

Metodika pro stanovení podmínek bezpečného využití vody a kalu z čistíren odpadních vod v zemědělství

Mgr. Vít Kodeš, Ph.D., doc. Mgr. Roman Grabic, Ph.D., prof. Ing. Radka Kodešová, CSc.



Certifikovaná metodika

2023

Metodika pro stanovení podmínek bezpečného využití vody a kalu z čistíren odpadních vod v zemědělství

Mgr. Vít Kodeš, Ph.D., doc. Mgr. Roman Grabic, Ph.D., prof. Ing. Radka Kodešová, CSc.

Certifikovaná metodika

2023

Autoři:

Mgr. Vít Kodeš, Ph.D., Český hydrometeorologický ústav

doc. Mgr. Roman Grabic, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

prof. Ing. Radka Kodešová, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze

Oponenti:

doc. Ing. Branislav Vrana, Ph.D., Masarykova univerzita

Ing. Michaela Budňáková, Ministerstvo zemědělství

Metodika byla schválena Odborem rostlinných komodit Ministerstva zemědělství
(osvědčení č. MZE-70957/2023-13123)

© Český hydrometeorologický ústav, Česká zemědělská univerzita v Praze,
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2023

ISBN 978-80-7653-064-5 (pdf)

Obsah

1. Cíl metodiky	5
2. Aktuální stav	5
2.1 Legislativní a normativní rámec	5
2.1.1 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody	5
2.1.2 Zákon 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů	5
2.1.3 Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech	6
2.1.4 Nařízení vlády 416/2010 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod podzemních	6
2.1.5 ČSN 75 7143 (757143) Jakost vod. Jakost vody pro závlahu	6
2.1.6 TNV 75 4310 Závlahová zařízení pro mikrozávlahy	6
2.1.7 Metodika „Kritéria využití městských odpadních vod k závlaze zemědělských plodin“	6
2.2 Stav poznání a dostupná data	7
2.3 Dostupné analytické metody	10
2.3.1 Cílené chemické analýzy	14
2.3.2 Necílené chemické analýzy	17
2.3.3 Metody analýzy biologického účinku	18
2.3.4 Kombinace chemických analýz a metod analýz biologického účinku (EDA)	22
3. Popis metodiky	25
3.1 Úvod	25
3.2 Vzorkování	25
3.2.1 Frekvence vzorkování	25
3.2.2 Vzorkovací techniky	25
3.3 Postup posouzení podmínek bezpečného využití vody a kalů z ČOV	27
4. Srovnání novosti postupů	30
5. Popis uplatnění metodiky	30
6. Ekonomické aspekty	31
7. Seznam literatury	33
8. Seznam publikací, které předcházely zpracování metodiky	39
9. Oponenti	41
10. Dedikace	41

Seznam zkratek:

AOP:	adverse outcome pathway (dráha nežádoucích účinků)
API:	atmospheric pressure ionization (ionizace za atmosférického tlaku)
BSK-5:	5-ti denní biochemická spotřeba kyslíku
DIA QTOF:	data independent analysis quadrupole Time-of-Flight (datově nezávislý sběr dat na hybridním kvadrupólu Time-of-Flight)
EBT:	effect based trigger (hodnota odezvy testu biologického účinku)
ECD:	electron capture detector (detektor elektronového záchytu)
ESI:	electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)
FID:	flame ionization detector (plamenově ionizační detektor)
GC:	gas chromatography (plynová chromatografie)
GC-MS/MS:	gas chromatography – tandem mass spectrometry (plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií)
HILIC:	hydrophilic interaction chromatography (hydrofilní interakční chromatografie)
HLPC/MS:	high-performance liquid chromatography – mass spectrometry (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
HPLC:	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HPRS:	high resolution product scan (sken produktu ve vysokém rozlišení)
HRMS:	high-resolution mass spectrometry (vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie)
IS:	internal standard (vnitřní standard)
LC/HRMS/DIA:	liquid chromatography – high resolution mass spectrometry with data independent analysis (kapalinová chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií a datově nezávislým sběrem dat)
LC-HRMS:	liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (kapalinová chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií)
LC-MS:	liquid chromatography – mass spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
LECHB FROV:	laboratoř environmentální chemie a biochemie fakulty rybářství a ochrany vod
LOQ:	limit of quantification (mez stanovitelnosti)
m/z:	mass to charge ratio (podíl hmotnosti iontu a jeho náboje)
MS:	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MW:	molecular weight (molekulová hmotnost)
NPD:	nitrogen-phosphorus detector (dusíko-fosforový detektor)
NTA:	non-targeted analysis (necílená chemická analýza)
NTS:	non-targeted screening (necílený screening)
OPFR:	organophosphate flame retardants (organické fosforové zhášeče hoření)
PCB:	polychlorinated biphenyls (polychlorované bifenily)
PFAS:	per- and polyfluoro alkyl substances (per- a poly fluoroalkylované látky)
PMOC:	persistent mobile organic compounds (perzistentní mobilní organické sloučeniny)
POCIS:	polar organic chemical integrative sampler (integrativní vzorkovač polárních organických látek)
RT:	retention time (retenční čas v chromatografické separaci)
SPE:	solid phase extraction (extrakce na pevnou fázi)
SPMD:	semi-permeable membrane device (polopropustná membrána)

1. Cíl metodiky

Metodika definuje postup pro posouzení vhodnosti aplikace vyčištěné odpadní vody a anaerobně stabilizovaného kalu z čistíren odpadních vod v zemědělství. Cílem je jejich bezpečné použití v zemědělství z pohledu ochrany podzemních vod a minimalizace rizik spojených s obsahem širokého spektra organických mikropolutantů, které se ve vyčištěných odpadních vodách a čistírenských kalcích vyskytují v různých, časově proměnlivých směsích.

2. Aktuální stav

2.1 Legislativní a normativní rámec

Problematika organických mikropolutantů ve vodách a kalcích z ČOV není adekvátně řešena na úrovni evropských ani národních legislativních dokumentů a příslušných norem či metodik.

2.1.1 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody

Cílem tohoto nařízení je v náležitých a nákladově efektivních případech usnadnit zavádění opětovného využívání vody, a pro ty členské státy, které si přejí nebo potřebují opětovně využívat vodu, tak vytvořit rámec, který jim to umožní. Z pohledu jakosti závlahové vody nařízení v oddílu 2 přílohy I týkajícího se minimálních požadavků na recyklovanou odpadní vodu určenou k zavlažování definuje 4 třídy kvality recyklované odpadní vody, pro které stanovuje požadavky na její kvalitu. Tyto požadavky zahrnují pouze mikrobiologické ukazatele a obecné fyzikálně-chemické ukazatele BSK-5, nerozpuštěné látky a zákal. Organické mikropolutanty jsou zmíněny pouze v příloze II týkající se posouzení rizik, kde se v podmínkách týkajících se dodatečných požadavků konstatuje, že: „Zvážení požadavků na kvalitu vody a monitorování, které doplňují nebo zpřísňují požadavky uvedené v oddíle 2 přílohy I, je-li to nutné a vhodné pro zajištění přiměřené ochrany životního prostředí a zdraví lidí a zvířat, zejména pokud existují jasné vědecké důkazy o tom, že rizika pocházejí z recyklované odpadní vody, a nikoliv z jiných zdrojů.“ V závislosti na výsledku posouzení rizik se mohou tyto dodatečné požadavky týkat zejména: a) těžkých kovů; b) pesticidů; c) vedlejších produktů dezinfekce; d) léčivých přípravků; e) jiných látek, které nově vzbuzují obavy, včetně znečišťujících mikrolátek a mikroplastů; f) antimikrobiální rezistence. Nařízení ale nijak nestanovuje konkrétní hodnoty limitů pro výše zmíněné skupiny látek ani taxativně látky z těchto skupin nevyjmenovává.

2.1.2 Zákon 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů

Účelem tohoto zákona je chránit povrchové a podzemní vody, jako ohrožené a nenahraditelné složky životního prostředí a přírodní zdroje, stanovit podmínky pro hospodárné využívání vodních zdrojů, pro zachování vodních zdrojů a předejití stavu nedostatku vody a pro zachování i zlepšení jakosti povrchových a podzemních vod, vytvořit podmínky pro snižování nepříznivých účinků povodní a sucha a zajistit bezpečnost vodních děl v souladu s právem Evropských společenství. Účelem tohoto zákona je též přispívat k zajištění zásobování obyvatelstva pitnou vodou a k ochraně vodních ekosystémů a na nich přímo závisících suchozemských ekosystémů. Tento zákon problematiku využití odpadních vod k závlahám neřeší, pouze v dílu 5 Ochrana jakosti vod v § 38 odst.9 konstatuje, že přímé vypouštění odpadních vod do podzemních vod je zakázáno a dále uvádí, že vypouštění odpadních vod neobsahujících nebezpečné závadné látky nebo zvláště nebezpečné závadné látky z jedné nebo několika územně souvisejících staveb pro bydlení, staveb pro rodinnou rekreaci nebo z jednotlivých staveb poskytujících ubytovací služby, vznikajících převážně jako produkt lidského metabolismu a činností v domácnostech, přes půdní vrstvy do vod podzemních lze povolit, pokud není

v daném případě technicky možné nebo s ohledem na zájmy chráněné tímto zákonem nebo jinými právními předpisy možné nebo žádoucí, vypouštění odpadních vod do vod povrchových. Jinými slovy, zákon upřednostňuje vypouštění do povrchových vod před vodami podzemními.

2.1.3 Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech

Toto nařízení vlády řeší problematiku odpadních vod, požadavky na četnosti odběrů vzorků vypouštěných odpadních vod a emisních limitů pro ně. Nezabývá se ale použitím odpadních vod pro závlahu.

2.1.4 Nařízení vlády 416/2010 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod podzemních

Nařízení vlády mimo jiné stanovuje ukazatele přípustného znečištění odpadních vod a minimální četnost měření míry znečištění odpadních vod. Opět toto NV nijak nezmiňuje problematiku organických mikropolutantů, mezi ukazateli zmiňuje pouze mikrobiologické ukazatele a obecné ukazatele ChSK-Cr, BSK-5, amoniakální dusík, nerozpuštěné látky a celkový fosfor.

2.1.5 ČSN 75 7143 (757143) Jakost vod. Jakost vody pro závlahu

Tato norma platí pro hodnocení a použití vody k závlaze. Dle této normy se k závlaze může používat voda, která negativně neovlivní zdravotní stav lidí a zvířat, výši výnosů a kvalitu plodin, půdní vlastnosti, jakost povrchových a podzemních vod a jiných složek životního prostředí. Vzhledem k datu vzniku a platnosti normy, tj. začátek 90. let minulého století, se v normě k posouzení vody k závlahám používají fyzikální, chemické, biologické a radiologické ukazatele, přičemž mezi chemickými ukazateli hodnotí zejména základní anorganické ukazatele, dále kovy a metaloidy. Z organických látek jsou v normě uvedeny pouze ukazatele tenzidy aniontové, fenoly, uhlovodíky C10-40 a PCB. Problematiku organických mikropolutantů (vyjma PCB) tudíž tato norma nijak neřeší.

2.1.6 TNV 75 4310 Závlahová zařízení pro mikrozávlahy

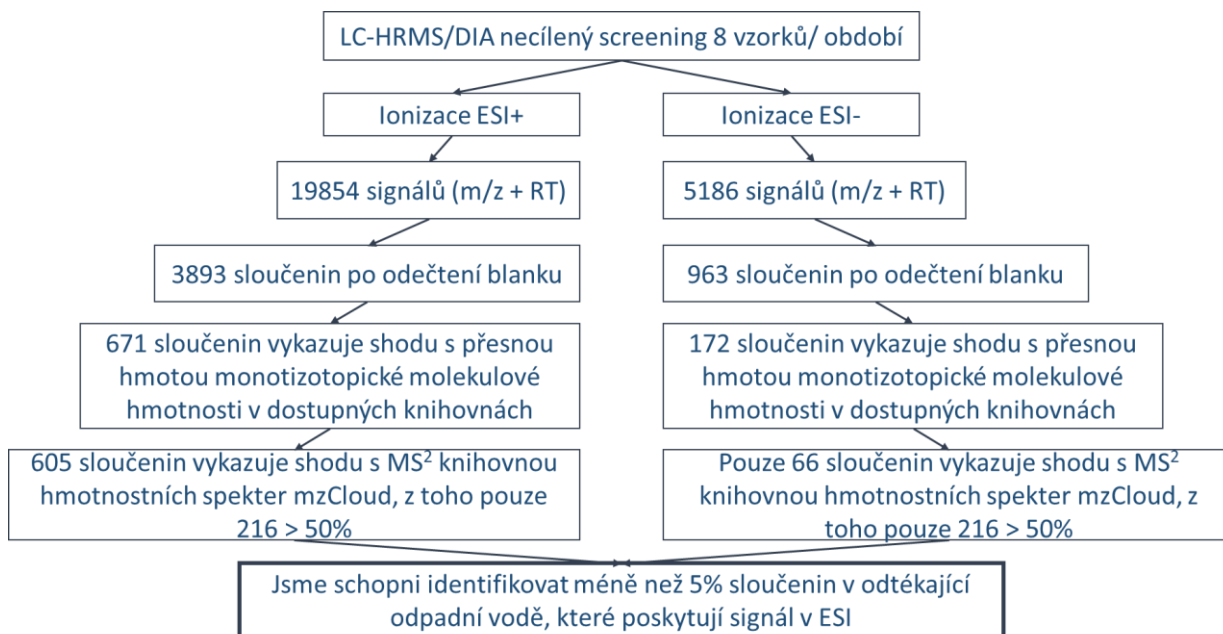
Tato odvětvová technická norma vodního hospodářství je určena pro navrhování mikrozávlah běžných zemědělských plodin a speciálních zemědělských kultur. Norma se z pohledu jakosti závlahových vod odvolává na normu ČSN 75 7143 a tedy neřeší problematiku organických mikropolutantů.

2.1.7 Metodika „Kritéria využití městských odpadních vod k závlaze zemědělských plodin“

Tato metodika (Zavadil, 2008) vychází z normy ČSN 75 7143, tudíž neřeší problematiku organických mikropolutantů, viz kap. 2.1.5.

2.2 Stav poznání a dostupná data

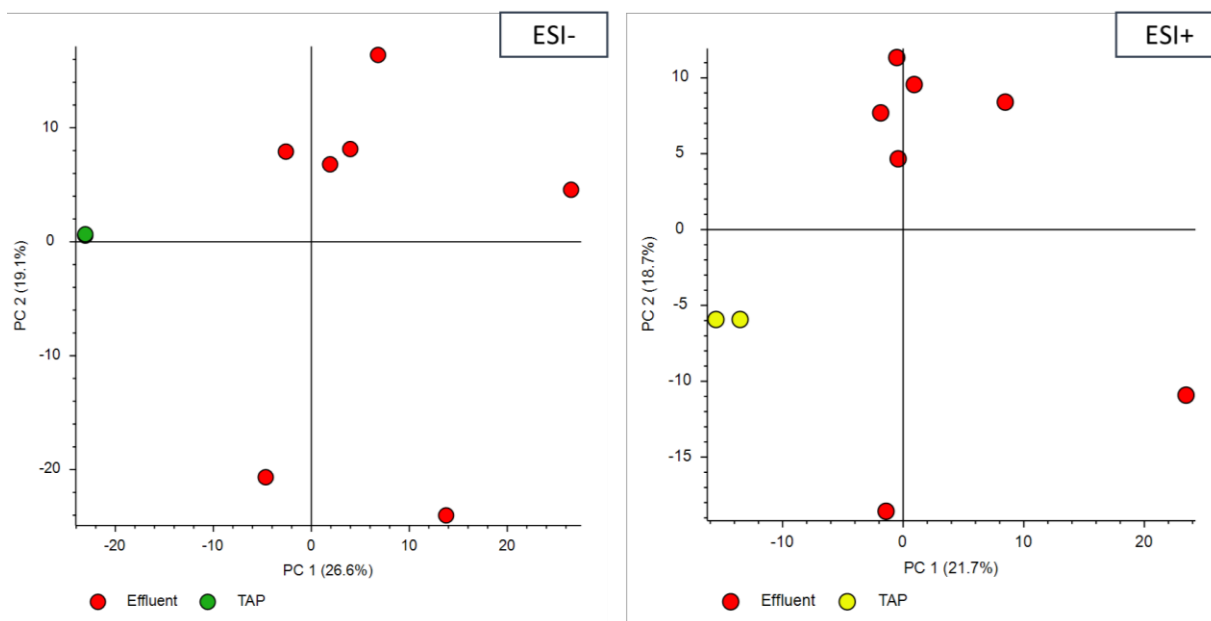
Na vodu a kal z čistíren odpadních vod je třeba pohlížet jako na médium s vysokou variabilitou jak ve složení mikropolutantů, tak v koncentracích těchto látek. Z pohledu legislativy je zřejmé, že problematika organických mikropolutantů a zejména jejich směsí není řešena. Obdobně v ČR existuje omezená množina informací a složení odpadních vod a čistírenských kalů. Tyto informace nejsou pořizovány systematicky. Byly a jsou pořizovány zejména v rámci výzkumu a vývoje, a to pouze na některých ČOV. V rámci řešení projektu NAZV QK21020080 byly provedeny analýzy složení vyčištěných odpadních vod a čistírenských kalů z ČOV Hrdějovice pro České Budějovice. Výsledky necíleného screeningu ukázaly, že vyčištěné odpadní vody obsahují tisíce látek v různých směsích. Pouze méně než 5 % látek bylo možno dostupnými metodami cílených chemických analýz identifikovat a stanovit jejich koncentrace (obr.2.2.1). V čistírenských kalcích byly provedeny cílené chemické analýzy, kde byl prokázán výskyt 33 látek ze 77 zkoumaných. Identifikované látky patří do různých skupin z pohledu jejich zdrojů a použití např. léčiva, antikoroziiva, bisfenoly, látky osobní péče apod. (Kodešová et al., 2024).



