrajni dražljaji na organizem, ki lahko trajajo več tednov, odvisno od reprodukcijskega cikla preiskovanega organizma. S kroničnim testom lahko definiramo izpostavljenost organizma ali njegov odziv na izpostavljenost.

**LC** (lethal concentration) -koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči smrtnost organizmov v izpostavljeni populaciji (npr. 48 h LC<sub>50</sub> je koncentracija, ki povzroči smrt 50% izpostavljenih organizmov v 48 urah).

**LOEC** (lowest observed effect concentration) -najnižja koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči statistično značilno spremembo merjenega odziva v organizmu v primerjavi s kontrolo.

**NOEC** (no observed effect concentration) -najvišja koncentracija snovi, ki v določenem času ne povzroči statistično značilne spremembe merjenega odziva v organizmu v primerjavi s kontrolo.

**PRELIMINARNI TEST** -test za ugotavljanje približne strupenosti preiskovane snovi. Je prva stopnja v izvedbi testa strupenosti, kjer ugotavljamo območje koncentracij z 0 in 100 % odzivom organizmov. V razponu delovanja preiskovane snovi kasneje izvajamo definitivne teste.

**RAZREDČEVALNA VODA** -vodna raztopina, ki jo uporabljamo za redčenje preiskovane snovi, z namenom pripraviti različne koncentracije preiskovane snovi ter za kontrolo. Njena sestava je natančno določena v ISO standardu (za vodne bolhe: ISO 6341, ISO 10706)

**REFERENČNA SPOJINA** -kemikalija, ki se uporablja v testih strupenosti pri pozitivni kontroli in povzroči natančno poznano strupenost.

**STRUPENOST (TOKSIČNOST)** -lastnost snovi, da v stiku z zunanjo površino ali notranjostjo organizma povzroči kvaren oz. neugoden učinek (lokalne ali sistemske poškodbe). Strupenost je rezultat doze oz. izpostavljenosti neki koncentraciji v določenem času, ki je spremenljiva s temperaturo, kemijsko obliko in dostopnostjo.

# KAZALO VSEBINE

<b>RAZLAGA OSNOVNIH POJMOV IN KRATIC</b> .....	<b>III</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE.....	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
<b>2 TEORETIČNE OSNOVE</b> .....	<b>3</b>
2.1 ODPADKI V SLOVENIJI .....	3
2.1.1 Izcedne vode .....	4
2.1.1.1 Kemijska sestava izcednih vod.....	5
2.1.2 Zakonski okviri na področju odpadkov.....	7
2.2 FIZIKALNO KEMIJSKE ANALIZE .....	8
2.3 EKOTOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE.....	9
2.3.1 Prednosti bioloških študij pred fizikalno- kemijskimi.....	10
2.3.2 Vrste testov strupenosti in učinki preiskovanih snovi.....	11
2.3.3 Testni organizem in merjeni biomarkerji.....	12
2.3.4 Stopnje v izvedbi testa strupenosti.....	13
2.3.4.1 Preliminarni test .....	13
2.3.4.2 Definitivni test.....	13
2.3.5 Interpretacija biološkega odziva v testih strupenosti .....	13
2.4 ORGANIZMI IN METODE V TESTIH STRUPENOSTI.....	14
2.4.1 Test strupenosti z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> (ISO 11348-2: 2007).....	14
2.4.2 Test strupenosti z algami ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ) (ISO 8692: 2004) .....	15
2.4.3 Test strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> ) (ISO 10706: 2000, ISO 6341: 1996).....	16
2.4.4 Testa strupenosti z zebricami ( <i>Danio rerio</i> ) (ISO 15088: 2007, ISO 7346-1: 1996) .....	17
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>18</b>
3.1 PREISKOVANA SNOV- IZCEDNA VODA .....	18
3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE ANALIZE .....	19
3.2.1 Merjenje temperature in raztopljenega kisika .....	20
3.2.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK) .....	20
3.2.3 Biokemijska potreba po kisiku (BPK).....	20
3.2.4 Celotni organski ogljik (TOC).....	21
3.2.5 Spektrofotometrično določanje amonijevega dušika ( $\text{NH}_4^+$ -N), nitritnega dušika ( $\text{NO}_2^-$ -N) in nitratnega dušika ( $\text{NO}_3^-$ -N).....	21
3.2.6 Določanje Kjeldahlovega dušika.....	21
3.2.7 Določanje klorida.....	22
3.2.8 Določanje ortofosfata.....	22
3.2.9 Prikaz rezultatov.....	22
3.3 TESTI STRUPENOSTI .....	23
3.3.1 Test akutne strupenosti z bakterijo ( <i>Vibrio fischeri</i> ).....	23
3.3.1.1 Potek testa .....	23
3.3.2 Test kronične strupenosti z algami ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ) .....	25
3.3.2.1 Potek testa .....	25
3.3.3 Test akutne strupenosti z zarodki rib zebrič ( <i>Danio rerio</i> ).....	26
3.3.3.1 Potek testa akutne strupenosti z zarodki.....	26
3.3.4 Test akutne strupenosti z odraslimi ribami zebričami ( <i>Danio rerio</i> ).....	27
3.3.4.1 Aklimacija zebrič .....	27
3.3.4.2 Potek testa akutne strupenosti .....	28
3.3.5 Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> ).....	28
3.3.5.1 Gojenje vodnih bolh .....	28
3.3.5.2 Potek akutnega testa .....	28
3.3.6 Test kronične strupenosti.....	29
3.3.6.1 Potek testa .....	30
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>30</b>

4.1	FIZIKALNO KEMIJSKE ANALIZE .....	30
4.2	TESTI AKUTNE STRUPENOSTI .....	32
4.2.1	Test akutne strupenosti z bakterijami ( <i>Vibrio fischeri</i> ).....	32
4.2.2	Test akutne strupenosti z zarodki rib zebrič ( <i>Danio rerio</i> ).....	32
4.2.3	Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> ).....	33
4.2.4	Test akutne strupenosti z odraslimi zebričami ( <i>Danio rerio</i> ) .....	33
4.2.5	Primerjava občutljivosti testnih sistemov .....	33
4.2.6	Učinek čiščenja na biološki čistilni napravi .....	35
4.3	TESTI KRONIČNE STRUPENOSTI .....	35
4.3.1	Test kronične strupenosti z zelenimi algami ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ) .....	35
4.3.2	Test kronične strupenosti z vodnimi bolhami.....	36
4.3.2.1	Hormeza .....	37
5	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>37</b>
6	<b>VIRI .....</b>	<b>38</b>

## 1 UVOD

Upravljanje z okoljem je zelo zahtevna naloga in zahteva preišljena dejanja. Načelo trajnostnega razvoja in trajnostnega ravnanja z okoljem je ključnega pomena. Zavedati se je potrebno, da okolje v katerem živimo in delujemo, ni naša last, ampak z njim zgolj upravljamo. Dobili smo ga v »uporabo« od naših prednikov in ga moramo pustiti zanamcem v čim bolj neokrnjeni obliki.

V razvitih državah z rastjo bruto domačega proizvoda narašča tudi nastajanje vseh vrst odpadkov. Posledično narašča tudi odlaganje odpadkov na odlagališča, ki je najpogostejši postopek odstranjevanja odpadkov v Sloveniji (Kazalci okolja, 2005). Posledica odlagališč so emisije niza stranskih produktov; plini, drobni delci, izcedne vode. (Koshy in sod., 2008). Odpadki predstavljajo veliko breme okolju, še posebno če se ravna z njimi neprimerno. Posebna skrb je potrebna pri ravnanju z vodami, ki se izcejajo iz območja, kjer se odpadki odlagajo, tako da se zagotovi čim manjši negativni vpliv na okolje. Izcedne vode so spremljevalec skoraj vsakršnega odlagališča odpadkov, pa naj bo to deponija v obratovanju ali pa zaprta deponija. Izcedne vode so vse tekočine, ki se izcejajo iz odloženih odpadkov ali pronicajo skozi telo odlagališča in se odvajajo ali zadržujejo znotraj telesa odlagališča (Uredba o odlaganju odpadkov na odlagališčih Ur.l. RS št. 32, 2006). Pod vplivom različnih vremenskih razmer in nalaganja odloženih odpadkov na deponiji, se izcejajo vode. Le te pa lahko predstavljajo pereč problem v okolju, saj z izlivanjem v vodno okolje ali na zemljino, ogrožajo tako vodne, podtalne, kot tudi kopenske dele okolja, ter imajo potencialen vpliv na žive organizme. Problem predstavlja tudi potencialno onesnaženje podtalnice, ki je v Sloveniji glavni vir pitne vode, in posledično je ogroženo tudi zdravje ljudi (Kovačič V.A. in sod., 2002). Posledica onesnaženih področij je lahko ekotoksikološki učinek, ki se lahko pojavi na vseh nivojih biološke organizacije, npr na nivoju posameznih organizmov do celotnih ekosistemov.

Za obvladovanje onesnaženja okolja so v okolju potrebni ukrepi, le te pa lahko določamo z ustreznim spremljanjem stanja v okolju. Pred sanacijskimi ukrepi so pri ravnanju z izcednimi vodami pomembni preventivni ukrepi na področju varstva okolja, naravnih virov, in naravnih vrednot, ki zahtevajo reden monitoring, ta pa zajema tudi analize izcednih voda. Le te je potrebno preiskovati z namenom, da se oceni kakovostno stanje in vplive posameznih deponij na okolje. Določanje kvalitete oziroma ocena strupenosti je osnovni ukrep, s katerim dobimo strokovne podatke za načrtno upravljanje z deponijami in izcednimi vodami. Zakonsko predpisano preiskovanje izcednih vod zahteva spremljanje fizikalno kemijskih parametrov ter določanje strupenosti za vodne bolhe. Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov (Ur.l. RS št. 72, 2008) narekuje določila glede izcednih voda, in določa mejne vrednosti nekaterih parametrov voda, ki se izcejajo iz deponije in odteka v vodotoke. Taka voda je lahko izredno strupena za različne organizme. Izpust v okolje pa predstavlja velik, predvsem negativen vpliv na organizme, zato je potrebno izcedne vode voditi na čistilno napravo (ČN) (Isidori M. in sod.,2003).

Različne vrste iztokov kot npr. iz industrijskih obratov, komunalnih čistilnih naprav, deponij preiskujemo z različnimi biološkimi in fizikalno kemijskimi metodami. Za ugotavljanje strupenosti iztokov uporabljamo poleg fizikalno kemijskih analiz tudi teste strupenosti z vodnimi organizmi iz različnih taksonomskih skupin (trofičnih nivojev) in s tem pridobimo celovitejši pregled vpliva na okolje oziroma organizme. Z različnimi testi strupenosti določamo akutno in kronično strupenost.



## **1.1 Cilji diplomske naloge**

Diplomska naloga zajema oceno akutne in kronične strupenosti različnih vzorcev izcednih vod iz ene od slovenskih komunalnih deponij, pred in po biološkem čiščenju. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti škodljive vplive izcednih vod na delovanje organizmov. V študijo so bili vključeni avtotrofni in heterotrofni organizmi iz različnih taksonomskih skupin in različnih trofičnih nivojev, pri katerih smo opazovali odziv glede na koncentracijo vzorca izcedne vode. S testi strupenosti smo pokazali občutljivost posameznih testnih organizmov na analizirane vzorce izcednih vod. Vzorci so bili ovrednoteni tudi z določanjem kemijskih značilnosti izcednih vod (kemijska in biološka potreba po kisiku, pH, koncentracije fosfatnih, amonijevih, nitratnih, nitritnih in kloridnih ionov, celokupni ogljik).

Namen diplomske naloge je bil tudi ugotoviti učinkovitost biološkega čiščenja izcednih vod ter ovrednotiti primernost očiščenih vzorcev izcednih vod za izpust neposredno v tla ali v vode glede na slovensko zakonodajo.

## **1.2 Hipoteze**

Pričakovali smo, da je vtok izcedne vode na čistilno napravo bolj strupen od iztoka. Biološki način čiščenja odpadnih voda temelji na dejavnosti mikroorganizmov, ki razgrajujejo razgradljive organske snovi v raztopljenem in koloidnem stanju. Z biološkimi metodami čiščenja je mogoče iz odpadne vode odstraniti določen delež organskih snov, torej se strupenost po biološkem čiščenju predvidoma zmanjša.

Pri določenih (nizkih) koncentracijah izcedne vode vtoka na čistilno napravo smo pričakovali, da bo odziv organizmov pozitiven; rast in razmnoževanje organizmov bo večja glede na kontrolo (pojav hormoneze). Glede na dejstvo, da je deponija komunalna, smo predvidevali, da je precejšnji delež odpadkov gospodinjanskega izvora, torej so organski odpadki. Izcedna voda je predvidoma bogata z organskimi snovmi (hranili), te pa v povišanih koncentracijah do določene meje ugodno vplivajo na rast, razvoj in razmnoževanje organizmov. Iz izkušenj tudi vemo, da majhen stres pozitivno vpliva na organizme in se vitalni procesi pospešijo.

Predvidevali smo, da iztok izcedne vode iz čistilne naprave ustreza določilom uredbe o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov (Ur.l. RS št. 72, 2008).

Predvidevali smo, da se bo za najbolj občutljivejšega izkazal testni sistem kronične izpostavitve z vodnimi bolhami.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Odpadki v Sloveniji

Z rastjo bruto domačega proizvoda, z večanjem potrošništva in z industrializacijo, z rabo vode hkrati narašča tudi nastajanje vseh vrst odpadkov. Odpadek je po definiciji Zakona o varstvu okolja (Ur.l. RS št. 39, 2006) določena snov ali predmet, ko ga njegov povzročitelj ali druga oseba, ki ima snov ali predmet v posesti, zavrže, namerava ali mora zavreči. Po ekonomski definiciji odpadek lahko definiramo kot tisti del proizvodnih in potrošniških ostankov, ki nima tržne vrednosti ali je njegova vrednost manjša od stroškov za ponovno uporabo ali predelavo, torej za pridobitev surovin za nove proizvode in potrošniške cikle.

Predpisi na področju ravnanja z odpadki so večinoma sprejeti na osnovi Zakona o varstvu okolja (Ur.l. RS št. 39, 2006). Okvirni oziroma osnovni predpis, ki ureja področje odpadkov, je Pravilnik o ravnanju z odpadki. Tega dopolnjujejo tri hčerinske skupine predpisov. V prvo skupino sodijo predpisi, ki obravnavajo posamezne vrste odpadkov (npr.: ravnanje z odpadnimi olji, embalažo in odpadno embalažo, baterijami) in v drugo skupino sodijo predpisi, ki obravnavajo objekte in naprave za ravnanje z odpadki (odlaganje, sežiganje). Tretjo skupino predpisov oblikujejo predpisi o čezmejnem prehodu odpadkov.

Poznamo nevarne in nenevarne odpadke; te pa delimo na komunalne (gospodinjske), gradbene, ostale nekomunalne odpadke, odpadno embalažo, odpadke iz obdelave lesa in odpadke iz obdelave odpadne vode. Komunalni odpadki so odpadki iz gospodinjstev ter njim po naravi in sestavi podobni. Do nedavnega smo jih odlagali v skupen zabojnik in javna komunalna podjetja so jih vozila na odlagališča nenevarnih odpadkov. S tem smo obremenjevali zrak, vodo in tla, sproščale so se zdravju škodljive snovi. Največja pomanjkljivost takega ravnanja pa je bila poraba naravnih virov. Večino teh odpadkov lahko vrnemo v proizvodni proces kot vhodno surovino, vendar morajo biti v ta namen zbrani ločeno. Po podatkih Agencije Republike Slovenije za okolje se v Sloveniji proizvede okrog 400 kg komunalnih odpadkov na prebivalca letno, ali nekaj več kot en kilogram na dan. Odlaganje je z vidika okolja najmanj zaželen način ravnanja z odpadki, saj zanj pomeni obremenitev in izgubo naravnih virov. Zato je dolgoročni cilj Evropske Unije postati družba recikliranja in odpadke koristiti kot vir. Cilj je zmanjševanje nastajanja odpadkov, povečevanje ponovne rabe in predelave odpadkov (koncept 3R; angl. Reduce, Reuse, Recycle). Potrebno je zagotoviti nadzor nad odpadki in primerno ravnanje z njimi. Kot metoda odstranjevanja odpadkov se v Sloveniji najpogosteje odpadke odlaga na odlagališča odpadkov (Kazalci okolja, 2005). Okoli 80% komunalnih odpadkov odložimo, to pa ima za posledico problematiko v okolju, ki zadeva ravnanje z odpadki ter upravljanje z deponijami. Področje ravnanja z odpadki je uvrščeno med temeljne okoljske probleme in reševanje te problematike ima prednostno nalogo.

Pomembno je pravilno načrtovati, konstruirati in upravljati odlagališča odpadkov. Za učinkovito gospodarjenje z deponijami na način, ki bi za okolje predstavljal čim manjši vpliv, je potreben monitoring (spremljanje) kakovosti izcednih vod.



**Slika 1:** Komunalna odlagališča odpadkov v Sloveniji (vir: Atlas okolja, 2009)

Legenda:

- ★ ...se zapira
- ★ ...se prilagaja
- ★ ...novo

### 2.1.1 Izcedne vode

Poznamo različne vrste odpadnih voda, ki so vir onesnaževanja okolja; domače (komunalne) odpadne vode, (industrijske) tehnološke odpadne vode, kmetijske odpadne vode in ostale odpadne vode. Za odpadne vode je značilno, da jih je potrebno do neke mere očistiti preden se jih spušča v okolje, navadno v površinske vode. Ena od vrst odpadnih voda so tudi izcedne vode iz odlagališč odpadkov. Izcedne vode so v Uredbi o odlaganju odpadkov na odlagališčih (Ur.l. RS št. 32, 2006) definirane kot vse tekočine, ki se izcejajo iz odloženih odpadkov ali pronicajo skozi telo odlagališča in se odvajajo ali zadržujejo znotraj telesa odlagališča.

Ko so odpadki na svojem mestu v deponiji, problem odstranjevanja odpadkov še zdaleč ni rešen. Na deponijah se pojavljajo izcedne vode, ki nastajajo pod vplivom različnih vremenskih sprememb (infiltracija, precipitacija, kondenzacija, transpiracija) in nalaganje odpadkov. Ko se pojavi nasičenje, pride do odpadne, izcedne vode. Kvantiteta izcedne vode se sezonsko spreminja in je predvsem odvisna od lokalnih vremenskih pogojev (vlaga, padavine); kvaliteta pa je odvisna od vrste odpadkov (vrsta odlagališča), geoloških značilnosti tal, nagnjenosti tal (konstrukcija odlagališča) ter od starosti odlagališča. Tok izcedne vode je močno povezan s precipitacijo (to je prehajanje vode iz atmosfere v tla), s površinskim odtokom in z infiltracijo (to je ponikanje oziroma prehajanje vode iz hidrosfere v litosfero) (Renou in sod, 2008). Izcedne vode so pomembni vir točkovnega onesnaženja.

