

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH VONNÝCH
LÁTEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

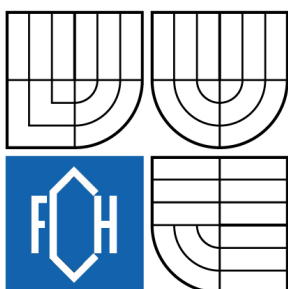
Bc. ALENA LAPČÍKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH VONNÝCH LÁTEK

THE ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF MUSK COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

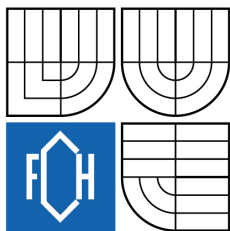
Bc. ALENA LAPČÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0284/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Bc. Alena Lapčíková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Posouzení ekotoxicity vybraných syntetických vonných látek

Zadání diplomové práce:

Na základě vyhodnocení ekotoxikologických údajů vybraných syntetických vonných látek s využitím akvatických a terestrických ekotestů posoudit nebezpečnost látek pro životní prostředí.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Alena Lapčíková
Student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na zhodnocení a posouzení ekotoxicity syntetických vonných látek s využitím testů ekotoxicity. Testovány byly čtyři syntetické vonné látky – galaxolid, tonalid, musk keton a musk xylen. Pro posouzení ekotoxicity byly použity čtyři alternativní testy prováděné na živých organismech a čtyři fytotesty.

Alternativní testy byly prováděny na koryšících *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus*, na žábřonožce *Artemia salina* a na vířníku *Brachionus calicyflorus*. V rámci fytotestů byl proveden test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*, test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa*, test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* a test inhibice růstu okřešku *Lemna minor*.

Na základě výsledků testů byly pro testované syntetické vonné látky stanoveny hodnoty EC50, IC50 a LC50 a zhodnocena jejich ekotoxicita.

ABSTRACT

This master's thesis is focused on evaluation of synthetic musk fragrances using ecotoxicity tests. Four musk fragrances were tested – Galaxolide, Tonalide, Musk ketone and Musk xylene. Four alternative ecotoxicity tests with living organisms, one standard ecotoxicity test and three fytotests were used for evaluation of ecotoxicity.

Alternative tests were performed on crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus calicyflorus*. Root growth inhibition test of *Sinapis alba*, root growth inhibition test of *Lactuca sativa*, root growth inhibition test of *Allium cepa* and growth inhibition test of *Lemna minor* were performed in the terms of fytotests.

On the basis of the results the values of EC50, IC50 and LC50 were determined and the ecotoxicity of musk compounds was evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxicita, syntetické vonné látky, musk, ekotesty

KEYWORDS

ecotoxicity, musk fragrances, musk, ecotests

LAPČÍKOVÁ, A. Posouzení ekotoxicity vybraných syntetických vonných látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 120 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis diplomanta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé závěrečné práce. Dále MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za laboratorní pomoc. V neposlední řadě své rodině a svým nejbližším za podporu při studiu.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	8
2.	CÍL PRÁCE.....	9
3.	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1.	Musk sloučeniny	10
3.1.1.	Přírodní musk sloučeniny	10
3.1.2.	Historie	10
3.1.3.	Syntetické vonné látky.....	11
3.1.4.	Vlastnosti	11
3.1.5.	Vstup musk sloučenin do životního prostředí	12
3.1.6.	Nitromusk sloučeniny.....	13
3.1.7.	Polycyklické musk sloučeniny	14
3.1.8.	Makrocyklické musk sloučeniny	15
3.1.9.	Sledované musk sloučeniny.....	16
3.1.10.	Toxicita musk sloučenin	21
3.2.	Ekotoxikologie	25
3.2.1.	Ekotoxikologické testy	25
3.2.2.	Přehled ekotoxikologických testů použitých v rámci práce	27
3.3.	Vyhodnocení testů ekotoxicity.....	35
3.3.1.	NOEC/ANOVA.....	35
3.3.2.	Výpočet hodnot EC _x	37
3.3.3.	Dynamický přístup	40
3.3.4.	Vyhodnocení testů <i>Sinapis alba</i> a <i>Lemna minor</i>	41
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
4.1.	Příprava vzorku	44
4.2.	Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i>	44
4.2.1.	Příprava ředící vody.....	44
4.2.2.	Podmínky testu	44
4.2.3.	Vyhodnocení testu	44
4.3.	Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i>	45
4.3.1.	Růstové médium	45
4.3.2.	Provedení testu	45
4.3.3.	Vyhodnocení testu	45
4.4.	Test inhibice růstu salátu <i>Lactuca sativa</i>	45

4.4.1.	Příprava ředící vody.....	45
4.4.2.	Podmínky testu	46
4.4.3.	Vyhodnocení testu	46
4.5.	Daphtoxkit F TM	46
4.5.1.	Příprava standardní sladké vody.....	46
4.5.2.	Inkubace epiphytí <i>Daphnia magna</i>	47
4.5.3.	Předkrmení testovacích organizmů	47
4.5.4.	Plnění testovací desky	48
4.5.5.	Přenos neonatů do testovacích šachet.....	48
4.5.6.	Vyhodnocení testu	48
4.6.	Thamnotoxkit F TM	48
4.6.1.	Příprava standardní sladké vody.....	49
4.6.2.	Inkubace cyst <i>Thamnocephalus platyurus</i>	49
4.6.3.	Plnění testovací desky	49
4.6.4.	Přenos larev do testovacích šachet	50
4.6.5.	Vyhodnocení testu	50
4.7.	Test na nitěnkách.....	50
4.8.	Akutní test toxicity na žábřonožkách <i>Artemia salina</i>	50
4.8.1.	Inkubace cyst <i>Artemia salina</i>	50
4.8.2.	Plnění testovací desky	51
4.8.3.	Přenos larev do testovacích šachet	51
4.8.4.	Vyhodnocení testu	51
4.9.	Rotokit F TM	51
4.9.1.	Příprava ředící vody.....	51
4.9.2.	Inkubace cyst	52
4.9.3.	Plnění testovací desky	52
4.9.4.	Přenos larev do šachet	52
4.9.5.	Vyhodnocení testu	52
4.10.	<i>Lemna minor</i>	53
4.10.1.	Příprava ředící vody	53
4.10.2.	Podmínky testu.....	54
4.10.3.	Provedení testu.....	54
4.10.4.	Vyhodnocení testu	54
5.	VÝSLEDKY.....	55
5.1.	Referenční testy toxicity.....	55

5.2.	Galaxolid	56
5.3.	Tonalid	58
5.4.	Musk keton	61
5.5.	Musk xylen	63
6.	DISKUZE	66
7.	ZÁVĚR	75
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	77
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	82
10.	SEZNAM PŘÍLOH	84
P1.	DICHROMAN DRASELNÝ – DÍLČÍ VÝSLEDKY	85
P2.	CHLORID DRASELNÝ – DÍLČÍ VÝSLEDKY	87
P3.	GALAXOLID – DÍLČÍ VÝSLEDKY	88
P4.	TONALID – DÍLČÍ VÝSLEDKY	96
P5.	MUSK KETON – DÍLČÍ VÝSLEDKY	104
P6.	MUSK XYLEN – DÍLČÍ VÝSLEDKY	112
P7.	TABULKA HODNOT PRO PROBITOVOU ANALÝZU	120

1. ÚVOD

Více než před sto lety byly v laboratoři za přispění náhody objeveny nitroaromatické sloučeniny se silným typickým pižmovým (musk) zápachem, proto dostaly jméno musk sloučeniny. Tento objev nastartoval rychlý růst celosvětové produkce a distribuce nesčetných syntetických vonných látek s různými chemickými strukturami.

Zatímco v dřívějších dobách byly zdrojem vonných látek výhradně přírodní materiály, je dnes rozvoj této oblasti nemyslitelný bez látek vyrobených synteticky. Při aplikacích jde vždy o pestré směsi často několika desítek látek a to ryze přírodního, ryze syntetického nebo kombinovaného původu.

Nelze pochybovat o tom, že v moderní lidské společnosti má průmysl vonných látek své nezastupitelné místo. Spotřebitelé dostávají vonné látky ve formě parfémů, kolínských a toaletních vod, v kosmetických výrobcích, v mýdlech, v pracích a čisticích prostředcích a v dalších, donedávna vůbec neparfémovaných technických výrobcích. Parfém se stal určitým reprezentativním prvkem, který hraje důležitou roli již při prvotním setkání parfémovaného výrobku se zákazníkem. Přestože trendem poslední doby je vůbec přípravy přírodní tělové kosmetiky neparfémovat, u převážné většiny kosmetických, pracích a čisticích produktů se parfém významným způsobem podílí na dotvoření celkového příznivého vjemu výrobku.

V roce 1981 byly dvě syntetické vonné látky skupiny nitromusk sloučenin poprvé detekovány v rybách, mušlích a vzorcích vody odebraných v oblasti Tokya v Japonsku. Tato analýza poskytla první důkaz o tom, že se syntetické vonné látky dostaly do vodní složky životního prostředí a do potravního řetězce. Ve skutečnosti to ale byly nálezy nitro a polycyklických musk sloučenin v Evropě, které nastartovaly diskuze a výzkumy v oblasti nových environmentálních polutantů. [1,2]

2. CÍL PRÁCE

Ačkoli jsou musk sloučeniny hlavně kvůli persistenci a potenciální bioakumulaci středem zájmu, jejich toxicita byla zatím prozkoumávána jen nepatrně. To, jestli lze všechny musk sloučeniny zařadit mezi látky toxické a jakou toxicitu jim přisoudit, je v současné době stále předmětem mnoha studií.

Diplomová práce je zaměřena na ekotoxikologické hodnocení čtyř nejčastějších syntetických vonných látek – dva zástupci ze skupiny nitromusk (musk xylen, musk keton) a dva ze skupiny polycyklických musk sloučenin (galaxolid, tonalid).

Pro dosažení cílů bude provedeno:

- ekotoxikologické zhodnocení vybraných syntetických vonných látek pomocí standardních testů toxicity,
- ekotoxikologické zhodnocení vybraných syntetických vonných látek pomocí alternativních testů toxicity,
- zhodnocení získaných výsledků.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Musk sloučeniny

V oblasti vonných látek jsou musk sloučeniny používány už po staletí. Výraz musk je používán pro širokou škálu chemicky definovaných látek, jejichž struktura se různí, ale jedeno mají stejné – zřetelnou a typickou vůni. Musk sloučeniny zahrnují zástupce jak přírodního charakteru, tak zástupce uměle připravené. Používání vonných látek má dlouhou historii a počátek se datuje již do doby starověku. Ještě na konci 19. století byly populární vůně získávány pouze z přírodních zdrojů. Dnes jsou výlučně využívány vonné látky připravené synteticky. Můžeme je rozdělit do tří hlavních skupin: aromatické nitro musk sloučeniny, polycyklické musk sloučeniny a makrocyclické musk sloučeniny. Zástupci prvních dvou skupin jsou hojně využívány v průmyslu. Detekce nitromusk sloučenin v rybách a lidských matricích rozpoutaly veřejnou debatu na téma používání těchto látek. Tato skutečnost způsobila, že nitro musk sloučeniny začaly být postupně vytlačovány a převládalo použití polycyklických sloučenin. Později ovšem byly v životním prostředí detekovány i polycyklické látky. Proto se očekává, že makrocyclické látky budou hrát v budoucnu důležitou roli na poli kosmetického průmyslu. [1]

3.1.1. Přírodní musk sloučeniny

Zvířecí sekret nazývaný pižmo (musk) je nositelem přírodního pižmového aroma. Sekret je produkován samcem kabara pižmového (*Moschus moschiferus* L.) ve žlázách umístěných v oblasti mezi dutinou břišní a genitáliemi. Kabara pižmový patří do skupiny *Moschidae* a dosahuje velikosti našeho srdce. Žije v horních oblastech východní Asie (Indie, Tibet, Čína, Sibiř a Mongolsko). Aby bylo možné získat ze samce pižmo, je třeba ho zabít a vyjmout z něj žlázy. Plně vyvinuté žlázy obsahují okolo 40 % pižma. Sušením se tato červenohnědá pasta změní v černé granule, které jsou použity pro alkoholové roztoky. Aroma tinktury, která je popisována například jako živočišná, dřevěná, zemitá, se stává intenzivnějším během skladování. Teprve až po značném zdržení vykazuje získaný extrakt příjemnou vůni. Komerčně používané produkty jsou rozdělovány podle svého původu. Nejvyšší z nich, Tonkin musk, pochází z Tibetu a z Číny. Objev a použití musk se datuje zpátky do staré Číny a Indie. V těchto společnostech hrály musky důležitou roli a byly také používány jako léky. Vonné látky se dostaly z Orientu do Evropy díky křížovým výpravám. Zde byly používány také jako léky a složky parfémů. Stejně jako v dávných dobách patří dnes musk sloučeniny k nejdražším přírodním produktům. V roce 1998 se hodnota 1 g přírodních musk sloučenin pohybovala od 30 do 50 amerických dolarů (což je víc než cena zlata, které v té době stálo 10 USD/gram). [1]

3.1.2. Historie

Vzhledem k omezené dostupnosti a vysoké ceně přírodních musk sloučenin se brzy objevila snaha najít určitou náhradu. První náznak se datuje do roku 1759, kdy chemik jménem Markgraf objevil při nitraci jantarového oleje látku s vůní podobnou přírodnímu pižmu. Ačkoli tento výsledek nevedl k okamžitému praktickému využití, povzbudil a ovlivnil pozdější výzkum. V roce 1890, několik let před izolací a objasněním struktury nositelů pižmového zápachu, se Baurovi podařilo nitrací *meta - terc -* butyl toluenu syntetizovat první chemicky definovanou látku pižmové vůně. 2 - (1,1 dimethylethyl) - 4 - methyl - 1,3,5 - trinitrobenzen byl patentován a začal se prodávat jako Baurovo pižmo. Postupem času byli syntetizováni další zástupci skupiny nitrosloučenin a staly se komerčně velmi důležité. [1]

3.1.3. Syntetické vonné látky

Musk sloučeniny tradičně patří mezi nejdůležitější látky používané ve voňavkářském průmyslu. Na jedné straně je to způsobeno jejich vůní, kterou můžeme rozdělit do dvou skupin – květinová a ovocná. Na straně druhé jsou oceňovány díky svým schopnostem fixovat a ucelit vonné kompozice. Zvyšování fixace zlepšuje účinnost vonných látek, protože díky ní dochází k postupnému pomalému úniku těkavých látek, což přispívá ke kvalitnímu prodloužení. Jsou známé také tím, že dokážou vázat vůni v tkaninách. Proto bývají přidávány jako parfémové složky nejen do kosmetických přípravků, ale i do detergentů. Syntetické musk sloučeniny zahrnují široké spektrum látek. Z komerčního hlediska jsou důležité pouze nitromusk sloučeniny, polycyklické a makrocyclické musk sloučeniny. Mnoho let dominovaly na trhu nitromusk sloučeniny. Od roku 1983 jejich podíl postupně klesal konstantně o 5 % ročně. Roku 1987 celkové množství (7000 tun) musk sloučenin tvořilo 67 % polycyklické, 35 % nitromusk a 3 – 4 % makrocyclické sloučeniny. [1]

3.1.4. Vlastnosti

V některých aspektech jsou syntetické vonné látky podobné klasickým organickým polutantům, jako jsou například DDT nebo PCB a patří tedy mezi typická xenobiotika. Díky své lipofilítě a perzistenci jsou ukládány v tukových tkáních vodních organismů, sedimentech a kalech z ČOV. Díky celosvětové produkci a využívání se musk sloučeniny staly všudypřítomnými. Z analytického hlediska mohou být nitro musk sloučeniny analyzovány stejnými metodami jako organochlorované polutanty (např. GC). Najdeme zde však řadu odlišností, které stojí za zmínku. Hlavním rozdílem je skutečnost, že tyto sloučeniny byly vyráběny a používány nepřetržitě. Následně byly konstantně vnášeny do životního prostředí, na rozdíl od klasických polutantů (POPs), které již nejsou využívány, a dá se říci, že jejich koncentrace v životním prostředí se snížila. Přítomnost musk sloučenin, která byla zjištěna v lidských vzorcích jako například v tukových tkáních a mateřském mléce není způsobena příjmem polutantů v potravě. Hlavní branou vstupu musk sloučenin do lidského organismu je adsorpce kůží. To vysvětluje, proč koncentrace musk sloučenin v lidských vzorcích nesouvisí s věkem. Adsorpce lipofilních kosmetických přípravků přes kůži je novým aspektem jak pro výzkum, tak pro chemický průmysl. V tomto případě fungují chemické látky používané denně v domácnostech jako environmentální polutanty. Proto se vysoká kontaminace, která byla pozorována ve vodním ekosystému, nenachází v průmyslových a zemědělských oblastech, ale v místech s vysokou populací, obzvláště v čistírnách odpadních vod. Některé syntetické vonné látky jsou proto specifickými a citlivými indikátory kontaminace odpadní vody.

Používání některých nitro musk sloučenin v kosmetickém průmyslu je dnes legislativně zakázáno. Použití ostatních nitromusk sloučenin je regulováno maximálními povolenými koncentracemi v konečných výrobcích. Polycyklické musk sloučeniny jsou dnes předmětem jednání v rámci Evropské komise. Dosud nebylo vydáno žádné omezení pro používání syntetických musk sloučenin v nekosmetických výrobcích.

Úspěch musk sloučenin v průmyslu vonných látek může být připisován jejich vynikající stabilitě vůči zásadám a světlu, nízké ceně (vyrábí se z levných surovin) ale hlavně jejich příjemné vůni, která je k nerozeznání od přírodně se vyskytujících makrocyclických musk sloučenin. Většina těchto bezbarvých pevných látek se vyznačuje dobrou rozpustností v běžných rozpouštědlech, výbornou perzistencí a vysokou hodnotou Henryho konstanty.

Logaritmus rozdělovacího koeficientu n-oktanol-voda musk sloučenin a některých jejich metabolitů se pohybuje v rozmezí 3,8 až 6,3, jejich molekulová hmotnost je od 206 do 297 g · mol⁻¹. Syntetické vonné látky se potenciálně biokoncentrují a bioakumulují v tukových

tkáních vodních a suchozemských organismů. Do povrchových vod se musk sloučeniny uvolňují zejména z městských čistíren odpadních vod. V USA a v Evropě se podíl musk sloučenin uvolněných do povrchových vod po primárním stupni čištění pohybuje v rozmezí od 14,6 % do 50,6 %. Toto číslo ovšem roste k 87,8 % až 99,9 % se sekundárním stupněm čištění odpadních vod. Nicméně, na výtoku z čistírny odpadních vod byla koncentrace musk sloučenin detekována v rozmezí 0,3 až 410 ng/l. [1, 2]

Nitromusk sloučeniny byly ve větší koncentraci nalezeny na vtoku do ČOV než na jejím výtoku. Většina syntetických musk sloučenin byla odstraněna ve formě kalu, který bývá často využíván jako zemědělské hnojivo. Například ve Švýcarsku je na hnojení polí využíváno $1,07 \cdot 10^8$ kg kalu, což představuje 51 % jeho celkové produkce. Z tohoto pole můžou být s pomocí dešťové vody musk sloučeniny vyluhovány do povrchových vod. [3]

Jednou z vlastností všech musk sloučenin je jejich semivolatilita. Díky tomu se tyto kontaminanty uvolňují do atmosféry téměř ze všech matric, ve kterých jsou přítomny. Sama atmosféra pak tvoří jedno z hlavních transportních médií do jiných složek životního prostředí. Bylo zjištěno, že se do ovzduší dostává 0,01-0,02 % celkového objemu používaných musk sloučenin. Ačkoli jsou vonné látky v atmosféře jako kontaminanty přítomny, jedná se pouze o lokální problémy, protože jak nitro musk, tak polycyklické musk sloučeniny podléhají řadě fotodegradčních reakcí s OH, NO₃ a O₃ radikály a jejich poločasy života se pohybují maximálně v několika desítkách hodin. Toto zjištění vylučuje možný transport těchto sloučenin na větší vzdálenosti. [4]

Lidská kůže je přímo vystavena musk sloučeninám v mnohých produktech. Z použití v domácnostech jsou tyto látky uvolňovány do atmosféry a do odpadních vod. Z čistíren odpadních vod se dostávají dále do akvatického systému. [5]

Díky vysoké rezistenci musk sloučenin ke všem druhům rozkladu jsou tyto látky v přírodě stálé a lze je najít ve všech složkách životního prostředí. Vedle původních sloučenin se však při analýzách začala zjišťovat i přítomnost látek velmi strukturně podobných původním muskům. To vedlo k prvním úvahám o možné metabolizaci primárních sloučenin. Postupem času se potvrdilo, že živé organismy mají schopnost musk sloučeniny částečně přeměňovat a vytvářet tak méně či více toxické metabolity než byla původní sloučenina. [6]

3.1.5. Vstup musk sloučenin do životního prostředí

K průniku do složek životního prostředí může docházet třemi cestami.

- Kontaminace životního prostředí v místech výroby (syntézy) těchto látek.
- Kontaminace odpady – nepoužité produkty, v nichž se tyto látky vyskytují.
- Kontaminace prostřednictvím odpadních vod.

Největší zátěží pro životní prostředí je třetí způsob kontaminace – prostřednictvím odpadních vod, neboť při běžných čistírenských úpravách nedochází k dostatečně účinné mikrobiologické degradaci. Zbytky nemetabolizovaných musk sloučenin (a jejich metabolity) jsou kumulovány jednak v kalech z čistíren odpadních vod, ale také odchází spolu s vyčištěnou vodou do recipientu. V recipientu, který mohou tvořit nádrže i vodní toky pak dochází ke kumulaci těchto látek v potravním řetězci a ustanovují se rovnováhy mezi obsahem musk sloučenin ve vodě a v sedimentu. V rámci vyšších trofických úrovní se věnuje pozornost zejména rybám, nutno však říci, že se tyto látky s největší pravděpodobností nachází i v organismech, které se rybami živí a v lidském těle. Kontaminace z potravy u lidí však není dosud potvrzena ani vyvrácena. Do lidského organismu se tyto látky dostávají hlavně resorpcí pokožkou a přes sliznice dýchacího ústrojí. Pro mnohé musk sloučeniny zatím neexistuje žádná studie, která by informovala o chování těchto látek ve složkách životního

prostředí. Ve velké většině případů se stále spoléhá pouze na softwarové modely, které na základě chemické struktury odhadnou možné chování látek v životním prostředí. [7]

3.1.6. Nitromusk sloučeniny

Éra nitromusk sloučenin započala s objevem Baurova pižma na konci 19. století. V následujících letech byly syntetizovány aromatické nitromusk sloučeniny, které hrály velmi významnou roli při nahrazování přírodních musk sloučenin syntetickými. Tyto umělé látky, ačkoli měly zcela odlišnou strukturu, vykazovaly stejnou vůni jako přírodní vonné látky. Nejznámější nitromusk sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 3.1. V porovnání s ostatními musk sloučeninami jsou nitromusk uznávané díky vůni, fixačním vlastnostem a mnohostrannému použití.

Po mnoho let byly tyto látky produkovány v obrovském množství, obzvláště díky své nízké ceně. Nicméně od roku 1983 začala jejich produkce prudce klesat díky zprávám o alergické reakci, kterou vykazoval musk ambrette. V roce 1981 v Japonsku byly musk keton a musk xylen poprvé detekovány v rybách a ve vodě. Přítomnost obou sloučenin ve vzorcích znamenala jejich potenciál bioakumulace ve vodním systému. V roce 1983 byl musk keton v rybách detekován také v USA. V roce 1993 detekované množství musk xyleny, musk ketonu a musk ambrette v $\mu\text{g}/\text{kg}$ rozpoutala širokou debatu na téma jejich dalšího používání. Následný výzkum lidských vzorků odhalil přítomnost musk xyleny a musk ketonu a v některých případech dokonce menší množství musk ambrette a musk mosken. Výzkum, který byl proveden v roce 1992 v Německu, prokázal přítomnost nitromusk sloučenin v levných kosmetických přípravcích a detergentech. Celkem 55 % zkoumaných kosmetických přípravků (parfémy, pěny na holení, sprchové gely, šampony a krémy) a 41,5 % detergentů obsahovalo nitromusk. V množstvích detekovaných v jednotlivých přípravcích panovaly značné rozdíly. V kosmetických přípravcích převažoval musk ketone, jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí od 4 do 2200 mg/kg . Naopak musk xylene dominoval v detergentech a musk ambrette byl nalezen pouze v jediném přípravku. Tato skutečnost znamenala, že kosmetický průmysl dobrovolně přijal doporučení IFRA z roku 1985 nepoužívat musk ambrette v žádném přípravku, který přichází do kontaktu s kůží.