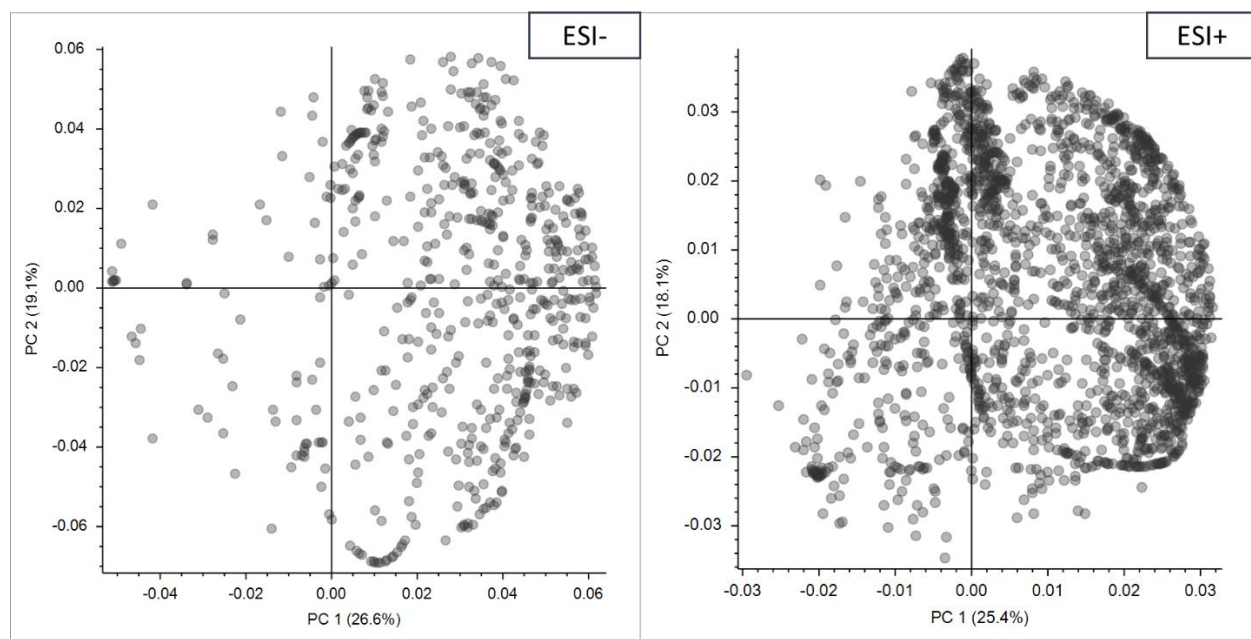
Obr.2.2.1 Počty detekovaných a identifikovaných látek v odpadní vodě ČOV Hrdějovice pomocí necíleného LC/HRMS/DIA screeningu

Složení směsí organických mikropolutantů je proměnlivé v čase (Golovko et al., 2014a, b). Variabilita ve složení polutantů je ilustrována na obrázcích 2.2.2 a 2.2.3. Byly zjištěny typicky vyšší koncentrace a přítomnost např. specifických léčiv v sezóně respiračních onemocnění nebo antihistaminik ve vegetační sezóně apod. viz obr. 2.2.4 a 2.2.5.

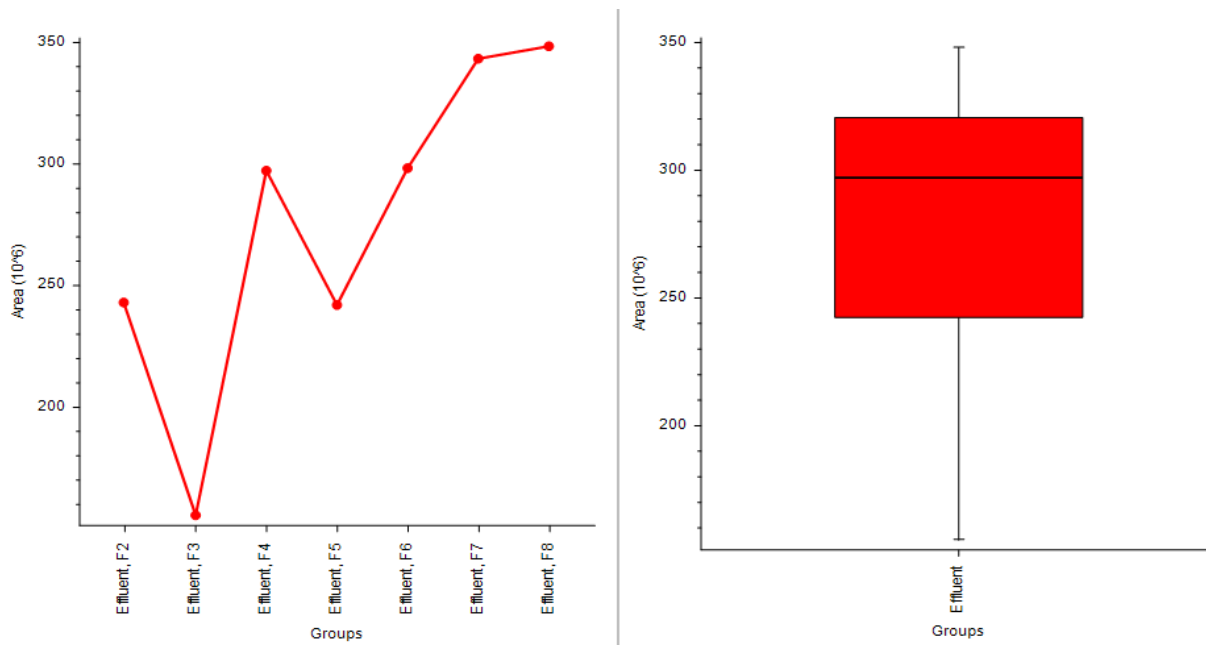
Screeningové studie v Evropě prokázaly výskyt stovek chemických látek ve vyčištěných odpadních vodách. Například 366 látek bylo zjištěno ve vodách z 56 evropských ČOV (Finckh et al., 2022), a 280 látek bylo identifikováno ve vodách ze 12 ČOV v povodí Dunaje (Alygizakis et al., 2019). Tisíce sloučenin bylo zjištěno v odpadních vodách necíleným screeningem ve studii García-Vara et al. (2023). Z nich 158 látek bylo identifikováno cíleně a v místě použití pro zavlaha bylo ve vodě zjištěno 119 látek.



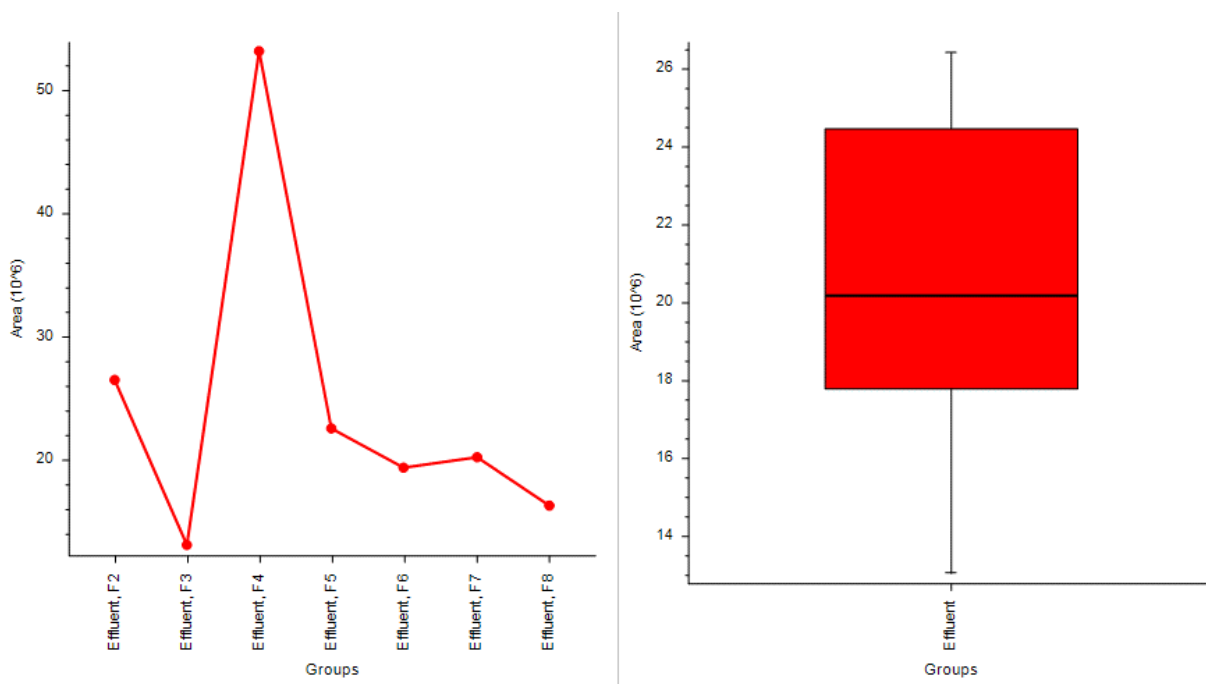
Obr. 2.2.2 Variabilita polutantů ve vyčištěné odpadní vodě ČOV v Hrdějovicích v období od dubna do října 2021 (vlevo signály ESI- ionizace, vpravo ESI+). TAP = pitná voda



Obr. 2.2.3 Variabilita polutantů ve vyčištěné odpadní vodě ČOV v Hrdějovicích (vlevo signály ESI- ionizace, vpravo ESI+) od dubna do října 2021. Každý bod reprezentuje jeden signál (sloučeninu)



Obr. 2.2.4 Variabilita koncentrací 4-acetamidoantipyrinu (metabolit analgetických a antipyretických léčiv třídy antipyrinů) ve vyčištěné odpadní vodě ČOV v Hrdějovicích od dubna do října 2021



Obr. 2.2.5 Variabilita koncentrací cetirizinu (antihistaminikum pro léčbu alergií) ve vyčištěné odpadní vodě ČOV v Hrdějovicích od dubna do října 2021

Komplexní směsi cizorodých látek, jako jsou organické mikropolutanty, které se běžně vyskytují v odpadních vodách a čistírenských kalech, mohou mít různý dopad na přírodní ekosystémy i zdraví člověka. Interakce mezi různými cizorodými látkami mohou být složité a záviset na konkrétních podmínkách a kontextu. Tyto různé látky nebo účinky se mohou vzájemně ovlivňovat v kontextu směsí nebo kombinací následujícími způsoby: antagonismus, synergie a aditivita.

Antagonismus se vyskytuje, když dvě nebo více látek nebo účinky působí protichůdným způsobem a snižují nebo potlačují účinky jedna druhé. To znamená, že kombinace látek má slabší účinek, než by měl jednotlivý účinek každé látky samostatně. To může zahrnovat konkurenci mezi látkami o vazebná místa na receptorech organismů nebo vliv na různé toxické mechanismy. Antagonismus může být nežádoucí v některých situacích, například v lékařství, kdy by kombinace léků mohla snížit jejich účinnost, v environmentálních vědách je tento způsob interakce naopak žádoucí. To může být důležité při hodnocení environmentálních rizik, protože výsledný účinek by mohl být mírnější, než by se očekávalo na základě toxicity každé látky samostatně

Synergie je opakem antagonismu. Synergie nastává, když dvě nebo více látek nebo účinky působí společně tak, že zesilují nebo posilují účinky jedna druhé. To znamená, že kombinace látek má silnější účinek, než by měl každý z nich samostatně. Synergie je negativní jev, pokud je takový účinek nežádoucí. To může být zvláště problematické, protože kombinace různých látek může vést k nečekaně silným účinkům na životní prostředí a může vyžadovat zvýšenou pozornost a regulaci.

Aditivita je termín, který se používá, když dvě nebo více látek nebo účinky působí nezávisle na sobě a jejich kombinovaný účinek je přesně součtem jejich jednotlivých účinků. V případě aditivity se kombinovaný účinek rovná sumě účinků každé složky samostatně. To znamená, že tyto látky neovlivňují navzájem své účinky a výsledný efekt je přesně předvídatelný na základě znalosti jednotlivých toxických látek. Aditivita se často používá při stanovení celkové toxicity směsí látek v rámci ekologického rizikového hodnocení. Bohužel ne pro všechny látky vyskytující se ve směsích v odpadních vodách a čistírenských kalech nejsou k dispozici potřebná data o toxicitě. Proto tento přístup nelze aplikovat, i kdybychom uvažovali čistě aditivní účinek všech látek ve směsi, což je v porovnání s uvažováním antagonismu a synergie zjevně jednodušší postup.

Z výše uvedeného vyplývá, že hodnocení na základě cílených analýz jednotlivých cizorodých látek nemůže popsat celkový konečný vliv na ekosystémy a zdraví člověka. Chemické analýzy totiž nejsou schopny odhalit antagonistické, synergické ani aditivní účinky cizorodých látek ve směsích. Tuto problematiku řeší metody orientované na hodnocení účinku směsí látek (effect-based metody). V případě, že je třeba rozklíčovat, která látka ze směsi je zodpovědná za pozorovaný účinek, dají se využít principy tzv. Effect directed analysis (EDA) metody. Tato metoda využívá postupné frakcionace vzorku umožňující vytipování a izolování účinné skupiny látek nebo chemického individua (Brack et al., 2016). Bližší popis použitelných analytických metod a ekotoxikologických metod orientovaných na hodnocení účinku směsí látek je uveden v následující kapitole 2.3.

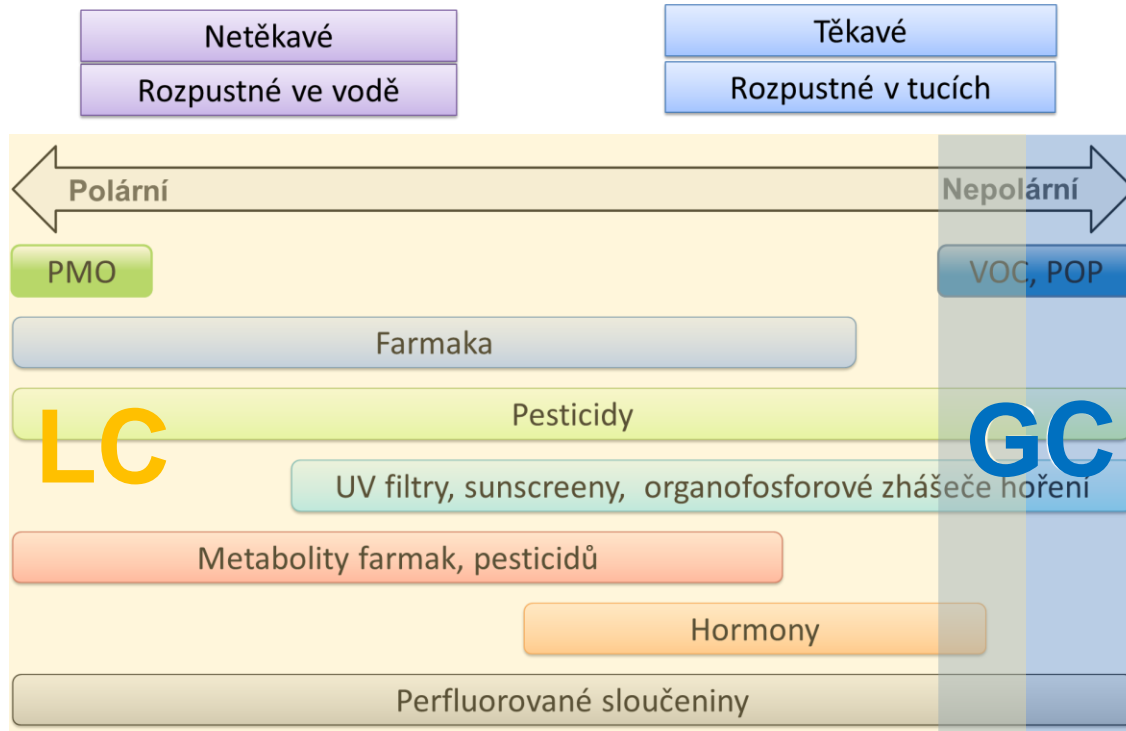
2.3 Dostupné analytické metody

Pokud odhlédneme od kovů a anorganických sloučenin, metody pro stanovení individuálních organických sloučenin ve stopových množstvích prošly za posledních 20 let významným vývojem, který zahrnuje masivní rozvoj kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně

