



# Badanie biodegradacji osadu ściekowego za pomocą testu *Vibrio fischeri*

## Study of Biodegradation of Sewage Sludge Using *Vibrio fischeri* Test

Hana SEZIMOVÁ <sup>1)</sup>, Tomáš SEZIMA <sup>2)</sup>, Ivana TRUXOVÁ <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Mgr., Ph.D.; Department of Biology and Ecology, University of Ostrava, Chittussiho 10, 710 00, Ostrava, Czech Republic; e-mail: hana.sezimova@osu.cz, tel.: (+420) 597 092 259

<sup>2)</sup> Ing., Ph.D.; T.G. Masaryk Water Research Institute, p.r.i., Ostrava Branch Office, Macharova 5, 702 00, Ostrava-Přívoz, Czech Republic; e-mail: tomas\_sezima@vuv.cz, tel.: (+420) 595 134 851

<sup>3)</sup> Ing.; T.G. Masaryk Water Research Institute, p.r.i., Ostrava Branch Office, Macharova 5, 702 00, Ostrava-Přívoz, Czech Republic; e-mail: ivana\_truxova@vuv.cz tel.: (+420) 595 134 812

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu biodegradacji i wstępnej obróbki fizycznej na toksyczność osadu z oczyszczalni ścieków. Toksyczność była określona za pomocą testu wykorzystującego luminescencyjne bakterie *Vibrio fischeri*. Najlepszy efekt uzyskano przy zastosowaniu kombinacji wstępnej obróbki fizycznej za pomocą pola elektrostatycznego i biodegradacji za pomocą mieszanicy kultur bakterii.

Słowa kluczowe: toksyczność, *Vibrio fischeri*, osad z oczyszczalni ścieków, biodegradacja, wstępna obróbka

### Summary

The purpose of the work was to determine the effect of biodegradation and initial physical treatment on toxicity of the sewage treatment sludge. Toxicity was determined by mean of the test using luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. The best effect was obtained by application a combination of initial physical treatment using electrostatic fields and biodegradation using mixed cultures of bacteria.

Keywords: toxicity, *Vibrio fischeri*, sludge from wastewater treatment, biodegradation, pretreatment

### Introduction

Integralną częścią nowoczesnych procesów oczyszczania ścieków jest powstawanie osadów. Stanowią one około jednej czwartej objętości ścieków oczyszczonych, ale koncentruje się w nich 50–80% zanieczyszczeń. Przeróbki osadów na oczyszczalni ścieków polega na ich stabilizacji i higienizacji, w taki sposób, że osady ściekowe mogą być w skuteczny sposób wykorzystane lub usunięte [1].

Polityka UE dotycząca odpadów zakłada zmniejszenie ilości odpadów składowanych i wspiera zapobieganie powstawaniu osadów.

Ogólnie, w krajach UE kierunki wykorzystania osadów ściekowych obejmują zastosowanie w: 32% w rolnictwie, 30% składowane na wysypiskach, 4% zrzut osadu do morza, 10% osadu jest spalane i 24% osadu usuwane za pomocą innych metod.

Składowiskach osadów na składowiskach odpadów, które w wielu krajach UE praktykowane, powinno być zaniechane. Surowy osad jest najczęściej stosowany w rolnictwie jako nawóz organiczny, do rekultywacji gruntów i obróbki termicznej [2].

Jakość osadów ściekowych, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, oceniana jest na podstawie monitorowania zawartości wybranych substancji niebezpiecznych w osadach, oraz monitorowania wskaź-

### Introduction

An integral part of modern wastewater treatment processes is the formation of sediments. They represent about quarter of the volume of the purified waste water, but 50–80% stands for contamination. Treatment of sludge at wastewater treatment plant is related with their stabilization and hygienization in such way that the sludge can be used in and effective manner or removed [1].

The EU policy on waste is reducing stored waste and supporting the sediments forming prevention.

Generally, in the EU the use of sewage sludge in different ways includes: 32% in agriculture, 30% stored on landfill sites, 4% of the sludge is dumped into the sea, 10% of the sludge is incinerated and 24% of the sludge is removed by using other methods.

Landfill debris in landfills, which is practiced in many EU countries, should be discontinued. Raw sludge is most commonly used in agriculture as organic fertilizer, to the recultivation of the land of the land and the heat treatment [2].