V roce 1993 se rozpoutala další diskuze na téma používání musk xyleny, která vyústila v doporučení nepoužívat musk xylen v kosmetických přípravcích ani v žádných detergentech. Toto rozhodnutí bylo založeno na důvodném podezření, že musk xylen vykazuje bioakumulační potenciál a je podezřelým karcinogenem. Zjištění vysokého fotoalergenního účinku v roce 1995 znamenalo zákaz používání musk ambrette v jakýchkoliv kosmetických přípravcích v rámci evropské unie. Od roku 1998 jsou musk moskene a musk tibetene zahrnuty do seznamu sloučenin, které nesmí být přítomny v kosmetických výrobcích. Později SCCNPF EU zavedla limity pro musk ketone a musk xylene v kosmetických přípravcích. Rozsáhlá debata na téma používání nitromusk sloučenin měla své výsledky. V roce 1996 bylo zjištěno, že pouze 7 z 56 testovaných levných kosmetických přípravků obsahovalo musk ketone, xylene a tibetene. V detergentech nebyl zjištěn obsah nitromusk sloučenin. [1, 2]

Tabulka 3.1: Významné nitromusk sloučeniny [1]

Název	Triviální název	Molekulový vzorec
1 - (1,1 - Dimethylethyl) - 3,5 - dimethyl - 2,4,6 - trinitrobenzen	Musk xylen, musk xylool	$C_{12}H_{15}N_3O_6$
1 - [4-(1,1 - Dimethylethyl) - 2,6 - dimethyl - 3,5 - dinitrophenyl] - ethanon	Musk keton	$C_{14}H_{18}N_2O_5$
1 - (1,1 - Dimethylethyl) - 2 - methoxy - 4 - methyl - 3,5 - dinitrobenzen	Musk ambrette	$C_{12}H_{16}N_2O_5$
1 - (1,1 - Dimethyl) - 3,4,5 - trimethyl - 2,6 - dinitrobenzen	Musk tibeten	$C_{13}H_{15}N_2O_4$
2,3 - Dihydro - 1,1,3,3,5 - pentamethyl - 4,6 - dinitro - 1H - inden	Musk mosken	$C_{14}H_{18}N_2O_4$

3.1.7. Polycyklické musk sloučeniny

Polycyklické musk sloučeniny byly objeveny až v roce 1950. Jedná se o látky bez nitro skupin, které můžeme rozdělit na deriváty indenu, tetralínu, tricyklické sloučeniny a deriváty kumarínu. Nejdůležitější zástupci jsou uvedeni v tabulce Tabulka 3.2. Stejně jako nitromusk sloučeniny jsou polycyklické látky vyrobeny uměle, nevyskytují se v přírodě a nemají s přírodními vonnými látkami žádný vztah. Jejich využívání začalo v roce 1951 po syntéze Phantolidu, chemicky 6 - acetyl - 1,1,2,3,3,5 - hexymethyldihydroindenu (AHDI). Byly ceněny zvláště díky své atraktivní vůni, ale také díky jejich levnější syntéze vzhledem k makrocyclickým sloučeninám. Ve srovnání s nitromusk sloučeninami jsou kvalitnější vzhledem k vyšší rezistenci vůči světlu a zásadám a ve schopnosti vázat se do tkanin. Také proto jsou mnohem častěji používány v kosmetických přípravcích a detergentech. Snížení produkce nitromusk sloučenin mělo logicky za následek zvýšení produkce polycyklických látek.

Analýza detergentů a kosmetických přípravků v roce 1994 – 1995 odhalila, že galaxolid a tonalid jsou nejčastěji používané polycyklické musk sloučeniny. Koncentrace galaxolidu v kosmetických výrobcích se pohybovala v rozmezí od 0,5 do 500 mg/kg a tonalidu od 1,1 do 520 mg/kg. Ostatní zástupci této skupiny se vyskytovali pouze v nepatrných množstvích. První zmínka o přítomnosti polycyklických sloučenin v rybách a vodě sahá do roku 1994. O rok později byly tyto sloučeniny nalezeny ve vzorcích lidské tkáně a mateřského mléka. Galaxolid a tonalid byly detekovány v obrovských množstvích, hodnoty byly mnohem vyšší než u nitro musk sloučenin. Po tomto zjištění mnoho výrobců kosmetických přípravků a detergentů přestalo polycyklické musk sloučeniny používat. Například versalide se nevyrábí již od roku 1980 kvůli vysokým neurotoxickým efektům. [1, 2, 5]

Tabulka 3.2: Významné polycyklické musk sloučeniny [1]

Název	Triviální název	Molekulový vzorec
1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyrane	Galaxolide, Abbalide, Pearlide	C ₁₈ H ₂₆ O
1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethynone	Tonalide, Fixolide	C ₁₈ H ₂₆ O
1-[6-(1,1-dimethylethyl)-2,3-dihydro-1,1-dimethyl-1H-inden-4-yl]-ethanone	Celestolide, Crysolide	C ₁₇ H ₂₄ O
1-(2,3-dihydro-1,1,2,3,3,6-hexamethyl-1H-inden-5-yl)-ethynone	Phantolide	C ₁₇ H ₂₄ O
1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,1,2,3,3-pentamethyl-4H-inden-4-one	Cashmeran	C ₁₄ H ₂₂ O
1-[2,3-dihydro-1,1,2,6-tetramethyl-3-(1-methyl-ethyl)-1H-inden-5-yl]-ethanone	Traseolide	C ₁₈ H ₂₆ O
1-(3-ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-ethynone	Versalide	C ₁₈ H ₂₆ O

3.1.8. Makrocyclické musk sloučeniny

Rozvoj makrocyclických sloučenin započal v roce 1926, kdy Růžička charakterizoval strukturu mascone a civetone. Ukázalo se, že makrocyclické sloučeniny jsou ketony (živočišné zdroje) a laktony (rostlinné zdroje). Jedná se o 15-ti až 17-ti četné cykly, jejich vůně je ovlivněna velikostí kruhů. Pokud má sloučenina 14 uhlíkových atomů, její odér je pouze slabý. 15-ti až 16-ti uhlíkové kruhy vykazují velmi silnou vůni. Díky svým výjimečným vlastnostem hrají makrocyclické látky důležitou roli ve voňavkářském průmyslu. Začaly se tedy objevovat snahy zlepšit syntézu přírodně se vyskytujících makrocyclických musk sloučenin pro průmyslové aplikace a vyvinout nové, snadněji dosažitelné látky. Syntetické makrocyclické sloučeniny mohou být rozděleny na ketony, diketony, laktony, oxalaktony, dilaktony, ketolaktony a estery. Přehled důležitých sloučenin je uveden v tabulce 3.3.

Vedle přírodně se vyskytujících makrocyclických musk sloučenin byla syntetizována celá řada sloučenin, které bychom v přírodě nenašli. Jedna z nejdůležitějších sloučenin této skupiny je etylene brassylate. Výroba této látky je levná díky snadné syntéze a levným vstupním produktům. Všeobecně je ale syntéza makrocyclických musk sloučenin náročným a mnohokrokovým procesem. Kvůli vysoké výrobní ceně je jejich ekonomická důležitost stále limitována. V roce 1996 představovaly pouhých 5 % celkové produkce musk sloučenin. Očekává se, že makrocyclické musk sloučeniny budou mít v budoucnu velký význam, obzvláště díky tomu, že se mnohé z nich vyskytují v přírodě a ty uměle připravené jsou přírodním látkám velmi podobné. [1, 2]

Tabulka 3.3: Významné makrocyclické musk sloučeniny [1]

Název	Triviální název	Molekulový vzorec
9 - cycloheptadecen - 1 - one	Civetone	$C_{17}H_{30}O$
5 - methylcyclopentadecanone	Muscone	$C_{16}H_{30}O$
Oxacycloheptadec - 8 - en - 2 - one	Ambrettolide	$C_{16}H_{28}O_2$
Oxacyclohexadecan - 2 - one	Exaltolide, Muskalactone, Pentalide, Thibetolide	$C_{15}H_{28}O_2$
Cyclopentadecanone	Exaltone, Normuscione	$C_{15}H_{28}O$
Cycloheptadecanone	Dihydrocivetone	$C_{17}H_{32}O$
Oxacyclohexadecen - 2 - one	Habanolide, Globalide	$C_{15}H_{26}O_2$
1,4 - dioxacycloheptadecanane - 5,17 - dione	Musk T, Musk NN, Astratone, Musk MC - 5	$C_{15}H_{26}O_4$
1,4 - dioxacyclohexadecane - 5,16 - dione	Musk MC - 4, Musk C14	$C_{14}H_{24}O_4$
1,6 - dioxacycloheptadecan - 7 - one	Musk 781, Cervolide	$C_{15}H_{28}O_3$

3.1.9. Sledované musk sloučeniny

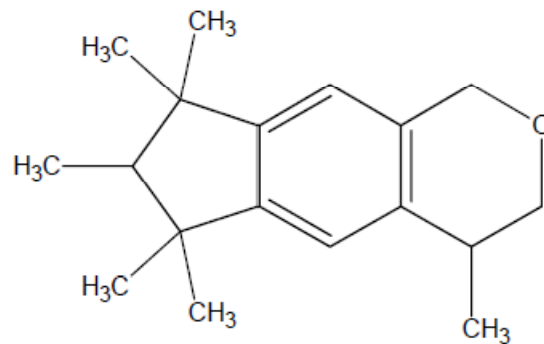
Galaxolid (HHCB)

Galaxolid je mírně viskózní, bezbarvá, stabilní kapalina. Jde o polycyclickou, velmi persistentní látku, která se akumuluje v organismech. Přidává se do šamponů, mýdel, čisticích prostředků, antiperspirantů, voňavek a vonných olejů.

Zdrojem galaxolidu je hlavně chemický průmysl – šampony, mýdla, čisticí prostředky, antiperspiranty, voňavky, vonné oleje apod. [8]

Tabulka 3.4: Vlastnosti galaxolidu [9, 10]

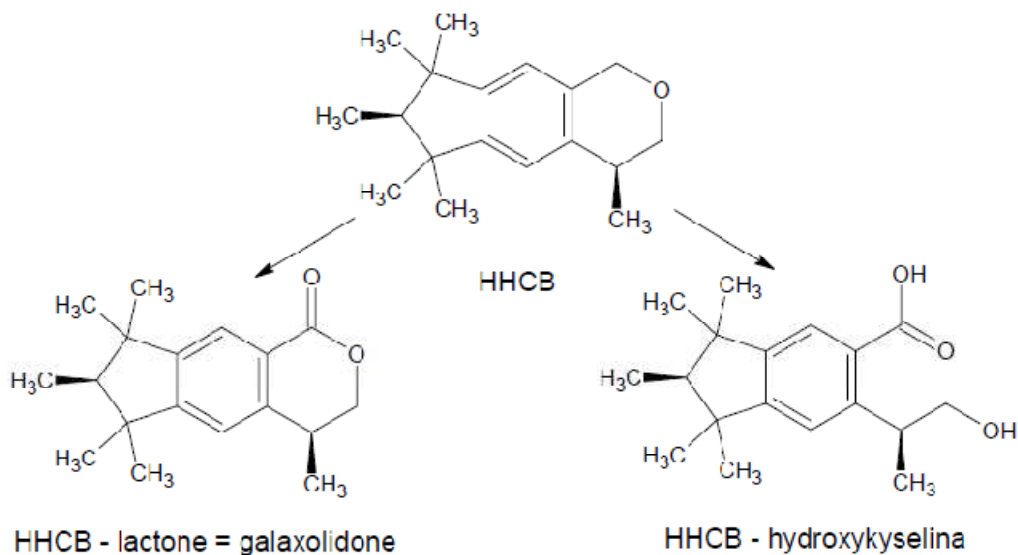
IUPAC název	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyrane
Sumární vzorec	$C_{18}H_{26}O$
CAS	1222-05-5
EINECS	214-946-9
Molekulová hmotnost	258,393 g/mol
Log K_{ow}	5,3
Bod tání	-57,9 °C
Tlak nasycených par	6,08 mbar
vzhled	Bezbarvá viskózní kapalina



Obrázek 3.1: Strukturní vzorec Galaxolidu

Metabolizace Galaxolidu

Výsledky pokusů dokládají, že tato polycyklická musk sloučenina je metabolizována na polárnější HHCB-lakton a HHCB-hydroxykyselinu, které jsou v přírodě velmi rychle degradovány nejrůznějšími mikroorganismy (bakterie nebo houby). [11]



Obrázek 3.2: Metabolizace galaxolidu [12]

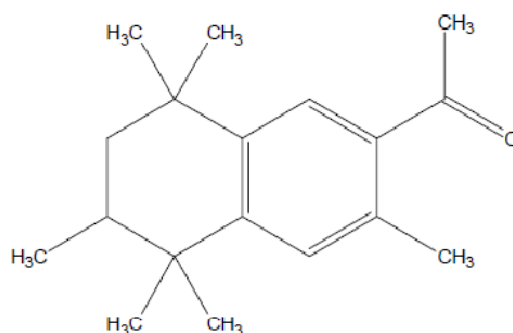
Tonalid (AHTN)

Tonalid voní sladce po květinách a dřevu. Je to polycyklická velmi persistentní látka, která se akumuluje v organismech. Používá se do šamponů, mýdel, čisticích prostředků, antiperspirantů, voňavek. Druh vůně je sladce čistý, mírný.

Možným zdrojem je hlavně chemický průmysl (výroba šamponů, mýdel, čisticích prostředků) ale najdeme jej také v potravinách s vyšším obsahem tuku. [13]

Tabulka 3.5: Vlastnosti tonalidu [9, 10]

IUPAC název	1-(5,6,7,8-tetryhydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethynone
Sumární vzorec	C ₁₈ H ₂₆ O
CAS	21145-77-7
EINECS	244-240-6
Molekulová hmotnost	258,393 g/mol
Log K _{ow}	5,4
Bod tání	57,0 °C
Tlak nasycených par	7,27 mbar
Vzhled	Bílé krystalky



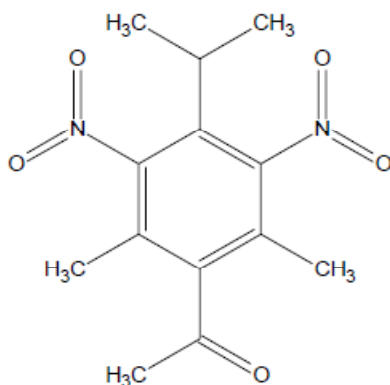
Obrázek 3.3: Strukturální vzorec Tonalidu

Musk keton

Musk keton je prozatímně povolen pro použití ve vybraných vůních do 1,4 %, do 0,56 % v toaletních vodách a do 0,042 % v ostatních kosmetických přípravcích. Najdeme jej také v nekosmetických přípravcích používaných v domácnostech a v detergentech. [9]

Tabulka 3.6: Vlastnosti musk ketonu [9, 10]

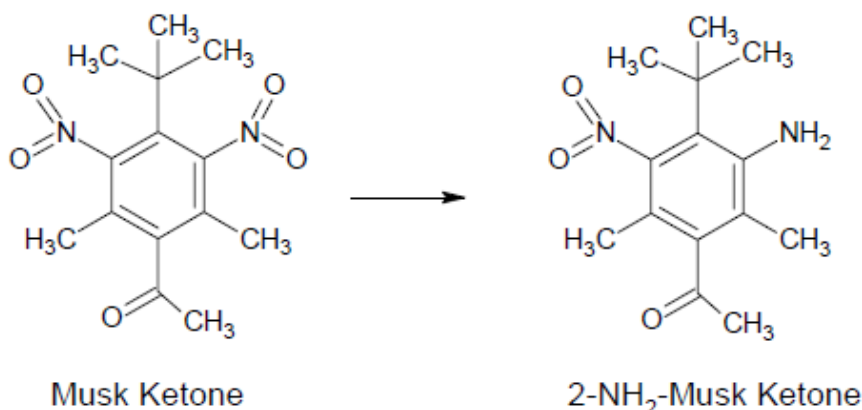
IUPAC název	1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2,6-dinitro-4-acetylbenzene
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅
CAS	81-14-1
EINECS	201-328-9
Molekulová hmotnost	294,271 g/mol
Log K _{ow}	4,3
Bod tání	137,0 °C
Tlak nasycených par	0,004 mbar
vzhled	Světle žluté krystalky
rozpustnost	Ve vodě prakticky nerozpustný



Obrázek 3.4: Strukturální vzorec musk ketonu

Metabolizace musk ketonu

Při metabolizaci musk ketonu se uplatňují jak redukční, tak oxidační reakce. Dochází k redukci nitroskupiny na aminoskupinu a následné oxidaci tert-butyl skupiny a methylových skupin. Musk keton obsahuje nitroskupiny pouze v poloze 2 (ortho), proto vzniká pouze jeden primární metabolit, a to 1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2-amino-6-nitro-4-acetylbenzene. Informace o tomto metabolitu jsou velmi omezené, ale pravděpodobně má také schopnost interagovat s estrogenními receptory a reagovat tak s hormonálním systémem. [14]



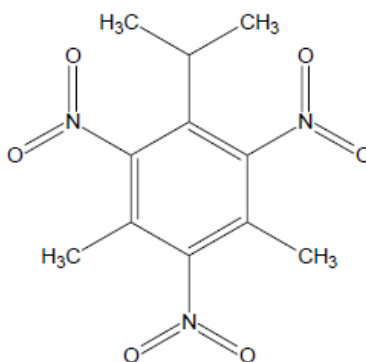
Obrázek 3.5: Metabolizace musk ketonu [12, 15]

Musk xylen

Musk xylen je prozatím povoleno pro použití ve vybraných vůních do 1 %, do 0,4 % v toaletních vodách a do 0,03 % v ostatních kosmetických přípravcích. Najdeme jej také v nekosmetických přípravcích používaných v domácnostech a v detergitech.

Tabulka 3.7: Vlastnosti musk xylenu [9, 10]

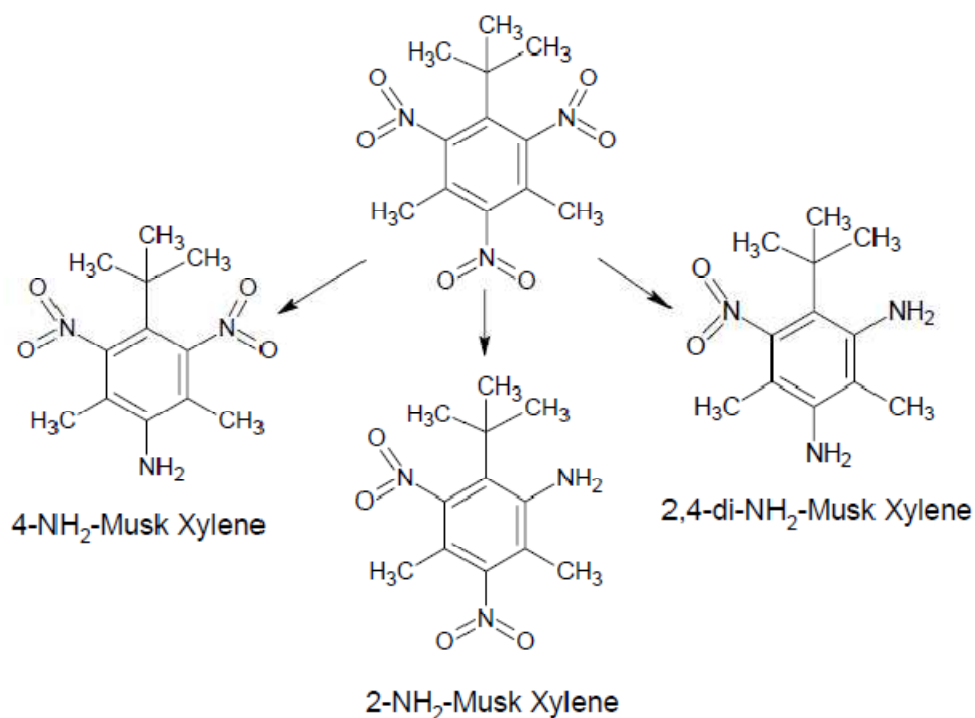
IUPAC název	1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆
CAS	81-15-2
EINECS	201-329-4
Molekulová hmotnost	297,237 g/mol
Log K _{OW}	4,9
Bod tání	114,0 °C
Tlak nasycených par	0,003 mbar
vzhled	Světle žluté krystalky, jemný krystalický prášek
rozpustnost	Ve vodě prakticky nerozpustný



Obrázek 3.6: Strukturální vzorec musk xylenu

Metabolizace musk xylenu

Při metabolizaci musk xylenu se uplatňují jak redukční, tak oxidační reakce. Nitroskupiny obsažené ve struktuře musk xylenu jsou redukovány přes nitroso a hydroxylamin meziprodukty až na aminoskupiny a to jak v poloze 2 (ortho), tak v poloze 4 (para). V živých organismech je upřednostňována redukce v poloze para a vzniká tak 1-tert-butyl- 3,5-dimethyl-4-amino-2,6-dinitrobenzene. Metabolit v poloze ortho (1-tert-butyl-3,5-dimethyl- 2-amino-2,6-dinitrobenzene) se také vyskytuje, ale není tak výrazně zastoupen. Výjimečně vznikají metabolity s aminoskupinami v obou polohách. Druhým krokem metabolizace je oxidace tert-butyl skupiny nebo methylových skupin. Zastoupení 4-amino metabolitu ve vodách je 3-10krát vyšší než zastoupení mateřské sloučeniny. [14, 16]



Obrázek 3.7: Metabolizace musk xylenu [12, 15]

3.1.10. Toxicita musk sloučenin

Bioakumulace musk sloučenin

Dostupná analytická data poukazují na schopnost musk sloučenin biokoncentrovat se v různých vodních druzích, nedokazují však jejich schopnost bioakumulace ve vodním ekosystému. Výsledky analýz provedených na rybách vylovených z řeky Labe neprokazují výraznější rozdíly v obsahu polycyklických a nitromusk sloučenin ve tkáních mladých a starých ryb stejného druhu [17]. Koncentrace musk sloučenin v akvatickém ekosystému je vysoce závislá na vzdálenosti od čistíren odpadních vod [11]. Na rozdíl od PCB sloučenin, pochází potenciál pro toxikologické vlivy vyplývající z expozice mateřskými musk sloučeninami z aktuální koncentrace, které je daný druh vystaven [18]. Většina současných analýz staví díky vyšší metabolické stabilitě a environmentální perzistenci a tím pádem i jejich vyšší koncentraci v biologických vzorcích (například ryby) do popředí zájmu spíše metabolity polycyklických a nitromusk sloučenin než samotné mateřské musk sloučeniny [11, 19].

Tabulka 3.8: Přehled faktoru biokonzentrace a biodostupnosti [20, 21, 22, 23, 24]

Sloučenina	Druh	BCF _w	BAF _w
Musk xylene	<i>Cyprinus carpio</i>	640-6740	-
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1600, 4400	10-60
	<i>Lepomis macrochirus</i>	1600-1700	-
	<i>Xenopus laevis</i>	5030	-
Musk ketone	<i>Tinca tinca</i>	-	230
	<i>Dreissena polymorpha</i>	-	390
	<i>Lepomis macrochirus</i>	1380	-
	<i>Danio rerio</i>	455	-
Tonalid	<i>Tinca tinca</i>	-	510
	<i>Dreissena polymorpha</i>	-	620
	<i>Lepomis macrochirus</i>	1584	-
	<i>Danio rerio</i>	620	-
Galaxolid	<i>Tinca tinca</i>	-	670
	<i>Dreissena polymorpha</i>	-	570
	<i>Lepomis macrochirus</i>	597	-
	<i>Danio rerio</i>	600	-

Toxicita musk sloučenin

Akutní toxicita a potenciální environmentální vlivy nitromusk a polycyklických musk sloučenin byla shrnuta v několika publikacích [11, 25, 26]. Tyto publikace zahrnují testy na řasách (*Pseudokirchineriella subscapitata*), korýších (*Daphnia magna*), slunečnici obecné (*Lepomis macrochirus*), pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*), daníu pruhovaném (*Danio rerio*), střevli (*Pimephales promelas*) a na jihoafrické žábě (*Xenopus laevis*). Výsledky testů jsou shrnuty v tabulce 3.9.