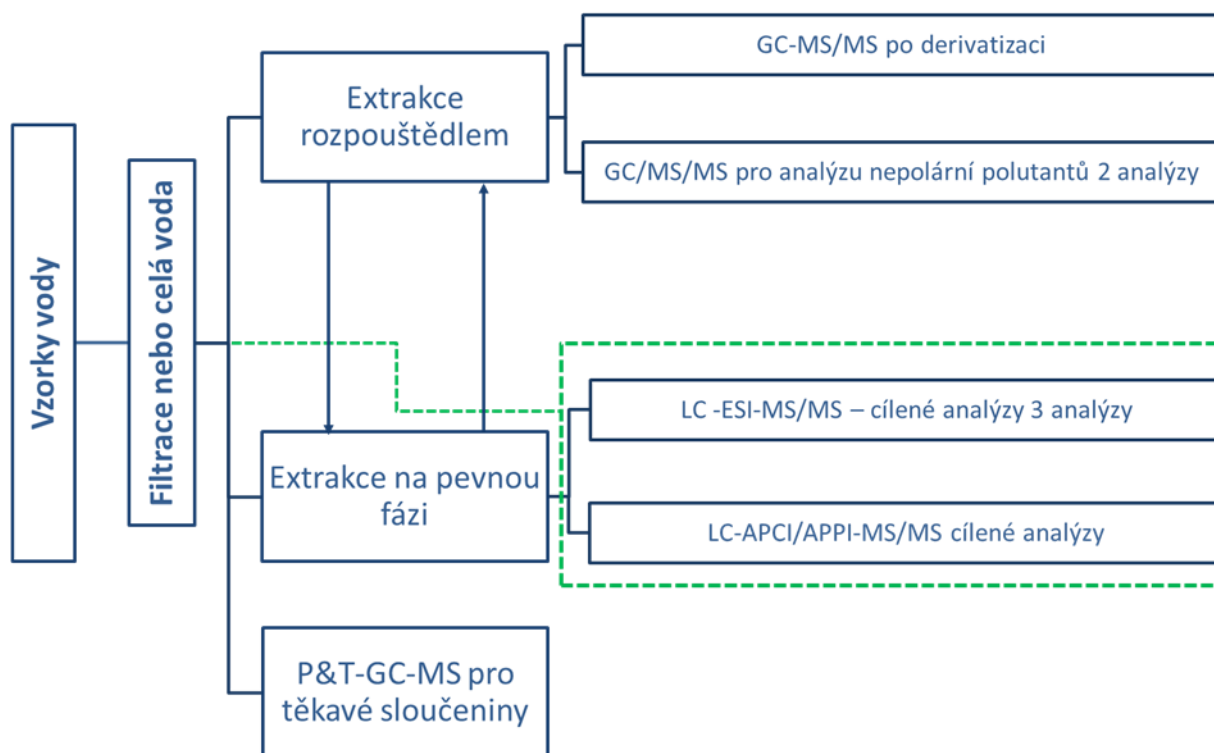
spektrometrickou detekcí a přechod od méně selektivní detekce v plynové chromatografii (FID, NPD a ECD) k hmotnostně spektrometrické detekci. Rozsah polarit stanovovaných sloučenin a jejich pokrytí separačními metodami jsou schematicky znázorněny v obrázku 2.3.1. Stávají metody pro chemickou analýzu vody zahrnují rozsahy polutantů pro monitoring založených na Stockholmské konvenci, seznamech prioritních sloučenin pro EU dle směrnice 2000/60/EC a jejích dceřiných směrnic a také kandidáty REACH (Schmidt, 2018), oproti velmi perzistentním mobilním a polárním sloučeninám (PMOC), které nejsou těmito metodami podchyceny.

Pro tento relativně malý počet sloučenin (255 sloučenin GC, 181 HPLC na reverzní fázi) jsou dostupné dobře popsané a validované metody založené na selektivní detekci pomocí nízko-rozlišující hmotnostní spektrometrie, většinou MS², s využitím kvadrupólových hmotnostních spektrometrů (Schmidt 2018). Zásadním předpokladem pro aplikaci těchto metod je dostupnost referenčních standardů. I když byly publikovány velmi rozsáhlé multiresiduální metody, které zahrnují desítky až stovky analytů (Grabic et al., 2012; Reemtsma et al., 2013), pokrytí již zmiňovaných prioritních či regulovaných polutantů vyžaduje komplexní analytickou strategii, která musí také reflektovat požadované meze detekce (stanovitelnosti) a požadované nejistoty stanovení v koncentracích blízkých koncentrační úrovni požadovaných norem environmentální kvality. Náročnost takových metod i pro cílený screening několika desítek nových podezřelých sloučenin může být demonstrována na schématu v obrázku 2.3.2, podle kterého byly analyzovány vzorky vody a pasivních vzorkovačů pro Norskou agenturu ochrany prostředí (Norwegian Environment Agency, 2018).

Polarita/vlastnosti různých typů organických kontaminantů vody



Obr. 2.3.1 Rozdělení často sledovaných skupin analytů podle polarit a separační metody pro jejich analýzu (GC – plynová, LC – kapalinová chromatografie)



Obr. 2.3.2 Schéma komplexní analýzy polutantů ve vodě pro široký rozsah sloučenin

Z obrázku 2.3.2 je patrné, že celý postup má několik bodů, které zásadním způsobem ovlivňují náročnost metody a také její meze stanovitelnosti. Prvním z nich je definice matrice, to znamená určit, zda bude analyzována celá voda (tedy včetně koloidní frakce a pevných částic) nebo pouze definovaná filtrovaná frakce. Od tohoto kroku se pak odvíjí i zvolené extrakční postupy, kdy je možné použít automatizované in-line extrakce na pevnou fázi (on line) SPE včleněné do LC-MS metody a prováděné robotickým autosamplerem (Lindberg et al. 2014). Pro analýzu velkých objemů vody či pro analýzu celé vody je pak nutné použít metody jiné, kombinující filtraci a off-line SPE nebo jejich spojení v jednom kroku (Golovko et al., 2018).

Pro reprezentativnost vzorku je důležitá metoda odběru. U odpadních vod je uzancí založenou na validačních studiích odebírán 24hodinový časově nebo průtokově proporcionální slévaný vzorek (Ort et al., 2010a; Ort et al., 2010b). Pro testování vyčištěných odpadních vod z větších ČOV jde o technicky snadno proveditelné vzorkování, ale problematické je to v případě menších čistíren nebo povrchových a podzemních vod. Neméně důležitá je pak denní a sezónní proměnlivost znečištění (Golovko et al., 2014a; Golovko et al., 2014b).

Pasivní vzorkování je pak možnost, jak zvýšit reprezentativnost odběru a zároveň přeskočit filtrační a koncentrační kroky analýzy. Aplikace pasivních vzorkovačů pro sledování širokého rozsahu polárních látek v podmínkách ČR byla již publikována včetně kalibrace pasivních vzorkovačů typu POCIS jak v odborné literatuře, tak i formou certifikované metodiky Vransy et al. (2021a) a metodik Grabice et al., (2015; 2018). V tabulce 2.3.1 jsou uvedeny koncentrační faktory a matrice pro dále diskutované jak cílené, tak i necílené a efektové metody chemické analýzy vody.

Tabulka 2.3.1 Přehled koncentračních faktorů pro různé metody vzorkování, úpravy a analýzy vzorků vody.

Vzorkování	Typická doba vzorkování		Filtrace	Vzorkovaný objem	Objem pro extrakci	Finální objem vzorku	Koncentrační faktor
	vyčištěná odpadní voda	povrchová/podzemní voda					
SPE extrakce	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ano	1 l	0.1-1 l	1 ml	100-1000
in-line SPE	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ano	0.1 l	1-5 ml	ekv. 5 µl	200-1000
off-line SPE							
celé vody	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ne	1-3 l	1-3 l	0.1-1 ml	1000-33000
POCIS	14 dní	28 dní	ne	1.4-3 l *	vzorkovač	1 ml	1400-3000
SPMD	30 dní	30 dní	ne	80-200 l **	vzorkovač	1 ml	80000-200000
silikonová guma	30 dní	30 dní	ne	50-150 l ***	vzorkovač	1 ml	50000-150000

* standardní POCIS 41 cm²; ** standardní SPMD 460cm²; *** jeden plát silikonu 100 cm²

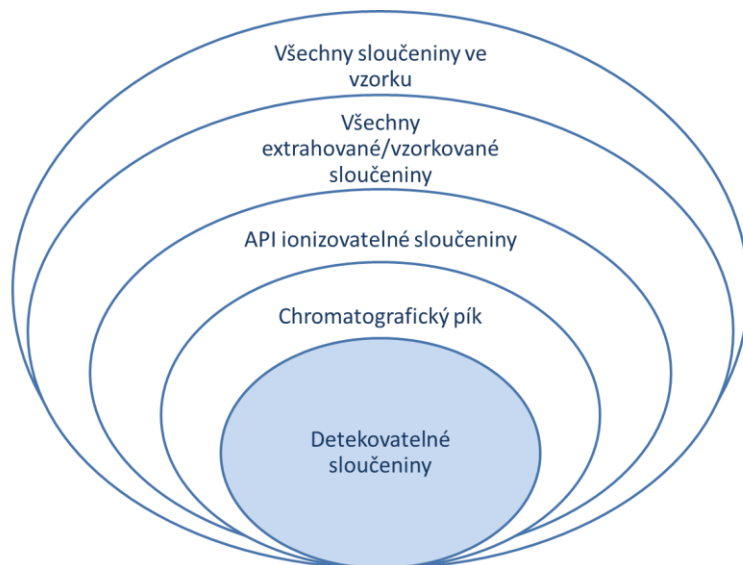
V tabulce 2.3.1 jsou zahrnuty i komerčně dostupné pasivní vzorkovače pro nepolární látky SPMD a POCIS, jejichž mobilita ve vodě a půdním prostředí je nízká a tomu musí odpovídat koncentrační faktory zvolené metody. Z tabulky je patrné, že metody se výrazně liší v mnoha aspektech. Pokud budeme brát do úvahy pouze polární polutanty, tak nejlepších koncentračních faktorů (a potažmo i LOQ) dosahuje extrakce celé vody na extrakční disky (Golovko et al., 2018), která byla vyvinuta pro stanovení progesteronů. Pro většinu ostatních sloučenin jsou ale plně postačující ostatní metody.

Z praktického hlediska je zásadní rozdíl mezi metodami, které jsou ukončeny finálním extraktem v rozpouštědle a in line SPE metodami. Tyto metody jsou sice vysoce automatizované, ale spotřebují veškerý vzorek pro danou analýzu. Z toho vyplývá nutnost skladování původního vzorku vody do doby dokončení analýzy. Výhodou in-line SPE metod jsou naopak relativně nízké objemy odebrané vody potřebné pro analýzy, které jsou výhodné pro logistiku plošných monitoringů (objemy transportované vody, chlazení a také skladování vzorků před analýzou).

V případě analýzy pevných vzorků, tj. kalů, kompostů či půdy, je situace komplikovanější vzhledem k frakci, kterou chceme stanovit. Analogií může být stanovení kovů, pro které mohou být použity různé typy vyluhovatelnosti (vodou nebo 2M HNO₃) nebo rozkladu (lučavkou královskou nebo totální rozklad pomocí kyseliny fluorovodíkové). Stacionární vyluhy či desorpce neodpovídají mobilitě organických polutantů z kalů do vodné fáze. Což jsme prokázali v experimentech zaměřených na desorpci farmak z různých typů stabilizovaných čistírenských kalů (Grabic et al., 2022) a na vymývání farmak z kalů aplikovaných na půdu (Kodešová et al., 2019, 2024). Pro hodnocení potenciálního vlivu polutantů v kalu na půdu by tedy měly být použity extrakty, které reflektují maximální množství sloučenin přítomných v kalech. Pro pevné matrice existují jak jednoduché postupy extrakce rozpouštědlem pomocí Quechers nebo v ultrazvukové lázni (Golovko et al., 2016; Nguyen and Baduel, 2023), tak sofistikované instrumentální metody založené na automatizované soxhletově extrakci, tlakové extrakci rozpouštědly nebo superkritickým CO₂ (Zuloaga et al., 2012). Finální produktem je extrakt v organickém rozpouštědle, který je analyzován analogicky extraktům vodných vzorků.

Metodu odběru a zkoncentrování vzorku pro daný typ monitoringu nebo hodnocení je tedy možné vybrat z běžně používaných a dostupných postupů. Možnost detekce organických sloučenin ve vzorku je dána průnikem několika faktorů, jak je znázorněno v obrázku 2.3.3, který byl vytvořen na základě článku (Hollender et al., 2023). Z obrázku je jasné, že jednoduchá

chemická analýza nemůže stanovit všechna přítomná chemická individua ve vzorku a kompletní charakterizace vzorku na základě chemických analýz není principiálně možná.



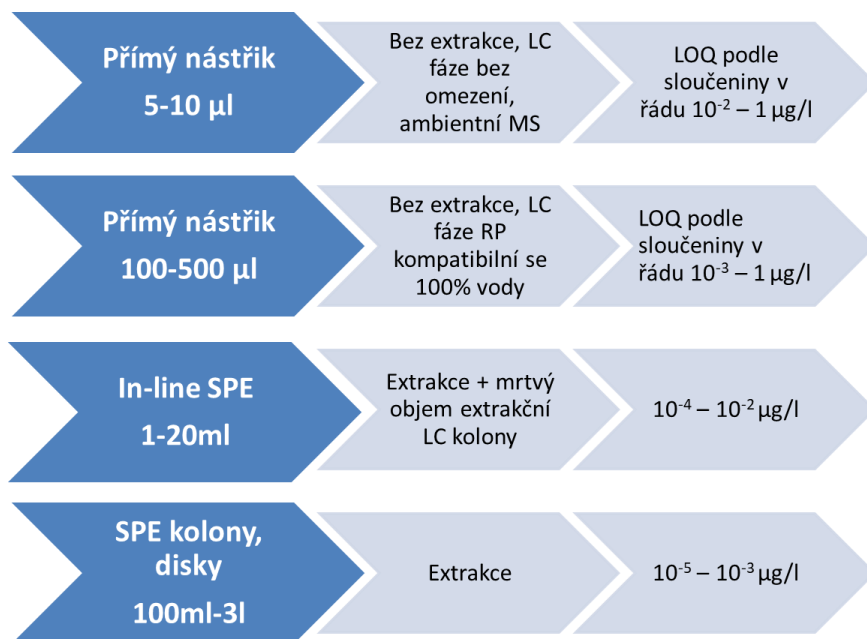
Obr. 2.3.3 Schématické znázornění jednotlivých podmínek, které vedou k detekci (kvantifikaci) dané sloučeniny ve vzorku. (Velikost oválu není proporcionální množství sloučenin).

2.3.1 Cílené chemické analýzy

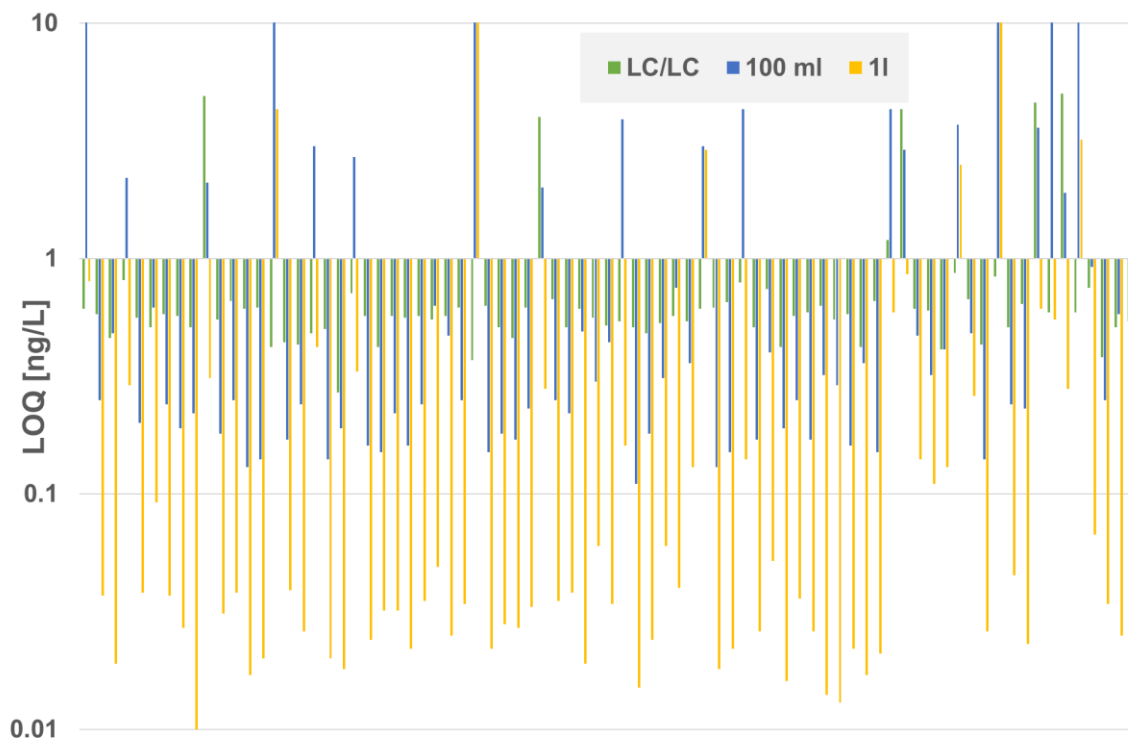
Definicí cílené chemické analýzy je znalost požadovaného rozsahu analytů a dostupnost referenčních standardů. Pokud máme k dispozici čisté látky nebo alespoň jejich technické produkty, jsme schopni ověřit a optimalizovat extrakci, ionizaci v API a chromatografickou separaci. Pro analýzu vody pomocí HPLC/MS je k dispozici řada technik od přímého nástřiku vody na chromatografickou kolonu až po extrakce na pevnou fázi. Orientační srovnání technik je zobrazeno na obrázcích 2.3.1.1 a 2.3.1.2. Z tohoto porovnání je patrné, že in line SPE technika nemá nejnižší meze detekce (jak lze ostatně očekávat i podle tabulky 2.3.1). Vzhledem ale k tomu, že i v případě selektivní sorpce (nebo spíše absence interakce analytu se sorbentem) je do LC MS systému vnesen analyt přítomen v mrtvém objemu extrakční kolony, jsou touto technikou detekovány analyty, které jinak mají vysoké LOQ, tj. např. clarithromycin, erythromycin nebo telmisartan. In line SPE metoda je často používaná aplikace hlavně z pohledu flexibility a automatizace analýzy pro velmi široký rozsah polutantů v různých typech vod (Bacaloni et al., 2007; Chen et al., 2023; Huntscha et al., 2012; Lindberg et al., 2014). Metoda cílené analýzy má ovšem omezení, která vyplývají z podstaty LC-MS: Pro každou ionizační techniku, separační systém nebo extrakční kolonu, je nezbytná další analýza. Tato omezení se ovšem do jisté míry týkají také ostatních metod, které používají jiné extrakční techniky. Obecně lze tedy konstatovat, že s počtem, a hlavně variabilitou vlastností analytů roste počet potřebných LC-MS² analýz.