Verjetnost nenadzorovanega onesnaževanja je na novejših odlagališčih odpadkov zmanjšana z uporabo vodoodpornih materialov na dnu odlagališča, ki preprečujejo nenadzorovan iztok odpadne vode in z uporabi drenažnih cevi, v katerih se zbira izcedna voda preden se izpusti v okolje. Pred izpustom v okolje je potrebno čiščenje izcedne vode. Moderna odlagališča so zgrajena tako, da v čim večji meri zadržijo emisije, vendar je znano, da na vsakem odlagališču prihaja do emisij plinov, praha,

izcednih vod in neprijetnega vonja, in s tem do okoljskega onesnaževanja (Koshy in sod. 2008).

Izcedne vode so kompleksna mešanica mnogih kemijskih spojin (organskih delcev, anorganskih ionov, vključno z ioni kovin), ki izvirajo iz različnih produktov (Chian in sod., 1976). Vsebujejo poznane kemikalije in tudi take kemikalije, za katere niti ne vemo, da so prisotne. Te kemikalije lahko pridejo v okolje. Govorimo o pojavu emisijskega onesnaženja. Za mlajša odlagališča odpadkov je značilna acetogena faza, kjer prevladuje anaerobna fermentacija organskih snovi, katere glavni produkt so hlapne organske kisline (95%). S starostjo odlagališča se pojavi metanogena faza, kjer metanogeni organizmi hlapne organske kisline pretvarjajo v bioplin (metan in ogljikov dioksid) (Renou in sod, 2008). Onesnaževala v izcednih vodah je zelo težko prepoznati ravno zaradi velikega števila spojin, ki tvorijo izcedno vodo in negotovosti glede biodostopnosti teh spojin. Ksenobiotiki so organske kemikalije ne naravnega, temveč antropogenega izvora in lahko pridejo z izcednimi vodami v okolje. Ksenobiotik je organizmu tuja snov, ki pa ni nujno toksična.

Pomembno je, da se zavedamo da so v okolju prisotne tudi snovi, ki delujejo brez praga strupenosti, in imajo stohastične učinke (npr. rak). Pomembna je kumulativna doza, skozi daljše obdobje življenja. Pri takih snoveh je težko oceniti potencialno strupenost. Koncentracije, ki npr. v nekaj dneh ne delujejo toksično, imajo lahko toksično delovanje ob izpostavitvi v daljšem časovnem obdobju. Pri takih snoveh sta v prehranjevalnem spletu pomembna pojava bioakumulacija in biomagnifikacija, ki strupenost v višjih nivojih prehranjevalnega spleta še povečujeta.

Monitoring kakovosti izcednih vod lahko poteka s pomočjo kemijskih analiz in/ali bioloških študij.

### 2.1.1.1 Kemijska sestava izcednih vod

Zaradi velike nehomogenosti odpadkov je v izcednih vodah prisotna kompleksna kemijska sestava (Chian in sod, 1976). Onesnaževala, ki jih najdemo v izcednih vodah lahko razdelimo v štiri glavne skupine (Williams, 2005):

- raztopljene organske snovi (izražene kot raztopljeni organski ogljik (DOC) in celotni organski ogljik (TOC) in lahkohlapne maščobne kisline;
- anorganske mikrokomponente, kot so kalcij ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnezij ( $\text{Mg}^{2+}$ ), natrij ( $\text{Na}^+$ ), kalij ( $\text{K}^+$ ), amonij ( $\text{NH}_4^+$ ), železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ), klorid ( $\text{Cl}^-$ ), sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) in hidrogen karbonat ( $\text{HCO}_3^-$ );
- težke kovine kot so kadmij (Cd), krom (Cr), baker (Cu), nikelj (Ni), cink (Zn) in svinec (Pb);
- organsko nerazgradljive snovi kot so aromatski ogljikovodiki, pesticidi, klorirane alifatske spojine.

#### **Organsko onesnaženje**

Organsko onesnaženje se izraža kot KPK,  $\text{BPK}_5$ , TOC in DOC. Raztopljeni organski ogljik (DOC) lahko onesnaži površinske in podtalne vode ter vpliva na prenos drugih vrst onesnaženja. Prispeva k redoks potencialu, tvori komplekse s težkimi kovinami kot so Cd, Zn, Ni in ima sposobnost povezovanja s hidrofobnimi organskimi kontaminanti. Raztopljeni organski ogljik sestavljajo visokomolekularne spojine s slabo

razgradljivostjo ( $\approx 33\%$ ) in spojine podobne huminom ( $\approx 60\%$ ) ter preostanek. Struktura huminov pa je sledeča: 60% fulvne kisline, 10% huminske kisline in 30% preostanka (hidrofilna frakcija). Vse tri frakcije vsebujejo veliko število karboksilnih skupin in s tem velik potencial za tvorbo kompleksov s težkimi kovinami in hidrofobnimi organskimi snovmi (Črnica Zajc, 2003).

### **Dušik in njegove oblike**

Amonij predstavlja največji delež topnega dušika v izcedni vodi, ki nastaja pri biorazgradnji. Kadar je amonij v izcedni vodi prisoten v večjih koncentracijah je oteženo konvencionalno čiščenje z biološko čistilno napravo. Dušik v nitritni obliki se v anaerobnih pogojih porablja, zato je prisoten v nizkih koncentracijah. Nitratni ioni pa so precej mobilni (Črnica Zajc, 2003).

### **Fosforjeve spojine**

Vključene so v številne fizikalne, kemijske in mikrobiološke transformacije. Topnost je odvisna od pH in alkalitete. Fosfati so prisotni v nizkih koncentracijah (Črnica Zajc, 2003).

### **Kovine**

Kovine, ki se pojavljajo v zaznavnih koncentracijah na večini komunalnih deponij so predvsem Al, As, Ba, Cu, Cd, Co, Cr, Fe, Zn, Ni, Ag, Pb in Hg. Porazdelitev težkih kovin med trdno in tekočo fazo ter hitrost zapuščanja deponije sta določeni s procesi, kot so raztapljanje, obarjanje, sorpcija, ionska izmenjava, kompleksiranje in redčenje. Na njihovo mobilnost vplivajo pH, redoks potencial, aktivnosti mikroorganizmov in struktura odpadkov. Tvorba kompleksov njihovo koncentracijo v vodi povečuje, medtem ko jo sorpcija in obarjanje znižujeta (Črnica Zajc, 2003).

### **Kationi**

Najpogostejši kationi v izcednih vodah so  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  in  $\text{Ca}^{2+}$ . Ti v odpadkih in sedimentih tvorijo komplekse (Črnica Zajc, 2003).

### **Anioni**

Anioni, kot so  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$  in  $\text{HCO}_3^-$  se le delno preoblikujejo. Sulfat se desorbira zaradi naraščanja pH in manjše sposobnosti ionske izmenjave. Po desorpciji pa se reducira in obori. Sulfid in karbonat se vežeta na kovine ali izhajata kot plina (Črnica Zajc, 2003).

### **Pesticidi in klorirani ogljikovodiki**

Največ se izločajo v izcedne vode s sorpcijo, mikrobiološko razgradnjo, hidrolizo, oksidacijo in redčenjem. Hitrost potovanja je odvisna od količine organskega onesnaženja v odpadkih in vodotopnosti same spojine (Črnica Zajc, 2003).

### **Specifične organske snovi (aromatski ogljikovodiki, fenoli, klorirane alifatske spojine)**

Večinoma lahko potujejo skupaj z izcedno vodo ali sodelujejo v mikrobioloških procesih, posebno pri prehodu skozi anaerobno območje. Navadno so prisotne le v sledovih (Črnica Zajc, 2003).

## 2.1.2 Zakonski okvir na področju odpadkov

Ustava Republike Slovenije pravi, da ima vsakdo v skladu z zakonom pravico do zdravega življenjskega okolja. Država skrbi za zdravo življenjsko okolje in v ta namen določa pogoje in načine za opravljanje gospodarskih in drugih dejavnosti. V veljavi sta Pravilnik o ravnanju z odpadki (Ur.l. RS št. 34, 2008) in Uredba o odlaganju odpadkov na odlagališčih (Ur.l. RS št. 32, 2006). Na podlagi Zakona o varstvu okolja iz leta 1993, ki je bil nato večkrat spremenjen, je vlada Republike Slovenije leta 2000 sprejela Uredbo o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov. Omenjena uredba je bila dvakrat spremenjena; leta 2004 in nato še v letu 2008.

Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov (Ur.l. RS št. 72, 2008) določa (a) mejne vrednosti parametrov izcedne vode, ki se odvaja neposredno ali posredno v vode ali javno kanalizacijo; (b) ukrepe za zmanjševanje obremenjevanja voda, in (c) posebne zahteve za monitoring izcednih vod. Mejne vrednosti parametrov izcedne vode, ki se odvaja v okolje so povzete v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Mejne vrednosti parametrov izcedne vode iz odlagališč za inertne, nenevarne in nevarne odpadke (Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov Ur.l. RS št. 72, 2008)

Parameter odpadne vode	Izraž en kot	enota	Odvajanje neposredno in posredno v vode (Ur.l. RS št. 72, 2008)	Odvajanje v javno kanalizacijo (Ur.l. RS št. 72, 2008)
temperatura		°C	30	40
pH vrednost			6,5 – 9,0	6,5 – 9,5
Neraztopljene snovi		mg/l	60	<sup>(a)</sup>
Usedljive snovi		ml/l	0,5	10
Biološka razgradljivost		%	-	50 <sup>(b)</sup>
Strupenost za vodne bolhe	S <sub>D</sub>		4	-
Celotni krom *	Cr	mg/l	0,5	0,5
Baker *	Cu	mg/l	0,5	0,5
Nikelj *	Ni	mg/l	0,5	0,5
Svinec *	Pb	mg/l	0,5	0,5
Živo srebro *	Hg	mg/l	0,01	0,01
Kadmij *	Cd	mg/l	0,1	0,1
Cink*	Zn	mg/l	2,0	2,0
Klorid	Cl	mg/l	(c)	-
Amonijev dušik *	N	mg/l	50	(d)
Nitratni dušik *	N	mg/l	(e)	-
Sulfid	S	mg/l	0,5	2,0
Celotni dušik	N	mg/l	(h)	-
Celotni fosfor	P	mg/l	2,0 ; 1,0 (i)	-
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	O <sub>2</sub>	mg/l	200 ; 300 (f)	-
Biokemijska potreba po kisiku (BPK5)	O <sub>2</sub>	mg/l	20 ; 30 (f)	-
Celotni ogljikovodiki (mineralna olja) *		mg/l	10	20
Lahkohlapni aromatski ogljikovodiki * (BTX) (g)		mg/l	0,1	0,5
Adsorbiljivi organski halogeni (AOX) (g)	Cl	mg/l	0,5	-

Legenda:

Oznaka \* označuje nevarno snov, druge oznake v preglednici pa pomenijo naslednje:

- ni podatka

$S_D$  – faktor razredčenja, ki ga izračunamo ( $100/24h EC_{50}$ ).

(a) mejna koncentracija neraztopljenih snovi v izcedni vodi se določi v okoljevarstvenem dovoljenju na podlagi mnenja upravljavca javne kanalizacije in komunalne ali skupne čistilne naprave;

(b) mejna vrednost za biološko razgradljivost se uporablja za izcedne vode, katerih parameter KPK presega vrednost 300 mg/l, lahko pa se določi nižja stopnja biološke razgradljivosti na način, ki je za biološko razgradljivost pri odvajanju odpadne vode v javno kanalizacijo določen v predpisu, ki ureja emisijo snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo;

(c) mejna koncentracija kloridov v izcedni vodi je določena posredno s strupenostjo za vodne bolhe;

(d) mejna vrednost amonijevega dušika za izcedno vodo, ki se odvaja v kanalizacijo s komunalno ali skupno čistilno napravo z zmogljivostjo manjšo od 2.000 PE, je 100 mg/l, za to, ki se odvaja v kanalizacijo s komunalno ali skupno čistilno napravo z zmogljivostjo enako ali večjo od 2.000 PE, je mejna vrednost 200 mg/l, sicer pa se lahko določi višja mejna vrednost na način, ki je za amonijev dušik pri odvajanju odpadne vode v javno kanalizacijo določen v predpisu, ki ureja emisijo snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo;

(e) mejna vrednost nitratnega dušika se izračuna kot mejna vrednost za neposredno odvajanje industrijske odpadne vode v skladu s predpisom, ki ureja emisijo snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo;

(f) velja za obstoječe zaprto odlagališče in za obstoječe obratujoče odlagališče ali obstoječe odlagališče v zapiranju ter za ta obstoječa odlagališča, ko bodo zaprta. Velja tudi za obstoječo zaprto napravo za ravnanje z rudarskimi odpadki in za obstoječo obratujočo napravo ali obstoječo napravo v zapiranju ter za te obstoječe naprave za ravnanje z rudarskimi odpadki, ko bodo zaprte;

(g) lahko-hlapni aromatski ogljikovodiki (BTX) so vsota benzena, toluena, etilbenzena in ksilena, pri čemer se za vsako posamezno spojino posebej izvajajo meritve in določajo letne količine nevarne snovi. Pri ksilenu se upošteva orto, meta in para izomere;

(h) mejna vrednost se določi kot vsota mejne vrednosti amonijevega dušika in mejne vrednosti amonijevega dušika, izražene kot N;

(i) se uporablja na občutljivih območjih, določenih v skladu s predpisom, ki ureja emisijo snovi pri odvajanju odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav.

## 2.2 Fizikalno kemijske analize

Najpogosteje se kakovost izcednih voda določa s fizikalno kemijskimi analizami. Z njimi ugotavljamo npr. vrednost pH, barvo, kemijsko potrebo po kisiku (KPK), biokemijsko potrebo po kisiku (BPK), celotni organski ogljik (TOC), fosforjeve spojine, dušikove spojine, itd. Z nespecifičnimi parametri za vrednotenje onesnaženja (KPK in BPK) ovrednotimo celotno organsko onesnaženje.

## 2.3 Ekotoksikološke študije

Ekotoksikologija je veda, ki se ukvarja s toksičnimi učinki fizikalnih in/ali kemijskih onesnaževal na okolje (Fendt, 2003). Za snov, ki je na določeni lokaciji sporna, oziroma želimo preveriti njeno spornost v smislu kvarnega učinka na organizme, poskušamo razložiti vse postopke od vnosa do njene končne usode v ekosistemu. Celostni pristop dosežemo s fizikalno kemijsko identifikacijo onesnaževal prisotnih v vzorcih, študijo procesov prenosa onesnaževal v ekosistemu in s testom strupenosti o možnih učinkih onesnaževal na organizme (Eaton in sod., 2005). Razumevanje vpliva onesnaženja na nek ekosistem lahko torej dosežemo le z interdisciplinarnim pristopom, tako da sodelujejo toksikologija, aplikativna ekologija in kemija okolja (Fendt, 2003). Namen ekotoksikoloških študij je pridobiti podatke, ki so nam v pomoč pri oceni strupenosti preiskovanih snovi, določanju mejnih vrednosti za kemikalije v iztokih odpadnih voda, oceni ustreznosti iztokov odpadnih voda glede na predpise, spremljanju učinkovitosti očiščenja okolja, sprejemanju odločitev v okolju, ocenjevanju tveganja, obdavčitvi onesnaževalcev, itd.

Začetki toksikologije segajo v 16. stoletje. Iz tistega časa je znan Paracelsusov izrek »Vse snovi so strupene, le njihova doza določa strupenost.« v 18. stoletju je Španec M.J.B. Orfila izdal knjigo, v kateri je posvečal pozornost škodljivim učinkom kemikalij na organizme. Knjiga je načela mnogo vprašanj, ki so predmet raziskav še dandanes, kot so simptomi zastrupitev, mehanizmi izločanja kemikalij, zdravljenje s protistrupi, itd. Izraz ekotoksikologija je prvi definiral Truhaut v 20. stoletju, kot znanost o strupenih učinkih, ki jih povzročajo naravna in sintetična onesnaževala na ekosistem. Testi strupenosti so dobili veljavo sredi 20. stoletja, ko se je povečala zaskrbljenost glede škodljivih učinkov onesnaževal na okolje (Rand, 1995). V omenjenih testih se meri (kvantificira) odziv organizma na strupeno snov. Pojavile so se standardizirane tehnike za teste strupenosti (z različnimi vrstami organizmov in ustanavljati so se začeli laboratoriji za izvajanje testov strupenosti. Standardizirane tehnike so razvila različna združenja: American Public Health Association (APHA), U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), International Standardization Organization (ISO), Environmental Canada, in Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). V 60-ih letih 20. stoletja usmerijo pozornost tudi na onesnaževanje iz industrijskih objektov v vodno okolje (potoke, reke, itd.), merjenje koncentracij izpostavljenosti in kontroliranje kvalitete vod. V 70-ih letih je v Združenih Državah Amerike akutni test strupenosti na ribah sprejet kot veljaven parameter v zakonodaji in je služil kot vodilo za kontroliranje onesnaženosti voda (ocene tveganja, itd.). Na evropskem nivoju se organizacija OECD (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj) že od leta 1994 pospešeno zavzema za sledenje učinkov onesnaževal s testi strupenosti. V Sloveniji je od leta 2000 po predpisih za izpust izcedne vode v okolje, potrebno določanje akutne strupenosti z vodnimi bolhami (Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov). Določanje strupenosti z vodnimi bolhami je predpisano tudi v Uredbi o okoljski dajatvi za onesnaževanje okolja zaradi odvajanja odpadnih voda (Ur.l. RS št. 123, 2004) in v Uredbi o emisiji snovi pri odvajanju odpadne vode iz naprav za pranje in kemično čiščenje tekstilij, (Ur.l. RS št. 41, 2007).

Mnogo avtorjev (Eaton in sod., 2005; Fendt, 2003; Rand, 1995) je mnenja, da tradicionalni pristop k ocenjevanju kvalitete odpadnih voda samo s fizikalno kemijskimi analizami ne pove dovolj. Zaradi potrebe po ovrednotenju vpliva odpadnih snovi (npr. izcedne vode) na žive organizme in okolje se uporabljajo različni testi strupenosti, s katerimi vrednotimo strupenost na testnih organizmih. Ekotoksikološke študije



vključujejo kemijske, fizikalne in biološke preiskave, in razlagajo vpliv posameznih onesnaževal na živo in neživo okolje. S testom strupenosti želimo poiskati zvezo med dozo (koncentracijo) določene substance in odzivom organizma. Učinki preiskovanih snovi na organizem so lahko pozitivni ali negativni. V toksikologiji se osredotočamo na škodljive učinke in iščemo vzroke zanje. Pri razlagi rezultatov bioloških testov strupenosti moramo biti pazljivi, ker so različne vrste organizmov različno dovzetne za neko strupeno snov, občutljivost pa je odvisna tudi od življenjskega cikla, pogojev v okolju, in morebitne prejšnje izpostavitve strupeni snovi (Eaton in sod., 2005; Fendt, 2003).