Předmětem studií se staly hlavně musk xylen, musk keton a tři polycyklické musk sloučeniny galaxolid, tonalid a ADBI. Akutní toxicita nitromusk a polycyklických musk sloučenin byla pozorována při poměrně vysokých koncentracích těchto látek.

Mechanismus, jakým je akutní toxicita způsobena zatím není znám. Celkové znečistlivění u ryb a obojživelníků může být pozorováno pouze u vysokých koncentrací, které způsobují akutní toxicitu.

Pozdější studie jsou v rozporu s příspěvkem Behechtiho [27], který zjistil hodnotu akutní toxicity pro derivát nitromusk sloučenin, konkrétně 4-aminomusk xylenu při nižších koncentracích. Jako testovací organismus byl použit *Daphnia magna* a hodnota 48hEC50 byla zjištěna 250 ng/l (interval spolehlivosti 230 – 280 ng/l). Dalším přezkoumáním Behechtiho závěrů Giddinsem [28] bylo zjištěno, že hodnota 48hEC50 je 490 µg/l (interval spolehlivosti 400 – 600 µg/l) z čehož vyplývá, že hodnoty EC50 zjištěné Behechtem byly nadhodnocené. Tato chyba byla s největší pravděpodobností způsobena přítomností vysoce toxických nečistot v zásobním roztoku. Toxická koncentrace 4-amino-musk xylenu pro dafnie je přibližně o čtyři řády větší, než je jejich koncentrace v povrchové vodě a vyčištěné odpadní vodě. Z toho vyplývá, že nitromusk sloučeniny a jejich deriváty představují bezvýznamné riziko pro životní prostředí. [28]

Na základě porovnání koncentrací nitro a polycyklických musk sloučenin nalezených v environmentálních vzorcích a koncentrací, které způsobují akutní toxicitu pro různé vodní druhy, můžeme konstatovat, že tyto sloučeniny nepředstavují akutní riziko pro vodní ekosystém. [29,19]

Tabulka 3.9: Akutní a subakutní toxicita musk sloučenin (všechna data jsou vedena v mg/l) [11, 27, 28, 29, 30]

Druh	Zjišťovaná veličina	Musk xylene	Musk ketone	Galaxolide	Tonalide
Řasy	EC50 (růst)	-	0,244	> 0,797	> 0,854
	EC50 (biomasa)	-	0,118	0,468	0,723
<i>Daphnia magna</i>	24 h EC50	-	-	-	-
	48 h EC50	>5,6	-	-	-
	LC50 (21 dní)	0,680	0,338-0,675	0,341	0,293
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	EC50 (21 dní)	-	0,169-0,338	0,244	0,282
	96 h LC50	>1000	-	-	-
<i>Lepomis macrochirus</i>	LC50 (21 dní)	-	> 0,5	-	-
	96 h LC50	1,20	-	-	-
<i>Danio rerio</i>	LC50 (21 dní)	-	-	0,314	0,452
	LC50 (14 dní) dospělá ryba	0,4	-	-	-
	96 h LC50 (embryo)	> 0,4	> 0,4	> 0,67	> 0,67
	96 h EC50 (embryo)	> 0,4	> 0,4	> 0,67	> 0,67
	LOEC (8 týdnů)	> 0,4	0,033	-	-
<i>Pimephales promelas</i>	96 h EC50 (embryo – teratogenita)	> 0,4	> 0,4	0,18	0,39
<i>Xenopus laevis</i>	96 h EC50 (embryo, růst)	> 0,4	> 0,4	> 1,0	> 1,0
	LC50 (32 dní, embryo, dospělý)	-	-	0,100	> 0,140
	96 h LC50 (embryo)	> 0,4	> 0,4	> 2,0	> 2,0
	96 h LC50 (embryo, teratogenita)	> 0,4	> 0,4	> 4,0	> 4,0
	96 h LC50 (embryo, růst)	> 0,4	> 0,4	> 1,0	> 2,0

Vývojová toxicita

Embrya *Xenopus laevis* a *Danio rerio* byly vystaveny vlivu polycyklických musk sloučenin. U obou embryí bylo možné pozorovat zvýšený výskyt malformací. Ačkoli u dania pruhovaného byly pozorovány malformace způsobené všemi třemi zkoumanými polycyklickými musk sloučeninami, malformace embryí *Xenopus laevis* byly způsobeny pouze látkou ADBI. I když oba druhy představují zástupce s předozadním zakřivením ocasu, koncentrace nezbytné pro vyvolání malformací u *Danio rerio* jsou přibližně o jeden řád nižší, než koncentrace, které způsobí ten samý efekt u embryí obojživelníků.

Z testovaných polycyklických musk sloučenin je látkou způsobující nejvyšší stupeň teratogenity galaxolid, ADBI způsobuje teratogenitu pouze při vysokých koncentracích. Galaxolid vykazuje malformace specifické pro embrya kaprovitých ryb, což dokazuje ztráta ocasu u embryí *Pimephales promelas* při koncentraci 0,067 nebo 0,14 mg/l, zatímco u embryí *Xenopus laevis* vystavenému galaxolidu a tonalidu nebo u embryí *Pimephales promelas* vystavenému tonalidu, nebyly pozorovány žádné malformace.

Ze všech tří polycyklických musk sloučenin, podrobených semi-statickému testu embryotoxicity na *Xenopus laevis*, vykazovaly galaxolid a tonalid výrazný účinek na růst při koncentraci nižší, než je koncentrace vyvolávající akutní toxicitu u embryí. U embryí *Danio rerio* nebyly pozorovány žádné účinky na růst. Podobné efekty byly pozorovány u *Pimephales promelas* vystavené koncentraci Tonalidu 0,140 mg/l, nikoliv však u galaxolidu. [11, 19]

Subchronická/ chronická toxicita

V současné době jsou dostupná pouze omezená data pro zhodnocení nebezpečí nitromusk a polycyklických musk sloučenin pro vodní ekosystém a populace vodních druhů vystavených nižším koncentracím vedoucím k subchronické nebo chronické toxicitě. Obecně existují tři možné nepříznivé interakce xenobiotik se zdravou populací:

- extrémně vysoké výskyty patologických změn (například nádorů plynoucích z genotoxicity nebo nádory podporující aktivity),
- suprese imunitního systému a proto vyšší citlivost populace na různé patogeny,
- endokrinní modulace ovlivňující reprodukční schopnosti populace.

Ani u mateřských sloučenin ani u metabolitů nitromusk a polycyklických musk sloučenin nebyla zjištěna karcinogenní aktivita s výjimkou druhově specifických nádorů jater při vysokých koncentrací musk xylenu pozorovaného u myši.

Dosud nejsou dostupné žádné informace vypovídající o potenciálním vlivu nitromusk a polycyklických musk sloučenin na imunitu vodních druhů. [11, 31, 32, 19]

U nitro musk a polycyklických musk sloučenin je prokázána také inhibice „multidrug efflux transporters“ v žábkách mořského měkkýše *Mytilus californianus*. Jedná se o inhibici buněčné pumpy zodpovědné za ochranu buňky před poškozením a odstraňování toxických látek z buňky. Poškozením této pumpy mohou cizorodé látky volně vstupovat do buňky a hromadit se v ní. Tento nepříznivý efekt trvá i po ukončení expozice organismu dané musk sloučenině. Podobný účinek poškození vylučování škodlivin z buněk je předpokládán také u člověka [17]. Ačkoli přímá souvislost ještě nebyla prokázána, předpokládá se, že zvýšené hladiny koncentrací musk xylenu a musk ketonu v krvi těhotných žen mají souvislost se zvýšeným procentem potratů [18].

Endokrinní modulace

Ačkoli současná databáze informací o potenciálním tlumení endokrinní aktivity nitromusk a polycyklických musk sloučenin je poněkud skromná, kompilace dat získaných z pokusů prováděných na savcích a dat z pokusů in vitro, které byly prováděny s buňkami a tkáněmi vodních organismů, jsou dostačující pro prvotní odhad přinejmenším potenciální (anti)estrogenní aktivity těchto sloučenin. Ani subchronická ani chronická toxicita nitromusk, polycyklických musk sloučenin nebo jejich směsí nevykazují žádnou formu (anti)estrogenní aktivity na hlodavcích. Základem tohoto výroku bylo vážení orgánů a histopatologických vyšetření dělohy, semenných váčků, prsních žláz, varlat, vaječnicků a vagín. Tato zjištění byla potvrzena studií Seinena, který vystavil mláďata myši vysoké koncentraci galaxolidu

a tonalidu přidávaného do krmení a nenašel žádný důkaz, který by dokazoval zvýšení děložní váhy. Zjištěna estrogenní aktivita je přibližně o 6 až 8 řádů nižší než aktivita vnitřního ligandu estradiolu. Pozdější studie ukázaly, že pouze extrémně vysoké koncentrace galaxolidu a tonalidu mají měřitelnou estrogenní účinnost a běžně se vyskytující koncentrace těchto látek, kterým jsou příroda a lidé vystaveni, jsou příliš nízké na to, aby měly vliv na estrogenní aktivitu. Prozkoumána byla také interakce polycyklických musk sloučenin s jaterními estrogenními receptory pstruha duhového, kapra nebo obojživelníka *Xenopus laevis* při zkoušce kompetitivního vázání. V porovnání s vnitřním ligandem estradiolem přibližně o 4 řády vyšší koncentrace tonalidu byla nezbytná pro vyvolání stejného stupně soutěživosti (IC_{50}) v receptoru *Xenopus laevis*.

Mateřské polycyklické musk sloučeniny (musk xylen a musk keton) nevykazují snahu vázat se na endogenní receptory pstruha duhového ani *Xenopus laevis*. Avšak aminometability musk xyleny a musk ketonu, vznikajících při čisticích procesech v čistírně odpadních vod, jsou schopny vázat se na estrogenní receptory jak u pstruha, tak u žáby. Koncentrace 2-aminomusk xyleny, nezbytná pro vytlačení 50 % endogenního ligandu u pstruha duhového, je o šest řádů vyšší než koncentrace endogenního ligandu estradiolu. Tato skutečnost opět potvrzuje, jak nerealisticky vysoké koncentrace tohoto metabolitu jsou nezbytné, aby dokázali soutěžit s endogenním ligandem. Přesto však existují tři známé metabolity musk xyleny a musk ketonu, které jsou schopné u receptoru *Xenopus laevis* soutěžit s endogenním ligandem. Koncentrace potřebné pro tuto soutěživost jsou pouze o dva až tři řády vyšší než koncentrace endogenního ligandu.

In vitro testy prokázaly estrogenní působení musk xyleny, musk ketonu, galaxolidu a hlavně metabolitů musk xyleny, a to pokusem se zvýšením proliferace buněk rakoviny prsu. [33, 34, 19]

3.2. Ekotoxikologie

Vliv chemických sloučenin na životní prostředí je v současné době jedním z aspektů spojených s výrobou chemických látek a produkcí odpadů. Analýzou a transportními mechanismy látek v životním prostředí se zabývá chemie životního prostředí. Účinky těchto látek na živé systémy zkoumá ekotoxikologie. Cílem oboru je vyvíjet metody, které umožňují charakterizovat vliv látek na rostliny, živočichy a bakterie, obecně na živé organismy v životním prostředí. Základem charakterizace jsou testy toxicity prováděné za standardních reprodukovatelných podmínek. Ekotoxikologické metody zkoumání musí být voleny tak, aby umožňovaly srovnání účinků různých látek mezi sebou i srovnání výsledků získaných v různých laboratořích. [35]

3.2.1. Ekotoxikologické testy

Ekotoxikologické testy můžeme dělit podle několika hledisek. Nejdůležitějšími jsou rozdělení podle doby expozice, uspořádání testu a podle úrovně provedení.

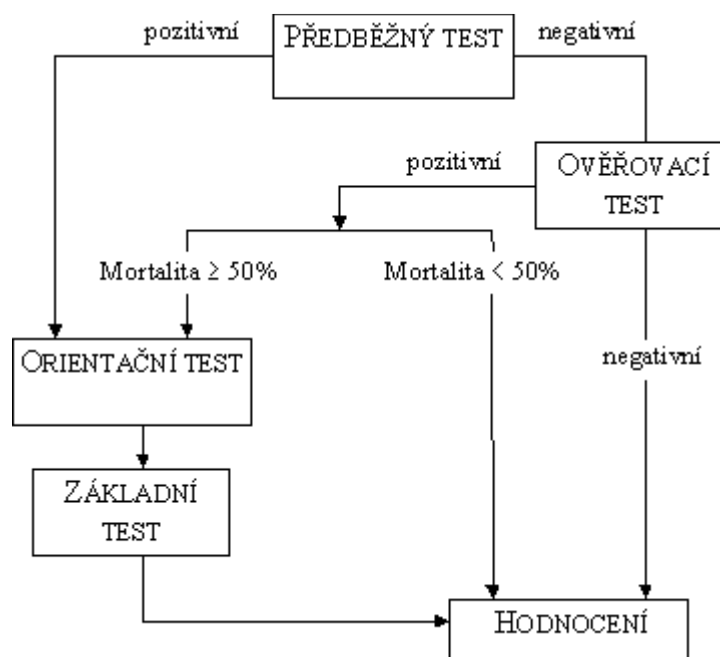
Mezi nejznámější a v laboratorní praxi nejrozšířenější patří standardní laboratorní testy akutní toxicity. V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří evropské metodiky popsané v normách ISO (International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci) a OECD (Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj).

V České Republice jsou doporučovány čtyři konvenční testy identické s evropskými ISO a OECD normami:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity,
- ČSN EN ISO 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchineriella subcapitata* (ISO 8692; 1989),
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – část 2: Obnovovací metoda,
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicky odpadů.

Tyto biotesty jsou uznávány mezinárodními legislativami, ale jejich provedení je značně náročné. Kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat za specifických podmínek a zajišťovat jim kvalitní potravu. Testování zabírá mnoho laboratorního prostoru, spotřebovává velká množství testovaného materiálu, vyžaduje pravidelnou péči o organismy a je tedy časově velmi náročné. [36, 37]

Postup ekotoxikologického hodnocení látek



Obrázek 3.8: Schéma postupu při testu toxicity [38]

Předběžný test

V předběžném testu se vzorek o neznámé toxicitě podrobí první zkoušce s testovacími organismy. Jde o to, zjistit, zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Používají se dvě paralelní nasazení se dvěma kontrolami. Nedojde-li k úhynu žádného organismu, je předběžný test hodnocen jako negativní a přistoupí se k ověřovacímu testu. [38, 39]

Ověřovací test

Negativní výsledek předběžného testu se ověřuje v šesti paralelních nasazeních. Nedojde-li v testovaných roztocích k úhynu o 10% převyšující úhyn v kontrole, je i zde výsledek hodnocen jako negativní. Další testování se neprovádí. Je-li výsledek pozitivní, úhyn v testovaném vzorku převyší o více než 10% úhyn v kontrole, záleží další postup na míře imobilizace či úhynu. V případě mortality nižší 50% se další testy neprovádějí a zjištěné skutečnosti se zaznamenají do protokolu. Překročí-li mortalita 50%, přistupuje se k orientačnímu testu. [38, 39]

Orientační test

Účelem tohoto testu je určení rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu EC50 testované látky. Používá se zde zpravidla 10 koncentrací vodného výluhu, volených v širokém rozpětí. Do tohoto testu se nasazuje menší počet pokusných organismů, obvykle postačuje testovat jednu koncentrační řadu a do každé testované koncentrace nasadit 4 organismy. Cílem je zjistit nejvyšší koncentraci látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů (OC0) a nejnižší koncentraci, která již působí letálně (OC100). [38, 39]

Základní test

Základní test slouží k vlastnímu určení hodnoty EC50. Test sestává zpravidla ze sedmi různých koncentrací vodného výluhu v rozmezí stanoveném orientačním testem. Ředění se provádí tak, aby kolem předpokládané hodnoty EC50 došlo k úhynu nebo imobilizaci 5 - 95 % organismů ve třech či více ředěních. Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěné orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2 - 3 paralelní nasazení. Po 24, 48 a 72 hodinách se odečítá počet uhynulých či imobilizovaných organismů. Ze zjištěných údajů se spočítá hodnota EC50. Na začátku i konci pokusu se zaznamenává teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH v každé testované koncentraci. [38, 39]

Interpretace výsledků

Výsledek ekotoxikologických testů je negativní, jestliže v ověřovacím testu nedojde k překročení 10% imobilizace či úhynu ve srovnání s kontrolou. Jestliže v ověřovacím testu uhne méně než 50% (ale více než 10%) testovaných organismů, nelze hodnotu EC50 stanovit a tato skutečnost se uvede do protokolu. Výsledek je hodnocen jako pozitivní, způsobuje-li testovaná látka větší než 50% úhyn nebo imobilizaci, je výsledkem ekotoxikologické zkoušky hodnota EC50, popř. i doplňkové hodnoty EC10, EC90, EC50/NOEC. [38, 39]

3.2.2. Přehled ekotoxikologických testů použitých v rámci práce

Daphtoxkit FTM

Daphtoxkit FTM používá spící vajíčka korýšů *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* nebo *Ceriodaphnia dubia*, které jsou celosvětově používány k testům toxicity. Tato vajíčka jsou chráněna chytinovou skořápkou zvanou epiphium a mohou být skladována po dlouhou dobu bez ztráty životaschopnosti. Když jsou epiphia umístěna do specifických, životních podmínek, vyvinou se z nich během tří dnů larvy (neonaty), které mohou být přímo použity pro testování. Kultivace vajíček *Daphnia magna* se provádí při teplotě 20 – 22 °C, 6000 lux v časovém intervalu 72 – 80 hodin. Neonaty jsou vyživovány až do doby použití v testu, při

němž již krmení nepokračuje. Pro tento účel se nejčastěji používají lyofilizované řasy *Spirulina micoralgae*.

Po 24 až 48 hodin trvajícím testu se stanoví počet mrtvých (LC50) nebo imobilizovaných (IC50) neonat po expozici testovaným vzorkem. Testovací destičky jsou přizpůsobeny velikosti mikroorganismu, lze testovat 5 koncentrací ve čtyřech opakováních s pěti organismy v jamce. [40]



Obrázek 3.9: Daphtoxkit FTM [41]

Srovnání se standardním testem

Pro většinu z 19 srovnávaných anorganických i organických chemikálií dával Daphtoxkit FTM magna nižší hodnoty EC50 než konvenční test. Daphtoxkit FTM pulex byl citlivější k 8 z 19 testovaných chemikálií v porovnání se standardní *Daphnia magna*. Zvýšená citlivost cyst vylíhlých z epiphíí je však přiřazována spíše vlivu tvrdosti ředící vody (voda ve standardním testu je tvrdší než voda v toxkitech) než testovacímu organismu jako takovému. Lilius et al (1995) srovnávali citlivost *Daphnia magna* a *pulex* na 30 referenčních chemikáliích s velice vysokou korelací a závěr jejich studie spočíval v konstatování, že mezi celkovou citlivostí těchto dvou druhů dafnií není rozdíl. [42]

Využití a výpovědní hodnota

Oba druhy dafnií jsou doporučovány jako standardní organismy pro testy toxicity. *Daphnia magna* je mnohem běžněji používána v laboratoři, přestože se liší od ostatních zooplanktonních druhů nejen svou velikostí, ale i životním prostředím (má rozšíření omezenější hlavně na tvrdší vody), životním cyklem a schopností odolávat predaci ryb. [42]



Obrázek 3.10: *Daphnia magna* [43]

Thamnotoxkit FTM

Jedná se o alternativní biotest, který byl vyvinut týmem Prof. Dr. Persoona na státní Gentské Univerzitě. Testovacím organismem jsou larvy nižšího sladkovodního koryše *Thamnocephalus platyurus*, které jsou vylíhly z cyst. Inkubace probíhá v časovém intervalu 20 – 22 hodin při teplotě 25 °C za stálého osvětlení 4000 lux. Následující den se plní mikroadestička testovacími roztoky a mikropipetou se do každé jamky přenáší vylíhly organismy. Samotný test se provádí po dobu 24 hodin v testovacích roztocích za temna. Po 24 hodinách se počítají mrtvé organismy v každé testovací jamce a stanoví se hodnota LC50. [44]

Srovnání se standardním testem

24 hodinový alternativní test s *Thamnocephalus platyurus* byl srovnán s 48 hodinovým standardním testem akutní toxicity s *Daphnia magna*. Srovnáním párů dat pro 43 čistých chemikálií, 16 výtoků z farmaceutických závodů, 12 domácích a průmyslových odtoků, 63 tuhých odpadů a hloubkových vrtů kalů a sedimentů a 12 průmyslových odtoků byly nalezeny velmi významné korelační vztahy mezi citlivostmi obou koryšů k testovaným látkám. Ukázalo se tak, že Thamnotoxkit FTM může být používán jako alternativa ke konvenčnímu testu s perloočkami. [42]

Využití a výpovědní hodnota

Studie Evropského společenství hodnotila možnosti a limitace použití Thamnotoxkitu FTM pro rutinní monitoring kontaminovaného životního prostředí. Test se ukázal jako vhodný pro hodnocení tuhých odpadů a kalů, hloubkových vrtů, říčních sedimentů a odpadních vod. Společně s dalšími biotesty byl Thamnotoxkit FTM aplikován na různé typy přírodních vzorků i v České Republice. Kromě výše uvedených typů bylo vyzkoušeno jeho použití i pro extrakty ze zemědělské půdy. Jeho aplikace na různé typy kapalných vzorků není příliš omezena ani případným zabarvením vzorku, protože tyto do běla zabarvené koryši jsou dobře viditelné právě proti tmavému pozadí. *Thamnocephalus platyurus* zastupuje v trofické hierarchii úroveň konzumentů a díky podobné citlivosti s *Daphnia magna* je vhodným zástupcem pro testování vzorků z vodních ekosystémů. Jedinou nevýhodou může být to, že se nevyskytuje v prostředí České republiky, což by mohlo znesnadnit interpretaci výsledků při hodnocení našich přírodních ekosystémů. [42]



Obrázek 3.11: *Thamnocephalus platyurus* [45]

Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Testovacím organismem je v tomto testu koryš *Artemia salina* (žábřonožka slanisková). Její vajíčka se k nám dováží v konzervách, téměř výhradně vyráběných v USA, například firmou Ocean Star International, Inc. Vajíčka žábřonožek jsou sbírána ve Velkém solném jezeře v Utahu. Jsou omyta sladkou vodou, usušena a vakuově plněna do konzerv. Běžně jsou používána jako krmivo pro akvarijní ryby. Ač se jedná o organismus žijící ve slaných vodách, nachází se pouze v jezerech, ne v mořích. Výhodou testu jsou značně homogenní vlastnosti vajíček a tedy i čerstvě narozených jedinců. Tím, že jsou čerstvě vylíhnutí jedinci ihned použiti pro test, odpadá náročný chov. [46]

Neotevřená konzerva vajíček má být uložena v chladu a suchu. Líhivost zárodků v cystách je zaručena zhruba jeden rok. Dají se však dobře použít i až 4 roky staré cysty. Otevřená konzerva musí být uchovávána v neporušeném igelitovém sáčku dobře uzavřeném gumičkou a uložena v ledničce. K cystám se nesmí dostat voda ani vzdušná vlhkost. Z jedné konzervy lze získat až několik milionů žábřonožek, u nichž je zaručena vysoká homogenita, stejné vlastnosti. [46]

Líhnutí vajíček/cyst

Obvykle se provádí tak, že se do laboratorní mořské vody, zpravidla o salinitě 1,2-3,0 % NaCl, odebere malé množství cyst. Vodu je dobré udržovat v mírném pohybu. Toho se nejlépe docílí provzdušňováním slabým proudem vzduchu. Tím se zajistí i adekvátní aerace. Je třeba nastavit proudění vzduchu tak, aby cysty vířily ve vodním sloupci a neležely na dně nebo na hladině. Líhivost kvalitních cyst se obvykle blíží 100 %. Optimální teplota pro líhnutí je 27 až 29 °C, kdy k vylíhnutí dochází přibližně do 18 hodin. Snížením teploty na 25 °C nedojde ke změně v citlivosti nauplií, ale k prodloužení doby líhnutí; při této teplotě se líhnou za 24 hodin a to je pro provozní podmínky v laboratořích často příznivější. Nevylíhlá vajíčka obvykle leží na dně, prázdné skořápky plavou na hladině. Živé žábřonožky jsou přitahovány světlem a lze je tedy pomocí bodového světelného zdroje dobře shromáždit na jednom místě a pak odlovit. [46]

Pracovní postup

Pro testování se používají čerstvě vylíhnutí jedinci artemií, tzv. nauplii. Bez krmení je životnost nauplií v ideálních podmínkách 96 až 120 hodin. Z Petriho misek jsou vylíhnutí

jedinci přeneseni pipetou do misek s testovanými koncentracemi zkoumaného vzorku. Během testu se žábřonožky nekrmí. Testovaný roztok se neprovzdušňuje. Zaznamenává se úmrtnost nauplií. Nejčastěji se za dobu testu volí 24 hodin. Doporučuje se však odečítat úhyn i po delší době.