Pro analýzy specifických polutantů jsou nezbytné jiné než konvenční separační a extrakční systémy. Pro analýzy PMOC je nezbytné použít kombinaci několika sorbentů (iontoměniče, aktivní uhlí a konvenční sorbenty) a také kombinace separačních systémů, kdy kromě chromatografie na reverzní fázi (RP HPLC) je použita i HILIC nebo fáze na bázi polymerního uhlíku (Schmidt, 2018). Pro ultra stopové analýzy reziduí hormonů nebo PFAS je často nutné

použít kromě specifických ionizačních technik i vysoce selektivní detekci pomocí vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie (HRMS) (Fedorova et al., 2013; Golovko et al., 2018).



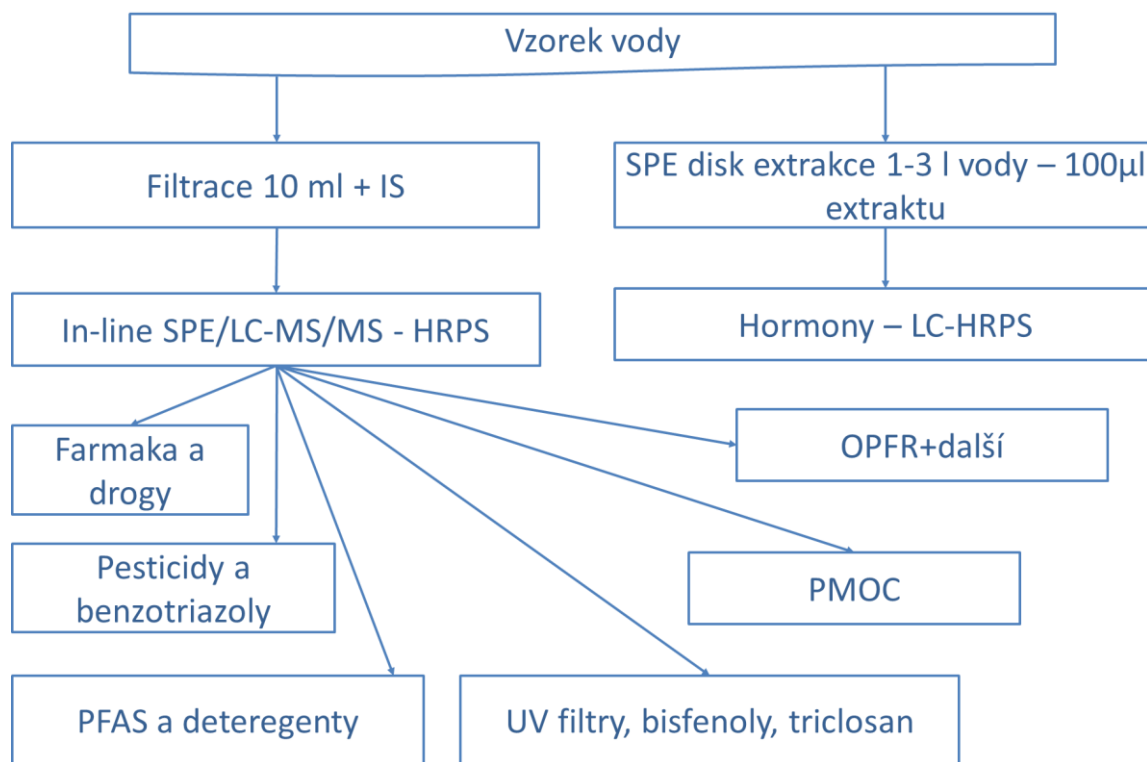
Obr. 2.3.1.1 Porovnání technik analýzy vzorků vody



Obr. 2.3.1.2 Porovnání dosažených mezí stanovitelnosti (LOQ) pro analýzu farmak ve vodě metodami in line SPE (1 ml) s extrakcí 0,1 a 1 l vody (zkonzentrování do 1 ml rozpouštědla) s LC-MS² QqQ detekcí

Ve výsledku pak narůstá náročnost takovéto komplexní analýzy (počet analýz, množství LC-MS (HRMS) systémů nutných pro detekci cílových analytů, čas kvalifikované pracovní síly pro analýzy), která nemusí být proporcionální získané informaci o vzorku. Ilustrativní schéma komplexní analýzy vzorku vody v maximálním možné rozsahu polárních polutantů stanovovaných v LECHB FROV je uveden v obrázku 2.3.1.3. Rozsah cca 400 analytů je možné pokrýt sedmi různými LC-MS(HRMS) analýzami, což odpovídá ceně okolo 1000 EUR/vzorek. Pro pevné matrice bude schéma velmi podobné, ale s vyšší cenou, která musí reflektovat vysokou variabilitu různých tříd polutantů a nezbytnost čištění vzorků pro některé analyty, jako jsou hormony v komplexní matici kalů či kompostů.

Cílené analýzy byly vyvinuty pro relativně velký počet analytů s velmi variabilními fyzikálně chemickými vlastnostmi. Jejich kombinace pro pokrytí celého spektra možných polutantů pro potřeby hodnocení vlivu odpadní vody nebo kalu na daný systém je ale velmi náročná, nestandardní a také nemusí být relevantní. Což bylo prokázáno i kombinací cílených analýz s analýzami biologického efektu v pasivních vzorkovačích (Šauer et al., 2023; Vrana et al., 2021b).



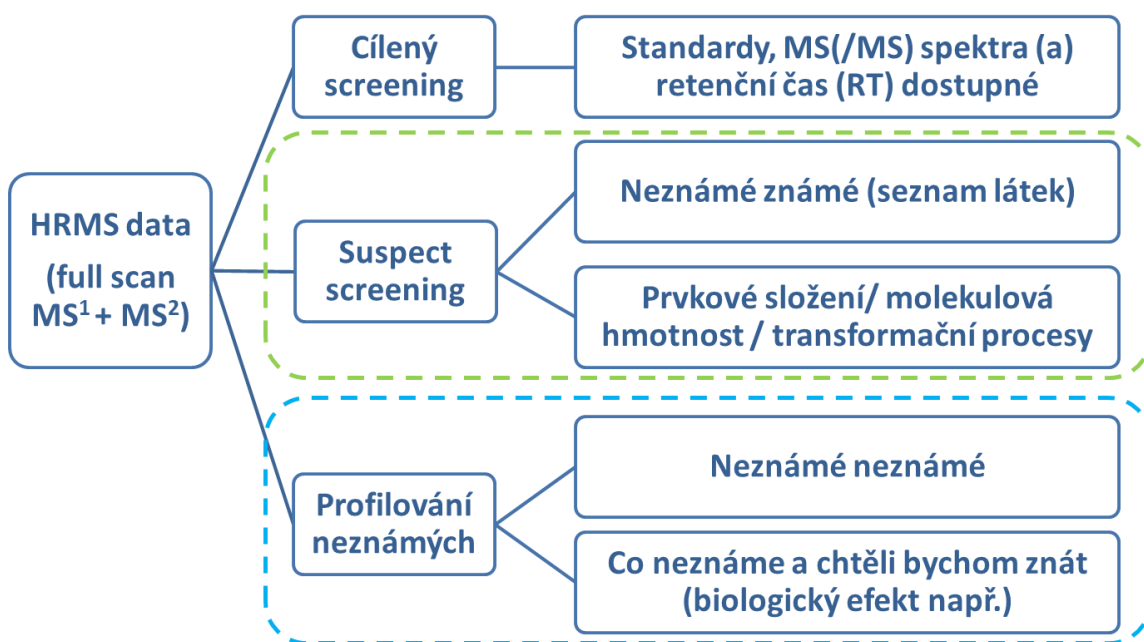
Obr. 2.3.1.3 Schéma komplexní analýzy vody pro polární polutanty

Pro rozšíření počtu analytů, které mohou být detekovány v jedné analýze, byly vyvinuty metody necílené analýzy, jejichž aplikace na detekci neznámých sloučenin ve vzorcích významně narůstá hlavně poslední dekádě s rozšířením cenově dostupných LC-HRMS přístrojů (Hollender et al., 2023).

2.3.2 Necílené chemické analýzy

Vzhledem k počtu možných signálů (sloučenin) ve vzorku, je necílená analýza polárních sloučenin spojená s dostupností rychle skenujících hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením přesné hmoty a zároveň dostatečně citlivých pro detekci i minoritních složek v komplexních směsích. Toto kritérium splňují analyzátoři doby letu (TOF) a orbitální iontové pasti (OIT). Vzhledem k tomu, že pro úspěšnou identifikaci neznámé sloučenin jsou potřeba nejméně MS² data (MS/MS), jsou tyto hmotnostní spektrometry kombinovány do hybridních MS, většinou s kvadrupólovými MS. Necílené analýzy se sestávají z necíleného sběru dat, který je možné provádět v několika režimech, které většinou kombinují sběr všech iontů v daném rozsahu m/z (MS¹) s datově nezávislými MS² experimenty (Álvarez-Ruiz and Picó, 2019; Overdahl et al., 2021; Renaud et al., 2022). Takto získaná data tedy obsahují jak MS¹, tak MS² hmotnostní spektra nezbytná pro identifikaci.

Data získaná necílenými metodami lze vyhodnocovat několika způsoby (Ccanccapa-Cartagena et al., 2019), které jsou schematicky znázorněny v obrázku 2.3.2.1. Pro tyto účely je možné použít jak komerčně dodávané software, tak i tzv. open source programy, které umožňují i vlastní tvorbu skriptů.



Obr. 2.3.2.1 Znázornění možností operace s daty, která jsou získána necílenými metodami analýzy.

Komplexní HRMS data umožňují nejen identifikaci podezřelých (suspect screening) sloučenin ve vzorku např. podle seznamů EU prioritních polutantů, aplikovaných pesticidů nebo farmak používaných v dané zemi (Celic et al., 2021; Dürig et al., 2019; Ng et al., 2022; Pochodylo and Helbling, 2017; Yukioka et al., 2020), ale také jejich kvantifikaci nebo profilování neznámých sloučenin ve vzorcích.

Rozsah aplikací je široký a sahá od identifikace metabolitů známých polutantů např. pesticidů (Anagnostopoulou et al., 2023), přes screening znečištění perfluorovanými sloučeninami (Ng et

al., 2022) až po studie používající strojové učení a umělou inteligenci pro identifikaci zdrojů znečištění a hodnocení rizika identifikovaných sloučenin (Becker et al., 2023; Joseph et al. 2023). Základním prvkem pro všechny necílené metody a postupy je ovšem jistota identifikace. Milníkem pro určování míry nejistoty, s jakou byl daný pík, definovaný m/z a retenčním časem, ztotožněn s chemickým individuem, je článek Schymanski et al. (2014). V tomto článku je definováno pět úrovní jistoty identifikace, které jsou stručně specifikovány v tabulce č. 2.3.2.1.

Tabulka 2.3.2.1 Úrovně nejistoty identifikace chemického individua podle Schymanski a kol. (2014)

Úroveň	Jistota identifikace		Minimální požadovaná data
1	potvrzená struktura	referenční standard	MS ¹ , MS ² , RT, referenční standard
2	pravděpodobná struktura	shoda s knihovnou MS ² spekter	MS ¹ , MS ² , referenční spektra v knihovně
		diagnostický důkaz	MS ¹ , MS ² , experimentální data
3	předběžný kandidát	struktura, substituent, třída	MS ¹ , MS ² , experimentální data
4	jednoznačné prvkové složení	izotopový vzor, adukty	MS ¹
5	přesná hmota	m/z, RT	MS ¹

Standardizace a vzájemné porovnání účinnosti jak měřících, tak i vyhodnocovacích metod jsou základními parametry, které určují možnost aplikace dané metody pro regulační účely, tj. např. posuzování bezpečnosti aplikace vyčištěných odpadních vod a kalů na půdy. LC-HRMS necílené metody mají obrovský potenciál. Nacházejí se však zatím ve fázi počátečního růstu se všemi dětskými chorobami, a je velmi těžké vyhodnotit účinnost nikoliv měřících metod, ale hlavně softwarových vyhodnocovacích postupů. Neshody v prvním kroku postupu tzv. peak picking (identifikace signálu na daném m/z a příslušného RT), což je nejnižší úroveň jistoty identifikace neznámé sloučeniny, mohou vést k zásadním rozdílům v hodnocení výsledků NTS (Hohrenk et al., 2020). Rozsáhlá recentní studie (Hollender et al., 2023) shrnuje doporučení asociace NORMAN pro cílený a suspektní screening, tak aby bylo dosaženo co nejvyšší harmonizace výsledků NTS. Zároveň je však v této studii konstatováno, že v současnosti neexistuje standardní operační procedura, která by mohla být obecně aplikována pro necílený screening.

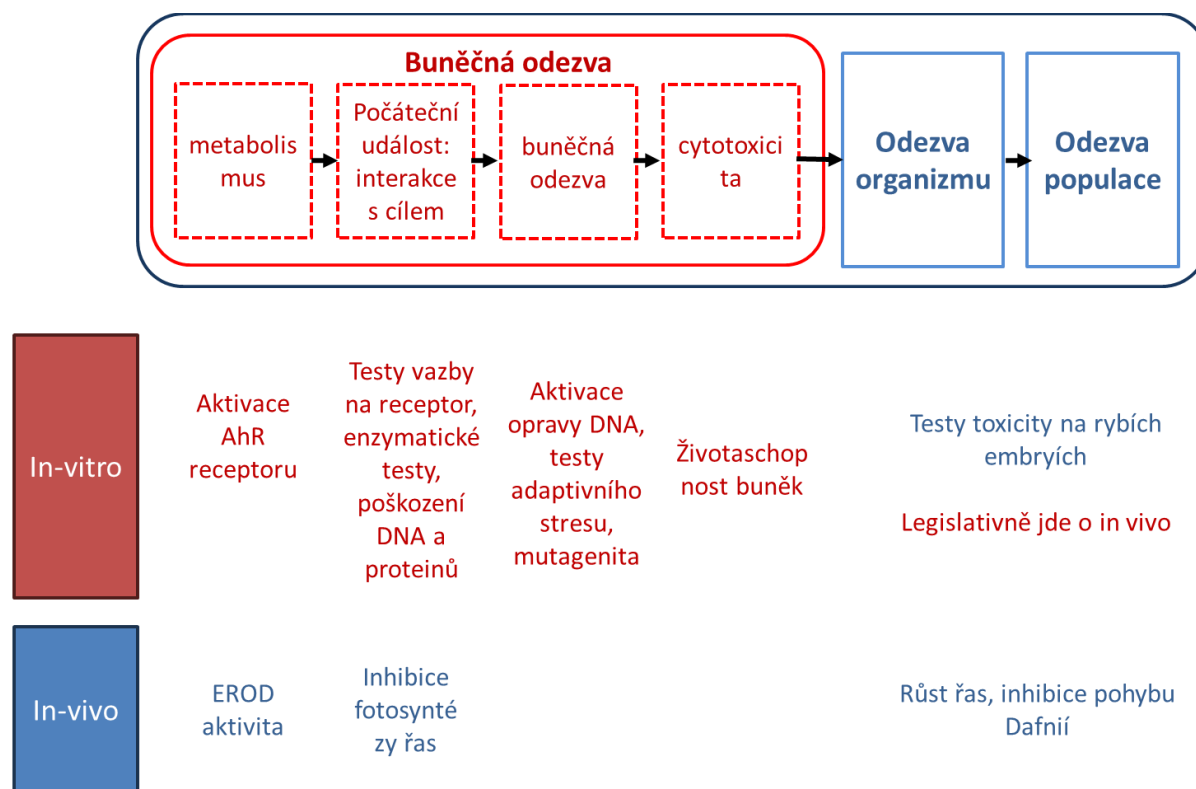
2.3.3 Metody analýzy biologického účinku

Počet chemických sloučenin identifikovaných ve vzorcích složek životního prostředí neustále narůstá, a to díky výše uvedeným cíleným i necíleným sofistikovaným instrumentálním metodám. Tradičně byly pro hodnocení toxicity odpadní vody a sedimentů používány biologické metody *in vivo* založené na organismech. Tyto metody jsou ovšem velmi limitované co do průchodnosti vzorků laboratoří a neschopnosti odlišit vliv chemických polutantů od vlivu pH, salinity a matrice vzorku (Escher et al., 2020). Pokrok ve vývoji robotizovaných a vysoce efektivních *in vitro* metod analýz biologického účinku změnil tradiční přístup a obecně urychluje proces hodnocení rizik a zároveň se vyhýbá použití testovacích organismů (Escher et al., 2020). Zásadní výhodou *in vitro* testů je pak množství vzorků potřebné pro analýzu.