Strupenost v testih strupenosti vrednotimo kot določanje smrtnosti (letalnost) in določanje subletalnih učinkov na vseh nivojih biološke organizacije (od organizma do ekosistema) (biokemijski, fiziološki učinki, rast, razvoj, vplivi na razmnoževanje, obnašanje, itd.) (Eaton in sod., 2005; Rand, 1995). Učinki, ki jih spremljamo se pri različnih organizmih in na različnih nivojih biološke organizacije razlikujejo, npr. število preživelih organizmov, teža in velikost organizma, št. teratogenih anomalij, pojav tumorjev, indukcija ali zaviranje encimske aktivnosti, številčnost in razpršenost organizmov v ekološki združbi, itd. Za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda navadno uporabljamo teste strupenosti z organizmi iz različnih trofičnih nivojev, npr. bakterije (razkrojevalci), alge (proizvajalci), rake in ribe (potrošniki). Spremljani parametri pa se od vrste do vrste razlikujejo. Pri ribah npr. se navadno preiskuje smrtnost, pri algah rast, pri vodnih bolhah pa gibljivost in razmnoževanje.

### 2.3.1 Prednosti bioloških študij pred fizikalno kemijskimi

Uporaba organizmov v testih ima kar nekaj prednosti pred fizikalno kemijskimi analizami (Eaton in sod.; Derksen, 2002; Rand, 1995). V starejših študijah okolja so raziskovalci podajali ocene tveganj posameznih onesnaževal za okolje na podlagi fizikalno kemijskih analiz, katerim so sledile primerjave med zaznanimi koncentracijami in empirično določenimi mejami toksičnosti posameznih snovi. Tak pristop pa ima kar nekaj pomanjkljivosti:

- Zaradi analitskih omejitev (npr. meja detekcije) lahko v vzorcih ostanejo toksične snovi, ki jih ne zaznamo,
- Izmerimo le koncentracijo posameznih snovi, in ugotovimo ali so nad ali pod dovoljeno mejo, ne moremo pa oceniti rezultatov kombiniranja toksičnih snovi (sinergizem, aditivizem, antagonizem,..),
- Toksičen učinek imajo lahko snovi šele ko vstopijo v celice organizma, kjer pride do bioaktivacije, lahko pa so toksični razgradni ali pretvorbeni produkti,
- Ne pridobimo podatka o deležu snovi, ki je organizmom dostopen (biodostopnost), ugotovi se celoten delež snovi, ki je prisoten,
- Z ekonomskega vidika so fizikalno kemijske analize relativno zahtevne in zahtevajo drage inštrumente, zato so lahko dražje od testov strupenosti.

Zaradi omenjenih prednosti biotestov smo v diplomski nalogi izvedli poleg nekaterih fizikalno kemijskih določitev v vzorcih izcednih vod tudi serijo biotestov z različnimi organizmi.

Kot pomanjkljivost biološkega pristopa k preiskovanju odpadnih voda pa lahko omenimo občutljivost organizmov (v in med vrstami, torej spremenljiv odziv), ter pomanjkanje specifičnosti biološkega odziva; pokaže se npr. stres, ne pa vir stresa;

nesmrtno doze so težko zaznane; vzrok in učinek pa težko dokazljiva). Z ustreznim biotestom torej lahko potrdimo biološki učinek onesnaževala, ki ga testiramo, ne moremo pa natančno identificirati specifičnih snovi, ki so za odziv odgovorne (Derksen, 2002). Pomanjkljivost je tudi ta, da ni direktne povezave med laboratorijsko pridobljenimi podatki o strupenosti, in stanjem v okolju. Na strupenost v okolju namreč vplivajo številni kemijski in fizikalni dejavniki, ki so v *in vitro* testih eliminirani, saj mnogih okoljskih dejavnikov v laboratoriju ni mogoče ustvariti. V okolju se organizmi navadno prilagodijo na spremenjene pogoje, zato je odziv organizmov lahko drugačen. V laboratoriju je organizem navadno izpostavljen najslabši možni situaciji, v okolju pa se taki situaciji lahko izogne s tem, da se umakne ali spremeni ekološko nišo (npr. poišče nestrupen vir hrane, se umakne v manj onesnažen habitat,..).

Idealen pristop k preiskovanju odpadnih voda je torej uporaba bioloških metod, s katero se ugotovi problem in tudi uporaba kemijskih analiznih postopkov, s katerimi se poišče možne vzroke za problem. Poleg tega, da nam tak celosten pristop prihrani veliko časa in denarja, je nujno potreben za določitev dejanskega stanja okolja. Podoben pristop smo uporabili v diplomski nalogi.

### 2.3.2 Vrste testov strupenosti in učinki preiskovanih snovi

V laboratoriju lahko izvedemo več vrst biotestov; opazujemo lahko strupenost, bioakumulacijo, genotoksičnost, toksikodinamiko, toksikokinetiko,.. (Rand, 1995; Derksen, 2002). Vsem naštetim biotestom je skupna biodostopnost. Če snov ni biodostopna, ne povzroči strupenosti, bioakumulacije, niti genotoksičnosti. Pri diplomskem delu smo se osredotočili na strupenost.

Teste strupenosti ločujemo glede na trajanje testov, dodajanje raztopin in namen (Eaton in sod., 2005; Rand, 1995). Glede na dodajanje testne raztopine poznamo statični sistem, obnavljajoči sistem in pretočni sistem. Glede na trajanje poznamo kratkotrajne teste strupenosti (kjer preiskujemo akutno strupenost), srednje dolge, ter dolgotrajne teste strupenosti (kjer preiskujemo kronično strupenost). Z akutnim testom ugotavljamo relativno strupenost kemikalij oziroma onesnaževal na izbrani vodni organizem v kratkem časovnem obdobju izpostavljenosti (od nekaj minut do nekaj dni, odvisno od organizma). Pri akutni strupenosti je navadno prisoten intenziven odgovor na preiskovano snov. Končni merjeni odziv mnogih akutnih biotestov je smrtnost. S kroničnim testom strupenosti ocenjujemo škodljiv vpliv kemikalije ob dolgotrajni oz. ponavljajoči se izpostavitvi (nekaj tednov do let, odvisno od organizma) subletalnim koncentracijam in ugotavljamo ne le preživetje, temveč tudi razvoj, razmnoževanje, itd. V takih testih študiramo vplive na življenjski cikel organizma ali na del življenjskega cikla (npr. rast in razmnoževanje). Pri kronični strupenosti je navadno manj intenziven dražljaj, prisoten je ponavljajoč, stalen stres, in organizem običajno da manj intenziven odgovor, vendar to ne pomeni, da preiskovana snov ni okolju nevarna. Učinki preiskovanih snovi (navadno onesnaževal) na organizme so lahko letalni (smrtni) in subletalni.

Kriteriji za izbor testa strupenosti so:

- Ustreznost (relevance); Ustreznost izraža primernost testa glede na posamezne značilnosti preiskovanja.
- Obnovljivost (repeatability); Obnovljiv test je tak, da dobimo enak rezultat, ne glede na to kdo je izvajalec testa, in kje se test izvaja.

- Zanesljivost (reliance); Zanesljivost izraža stopnjo zaupanja da tako je.
- Robustnost (robustness); Robustnost testa pomeni, da je test tak, da ga zna narediti več ljudi.
- Ponovljivost (reproducibility); Ponovljivost izraža ujemanje rezultatov zaporednih meritev istega merjenega fenomena, opravljenih pod enakimi pogoji merjenja.

### 2.3.3 Testni organizem in merjeni biomarkerji

Biomarker je merjen biološki odziv na organizemskem in sub-organizemskem nivoju (npr. biokemijski, fiziološki, histološki, vedenjski odzivi), ki poda informacijo o potencialnem učinku onesnaževala na organizem in omogoča tudi študije mehanizma delovanja določenih vrst onesnaževal. Biomarker oz. bioindikator sta pokazatelja npr. onesnaženja okolja, ki prikazuje odklon od normalnega stanja.

Med najbolj pogostimi organizmi v testih strupenosti so sladkovodni nevretenčarji (vodne bolhe, postrance, žuželke), nekateri vretenčarji (ribe), sladkovodne rastline (vodna leča), zelene alge in morske bakterije. Danes se na področju vodne toksikologije uveljavljajo manj invazivni in etično sprejemljivejši načini testiranja z embriji namesto z odraslimi organizmi (npr. rib zebrič *Danio rerio*) ali s celičnimi kulturami (npr. hepatocite postrvi). Poleg klasičnih testov strupenosti z izbranimi testnimi organizmi so v zadnjem času vse bolj v veljavi testi za ugotavljanje genotoksičnosti, kar pa ni zajeto v tem diplomskem delu. Za pridobitev relevantnih rezultatov ni pomembna samo prava izbira metode, temveč mora biti tudi prava izbira organizma. Testne organizme lahko dobimo iz populacije na neonesnaženem območju, kupimo pri dobaviteljih, ali jih vzgojimo v laboratoriju. Vsi organizmi v določenem testu morajo biti iz istega vira.

Pri izbiri vrst organizmov, primernih za test strupenosti, so pomembni naslednji kriteriji (Rand, 1995):

- Občutljivost vrste
- Komerzialno in ekološko pomembna vrsta
- Preprosto gojenje v laboratoriju
- Poznana fiziologija, genetika, obnašanje in ekološke značilnosti
- Splošno dostopna vrsta, številčnost, razširjenost
- Vrsta reprezentativna za ekosistem
- Ekonomski vidik

Pri izbiri merjenih odzivov organizmov primernih za test strupenosti, so pomembni naslednji kriteriji (Rand, 1995):

- Merljiv odziv (odziv je možno kvantificirati)
- Preprosta interpretacija odziva
- Občutljivost na nizke koncentracije
- Odziv odvisen od koncentracije (doze)
- Čim manjša variabilnost odziva (visoka ponovljivost)
- Hiter odziv

- Biološko pomemben odziv
- Možnost posploševanja tudi na druge organizme

### 2.3.4 Stopnje v izvedbi testa strupenosti

Testi strupenosti so navadno izvedeni v dveh stopnjah. Prva stopnja je preliminarni test (eden ali več). Druga stopnja je definitivni test (eden ali več) (Eaton, 2005).

#### 2.3.4.1 Preliminarni test

Preliminarni test (range-finding test) je prva stopnja pri izvedbi testa strupenosti. Zanj je značilno široko koncentracijsko območje in kratkotrajna izpostavljenost organizmov z namenom poiskati območje koncentracij preiskovane snovi, kjer se pojavi strupenost. Organizme navadno izpostavimo širokemu koncentracijskemu območju z logaritamskim razmerjem kot je 0,01; 0,1; 1; 10; 100 vol.% vzorca preiskovane snovi. Vključiti želimo koncentracije, ki povzročijo učinek pri vseh organizmih in ostale koncentracije, ki povzročijo manjši učinek ter tiste, kjer ni učinka (Rand, 1995). S preliminarnim testom želimo oceniti koncentracijsko območje, ki ga bomo uporabili v definitivnem testu.

#### 2.3.4.2 Definitivni test

Definitivni test je druga stopnja pri izvedbi testa strupenosti, s katerim natančno določimo  $LC_x$ ,  $EC_x$  ali  $IC_x$  vrednosti. Pri teh testih navadno uporabimo geometrijsko serijo redčenja vzorca, kjer želimo zajeti koncentracije preiskovane snovi od najvišje, ki ni v preliminarnem testu povzročila učinka pri nobenem oziroma malo organizmih do najnižje, ki je učinek povzročila pri 100% organizmov.

### 2.3.5 Interpretacija biološkega odziva v testih strupenosti

Rezultati biotestov postanejo relevantni šele ob dobri statistični analizi podatkov. Pozitiven rezultat predstavlja statistično značilno spremembo življenjskih procesov (npr. inhibicija rasti). Za preiskovano snov ali vzorec, ki ne povzroči statistično značilnega odstopanja od kontrole, lahko trdimo, da v danem testnem sistemu nima toksičnega vpliva.

Za čim bolj celovit prikaz slike stanja v okolju potrebujemo rezultate čim več različnih biotestov, kjer kot testne organizme uporabimo živali in rastline ter mikroorganizme. Torej uporabimo prokariote in evkariote, ter organizme z različnih trofičnih nivojev. Pri dobrih analizah uporabimo bioteste, v katerih spremljamo več različnih odzivov organizmov (preživetje, rast, reprodukcija, encimska aktivnost,..). Odločitev katere bioteste bomo uporabili, je izredno pomembna za čim bolj relevanten rezultat. Izbor biotestov naredimo na podlagi informacij, ki jih želimo pridobiti in občutljivosti testnega

organizma ter na podlagi fizikalno kemijskih lastnosti vzorca (Derksen, 2002). Smrtnost običajno izražamo s parametrom  $LC_{50}$ . Za prikaz strupenega delovanja preiskovane snovi pogosto uporabljamo tudi parameter  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  (razlaga parametrov je na strani III.).

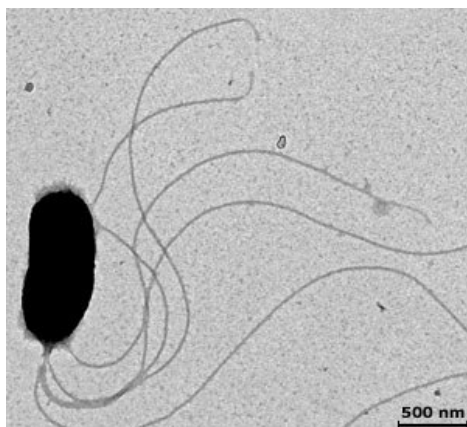
Pomembno je, da se zavedamo, da lahko z uporabo nekaterih biotestov izločimo značilne okoljske pogoje preiskovanega ekosistema, prav tako pa se lahko odzivi med različnimi testnimi organizmi močno razlikujejo (Eaton in sod., 2005; Fendt, 2003).

## 2.4 Organizmi in metode v testih strupenosti

Testi strupenosti temeljijo na izpostavitvi organizmov preiskovani snovi in spremljanju kvarnih učinkov na izpostavljenih organizmih, iščemo zvezo med koncentracijo snovi in odzivom organizmov. Vsem laboratorijskim testom je značilna priprava različnih koncentracij preiskovane snovi, katerim izpostavimo testne organizme. Nato spremljamo kvarne učinke in določamo posamezne koncentracije vzorca, ki povzročijo pri določenem odstotku izpostavljenih organizmov spremljane učinke oz. odzive.

### 2.4.1 Test strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri* (ISO 11348-2: 2007)

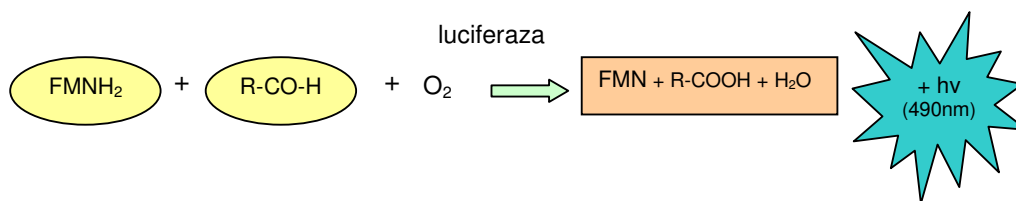
*Vibrio fischeri* (slika 2) so morske gram negativne paličaste bakterije. Bakterije te vrste so navadno prisotne na morskih organizmih (npr. simbioza bakterij s sipi) ali pa prosto živijo kot bakterijski plankton, lahko pa živijo tudi kot parazit (zajedavec). Imajo nenavadno lastnost sproščanja šibke svetlikajoče (luminiscenčne) svetlobe, kot stranski produkt celičnega dihanja.



**Slika 2:** Bakterija *Vibrio fischeri*  
(<http://www.pnas.org/content/102/8/2673/F2.large.jpg>)

Pri luminiscenci gre za biokemijsko reakcijo, pri kateri encim luciferaze v prisotnosti koencima flavin mononukleotida ( $FMNH_2$ ) oksidira organsko spojino, npr. verigo aldehida ( $R-CO-H$ ). Pri tem se sprosti energija v obliki modro- zelene svetlobe z valovno dolžino 490nm. Reakcijo, ki se dogaja v bakteriji *Vibrio fischeri* prikazuje slika 3. Celično dihanje je osnova celičnega metabolizma in spremljajočih življenjskih

procesov. Ker je bakterijska bioluminiscenca direktno povezana s celičnim dihanjem, vsako zaviranje (inhibicija) celične aktivnosti (npr. zaradi toksičnosti okolja) preko zmanjšanega nivoja dihanja, reducira tudi nivo luminiscence. Izpostavljenost strupenim snovem v vodah torej povzroči zaviranje bioluminiscence bakterij *Vibrio fischeri*, ki jo merimo na luminometru pred izpostavitvijo preiskovani snovi (izcedna voda) in po določenem inkubacijskem času. Zmanjšanje intenzitete svetlobe je obratno sorazmerno strupenosti testirane snovi. Bolj ko je vzorec strupen, nižja je intenziteta emitirane snovi. Namen testa je določanje koncentracije preiskovane snovi (izcedna voda), ki povzroči 50% zaviranje luminiscence v določenem inkubacijskem času (npr. 30 min) glede na kontrolo (30min IC<sub>50</sub>). Testni organizem in oprema so komercialno dostopni. Test je hiter, ponovljiv, primerljiv in relativno enostaven (Eaton, 2005) in ga zato pogosto uporabljamo kot »presejalni« test za hitro oceno strupenosti kemikalij in odpadnih vod.



**Slika 3:** Nastanek luminiscenčne svetlobe

#### 2.4.2 Test strupenosti z algami (*Desmodesmus subspicatus*) (ISO 8692: 2004)

Alge so eno ali več celični organizmi, ki se pojavljajo v sladkih in slanih vodah, ter v kopenskih okoljih. Vsebujejo klorofil, zelen pigment, ki je nujen za fotosintezo. Poleg klorofila lahko vsebujejo še druge pigmente (fukoksantin, fikoeritrin) (Eaton, 2005).

Alge *Desmodesmus subspicatus* (prej imenovana *Scenedesmus*) uvrščamo med kokalne zelene alge. Prikazane so na sliki 4. So enocelične sladkovodne planktonske alge in imajo pomembno vlogo kot primarni producenti. So tipične steljčnice (organizmi, ki še nimajo jasno razvitih tkiv in organov). Celice so neobičkane, z razvito steno, in se združijo v kolonije. Najraje naseljujejo rahlo organsko onesnažene vode, torej so primerne kot pokazatelj onesnaženosti. V Sloveniji so v jezerih razširjene predvsem sorodne vrste rodu *Scenedesmus*: *S. quadricauda*, *S. acutus*, *S. brasiliensis*.

V testu strupenosti določamo zaviranje rasti zelenih alg, ki jo povzroči preiskovana snov (npr. izcedna voda). Metoda je primerna za preiskovanje snovi, ki so topne v vodi. Princip testa je določanje koncentracije preiskovane snovi (izcedna voda), ki povzroči 50% zaviranje hitrosti rasti alg po 72 urah glede na kontrolo (72 h IC<sub>50</sub>). Čeprav test traja samo 3 dni, je to kronični test za alge.



**Slika 4:** Zelene alge *Desmodesmus subspicatus*  
([http://www.butbn.cas.cz/ccala/col\\_images/688.jpg](http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/688.jpg))

#### 2.4.3 Test strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) (ISO 10706: 2000, ISO 6341: 1996)

Sladkovodni raki vodne bolhe (*Daphnia magna*) (Crustacea, Cladocera) so ene izmed najpogosteje uporabljenih organizmov v testih akutne in kronične strupenosti, predvsem zato, ker imajo kratek življenjski cikel (40 do 56 dni), ker so nezahtevne za gojenje in so med bolj občutljivimi organizmi na kemikalije (Eaton, 2005; Rand, 1995). Slika 5 prikazuje vodno bolho.