Obrázek 3.12: *Artemia salina* [47]

Rotoxkit FTM

Tento test byl vyvinut dvěma výzkumnými týmy pracujícími na dvou pracovištích, a to týmem Prof. Dr. Persoona na Státní Gentské Univerzitě a týmem Prof. Dr. T. W. Snella na univerzitě v Tampě na Floridě. Jako testovací organismus se pro tento typ testu běžně používá vířník *Brachionus calicyflorus* vylíhlý z cyst. Tyto cysty je nutno uskladňovat v ampulích k tomu určených, a to při teplotě okolo 4 °C. Před provedením testu je nezbytné cysty oživit v inkubátoru při teplotě 25 °C za kontinuálního osvětlení, po dobu 16 – 18 hodin. Oživení vířníci se poté podrobí testu toxicity na připravené koncentrační řadě testovaného vzorku. Biotest se provádí v temnu při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin, po ukončení inkubace se zjistí úmrtnost a hodnota LC50. [42, 48, 49]

Srovnání se standardním testem, reprodukovatelnost

Rotoxkit F je o něco málo citlivější k přírodním vzorkům i čistým chemickým látkám (kovům, aniontům, organickým sloučeninám) než *Daphnia magna*, s jejíž citlivostí však koreluje, a proto je i *Brachionus calicyflorus* navrhován jako alternativa tohoto standardního testu. Reprodukovatelnost Rotoxkitu F byla ověřována ve 120 laboratořích po celém světě a koeficient variance dosáhl hodnoty 48,5 % . [42, 48, 49]

Využití a výpovědní hodnota

Stejně jako Thamnotoxkit FTM i Rotoxkit FTM byl zapojen do hodnotícího projektu Evropského společenství a vystupoval v baterii testů hodnotící přírodní vzorky v České Republice. I zde byla zkoušena možnost jeho použití pro monitorování tuhých odpadů a kalů, hloubkových vrtů, říčních sedimentů, odpadních vod a půd. Nevýhodou tohoto biotitu může být velikost, která činí počáteční manipulaci s nimi obtížnější. Na druhé straně by mohl být tento test zajímavý pro české podmínky, protože *Brachionus calicyflorus* je běžnou součástí našich vodních ekosystémů, kde zastupuje úroveň konzumentů v trofických řetězcích stejně jako například *Daphnia magna*. [42]



Obrázek 3.13: *Brachionus calicyflorus* [50]

Allium cepa

Tato metoda je velice jednoduchá a citlivá na měření toxicity způsobené vystavením chemikálií vyjádřena jako inhibice růstu kořene cibule. Jestliže vystavíme kořeny cibule toxické látky, dojde k inhibici růstu kořene. K inhibici dojde i tehdy, je-li špatné pH nebo pokud jsou přítomny nějaké nerozpuštěné látky, které mohou bránit příjmu živin. Metoda je použitelná pro vzorky povrchových vod, pitné vody, odpadní vody a pro některé ve vodě rozpustné chemikálie. Vhodným růstovým médiem je studená vodovodní voda s ověřenou kvalitou, s pH okolo 7 a bez přítomnosti toxických iontů. Testovacím organismem jsou cibulky *Allium cepa* L. (viz Obrázek 3.14) průměrné velikosti 1,5 cm, které nejsou vyschlé ani jinak viditelně poškozené. Cibulky by neměly být skladovány déle než jeden rok a měly by být uchovávány při teplotě 10 až 20 °C. Pro každou testovanou koncentraci se doporučuje použít deset cibulek, ale v případě nedostatku testovaných vzorků nebo chemikálií lze použít pouze 5 – 6 cibulek. Každá cibulka musí být položena na hrdlo zkumavky tak, aby kořenová primordia byla ponořena v médiu. Malé oloupané cibulky stejné velikosti se při teplotě 20 °C po dobu 48 – 72 hodin nechají kultivovat v různých koncentracích testované látky rozpuštěné v růstovém médiu. Současně se na stejnou dobu nasadí cibulky do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Každých 24 hodin se obmění médium ve zkumavkách se vzorky i s kontrolou. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole změří délka svazku kořenů jednotlivých cibulek. Ze získaných hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, jež způsobí 50 % inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72hIC₅₀). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, výpočet IC₅₀ se neprovádí. [51]



Obrázek 3.14: *Allium cepa* L. [52]

Sinapis alba

Semena hořčice bílé se vystaví na dobu 72 hodin účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Současně se na dobu 72 hodin nasadí semena do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a změří se délka kořenů. Z naměřených hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72hIC₅₀). [53, 54]



Obrázek 3.15: Semena hořčice bílé *Sinapis alba* [55]

Lactuca sativa

Semena salátu setého se vystaví na dobu 72 hodin účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Současně se na dobu 72 hodin nasadí semena do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a změří se délka kořenů. Z naměřených hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72hIC₅₀). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně (průměrná délka kořene v testované látce je větší než v kontrole), výpočet IC se neprovádí. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působí inhibičně, vyhodnocuje se IC₅₀ za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu. [53, 54]

Akutní test toxicity na nitěnkách Tubifex tubifex

Testovacím organismem jsou oligochaeta *Tubifex tubifex*, které je třeba zakoupit čerstvé v akvaristickém obchodě. Před provedením testu je třeba nitěnky uchovávat v provzdušňované vodě o teplotě 10 °C. Před použitím je vhodné nitěnky hodinu aklimatizovat při laboratorní teplotě. Pro test je vhodné použít 6 až 10 nitěnek o velikosti 2 až 4 cm. [56]



Obrázek 3.16: *Tubifex tubifex* [57]

Test inhibice růstu okřešku menšímu *Lemna minor*

Test se používá k testování toxicity roztoků a suspenzí vůči zástupci vyšších vodních rostlin okřešku menšímu (*Lemna minor* L.). Testuje se inhibice růstu podle růstové křivky. Délka expozice je 7 dní. Z tohoto pohledu lze hovořit o toxicitě při semichronické expozici, neboť je zahrnut jak okamžitý účinek při uvedení organismu do testu, tak i dlouhodobé působení, které se projevuje v inhibici nárůstu nových generací. [54,58,59]

Princip

Rostliny okřešku menšího se nechají růst v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS (Swedish Standard Medium). Současně se nasadí testovací rostliny do kontrolního živného roztoku bez testované látky. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet lístků. Cílem testu je kvantifikovat účinky látky na vegetativní růst okřešku menšího posouzením počtu listů - rychlosti růstu a alespoň jedné ze tří volitelných charakteristik: velikosti listové plochy, hmotnosti sušiny nebo obsahu chlorofylu. Srovnání růstu v testovaných roztocích a kontrole se stanovuje pomocí koncentrace IC50, lze zjišťovat i hodnoty LOEC a NOEC. V některých případech může testovaná látka vykazovat stimulaci růstu, potom se hodnota IC50 nestanovuje. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích, vyhodnocuje se IC50 za použití koncentrací s prokázanou inhibicí růstu. [54, 58, 59]

Charakteristika organismu

Taxonomicky patří *Lemna minor* L. do oddělení rostlin krytosemenných (*Angiospermophyta*) kvetoucích, třídy jednoděložných (*Monocotyledonopsida*), čeledi *Lemnaceae*. Z hydrobiologického hlediska jej řadíme do tzv. měkké vegetace, která zahrnuje rostliny plovoucí na vodní hladině (natantní) a rostliny ponořené (submerzní). Tato makrofyta jsou do určité míry vítána na obhospodařovaných vodních plochách, protože slouží jako vhodná potrava např. pro ryby a vodní ptactvo. Okřešky porůstají hladinu stojatých vod a jsou nejznámějším zástupcem pleustonického společenstva. Za příhodných podmínek vytvářejí kompaktní porosty, které nepropouštějí světlo, a jejich asimilační kyslík uniká do vzduchu, což vede ke zhoršení jakosti vod pod nimi. Nejznámějším druhem je okřehek menší (*Lemna minor*).

Okřehek menší je drobná vodní rostlina s plochými lístky, kožovité konzistence, s jedním lístkem i kořínkem. Zdravé kolonie jsou tvořeny 2 - 5 lístky. Květy mají jednu tyčinku a jeden

semeník, obvykle se však nevyvíjejí. Roste ve stojatých nebo mírně tekoucích vodách v nížinách až subalpinských polohách.

Okřehek má výborné akumulaci schopnosti, pozorované zejména u sloučenin dusíku, fosforu a u těžkých kovů. Jeho kultivace je jednoduchá a nenáročná a nevyžaduje zvláštní zařízení. [54, 58, 59]



Obrázek 3.17: *Lemna minor* [60]

3.3. Vyhodnocení testů ekotoxicity

Prvořadým posláním standardních testů toxicity je poskytnout informaci o:

- maximální koncentraci, která nemá žádný efekt na variabilní odpověď (jako přežití, růst těla, reprodukce, růst populace). Tato informace slouží k odvození koncentrace, která může být považována za bezpečnou pro životní prostředí,
- jaké efekty na životní prostředí mohou být očekávány, jestliže dojde k překročení této koncentrace,
- požadavcích na další studie s ohledem na ekotoxicitu chemikálií. Priorita je vysoká, jestliže koncentrace v životním prostředí se blíží této maximální koncentraci nebo ji dokonce překračuje.

Analýzu testů toxicity můžeme rozdělit do tří skupin:

- metoda ANOVA,
- statické metody,
- dynamické metody. [61]

3.3.1. NOEC/ANOVA

ANOVA slouží hlavně k odhadu hodnot NOEC a LOEC. NOEC je velmi dobře zaveden pro souhrn chronických toxických efektů a je doporučován některými mezinárodními směrnici (např. EPA). Metoda je založena na srovnávání odpovědí v každé koncentraci testu s kontrolou na základě statistických procesů jako například metoda vícenásobného porovnání (multiple comparison procedure).

Definice se může mírně lišit. NOEC je ale běžně chápán jako nejvyšší koncentrace, která není statisticky významně rozdílná od kontroly. Podobně je definován LOEC. Jde o nejnižší koncentraci, která vykazuje významné rozdíly v porovnání s kontrolou. [62]

Výhody

- **Pojmová jednoduchost**
Při použití metody ANOVA můžeme jednoduše porovnat, jestli se každá koncentrace liší od kontroly.
- **Jednoduchost výpočtů**
Vzorec pro výpočet hodnot nalezneme v každé statistické příručce. K dispozici je také celá řada profesionálních i laických programů pro výpočty ANOVA.
Pro porovnání - regresní a matematické modely vyžadují speciální software. Byly sice vyvinuty jednoduché (neparametrické) metody pro stanovení hodnoty EC50, ale nejsou vždy dostatečně přizpůsobené doporučeným normám.
- **Návrh metody je přímý**
Jestliže si osvojíme metodu ANOVA, můžeme snadno určit počet opakování, který je nutný pro dosažení určitého stupně citlivosti. [62, 63]

Nevýhody

- **NOEC musí být jedna z testovaných koncentrací**
Hodnota NOEC je určována výběrem rozsahu koncentrací. Běžně bývá testováno jen malé množství koncentrací. Proto je přesnost této metody většinou velmi omezena.
- **NOEC nemůžeme považovat za bezpečnou koncentraci**
Jestliže proměnlivost experimentu je vysoká, pak citlivost metody je relativně nízká. To znamená, že od kontroly mohou být rozeznány pouze velké rozdíly.
- **Chybí informace o křivce koncentrace-odpověď**
Informace o změně odpovědi v závislosti na koncentraci může být užitečná v určení citlivosti testovaného druhu. Tato informace není dostupná z metody ANOVA/NOEC. Není tedy možné předpovědět vliv při koncentracích jiných, než které byly použity v testu.
- **Není možné odhadnout přesnost metody**
- **Robustnost**
Metodologické variace mohou vést k různým hodnotám NOEC pro shodné vzorky. Jak moc se tyto hodnoty mohou lišit, závisí hlavně na rozložení koncentrací vzhledem ke zjištěné závislosti koncentrace-odpověď.
- **NOEC/LOEC nemusí existovat ve všech případech**
Jestliže nejnižší testovaná koncentrace vykazuje statisticky významný rozdíl od kontroly, hodnotu NOEC nelze určit. Jestliže žádná z testovaných koncentrací se významně neliší od kontroly, hodnotu LOEC nelze určit. V takových případech je nutné opakovat experiment za použití jiných koncentrací, aby bylo možné zjistit hodnotu NOEC/LOEC.
- **Správný postup při experimentu nemusí garantovat správné výsledky**
Čím horší je provedení experimentu, tím vyšší je variabilita získaných dat. To znamená nižší citlivost detekce rozdílu od kontroly a tedy i vyšší hodnotu NOEC. [62,63]

3.3.2. Výpočet hodnot EC_x

Další metodou analýzy je výpočet hodnoty EC_x , kde X udává procentuální bod na křivce koncentrace-odpověď. Tato metoda je používána zejména pro stanovení akutní toxicity a nejčastěji vyžadovanou hodnotou v rámci různých směrnic a doporučení je EC_{50} . Jednou ze statistických metod používaných pro vyhodnocení EC_{50} je například probitová analýza. Důležitou roli hrají i tzv. neparametrické metody, které se vyvarují některým problémům koncentrační křivky. [61]

Metodologie

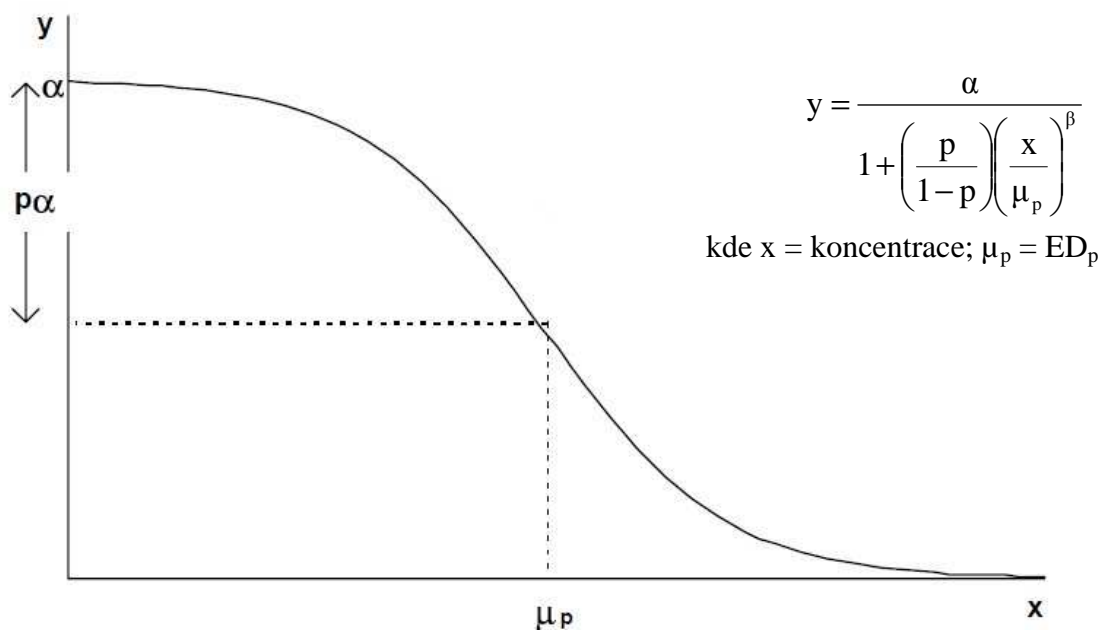
Typický experiment probíhá v nasazení kontroly a určitého počtu koncentrací s určitým počtem opakování. Měření na každé experimentální jednotce je jistou formou subletální odpovědi jako například váha organismu nebo počet vyprodukovaných potomků. [64]

Testovací koncentrace (BC)

Testovací koncentrace (Benchmark Concentration – BC) je definována jako spodní mez spolehlivosti koncentrace, která vykazuje nějaký, předem určený, nárůst míry odezvy v porovnání s kontrolou. Jinými slovy, jde o spodní mez spolehlivosti odhadu hodnoty EC. BC je relativně konzervativní hodnota, na které je založen odhad bezpečné koncentrace. Přesto má dobré výsledky například v oblasti toxikologie savců, kde musí být zachováno velmi malé potenciální riziko ohrožení člověka. Pro použití v ekotoxikologii může být BC považováno za příliš konzervativní.

EC_0

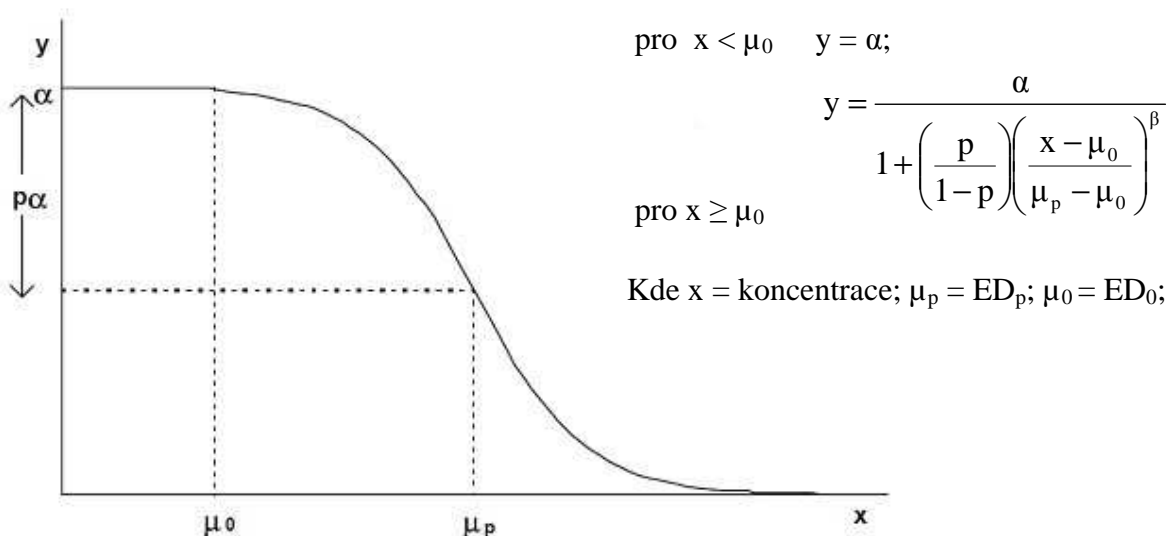
Běžně používané modely typu dávka-odpověď, jako například logaritmická křivka, předpovídají nenulové efekty už při velmi malých dávkách. Odhad hodnoty EC nemůže být považován za odhad pravé hodnoty NEC. Je ale možné upravit konvenční model dávka-odpověď tak, aby bylo možné odhadnout hodnotu EC_0 . Pozornost zasluhují dva typy modelů, prahové modely a modely hormeze.



Obrázek 3.18: Křivka pro logaritmickou regresní rovnici [63]

Prahové modely

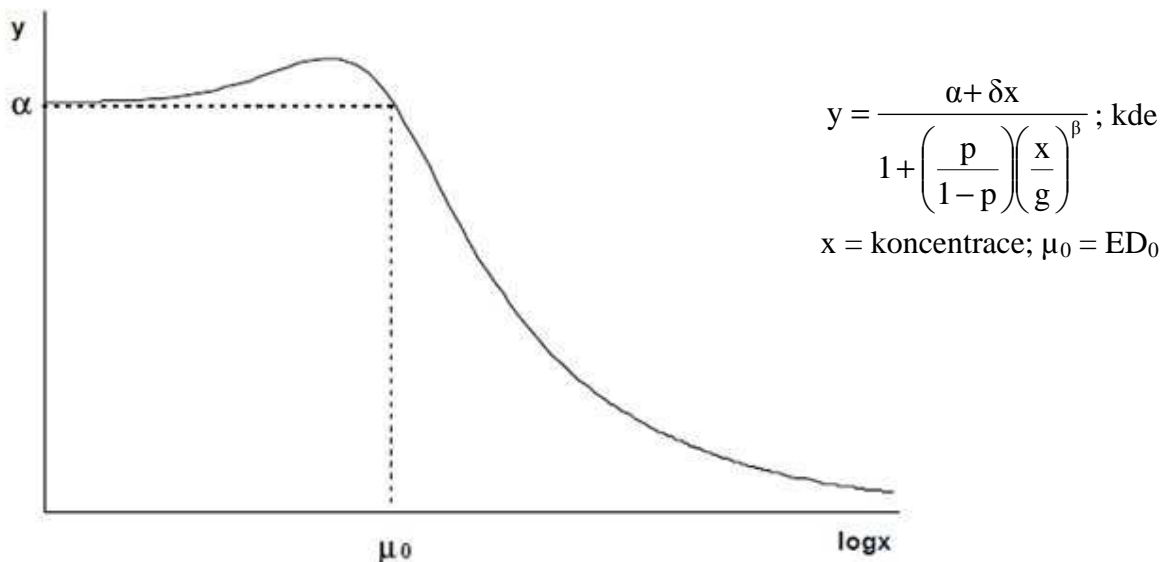
Prahový model je založen na hypotéze, že existuje dávka, při které látka neprojevuje toxický efekt a nad kterou se toxický efekt začíná zvyšovat. Prahový model může být chápán jako dva modely spojené dohromady v jednom bodě. Jednu část tvoří horizontální přímka, která charakterizuje úroveň pozadí, další část popisuje vzrůstající efekt se vzrůstající dávkou. Tyto dvě části jsou spojeny v bodě EC_0 (bod prahové dávky). Toto je maximální dávka, při které je odpověď rovna pozadí a může být považována za parametr tohoto modelu a tím pádem přímo odhadnuta.



Obrázek 3.19: Výpočet prahové koncentrace nebo EC_0 [63]

Stimulační efekt malé dávky látky (model hormeze)

Regresní modely použitelné na data typu dávka-odpověď jsou obecně monotónní, odrážející vždy stoupající nepříznivý efekt zvyšující se dávkou. Problém nastává v případě, že narazíme na účinky, které se vymykají očekávanému monotónnímu průběhu. Příkladem tohoto jevu je hormeze, kdy se při nízkých dávkách testované látky projevuje stimulační efekt, zatímco vyšší koncentrace vedou k toxickému efektu. Bod, při kterém jsou projevy shodné s kontrolou, je v ekotoxikologii nazýván EC_0 . Tento bod může být chápán jako koncentrace, při které jsou potlačeny stimulační efekty a začínají se projevovat toxické vlivy. Z tohoto pohledu může být EC_0 považováno za odhad pravé hodnoty NEC.