The quality of sludge, in accordance with the common law, shall be assessed on the basis of the monitoring of selected hazardous substances in sediments and monitoring of microbiological

ników mikrobiologicznych. Odpady wykorzystywane rolniczo, zgodnie z dekretem czeskim 294/2005 Coll. Podlegają badaniu ostrej ekotoksyczności ekstraktu wodnego na czterech organizmów ryb, rozwielitek, glonów i ziaren gorczycy.

Zalecany zestaw testów toksyczności ekstraktów i próbek ciekłych obejmuje badanie toksyczności na *Daphnia*, glonach, a także hamujący wpływ na luminescencję bakterii *Vibrio fischeri* [3].

Celem przedstawionych badań była ocena ostrej toksyczności próbek osadów ściekowych z wykorzystaniem luminescencji bakterii *Vibrio fischeri*. Test został przeprowadzony na próbkach osadów ściekowych poddanych wstępnej obróbce fizycznej (pole elektromagnetyczne i ultradźwięki) oraz biodegradacji.

## Metody prac eksperymentalnych.

### Charakterystyka próbek osadu

Próbki osadów do badań zostały pobrane w miejsko – przemysłowej oczyszczalni ścieków. Próbki były pobrane zgodnie z normą czeską i przechowywane w temperaturze 4°C, analizy przeprowadzano w ciągu 24 godzin.

### Przygotowanie próbek do testu toksyczności ostrej na bakteriach *Vibrio fischeri*

Ekstrakt osadu dla badania ostrej toksyczności na bakteriach *Vibrio fischeri* przygotowano z 10 g próbki Soxhleta w 200 ml dichlorometanu (DCM). Otrzymany ekstrakt zateża się w wyparce próżniowej do objętości 10 ml. W ekstrakcie oznaczono zawartość ekstrahowalnej masy ograniczonej EOM (Extractable Organic Mass). Następnie, przeprowadzono transfer DCM do dimetylosulfotlenku (DMSO) w atmosferze azotu. Określenie EOM było przeprowadzone metoda wagową.

### Test toksyczności ostrej na *Vibrio fischeri*

Ocenę toksyczności ostrej osadów przeprowadzono obserwując zmiany ilości bakterii z *Vibrio fischeri* zgodnie z metodyką czeską ČSN EN ISO 11348-1 [4]. Test był prowadzony w temperaturze 15°C, zawartość NaCl w próbce wynosi 2%.

Każdą próbkę badano w dziewięciu stężeniach i dwu powtórzeniach. Hamowanie luminescencji mierzono za pomocą luminometru LUMISTox 300 (HACH LANGE GmbH) w dwóch czasach ekspozycji po 15 i 30 minutach. Na podstawie zmierzonych danych obliczono wartość EC50 dla każdego monitorowanego czasu ekspozycji.

## Wyniki

Za pomocą testu na bakteriach luminescencyjnych *Vibrio fischeri* oceniano zmianę toksyczności w próbkach osadów ściekowych w zależności od obróbki wstępnej i biodegradacji.

indicators. Waste is used in agriculture in accordance with the Czech decree 249/2005 Coll. They are subject of test of very acute ecotoxicity on four fish organisms, daphnia, algae and mustard grains.

Recommended test set for the extracts toxicity and liquid samples includes toxicity test on *Daphnia*, algae and also the hamstring effect on luminescence of *Vibrio fischeri* bacteria [3].

The objective of the study was to assess acute toxicity of presented sewage sludge samples using *Vibrio fischeri* luminescence. The test was carried out on samples of sludge treated with initial physical treatment (electromagnetic field and ultrasounds) and biodegradation.

## Methods of the experimental work.

### Sediment samples characteristics

Sediment samples for testing were collected in an urban – industrial wastewater treatment. Samples were taken according to the Czech standard and stored at 4°C, the analysis has been carried out within 24 hours.

### Sample preparation for acute toxicity test on *Vibrio fischeri* bacteria

Sediment extract for acute toxicity studies on *Vibrio fischeri* bacteria was prepared with 10 g of Soxhlet in 200 ml of dichloromethane (DCM). Obtained extract was condensed in the vacuum rotary do a volume of 10 ml. The content of EOM (Extractable Organic Mass) was fixed. Then, the transfer of the DCM to dimethyl sulfoxide (DMSO) in a nitrogen atmosphere was conducted. The EOM determining was carried out by weight method.

### *Vibrio fischeri* toxicity test

The acute toxicity test of sediments was carried out by observing the change of *Vibrio fischeri* quantity according to Czech standard ČSN EN ISO 11348-1 [4]. Test was conducted in temperature of 15°C, NaCl content in the sample equals 2%.