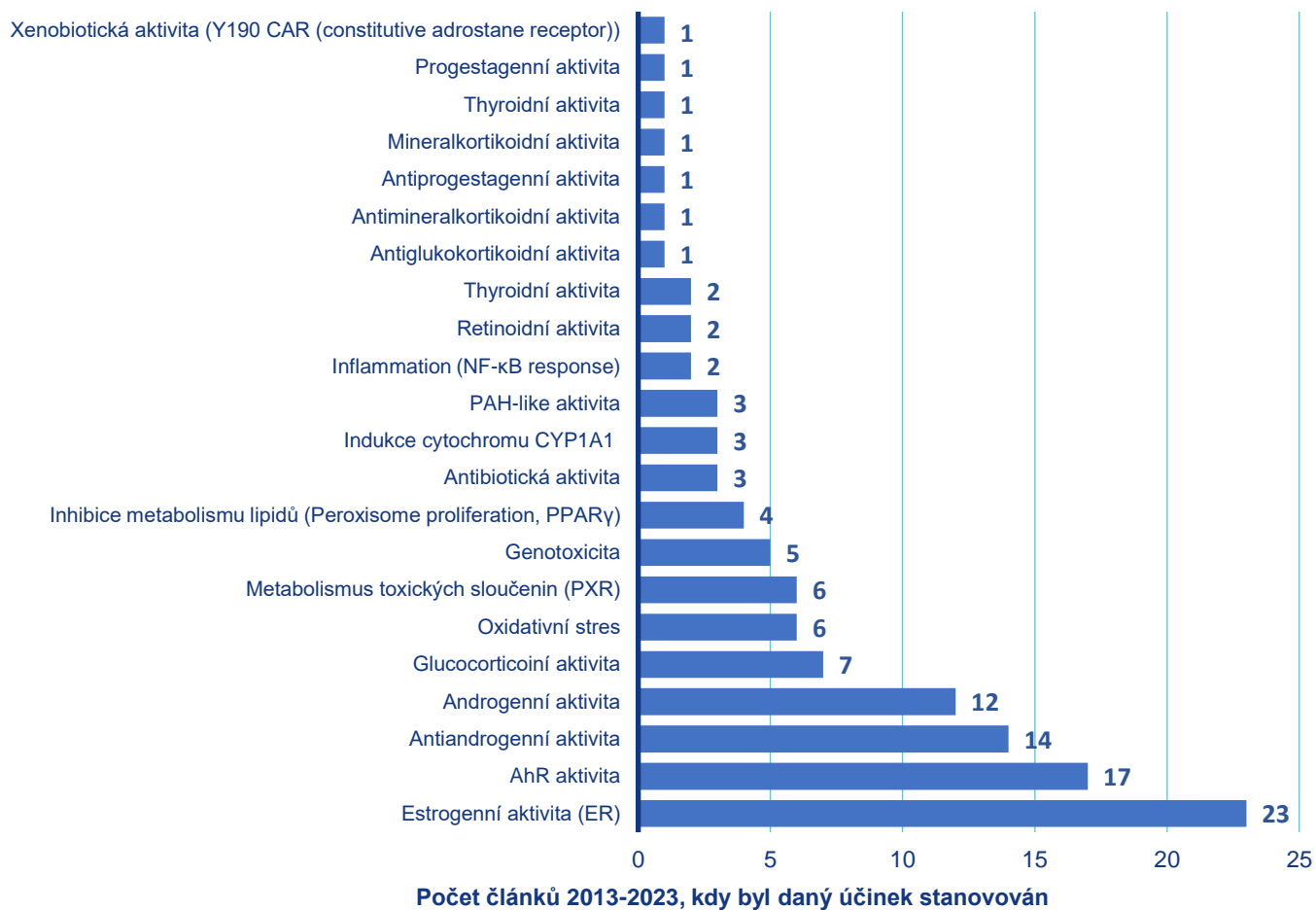
Pro výběr vhodných metod biologické analýzy efektu byl vyvinut koncept AOP (Adverse Outcome Pathway), který popisuje propojení interakce mezi xenobiotikem a danou biomolekulou

s efektem na biologické úrovni odpovídající hodnocení rizika (Ankley et al., 2010). Za tímto konceptem stojí myšlenka, že kaskáda molekulárních reakcí spouští nežádoucí efekt na úrovni jedince, populace nebo ekosystému (Brack et al., 2016). Schéma AOP s vyznačenými typy *in vitro* testů a jejich porovnání s *in vivo* je uvedeno v obrázku 2.3.3.1.

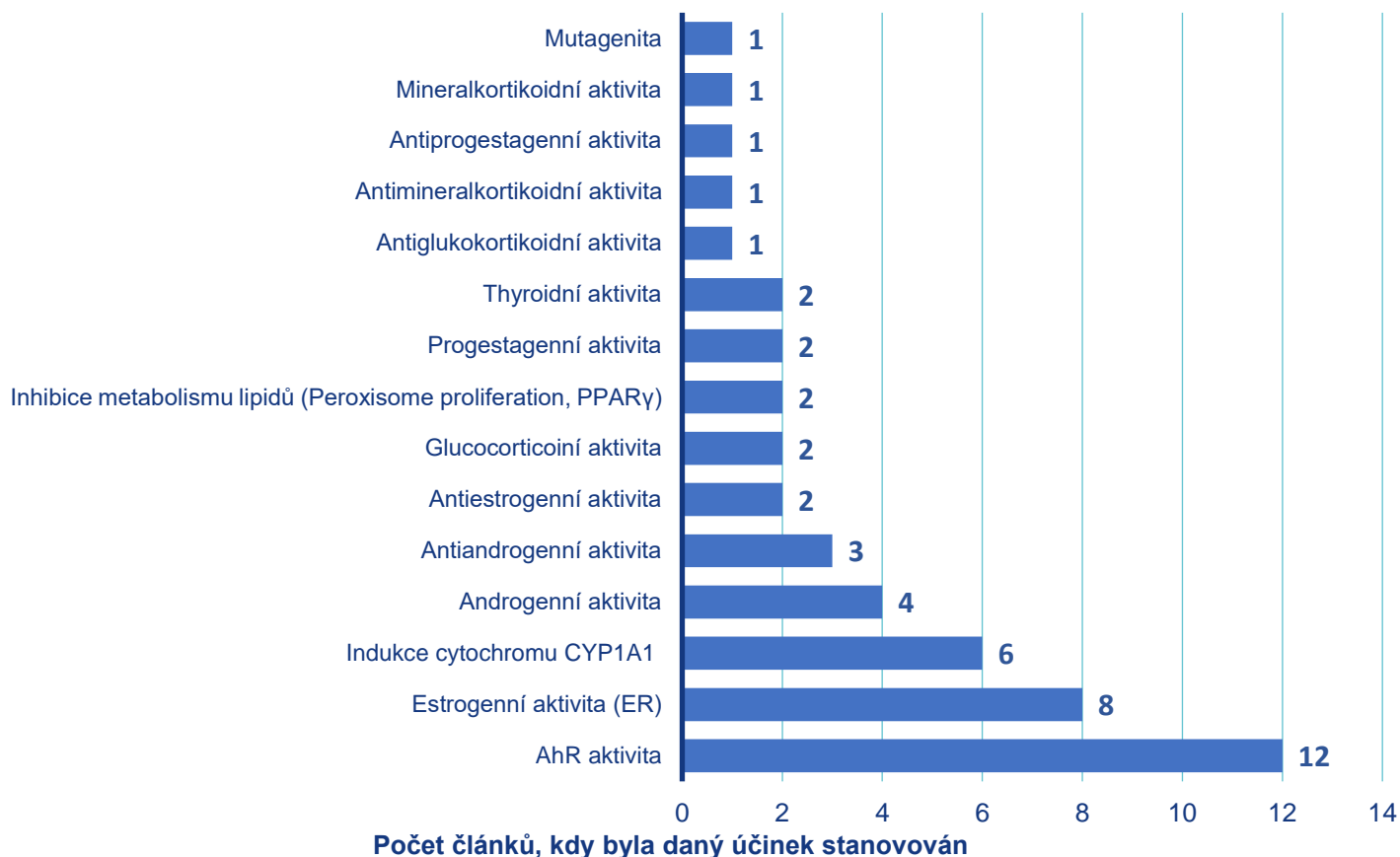
Z přehledu je patrné, že možných *in vitro* testů je relativně velký počet. Výčet a frekvence nálezů ve zběžné literární rešerši provedené v rozmezí publikovaných prací na WOS v letech 2013–2023 jsou uvedeny v obrázcích 2.3.3.2 a 2.3.3.3. Pro většinu těchto testů je typický objem požadovaný pro provedení analýzy efektu *in vitro* v rozmezí 40–200 µl extraktu vzorku (pasivního vzorkovače, půdy, kalu či odpadní vody) (Brack et al., 2016), což je dostatečně malé množství pro alikvótní podíl z extraktu pro cílené či necílené analýzy.



Obr. 2.3.3.1 Metody analýzy biologického účinku chemické látky podle (Brack et al., 2016), červeně jsou zvýrazněny *in vitro* a modře *in vivo* metody



Obr. 2.3.3.2 Výčet metod stanovení biologického účinku na základě literární rešerše v rozmezí let 2013 až 2023 v matricích voda – pasivní vzorkovač



Obr. 2.3.3.3 Výčet metod stanovení biologického účinku na základě literární rešerše v rozmezí let 2013 až 2023 v matici půda.

Z praktického pohledu je celý rozsah dostupných biologických metod analýzy efektu příliš vysoký. Na půdorysu NORMAN a Společné Implementační Strategie (CIS) pro Vodní rámcovou směrnici 2000/60/ES však byly vygenerovány obecné postupy nejen pro definici rozsahu in vitro testů, ale také pro jejich aplikaci na hodnocení rizik vypouštění či aplikace vyčištěných odpadních vod (NORMAN, 2019). Tento dokument doporučuje rozsah biotestů, které mají definovány specifické hodnoty tzv. Effect Based Trigger (EBT), což jsou hodnoty odezvy testu biologického účinku, při jejichž překročení je indikováno potenciální ekologické riziko. Seznam analyzovaných efektů s hodnotami EBT, které se musí použít pro analýzu biologického účinku je uveden v tabulce 2.3.3.1. Pro hodnocení jsou uvedeny dva soubory limitních hodnot podle (Escher et al., 2018; van der Oost et al., 2017). V dokumentu jsou také uvedena doporučení pro hodnocení výsledků analýz biologického účinku, která jsou založena na poměru nalezené hodnoty biologického ekvivalentu referenční sloučeniny s hodnotou EBT.

Tento harmonizovaný přístup byl aplikován v případové studii kvality vypouštěných odpadních vod v povodí Dunaje (Alygizakis et al., 2023). Výsledky byly velmi variabilní jak mezi efektovými metodami, tak i mezi studovanými čistírnami odpadních vod a dokumentují použitelnost metod analýzy biologického efektu pro hodnocení kvality vypouštěné odpadní vody v návaznosti na dokumenty NORMAN. Nezanedbatelnou skutečností z pohledu více rutinních aplikací je komerční dostupnost těchto, jinak složitých a náročných metod viz např.

<https://biodetectionsystems.com/> .

Tabulka 2.3.3.1 Seznam *in vitro* biotestů s uvedenými hodnotami EBT (Effect Based Trigger)

Aktivita	EBT ^a	EBT ^b
Estrogenní (ER α)	0.5 ng E2-eq/L	0.1 ng E2-eq/L
Androgenní (anti-AR)	25 μ g Flu-eq/L	14 μ g Flu-eq/L
Glucocorticoidní (GR)	100 ng DEX-eq/L	
Dioxin-like (DR, Ahr aktivita)	50 pg TD-eq/L	50 pg TD-eq/L
Inhibice metabolismu lipidů (PPAR γ)	10 ng Ros-eq/L	
PAH (PAH)	150 ng BaP-eq/L	6.2 ng BaP-eq/L
Oxidativní stres (Nrf2)	10 μ g Cur-eq/L	21 μ g Cur-eq/L
Pregnane X receptor (PXR)	3 μ g Nic-eq/L	54 μ g Nic-eq/L

Vyjádřeno jako koncentrační ekvivalenty referenčních sloučenin:

E2 = 17 β -estradiol; Flu = flutamid; DEX = dexamethason; TD = 2378-TCDD; Ros = rosiglitazon; BaP = benzo[a]pyren; Cur = curcumin; Nic = nicardipin

^a Van der Oost et al., 2017

^b Escher et al., 2018

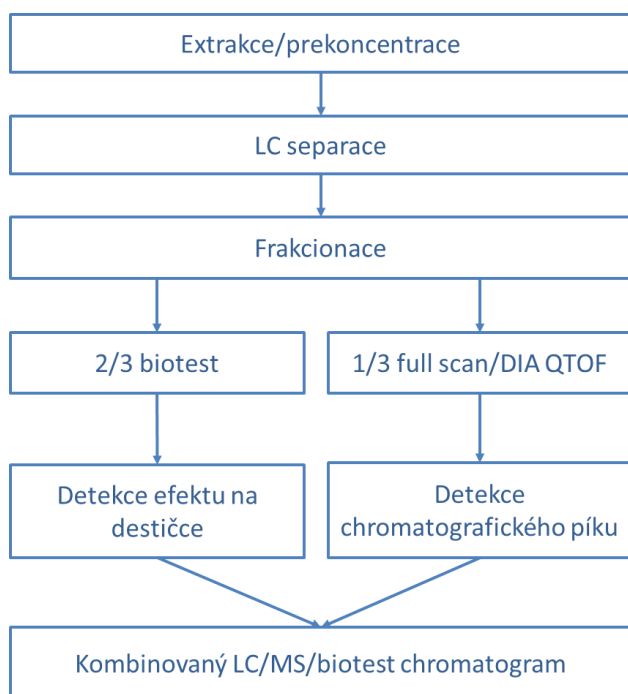
2.3.4 Kombinace chemických analýz a metod analýz biologického účinku (EDA)

Evropská unie, v návaznosti na cíle udržitelného rozvoje Organizace spojených národů, přijala strategii pro netoxické prostředí, která zahrnuje vývoj mezioborových řešení pro monitoring a management chemických směsí (Brack et al., 2019). Analýza biologického efektu je vhodným nástrojem pro hodnocení ekotoxicity daného vzorku, ale není úplně využitelná pro management nebezpečných chemických látek. Navíc komplexní chemické směsi jako jsou vyčištěné odpadní vody nebo kaly mohou vykazovat silné matricové efekty, které mohou maskovat některé biologické účinky chemických individuů v takovém vzorku (Escher et al., 2020). Z tohoto pohledu je tedy žádoucí, aby byly identifikovány biologicky aktivní složky v takových komplexních směsích. Identifikace na úrovni 2 podle Schymanski stupnice lze dosáhnout pouze kombinací výše uvedených metod chemické a biologické analýzy. Pro postupy vedoucí k určení a stanovení biologicky aktivních složek ve směsích se vžil termín účinkem cílená analýza (EDA – Effect Directed Analysis) a pokusy o syntézu obou postupů probíhají paralelně s vývojem jednotlivých metod (Brack et al., 2016).

Úroveň objasnění biologického účinku přítomností chemických sloučenin se zásadně liší mezi jednotlivými stanovovanými účinky (Šauer et al., 2023). Zatímco estrogenicita extraktů pasivních vzorkovačů povrchové vody byla v tomto článku vysvětlena estrogenními hormony 17 β -estradiolem, estriolem a estronem z více než 40 %, další účinky, jako anti-AR nebo PPAR γ , byly vysvětleny cílenými i necílenými (semi kvantitativně) stanovenými sloučeninami se známým účinkem maximálně z 1,2 % výsledného ekvivalentu biologického účinku. Tato a další práce dokumentují jednak užitečnost a nezbytnost hodnocení celkového účinku komplexních směsí ve vzorku, ale také nutnost identifikace biologicky aktivních složek.

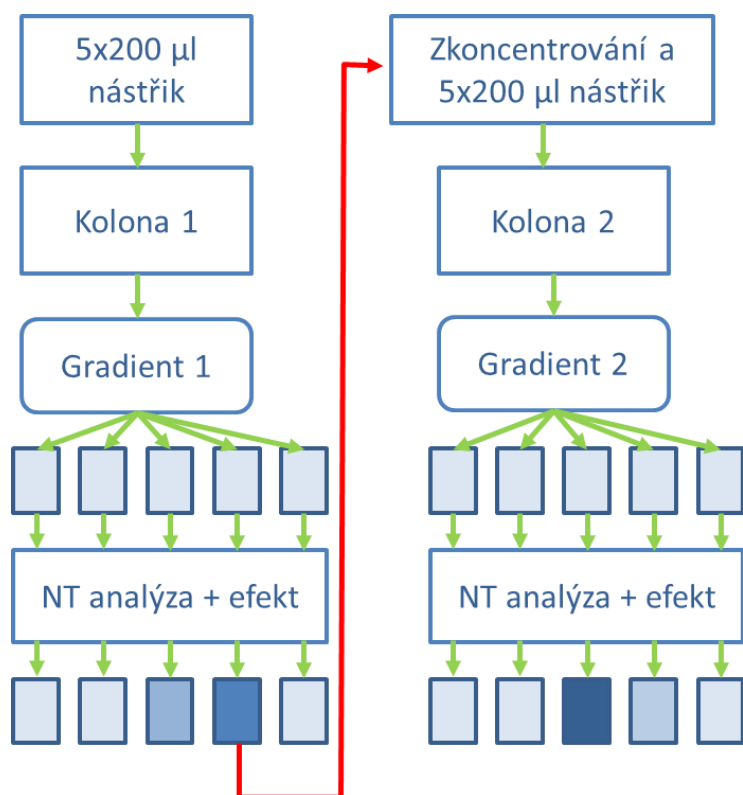
Pro úspěšnou identifikaci chemických individuů ve vysoce komplexních matricích je nezbytně nutné snížení počtu látek v analyzované směsi (Brack et al., 2016). Existuje několik přístupů k EDA, základní rozdělení vede mezi online a off-line metodami separace komplexní směsi.