Obrázek 3.20: Model hormeze [63]

Model závislosti odpovědi na čas

Jestliže odpověď v jednoduchých ekotoxikologických testech získáváme v různých dnech, můžeme sigmoidální křivku modifikovat a zahrnout do ní i čas. Jednou z výhod je, že jsme schopni odhadnout hodnoty EC pro různé časy.

Výhody

- Regrese umožňuje odhad toxických efektů netestovaných koncentrací. Zatímco NOEC může být pouze jedna z koncentrací použitých v experimentu.
- Čím větší je přesnost experimentu, tím menší bude šířka intervalu spolehlivosti. To znamená, že čím menší bude variabilita experimentu, tím spíše se odhad hodnoty EC přiblíží její skutečné hodnotě. Oproti tomu velká variabilita výsledků znamená, že odhad hodnoty EC bude mnohem vyšší nebo nižší než její skutečná hodnota.
- Jelikož lze vždy spočítat interval spolehlivosti, může být vždy určena přesnost odhadu hodnoty EC. Zatímco přesnost určení hodnoty NOEC nemůže být nikdy určena.
- Hodnota EC může být vždy spočítána, i tehdy, když leží mimo rozsah testovaných koncentrací. Hodnotu NOEC není možné vždy určit, buď proto, že nejnižší dávka má statisticky významný efekt, nebo žádná z dávek nemá tento efekt. V takovém případě je nutné test opakovat.
- Hodnoty EC jsou porovnatelné jak mezi jednotlivými experimenty, tak mezi laboratořemi, které postupovaly podle stejného protokolu.

Nevýhody

- Výběr regresního modelu: jestliže chceme získat hodnotu EC při nízkém vlivu, jako například EC_{10} nebo EC_5 , její odhad bude většinou záviset na výběru modelu. Pro jakoukoli množinu výsledků testů bude možné použít více modelů a nemusí být jednoduché rozhodnout, který z nich je nejvhodnější.
- I pokud bude jistota použití správného modelu, při nízkém vlivu bude interval spolehlivosti relativně velký.
- Přesnost odhadu hodnot EC závisí na počtu testovaných koncentrací a jejich hodnotách. Proto pokud je důležité odhadnout hodnotu EC u koncentrací s nízkým

účinkem, bude pravděpodobně nutné provést výběr optimálních testovaných koncentrací. Tento výběr bude nutné provést odděleně pro každý model.

- Pro testovací koncentrace (BC) musí být vybrán model, rozsah účinku, ale také úroveň spolehlivosti použitá k odhadu intervalu spolehlivosti.
- Jak prahový model, tak model hormeze vyžadují navíc ještě jeden parametr v porovnání s klasickým sigmoidním modelem. Proto je složitější určit model.
- Zkušenosti ukazují, že interval spolehlivosti při odhadu hodnoty NEC podle prahového modelu a modelu hormeze má tendenci být velmi široký. Proto předtím, než mohou být tyto modely použity, je nutné provést výběr optimálních koncentrací.

3.3.3. Dynamický přístup

Dynamický přístup pro analýzu standardních testů toxicity charakterizuje toxické efekty pomocí NEC (No-Effect Concentration), meze tolerance a rychlosti eliminace. Parametry se přímo vztahují k dlouhodobé expozici, není tedy nutný extrapolací faktor. Vztahují se ke změnám v procesu. Z těchto tří parametrů je možné vypočítat statistické parametry, jako například EC_0 na konci testu nebo EC_x v určitém čase. Není ovšem možné vypočítat dynamické parametry ze statistických, z čehož vyplývá, že dynamické parametry poskytují více informací než statické. Dynamický přístup používá informaci o rychlosti, při které dojde k efektům během expozice. Je velmi důležité uvědomit si, že dynamické postupy jsou alternativní analýzou pro ty samé testy ekotoxicity. Přístupy se liší pouze informací, která je získána z naměřených dat.

Tři složky, které by měl dynamický model obsahovat, jsou kinetika, účinek a fyziologie. Důsledkem je, že odpovědi jsou modelovány jako funkce koncentrace a času. [64, 65]

Kinetika

Kinetika spojuje vnitřní a vnější koncentrace, přičemž nejjednodušší je kinetika prvního řádu. Ta předpokládá, že příjem je úměrný vnější koncentraci a výdej je úměrný vnitřní koncentraci. U modelu typu DEB (Dynamic Energy Budget) jsou míry příjmu a výdeje vztaheny vzhledem k povrchu organismu.

Měření časových profilů pro vnitřní koncentrace někdy vykazuje odchylku od kinetiky prvního řádu. Pro zlepšení se častěji používají kinetiky vyšších řádů, protože mají více parametrů. Detailnější modelování různých charakteristik příjmu (vodou nebo potravou), vylučování (vodou, reprodukcí nebo dýcháním), změn v obsahu tuku a metabolické transformace většinou odpovídá realitě více než použití kinetiky vyššího řádu. Některé chemikálie nejsou přijímány, ale mají vnější vliv na organismus. Modely kinetiky vyšších řádů je možné použít pouze tehdy, pokud jsou změřeny interní koncentrace. Použití pokročilejších modelů kinetiky ve standardních testech toxicity není možné, protože nejsou měřeny interní koncentrace. [64, 65]

Účinky

Účinková složka spojuje účinky na cílový parametr, jako například náklady na údržbu a růst, s vnitřní koncentrací. Nejjednodušší je model lineárního účinku: Změna cílového parametru je úměrná vnitřní koncentraci, která překročí vnitřní hodnotu NEC. [64, 65]

Podle vlivů na reprodukci rozlišujeme pět cílových parametrů, dva pro přímé a tři pro nepřímé účinky. Přímé účinky na reprodukci jsou definovány jako dopad na výsledek reprodukčního úsilí nezávisle na velikosti úsilí. Jedna akce zvyšuje energetické náklady na každého potomka, jiná ovlivňuje přežití vajíčka během krátké periody. Nepřímé účinky na

reprodukcí ovlivňují míru reprodukčního úsilí. Nepřímé účinky zvyšují náklady na růst nebo výživu. Tyto nepřímé účinky snižují populaci, ale také oddalují reprodukci. Kromě parametrů s účinkem na reprodukci rozlišujeme parametry s účinkem na růst organismu. [64, 65]

Fyziologie

Pro studium akutních letálních účinků nepotřebujeme fyziologický model. Pro vlivy na růst a reprodukci potřebujeme složku fyziologie, která obsahuje parametry jako délka těla, celkový počet potomků, počet přeživších jedinců atd. Nejjednodušší způsob je použití modelu DEB, který obsahuje všechny nezbytné procesy: krmení, trávení, dýchání, prostředky obživy, růst, vývin a stárnutí. Fyziologická složka závisí pouze na testovaném organismu, není potřeba ji proto studovat pro každý jednotlivý test toxicity. Fyziologická složka se tímto liší od ostatních dvou složek, kinetiky a účinků. [64, 65]

3.3.4. Vyhodnocení testů *Sinapis alba* a *Lemna minor*

Sinapis alba

Vyhodnocení testu

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky (v ČR jsou k dispozici počítačové programy umožňující rychlé a pohodlné vyhodnocení testu včetně stanovení hodnoty IC50.)

Základem pro hodnocení inhibičních (stimulačních) účinků testované látky na *Sinapis alba* je průměrná délka kořene zjištěná v testovacích miskách ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Počet nevyklíčených semen se uvede do protokolu a do průměru se tato semena započítávají jako nulová délka kořene. Semena, která vyklíčí, ale nevytvoří kořen, se do průměru započítávají rovněž jako nulová. Hodnota IC50 se počítá pro každé paralelní stanovení zvlášť, výsledná hodnota je průměrem uvedených hodnot. Jednotlivé hodnoty IC50 by se neměly lišit o více než 30 %. Jestliže působí testovaná látka stimulačně, IC50 se nevyhodnocuje. [53, 54]

*Výpočet průměrné délky kořene *Sinapis alba**

$$\bar{L} = \frac{\sum L_i}{n}, \text{ kde}$$

\bar{L} je průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm);

L_i je délka i -tého kořene ve zvolené koncentraci (mm);

n je počet semen ve zvolené koncentraci (30);

Stejným způsobem se vypočte průměrná délka kořene v kontrole L_c (mm).

Výpočet inhibice růstu kořene v testované látce oproti kontrole

$$\bar{I}_i = \frac{\bar{L}_c - \bar{L}_v}{\bar{L}_c} \cdot 100, \text{ kde}$$

\bar{I}_i je inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci, je-li $\bar{I}_i < 0$, jedná se o stimulaci růstu

\bar{L}_c je průměrná délka kořene v kontrole (mm)

\bar{L}_v je průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm).

Výpočet hodnoty IC50

Koncentrace látky, kde došlo k inhibici růstu, se vyjádří v logaritmických hodnotách (log c). Získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je log c (osa x) a závisle proměnnou % inhibice (osa y). Vynesenými body se proloží přímka (např. metodou nejmenších čtverců). Z průsečíku proložené přímky a souřadnice inhibice 50 % se spustí kolmice na osu x a odečte se příslušná hodnota log c. Odlogaritmováním hodnoty log c se získá hledaná koncentrace IC50. [53, 54]

Lemna minor

Vyhodnocení testu

Účelem testu je stanovit účinky testované látky na vegetativní růst okřehku. Účinek testované látky se posuzuje podle:

- rychlosti růstu
- plochy pod růstovou křivkou
- konečné biomasy

Stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí (μ) v testovaných koncentracích a v kontrole. Růstová rychlost se vypočítá ze vztahu:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

kde

N_0 počet lístků na počátku testu

N_n počet lístků na konci testu

t_n doba trvání testu

Z vypočtených hodnot μ pro každou testovanou koncentraci a kontrolu se vypočítá inhibice (případně stimulace) růstu I_{μ} v % z následující rovnice:

$$I_{\mu} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} 100$$

kde

I_{μ} inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí; je-li $I_{\mu} < 0$, jedná se o stimulaci růstu

μ_c růstová rychlost v kontrole

μ_i růstová rychlost v testované koncentraci

Stanovení inhibice růstu porovnáním ploch pod růstovými křivkami

Plocha pod růstovou křivkou se vypočítá pro kontrolu a pro každou testovanou koncentraci podle následující rovnice:

Při stanovení inhibice růstu se jako u řasového testu vychází buď z plochy pod růstovou křivkou, nebo z růstové rychlosti. Dalším parametrem je porovnání konečné biomasy (listové plochy, sušiny nebo obsahu chlorofylu).

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

kde

A plocha pod růstovou křivkou

N_0 počet lístků na počátku testu (t_0)

- N_l počet lístků v čase t_l
- N_n počet lístků v čase t_n
- t_l čas prvního odečítání od počátku testu
- t_n čas n-tého odečítání od počátku testu

Plocha by se měla vypočítat pro celé testovací období, pro část dané růstové křivky jen v odůvodněných případech.

Vypočítají se hodnoty A pro každou testovanou koncentraci a kontrolu. Z těchto hodnot se pak vypočítá inhibice (případně stimulace) růstu I_{Ai} pro jednotlivé koncentrace:

$$I_{Ai} = \frac{A_c - A_i}{A_c} 100$$

kde

I_{Ai} inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami; je-li $I_{Ai} < 0$, jedná se o stimulaci růstu

A_c průměrná plocha pod růstovou křivkou u kontroly

A_i průměrná plocha pod růstovou křivkou u testované koncentrace i

Stanovení inhibice růstu porovnáním hmotnosti konečné biomasy

Konečné množství biomasy se zjistí pro kontrolu a každou testovanou koncentraci. Inhibice růstu na základě porovnání konečného množství biomasy ($\%I_b$) se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$I_B = \frac{(B_c - B_i)}{B_c} (\%), \text{ kde}$$

I_B je procento redukce biomasy,

B_c je konečná biomasa v kontrole,

B_i je konečná biomasa u testované koncentrace. [54, 58, 59]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Příprava vzorku

Vzhledem k nerozpustnosti musk sloučenin ve vodě bylo nutné zvolit vhodnou alternativu, která by umožnila jednak rozpuštění sloučeniny, a neměla by negativní vliv na testované organismy. Většina musk sloučenin je velmi dobře rozpustná v organických rozpouštědlech. Je však nutno být si vědom vlivu rozpouštědla na testovací organismy. Z organických rozpouštědel (metanol, etanol, aceton, oktanol, hexanol a dalších běžných v analytické chemii) je pro ekotoxikologické biotesty nejčastěji používán dimethylsulfoxid (DMSO). Řasové testy toxicity snášejí do 3 % DMSO, koryši 5 – 7 %, ryby 5 – 10 % a bakterie až 20 % DMSO. [66]

V rámci diplomové práce byl používán 5% roztok dimethylsulfoxidu a byl sledován jeho vliv na vyhodnocení testů ekotoxicity.

4.2. Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba*

4.2.1. Příprava ředící vody

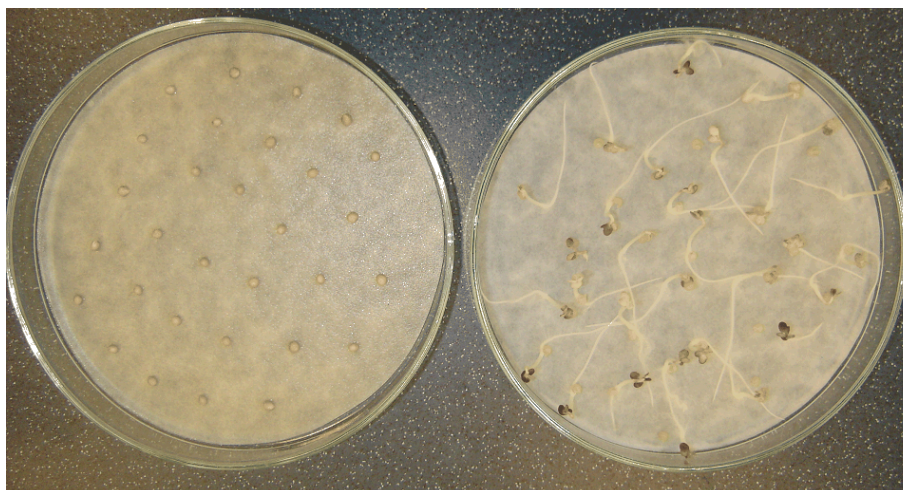
Nejprve byla připravena série čtyř zásobních roztoků. Na analytických vahách bylo naváženo 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněno destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byly připraveny další roztoky, ve kterých byly rozpuštěny navážky 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl . Na 1 litr ředící vody bylo nadávkováno 25 ml každého zásobního roztoku. Takto připravená ředící voda byla 24 hodin sycena vzdušným kyslíkem, poté nechána 24 hodin odstát a nakonec byla zkontrolována hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí $7,8 \pm 0,2$. V případě jiné hodnoty je nutno pH upravit roztokem 1 mol/l NaOH nebo 1 mol/l HCl . [52, 54]

4.2.2. Podmínky testu

Na dno Petriho misky o průměru 120 – 140 mm byl vložen filtrační papír, na který bylo nepipetováno 5 ml testované koncentrace. Poté bylo na dno misky umístěno 30 semen *Sinapis alba* s klíčivostí minimálně 90 %. Misky byly přikryty víčkem a uloženy do zatemněného inkubátoru o teplotě 20 ± 2 °C na dobu 72 hodin. Po uplynutí dané doby byla stanovena inhibice růstu 72h IC_{50} . Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu je průměrná délka kořene. [52, 54]

4.2.3. Vyhodnocení testu

Výsledkem testu je hodnota 72h IC_{50} . Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z temného inkubátoru a u jednotlivých vyklíčených semen byla změřena délka kořene. Koncentrace látky, při které došlo k inhibici růstu, se vyjádřila v logaritmických hodnotách. Získané hodnoty se vynesly do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou byla $\log c$ (osa x) a závisle proměnnou % inhibice (osa y). Vynesenými body se proložila přímka a z průsečíku přímky a souřadnice inhibice 50 % se spustila kolmice na osu x a odečetla se příslušná hodnota $\log c$. Odlogaritmování hodnoty $\log c$ byla získána hledaná koncentrace IC_{50} . [52, 54]



Obrázek 4.1: Semena hořčice bílé na začátku testu a po 72 hodinách

4.3. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

4.3.1. Růstové médium

Jako růstové médium byla použita vodovodní voda, která se nechala 3 minuty odtékat.

4.3.2. Provedení testu

Veškeré vnější slupky cibulek byly odstraněny tak, aby nebyla poškozena jejich kořenová primordia. Takto očištěné cibulky byly ponechány 24 hodin v nádobě s vodou. Poté byly cibulky vytaženy z nádoby, osušeny jemným papírem a položeny na hrdlo zkumavky s testovanými roztoky tak, aby kořenová primordia byla ponořena v médiu. Pro všechny testované roztoky včetně kontrol bylo použito 6 cibulek. Takto připravené cibulky byly ponechány při laboratorní teplotě bez přímého slunečního záření po dobu 72 hodin. Po 24 hodinách byly roztoky ve zkumavkách doplňovány.

4.3.3. Vyhodnocení testu

Po 72 hodinách byla změřena délka kořenových svazků v každém testovaném roztoku. Z průměrných délek kořenů byla následně vypočítána hodnota 72hIC50. [51]

4.4. Test inhibice růstu salátu *Lactuca sativa*

4.4.1. Příprava ředící vody

Nejprve byla připravena série čtyř zásobních roztoků. Na analytických vahách bylo naváženo 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněno destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byly připraveny další roztoky, ve kterých byly rozpuštěny navážky 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl. Na 1 litr ředící vody bylo nadávkováno 25 ml každého zásobního roztoku. Takto připravená ředící voda byla 24 hodin sycena vzdušným kyslíkem, poté nechána 24 hodin odstát a nakonec byla zkontrolována hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí $7,8 \pm 0,2$. V případě jiné hodnoty je nutno pH upravit roztokem 1 mol/l NaOH nebo 1 mol/l HCl. [52, 54]

4.4.2. Podmínky testu

Na dno Petriho misky o průměru 120 – 140 mm byl vložen filtrační papír, na který bylo nepipetováno 5 ml testované koncentrace. Poté bylo na dno misky umístěno 30 semen *Lactuca sativa* s klíčivostí minimálně 90 %. Misky byly přikryty víčkem a uloženy do zatemněného inkubátoru o teplotě 20 ± 2 °C na dobu 72 hodin. Po uplynutí dané doby byla stanovena inhibice růstu 72h IC50. Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu je průměrná délka kořene. [52, 54]

4.4.3. Vyhodnocení testu

Výsledkem testu je hodnota 72h IC50. Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z temného inkubátoru a u jednotlivých vyklíčených semen byla změřena délka kořene. Koncentrace látky, při které došlo k inhibici růstu, se vyjádřila v logaritmických hodnotách. Získané hodnoty se vynesly do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou byla log c (osa x) a závisle proměnnou % inhibice (osa y). Vynesenými body se proložila přímka a z průsečíku přímky a souřadnice inhibice 50 % se spustila kolmice na osu x a odečetla se příslušná hodnota log c. Odlogaritmování hodnoty log c byla získána hledaná koncentrace IC50. [52, 54]

4.5. Daphtoxkit FTM

Jako testovací organismus byl použit korýš *Daphnia magna*, který byl vylíhnut z vajíček. Výsledkem tohoto mikrobiotestu je stanovení hodnot 24h EC50 a 48h EC50.

4.5.1. Příprava standardní sladké vody

Pro přípravu 2 litrů standardní sladké vody byly použity ampule s koncentrovanými solnými roztoky. Tato voda byla použita jako inkubační médium pro epiphia a pro přípravu koncentrační řady musk sloučenin. Dvoulitrová odměrná baňka byla z poloviny naplněna destilovanou vodou. Poté byla otevřena ampule označená číslem 1 obsahující koncentrovaný sodný roztok NaHCO₃ a její obsah byl převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi s koncentrovanými roztoky, tj. jedna ampule označená číslem 2 (CaCl₂), jedna ampule s číslem 3 (MgSO₄) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou a protřepána. Před použitím standardní sladké vody pro inkubaci epiphii a před přípravou roztoků musk sloučenin byla 15 minut provzdušňována. Mezi jednotlivými testy byla uchovávána v ledničce. [40]



Obrázek 4.2: Příprava standardní sladké vody [67]

4.5.2. Inkubace epiphii *Daphnia magna*

Inkubace epiphii byla započata 3 dny před začátkem testů toxicity. Epiphia byla z ampule kvantitativně převedena na mikrosítko a byla důkladně promyta vodovodní vodou. V 15 ml provzdušněné standardní sladké vodě byla epiphia přenesena na inkubační Petriho misku. Miska byla zakryta víčkem a inkubována 72 hodin při 20 – 22°C za kontinuálního osvětlení 6000 lux. [40]



Obrázek 4.3: Dafnie vylíhlé z cyst [68]

4.5.3. Předkrmení testovacích organismů

Dvě hodiny před nasazením organismů do testu byly perloočky *Daphnia magna* předkrmeny suspenzí řas *Spirulina microalgae*. Suspenze byla protřepána se standardní sladkou vodou a nalita na inkubační misku. Opatrným otáčením obsahu byl předkrm rovnoměrně rozptýlen. [40]

4.5.4. Plnění testovací desky

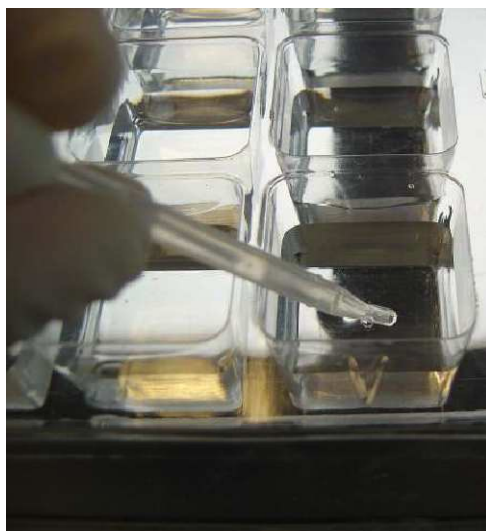
Do každé šachty v kontrolním řádku bylo převedeno 10 ml standardní sladké vody. Do šachet ostatních řádků bylo převedeno 10 ml příslušné koncentrace musk, v pořadí podle klesající koncentrace. [40]

4.5.5. Přenos neonatů do testovacích šachet

Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule opatřená tmavými okraji a průhledným krytem. Pomocí mikropipety bylo přeneseno nejméně 20 neonatů dafnií z Petriho misky do promývacích šachet na desce. Poté bylo přeneseno 5 jedinců z promývacích do ostatních šachet v řádku. Nakonec byla přiložena parafilmová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla obalena alobalem a vložena do zatemnělého inkubátoru o teplotě 20°C na dobu 48 hodin. [40]

4.5.6. Vyhodnocení testu

Výsledkem biotestu bylo stanovení hodnot 24h EC50 a 48h EC50. Po 24 a 48 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a ve všech šachtách byl zjištěn počet mrtvých a imobilizovaných jedinců. Pokud by kontrola přesáhla 10 % mortalitu, je biotest považován za chybný a je nutno ho opakovat. Z celkového počtu mrtvých a imobilizovaných neonatů bylo pro každou koncentraci vypočítáno procento úmrtnosti. Tato procenta se následně převedla na probitové hodnoty. Ze získaných dat se sestrojil graf závislosti probitových hodnot (osa y) na logaritmech koncentrací (osa x). Vynesenými body se proložila přímka a z průsečíku přímky a souřadnice probitové hodnoty 5 (50 %) se spustila kolmice na osu x, a odečetla se příslušná hodnota log c. Ze získaných výsledků byla zjištěna hodnota 24h EC50 a 48h EC50 nebo LC50. [40]



Obrázek 4.4: Přenos larev z promývací šachty [68]

4.6. Thamnotoxkit FTM

Test byl proveden v multišachtové desce za použití růstového stádia larev sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* vylíhnutých z cyst.