Each sample was studied in nine concentrations and two repetitions. Inhibition of luminescence was measured by use of luminometer LUMISTox 300 (HACH LANGE GmbH) in two times of exposure: 15 and 30 minutes. The EC50 value was calculated on the basis of the measured data for each monitored exposure time.

## Results

Using test on *Vibrio fischeri* luminescence bacteria the evaluation of change in toxicity of the sludge samples in dependence of pretreatment and biodegradation was conducted.

Pierwszy etap obejmował serię 6 badanych próbek obejmował badanie osadów ściekowych po wstępnej obróbce wstępnej (tabela 1). Zestaw doświadczeń wstępnych obejmował próby bez obróbki wstępnej lub biodegradacji, oraz próby z wstępną obróbką za pomocą pola elektrostatycznego i biodegradacji.

Wyniki tych testów wykazały, że wstępna obróbka, przeprowadzona na każdej próbce ekstraktu osadów wpływa na wyniki toksyczności (Tabela 2). Najbardziej toksyczna była próbka 1. którą badano bezpośrednio po pobraniu z oczyszczalni ścieków. Kolejne próbki poddano obróbce wstępnej i biodegradacji. Kombinacja spontanicznej biodegradacji i wstępnej obróbki fizycznej za pomocą pola elektrostatycznego (próbka 4) spowodowała zmniejszenie toksyczności ostrej na próbie ponad 8 razy w czasie ekspozycji 15 minut, 3 razy w czasie 30 minut ekspozycji.

First stage which consisted of series of 6 samples included the examination of sludge after initial pretreatment (table 1). Set of the initial examination contained attempts without pretreatment or biodegradation and attempts with pretreatment by use of electrostatic field and biodegradation.

The results of these tests showed that pre-treatment, carried out on each sample extract affects the results of sediment toxicity (Table 2). The most toxic was a sample number 1, which was examined directly after collecting it from wastewater treatment plant. The following samples have undergone pretreatment and biodegradation. A combination of spontaneous biodegradation and pretreatment by use of electrostatic field (sample 4) caused a reduction in acute toxicity: 8 times on exposure time of 15 minutes and 3 times on exposure time of 30 minutes.

Tabela 1  
Ocena próbek przy pomocy testu toksyczności bakterii *Vibrio fischeri*

Table 1  
Evaluation of the test samples using bacteria *Vibrio fischeri* toxicity

Nr próbki Sample No.	Rodzaj przygotowania próbek osadów ściekowych Type of sludge sample preparation
1	Próba wstępna – bez zmian Preliminary test – no change
2	Fizyczna obróbka wstępna – pole elektrostatyczne Physical pretreatment – electrostatic field
3	Spontaniczna biodegradacja przez 3 tygodnie Spontaneous biodegradation for 3 weeks
4	Spontaniczna biodegradacja przez 3 tygodnie, w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną – pole elektrostatyczne Spontaneous biodegradation by 3 weeks, in combination with a physical pre-treatment – electrostatic field
5	Biodegradacja przez 3 tygodnie, za pomocą mieszanej kultury bakterii Biodegradation by 3 weeks, using a mixed culture of bacteria
6	Biodegradacja przez 3 tygodnie z wykorzystaniem mieszanej kultury bakterii w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną – pole elektrostatyczne Biodegradation by 3 weeks using a mixed culture of bacteria in combination with a physical pre-treatment – electrostatic field