**Slika 5:** Slika vodne bolhe  
(<http://www.summagallicana.it/lessico/a/Aldrov%20Daphnia%20magna.jpg>)

Vodne bolhe so členonožci, raki listonožci. Imajo pomembno vlogo v prehranjevalnem spletu kot porabnik fitoplanktona in kot hrana večjim vretenčarjem. Vodne bolhe so filtratorji, ki se prehranjujejo z organskimi delci (bakterije, alge, detrit, raztopljeni organski material). Živijo v stoječih vodah, npr. v jezerih, ribnikih, mlakah. Dolžina živali je 5 do 6 mm. Imajo izrazito oblikovano glavo, na glavi veliko sestavljeno oko, telo pa je prekrito s karapaksom, ki je razvit v obliki lupine. Na glavi sta para anten. Prve so majhne, druge pa velike in razvejane in so preoblikovane v organ za plavanje. Na

zadnji strani je valilnik (marsupij), kjer se razvijajo mladiči. Razmnožujejo se lahko spolno ali nespolno. Večino leta poteka razmnoževanje nespolno, partenogenetsko, torej brez oploditve s strani samcev, ko samice producirajo diploidna jajca. Na ta način se lahko živali namnožijo v zelo kratkem času in učinkovito izkoristijo ugodne okoljske abiotične pogoje. V večini okolij je populacija tako sestavljena zgolj iz samic. Odrasle samice izvalijo jajca v valilnik, ki je na hrbtne strani telesa in tako se brez predhodne oploditve razvijejo mlade vodne bolhe, ki so genetsko identične odrasli samici. Pri spremenjenih razmerah (nizke temperature, visoka gostota organizmov, pomanjkanje hranil, kopičenje strupenih metabolitov) se tvorba partenogenetskih jajc zaustavi, iz nekaterih jajc se namesto samic razvijejo samci. Samci oplodijo samico in pride do spolnega razmnoževanja. Po oploditvi samica proizvede drugačna t.i. »zimsko« jajca, ki imajo temen ovoj in so bolj odporna na neugodne razmere. Iz zimskih jajc se ob ponovno ugodnih razmerah zopet razvijejo partenogenetske samice. Vodne bolhe so »paradni konj« v ekotoksikologiji. Vodne bolhe, ki jih uporabljamo v testih strupenosti, dobimo z gojenjem samic, ki se razmnožujejo nespolno. To je prednost ker so osebki genetsko enaki, to pa pomeni da so enako občutljivi. S tem se izognemo variabilnosti med osebki (Rand, 1995).

Z vodnimi bolhami izvajamo akutne in kronične teste strupenosti. Pri akutnem testu strupenosti določamo koncentracijo preiskovane snovi (npr. izcedna voda), ki povzroči 50% negibnih vodnih bolh po 24 oz. 48 urah ( $EC_{50}$ ).

Pri kroničnem testu strupenosti, ki traja 21 dni, vodne bolhe izpostavimo preiskovani snovi in ugotavljamo preživetje samic ter vpliv na razmnoževanje, ki ga prikažemo kot skupno število mladih na samico. Pri kroničnem testu je sistem obnavljajoč, kar pomeni da izpostavljenim živalim menjamo raztopino (vsaj trikrat tedensko) ali pa pretočni, kjer zagotovimo stalen pretok raztopine s preiskovano snovjo .

#### 2.4.4 Testa strupenosti z zebricami (*Danio rerio*) (ISO 15088: 2007, ISO 7346-1: 1996)

Zebrica (*Danio rerio*) (slika 6) je majhna, tropska, sladkovodna riba. Spada v družino krapov (*Ciprinidae*). Odrasle zebrice merijo 3 do 5 cm v dolžino in uspevajo v mehki kot tudi trdi vodi, kar pomeni, da so relativno neobčutljive na trdoto vode in jih je zato lažje vzdrževati in vzgajati. Pri temperaturi 26 °C zebrice hitreje rastejo kot pri nižjih temperaturah in v starosti od 4 do 15 mesecev so samice v najugodnejši fazi drstenja. Ena samica izleže od 50 do 200 iker na dan. So izredno občutljive na spremembe okoljskih dejavnikov, kar se lahko odraža v manjšem številu izleženih jajc. Zebrice so lahko dosegljive in relativno poceni. Pri testih strupenosti lahko uporabimo odrasle zebrice ali zarodke rib zebric. V obeh primerih določamo akutno strupenost, ki se kaže z letalnimi in subletalnimi biomarkerji. Zarodki zebric so uporabni v raziskavah zaradi njihovega enostavnega gojenja in velikega števila zarodkov, ter zaradi hitrega razvoja zarodkov in lepo opazne morfologije. Pri testu z odraslimi zebricami jih izpostavimo v različne koncentracije vzorca in ugotavljamo smrtnost. Pri testu z zarodki rib jih izpostavimo različnim koncentracijam vzorca in ugotavljamo letalne biomarkerje (razvoj repa, srčni utrip, koaguliranost zarodka) ter subletalne biomarkerje (pigmentacija, oči, gibanje, krvni obtok) tako, da pod mikroskopom opazujemo zarodek. Iz dobljenih podatkov v obeh primerih testa izračunamo  $LC_{50}$  oz.  $EC_{50}$ .





**Slika 6:** Zebrica (*Danio rerio*)  
 (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ac/Zebrafisch.jpg/250px-Zebrafisch.jpg>)

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Preiskovali smo vzorce izcednih vod iz odlagališča komunalnih odpadkov. V preiskavo smo vključili fizikalno kemijske analize vzorcev in teste strupenosti z vzorci izcednih vod. Uporabili smo multibiomarkerski pristop k biomonitoringu izcedne vode. Torej smo v laboratorijsko analizo vključili več biomarkerjev (preživelost, gibanje, razvoj, razmnoževanje organizma na organizemskem nivoju ter svetlobna emisija bakterij na celičnem nivoju opazovanja) pri organizmih iz različnih trofičnih nivojev.

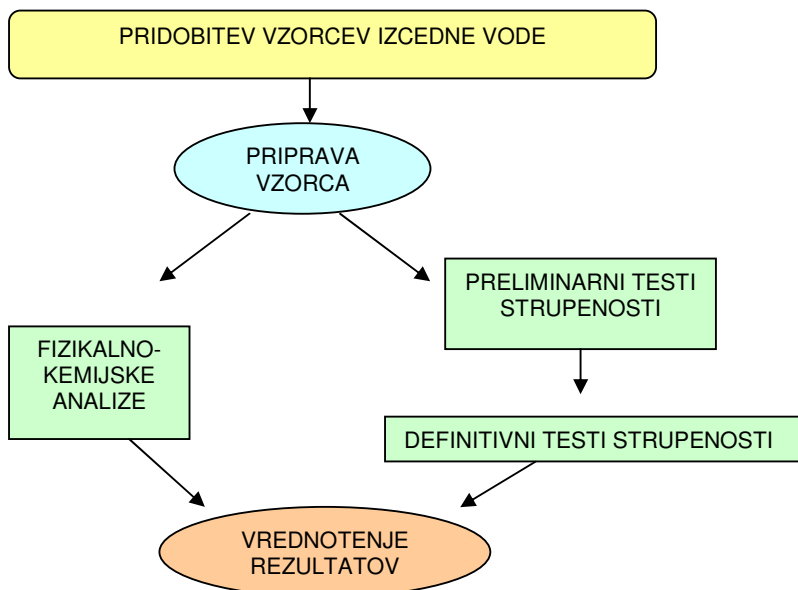
#### 3.1 Preiskovana snov- izcedna voda

Analizirali smo vzorce izcednih vod iz enega od slovenskih odlagališč komunalnih odpadkov; vtok na biološko čistilno napravo in iztok iz biološke čistilne naprave. Imeli smo po dva vzorca izcednih vod, ki sta bila zajeta v različnih časovnih obdobjih. Prvi vzorec izcedne vode, ki teče na čistilno napravo smo poimenovali U1, iztok iz čistilne naprave pa U2. Naslednja dva vzorca iz istega odlagališča (vzorčenje je potekalo čez nekaj mesecev), smo poimenovali U3 (vtok na čistilno napravo) in U4 (iztok iz čistilne naprave). Slika 7 prikazuje shemo pritokov in iztokov iz čistilne naprave.



**Slika 7:** Oznaka vzorcev vtokov in iztokov iz čistilne naprave  
 Vzorce izcednih vod smo zamrznili in jih shranili v polietilenski embalaži. Odmrznjen vzorec smo 2 dni hranili na 4 °C. Če ga v dveh dneh nismo uporabili, smo ga zavrgli.

Analize smo izvedli v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu, Ljubljana. Shema poteka laboratorijske analize izcednih vod je prikazana na sliki 8.



**Slika 8:** Potek laboratorijske analize izcedne vode

### 3.2 Fizikalno kemijske analize

Zaradi pomanjkanja količine vzorcev izcedne vode U1 in U2, smo fizikalno kemijske analize opravili le za vzorca izcedne vode U3 in U4 (drugi zajem vzorcev izcednih vodov tok na čištilno napravo-ČN in iztok iz ČN). Izvedli smo osnovne fizikalno kemijske analize:

- pH vrednost,
- kemijska potreba po kisiku (KPK);
- biokemijska potreba po kisiku (BPK<sub>5</sub>);
- koncentracija celotnega organskega ogljika (TOC);
- koncentracija anorganskega ogljika (IC);
- koncentracija celotnega ogljika (TC);
- koncentracija amonijevega dušika (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- N);
- koncentracija nitritnega dušika (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>- N);
- koncentracija nitratnega dušika (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- N);
- koncentracija Kjeldahlovega dušika;
- koncentracija klorida (Cl<sup>-</sup>);
- koncentracija ortofosfata (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>- P).

### 3.2.1 Merjenje temperature in raztopljenega kisika

Raztopljeni kisik smo merili z membransko elektrodo, selektivno za kisik. V isti napravi je vgrajen tudi termistor s katerim merimo temperaturo (proizvajalec WTW, merilec kisika OXI 96 z elektrodo EOT 96).

### 3.2.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

KPK analize smo izvedli po standardni metodi ISO 6060: 1989.

S kemijsko potrebo po kisiku določimo celotno organsko onesnaženje (razgradljive in nerazgradljive snovi). Postopek je osnovan na kemijski oksidaciji. Organske nečistoče določamo tako, da jih pri določenih pogojih oksidiramo in iz porabe oksidanta (kalijev dikromat) sklepamo na količino organskih snovi (Zagorc Končan in sod., 2004).

Vzorcu smo dodali znano prebitno količino standardne raztopine kalijevega dikromata. Erlenmajerico smo pritrdili na povratni hladilnik in skozi njega počasi dodali reagent žveplove kisline ( $H_2SO_4/Ag_2SO_4$ ) in ga refluktirali. Preostanek dikromata smo določili s titracijo s standardno raztopino amonijevega železovega sulfata (FAS).

### 3.2.3 Biokemijska potreba po kisiku (BPK)

BPK analize smo izvedli po standardni metodi ISO 5815: ISO 5815: 2003.

Biokemijska potreba po kisiku (BPK) je množina kisika, ki je potrebna za oksidacijo razgradljivih organskih snovi s pomočjo mikroorganizmov, ki jih vzorec vsebuje. Določitev BPK v vzorcih smo izvajali po klasični razredčevalni metodi zaradi prevelikega organskega onesnaženja izcednih vod (Zagorc Končan in sod., 2004).

Vzorec, ki ga analiziramo, smo razredčili z razredčevalno vodo, ki je nasičena s kisikom in obogatena s hranili ter dodali cepivo z aerobnimi organizmi in alitiosečnino (ATU), da smo odstranili vpliv nitrifikacije. Vzorce smo inkubirali v popolnoma napolnjenih in zaprtih stekleničkah pri 20°C in jim določili raztopljeni kisik pred in po inkubaciji.

Raztopljeni kisik smo določali kemijsko po Winklerju. Metoda temelji na oksidacijski lastnosti raztopljenega kisika. Po dodatku alkalnega-jodid-azidnega reagenta in raztopine  $MnSO_4$  nastane rjava oborina manganovih hidroksidov različne sestave. Oborino smo nakisali da jodid oksidira v jod. Sproščeni jod smo titrirali z natrijevim tiosulfatom. Množina sproščenega joda je ekvivalentna množini raztopljenega kisika. BPK je razlika vsebnosti kisika pred in po inkubaciji. Standardni čas inkubacije je 5 dni.

### 3.2.4 Celotni organski ogljik (TOC)

Celotni organski ogljik (Total organic carbon-TOC) smo določili po standardni metodi ISO 8245: 1983.

S TOC analizatorjem proizvajalca Shimadzu model TOC-5000A smo merili celotni ogljik (TC) in anorganski ogljik (IC). Iz razlike smo izračunali vsebnost raztopljenega organskega ogljika (DOC).

Organski ogljik v vzorcu se na katalizatorju, ki je segret na 680 °C, oksidira do ogljikovega dioksida, ki ga določimo z ustreznim detektorjem. Anorganski ogljik smo določili tako, da smo vzorec nakisali in segreli na 200 °C, zaradi česar so se vse oblike anorganskega ogljika ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^-$  in  $\text{CO}_{2(l)}$ ) pretvorile v plinasti ogljikov dioksid. Tega smo določili enako kot celotni ogljik. Vzorce smo pred meritvijo prefiltrirali, s tem pa smo odstranili neraztopljene delce, zato smo dejansko določili DOC in ne TOC.

### 3.2.5 Spektrofotometrično določanje amonijevega dušika ( $\text{NH}_4^+$ -N), nitritnega dušika ( $\text{NO}_2^-$ -N) in nitratnega dušika ( $\text{NO}_3^-$ -N)

Spektrofotometrično določanje amonija smo določili po standardni metodi ISO 7150/1: 1984.

Amonijev dušik smo določali spektrofotometrično tako, da smo vzorcu dodali barvni reagent in raztopino natrijevega dikloroizocianurata ter inkubirali eno uro pri 25 °C. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 655 nm v kivetu. Koncentracijo amonijevega dušika v vzorcih smo izračunali glede na vrednost absorbance vzorca in standarda.

Nitritni dušik smo določali spektrofotometrično tako, da smo ustrezni količini vzorca dodali raztopino sulfanilamida in NED dihidroklorid ter počakali 10 min. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 543 nm in izračunali koncentracijo  $\text{NO}_2^-$ -N glede na vrednost absorbance vzorca in standarda.

Nitratni dušik smo določali spektrofotometrično tako, da smo vzorcu dodali ustrezno količino  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -EDTA ter ga spustili skozi redukcijsko kolono s kadmijevimi granulami s hitrostjo 7-10 ml·min<sup>-1</sup>. Tako pripravljenemu vzorcu smo dodali sulfanilamidni reagent, počakali 10 min ter dodali še raztopino NED-dihidroklorid. Po desetih minutah smo izmerili absorbanco pri 543 nm. Enako smo postopali s standardom. Vzporedno smo naredili še slepi vzorec, ki služi za umeritev spektrofotometra. Koncentracijo nitrata v vzorcih smo izračunali glede na vrednost absorbance vzorca in standarda.

### 3.2.6 Določanje Kjeldahlovega dušika

Kjeldahlov dušik smo določali po standardni metodi ISO 5663: 1984.

Kjeldahlov dušik podaja množino amonijevega in organskega dušika v vzorcu po mineralizaciji (brez nitrita in nitrata).

Vzorec smo z dodatkom žveplove (VI) kisline mineralizirali v amonijev sulfat ob prisotnosti bakra kot katalizatorja. V napravi za razklop smo prevedli organsko vezani dušik v amonij, ki smo ga potem določali z destilacijo in titracijo.

### 3.2.7 Določanje klorida

Kloridne ione smo določili tako, da smo vzorcu dodali indikator in ga titrirali z raztopino živosrebrega (II) nitrata. Pri tem je nastal slabo disociran živosrebrov (II) klorid. Vzorec se je obarval vijolično, ko so vsi kloridni ioni vezani. Prebitni živosrebrovi ioni z indikatorjem difenilkarbazonom v dušikovem kislem mediju tvorijo vijolično obarvano kompleksno spojino (Zagorc Končan in sod., 2004).

### 3.2.8 Določanje ortofosfata

Ortofosfat smo določili spektrofotometrično tako, da smo vzorcu dodali raztopino amonijevega molibdata in kositrovega (II) klorida. Po desetih minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 690 nm. Izmerili smo še absorbanco za slepi vzorec in ustrezne razredčitve standarda ter z njimi postopali enako kot z vzorcem (Zagorc Končan in sod., 2004).

### 3.2.9 Prikaz rezultatov

Vse rezultate smo podali kot aritmetično sredino dveh ali več meritev posameznega testa. Aritmetično sredino smo izračunali po enačbi (1). Poleg rezultata smo po enačbi (2) navedli tudi oceno variabilnosti (standardni odklon od povprečne vrednosti).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

$\bar{x}$  .....povprečna vrednost  
 $n$  .....število meritev oz. paralelk  
 $x_i$  .....vrednost i-te meritve oz. opazovanja

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$n$  .....št. Meritev oz. paralelk  
 $x_i$  .....vrednost i-te meritve  
 $\bar{x}$  .....povprečna vrednost

### 3.3 Testi strupenosti

Delo je potekalo po naslednjih postopkih, ki daje informacije o strupenosti izcednih vod in pri tem so bili upoštevani mednarodni standardni postopki;

- določanje zaviranja svetlobne emisije bakterij (*Vibrio fischeri*) (ISO 11348-2: 2007)
- določanje zaviranja rasti zelenih alg (*Desmodesmus subspicatus*) (ISO 8692: 2004)
- določanje akutne strupenosti za vodne bolhe (*Daphnia magna*) (ISO 6341: 1996 )
- določanje kronične strupenosti za vodne bolhe (*Daphnia magna*) (ISO 10706: 2000 )
- določanje akutne strupenosti na zarodke rib zebric (*Danio rerio*) (ISO 15088: 2007 )
- določanje akutne letalne strupenosti na ribe zebrice (*Danio rerio*) (ISO 7346-1: 1996 )

Za vsak vzorec izcedne vode smo najprej opravili preliminarni test, s katerim smo zajeli širše območje koncentracij, nato smo opravili še definitivni test. Skušali smo izbrati različne koncentracije vzorca, ki povzročijo odziv med 10 in 90 %, kar je omogočalo korekten izračun  $EC_x$ ,  $IC_x$ ,  $LC_x$  vrednosti. Vsi primeri testov strupenosti so bili statični, razen kroničnih testov z vodnimi bolhami, ki so bili obnavljajoči.

#### 3.3.1 Test akutne strupenosti z bakterijo (*Vibrio fischeri*)

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 11348-2: 2007. Za oceno strupenosti vzorca je bilo potrebno izmeriti bioluminiscenco bakterij *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, ki smo jih kupili od proizvajalca Dr. Lange, pred dodatkom vzorca in po njem. To zmanjšanje smo primerjali z bakterijami, ki smo jim kot vzorec dodali kontrolno raztopino, to je raztopina, ki ni strupena za bakterije.