4.6.1. Příprava standardní sladké vody

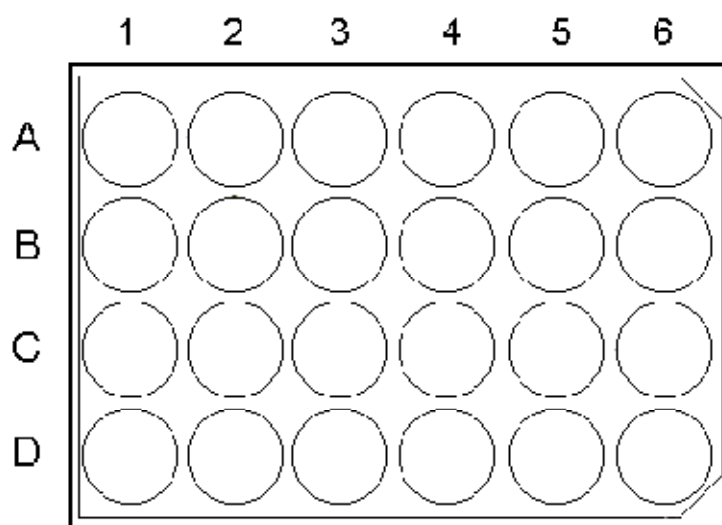
K přípravě standardní sladké vody byly použity ampule s koncentrovanými solnými roztoky. Tato voda byla použita jako médium pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu koncentrační řady. Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna cca 800 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule s koncentrovaným sodným roztokem označena číslem 1 (NaHCO_3) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi obsahujícími koncentrované roztoky, tj. dvě ampule označené číslem 2 (CaSO_4), jedna ampule s číslem 3 (MgSO_4) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou a protřepána. Před použitím standardní sladké vody pro inkubaci a před přípravou roztoků musk sloučenin byla 15 minut provzdušňována. Mezi jednotlivými testy byla uchovávána v ledničce při teplotě maximálně 4 °C. [44]

4.6.2. Inkubace cyst *Thamnocephalus platyurus*

Inkubace cyst byla započata 24 hodin před začátkem testování. Jako médium pro inkubaci cyst byla použita zředěná standardní sladká voda, která byla připravena smícháním 17,5 ml destilované vody s 2,5 ml standardní sladké vody. Vialka s cystami byla naplněna 1 ml zředěné standardní sladké vody a byla 30 minut protřepávána. Předhydratované cysty byly kvantitativně přeneseny na Petriho misku, kam bylo přidáno 10 ml zředěné standardní sladké vody. Miska byla uzavřena víčkem a cysty se nechaly inkubovat při 25 °C po dobu 20 – 22 hodin za kontinuálního osvětlení (3 000 – 4 000 lux). [44]

4.6.3. Plnění testovací desky

Šachty jsou označeny 1 až 6 horizontálně a A až D vertikálně. Přenos testovaných roztoků byl vždy prováděn směrem od kontroly (první sloupec vlevo) k nejvyšší koncentraci (šestý sloupec vpravo). Do každé šachty sloupce 1 (šachty A1, B1, C1 a D1) byl napipetován 1 ml standardní sladké vody (kontrola), do každé šachty v sloupci 2 (šachty A2, B2, C2 a D2) byl přenesen 1 ml ze zkumavky 5 (nejnižší koncentrace). Tento postup byl opakován se zkumavkami 4, 3, 2 a 1 k naplnění šachet sloupců 3, 4, 5 a 6. Každá zkumavka s roztoky byla vždy před napipetováním intenzivně protřepána. [44]



Obrázek 4.5: Testovací deska [68]

4.6.4. Přenos larev do testovacích šachet

Ke shromáždění larev organismu *Thamnocephalus platyurus* byla Petriho miska vyjmuta z inkubátoru asi 5 minut před nanesením do šachet. Pomocí mikropipety bylo přeneseno 50 larev z Petriho misky do každé mycí šachty v řádku D v pořadí D1 až D6 (s rostoucí koncentrací toxikantu). Z mycí šachty D1 bylo do ostatních šachet v sloupci (A1, B1 a C1) přeneseno 10 larev. Tento přenos byl následně zopakován pro sloupce 2, 3, 4, 5 a 6 v tomto pořadí. Nakonec byla přiložena parafinová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla obalena alobalem (inkubace probíhá v temnu) a vložena do inkubátoru o teplotě 25°C na dobu 24 hodin. [68]

4.6.5. Vyhodnocení testu

Výsledkem tohoto biotestu je hodnota 24h LC50. Po 24 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a byli spočítáni živí i mrtví jedinci. Larvy byly považovány za mrtvé, pokud během 10 sekund pozorování nevykazovaly žádný pohyb. Pokud procento úmrtnosti v kontrole přesáhlo 10 %, byl biotest považován za neplatný. Hodnota 24h LC50 byla zjištěna stejným způsobem jako u testu Daphtoxkit FTM (viz kap. 4.4) [44]

4.7. Test na nitěnkách

Nitěnky *Tubifex tubifex* byly podrobeny tříminutovému akutnímu testu toxicity. Pro testování bylo použito 10 kusů náhodně vybraných jedinců o velikosti 2 až 4 mm. Počet nehybných jedinců byl počítán přesně (pomocí stopek) tři minuty od vložení nitěnek do roztoku.

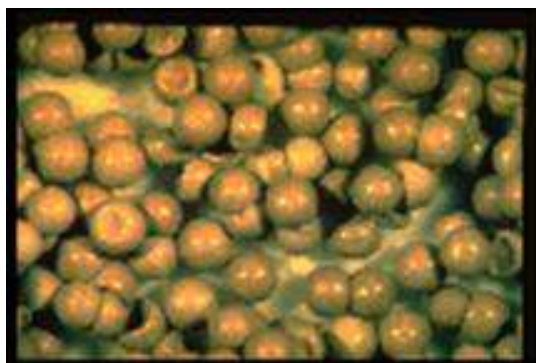


Obrázek 4.6: Nitěnky *Tubifex tubifex* [70]

4.8. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

4.8.1. Inkubace cyst *Artemia salina*

Inkubace cyst byla započata 2 dny před začátkem testů toxicity. Do 2 litrů vody byla odebrána lžička cyst artemií a velká lžice soli. Cysty artemií byly provzdušňovány slabým proudem vzduchu. Cysty byly inkubovány 48 hodin při laboratorní teplotě.



Obrázek 4.7: Cysty artemie [46]

4.8.2. Plnění testovací desky

Šachty jsou označeny 1 až 6 horizontálně a A až D vertikálně. Přenos testovaných roztoků byl vždy prováděn směrem od kontroly (první sloupec vlevo) k nejvyšší koncentraci (šestý sloupec vpravo). Do každé šachty sloupce 1 (šachty A1, B1, C1 a D1) bylo napipetováno 5 ml standardní mořské vody (kontrola), do každé šachty v sloupci 2 (šachty A2, B2, C2 a D2) bylo přeneseno 5 ml ze zkumavky 5 (nejnižší koncentrace). Tento postup byl opakován se zkumavkami 4, 3, 2 a 1 k naplnění šachet sloupců 3, 4, 5 a 6. Každá zkumavka s roztoky byla vždy před napipetováním intenzivně protřepána.

4.8.3. Přenos larev do testovacích šachet

Pomocí mikropipety bylo přeneseno 50 larev artemií z Petriho misky do každé mycí šachty v řádku D v pořadí D1 až D6 (s rostoucí koncentrací toxikantu). Z mycí šachty D1 bylo do ostatních šachet v sloupci (A1, B1 a C1) přeneseno 10 larev. Tento přenos byl následně zopakován pro sloupce 2, 3, 4, 5 a 6 v tomto pořadí. Nakonec byla přiložena parafinová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla vložena do osvětleného inkubátoru o teplotě 25°C na dobu 48 hodin.

4.8.4. Vyhodnocení testu

Výsledkem biotestu bylo stanovení hodnot 24h LC50 a 48h LC50. Po 24 a 48 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a ve všech šachtách byl zjištěn počet mrtvých a imobilizovaných jedinců. Pokud by kontrola přesáhla 10 % mortalitu je biotest považován za chybný a je nutno ho opakovat. Z celkového počtu mrtvých a imobilizovaných neonatů bylo pro každou koncentraci vypočítáno procento úmrtnosti. Ze zaznamenané mortality byla sestrojena grafická závislost procentuální mortality na logaritmu koncentrace testované látky. Hodnoty 24h LC50 a 48h LC50 byly zjištěny pomocí lineární regrese.

4.9. Rotoxkit FTM

4.9.1. Příprava ředící vody

K přípravě standardní sladké vody byly použity ampule s koncentrovanými solnými roztoky. Tato voda byla použita jako médium pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu koncentrační řady. Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna cca 800 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule s koncentrovaným sodným roztokem označena číslem 1 (NaHCO₃) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi obsahujícími koncentrované roztoky, tj. dvě ampule označené

číslem 2 (CaSO₄), jedna ampule s číslem 3 (MgSO₄) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou a protřepána. Mezi jednotlivými testy byla uchovávána v ledničce při teplotě maximálně 4 °C. [42, 48, 49]

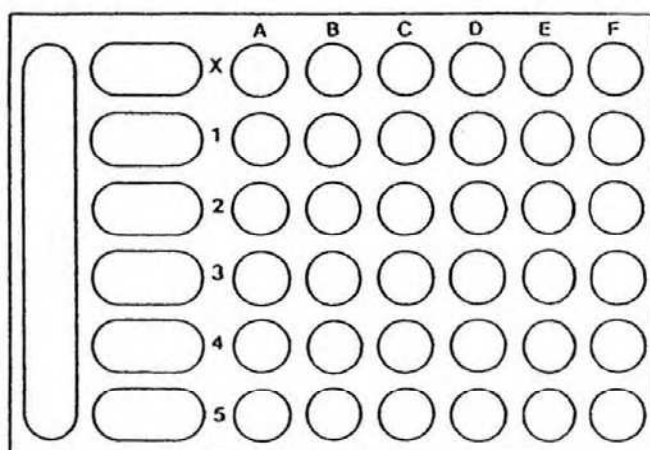
4.9.2. Inkubace cyst

Vialka obsahující cysty vířníků *Brachionus calicyflorus* byla vyprázdněna do žlábků určeného k líhnutí na testovací desce a vypláchnuta 0,5 ml standardní sladkou vodou. Poté byly přidány 2 ml standardní sladké vody.

Na testovací destičku byl přiložen parafilm, kryt a destička byla na 16 – 18 hodin vložena do inkubátoru při 25 °C a 3 000 až 4 000 lux. [42, 48, 49]

4.9.3. Plnění testovací desky

Šachty jsou označeny X až 6 vertikálně a A až F horizontálně. Přenos testovaných roztoků byl vždy prováděn směrem od kontroly k nejvyšší koncentraci. Do každé šachty řádku X (šachty AX, BX, CX, DX, EX) bylo nepipetováno 0,3 ml standardní sladké vody (kontrola), do každé šachty v řádku 1 (šachty A1, B1, C1, D1, E1 a F1) bylo přeneseno 0,3 ml ze zkumavky 5 (nejnižší koncentrace). Tento postup byl opakován se zkumavkami 4, 3, 2 a 1 k naplnění šachet řádků 2, 3, 4 a 5. Každá zkumavka s roztoky byla vždy před napipetováním intenzivně protřepána. [42, 48, 49]



Obrázek 4.8: Testovací deska pro Rotoxkit F [68]

4.9.4. Přenos larev do šachet

Pomocí mikropipety bylo přeneseno 50 larev *Brachionus calicyflorus* z líhnoucího žlábků do každé mycí šachty v pořadí 1 až 5 (s rostoucí koncentrací toxikantu). Z mycí šachty 1 bylo do ostatních šachet v řádku (A1, B1, C1, D1, E1 a F1) přeneseno 5 larev. Tento přenos byl následně zopakován pro řádky 2, 3, 4 a 5 v tomto pořadí. Nakonec byla přiložena parafinová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla obalena alobalem (inkubace probíhá v temnu) a vložena do inkubátoru o teplotě 25°C na dobu 24 hodin. [42, 48, 49]

4.9.5. Vyhodnocení testu

Výsledkem tohoto biotestu je hodnota 24h LC50. Po 24 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a byli spočítáni živí i mrtví jedinci. Larvy byly považovány za mrtvé, pokud během 10 sekund pozorování nevykazovaly žádný pohyb. Pokud procento úmrtnosti

v kontrole přesáhlo 10 %, byl biotest považován za neplatný. Hodnota 24h LC50 byla zjištěna stejným způsobem jako u testu Daphtoxkit FTM (viz kap. 4.4) [42, 48, 49]

4.10. *Lemna minor*

4.10.1. Příprava ředící vody

Přibližně k 900 ml destilované vody bylo přidáno po 20 ml každého ze zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz tabulka 4.1). Potom byl přidán 1 ml každého ze zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz tabulka 4.2). Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1000 ml. Pro další uchovatelnost byly roztoky upraveny autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 4.1: Složení zásobních roztoků pro kultivaci okřehku - makrosložky [54, 58]

Zásobní roztok (makrosložky)	[g/l]
<i>Zásobní roztok 1</i>	
KNO ₃	17,5
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>Zásobní roztok 2</i>	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00
<i>Zásobní roztok 3</i>	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75

Tabulka 4.2: Složení zásobních roztoků pro kultivaci okřehku - mikrosložky [54, 58]

Zásobní roztok (mikrosložky)	[mg/l]
<i>Zásobní roztok 4</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>Zásobní roztok 5</i>	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,0
<i>Zásobní roztok 6</i>	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,0
<i>Zásobní roztok 7</i>	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0
<i>Zásobní roztok 8</i>	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,0
EDTA, disodná sůl, dihydrát	1500,0

4.10.2. Podmínky testu

Podmínky testu jsou uvedeny v tabulce:

Tabulka 4.3: Podmínky testu [54, 58, 59]

Testovací organismus	okřehek menší (<i>Lemna minor</i> L.)
Barva	zelená
Velikost	0,5 – 3 cm
Typ testu	statický
Počet iniciačních lístků v jedné koncentraci	10 - 16
Sledovaná odezva	inhibice růstu, symptomy
Podmínky testu	stálá teplota a osvětlení
Opakování	2 - 3
Objem testované koncentrace	100 ml ve 150 ml kádince
Teplota	(24 ± 2) °C
Doba expozice	7 dní
Osvětlení	6500 - 10000 lx

4.10.3. Provedení testu

Do testovacích i kontrolních kádinek s připravenými koncentracemi testované látky byly pomocí tyčinky přeneseny 2-4lístkové kolonie okřešku. V každé kádince musí být identický počet lístků. Celkový počet lístků v koncentraci na počátku byl 10. Kádinky byly překryty potravinářskou fólií a umístěny pod zářivku s kontinuálním osvětlením a světelnou intenzitou 6 500 – 10 000 lux.

Kontrola testovacích organismů se provádí zjišťováním počtu lístků a sledováním vzhledu kolonií každý den a při ukončení testu. Byla sledována odumřelá tkáň lístků (bílá nebo rozmočená), tzv. nekróza a zežloutnutí tkáně lístků, tzv. chloróza. Kromě počtu lístků byl hodnocen účinek testované látky na konečné množství biomasy. Biomasa byla stanovena jako listová plocha a také jako hmotnost sušiny (sušení biomasy při 60 °C do dosažení konstantní hmotnosti vzorku).

4.10.4. Vyhodnocení testu

Výsledkem tohoto testu je hodnota 168IC₅₀. Účelem testu je stanovit účinky testované látky na vegetativní růst okřešku.

Koncentrace testované látky, ve kterých došlo k inhibici růstu, se vyjádří v logaritmických hodnotách (log c).

Do tabulky byly sestaveny hodnoty I_{Ai}, případně I_μ, nebo I_B proti odpovídajícím testovaným koncentracím. Získané hodnoty byly vyneseny do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je log c (osa x), závisle proměnnou inhibice v % (osa y). Vynesenými body byla proložena přímka. Z průsečíku proložené přímky a souřadnice odpovídající 50 % inhibici byla spuštěna kolmice na osu x a odečtena příslušná hodnota log c. Odlogaritmováním hodnoty log c byla získána hledaná koncentrace IC. [54, 58, 59]

5. VÝSLEDKY

5.1. Referenční testy toxicity

Referenční testy byly prováděny podle metodiky a za stejných podmínek jako následující testy s testovanými látkami. Všechny standardy byly testovány nejméně jednou. K testování byl používán roztok dichromanu draselného o koncentraci 1 g/l, pro okřehek byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci 20 g/l.

Všechny musk sloučeniny byly podrobeny čtyřem testům fytoxicity – test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*, test inhibice růstu kořene salátu setého *Lactuca sativa*, test inhibice růstu kořene cibule bílé *Allium cepa* a test inhibice růstu okřešku menšímu *Lemna minor*. Pro testování byly použity také čtyři alternativní testy toxicity – test Thamnotoxkit FTM s organismem *Thamnocephalus platyurus*, Daphtoxkit FTM s korýšem *Daphnia magna*, Rotoxkit FTM s vířníkem *Brachionus calyciflorus* a test na mořském organismu *Artemia salina*.

Akutní test toxicity na nitěnkách *Tubifex tubifex* byl proveden s koncentracemi dichromanu draselného 100 mg/l a 1000 mg/l. Ani v jednom případě nedošlo k úhynu žádného z jedinců. Tento test tedy není dostatečně citlivý a z toho důvodu nebyl použit pro sledované musk sloučeniny.

Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce. Dílčí výsledky jsou uvedeny v příloze P1 až P6.

Tabulka 5.1: Výsledky referenčních testů

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Experimentální hodnota [mg/l]	Deklarovaná hodnota (rozsah hodnot) [mg/l]	Odchylka [%]
Daphtoxkit F TM	24EC50	1,13±0,026	1,12	0,89
	48hEC50	0,77±0,105	0,83	7,23
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	0,10±0,0	0,10	0
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	33,55±0,049	-	-
	48hLC50	8,8±0,065	-	-
Rotoxkit F TM	24hLC50	9,75±0,014	9,6 - 17,8	v rozmezí
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	53,18±0,019	50 - 80	v rozmezí
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	47,39±0,047	10 - 50	v rozmezí
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	0,45±0,06	-	-
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	5510±0,098	5500-10000	v rozmezí

5.2. Galaxolid

Alternativní testy toxicity s živými organismy byly vyhodnoceny formou probitové analýzy a lineární regrese, z obou výsledků byla vypočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka. U fyto-testů byly příslušné hodnoty stanoveny na základě lineární regrese, průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka byly získány ze dvou různých měření. Účinek testovaných musk sloučenin na okřehek *Lemna minor* byl posouzen podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou a podle konečné biomasy, stejně jako v předchozích případech byla spočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka.

Tabulka 5.2: Výsledky úvodního testu pro galaxolid

Test/testovaný organismus	Koncentrace [mg/l]	Inhibice/úmrtnost %
Daphtoxkit F TM	5	75
	5	100
Thamnotoxkit F TM	5	100
<i>Artemia salina</i>	10	97
	10	100
<i>Sinapis alba</i>	10	51
<i>Lactuca sativa</i>	10	54
<i>Allium cepa</i>	10	58

Úvodní testy provedené na všech organismech byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), z toho důvodu následovaly testy předběžné.

Tabulka 5.3: Výsledky předběžného testu pro galaxolid na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese) [mg/l]	Hodnota (probitový model) [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	2,98±0,069	3,02±0,05	3,00±0,06	3	0,0218
	48hEC50	1,20±0,142	1,04±0,029	1,12±0,086	1,12	0,0795
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	1,29±0,072	1,29±0,182	1,29±0,127	1,29	0,0025
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	3,53±0,019	3,52±0,024	3,525±0,022	3,53	0,0052
	48hLC50	2,36±0,091	2,25±0,071	2,305±0,081	2,3	0,0579
Rotoxkit F TM	24hLC50	2,14±0,081	2,12±0,113	2,13±0,097	2,12	0,0165

Tabulka 5.4: Výsledky předběžného testu pro galaxolid na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	4,038±0,165	4,201±0,245	4,119±0,205	4,12	0,0815
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	5,762±0,062	6,996±0,097	6,379±0,0795	6,38	0,6172
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	5,504±0,331	5,506±0,319	5,505±0,325	5,50	0,0011

Tabulka 5.5: Výsledky předběžného testu pro galaxolid na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		<i>Lemna minor</i>
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	4,55±0,043
	Rychlost růstu	5,97±0,108
	Hmotnost konečné biomasy	3,59±0,04
Průměrná hodnota [mg/l]		4,7±0,064
Medián		4,55
Směrodatná odchylka		0,9451

Na základě předběžných testů bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní testy.

Tabulka 5.6: Výsledky základního testu pro galaxolid na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese) [mg/l]	Hodnota (probitový model) [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	1,22±0,01	1,22±0,011	1,22±0,011	1,22	0,0004
	48hEC50	1,12±0,014	1,12±0,014	1,12±0,014	1,12	0,0004
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	1,21±0,124	1,08±0,131	1,145±0,128	1,08	0,063
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	2,26±0,039	2,35±0,046	2,305±0,043	2,25	0,0130
	48hLC50	1,89±0,046	1,88±0,049	1,885±0,048	1,89	0,0024
Rotoxkit F TM	24hLC50	1,93±0,059	1,93±0,059	1,93±0,059	1,93	0,0002

Tabulka 5.7: Výsledky základního testu pro galaxolid na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	3,936±0,017	4,022±0,161	3,979±0,089	3,98	0,0430
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	6,573±0,058	6,191±0,03	6,382±0,044	6,38	0,1910
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	5,009±0,021	5,168±0,059	5,088±0,04	5,09	0,0791

Tabulka 5.8: Výsledky základního testu pro galaxolid na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		<i>Lemna minor</i>
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	5,01±0,05
	Rychlost růstu	6,51±0,04
	Hmotnost konečné biomasy	4,56±0,026
Průměrná hodnota [mg/l]		4,62±0,039
Medián		5,01
Směrodatná odchylka		0,83

5.3. Tonalid

Alternativní testy toxicity s živými organismy byly vyhodnoceny formou probitové analýzy a lineární regrese, z obou výsledků byla vypočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka. U fytotestů byly příslušné hodnoty stanoveny na základě lineární regrese, průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka byly získány ze dvou různých měření. Účinek testovaných musk sloučenin na okřehek *Lemna minor* byl posouzen podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou a podle konečné biomasy, stejně jako v předchozích případech byla spočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka.

Tabulka 5.9: Výsledky úvodního testu pro tonalid

Test/testovaný organismus	Koncentrace [mg/l]	Inhibice/úmrtnost %
Daphtoxkit F TM	5	100
	5	100
Thamnotoxkit F TM	5	100
<i>Artemia salina</i>	10	93
	10	100
<i>Sinapis alba</i>	5	52
<i>Lactuca sativa</i>	5	53
<i>Allium cepa</i>	15	57

Úvodní testy provedené na všech organismech byly pozitivní (mortalita $\geq 50\%$), z toho důvodu následovaly testy předběžné.

Tabulka 5.10: Výsledky předběžného testu pro tonalid na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	2,33±0,061	2,50±0,045	2,415±0,053	2,42	0,0859
	48hEC50	1,32±0,047	1,32±0,114	1,32±0,081	1,32	0,0021
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	1,53±0,089	1,47±0,192	1,5±0,141	1,5	0,0301
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	2,63±0,015	2,63±0,009	2,63±0,012	2,63	0,0022
	48hLC50	2,16±0,043	2,39±0,141	2,275±0,092	2,27	0,1155
Rotokit F TM	24hLC50	3,68±0,257	4,05±0,084	3,865±0,171	3,86	0,1862

Tabulka 5.11: Výsledky předběžného testu pro tonalid na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	7,203±0,112	4,431±0,188	5,817±0,15	5,82	1,3861
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,063±0,129	7,168±0,032	7,116±0,081	7,12	0,0562
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	5,332±0,028	5,633±0,138	5,483±0,083	5,48	0,1503

Tabulka 5.12: Výsledky předběžného testu pro tonalid na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	1,48±0,069
	Rychlost růstu	8,54±0,055
	Hmotnost konečné biomasy	5,16±0,116
Průměrná hodnota [mg/l]		5,06±0,08
Medián		5,16
Směrodatná odchylka		2,8830

Na základě předběžných testů bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní testy.