Tabela 2  
Otrzymane wartości EC50  
dla czasu ekspozycji 15 i 30 minut

Table 2  
EC50 values obtained  
for the exposure time of 15 and 30 minutes

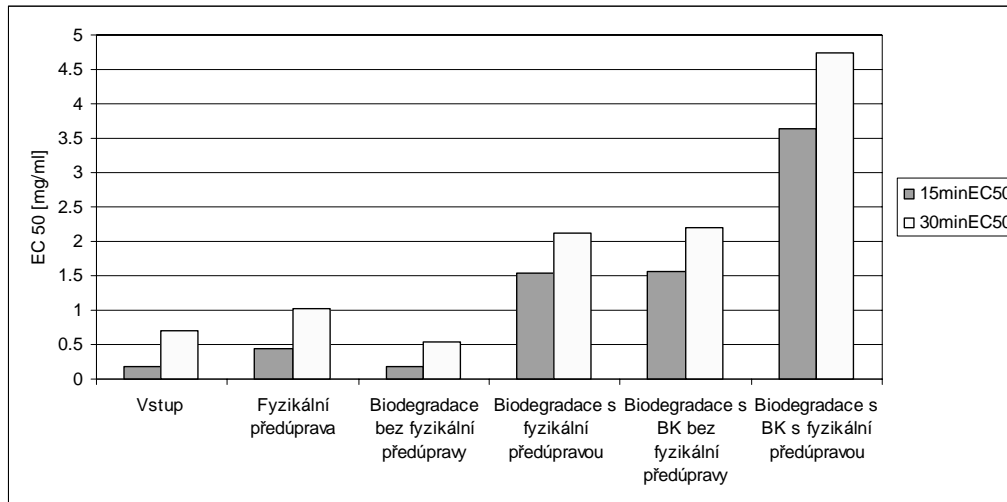
Nr próbki Sample No.	EOM [mg/ml]	15 min EC50 [mg/ml]	30 min EC50 [mg/ml]
1	1,6	0,18	0,71
2	1,9	0,44	1,02
3	1,0	0,18	0,54
4	1,0	1,55	2,12
5	1,6	1,57	2,21
6	1,1	3,64	4,74

Największy spadek toksyczności obserwowano w próbce 6, zaobserwowano zmniejszenie toksyczności ponad 20 razy w czasie ekspozycji 15 minut i więcej niż 6 razy w czasie ekspozycji 30 minut. Graficzne przedstawienie skuteczności różnych rodzajów przygotowania próbki przedstawiono na rys. 1.

Dalsza seria prób miała na celu zbadanie zmian toksyczności w czasie (5 i 7 tygodni) – tabela 3.

The largest toxicity decrease was observed on the 6 sample, where it was observed that toxicity reduction equaled more than 20 times on exposure time of 15 minutes and more than 6 times on exposure time of 30 minutes. Graphical presentation of the effectiveness of different types of sample treatment is shown on Fig. 1.

Further series of tests was to investigate changes in toxicity in time (5 and 7 weeks) – Tab.3.



Rys. 1  
Porównanie EC50 [mg/ml] w próbkach ekstraktów osadów ściekowych

Fig. 1  
Comparison of EC50 [mg/ml] in the samples of sludge extracts

Tabela 3  
Ocena próbek przy pomocy testu toksyczności bakterii *Vibrio fischeri*

Table 3  
Evaluation of the test samples using bacteria *Vibrio fischeri* toxicity

Nr próbki Sample No.	Rodzaj przygotowania próbek osadów ściekowych Type of sludge sample preparation
7	Spontaniczna biodegradacja w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – wejściowa Spontaneous biodegradation in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – input
8	Spontaniczna biodegradacja w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – po 5 tygodniach Spontaneous biodegradation in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – after 5 weeks
9	Spontaniczna biodegradacja w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – po 7 tygodniach Spontaneous biodegradation in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – after 7 weeks
10	Biodegradacja przy pomocy mieszanych kultur bakteryjnych w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – wejściowa Biodegradation by a mixed bacterial culture in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – input
11	Biodegradacja przy pomocy mieszanych kultur bakteryjnych w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – po 5 tygodniach Biodegradation by a mixed bacterial culture in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – after 5 weeks
12	Biodegradacja przy pomocy mieszanych kultur bakteryjnych w połączeniu z fizyczną obróbką wstępną pola elektrostatycznego – po 7 tygodniach Biodegradation by a mixed bacterial culture in combination with a physical pre-treatment of the electrostatic field – after 7 weeks

W tabeli 4 przedstawiono wyniki, uzyskane w wyniku zastosowania spontanicznej biodegradacji i wstępnej obróbki polem elektrostatycznym. Porównanie wyników dla próbki 7 (wstępnej) i próbki 9 (po 7 tygodniach) pozwala na stwierdzenie, że ekspozycja 15 minut powoduje obniżenie toksyczności 3 razy, a ekspozycja 30 minut 1,7 razy.

Celem kolejnych prób było określenie wpływu obróbki ultradźwiękami (wyniki w tabeli 5) na toksyczność. W tabeli 6 zamieszczono porównanie wyników dla próbek poddanych działaniu ultradźwięków i spontanicznej biodegradacji.

W ramach projektu zweryfikowano możliwość stosowania osadów ściekowych jako paliwa, w tabeli 7 przedstawiono toksyczność ostrą próbek paliwa wielokładnikowego i popiołu. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 8. Toksyczność ostrą próbek paliwa i popiołu jest znacznie niższa w porównaniu do wartości EC50 dla surowego osadu.