##### 3.3.1.1 Potek testa

Na osebнем računalniku smo aktivirali program LUMISOFT in nastavili parametre meritve (čas inkubacije, interval med posameznimi meritvami, ime vzorca, vrsta razredčitve in ostalo). Program pokaže, katero kiveto moramo izmeriti in čas, kdaj jo moramo izmeriti, tako da je čas inkubacije med serijama meritev za vse kivete enak. Luminiscenco smo merili na luminometru LUMISTOX (dr. Lange), ki je sestavljen iz inkubacijske enote in enote za merjenje intenzitete emitirane svetlobe. Temperatura v inkubacijski enoti je bila  $15 \pm 1$  °C. Vanjo smo postavili kivete in reaktivacijsko raztopino (glukoza, NaCl, pH uravnan na 7). Med tem smo pripravili testni vzorec, ki mora imeti ustrezno slanost (2% NaCl) in pH vrednost ( $7,0 \pm 0,2$ ). V čašo z volumnom 100 ml smo dali 1 g NaCl, 50 ml testnega vzorca izcedne vode in z 0,1M NaOH ali 0,1M HCl pH uravnali na vrednost  $7,0 \pm 0,2$ . Bakterije smo iz zamrzovalnika postavili za 2 min v vodno kopel s sobno temperaturo in nato dodali približno 500 µl termostatisirane reaktivacijske

raztopine. Rahlo smo premešali in postavili na inkubacijsko enoto. Po 15 min smo prelili vsebino v preostalo reaktivacijsko raztopino, premešali in odpipetirali po 500 µl revitalizirane suspenzije bakterij v vse kivete v vrstah B in C. Inkubacijska enota ima 3 vrste po 10 celic. Vrsta A je namenjena pripravi različnih koncentracij testnega vzorca, v vrsti B pripravljamo eno paralelko meritev, v vrsti B pa drugo. V vrsti A smo pripravili vrsto razredčitev testnega vzorca izcedne vode. Po merjenju luminiscence brez dodanega vzorca (samo suspenzija 500 µl bakterij) smo v vrsti B in C dodali po 500 µl pripravljenih razredčitev testnega vzorca izcedne vode iz vrste A.

S časom inkubacije se luminiscenca slepega vzorca spreminja tudi v odsotnosti strupenih snovi, zato je potrebno izračunati korekcijski faktor CF po enačbi (3). Ta je potreben za izračun spremembe intenzitete luminiscence v kontroli brez strupenih snovi. Iz meritev smo dobili podatke  $I_{0 \text{ kontrola}}$  in  $I_{30 \text{ kontrola}}$  ter  $I_{0 \text{ vzorec brez izcedne vode}}$  in  $I_{30 \text{ vzorec z izcedno vodo}}$ .

$$CF = \frac{I_{30 \text{ kontrola}}}{I_{0 \text{ kontrola}}} \quad (3)$$

CF.....korekcijski faktor

$I_{30 \text{ kontrola}}$ .....intenziteta luminiscence v kontroli po 30 min inkubacije

$I_{0 \text{ kontrola}}$ .....začetna intenziteta luminiscence v kontroli

Začetne intenzitete luminiscence za posamezne vzorce smo v enačbi (4) pomnožili z dobljenim korekcijskim faktorjem CF in s tem dobili teoretično intenziteto luminiscence v vzorcih po 30 min, če ne bi bila prisotna izcedna voda.

$$I_{\text{corr } 30 \text{ vzorec brez izcedne vode}} = I_{0 \text{ vzorec brez izcedne vode}} \times CF \quad (4)$$

$I_{\text{corr } 30 \text{ vzorec brez izcedne vode}}$  .....teoretična intenziteta luminiscence

$I_{0 \text{ vzorec brez izcedne vode}}$ .....začetna intenziteta luminiscence v posameznih razredčitvah vzorca

Zaviranje luminiscence za posamezno koncentracijo vzorca smo izračunali po enačbi (5).

$$I = \frac{I_{\text{corr } 30 \text{ vzorec brez izcedne vode}} - I_{30 \text{ vzorec z izcedno vodo}}}{I_{\text{corr } 30 \text{ vzorec brez izcedne vode}}} \times 100 \quad (5)$$

I.....zaviranje luminiscence

Vse rezultate smo predstavili kot aritmetično sredino dveh paralelk meritev v posameznem testu. S pomočjo grafa (priloga A), kjer je abscisa označevala koncentracijo vzorca izcedne vode, ordinata pa odstotek zaviranja luminiscence, smo dobili enačbo premice za izračun koncentracije vzorca, pri kateri opazimo določen odstotek zaviranja luminiscence (npr.  $IC_{50}$ ).

### 3.3.2 Test kronične strupenosti z algami (*Desmodesmus subspicatus*)

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 8692: 2004. Določali smo zaviranje oziroma pospeševanje rasti enoceličnih zelenih alg *Desmodesmus subspicatus* Chodat 1926, ki ga povzroči vzorec izcedne vode po 72 urah izpostavitve.

#### 3.3.2.1 Potek testa

Tri do štiri dni pred začetkom testa smo sterilno cepili alge iz ravnega medija po Jaworskem v sveže pripravljen sterilni in prezračen ISO rastni medij, katerega sestava je točno določena v ISO standardu. Tik pred nastavitvijo testa smo pod mikroskopom z uporabo Bürkerjeve kamrice prešteli alge in po enačbi (6) določili koncentracijo alg (Št. alg/ml) v ISO rastnem mediju. V testu potrebujemo izhodno koncentracijo alg  $1 \times 10^4$  alg/ml.

$$\text{Št. alg / ml} = \frac{a \times 1000}{b \times c \times d} \quad (6)$$

Št. alg ml.....koncentracija alg v ISO rastnem mediju

a.....št. alg prešteti v Bürkerjevi celici

b.....površina kvadratka [ $\text{mm}^2$ ]

c.....globina celice [mm]

d.....št. prešteti kvadratki v Bürkerjevi celici

Iz izračunane koncentracije alg v ISO rastnem mediju smo po enačbi (7) izračunali kolikšen volumen alg ( $V_a$ ) moramo dodati v bučko z volumnom 100 ml, kjer smo pripravili testno suspenzijo alg z vzorcem izcedne vode.

$$V_a = \frac{10^4 \times 100 \text{ ml}}{\text{št. alg / ml}} \quad (7)$$

V bučkah z volumnom 100 ml smo pripravili vsaj 5 različnih koncentracij testnega vzorca. Pripravili smo po dve paralelki za vsako koncentracijo testnega vzorca. Ustreznemu volumnu izcedne vode ( $V_i$ ) smo dodali ISO rastni medij, ustrezen volumen alg iz ISO rastnega medija ( $V_a$ ) in dodali destilirano vodo do oznake na bučki. Volumen izcedne vode ( $V_i$ ), ki smo ga morali za posamezno koncentracijo odpipetirati v bučko, smo izračunali po enačbi (8). Nato smo 40 ml pripravljene suspenzije prelili v erlenmajerice z volumnom 100 ml in dali na stalno stresanje (125 stresljajev/min) za 72 ur ob stalni svetlobi (6000 do 10000 lux).

$$V_i = \frac{10^4 \times 100 \text{ ml}}{\text{Št. alg / ml}} \quad (8)$$

Hitrost rasti smo izračunali po enačbi (9) in po enačbi (10) izrazili odstotek zaviranja rasti alg ( $I$ ) za posamezno razredčitev vzorca izcedne vode. Vse rezultate smo



predstavili kot aritmetično sredino dveh paralelk meritev v posameznem testu. S pomočjo grafa (priloga B), kjer je abscisa označevala koncentracijo testnega vzorca izcedne vode, ordinata pa odstotek zaviranja rasti, smo dobili enačbo premice za izračun koncentracije vzorca, pri kateri opazimo določen odstotek zaviranja rasti alg (npr. IC<sub>50</sub>).

$$\mu_i = \frac{\ln(\check{S}t. \text{ alg / ml})_{3dni} - \ln(\check{S}t. \text{ alg / ml})_{za\check{c}}}{3dni} \quad (9)$$

$\mu_i$ .....specifična hitrost rasti alg v koncentraciji izcedne vode  
 (Št. alg/ml)<sub>3dni</sub>.....koncentracija alg po 72 urni izpostavitvi  
 (Št. alg/ml)<sub>zač</sub>.....koncentracija alg na začetku testa

$$I = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \quad (10)$$

$\mu_c$ .....specifična hitrost rasti alg v kontroli  
 $\mu_i$ .....specifična hitrost rasti alg v posamezni koncentraciji vzorca izcedne vode  
 I.....zaviranje rasti [%]

### 3.3.3 Test akutne strupenosti z zarodki rib zebrič (*Danio rerio*)

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 15088: 2007. Pri akutnem testu strupenosti z zarodki rib zebrič (*Danio rerio* Hamilton Buchanan) določamo koncentracijo oziroma stopnjo razredčenja vzorca, ki povzroči strupene učinke na izpostavljenih zarodkih v 48 urah pri 26±1 °C.

#### 3.3.3.1 Potek testa akutne strupenosti z zarodki

Da smo lahko izvedli test, je bilo potrebno predhodno gojenje rib v akvariju na 26±1 °C s fotoperiodo 12 ur teme, 12 ur svetlobe. Zarodke smo pobrali iz akvarija in s pomočjo mikroskopa neoplojene izločili. Uporabili smo testne plošče s 24 luknjicami. V luknjicah smo pripravili različne koncentracije vzorca izcedne vode, tako da smo jo redčili z razredčevalno vodo, kot je predpisano v standardu. Pri tem smo upoštevali dodatek razredčevalne vode z oplojenim jajčecem (400 µl), ki smo ga prestavili v testne plošče s pipeto (po eno jajčece v vsako luknjico). Enačba (11) kaže kako smo izračunali potreben volumen izcedne vode za določeno koncentracijo, kateri smo izpostavili zarodek. Test smo nastavili z zarodki, ki so imeli največ 128 celic. Skupen volumen v posamezni luknjici v testni plošči je bil 1 ml. Za vsako koncentracijo smo imeli 10 paralelk. Poleg kontrole smo imeli še pozitivno kontrolo (3,4 dikloroanilin), ki je po standardu referenčna snov. Test je veljaven če 3,7 mg/l 3,4 dikloroanilina povzroči efekt pri več kot 10% izpostavljenih organizmih. Pod mikroskopom smo vsak zarodek

posebej opazovali in določali koaguliranost, razvoj repa (če je ločen od rumenjaka) in srčni utrip.

Zarodek smo definirali kot mrtev, če po 48 urah:

- ni bil rep ločen od rumenjaka, ali
- srčni utrip ni bil zaznan, ali
- je bil koaguliran.

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} \quad (11)$$

$V_1$ .....volumen vzorca, ki ga dodamo

$c_1$ .....koncentracija vzorca, ki ga dodamo (nerazredčen vzorec)

$V_2$ .....končni volumen v testni posodi (npr. v luknjici v tesni plošči)

$c_2$ .....koncentracija vzorca, kateri želimo organizem izpostaviti

Smrtno koncentracijo smo določali s pomočjo grafa (priloga C), na katerem je abscisa označevala koncentracijo vzorca, ordinata pa odstotek mrtvih zarodkov. Na ta način smo izračunali koncentracijo, ki povzroči določen odstotek mrtvih zarodkov ( $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$ ).

### 3.3.4 Test akutne strupenosti z odraslimi ribami zebričami (*Danio rerio*)

Test smo izvedli po mednarodnem standardu ISO 7346-1: 1996. Testni organizem so bile odrasle ribe zebriče (*Danio rerio*), dolge  $30 \pm 5$  mm. Določali smo koncentracijo izcedne vode, ki povzroči smrt pri 50% testne populacije živali po 24, 48, 72 in 96 urah (24 h  $LC_{50}$ , 48 h  $LC_{50}$ , 72 h  $LC_{50}$  in 96 h  $LC_{50}$ ).

#### 3.3.4.1 Aklimacija zebrič

Zebriče smo dobili pri komercialnem dobavitelju in jih vsaj teden dni pred začetkom testa pripeljali v laboratorij. Imeli smo jih v akvariju z volumnom 10 l, napolnjenim z vodo iz neonesnaženega potoka. S tem smo zagotovili aklimacijo živali na laboratorijske razmere. Vodo smo stalno prezračevali, pH vrednost je bila  $7,8 \pm 0,2$ , in kalcijeva trdota približno 250 mg/l. Do začetka testa smo jih enkrat dnevno hranili s komercialno dostopno ribjo hrano ali z mladimi vodnimi bolhami, fotoperioda je bila 16 ur svetlobe, 8 ur teme.

### 3.3.4.2 Potek testa akutne strupenosti

V akvarije z volumnom 5 l smo pripravili različne koncentracije vzorca (izračun dodanega vzorca po enačbi (11) iz poglavja 3.3.3.1), katerega smo redčili z vodo iz neonesnaženega potoka in v njih po 7 rib na akvarij izpostavili za 96 ur. Za preliminarne teste smo uporabili po 3 ribe in posledično uporabili po 1,5 l testne raztopine za posamezno koncentracijo. Med testom rib nismo hranili, vodo pa smo stalno prezračevali. Skozi poliuretanske cevke smo preko ventila, s katerim uravnavamo pretok zraka, v akvarije dovajali zrak. Fotoperioda je bila enaka kot med aklimacijo (16ur dneva/8ur teme). Vsak dan smo prešteli mrtve ribe in jih odstranili iz akvarija. Za vsako koncentracijo smo nato izračunali odstotek mrtvih rib. S pomočjo grafa (priloga F), kjer je abscisa označevala koncentracijo vzorca, ordinata pa odstotek mrtvih rib, smo izračunali LC<sub>50</sub>.

### 3.3.5 Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 6341: 1996. Pri akutnem testu z vodnimi bolhami določamo koncentracijo, ki v 24 oziroma 48 urah imobilizira 50% živali, ki so izpostavljene izcedni vodi (EC<sub>50</sub>). Kot negibne vodne bolhe smo šteli tiste, ki po rahlem stresanju niso bile gibljive.

#### 3.3.5.1 Gojenje vodnih bolh

Gojenje vodnih bolh za izvedbo testa ni predpisano. Vodne bolhe *Daphnia magna* Straus 1820 smo gojili v steklenih akvarijih z volumnom 3 l, v mediju M4, ki je v standardu testa kronične strupenosti za vodne bolhe (ISO 10706: 2000) predpisan kot razredčevalna voda. Razredčevalno vodo uporabljamo za kontrolo in za redčenje testnih vzorcev, da dobimo želeno testno koncentracijo. Medij M4 vsebuje nekatera makrohranila in vitamine. Da se živali v akvariju niso preveč namnožile smo vsak dan s pipeto pobirali mlade bolhe iz akvarija, ki smo jih lahko uporabili za teste, za hrano ribam ali pa smo jih zavrgli. Vodne bolhe smo hranili z zelenimi algami (*Desmodesmus subspicatus*), ki smo jih filtrirali skozi filter s porami premera 1,2 µm in tako odstranili gojišče, v katerem so rasle. Nato smo alge sprali z razredčevalno vodo in razredčili do določene meje. Koncentracijo alg smo določali spektrofotometrično ter količino ogljika v njeni suspenziji določili s pomočjo predhodno pripravljene umeritvene krivulje. Vodne bolhe smo hranili tako, da je vsaka od njih dobila 0,1 do 0,2 mg ogljika dnevno.

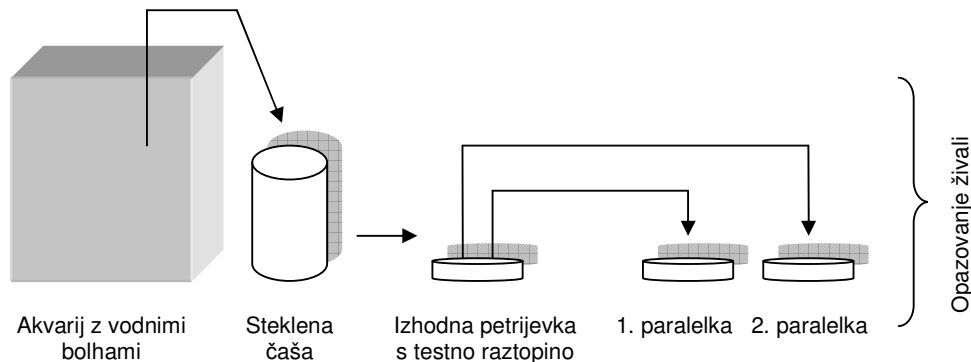
#### 3.3.5.2 Potek akutnega testa

Pred testom smo preverili občutljivost živali z referenčno kemikalijo (kalijev dikromat). Tako kot je predpisano v standardu, so bili testi opravljeni z živalmi vsaj tretje generacije in starimi manj kot 24 ur, v temperiranem prostoru na 20±2 °C; fotoperioda je bila 16 ur svetlobe, 6 ur teme. Pripravili smo 5 koncentracij vzorca izcedne vode. Po enačbi (11) iz poglavja 3.3.3.1 smo izračunali potreben volumen vzorca in za redčenje uporabili razredčevalno vodo tako, kot je predpisano v standardu, ter po 20 ml

raztopine prelili v steklene petrijevke. Razredčevalna voda ne vsebuje hranil in omogoča živalim zgolj preživetje. Vsaki koncentraciji vzorca smo izpostavili po 20 živali (2 paralelki po 10 živali) tako, da gostota ni presegala 5 živali na 10 ml raztopine in jih med testom nismo hranili. Pripravili smo tudi kontrolo (razredčevalna voda brez testnega vzorca izcedne vode), kjer smo 10 živali izpostavili istim pogojem. Živali smo v kapljici medija s pomočjo pipete prestavili v petrijevke. Pri tem smo pazili, da žival ni prišla v stik z zrakom, ki bi ji prišel pod karapaks in oviral gibanje. Ob tem smo skušali z živaljo prestaviti čim manjši volumen medija. Da bi se izognili redčenju testnih koncentracij smo po 20 živali prestavili v testno raztopino (s testno koncentracijo) in nato po 10 v vsako testno petrijevko. Potek prestavljanja živali prikazuje slika 9. Po 24 in po 48 urah smo prešteli gibljive in negibljive živali tako, da smo petrijevko stresli in prešteli koliko živali je plavalo oziroma se premikalo. Bili smo previdni, saj žival lahko premika antene, vendar to še ne pomeni, da plava. Na koncu smo ovrednotili rezultate in narisali graf (priloga D), kjer abscisa označuje koncentracijo vzorca, ordinata pa odstotek negibnih živali. S »probit« analizo smo s pomočjo računalniškega programa izračunali 24 in 48h EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, in EC<sub>90</sub> (US EPA, 1994). Enačba (12) kaže izračun faktorja redčenja vzorca (S<sub>D</sub>). Faktor redčenja smo nato primerjali z največjim zakonodajno dovoljenim faktorjem za neposredni izpust iztoka v vode.

$$S_D = \frac{100}{24h EC_{50}} \quad (12)$$

S<sub>D</sub>.....faktor razredčenja



**Slika 9:** Izvedba testa akutne strupenosti z vodnimi bolhami

### 3.3.6 Test kronične strupenosti

Test smo izvedli po mednarodnem standardu ISO 10706: 2000. Testni organizem so bile vodne bolhe (*Daphnia magna*). Samice 2. do 5. generacije, stare manj kot 24 ur smo izpostavili različnim koncentracijam vzorca za 21 dni ter beležili število preživelih živali in število mladih v 21 dneh, ki smo ga izrazili kot skupno število mladih na vodno bolho. Gojenje vodnih bolh je opisano v poglavju 3.3.5.1.