Tabulka 5.13: Výsledky základního testu pro tonalid na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	1,52±0,038	1,50±0,012	1,51±0,025	1,51	0,0097
	48hEC50	1,33±0,018	1,33±0,02	1,33±0,019	1,33	0,0007
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	1,58±0,059	1,58±0,059	1,58±0,059	1,58	0,0004
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	2,23±0,022	2,44±0,021	2,335±0,022	2,33	0,1019
	48hLC50	1,97±0,057	2,23±0,061	2,1±0,059	2,1	0,1337
Rotokit F TM	24hLC50	4,2±0,060	4,2±0,057	4,2±0,059	4,2	0,0001

Tabulka 5.14: Výsledky základního testu pro tonalid na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	4,561±0,032	4,412±0,158	4,487±0,095	4,49	0,0745
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,371±0,055	7,516±0,021	7,443±0,038	7,44	0,0728
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	5,766±0,003	5,368±0,08	5,567±0,042	5,57	0,1990

Tabulka 5.15: Výsledky základního testu pro tonalid na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	4,53±0,023
	Rychlost růstu	5,87±0,006
	Hmotnost konečné biomasy	4,28±0,003
Průměrná hodnota [mg/l]		4,9±0,011
Medián		4,53
Směrodatná odchylka		0,6990

5.4. Musk keton

Alternativní testy toxicity s živými organismy byly vyhodnoceny formou probitové analýzy a lineární regrese, z obou výsledků byla vypočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka. U fyto-testů byly příslušné hodnoty stanoveny na základě lineární regrese, průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka byly získány ze dvou různých měření. Účinek testovaných musk sloučenin na okřehek *Lemna minor* byl posouzen podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou a podle konečné biomasy, stejně jako v předchozích případech byla spočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka.

Tabulka 5.16: Výsledky úvodního testu pro musk keton

Test/testovaný organismus	Koncentrace [mg/l]	Inhibice/úmrtnost %
Daphtoxkit F TM	5	75
	5	100
Thamnotoxkit F TM	5	100
<i>Artemia salina</i>	10	83
	10	100
<i>Sinapis alba</i>	5	50
<i>Lactuca sativa</i>	5	51
<i>Allium cepa</i>	15	58

Úvodní testy provedené na všech organismech byly pozitivní (mortalita ≥ 50 %), z toho důvodu následovaly testy předběžné.

Tabulka 5.17: Výsledky předběžného testu pro musk keton na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	3,85±0,061	2,76±0,091	3,305±0,076	3,31	0,5461
	48hEC50	2,17±0,144	2,38±0,112	2,275±0,128	2,27	0,1066
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	6,69±0,002	7,77±0,061	7,23±0,032	7,23	0,5379
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	7,23±0,004	7,57±0,004	7,4±0,004	7,4	0,1694
	48hLC50	4,88±0,021	4,85±0,068	4,865±0,045	4,86	0,0171
Rotoxkit F TM	24hLC50	3,77±0,062	3,95±0,318	3,86±0,19	3,86	0,0887

Tabulka 5.18: Výsledky předběžného testu pro musk keton na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	5,734±0,06	4,602±0,07	5,668±0,07	5,67	0,0661
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,563±0,054	7,006±0,064	7,284±0,059	7,28	0,2787
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	6,66±0,053	6,432±0,093	6,546±0,073	6,55	0,1138

Tabulka 5.19: Výsledky předběžného testu pro musk keton na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	3,24±0,047
	Rychlost růstu	6,12±0,108
	Hmotnost konečné biomasy	6,93±0,029
Průměrná hodnota [mg/l]		5,43±0,061
Medián		6,12
Směrodatná odchylka		1,5856

Na základě předběžných testů bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní testy.

Tabulka 5.20: Výsledky základního testu pro musk keton na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	2,33±0,065	2,33±0,064	2,33±0,065	2,33	0,0005
	48hEC50	2,13±0,021	2,13±0,019	2,13±0,02	2,13	0,00004
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	6,18±0,013	6,19±0,015	6,145±0,014	6,19	0,0051
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	4,93±0,018	4,93±0,018	4,93±0,018	4,93	0,0009
	48hLC50	4,74±0,021	4,74±0,017	4,74±0,019	4,74	0,0012
Rotoxkit F TM	24hLC50	3,86±0,054	3,86±0,056	3,86±0,055	3,86	0,0007

Tabulka 5.21: Výsledky základního testu pro musk keton na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	4,548±0,039	5,141±0,01	4,844±0,025	4,84	0,2964
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,618±0,149	7,115±0,049	7,367±0,099	7,37	0,2514
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	6,27±0,147	6,528±0,042	6,399±0,095	6,4	0,1290

Tabulka 5.22: Výsledky základního testu pro musk keton na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	4,98±0,005
	Rychlost růstu	6,52±0,022
	Hmotnost konečné biomasy	4,58±0,052
Průměrná hodnota [mg/l]		5,36±0,026
Medián		4,98
Směrodatná odchylka		0,8376

5.5. Musk xylen

Alternativní testy toxicity s živými organismy byly vyhodnoceny formou probitové analýzy a lineární regrese, z obou výsledků byla vypočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka. U fytoestrogenů byly příslušné hodnoty stanoveny na základě lineární regrese, průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka byly získány ze dvou různých měření. Účinek testovaných musk sloučenin na okřehek *Lemna minor* byl posouzen podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou a podle konečné biomasy, stejně jako v předchozích případech byla spočítána průměrná hodnota, medián a směrodatná odchylka.

Tabulka 5.4: Výsledky úvodního testu pro musk xylen

Test/testovaný organismus	Koncentrace [mg/l]	Inhibice/úmrtnost %
Daphtoxkit F TM	5	70
	5	100
Thamnotoxkit F TM	5	100
<i>Artemia salina</i>	10	90
	10	100
<i>Sinapis alba</i>	5	51
<i>Lactuca sativa</i>	5	52
<i>Allium cepa</i>	15	56

Úvodní testy provedené na všech organismech byly pozitivní (mortalita $\geq 50\%$), z toho důvodu následovaly testy předběžné.

Tabulka 5.24: Výsledky předběžného testu pro musk xylen na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	3,16±0,04	3,20±0,07	3,18±0,055	3,18	0,0195
	48hEC50	2,15±0,025	2,30±0,028	2,225±0,027	2,23	0,0776
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	6,12±0,084	7,41±0,005	6,765±0,045	6,77	0,6465
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	5,24±0,149	5,27±0,171	5,255±0,16	5,25	0,0166
	48hLC50	4,21±0,046	4,06±0,045	4,135±0,046	4,14	0,0732
Rotokit F TM	24hLC50	3,26±0,238	3,23±0,7	3,245±0,47	3,25	0,0130

Tabulka 5.25: Výsledky předběžného testu pro musk xylen na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	5,891±0,059	6,123±0,108	6,052±0,084	6,05	0,1608
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,97±0,091	7,254±0,078	7,612±0,052	7,61	0,3580
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	7,633±0,186	7,13±0,209	7,882±0,02	7,88	0,2488

Tabulka 5.26: Výsledky předběžného testu pro musk xylen na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	1,09±0,005
	Rychlost růstu	3,72±0,07
	Hmotnost konečné biomasy	11,95±0,157
Průměrná hodnota [mg/l]		5,59±0,077
Medián		3,72
Směrodatná odchylka		4,6264

Na základě předběžných testů bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní testy.

Tabulka 5.5: Výsledky základního testu pro musk xylen na živých organismech

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota (lineární regrese)	Hodnota (probitový model)	Průměrná hodnota	Medián	Směrodatná odchylka
Daphtoxkit F TM	24EC50	2,39±0,017	2,39±0,014	2,39±0,016	2,39	0,0025
	48hEC50	2,22±0,049	2,22±0,05	2,22±0,05	2,22	0,0005
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	6,16±0,076	6,16±0,076	6,16±0,076	6,16	0,0005
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	4,16±0,045	4,16±0,044	4,16±0,045	4,16	0,0007
	48hLC50	4,04±0,05	4,04±0,052	4,04±0,051	4,04	0,0002
Rotokit F TM	24hLC50	2,89±0,002	2,88±0,003	2,885±0,003	2,88	0,0020

Tabulka 5.28: Výsledky základního testu pro musk xylen na vyšších rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* a *Allium cepa*

Testovaná rostlina	Zjišťovaná veličina	1. hodnota [mg/l]	2. hodnota [mg/l]	Průměrná hodnota [mg/l]	Medián	Směrodatná odchylka
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	5,211±0,095	6,141±0,055	5,676±0,075	5,68	0,4649
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,29±0,01	6,719±0,054	7,004±0,032	7,00	0,2855
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	8,098±0,195	7,491±0,033	7,795±0,114	7,79	0,3034

Tabulka 5.29: Výsledky základního testu pro musk xylen na rostlině *Lemna minor*

Testovaný organismus		Lemna minor
Zjišťovaná veličina		168hIC50
Hodnota [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	5,01±0,011
	Rychlost růstu	6,51±0,014
	Hmotnost konečné biomasy	4,56±0,016
Průměrná hodnota [mg/l]		5,36±0,014
Medián		5,01
Směrodatná odchylka		0,8345

6. DISKUZE

Diplomová práce se zaměřuje na ekotoxikologické hodnocení vybraných syntetických vonných látek – galaxolidu, tonalidu, musk ketonu a musk xylen. Galaxolid a tonalid patří mezi nejvýznamnější zástupce skupiny polycyklických musk sloučenin a musk xylen a musk keton představují dva nejvýznamnější zástupce z velké skupiny aromatických nitromusk sloučenin. Pro testování těchto látek byly použity čtyři fytotesty, prováděné na rostlinách *Sinapis alba*, *Lactuca sativa*, *Allium cepa* a *Lemna minor* a čtyři alternativní testy na organismech *Artemia salina*, *Brachionus calicyflorus*, *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus*.

Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou, ověření správnosti postupů, klíčivosti semen a citlivosti organismů bylo provedeno pomocí standardních testů ekotoxicity se standardní látkou dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$, pro okřehek menší byl v souladu s normou použit chlorid draselný KCl. Výsledné hodnoty pro dichroman draselný a chlorid draselný byly ve shodě s výsledky odpovídajícími těmto standardům, a proto bylo možné tyto postupy použít pro hodnocení ekotoxicity vybraných musk sloučenin.

Pro lepší porovnání a zhodnocení výsledků byly získané hodnoty EC50, IC50 a LC50 shrnuty do tabulky 6.1. Vliv rozpouštědla dimethylsulfoxidu byl zanedbatelný, z toho důvodu nebyl zohledněn při vyhodnocování ekotoxicity musk sloučenin.

Tabulka 6.1: Výsledné hodnoty pro testované musk sloučeniny

Test/testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	galaxolid	tonalid	musk keton	musk xylen
Daphtoxkit F TM	24EC50	1,22±0,011	1,51±0,025	2,33±0,065	2,39±0,016
	48hEC50	1,12±0,014	1,33±0,019	2,13±0,02	2,22±0,05
Thamnotoxkit F TM	24hLC50	1,145±0,128	1,58±0,059	6,145±0,014	6,16±0,076
<i>Artemia salina</i>	24hLC50	2,305±0,043	2,335±0,022	4,93±0,018	4,16±0,045
	48hLC50	1,885±0,048	2,1±0,059	4,74±0,019	4,04±0,051
Rotoxkit F TM	24hLC50	1,93±0,059	4,2±0,059	3,86±0,055	2,885±0,003
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	3,98±0,089	4,49±0,095	4,84±0,025	5,68±0,075
<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	6,38±0,044	7,44±0,038	7,37±0,099	7,00±0,032
<i>Allium cepa</i>	72hIC50	5,09±0,04	5,57±0,042	6,4±0,095	7,79±0,114
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	4,62±0,039	4,9±0,011	5,36±0,026	5,36±0,014

Z výsledků testů ekotoxicity vyplývá, že testy na vodních organismech jsou citlivější než testy prováděné s vyššími rostlinami. Ve skupině alternativních testů s vodními organismy vykazovala jednoznačně největší citlivost *Daphnia magna*. V rámci fytotestů se jako nejcitlivější ukázal být test na hořčici *Sinapis alba*, prostřednictvím tohoto testu byly získány nižší hodnoty IC50 než u ostatních testovaných rostlin. Nejmenší citlivost vykazuje *Lactuca sativa*, u které byly získané hodnoty IC50 nejvyšší.

Tabulka 6.2 : Nejnižší zjištěné hodnoty pro sledované musk sloučeniny

Sloučenina	Test	Zjišťovaná veličina	Hodnota
galaxolid	Daphtoxkit F TM	48hEC50	1,12±0,014
tonalid	Daphtoxkit F TM	48hEC50	1,33±0,019
musk keton	Daphtoxkit F TM	48hEC50	2,13±0,02
musk xylen	Daphtoxkit F TM	48hEC50	2,22±0,05

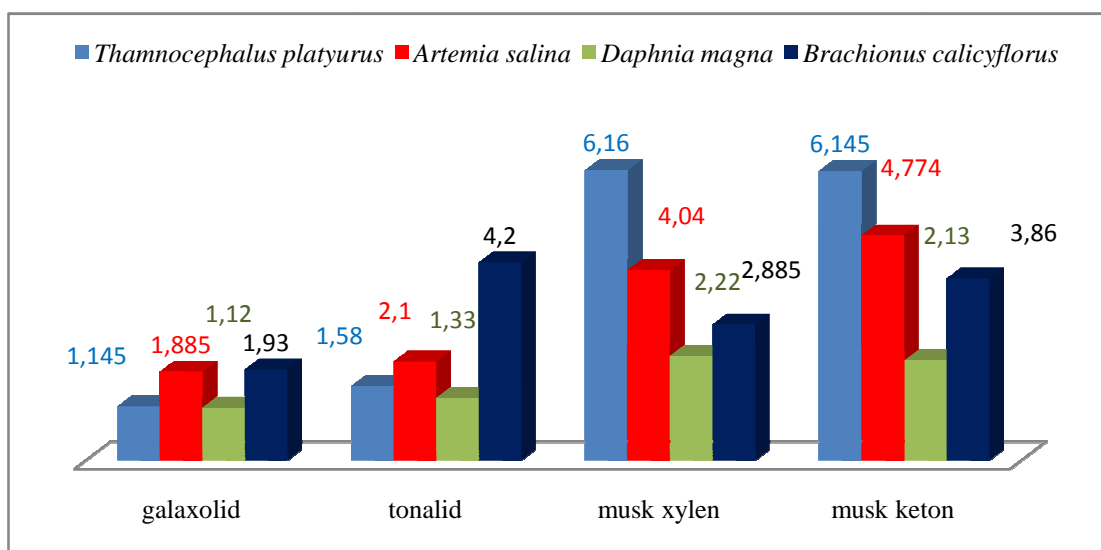
V tabulce 6.2 je shrnuta ekotoxicita jednotlivých musk sloučenin pro nejcitlivější organismus, kterým byl ve všech případech drobný korýš *Daphnia magna*.

Tabulka 6.3: Nejvyšší zjištěné hodnoty pro sledované musk sloučeniny

Sloučenina	Testovaný organismus	Zjišťovaná veličina	Hodnota
galaxolid	<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	6,38±0,044
tonalid	<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,44±0,038
musk keton	<i>Lactuca sativa</i>	72hIC50	7,37±0,099
musk xylen	<i>Allium cepa</i>	72hIC50	7,79±0,114

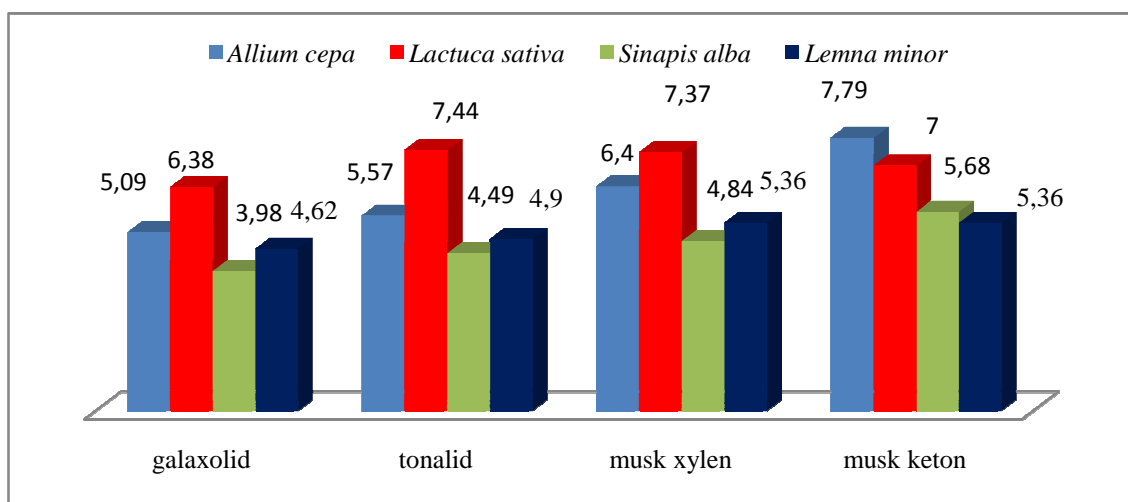
V tabulce 6.3 jsou pro názornost shrnuty nejvyšší hodnoty, které byly v rámci testování získány, tedy hodnoty ekotoxicity pro nejméně citlivé testy, kterými byly ve třech případech test inhibice růstu kořene *Lactuca sativa* a v případě musk xyleny test inhibice růstu kořene *Allium cepa*.

Pro lepší znázornění výsledku jsou v grafu 6.1 vyobrazeny výsledné hodnoty stanovené pro musk sloučeniny pomocí alternativních testů na vodních organismech. V grafu 6.2 jsou obdobně znázorněny výsledné hodnoty EC50, IC50 a LC50 stanovené pomocí testů s vyššími rostlinami.



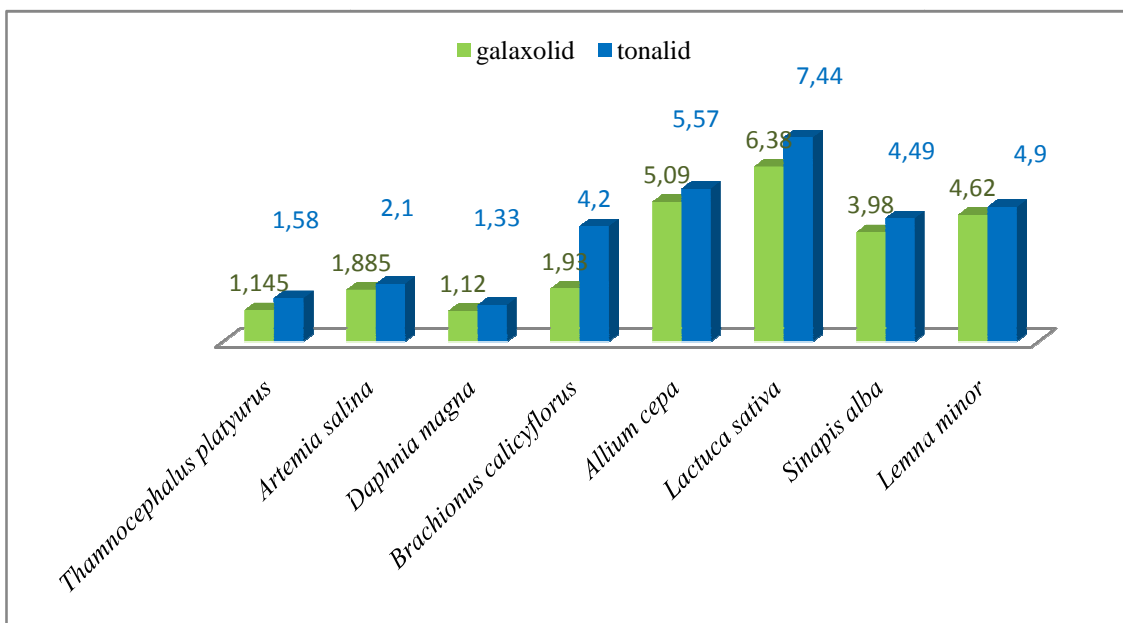
Graf 6.1: Vyhodnocení alternativních testů ekotoxicity s živými organismy

Z grafu 6.1 je patrná nejvyšší citlivost organismu *Daphnia magna* v porovnání s ostatními vodními organismy. *Thamnocephalus platyurus* se ukázal být jako velmi citlivý při testech prováděných s galaxolidem a tonalidem, zatímco u musk xyleny a musk ketonu se projevil jako nejméně citlivý. Citlivost žábřonožky *Artemia salina* se jeví jako stabilní, na všech testovaných látkách vykazuje třetí nejvyšší citlivost. *Brachionus calicyflorus* se ukázal jako poměrně citlivý organismus v případě galaxolidu, musk xyleny a musk ketonu, zatímco u tonalidu se vyznačoval nejnižší citlivostí. Z grafu jasně plyne, že nejvíce nebezpečnou látkou pro životní prostředí je galaxolid, který jednoznačně vykazoval nejnižší hodnoty EC50 a LC50. O musk xyleny a musk ketonu lze z grafu vyčíst, že vykazují srovnatelnou ekotoxicitu, po bližším srovnání dojdeme k závěru, že musk keton je nepatrně toxicitější.



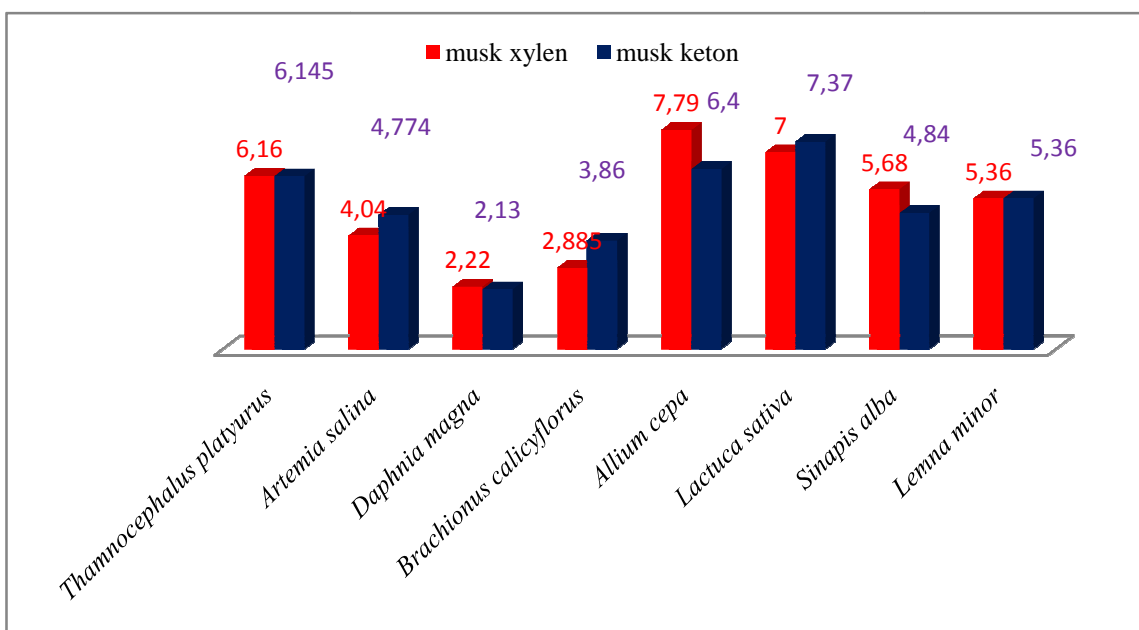
Graf 6.2: Vyhodnocení ekotoxicity pomocí testů s vyššími rostlinami

V grafu 6.2 je vyobrazena ekotoxicita musk sloučenin vyhodnocená pomocí fytotestů. Při srovnání s grafem 6.1 je na první pohled patrné, že u rostlin nedocházelo k tak velkým výkyvům v citlivosti, jako tomu bylo u živých organismů. Nejcitlivějším fytotestem je test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, který byl nejcitlivější u ekotoxikologického hodnocení galaxolidu, tonalidu a musk ketonu. Pouze v případě musk xyleny byla nejcitlivější vyšší rostlinou *Lemna minor*, na které byla zjištěna ekotoxicita sloučeniny o 0,32 mg/l nižší, než u *Sinapis alba*. Nejméně citlivým se v rámci fytotestů ukázal test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa*, který se projevil jako nejméně citlivý ve třech případech, konkrétně u galaxolidu, tonalidu a musk ketonu. Nejnižší ekotoxicitu musk xyleny vykazoval test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*. I když není z grafu 6.2 na první pohled jednoznačně patrná nejvyšší toxicita galaxolidu, jako je tomu v grafu 6.1, lze konstatovat, že i v případě testování musk sloučenin pomocí fytotestů vykazuje galaxolid nejvyšší ekotoxické vlastnosti.