### Konkluzja

Do oceny potencjalnych zagrożeń związanych z substancjami toksycznymi w osadach ściekowych najczęściej stosowane są procedury określania zawar-

Tab.4. states the results obtained by means of application of spontaneous biodegradation and electrostatic field pretreatment. Comparison of the results for the sample 7 (initial) and sample 9 (after 7 weeks) allows to declare that time exposure of 15 minutes causes 3 times toxicity reduction and exposure time of 30, 1.7 times.

The objective of the following tests was to determine the effect of ultrasounds (results in Tab.5.) onto toxicity. Tab.6. provides comparison of the results for the samples treated with ultrasounds and spontaneous biodegradation.

The project verified the possibility of applying sewage sludge as a fuel, Tab.7. shows the acute toxicity of a multicomponent fuel and ash. Obtained results are shown in Tab.8. Acute toxicity of fuel samples and ash samples is much lower compared to the EC50 values for the raw sludge.

### Conclusion

To assess the potential risks associated with toxic substances in the sludge the most commonly used are the procedures for determining the content and

Tabela 4  
Otrzymane wartości EC50  
dla czasu ekspozycji 15 i 30 minut

Table 4  
EC50 values obtained  
for the exposure time of 15 and 30 minutes

Nr próbki Sample No.	EOM [mg/ml]	15 min EC50 [mg/ml]	30 min EC50 [mg/ml]
7	2,6	1,83	3,68
8	2,9	1,42	2,84
9	1,2	6,09	6,22
10	2,2	2,95	4,76
11	2,5	0,72	1,81
12	2,4	5,68	3,81

Tabela 5  
Ocena próbek przy pomocy testu toksyczności  
bakterii *Vibrio fischeri*

Table 5  
Evaluation of the test samples using bacteria  
*Vibrio fischeri* toxicity

Nr próbki Sample No.	Rodzaj przygotowania próbek osadów ściekowych Type of sludge sample preparation
13	Spontaniczna biodegradacja bez fizycznej obróbki wstępnej Spontaneous biodegradation without physical pre-treatment
14	Spontaniczna biodegradacja z fizyczną obróbką wstępną za pomocą ultradźwięków Spontaneous biodegradation with a physical pre-treatment by means of ultrasound
15	Biodegradacja przy pomocy mieszanych kultur bakteryjnych bez fizycznej obróbki wstępnej Biodegradation by a mixed bacterial culture without physical pre-treatment
16	Biodegradacja przy pomocy mieszanych kultur bakteryjnych z fizyczną obróbką wstępną za pomocą ultradźwięków Biodegradation by a mixed bacterial culture with a physical pre-treatment by means of ultrasound

Tabela 6  
Otrzymane wartości EC50  
dla czasu ekspozycji 15 i 30 minut

Table 6  
EC50 values obtained  
for the exposure time of 15 and 30 minutes

Nr próbki Sample No.	EOM [mg/ml]	15 min EC50 [mg/ml]	30 min EC50 [mg/ml]
13	1,87	0,35	1,17
14	2,2	0,36	1,2
15	2,0	0,14	0,81
16	3,1	0,01	0,34

Tabela 7  
Ocena próbek przy pomocy testu toksyczności  
bakterii *Vibrio fischeri*

Table 7  
Evaluation of the test samples using bacteria  
*Vibrio fischeri* toxicity

Nr próbki Sample No.	Rodzaj przygotowania próbek osadów ściekowych Type of sludge sample preparation
17	Mieszane paliwo wieloskładnikowe Mixed multi-fuel
18	Popiół, niespalone resztki Ash, unburnt residues

Tabela 8  
Otrzymane wartości EC50  
dla czasu ekspozycji 15 i 30 minut

Table 8  
EC50 values obtained  
for the exposure time of 15 and 30 minutes

Nr próbki Sample No.	EOM [mg/ml]	15 min EC50 [mg/ml]	30 min EC50 [mg/ml]
17	2,87	5,2	7,54
18	0,40	22,91	16,23

tości i ilości związków chemicznych. Bardzo ważne jest uzupełnienie analizy chemicznej testami biologicznymi dla określenia toksyczności za pomocą wybranych wrażliwych organizmów wskaźnikowych. W ramach projektu VaV-SP/2f2/98/07 – badania w obszarze odpadów jako substytutu surowców zbadano toksyczność próbek osadów ściekowych, w zależności od zastosowania fizycznej obróbki wstępnej i biodegradacji. Badania przeprowadzono za pomocą testu luminescencji bakterii *Vibrio fischeri*.