### 3.3.6.1 Potek testa

Poleg kontrole smo pripravili 5 različnih koncentracij tako, da je bila od začetne vsaka naslednja koncentracija manjša za faktor 2. Za kontrolo in vsako koncentracijo testnega vzorca izcedne vode je bilo po 10 paralelk. Test za vsak vzorec izcedne vode (U1, U2, U3, U4) smo izvedli vsaj dvakrat, pri tem pa smo skušali izbrati čim bolj primerne koncentracije za določitev LOEC in NOEC vrednosti. Izcedno vodo smo redčili z medijem M4 (razredčevalna voda), ki smo ga pripravili tako, kot je predpisano v standardu in vsebuje nekatera makrohranila in vitamine. Kot najvišjo koncentracijo v posameznem testu smo vzeli 24h EC50 vrednost, ki smo jo določili v akutnem testu strupenosti na vodne bolhe. Začetno koncentracijo vzorca smo pripravili v bučko z volumnom 1 l. Volumen vzorca, ki smo ga dodali mediju M4, smo izračunali po enačbi (9) iz poglavja 3.3.3.1. Nato smo 500 ml začetne raztopine prelili v 500 ml bučko, in preostalo raztopino redčili z medijem M4 (v razmerju 1:1). V steklene čaše z volumnom 100 ml smo prelili po 50 ml vzorca in s kapalko prestavili po 1 žival v čaše. Žival ni smela biti v stiku z zrakom, ker bi ta lahko prišel pod karapaks in bi oviral vitalne funkcije živali. Torej smo majhen volumen medija prenesli z živaljo v testno raztopino, vendar je bil ta volumen zanemarljivo majhen, saj smo pri tem pazili da smo prenesli čim manjši volumen medija. Temperatura okolja, kjer smo izvajali test je bila konstantna  $21 \pm 2$  C. Fotoperioda je bila 16 ur svetlobe, 6 ur teme. Vsaj trikrat tedensko smo žival s pipeto prenesli v čašo z novo pripravljeno raztopino (isti vzorec, ista koncentracija). S tem smo zagotovili enako izpostavljenost skozi ves čas trajanja testa, v primeru če bi s časom testni vzorec razpadal (zaradi fotorazgradnje ali zaradi mikrobne aktivnosti). Potem smo prešteli mlade in jih izločili. Vsak dan smo živali tudi hranili z algami *Desmodesmus subspicatus*, tako, da je vsaka vodna bolha dobila od 0,1 do 0,2 mg ogljika dnevno (glej poglavje 3.3.5.1).

Podatke o številu mladih smo izrazili kot povprečno število mladih na vodno bolho in jih primerjali s povprečnim številom mladih v kontroli. S pomočjo grafa (priloga E) kjer je abscisa označevala koncentracijo vzorca, ordinata pa število mladih na samico po 21 dneh, smo prikazali vpliv vzorcev na živali. Z Dunnettovo analizo (računalniški program) smo izračunali vrednosti 21d NOEC in 21d LOEC (US EPA, 1994). Strupenost smo ocenjevali glede na povečano število mladih.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Fizikalno kemijske analize

Rezultate fizikalno kemijskih analiz smo v preglednici 2 predstavili kot povprečno vrednost vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Velike vrednosti KPK kažejo na organsko onesnaženje. Večina merjenih parametrov se na iztoku iz čistilne naprave zmanjša, z izjemo  $\text{NO}_3^-$  (nitrati ioni) in  $\text{NO}_2^-$  (nitritni ioni).

**Preglednica 2:** Povprečni rezultati fizikalno kemijskih analiz vzorcev izcedne vode s standardnimi odkloni

Parameter	Enota	Mejne vrednosti (Ur.l. RS št. 72, 2008)		Rezultat				Učinek čiščenja * [%]
		odvajanje v javno kanalizacijo	odvajanje neposredno in posredno v vode	U1	U2	U3	U4	
KPK (kemijska potreba po kisiku)	mg/l	-	300	-	-	2455 ± 50	1130 ± 15	54
BPK <sub>5</sub> (biološka potreba po kisiku)	mg/l	-	30	-	-	150 ± 60	43 ± 20	71
pH (pH vrednost)	/	6,5 – 9,5	6,5 – 9,0	8,0± 0,1	8,9± 0,1	8,2 ±0,1	8,4 ±0,1	-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (amonijevi ioni)	mg/l	≥100	50	-	-	700 ±200	160 ±40	77
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (nitratni ioni)	mg/l	-	-	-	-	172 ± 5	302 ± 11	-
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (nitritni ioni)	mg/l	-	-	-	-	62 ±17	116 ± 29	-
Cl <sup>-</sup> (kloridni ioni)	mg/l	-	-	-	-	1388 ±190	708 ±70	49
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (fosfatni ioni)	mg/l	-	-	-	-	66 ±1	40 ±1	39
TC (celotni ogljik)	mg/l	-	-	-	-	1132 ±23	260 ±5	77
IC (anorganski ogljik)	mg/l	-	-	-	-	796 ±16	120 ±3	85
DOC (raztopljeni organski ogljik)	mg/l	-	-	-	-	336 ±7	40 ±1	88

\* učinek čiščenja smo izrazili s primerjavo U3 in U4 vzorcev  
- ni podatka

Učinek čiščenja smo izračunali tako, da smo koncentracijo merjenega parametra iztoka izcedne vode iz ČN delili s koncentracijo merjenega parametra vtoka na ČN. Primer kaže enačba (13).

$$\% \text{ čiščenja} = 100 - \left( \frac{a_{\text{iztok}}}{a_{\text{vtok}}} \times 100 \right) \quad (13)$$

$a_{\text{iztok}}$ .....vrednost parametra v vzorcu izcedne vode na iztoku na ČN  
 $a_{\text{vtok}}$ .....vrednost parametra v vzorcu izcedne vode na vtoku na ČN

Biološko čiščenje je bilo učinkovito pri odstranjevanju organskih snovi, saj so se koncentracije kemijskih parametrov, ki so pokazatelji organskega onesnaženja kot so KPK, BPK<sub>5</sub>, TC občutno znižali v primerjavi z nečiščenimi vzorci. V vzorcu U4 sta se občutno povečali koncentraciji nitratnega in nitritnega iona (preglednica 2). Predvidevamo, da je to zaradi nitrifikacije.

Podatki fizikalno kemijskih analiz kažejo, da ob upoštevanju veljavne zakonodaje niti vtoki niti iztoki izcednih vod iz ČN niso primerni za odvajanje neposredno in posredno v vode (Ur.l. RS št. 72, 2008). Vsi parametri razen pH vrednosti so namreč preseženi. Dovoljeno pa je odvajanje izcedne vode v javno kanalizacijo.

## 4.2 Testi akutne strupenosti

### 4.2.1 Test akutne strupenosti z bakterijami (*Vibrio fischeri*)

Test akutne strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri* se je v predhodnih raziskavah izkazal kot zelo primeren presejalni test za hitro oceno strupenosti odpadnih vod. Vrednost IC<sub>50</sub> je pri vzorcu U1 najnižja (10,8 vol.%), vzorec U3 kaže podobno strupenost kot U1, vzorec U4 pa ni strupen. Iztoka sta si po strupenosti, glede na test z bakterijami, podobna. Rezultati kažejo, da si po strupenosti tako sledijo vzorci: U1> U3> U2> U4 (preglednica 3).

**Preglednica 3:** Vrednosti 30min IC<sub>50</sub> za testni sistem z bakterijami (*Vibrio fischeri*)

<i>Vibrio fischeri</i>	U1	U2	U3	U4
30 min IC <sub>50</sub> [vol.%]	10,8	>80	18,2	>100

### 4.2.2 Test akutne strupenosti z zarodki rib zebrič (*Danio rerio*)

Vrednost 24h LC<sub>50</sub> za testni sistem z zarodki zebrič (*Danio rerio*) je najnižja pri vzorcu U1 (3,2 vol. %), najvišja pa pri vzorcu U4 (24,7 vol. %) (preglednica 4). Test z zarodki rib zebrič kaže, da sta si vtoka v ČN (U1, U3) in iztoka iz ČN (U2, U4) po strupenosti zelo podobna. Vzorci si po strupenosti sledijo tako: U1> U3> U2> U4.

**Preglednica 4:** Vrednosti 24h LC<sub>50</sub> za testni sistem z zarodki zebrič

<i>Danio rerio</i> zarodki	U1	U2	U3	U4
24 h LC <sub>50</sub> [vol.%]	3,2	22,2	6,3	24,7

#### 4.2.3 Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Najnižja 24 urna vrednost  $EC_{50}$  je pri vzorcu U1 (3,6 vol. %), najvišja pa pri vzorcu U4 (32,8 vol. %). 24 urne vrednosti  $EC_{50}$  za testni sistem z vodnimi bolhami kažejo enako zaporedje strupenosti vzorcev kot ostali akutni testi:  $U1 > U3 > U2 > U4$  (preglednica 5). Tako kot v primeru testa z zarodki zebrič kaže tudi test z vodnimi bolhami podobno strupenost vzorcev U1 ter U3 in U2 ter U4. S stališča faktorja redčenja, ki je po zakonodaji največ 4 (Ur.l. RS št. 72, 2008), je edino vzorec U4 primeren za izpust neposredno v vode.

**Preglednica 5:** Vrednosti  $EC_{50}$  in faktor razredčenja za testni sistem z vodnimi bolhami

<i>Daphnia magna</i>	U1	U2	U3	U4
24 h $EC_{50}$ [vol.%]	3,6	20,6	5,1	32,8
48 h $EC_{50}$ [vol.%]	3,4	16,8	4,8	18,6
$S_D$ (faktor razredčenja)	27,8	4,9	19,6	3,0

#### 4.2.4 Test akutne strupenosti z odraslimi zebričami (*Danio rerio*)

Test akutne strupenosti z odraslimi zebričami kaže na zelo ozek interval koncentracij vzorcev, ki niso povzročale smrti rib do pogina vseh izpostavljenih zebrič. Test smo izvajali z vzorcema U3 in U4. Teste z odraslimi ribami smo izvedli z majhnim številom izpostavljenih rib (3), ker smo glede na trende o manjši uporabi vretenčarjev v poskusne namene, želeli omejiti njihovo uporabo. Rezultati, ki jih podajamo, so okvirna ocena, za točno določitev 96h  $LC_{50}$  pa bi potrebovali več zebrič, 96 urna vrednost  $LC_{50}$  za vzorec U4 je bila 14,6 vol. odstotkov. Pri 12,8 vol. % vzorca U4 so preživele vse izpostavljene ribe, pri 16,3 vol. % pa so vse poginile. Zanimivo je to, da so vse ribe poginile že po 24 urah in se stanje v naslednjih 72 urah ni več spreminjalo. 24 in 96 urni vrednosti  $LC_{50}$  za vzorec U4 sta enaki.

Prav tako je bil učinek vzorca U3 zelo hiter, saj se smrtnost rib po 24 urah izpostavljenosti ni več spremenila. Pri preliminarnem testiranju z vzorcem U3 so pri koncentraciji 1,0 vol. % vse ribe preživele, pri 2,4 vol. % pa so vse ribe poginile. Pravilne vrednosti 96h  $LC_{50}$  ne moremo podati, saj imamo na voljo nezadostne podatke.

#### 4.2.5 Primerjava občutljivosti testnih sistemov

Če primerjamo  $EC_{50}$  (ali  $LC_{50}$ ) vrednosti, sta se kot najbolj občutljiva izkazala testna sistema akutne strupenosti z vodnimi bolhami in zarodki rib zebrič. Za najmanj



občutljivega pa smo ocenili testni sistem z bakterijo *Vibrio fischeri* (preglednice 6 - 9). Če bi imeli več podatkov o testnih sistemih z odraslimi zebričami *Danio rerio*, bi bil to predvidoma najobčutljivejši sistem, tako kot se je izkazalo pri vzorcu U4. Na žalost pa nismo dobili zadovoljivih podatkov pri vzorcu U3 in nismo mogli natančno definirati LC<sub>50</sub> vrednosti. Za teste z ribami je namreč značilno, da obstaja zelo ozek interval koncentracij v katerem snov deluje od normalnega stanja do letalnega stanja za ribe. Test smo z vzorcem U3 izvedli trikrat, nato smo končali zaradi etičnih razlogov. Zaradi tega smo tudi nadaljevali delo z zarodki zebrič, ki se smatrajo kot eno izmed možnih nadomestil testov z odraslimi ribami.

**Preglednica 6:** Akutna strupenost izcedne vode U1

U <sub>1</sub> [vol. %]	<i>Vibrio fischeri</i> (IC vrednosti)	<i>Daphnia magna</i> (EC vrednosti)		<i>Danio rerio</i> zarodki (LC vrednosti)
Čas izpostavitve	30 min	24 h	48 h	48 h
EC <sub>10</sub> (IC <sub>10</sub> ) (LC <sub>10</sub> )	0,9	3,1	2,7	2,2
EC <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> ) (LC <sub>50</sub> )	10,8	3,6	3,4	3,2
EC <sub>90</sub> (IC <sub>90</sub> ) (LC <sub>90</sub> )	>100	4,1	4,1	4,2

**Preglednica 7:** Akutna strupenost izcedne vode U2

U <sub>2</sub> [vol. %]	<i>Vibrio fischeri</i> (IC vrednosti)	<i>Daphnia magna</i> (EC vrednosti)		<i>Danio rerio</i> zarodki (LC vrednosti)
Čas izpostavitve	30 min	24 h	48 h	48 h
EC <sub>10</sub> (IC <sub>10</sub> ) (LC <sub>10</sub> )	12,4	17,2	14,4	13,5
EC <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> ) (LC <sub>50</sub> )	>80,0	20,6	16,8	22,2
EC <sub>90</sub> (IC <sub>90</sub> ) (LC <sub>90</sub> )	>80,0	24,7	19,5	30,9

**Preglednica 8:** Akutna strupenost izcedne vode U3

U <sub>3</sub> [vol. %]	<i>Vibrio fischeri</i> (IC vrednosti)	<i>Daphnia magna</i> (EC vrednosti)		<i>Danio rerio</i> zarodki (LC vrednosti)
Čas izpostavitve	30 min	24 h	48 h	48 h
EC <sub>10</sub> (IC <sub>10</sub> ) (LC <sub>10</sub> )	1,3	4,3	4,1	5,6
EC <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> ) (LC <sub>50</sub> )	18,2	5,1	4,8	6,3
EC <sub>90</sub> (IC <sub>90</sub> ) (LC <sub>90</sub> )	>100,0	6,1	5,6	6,9

**Preglednica 9:** Akutna strupenost izcedne vode U4

U <sub>4</sub> [vol. %]	<i>Vibrio fischeri</i> (IC vrednosti)	<i>Daphnia magna</i> (EC vrednosti)		<i>Danio rerio</i> zarodki (LC vrednosti)	<i>Danio rerio</i> odrasle ribe (LC vrednosti)
Čas izpostavitve	30 min	24 h	48 h	48 h	96 h
EC <sub>10</sub> (IC <sub>10</sub> ) (LC <sub>10</sub> )	4,3	19,6	12,6	22,9	13,2
EC <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> ) (LC <sub>50</sub> )	>50	32,8	18,6	24,7	14,6
EC <sub>90</sub> (IC <sub>90</sub> ) (LC <sub>90</sub> )	>50	54,9	27,3	26,6	16,0

#### 4.2.6 Učinek čiščenja na biološki čistilni napravi

Po enačbi (13) lahko glede na vrednosti EC<sub>50</sub> po 24 urah pri akutnem testu z vodnimi bolhami ocenimo učinek čiščenja na biološki čistilni napravi (ČN). V primeru U1 je učinek čiščenja 83 %, saj je 24 urna vrednost EC<sub>50</sub> pri vzorcu U1 šestkrat nižja v primerjavi z vzorcem U2. Enako, šestkratno, zmanjšanje 24 urne vrednosti EC<sub>50</sub> v testu z vodnimi bolhami je pri vzorcih U3 in U4 (24 urna vrednost EC<sub>50</sub> iztoka je šestkrat višja od vtoka). V primeru vzorca U3 je učinek čiščenja 73 %, kar je podobno kot pri vzorcu U1.

$$\% \text{ čiščenja} = 100 - \left( \frac{24hEC_{50 \text{ vtok na ČN}}}{24hEC_{50 \text{ iztok iz ČN}}} \times 100 \right) \quad (14)$$

24hEC<sub>50</sub> vtok na ČN.....vrednost EC<sub>50</sub> po 24 urni izpostavitvi vzorca izcedne vode vtoka na ČN

24hEC<sub>50</sub> iztok na ČN..... vrednost EC<sub>50</sub> po 24 urni izpostavitvi vzorca izcedne vode iztoka iz ČN.

### 4.3 Testi kronične strupenosti

#### 4.3.1 Test kronične strupenosti z zelenimi algami (*Desmodesmus subspicatus*)

Za najbolj strupenega se je izkazal vzorec U1 z 72 urno vrednostjo IC<sub>50</sub> 6,6 vol. %. Najmanj strupen je bil vzorec U2. Po strupenosti, ki jo kaže testni sistem z zelenimi algami, si vzorci sledijo tako: U1 > U3 > U4 > U2. Vzorca U2 in U4 sta si po strupenosti za zelene alge podobna. 72 urna vrednost IC<sub>50</sub> je pri vzorcu U2 59,0 vol. %, pri vzorcu U4 pa 54,2 vol. % (preglednica 10).

Nekateri preliminarni testi so pokazali povečanje rasti zelenih alg pri zelo nizkih koncentracijah. V definitivnih testih smo nato uporabili koncentracije vzorcev, ki so delovale zavirajoče na rast alg in določali IC vrednosti. Vrednosti so povzete v preglednici 10.

**Preglednica 10:** Kronična strupenost vzorcev izcednih vod za zelene alge

<i>Desmodesmus subspicatus</i>	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	U <sub>4</sub>
Čas izpostavitve	72 h	72 h	72 h	72 h
(IC <sub>10</sub> ) [vol.%]	3,3	40,7	6,0	10,5
(IC <sub>50</sub> ) [vol.%]	6,6	59,0	21,3	54,2
(IC <sub>90</sub> ) [vol.%]	10,0	77,3	36,4	98,0

#### 4.3.2 Test kronične strupenosti z vodnimi bolhami

V preglednici 12 so povzete vrednosti 21d LOEC in 21d NOEC, ki smo jih izračunali z Dunnettovo analizo, kot je priporočeno v standardnem postopku. Pri tem smo opazovali pojav povečanja števila mladih glede na kontrolo, torej je bilo razmnoževanje pospešeno.