V online metodách je vzorek po chromatografické separaci dělen na dvě části, kdy jedna je frakčně dávkována na destičky, kde dochází po ukončení analýzy k detekci daného účinku a v druhé paralelně probíhá necílená detekce přítomných chemických sloučenin pomocí HRMS, viz obrázek 2.3.4.1 (Houtman et al., 2020). Nejedná se tedy o opravdovou online metodu, protože online jsou pouze sbírány frakce a vlastní analýza probíhá až poté. Metoda je založena na komerčně dostupném systému sestávajícím z chromatografu, frakcionátoru, robotizované vysoce dostupné detekce in vitro testy (tabulka 2.3.3.1) a hmotnostního spektrometru operované v režimu NTA. Výhodou tohoto systému je výsledná kombinace efektogramu s chromatogramem, který umožňuje výběr pouze těch částí LC/MS signálů, které se shodují s elucí biologicky aktivních sloučenin. Nevýhodou je pak nutnost opakovat analýzu pro každý sledovaný efekt a relativně nízká citlivost biotestů z nekoncentrovaných malých frakcí



Obr. 2.3.4.1 Schématické znázornění online EDA/HRMS

V off-line metodách je prováděna separace extraktů vzorků do frakcí, které mohou pokrývat různou oblast chromatogramu a také mohou být slučovány stejné frakce extraktů z opakovaných nástřiků vzorků. Jednotlivé frakce jsou pak zkoncentrovány na příslušný objem a analyzovány NTA a biotesty. Příslušné frakce s efektem pak mohou být opakovaně frakcionovány za účelem dalšího snížení komplexity směsi na LC systému s ortogonálním chemismem separace (Brack et al., 2016; Grabic et al., 2023) viz obrázek 2.3.4.2.



Obr. 2.3.4.2 Schéma ortogonální 2 D chromatografické separace komplexní směsi pro EDA

Komplexita chemické směsi může být snížena oproti původnímu extraktu. Problémem ale zůstává stále relativně vysoký počet signálů pro NTA, které jsou obtížně identifikovatelné. Zejména pak pokud jsou pro akvizici použity jednostupňové LC/HRMS/DIA metody, které nemusí poskytovat kvalitní MS² spektra zvláště pro málo intenzivní ionty. Výhodou těchto postupů je vyšší citlivost díky možným opakováním frakcionace a také možnost separace v 2 D.

Dalším možným uspořádáním je afinitní přečištění extraktu, kdy jsou ze vzorku selektivně vyvázány sloučeniny s afinitou k danému ligandu na sorbent s tímto ligandem, a po odstranění vzorku zpětně eluovány do roztoku (Peng et al., 2016). Zásadní výhodou tohoto uspořádání EDA, které se také nazývá pull down assay, je vysoká míra selektivity. Principiálně může kromě selektivní interakce receptoru a ligandu docházet také k neselektivní sorpci na povrchu nosiče afinitního sorbentu, tyto interference však můžeme velmi dobře eliminovat použitím diferenční analýzy, kdy sorbent bez vzorku a nosič sorbentu se vzorkem použijeme jako kontrolu pro selektivně navázané sloučeniny (Grabic et al., 2023). V tomto případě může být počet nalezených signálů redukován na množství, které je možné zpracovat do jisté míry i manuální interpretací MS² spekter získaných pouze pro zájmové signály za dobře definovaných podmínek (izolační okno 1 m/z). Masivní použití této metody je však zatím limitováno náročností získání specifických afinitních sorbentů.

Pokud shrneme stávající stav vývoje EDA, tak musíme konstatovat, že jde o vysoce sofistikované metody, které vedou k cíli, tj. identifikaci biologicky aktivních složek směsi, ale nacházejí se zatím ve stádiu výzkumu, který má daleko k rutinnímu použití v běžné praxi.

3. Popis metodiky

3.1 Úvod

Metodika uvádí postup pro vyhodnocení rizika vyplývajícího z použití odpadních vod a kalů zemědělství. Postup definuje požadavky na frekvenci vzorkování, uvádí použitelné vzorkovací techniky a analytické metody, specifikuje způsob posouzení výsledků, jejich interpretaci a klasifikaci. Tento postup je vhodný jak pro komunální, tak průmyslové ČOV.

3.2 Vzorkování

3.2.1 Frekvence vzorkování

Vzhledem k variabilitě složení odpadních vod a kalů je potřeba zajistit odběr reprezentativních vzorků. Z pohledu frekvence vzorkování je třeba postihnout sezónní variabilitu ovlivněnou proměnlivými vstupy různých látek i rozdíly ve fungování dané čistírenské technologie v průběhu roku. Doporučený minimální interval vzorkování vyčištěné odpadní vody je 4x do roka v odstupu minimálně 2 měsíce mezi odběry vzorků. Pro hodnocení je tedy potřeba vyhodnotit alespoň 4 vzorky reprezentující všechny sezóny (roční období) roku. Pro vyhodnocení čistírenských kalů lze aplikovat stejná pravidla jako pro odpadní vodu.

3.2.2 Vzorkovací techniky

Vzhledem k vysoké časové variabilitě ve složení vzorků vyčištěné odpadní vody je problematické využití bodových jakožto i slévaných vzorků. Bodové vzorky reprezentují složení pouze v době odběru vzorku, v tomto případě přibližně 4 sekundy z celého roku (1 sekunda na odběr). Pro zvýšení reprezentativnosti takovýchto vzorků by jich muselo být odebráno řádově více. Pro pokrytí např. 12 týdnů v roce by bylo potřeba odebrat 84 vzorků, což by bylo časově i finančně náročné. Při odběru slévaných vzorků by bylo potřeba využít chlazené automatické vzorkovače. Počet vzorků by se oproti bodovým vzorkům snížil, pokud by se nevzorkovalo dle požadavků přílohy 3 vyhlášky č. 293/2011 Sb. (vzorek typu B, 24hodinový slévaný vzorek) z 12 alikvotů odebraných v intervalu 2 hodin. Pokud ano, počet vzorků by neklesl, ale zvýšila by se reprezentativnost odběru oproti vzorkům bodovým. Ke snížení počtu vzorků na 28 by došlo, pokud by se odebíral 3 denní slévaný vzorek (z 12 dvouhodinových alikvotů denně). Tento postup je i přes redukci počtu vzorků vzhledem k nutnosti použití chlazeného automatického vzorkovače technologicky a finančně náročný. Pro vzorkování lze s výhodou využít metod pasivního vzorkování. Tyto metody jsou finančně méně náročných a poskytují časově vážený průměr koncentrací v odpadní vodě za období dvou až čtyř týdnů. Po dobu expozice pasivního vzorkovače dochází i ke zkoncentrování a stabilizaci látek v pasivním vzorkovači. Při použití pasivních vzorkovačů trvá expozice pasivního vzorkovače dle typu 2 týdny (POCIS) nebo 4 týdny (SPMD, silikonová guma). Tři až 8 vzorků ročně tedy pokrývá 12 týdnů z celého roku rozložených do všech ročních období.

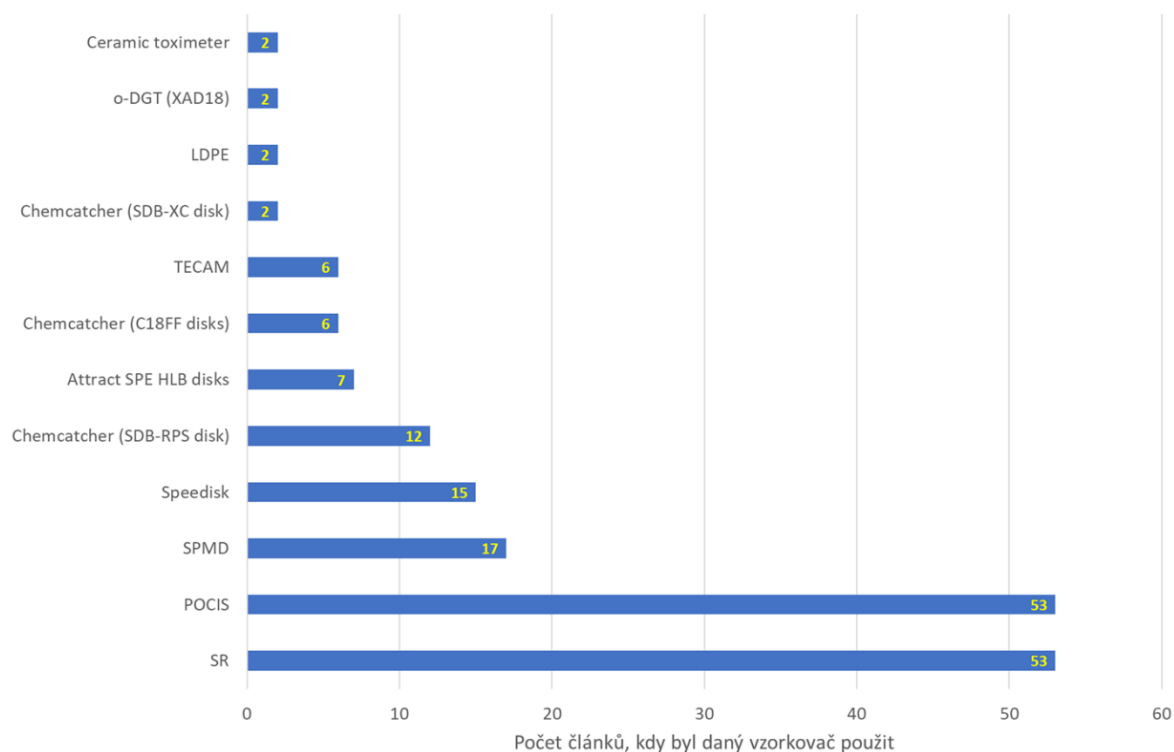
Existuje řada typů pasivních vzorkovačů dle toho, zda jsou navrženy pro sledování nepolárních nebo polárních látek viz obr. 3.2.2.1. V ČR se v naprosté většině používají 3 typy vzorkovačů. V rámci celostátního rutinního monitoringu ČHMÚ, dále v rámci průzkumných typů monitoringu Povodí Vltavy s.p., Povodí Labe s.p. a Výzkumného ústavu vodohospodářského T.G.M., v.v.i. se používají pasivní vzorkovače typu POCIS - Polar Organic Chemical Integrative Sampler (Alvarez et al., 2004) pro polární organické mikropolutanty a SPMD – Semi-permeable Membrane Device (Huckins et al., 2002; 2006) pro nepolární látky. V rámci různých výzkumných projektů se na území ČR používají i pasivní silikonové vzorkovače na bázi silikonové gumy pro

sledování nepolárních polutantů (Smedes and Booij, 2012; Vrana et al., 2019). Z tohoto pohledu je jejich použití na území ČR dnes již vcelku rutinní záležitostí.

Při aplikaci pasivního vzorkování lze využít postupů uvedených v Metodice sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů (Grabic a kol., 2015) a metodice Využití pasivních vzorkovačů POCIS pro monitoring farmak a pesticidů v povrchových vodách (Grabic a kol., 2018). Souhrnné porovnání je uvedeno v tabulce 3.2.2.1.

Pro vzorkování odpadních vod je třeba se řídit ČSN ISO 5667-10 Kvalita vod – Odběr vzorků – Část 10: Návod pro odběr vzorků odpadních vod a ČSN EN ISO 5667-23 Jakost vod – Odběr vzorků – Část 23: Návod pro pasivní odběr vzorků v povrchových vodách.

Pro vzorkování čistírenských kalů je třeba dodržet postupy dle ČSN EN/ISO 5667-13 Jakost vod – Odběr vzorků – Část 13: Návod pro odběr vzorků kalů a část ČSN EN ISO 5667-15 Jakost vod – Odběr vzorků – Část 15: Pokyny pro konzervaci a manipulaci se vzorky kalu a sedimentu.



Obr. 3.2.2.1: Přehled pasivních vzorkovačů a četnost jejich použití pro stanovení účinku komplexní směsi látek ve vodě za posledních 10 let

Tab.3.2.2.1 Porovnání počtu reprezentativních vzorků pro jednotlivé vzorkovací techniky

Vzorkovací technika	Počet vzorků ročně	Reprezentativita vzorků	Technologická náročnost	Finanční náročnost	Efektivita vzhledem k nákladům	Vhodnost použití pro:
Bodový vzorek	84	1 sekunda	nízká	vysoká	nízká	Cílené analytické metody
Slévaný vzorek denní	84	1 den s rozlišením 2 hodiny	vysoká	vysoká	nízká	Cílené analytické metody
Slévaný vzorek třídní	28	3 dny s rozlišením 2 hodiny	vysoká	střední	nízká	Cílené a necílené analytické metody
Pasivní vzorkovač *	3-6	14 ^a – 30 ^b dní kontinuálně <i>a POCIS, b SPMD a silikonová guma</i>	nízká	nízká	vysoká	Cílené i necílené analytické metody, metody analýzy biologického účinku, EDA

*Pasivní vzorkování – výsledky jsou pro POCIS limitovány variabilitou vzorkovacích rychlostí, zde je nutné do budoucna harmonizovat postupy přepočtů koncentrací v pasivních vzorkovačích nebo uzanční hodnoty platné pro extrakty z pasivních vzorkovačů

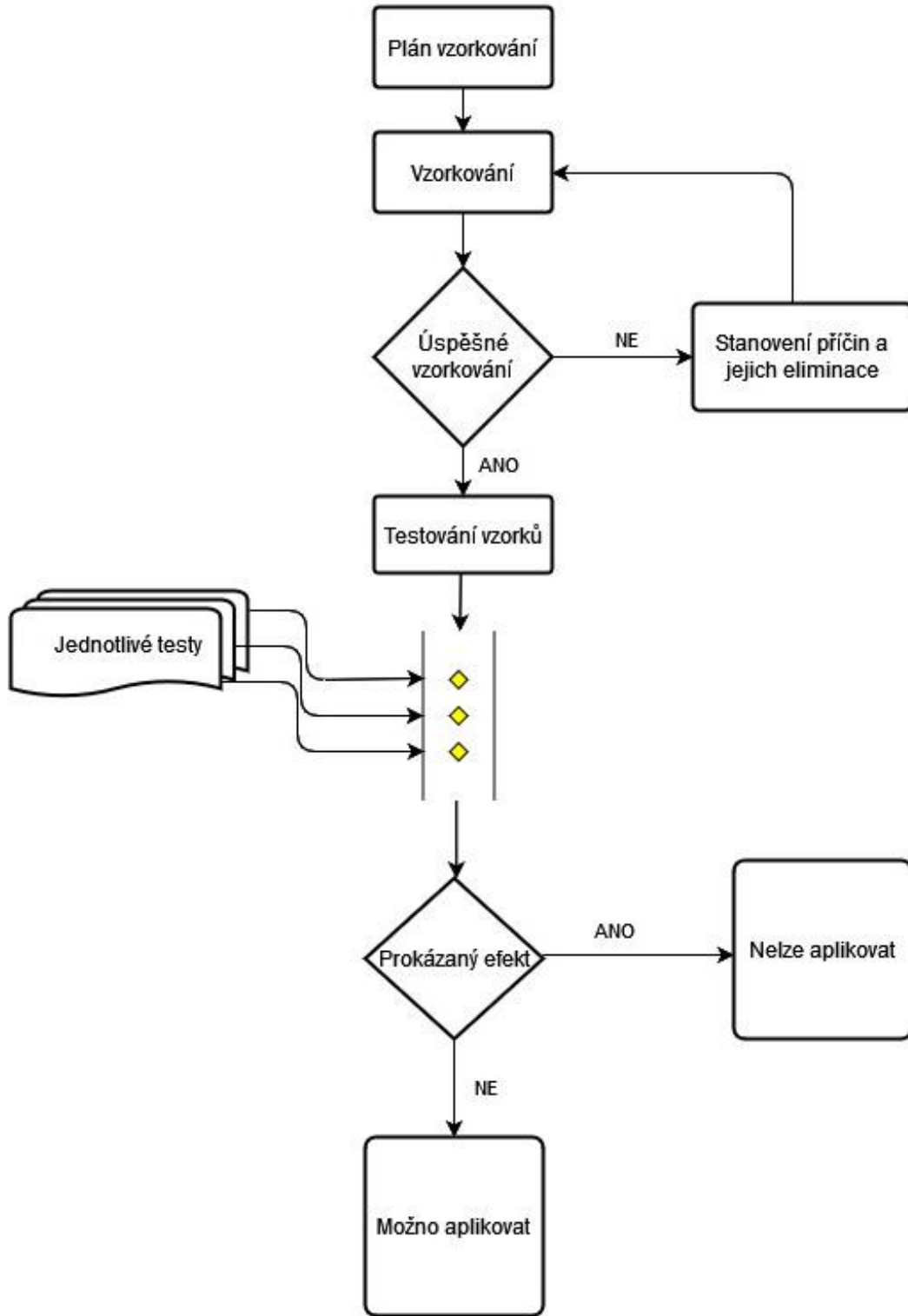
Omezení:

Navržené intervaly vzorkování a vzorkovací techniky lze uplatnit pouze v případě kontinuálního vypouštění odpadních vod, v případě diskontinuálního vypouštění (zejména u menších ČOV) nelze tento postup použít. U ČOV s diskontinuálním vypouštěním nepředpokládáme potenciál takovéto čistírny pro využití odpadních vod v zemědělství.