Przeprowadzono 4 serie prób. Pierwszej seria doświadczeń koncentrowała się na ocenie wpływu wstępnej obróbki za pomocą pola elektrostatycznego w połączeniu z biodegradacją. Oceniono 6 próbek z różnymi modyfikacjami, stwierdzono, że największy spadek toksyczności obserwowano w przypadku kombinacji biodegradacji za pomocą bakterii obróbki wstępnej za pomocą pola elektrostatycznego. W tym przypadku zaobserwowano zmniejszenie toksyczności ponad 20 razy w czasie 15 minut ekspozycji i ponad 6 razy w czasie 30 minut ekspozycji.

quantity of chemical compounds. Very important is a complement of chemical analysis with biological tests to determine the toxicity by means of selected sensitive indicator organisms. Within the framework VaV-SP/2f2/98/07 – Research in the area of waste as a substitute for raw materials the toxicity of sludge samples was examined, depending on the application of physical pretreatment and biodegradation. The research was conducted by use of *Vibrio fischeri* bacteria luminescence test.

A series of 4 tests were carried out. The first series of experiments focused on assessing the impact of initial treatment using electrostatic field connected with biodegradation. Six samples were rated with different modifications and it was ascertained, that the largest decrease in the toxicity was observed in the case of a combination of biodegradation using bacteria pretreatment and electrostatic field. In this case there was a reduction of toxicity: 20 times on exposure time of 15 minutes and 6 times on exposure time of 30 minutes.

Druga seria doświadczeń, obejmująca również 6 prób, obejmowała obróbkę wstępna w polu elektrostatycznym i biodegradację i zmiany w czasie. Po 7 tygodniach stwierdzono w czasie ekspozycji 15 minut więcej niż trzykrotne zmniejszenie toksyczności i po czasie 30 minut – 1,7-krotny spadek.

Trzecia seria doświadczeń miała na celu określenie skuteczności obróbki wstępnej za pomocą ultradźwięków na toksyczność próbki. Najwyższe zmniejszenie toksyczności obserwowano w próbie, która obejmowała ultradźwięki w połączeniu z biodegradacją, bez dodatku bakterii.

Ostatnie próby obejmują badanie paliwa z osadów ściekowych oraz popiołu. Wyniki badań wykazały, że ostra toksyczność próbek paliwa wieloskładnikowego i próbek popiołu jest znacznie niższa w porównaniu do wartości EC50 surowego osadu.

Podsumowując, należy stwierdzić, że metoda wstępnej obróbki fizycznej osadów ściekowych oraz biodegradacji daje dobre wyniki w zakresie zmniejszenia toksyczności próbek.

The second series of experiments, including 6 attempts, included pretreatment in electrostatic field, biodegradation and changes over time. After 7 weeks it was observed that after 15 minutes of exposure the toxicity decreased 3 times, and 1.7 times in case of 30 minutes.

Third series of experiments was to identify the effectiveness of pretreatment using ultrasound on the samples toxicity. The highest reduction of toxicity were observed in the sample, which included the ultrasound in combination with biodegradation without bacteria addition.

Recent attempts include the study of fuel from sewage and the ash. The results showed that acute toxicity of multicomponent fuel samples and ash samples is much lower compared to the EC50 values of raw sludge.

In conclusion, it should be noted that the physical method of pretreatment of sewage sludge and biodegradation gives good results in terms of reducing the acute toxicity of the samples.

## Literatura – References

1. Pošta, J. et al. (2005): *Čistírny odpadních vod. PowerPoint, ČZU, Praha, ISNM 80-213-1366-8.*
2. Hartig, K. (2003): *Současnost a blízká budoucnost ve spalování kalů z čistíren odpadních vod. In: Spalování kalů z čistíren odpadních vod. CICERO, Ostrava, ISBN 80-239-1380-8.*
3. Vosáhlová, S., Sirotková, D., Hofman, J., Kočí, V., Matějů, V., Záleská, M. (2012): *Návrh změn hodnocení ekotoxicity odpadů v české legislativě. Acta Environmetalice Universitatis Comenianae, Bratislava, Vol. 20, 1. ISSN 1335-0285.*
4. ČSN EN ISO 11348-1 (2009): *Jakost vod- Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi Vibrio fischeri (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi.*