Samo pri vzorcu U3 smo opazili zmanjšano število mladih pri koncentraciji 2,5 vol. %. Zanimivo je to, da v istem testu pojav razmnoževanja pri višji koncentraciji (5,0 vol. %), ni bil moten in ni bilo statistično značilnega odstopanja od kontrole.

Vrstni red kronične strupenosti za vodne bolhe je sledeči: U1 > U2 > U4 > U3. Za najbolj strupenega se je izkazal vzorec U1, z najnižjimi vrednostmi 21d LOEC (0,03 vol. %) in 21d NOEC (0,01 vol. odstotkov). Vzorca U2 in U4 si, za razliko od akutnih, po rezultatih kroničnih testov nista podobna. Vzorec U2 ima 21d LOEC vrednost 0,94 vol. %, vzorec U4 pa 3,10 vol. odstotkov.

**Preglednica 11:** Kronična strupenost vzorcev izcednih vod za vodne bolhe glede na povečanje števila mladih

<i>Daphnia magna</i>	U1	U2	U3	U4
21d LOEC [vol.%]	0,03	0,94	-	3,10
21d NOEC [vol.%]	0,01	<0,94	5,00	1,56

#### 4.3.2.1 Hormeza

Pri kroničnih testih strupenosti smo ob nekaterih nizkih koncentracijah opazili stimulacijo življenjskih procesov. To je pojav hormeze. Pri vodnih bolhah *D. magna* smo opazili povečano razmnoževanje, pri zelenih algah *D. subspicatus* pa povečanje rasti. Vzorec U1 s koncentracijo 0,03 vol. % povzroči povečano razmnoževanje vodnih bolh, s koncentracijo 1,5 in 2,1 vol. % pa povzroči povečano rast alg. V primeru U2 vzorca opazimo povečano razmnoževanje vodnih bolh pri 0,94 vol. %, in povečano rast alg pri 15 do 25,4 vol. %. Vzorec U3 s koncentracijo 0,63 vol. % kaže rahlo povišanje št. mladih, vendar ni statistično značilno, s koncentracijo 5,0 vol. % pa povzroča povečano rast alg. V primeru vzorca U4 je pri koncentraciji 3,1 vol. % povečano razmnoževanje vodnih bolh. Pri vzorcu U4 sicer nismo opazili povečanja rasti alg v nobeni od testnih koncentracij izcedne vode. Če bi testirali pri nižjih koncentracijah, bi verjetno dobili nek interval koncentracij, pri katerih bi opazili hormezo. S preliminarnimi testi z algami smo iskali razpon koncentracij, ki povzročajo zaviranje rasti alg, zato se nismo osredotočali na indukcijo rasti. V definitivnih testih smo nato uporabili koncentracije vzorcev, ki so delovale zavirajoče na rast alg. Hormezo smo opazili, vendar je nadalje nismo raziskovali. Vzorcem izcednih vod lahko ob nekaterih nizkih koncentracijah pripišemo značilnost biostimulacije. Iz testov strupenosti z algami, ki kažejo na biostimulacijo, sklepamo na prisotnost organskih snovi v izcednih vodah, predvsem dušika in fosforja.

## 5 ZAKLJUČKI

Za preiskovanje strupenosti izcednih vod iz odlagališča komunalnih odpadkov smo uporabili fizikalno kemijske analize in serijo akutnih in kroničnih testov strupenosti z organizmi iz različnih trofičnih nivojev.

Vsi preiskovani vzorci izcednih vod so bili strupeni za vodne organizme. Vzorci izcednih vod so bili onesnaženi z organskimi snovmi, po biološkem čiščenju se je vsebnost organskih snovi v vzorcih zmanjšala, kar je vplivalo tudi na strupenost vzorcev. Največjo strupenost smo ugotovili pri vzorcu U1 (prvo vzorčenje vtoka izcedne vode na ČN), saj so akutni testi strupenosti pokazali vpliv na vitalne procese organizmov v koncentracijah pod 5,00 vol. %. Kronično strupenost smo zasledili še pri nižjih koncentracijah, in sicer pri 0,03 vol. %.

Raziskava, ki jo obsega diplomsko delo kaže, da sta se seriji vzorcev, odvzetih ob različnih časih, po strupenosti razlikovali. Največjo razliko med vzorcema U1 in U3 smo ugotovili pri kronični strupenosti na alge in vodne bolhe. Vzorca prvega vzorčenja izcednih vod (U1 in U2) sta bila bolj strupena od vzorcev drugega vzorčenja (U3, U4). Hkrati lahko povemo tudi to, da so vtoki izcedne vode na ČN (U1, U3) bolj strupeni od iztokov iz ČN (U2, U4) in tako potrdimo hipotezo

Pri kroničnih testih strupenosti smo ob nekaterih zelo nizkih koncentracijah vzorcev opazili stimulacijo življenjskih procesov. Prepoznali smo pojav hormeze, najverjetneje kot posledica visoke vsebnosti hranil. Pri testih z vodnimi bolhami *Daphnia magna* smo opazili povečanje števila mladih na vodno bolho. Podobno je bilo pri kroničnih testih strupenosti z algami *Desmodesmus subspicatus*, kjer smo opazili povečano rast. Hipotezo, da pričakujemo povečan obseg življenjskih procesov pri nekaterih nizkih koncentracijah izcedne vode, smo potrdili.

Rezultati fizikalno kemijskih analiz ter strupenosti kažejo, da ob upoštevanju veljavne zakonodaje (Ur.l. RS št. 72, 2008) tudi vzorca izcednih vod po biološkem čiščenju nista primerna za odvajanje neposredno v vode. Vsi parametri, razen pH vrednosti, in faktorja razredčenja ( $S_D$ ) v primeru vzorca U4, presegajo dovoljene mejne vrednosti, določene v zakonodaji. Dovoljeno pa je odvajanje izcedne vode v javno kanalizacijo.

Med akutnimi izpostavitvami so največjo občutljivost pokazale vodne bolhe *Daphnia magna* in ribe *Danio rerio*. Tudi v kronični izpostavitvi so bile vodne bolhe *Daphnia magna* občutljivejše od alg *Desmodesmus subspicatus*. Hipotezo, da se bo za najbolj občutljivejšega izkazal testni sistem z vodnimi bolhami, smo potrdili.

## 6 VIRI

Atlas okolja. Agencija Republike Slovenije za okolje, Ministrstvo za okolje in prostor.  
[http://gis.arso.gov.si/atlasokolja/profile.aspx?id=Atlas\\_Okolja\\_AXL@Arso](http://gis.arso.gov.si/atlasokolja/profile.aspx?id=Atlas_Okolja_AXL@Arso) (30.4.2009)

Chian E., DeWalle F. 1976. Sanitary landfill leachates and their treatment. *Journal of the environmental engineering division*, 102: 411-431

Črnica Zajc, N. 2003. Ocena biorazgradljivosti deponijskih izcednih vod z laboratorijskimi in pilotnimi poskusi, Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Derksen J.G.M. 2002. Microbiotests, Possibilities and Limitations. With special reference to (sub)tropical conditions and developing countries. Amsterdam, Aquasense: 76 str.

Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice W.E., Greenberg E.A. 2005. Standard methods for the examination of water & wastewater. 21st edition. Washington, American Public Health Association

Fendt K. 2003. Ecotoxicological Problems Associated with Contaminated Sites. *Toxicology Letters*, 140-141: 353-365

Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205: 223-240

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parella. 2002. A. Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere* 51: 85-94

ISO 5663; 1984. Water Quality- Determination of Kjeldahl nitrogen- Method after mineralization with selenium. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 5815; 2003. Water Quality- Determination of biochemical oxygen demand after n days ( $BOD_n$ ) - Dilution and seeding method. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 6060; 1989. Water Quality- Determination of chemical oxygen demand. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 6341; 1996. Water quality- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)- Acute toxicity test. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 7150/1; 1984. Water Quality- Determination of ammonium– Part 1: Manual spectrometric method. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 7346-1; 1996. Water quality- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 8245; 1983. Water Quality- Guidelines for determination of total organic carbon (TOC). International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 8692; 2004. Water quality- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 10706; 2000. Water quality- Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 11348-2; 2007. Water quality- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). International Organisation for Standardisation. Geneve.

ISO 15088; 2007. Water quality- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Organisation for Standardisation. Geneve.

Kazalci okolja 2005. 2006. Ančik E., Arih A., Bat m., Bernard Vukadin B., Blažič M., Bolte T., Burja A., Cegnar T., Čermelj B., Denac D., Gabrovec M., Gale I., Gjerek M., Jankovič V., Koce U., Kolar A., Kovač N., Kranjc M., Kušar U., Malešič I., Marolt D., Mavsar R., Mekkinda Majaron T., Mežan U., Mihorko P., Nartnik I., Pavšer N., Planinšek A., Plevnik A., Poje M., Remec Rakar Š., Rupnik J., Sotlar Z., Strojjan I., Suhadolnik Gjura N., Šarc B., Šegula A., Tome D., Trpin D., Turk I., Ulrich Supovec M., Vrezec A., Zec M., Žust A., Zupan N. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje: 242 str.  
<http://kazalci.arso.gov.si> (30.3.2009)

Koshy L., Jones T., BeruBe K. 2008. Bioreactivity of municipal solid waste landfill leachates- Hormesis and DNA damage. *Water research* 42: 2177-2183

Kovačič Viler A., Uhan J., Andjelov M., Kranjc S., Kranjc M., Zupan M., Kolenc A., Rejec Brancelj I., Čarni D., Bat M. 2002. Strokovne podlage za razglasitev ogroženosti podzemne vode v Republiki Sloveniji. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje: 101 str.

Rand M.G.. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assesment. 2nd edition. Florida, Ecological Services Inc: 1125 str.

Renou S., Givaduan J.G., Poulain S., Dirassouyan F., Moulin P. 2008. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials*, 150: 468-493

Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov. Ur.l. RS št. 72, 2008

Uredba o odlaganju odpadkov na odlagališčih. Ur.l. RS št. 32, 2006

Williams, P. T. 2005. Waste Treatment and Disposal, Second Edition. England, John Wiley & Sons: 375 str.

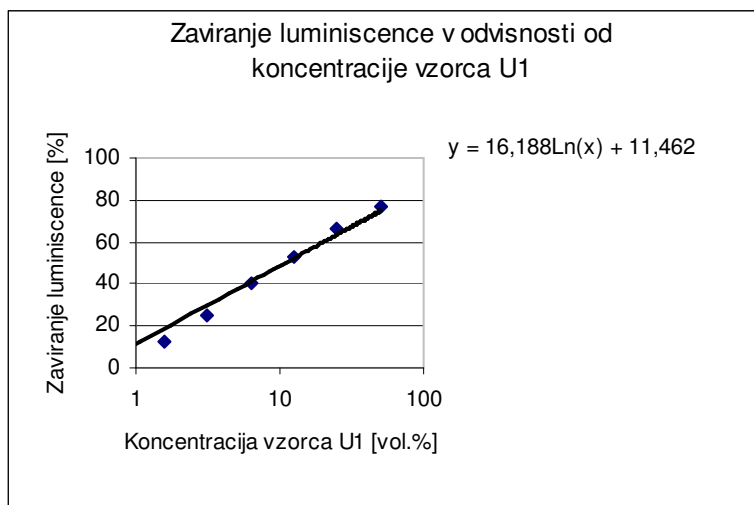
Zagorc Končan, J., Žgajnar Gotvajn, A., Roš, M., Drolc, A. 2004. Vaje iz ekološkega inženirstva. 3. razširjena izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo, Ljubljana.

## PRILOGE

### PRILOGA A: Rezultati testa akutne strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri*

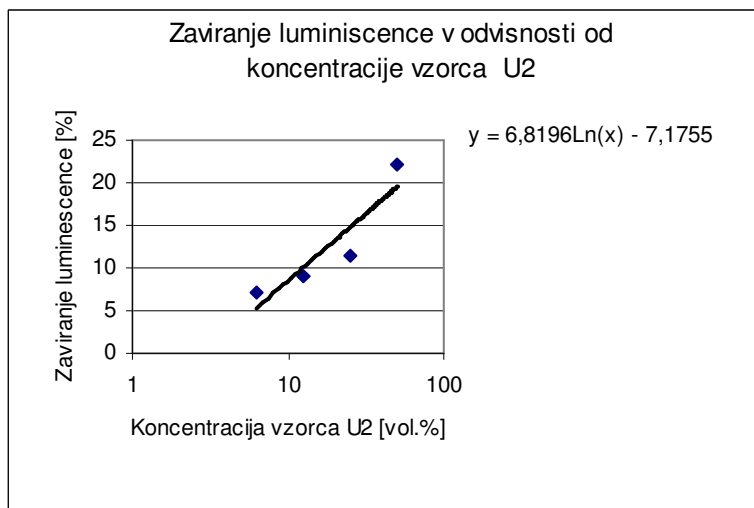
Vzorec U1: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U1 [vol.%]	Zaviranje luminiscence [%]
0,4	3,7
1,6	12,1
3,1	25,0
6,3	40,0
12,5	52,8
25,0	66,1
50,0	76,9



Vzorec U2: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

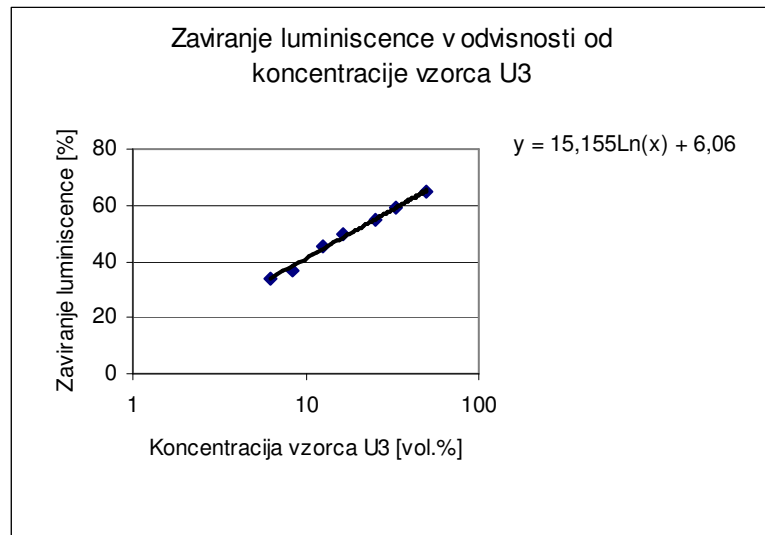
Konc. U2 [vol.%]	Zaviranje luminiscence [%]
1,6	-2,9
6,1	-4,7
6,3	7,1
12,5	9,0
25,0	11,5
50,0	22,0





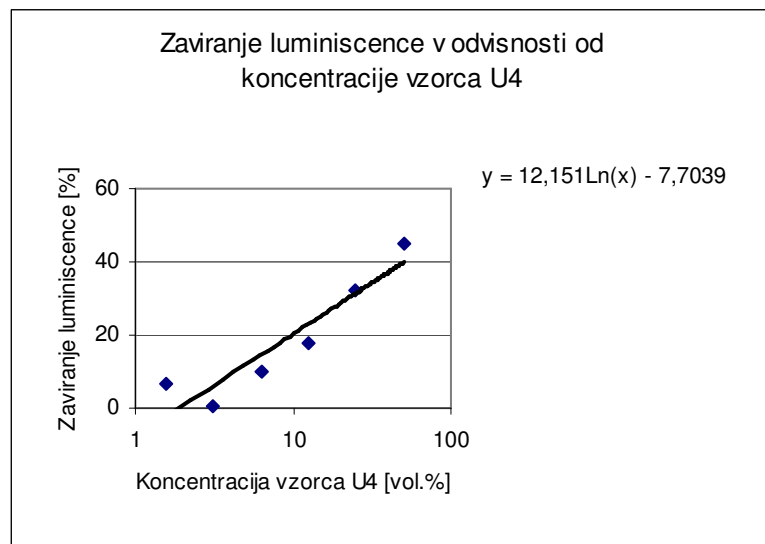
Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U3 [vol.%]	Zaviranje luminiscence [%]
6,3	34,0
8,3	36,5
12,5	45,4
16,7	49,8
25,0	55,0
33,3	59,0
50,0	64,8



Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

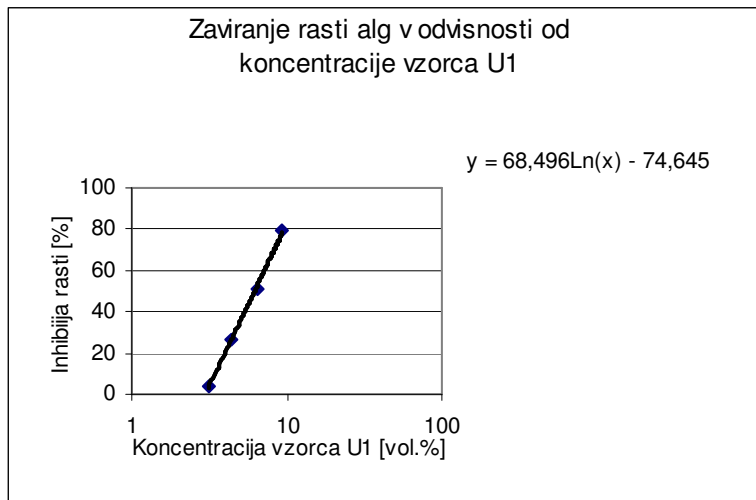
Konc. U4 [vol.%]	Zaviranje luminiscence [%]
1,6	6,6
3,1	0,7
6,3	10,2
12,5	17,7
25,0	32,4
50,0	45,1



## PRILOGA B: Rezultati testa kronične strupenosti z algami (*Desmodesmus subspicatus*)

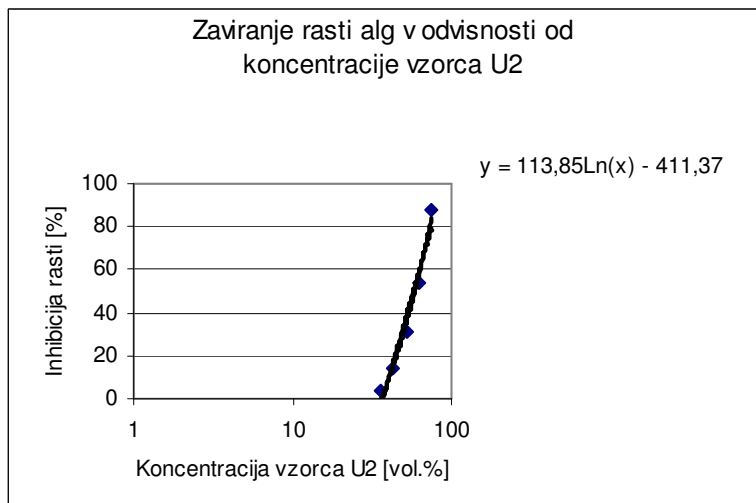
Vzorec U1: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U1 [vol.%]	Inhibicija rasti [%]
1,5	-2,4
2,1	-0,5
3,1	3,8
4,4	26,1
6,4	51,2
9,3	79,2