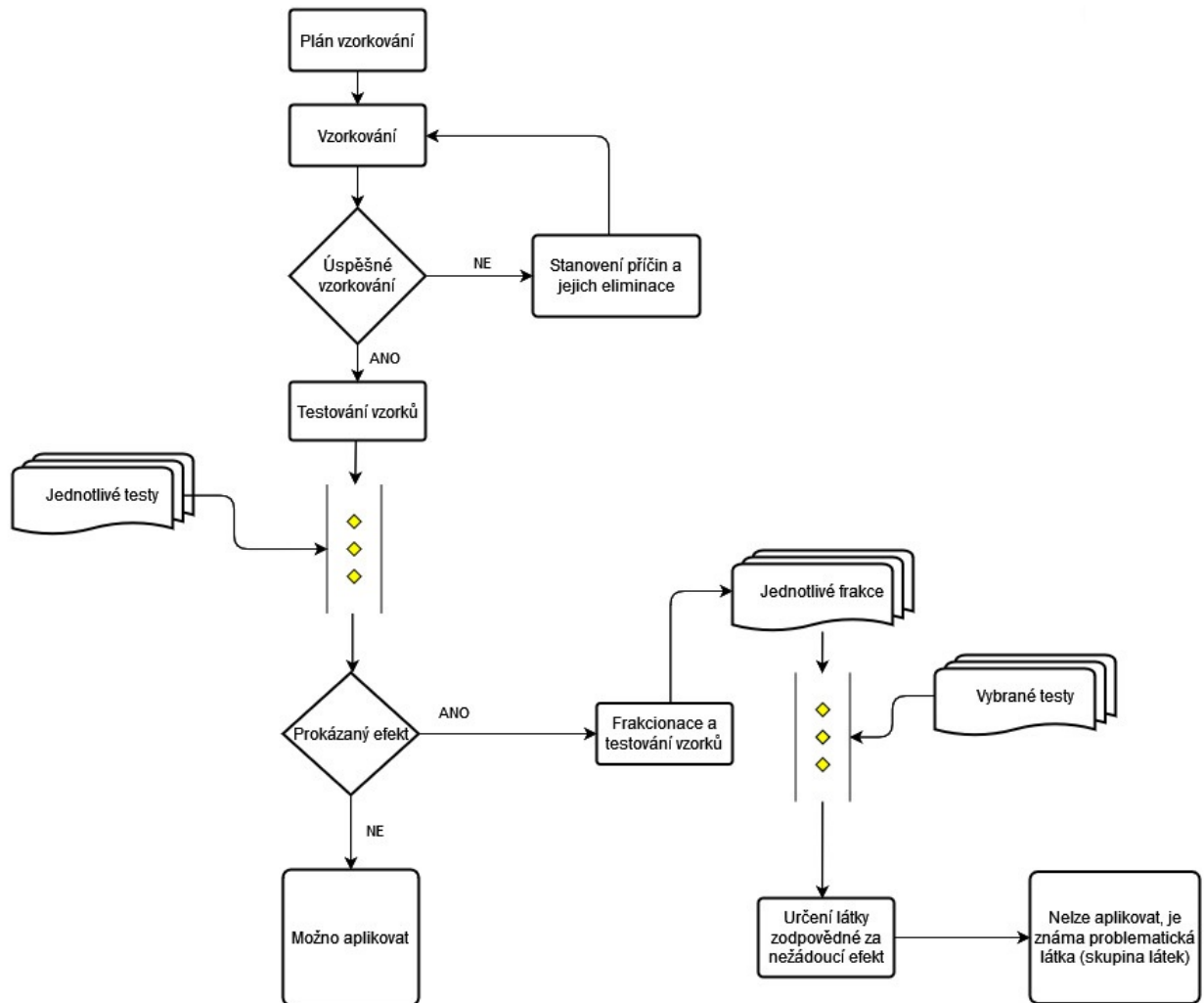
3.3 Postup posouzení podmínek bezpečného využití vody a kalů z ČOV

Postup je rozdělen do 4 kroků.

1. Vytvoření plánu vzorkování tak, aby vyhověl požadavkům této metodiky. V rámci plánu je třeba stanovit vzorkovací místo, které zabezpečí odběr reprezentativního vzorku, bezpečnou instalaci a deinstalaci vzorkovačů včetně jejich zabezpečení před nežádoucími zásahy třetích osob během vzorkování a časový rozvrh vzorkování. V časovém rozvrhu je třeba počítat s poškozením vzorkovacích zařízení během vzorkování a vzorkování je tudíž třeba naplánovat na období celkem 6 týdnů pro případnou opakovanou expozici pasivních vzorkovačů.
2. Vlastní vzorkování a analýzy extraktů pomocí kompletní sady metod analýzy biologického účinku doporučených v kapitole 2.3.3 (tabulka 2.3.3.1).
3. Vyhodnocení získaných výsledků pro jednotlivé typy testů
4. Syntéza výsledků a vlastní klasifikace. Při vyhodnocení musí být přihlíženo k principu předběžné opatrnosti a je vhodné využít pravidla „one out – all out“ tj. jeden výsledek nevyhověl, celý soubor výsledků nevyhověl (obr. 3.3.1). V případě, že by bylo vhodné zjistit, jaká látka nebo skupina látek je zodpovědná za nežádoucí efekt a způsobuje to, že není bezpečné použití, je třeba aplikovat postupy EDA analýzy (obr. 3.3.2).



Obr. 3.3.1 Postup pro posouzení vhodnosti bezpečné aplikace odpadní vody a kalu na půdu



Obr. 3.3.2 Postup pro posouzení vhodnosti bezpečné aplikace s identifikací problematických látek bránících bezpečné aplikaci (EDA)

4. Srovnání novosti postupů

Tato metodika se nově zabývá problematikou organických mikropolutantů. Otázka hodnocení vhodnosti aplikace odpadních vod a čistírenských kalů v zemědělství z pohledu organických mikropolutantů nebyla dosud v ČR řešena. Metodika využívá metod pasivního vzorkování a metod hodnotících účinky směsí látek. Z pohledu novosti přístupů nejsou obě skupiny zmiňovaných metod rutinně využívány v oblasti nakládání s odpadními vodami a čistírenskými kaly. Doposud používané metody využívají konvenční přístupy, tj. konvenční metody vzorkování (bodové, slévané, popř. směsné vzorky) a cílené chemické analýzy.

5. Popis uplatnění metodiky

Znalost složení odpadní vody nebo čistírenského kalu z pohledu komplexních směsí organických mikropolutantů je nezbytným předpokladem pro správné posouzení vhodnosti jejich aplikace v zemědělství z pohledu prevence rizika kontaminace podzemních vod, zemědělské produkce i půdy cizorodými látkami. Vzhledem k tomu, že v současnosti nejsou informace o jejich kompletním složení k dispozici, nelze bez těchto dat kvalifikovaně rozhodnout, zda je jejich aplikace v zemědělství bezpečná. Metodika tudíž nabízí alternativní způsob posouzení, pro které není potřeba znát detailní chemické složení. Uplatnění metodiky se předpokládá v případě záměru využít vyčištěných odpadních vod a čistírenských kalů v zemědělství, typicky pro závlahy nebo aplikaci kalů na zemědělskou půdu. Na základě vyhodnocení vhodnosti takovéto aplikace dle této metodiky je možné přispět ochraně jakosti podzemních vod, zemědělské produkce, půdy i lidského zdraví z pohledu organických mikropolutantů. Použití této metodiky může být součástí opatření na ochranu vody a půdy dle § 23a odst.1 písm. b zákona 254/2001 Sb. (Zákon o vodách), dále § 3 odst.2 zákona 334/1992 Sb. (Zákon o ochraně zemědělského půdního fondu) a § 69 odst. 1 zákona 541/2020 Sb. (Zákon o odpadech).

Tato metodika je zejména určena pro podniky Povodí v rámci činností správy povodí, v rámci obecné ochrany vod pro vodoprávní úřady, v rámci ochrany půdy pak Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému.

6. Ekonomické aspekty

Aplikace této metodiky poskytuje efektivní využití metod, které umožňují reprezentativnější odběr vzorku bez nutnosti odběru vysokého počtu vzorků oproti konvenčním metodám vzorkování a vyhodnocení rizikosti aplikace komplexních směsí organických mikropolutantů, bez nutnosti provádět nákladné cílené analýzy stovek až tisíců cizorodých látek, které se běžně v odpadních vodách a čistírenských kalech vyskytují. Ekonomický přínos metodiky je omezeně vyčíslitelný, jelikož vyčíslení nákladů na cílené analýzy je závislé na použitých analytických technikách a počtu cílových analytů, které definují počet nutných analytických metod a analytických stanovení. V tabulce 6.1 je uveden odhad porovnání nákladů na metody necílených chemických analýz a metod biologického účinku.

Tabulka 6.1 Odhadované náklady pro metody chemických analýz a metod biologického účinku

Matrice	Vzorkovač/ SPE (Kč)	Extrakce (Kč)	Analýza (Kč)	Interpretace a vyhodnocení dat (Kč)	Celkem (Kč)	Komerční dostupnost	Metoda
Silikon	1000	250	5000 *	20000	26250	Ne ⁺	Necílená chemická analýza
POCIS	1000	250	6000 **	40000	47250	Ne ⁺	
Voda	250	250	11000 ***	60000	71500	Ne ⁺	
Kal		250	11000 ***	60000	71250	Ne ⁺	
Silikon	1000	250	6000 ****	5000	12250	Ano	Analýza biologického účinku
POCIS	1000	250	6000 ****	5000	12250	Ano	
Voda	250	250	6000 ****	5000	11500	Ano	
Kal		250	6000 ****	5000	11250	Ano	

* GC-HRMS analýza

** 2 x LC-HRMS

*** GC-HRMS + 2x LC-HRMS

**** baterie požadovaných biotestů, cena odhadnutá na základě roční licence pro 150 vzorků

+ vyhodnocení necílených analýz je v současné době zejména záležitostí akademické sféry

Je třeba konstatovat, že použití cílených analýz nedokáže poskytnout informace o složení komplexních směsí cizorodých látek, tudíž je nasazení tradičních analytických postupů při zvážení vysokých nákladů analýz a nízké informační hodnotě výsledků zcela neefektivní a neekonomické.

Z pohledu vzorkování je možné říci, že na základě redukce vzorků odpadní vody z 84 bodových vzorků na 9 vzorků (6 vzorků z pasivních vzorkovačů pro polární látky a 3 vzorky pasivních vzorkovačů pro nepolární látky) dojde nepochybně k úsporám jak při vzorkování, tak při analýze vzorků, jelikož se významně sníží počet zpracovaných vzorků.

Je známým faktem, že prevence bývá efektivnější a levnější než náprava vzniklého problému. V případě kontaminace podzemních vod, nejsou dnes dostupné technologie pro efektivní odstranění komplexních směsí polárních organických mikropolutantů navíc z velkých objemů podzemních vod, které mohou být těmito látkami zasaženy. Jejich odstranění by bylo pouze

teoreticky možné za nepřiměřeně vysokých nákladů, navíc by náprava stavu trvala dlouhé roky až desítky let. Z tohoto důvodu je zabránění vstupu cizorodých látek s negativními efekty vyskytujících se v odpadních vodách a kalech do podzemních vod tou nejméně nákladnou a z pohledu efektivity nejekonomičtější metodou.

Případné náklady na testování vhodnosti aplikace vyčištěné odpadní vody a kalů v zemědělství má z logiky věci nést ten, kdo je bude chtít aplikovat a bude mít z takovéto činnosti užitek. Ten také bude muset předložit výsledky tohoto testování, aby prokázal, že takováto aktivita neohrozí cenné zdroje podzemních vod.

7. Seznam literatury

- ALYGIZAKIS, N. A., BESSELINK, H., PAULUS, G. K., OSWALD, P., HORNSTRA, L. M., OSWALDOVA, M., MEDEMA, G., THOMAIDIS, N. S., BEHNISCH, P. A., SLOBODNIK, J. (2019). Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis, *Environment International*, **127**, 420–429.
- ALVAREZ, D. A., PETTY, J. D., HUCKINS, J. N., JONES-LEPP, T. L., GETTING, D. T., GODDARD, J. P., MANAHAN, S. E. (2004). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 1640–1648.
- ÁLVAREZ-RUIZ, R., PICÓ, Y. (2019). Sequential window acquisition of all theoretical fragments versus information dependent acquisition for suspected-screening of pharmaceuticals in sediments and mussels by ultra-high pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1595**, 81–90.
- ANAGNOSTOPOULOU, K., NANNOU, C., EVGENIDOU, E., LAMBROPOULOU, D. A. (2023). Does climbazole instigate a threat in the environment as persistent, mobile and toxic compound? Unveiling the occurrence and potential ecological risks of its phototransformation products in the water cycle. *Journal of Hazardous Materials*, **458**, 131854.
- ANKLEY, G.T., BENNETT, R.S., ERICKSON, R.J., HOFF, D.J., HORNING, M.W., JOHNSON, R.D., MOUNT, D.R., NICHOLS, J.W., RUSSOM, C.L., SCHMIEDER, P.K., SERRRANO, J.A., TIETGE, J.E., VILLENEUVE, D.L. (2010). Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**(3), 730–741.
- BACALONI, A., CAVALIERE, C., FABERI, A., FOGLIA, P., MARINO, A., SAMPERI, R., LAGANÀ, A. (2007). Evaluation of the atmospheric pressure photoionization source for the determination of benzidines and chloroanilines in water and industrial effluents by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, **72**(2), 419–426.
- BECKER, R. W., ARAÚJO, D. S., JACHSTET, L. A., RUIZ-PADILLO, A., DO AMARAL, B., DE SOUZA, J. E., ATHAYDE, C. D., ATHAYDE, G. B., SIRTORI, C. (2023). Classifying micropollutants by environmental risk in groundwater using screening analysis associated to a hybrid multicriteria method combining (Q)SAR tools, fuzzy AHP and ELECTRE. *Science of The Total Environment*, **892**, 164588.
- BRACK, W., AIT-AISSA, S., BURGESS, R.M., BUSCH, W., CREUSOT, N., DI PAOLO, C., ESCHER, B.I., MARK HEWITT, L., HILSCHEROVA, K., HOLLENDER, J., HOLLERT, H., JONKER, W., KOOL, J., LAMOREE, M., MUSCHKET, M., NEUMANN, S., ROSTKOWSKI, P., RUTTKIES, C., SCHOLLEE, J., SCHYMANSKI, E.L., SCHULZE, T., SEILER, T.-B., TINDALL, A.J., DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G., VRANA, B., KRAUSS, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments – An in-depth overview. *Science of The Total Environment*, **544**, 1073–1118.

- BRACK, W., AISSA, S. A., BACKHAUS, T., DULIO, V., ESCHER, B. I., FAUST, M., HILSCHEROVA, K., HOLLENDER, J., HOLLERT, H., MÜLLER, C., MUNTHER, J., POSTHUMA, L., SEILER, T.-B., SLOBODNIK, J., TEODOROVIC, I., TINDALL, A. J., DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G., ZHANG, X., ALTENBURGER, R. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, **31**(1), 10.
- CCANCCAPA-CARTAGENA, A., PICO, Y., ORTIZ, X., REINER, E.J. (2019). Suspect, non-target and target screening of emerging pollutants using data independent acquisition: Assessment of a Mediterranean River basin. *Science of The Total Environment*, **687**, 355–368.
- CELIC, M., JAÉN-GIL, A., BRICENO-GUEVARA, S., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., GROS, M., PETROVIC, M. (2021). Extended suspect screening to identify contaminants of emerging concern in riverine and coastal ecosystems and assessment of environmental risks. *Journal of Hazardous Materials*, **404 A**, 124102.
- ČSN 75 7143 (757143) Jakost vod. Jakost vody pro závlahu.
- ČSN EN/ISO 5667-13 (757051) Jakost vod – Odběr vzorků – Část 13: Návod pro odběr vzorků kalů.
- ČSN EN ISO 5667-15 (757051) Jakost vod – Odběr vzorků – Část 15: Pokyny pro konzervaci a manipulaci se vzorky kalu a sedimentu.
- ČSN EN ISO 5667-23 (757051) Jakost vod – Odběr vzorků – Část 23: Návod pro pasivní odběr vzorků v povrchových vodách.
- ČSN ISO 5667-10 (757051) Kvalita vod – Odběr vzorků – Část 10: Návod pro odběr vzorků odpadních vod.
- DÜRIG, W., TRÖGER, R., ANDERSSON, P. L., RYBACKA, A., FISCHER, S., WIBERG, K., AHRENS, L. (2019). Development of a suspect screening prioritization tool for organic compounds in water and biota. *Chemosphere*, **222**, 904–912.
- ESCHER, B. I., STAPLETON, H. M., SCHYMANSKI, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, **367**(6476), 388–392.
- FEDOROVA, G., RANDAK, T., LINDBERG, R. H., GRABIC, R. (2013). Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **27**(15), 1751–1762.
- FINCKH, S., BECKERS, L.-M., BUSCH, W., CARMONA, E., DULIO, V., KRAMER, L., KRAUSS, M., POSTHUMA, L., SCHULZE, T., SLOOTWEG, J., VON DER OHE, P. C., BRACK, W. (2022). A risk based assessment approach for chemical mixtures from wastewater treatment plant effluents, *Environment International*, **164**, 107234.
- GARCÍA-VARA, M., ORLANDO-VÉLIZ, D., BONANSEA, R. I., POSTIGO, C., LÓPEZ DE ALDA, M. (2023). Prioritization of organic contaminants in a reclaimed water irrigation system using wide-scope LC-HRMS screening, *Journal of Hazardous Materials*, **459**, 132119.

- GOLOVKO, O., KUMAR, V., FEDOROVA, G., RANDAK, T., GRABIC, R. (2014a). Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**(12), 7578–7585.
- GOLOVKO, O., KUMAR, V., FEDOROVA, G., RANDAK, T., GRABIC, R. (2014b). Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere*, **111**(0), 418–426.
- GOLOVKO, O., KOBÁ, O., KODESOVÁ, R., FEDOROVA, G., KUMAR, V., GRABIC, R. (2016). Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(14), 14068–14077.
- GOLOVKO, O., ŠAUER, P., FEDOROVA, G., KROUPOVÁ, H. K., GRABIC, R. (2018). Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Science of The Total Environment*, **621**, 1066–1073.
- GRABIC, R., FICK, J., LINDBERG, R.H., FEDOROVA, G., TYSKLIND, M. (2012). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, **100**(0), 183–195.
- GRABIC, R., GARBICOVÁ, K., FEDOROVA, G., GOLOVKO, O., RANDÁK, T. (2015). Metodika sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů. Edice metodik, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ISBN 978-80-7514-031-9.
- GRABIC, R., VRANA, B., FEDOROVA, G., ŠVECOVÁ, H., URIK, J., ČERVENÝ, D., GOLOVKO, O., GRABICOVÁ, K., ŠANDOVÁ, M., TUREK, J., RANDÁK, T. (2018). Využití pasivních vzorkovačů POCIS pro monitoring farmak a pesticidů v povrchových vodách. Edice metodik, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ISBN 978-80-7514-067-8.
- GRABIC, R., IVANOVÁ, L., KODEŠOVÁ, R., GRABICOVÁ, K., VOJS STAŇOVÁ, A., IMREOVÁ, Z., DRTIL, M., BODÍK, I. (2022). Desorption of pharmaceuticals and illicit drugs from different stabilized sludge types across pH. *Water Research*, **220**, 118651.
- GRABIC, R., MIKUŠOVÁ, P., VOJS STAŇOVÁ, A., TOUŠOVÁ, Z., SMUTNÁ, M., HILSCHEROVÁ, K. (2023). Identifikace polutantů pro odhad stanovení rizik a monitoring: Postupy molekulárně biologické analýzy efektu kombinované s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií. In: Kabelková, I., Benáková, A., Špačková, A, Bareš, V. Eds. Sborník příspěvků 15. Bienální konference CzWA VODA 2023, 20.–22. 9. 2023, Litomyšl, s. 236–242, ISBN: 978-80-908629-3-7
- HOHRENK, L.L., ITZEL, F., BAETZ, N., TUERK, J., VOSOUGH, M., SCHMIDT, T.C. (2020). Comparison of Software Tools for Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Data Processing in Nontarget Screening of Environmental Samples. *Analytical Chemistry*, **92**(2), 1898–1907.

- HOLLENDER, J., SCHYMANSKI, E.L., AHRENS, L., ALYGIZAKIS, N., BÉEN, F., BIJLSMA, L., BRUNNER, A.M., CELMA, A., FILDIER, A., FU, Q., GAGO-FERRERO, P., GIL-SOLSONA, R., HAGLUND, P., HANSEN, M., KASERZON, S., KRUBE, A., LAMOREE, M., MARGOUM, C., MEIJER, J., MEREL, S., RAUERT, C., ROSTKOWSKI, P., SAMANIPOUR, S., SCHULZE, B., SCHULZE, T., SINGH, R.R., SLOBODNIK, J., STEININGER-MAIRINGER, T., THOMAIDIS, N.S., TOGOLA, A., VORKAMP, K., VULLIET, E., ZHU, L., KRAUSS, M. (2023). NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring. *Environmental Sciences Europe*, **35**(1), 75.
- HOUTMAN, C. J., TEN BROEK, R., VAN OORSCHOT, Y., KLOES, D., VAN DER OOST, R., ROSIELLE, M., LAMOREE, M. H. (2020). High resolution effect-directed analysis of steroid hormone (ant)agonists in surface and wastewater quality monitoring. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **80**, 103460.
- HUCKINS, J.N., PETTY, J.D., LEBO, J.A., ALMEIDA, F.V., BOOIJ, K., ALVAREZ, D.A., CLARK, R.C., MOGENSEN, B.B. (2002). Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environmental Science and Technology*, **36**, 85–91.
- HUCKINS, J. N., PETTY, J. D., AND BOOIJ, K. 2006. Monitors of Organic Chemicals in the Environment: Semipermeable Membrane Devices. Springer, New York. 223 pp.
- HUNTSCHA, S., SINGER, H.P., MCADELL, C.S., FRANK, C.E., HOLLENDER, J. (2012). Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1268**, 74–83.
- CHEN, L., YAN, X., ZHOU, X., PENG, P., SUN, Q., ZHAO, F. (2023). Advances in the on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry analysis of emerging organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **160**, 116976.
- JOSEPH, N. T., SCHWICHTENBERG, T., CAO, D. P., JONES, G.D., RODOWA, A. E., BARLAZ, M. A., CHARBONNET, J. A., HIGGINS, C. P., FIELD, J. A., HELBLING, D. E. (2023). Target and Suspect Screening Integrated with Machine Learning to Discover Per- and Polyfluoroalkyl Substance Source Fingerprints. *Environmental Science and Technology*, **57**(38), 14351–14362.
- KODEŠOVÁ, R., KLEMENT, A., GOLOVKO, O., FÉR, M., KOČÁREK, M., NIKODEM, A., GRABIC, R. (2019). Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *Journal of Environmental Management*, **250**, 109407.
- KODEŠOVÁ, R., ŠVECOVÁ, H., KLEMENT, A., FÉR, M., NIKODEM, A., FEDOROVA, G., RIEZNYK, O., KOČÁREK, M., SADCHENKO, A., CHROŇÁKOVÁ, A., GRABIC, R. (2024). Contamination of water, soil, and plants by micropollutants from reclaimed wastewater and sludge from a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, **907**, 167965.
- LINDBERG, R.H., ÖSTMAN, M., OLOFSSON, U., GRABIC, R., FICK, J. (2014). Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. *Water Research*, **58**(0), 221–229.
- Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) 2020/741 ze dne 25. 5. 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vod.

- Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.
- Nařízení vlády 416/2010 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod podzemních.
- NG, K., ALYGIZAKIS, N., ANDROULAKAKIS, A., GALANI, A., AALIZADEH, R., THOMAIDIS, N.S., SLOBODNIK, J. (2022). Target and suspect screening of 4777 per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in river water, wastewater, groundwater and biota samples in the Danube River Basin. *Journal of Hazardous Materials*, **436**, 129276.
- NGUYEN, T.T.N., BADUEL, C. (2023). Optimization and validation of an extraction method for the analysis of multi-class emerging contaminants in soil and sediment. *Journal of Chromatography A*, **1710**, 464287.
- NORMAN [online], (2019). Joint NORMAN and Water Europe Position Paper: Contaminants of Emerging Concern in Urban Wastewater.[cit. 2023-10-14]. Dostupné z: https://www.normandata.eu/sites/default/files/files/Publications/Position%20paper_CECs%20UWW_NORMAN_WE_2019_Final_20190910_public.pdf.
- Norwegian Environment Agency [online], (2018). Screening programe 2017 Suspected PBT compounds. [cit 2023-11-7]. Dostupné z: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m1063/m1063.pdf>.
- ORT, C., LAWRENCE, M.G., REUNGOAT, J., MUELLER, J.F. (2010a). Sampling for PPCPs in Wastewater Systems: Comparison of Different Sampling Modes and Optimization Strategies. *Environmental Science & Technology*, **44**(16), 6289–6296.
- ORT, C., LAWRENCE, M.G., RIECKERMANN, J., JOSS, A. (2010b). Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater Systems: Are Your Conclusions Valid? A Critical Review. *Environmental Science and Technology*, **44**(16), 6024–6035.
- OVERDAHL, K.E., SUTTON, R., SUN, J., DESTEFANO, N.J., GETZINGER, G.J., FERGUSON, P.L. (2021). Assessment of emerging polar organic pollutants linked to contaminant pathways within an urban estuary using non-targeted analysis. *Environmental Science: Processes and Impacts* **23**(3), 429–445.
- PENG, H., SUN, J.X., ALHARBI, H.A., JONES, P.D., GIESY, J.P., WISEMAN, S. (2016). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma is a Sensitive Target for Oil Sands Process-Affected Water: Effects on Adipogenesis and Identification of Ligands. *Environmental Science and Technology*. **50**(14), 7816–7824.
- POCHODYLO, A.L., HELBLING, D.E. (2017). Emerging investigators series: prioritization of suspect hits in a sensitive suspect screening workflow for comprehensive micropollutant characterization in environmental samples. *Environmental Science-Water Research and Technology* **3**(1), 54–65.
- REEMTSMA, T., ALDER, L., BANASIAK, U. (2013). A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1271**(1), 95–104.

- RENAUD, J.B., SABOURIN, L., HOOGSTRA, S., HELM, P., LAPEN, D.R., SUMARAH, M.W. (2022). Monitoring of Environmental Contaminants in Mixed-Use Watersheds Combining Targeted and Nontargeted Analysis with Passive Sampling. *Environmental Toxicology and Chemistry* **41**(5), 1131–1143.
- SMEDES, F., BOOIJ, K. (2012). Guidelines for Passive Sampling of Hydrophobic Contaminants In Water Using Silicone Rubber Samplers. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. **52**. 20 pp., ISBN 978-87-7482-114-4.
- SCHMIDT, T.C. (2018). Recent trends in water analysis triggering future monitoring of organic micropollutants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**(17), 3933–3941.
- SCHYMANSKI, E.L., JEON, J., GULDE, R., FENNER, K., RUFF, M., SINGER, H.P., HOLLENDER, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science and Technology*, **48**(4), 2097–2098.
- ŠAUER, P., VRANA, B., ESCHER, B.I., GRABIC, R., TOUŠOVÁ, Z., KRAUSS, M., VON DER OHE, P.C., KÖNIG, M., GRABICOVÁ, K., MIKUŠOVÁ, P., PROKEŠ, R., SOBOTKA, J., FIALOVÁ, P., NOVÁK, J., BRACK, W., HILSCHEROVÁ, K. (2023). Bioanalytical and chemical characterization of organic micropollutant mixtures in long-term exposed passive samplers from the Joint Danube Survey 4: Setting a baseline for water quality monitoring. *Environment International* **178**, 107957.
- TNV 75 4310 Závlahová zařízení pro mikrozávlahy.
- VAN DER OOST, R., SILENO, G., JANSE, T., NGUYEN, M.T., BESSELINK, H., BROUWER, A. (2017). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part II–field feasibility survey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **36**(9), 2400–2416.
- VRANA, B., RUSINA, T., OKONSKI, K., PROKEŠ, R., CARLSSON, P., KOPP, R., SMEDES, F. (2019). Chasing equilibrium passive sampling of hydrophobic organic compounds in water, *Science of The Total Environment*, **664**, 424–435
- VRANA, B., URIK, J., FEDOROVA, G., SVECOVA, H., GRABICOVA, K., GOLOVKO, O., RANDAK, T., GRABIC, R. (2021a). In situ calibration of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring of pharmaceuticals in surface waters. *Environmental Pollution*, **269**, 116121.
- VRANA, B., SMEDES, F., HILSCHEROVA, K., PROKES, R., SOBOTKA, J., FIALOVA, P., ALYGIZAKIS, N., SLOBODNIK, J., TARABEK, P., MAKOVINSKA, J., THOMAIDIS, N., NIKA, M. CH., KRAUSS, M., MUZ, M., SCHULZE, T., GRABIC, R., GRABICOVA, K. (2021b). Analysis of organic substances in the Danube River surface water by passive sampling (Chapter 32; pp. 349 362). In: Joint Danube Survey 4 Scientific Report: A Shared Analysis of the Danube River (Liska, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodnik, J., Paunovic, M. (eds.). International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna. ISBN: 978-3-200-07450-7.
- Vyhláška MŽP č. 293/2011 Sb. o poplatcích za vypouštění odpadních vod do vod povrchových.
- YUKIOKA, S., TANAKA, S., SUZUKI, Y., ECHIGO, S., KÄRRMAN, A., FUJII, S. (2020). A profile analysis with suspect screening of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in firefighting foam impacted waters in Okinawa, Japan. *Water Research*, **184**, 116207.

ZAVADIL, J. (2008). Kritéria využití městských odpadních vod k závlaze zemědělských plodin, Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, Praha, 67 s., ISBN 978-80-904027-5-1.

Zákon 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů.

Zákon 334/1992 Sb. České národní rady o ochraně zemědělského půdního fondu.

Zákon 541/2020 Sb. o odpadech.

ZULOAGA, O., NAVARRO, P., BIZKARGUENAGA, E., IPARRAGUIRRE, A., VALLEJO, A., OLIVARES, M., PRIETO, A. (2012). Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, **736**, 7–29.

8. Seznam publikací, které předcházely zpracování metodiky

GOLOVKO, O., KUMAR, V., FEDOROVA, G., RANDAK, T., GRABIC, R. (2014a). Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**(12), 7578–7585.

GOLOVKO, O., KUMAR, V., FEDOROVA, G., RANDAK, T., GRABIC, R. (2014b). Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere*, **111**(0), 418–426.

GOLOVKO, O., KOBÁ, O., KODEŠOVÁ, R., FEDOROVA, G., KUMAR, V., GRABIC, R. (2016). Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(14), 14068–14077.

GOLOVKO, O., ŠAUER, P., FEDOROVA, G., KROUPOVÁ, H.K., GRABIC, R. (2018). Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Science of The Total Environment*, **621**, 1066–1073.

GRABIC, R., IVANOVÁ, L., KODEŠOVÁ, R., GRABICOVÁ, K., VOJS STAŇOVÁ, A., IMREOVÁ, Z., DRTIL, M., BODÍK, I. (2022). Desorption of pharmaceuticals and illicit drugs from different stabilized sludge types across pH. *Water Research*, **220**, 118651.

KODEŠOVÁ, R., KLEMENT, A., GOLOVKO, O., FÉR, M., KOČÁREK, M., NIKODEM, A., GRABIC, R. (2019). Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *Journal of Environmental Management*, **250**, 109407.

KODEŠOVÁ, R., FEDOROVA, G., KODEŠ, V., KOČÁREK, M., RIEZNYK, O., FÉR, M., ŠVECOVÁ, H., KLEMENT, A., BOŘÍK, A., NIKODEM, A., GRABIC, R. (2023): Assessment of potential mobility of selected micropollutants in agricultural soils of the Czech Republic using their sorption predicted from soil properties. *Science of The Total Environment*, **865**, 161174.

KODEŠOVÁ, R., ŠVECOVÁ, H., KLEMENT, A., FÉR, M., NIKODEM, A., FEDOROVA, G., RIEZNYK, O., KOČÁREK, M., SADCHENKO, A., CHROŇÁKOVÁ, A., GRABIC, R. (2024). Contamination of water, soil, and plants by micropollutants from reclaimed wastewater and sludge from a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, **907**, 167965.

- MENACHERRY, S.P.M., KOČÁREK, M., KACEROVA, T., KOTÍKOVÁ, Z., KAČER, P., KODEŠOVÁ, R. (2022). The impact of initial concentration of selected pharmaceuticals on their early stage of dissipation in soils. *Journal of Soils and Sediments*, **22** (2), 522–535.
- MENACHERRY, S.P.M., KODEŠOVÁ, R., FEDOROVA, G., SADCHENKO, A., KOČÁREK, M., KLEMENT, A., FÉR, M., NIKODEM, A., CHROŇÁKOVÁ, A., GRABIC, R. (2023). Dissipation of twelve organic micropollutants in three different soils: Effect of soil characteristics and microbial composition. *Journal of Hazardous Materials*, **459**, 132143.
- ŠAUER, P., VRANA, B., ESCHER, B.I., GRABIC, R., TOUŠOVÁ, Z., KRAUSS, M., VON DER OHE, P.C., KÖNIG, M., GRABICOVÁ, K., MIKUŠOVÁ, P., PROKEŠ, R., SOBOTKA, J., FIALOVÁ, P., NOVÁK, J., BRACK, W., HILSCHEROVÁ, K. (2023). Bioanalytical and chemical characterization of organic micropollutant mixtures in long-term exposed passive samplers from the Joint Danube Survey 4: Setting a baseline for water quality monitoring. *Environment International* **178**, 107957.

9. Oponenti

Posudek odborný: doc. Ing. Branislav Vrana, Ph.D., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Posudek ze státní správy: Ing. Michaela Budňáková, Ministerstvo zemědělství, Oddělení zemědělských vstupů

10. Dedikace

Metodika je výsledkem projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK21020080 s názvem: Osud vybraných mikropolutantů, které se vyskytují ve vyčištěné vodě a kalech z čistíren odpadních vod, v půdě.

Metodika pro stanovení podmínek bezpečného využití vody a kalu z čistíren odpadních vod v zemědělství

Vydal Český hydrometeorologický ústav, Na Šabatce 17, Praha 4, 143 06
Praha 2023, 1.vydání, 42 stran

Publikace neprošla jazykovou úpravou. Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají autoři.
Metodika je poskytována bezplatně.

ISBN 978-80-7653-064-5 (pdf)