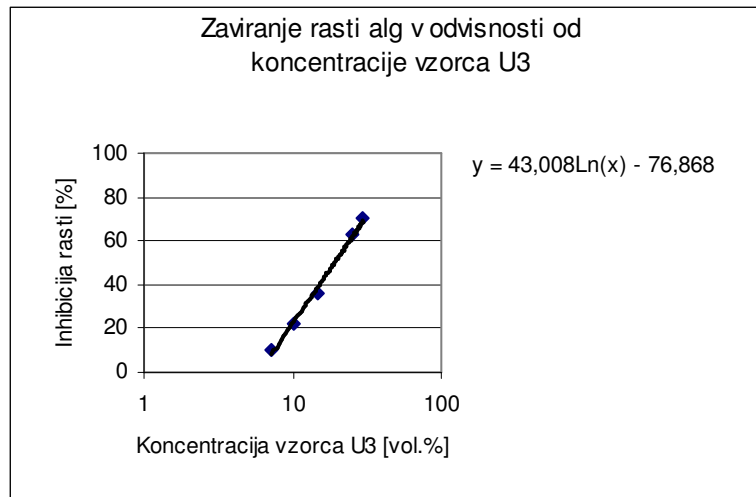
Vzorec U2: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

Konc. U2 [vol.%]	Inhibicija rasti [%]
36	4,2
43,2	13,8
51,8	30,8
62,2	53,6
74,6	88,0



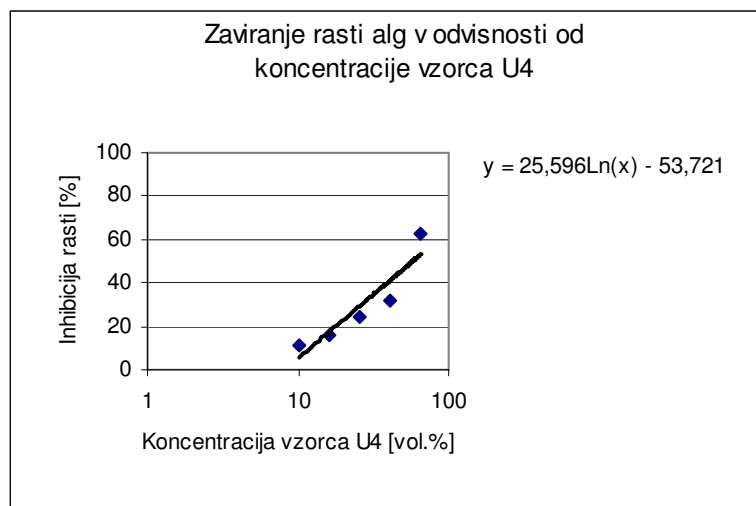
Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U3 [vol.%]	Inhibicija rasti [%]
7,2	9,9
10,2	22,2
14,6	35,8
25,4	62,9
29,9	70,2



Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

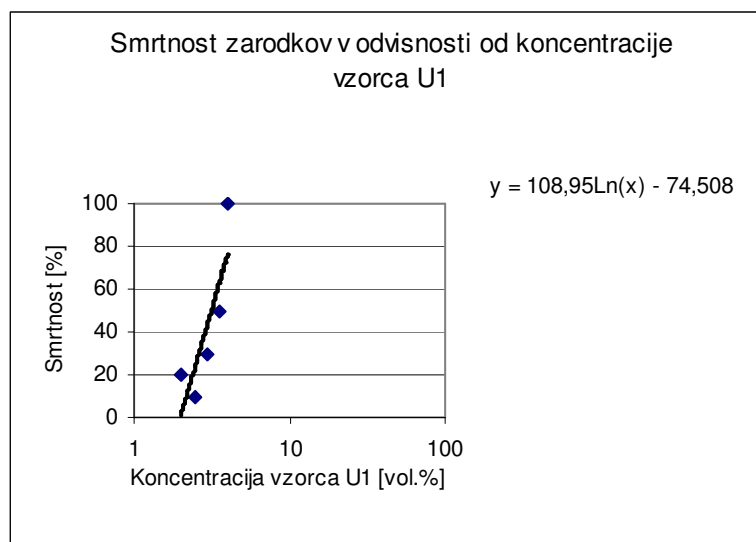
Konc. U4 [vol.%]	Inhibicija rasti [%]
10,0	10,9
16,0	16,0
25,6	24,4
41,0	31,9
65,0	63,0



## PRILOGA C: Rezultati testa akutne strupenosti z zarodki rib zebrić (*Danio rerio*)

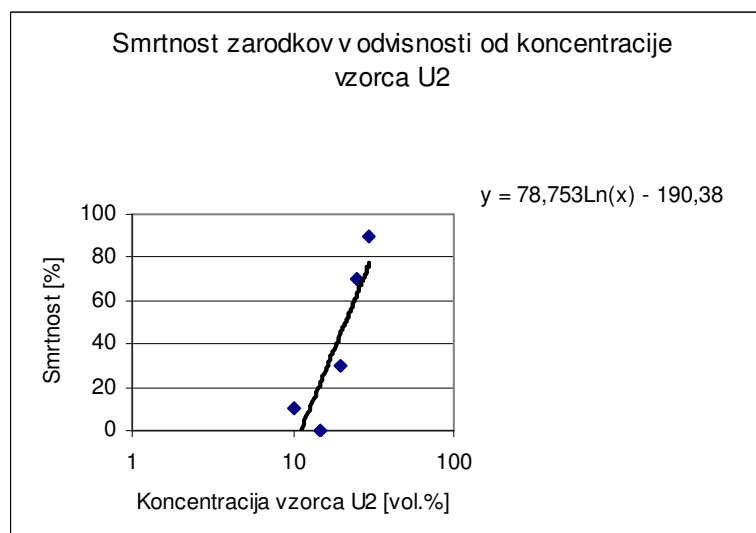
Vzorec U1: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U1 [vol.%]	Mrtvi zarodki [%]
2,0	20,0
2,5	10,0
3,0	30,0
3,5	50,0
4,0	100



Vzorec U2: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

Konc. U2 [vol.%]	Mrtvi zarodki [%]
10,0	10,0
15,0	0
20,0	30,0
25,0	70,0
30,0	90,0



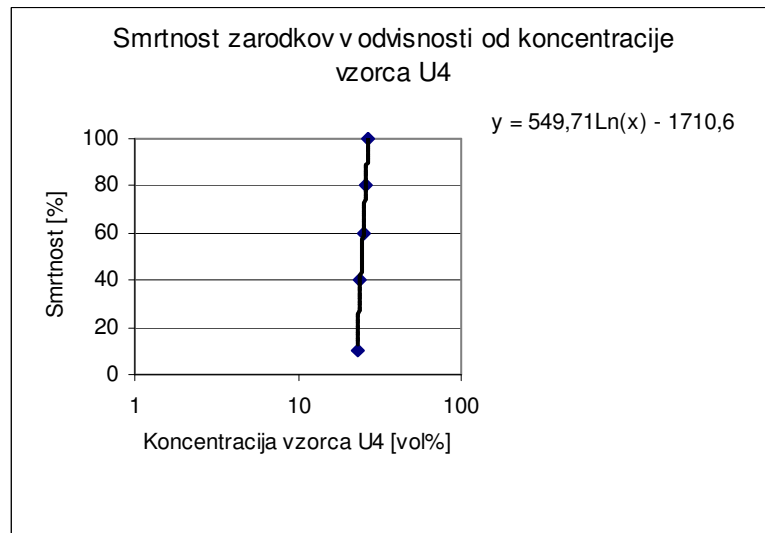
Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U3 [vol.%]	Mrtvi zarodki [%]
5,5	20,0
6,0	20,0
6,5	60,0
6,7	90,0
6,8	100
7,0	100



Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave

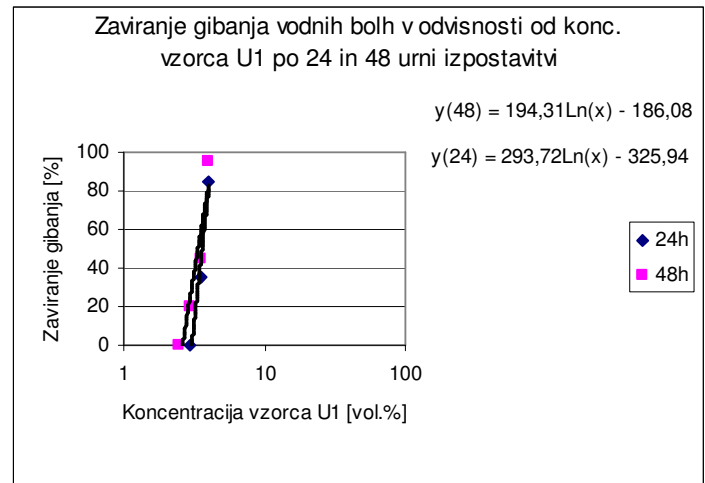
Konc. U4 [vol.%]	Mrtvi zarodki [%]
23,0	10,0
24,0	40,0
25,0	60,0
26,0	80,0
27,0	100,0



**PRILOGA D: Rezultati testa akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)**

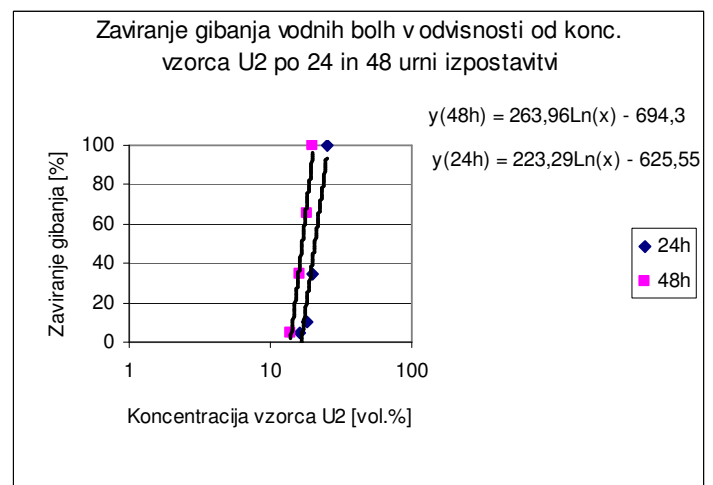
Vzorec U1: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo

Konc. U1 (vol.%)	negibne živali [%]	
	24h	48h
2	0	5
2,5	0	0
3	0	20
3,5	35	45
4	85	95



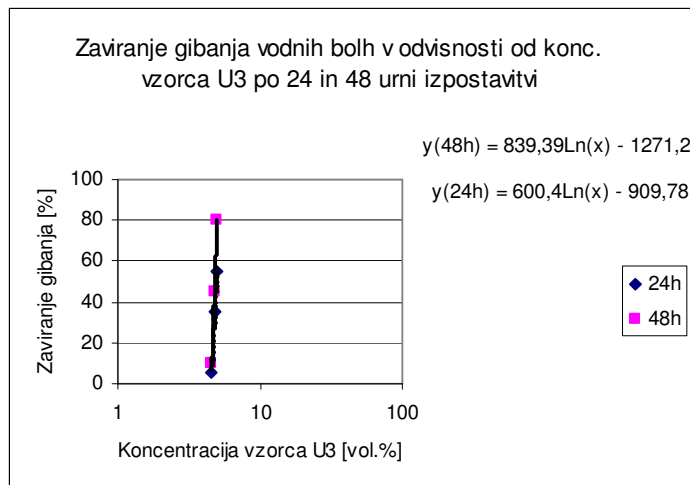
Vzorec U2: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

Konc. U2 (vol.%)	negibne živali [%]	
	24h	48h
14	0	5
16	5	35
18	10	65
20	35	100
25	100	100



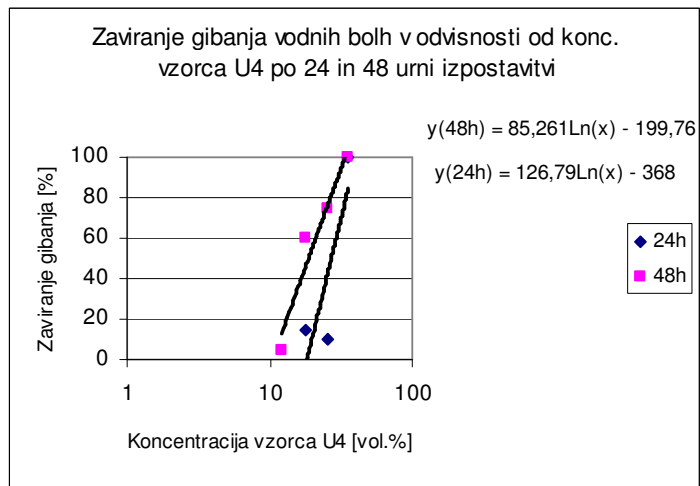
Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc U3 [vol.%]	negibne živali [%]	
	24h	48h
4	10	15
4,2	5	10
4,6	5	10
4,8	35	45
5	55	80



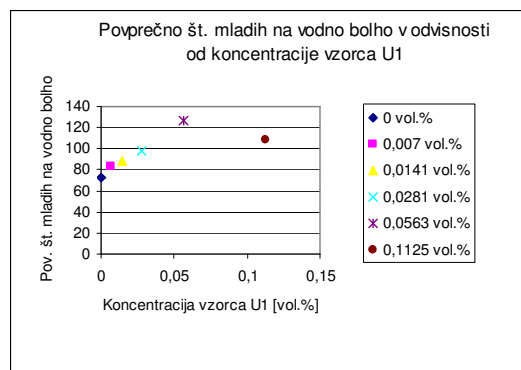
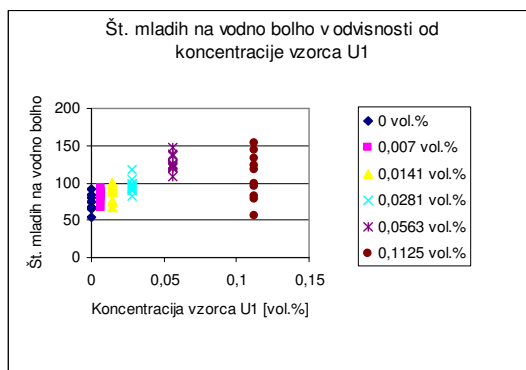
Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

Konc. U4 [vol.%]	negibne živali [%]	
	24h	48h
8,6	0	0
12,1	0	5
18,1	15	60
25,3	10	75
35,4	100	100

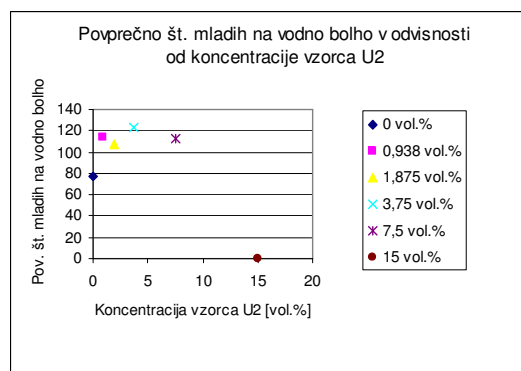
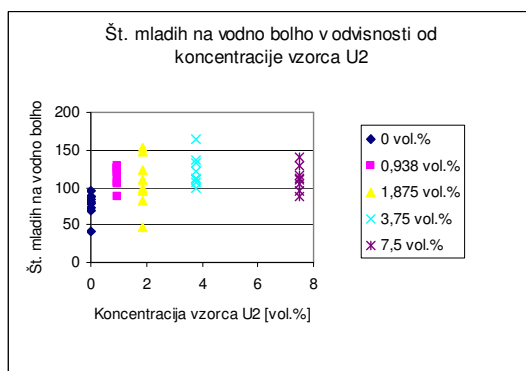


## PRILOGA E: Rezultati testa kronične strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Vzorec U1: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

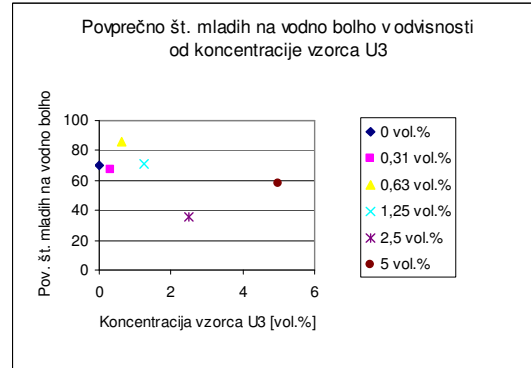
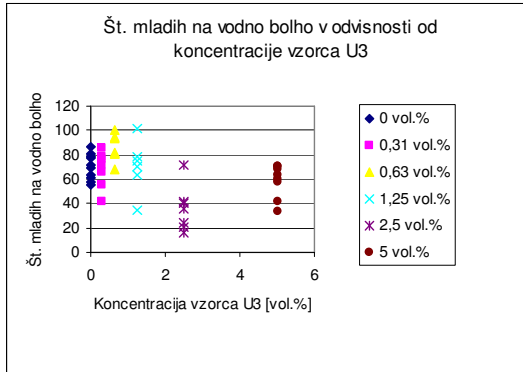


Vzorec U2: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

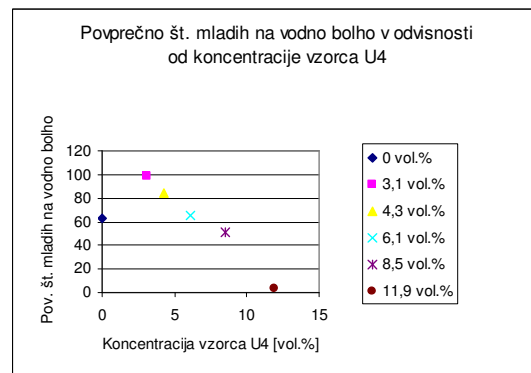
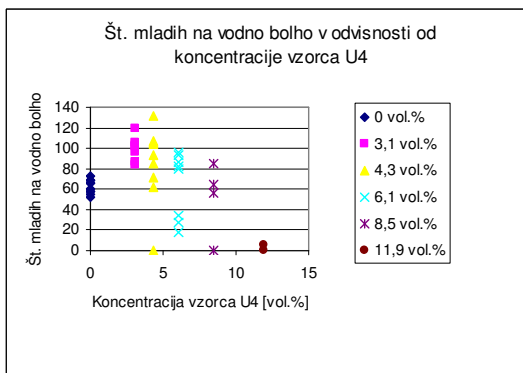




Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:



Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:



**PRILOGA F: Rezultati testa akutne strupenosti z ribami (*Danio rerio*)**

Vzorec U3: vtok izcedne vode na biološko čistilno napravo:

Konc. U3 [vol.%]	Smrtnost rib [%]			
	Po 24 urah	Po 48 urah	Po 72 urah	Po 96 urah
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2,4	100	100	100	100
5,5	100	100	100	100
13	100	100	100	100
30	100	100	100	100

Vzorec U4: iztok izcedne vode iz biološke čistilne naprave:

Konc. U4 [vol.%]	Smrtnost rib [%]			
	Po 24 urah	Po 48 urah	Po 72 urah	Po 96 urah
0	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11,3	0	0	0	0
12,8	0	0	0	0
14,4	42,9	42,9	42,9	42,9
16,3	100	100	100	100