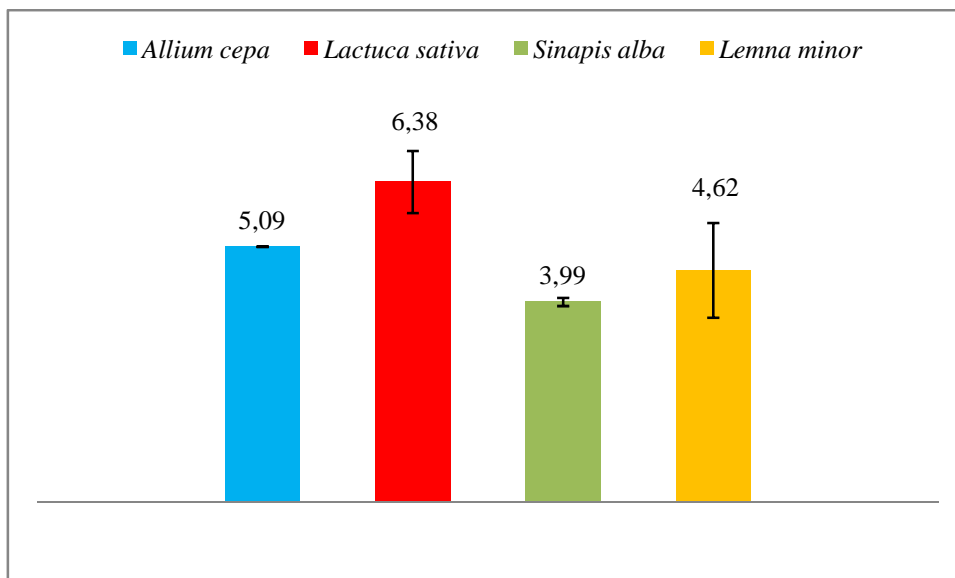
Graf 6.3: Ekotoxicita polycyklických musk sloučenin

Vyhodnocením ekotoxicity polycyklických musk sloučenin, galaxolidu a tonalidu (Graf 6.3), dojdeme k závěru, že více nebezpečný pro životní prostředí je galaxolid, který vykazoval nejnižší hodnoty v rámci všech provedených testů.



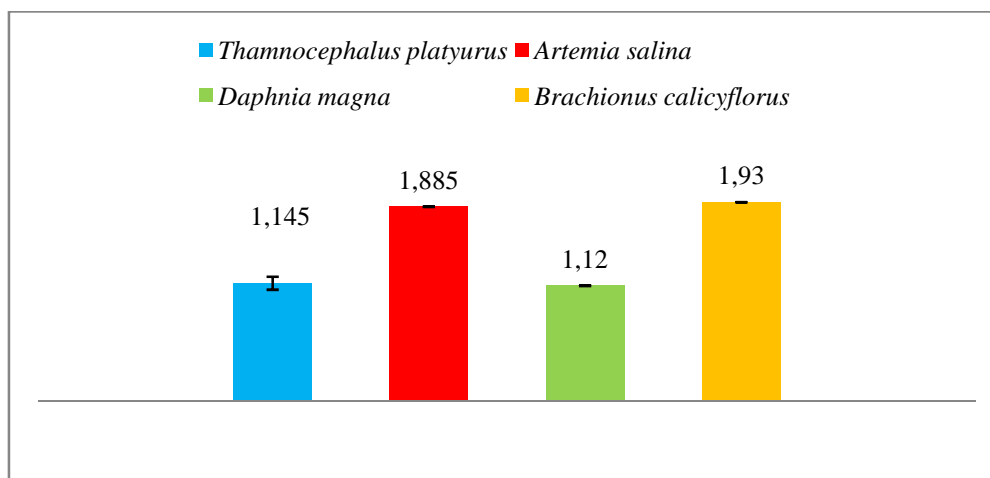
Graf 6.4: Ekotoxicita nitomusk sloučenin

Z grafu 6.4 je možné vyhodnotit ekotoxicitu skupiny nitromusk sloučenin, musk xylenu a musk ketonu. Obě sloučeniny vykazují srovnatelnou toxicitu, přičemž musk xylen se jeví jako méně toxický.



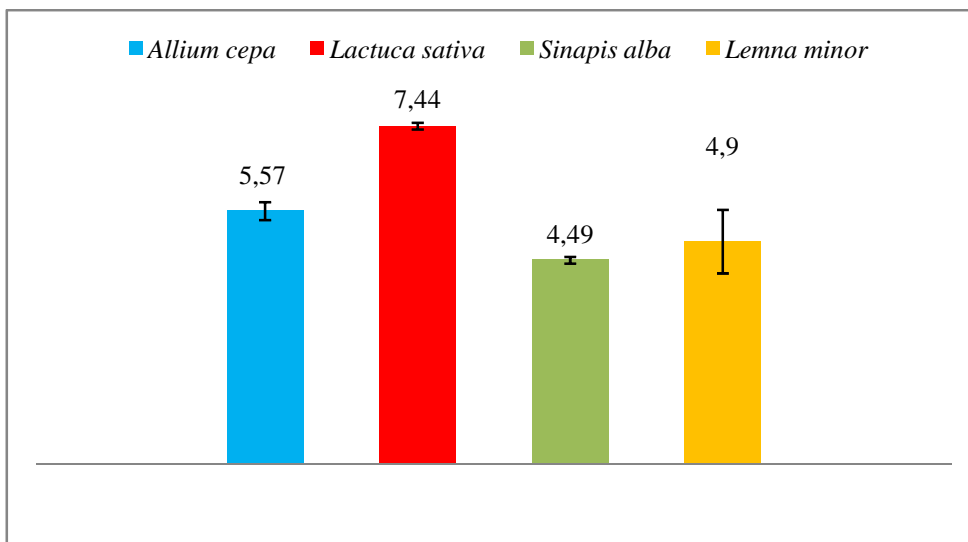
Graf 6.5: Ekotoxicita galaxolidu – fytotesty

Z grafu 6.5, ve kterém je porovnána ekotoxicita galaxolidu, zřetelně vyplývá, že nejcitlivější rostlinou byla hořčice *Sinapis alba* a nejméně citlivý salát *Lactuca sativa*. Nejnižší hodnota ekotoxicity zjištěná pro galaxolid činí 3,99 mg/l. Průměrná hodnota vypočítána ze všech získaných výsledků je 5,02 mg/l.



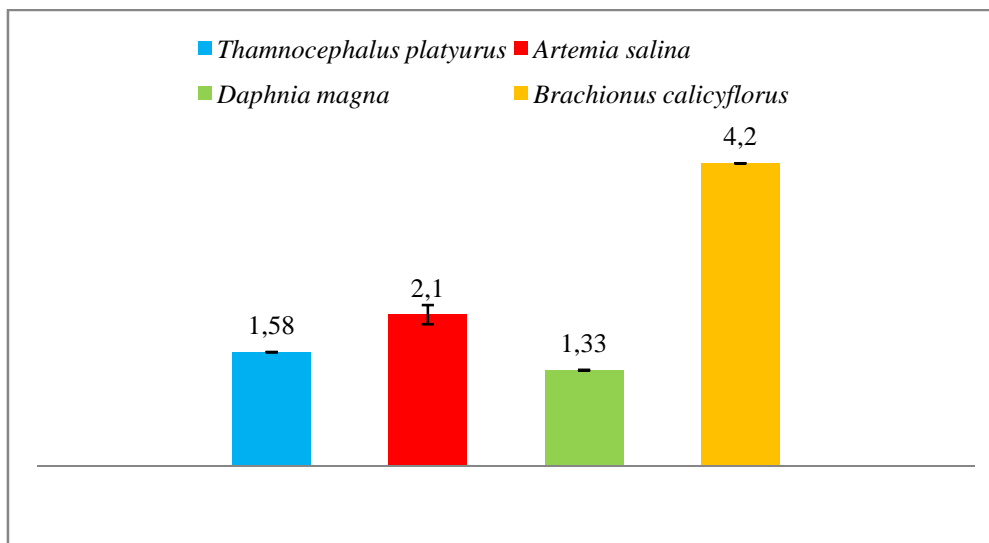
Graf 6.6: Ekotoxicita galaxolidu – testy s živými organismy

Z grafu 6.6, ve kterém je porovnána ekotoxicita galaxolidu, je možné vyčíst, že nejcitlivějším organismem byl korýš *Daphnia magna* a nejméně citlivým vířník *Brachionus calicyflorus*. Nejnižší hodnota ekotoxicity zjištěná pro galaxolid činí 1,12 mg/l. Průměrná hodnota vypočítána ze všech získaných výsledků je 1,52 mg/l.



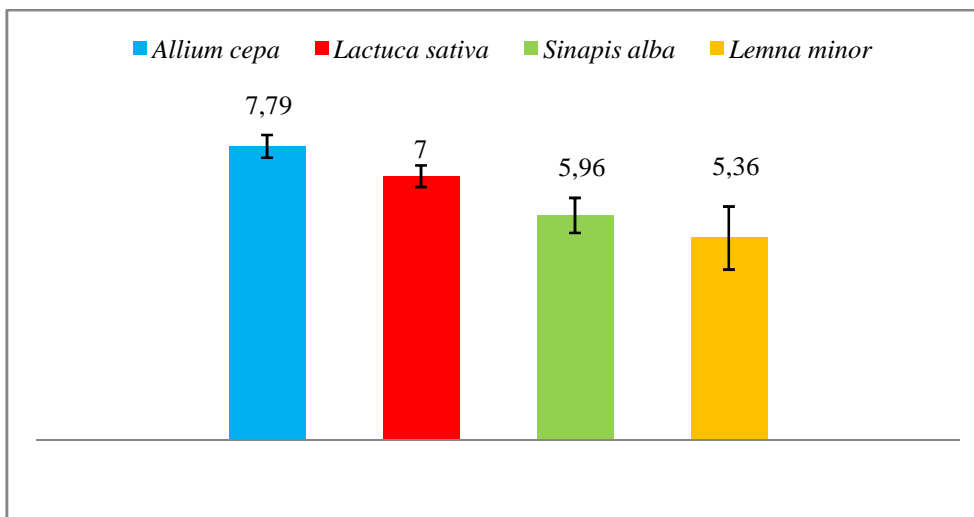
Graf 6.7: Ekotoxicita tonalidu – fytotesty

V grafu 6.7 jsou vyobrazeny výsledné hodnoty ekotoxicity zjištěné pro tonalid na vyšších rostlinách, které se pohybují v rozmezí od 4,49 mg/l až do hodnoty 7,34 mg/l. Průměrná hodnota vypočítána ze všech získaných výsledků činí 5,6 mg/l. Nejcitlivější rostlinou se i v tomto případě jeví hořčice *Sinapis alba*, nejmenší citlivost vykazoval test inhibice růstu kořene *Lactuca sativa*.



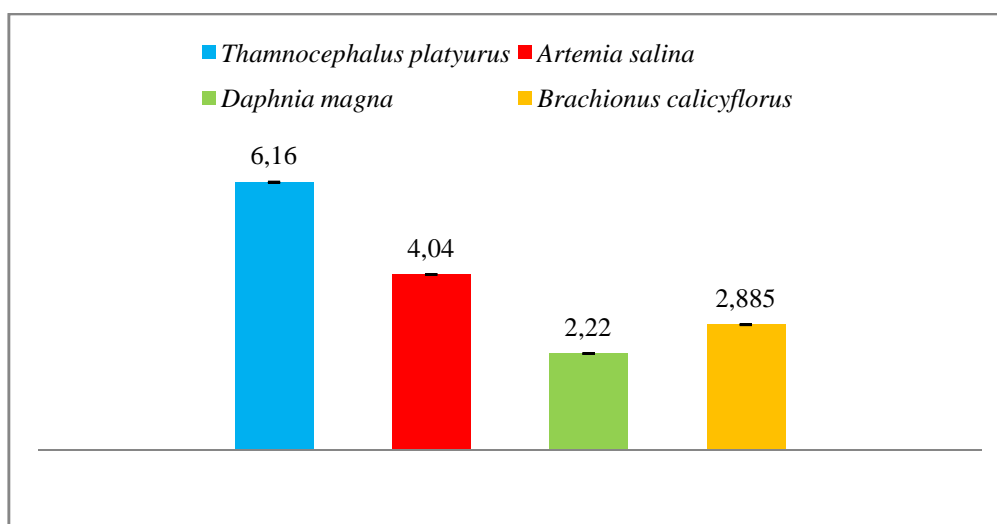
Graf 6.8: Ekotoxicita tonalidu – testy s živými organismy

V grafu 6.6 jsou vyobrazeny výsledné hodnoty ekotoxicky zjištěné pro tonalid pomocí alternativních testů toxicity na živých organismech, které se pohybují v rozmezí od 1,33 mg/l až do hodnoty 4,2 mg/l. Průměrná hodnota vypočítána ze všech získaných výsledků činí 2,3 mg/l. Nejcitlivějším organismem se i v tomto případě jeví drobný korýš *Daphnia magna*, nejmenší citlivost vykazoval test Rotoxkit FTM s vířníkem *Brachionus calicyflorus*.



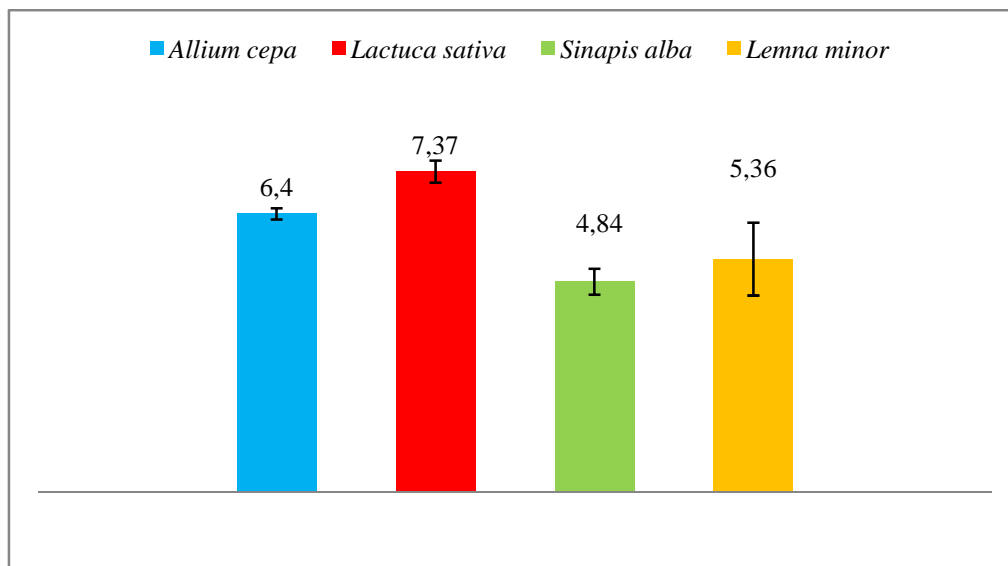
Graf 6.9: Ekotoxicita musk xylenu – fytotesty

V grafu 6.9 je možné stejně jako v předchozích případech názorně shlédnout zjištěné rozdíly v citlivosti jednotlivých fytotestů pro hodnocení ekotoxicity musk xylenu. Nejcitlivějším testem je test inhibice růstu *Lemna minor*, hodnota 168hIC₅₀ byla v tomto případě zjištěna 5,36 mg/l. Nejméně citlivým je test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*, který se takto projevil pouze v případě musk xylenu, u ostatních musk sloučenin byla nejvíce citlivou rostlinou hořčice *Sinapis alba*. Průměrná hodnota ze všech provedených testů vychází 6,53 mg/l.



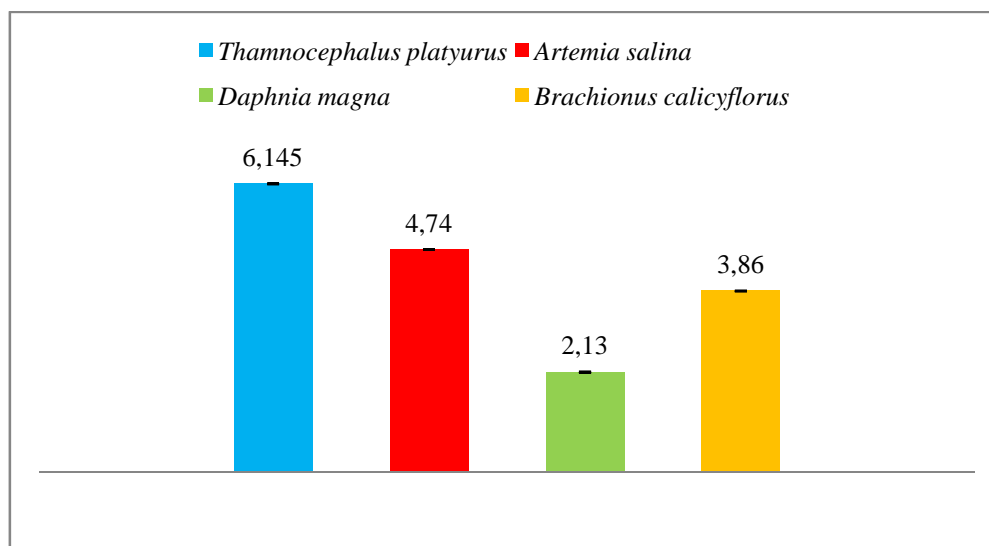
Graf 6.10: Ekotoxicita musk xylenu – testy s živými organismy

Z grafu 6.10 je již na první pohled je patrná nejvyšší citlivost organismu *Daphnia magna*, pro který zjištěná hodnota ekotoxicity činí 2,22 mg/l. Druhým nejcitlivějším testem byl v tomto případě test na vířníku *Brachionus calicyflorus*, třetím potom žábřonožka *Artemia salina*. Nejméně citlivým byl test na korýši *Thamnocephalus platyurus*, který byl v předchozích dvou případech, tedy u galaxolidu a tonalidu, druhým nejcitlivějším organismem.



Graf 6.11: Ekotoxicita musk ketonu – fytotesty

Z grafu 6.11, kde jsou vyobrazeny výsledky ekotoxicity musk ketonu je možné vyčíst, že na rozdíl od musk xylenu je nejcitlivějším test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba*, teprve za ním následuje test na okřehku *Lemna minor*. Nejmenší citlivost v případě musk ketonu vykazuje stejně jako u galaxolidu a tonalidu salát *Lactuca sativa*. Hodnoty ekotoxicity zjištěné pro musk keton se pohybují v rozmezí od 4,84 až do 7,42 mg/l. průměrná hodnota potom činí 6,0 mg/l.



Graf 6.12: Ekotoxicita musk ketonu – testy s živými organismy

Z grafu 6.12 vyplývá podobný trend jako u musk xylenu. Nejvíce citlivým organismem je *Daphnia magna*, která vykazuje hodnotu 48hEC50 2,13 mg/l. Druhým nejcitlivějším organismem je stejně jako v případě musk xylenu *Brachionus calicyflorus*, po něm následuje *Artemia salina*. I v tomto případě je nejméně citlivým organismem *Thamnocephalus platyurus*.

Tabulka 6.4: Průměrné hodnoty inhibice DMSO (hodnoty uvedeny v %)

Test/testovaný organismus	galaxolid	tonalid	musk keton	musk xylen
Daphtoxkit	1,67	1,67	1,67	1,67
Thamnotoxkit	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>Aetmia salina</i>	1,00	1,00	2,00	3,00
Rotoxkit	8,50	8,50	8,50	8,50
<i>Sinapis alba</i>	3,46	3,46	2,53	2,53
<i>Lactuca sativa</i>	2,88	2,88	2,88	2,88
<i>Allium cepa</i>	3,36	3,36	3,36	3,36
<i>Lemna minor</i>	7,17	6,50	6,50	7,33

V tabulce 6.4 jsou uvedeny průměrné hodnoty inhibice, kterou vykazoval dimethylsulfoxid, který byl použit v rámci práce jako rozpouštědlo. Z tabulky je patrné, že DMSO neměl výrazný vliv na výslednou hodnotu ekotoxicity. Nejvyšší zjištěná hodnota činí 8,5 % v případě ovlivnění testu Rotoxkit FTM, který byl proveden s drobnými vířníky *Brachionus calicyflorus*.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo posouzení ekotoxicity syntetických vonných látek, dvou látek ze skupiny polycyklických musk sloučenin – galaxolidu a tonalidu, a dvou látek ze skupiny nitromusk sloučenin – musk xylenu a musk ketonu.

V teoretické části byla zpracována rešerše o syntetických vonných látkách a o možnosti jejich ekotoxikologického hodnocení. Byly zde zhodnoceny vlastnosti syntetických vonných látek, jejich chování v životním prostředí a toxicita. Součástí rešerše jsou také testy ekotoxicity, které byly pro testování syntetických musk sloučenin použity. V poslední kapitole teoretické části jsou uvedeny možnosti vyhodnocování testů ekotoxicity.

K ekotoxikologickému hodnocení vybraných syntetických vonných látek byly využity čtyři alternativní testy ekotoxicity s živými organismy a čtyři testy fytotoxicity. Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou. Rovněž byly provedeny referenční testy za účelem prověření správnosti testů a citlivosti testovaných organismů. Jako standard pro kontrolu kvality byl použit dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$, v případě okřešku menšího *Lemna minor* byl jako standard použit dichroman draselný KCl. Všechny stanovené hodnoty EC50, IC50, LC50 u použitých testů ekotoxicity byly ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

V rámci alternativních testů ekotoxicity s akvatickými organismy byly pro diplomovou práci použity Daphtoxkit FTM s organismem *Daphnia magna*, Thamnotoxkit FTM s organismem *Thamnocephalus platyurus*, Rotoxkit FTM s vířníkem *Brachionus calicyflorus* a akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*. Z testů fytotoxicity byly použity testy inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba*, test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*, test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* a test inhibice růstu okřešku *Lemna minor*.

Porovnáním citlivosti použitých alternativních testů s živými organismy lze konstatovat, že nejcitlivějším testem byl test na organismu *Daphnia magna*, nejméně potom *Thamnocephalus platyurus*.

Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* se projevil jako nejvíce stabilní, v rámci všech testů nevykazoval tak velké výkyvy v citlivosti jaké byly například u testu Thamnotoxkit FTM prováděným s koryšem *Thamnocephalus platyurus*.

Porovnáním testů fytotoxicity jsme došli k závěru, že nejvíce citlivou rostlinou je hořčice *Sinapis alba*, nejméně citlivý je salát *Lactuca sativa*, který je také nejméně citlivý v rámci všech provedených testů.

Na základě porovnání testů ekotoxicity skupin polycyklických a nitromusk sloučenin lze učinit závěr, že větší nebezpečí pro životní prostředí představuje skupina polycyklických syntetických vonných látek.

Ve skupině polycyklických musk sloučenin je jednoznačně toxičtější galaxolid, který se ukázal být také jako nejvíce toxickou musk sloučeninou v rámci všech testovaných.

Při porovnání jednotlivých nitromusk sloučenin můžeme konstatovat, že v oblasti ekotoxicity jsou si obě látky – musk xylen a musk keton téměř rovny, přičemž musk keton je jen nepatrně toxičtější než musk xylen.

Nejnižší hodnoty, které byly pro musk sloučeniny zjištěny pomocí testu Daphtoxkit FTM za použití organismu *Daphnia magna* jsou následující:

- pro galaxolid $1,12 \pm 0,014$ mg/l;
- pro tonalid $1,33 \pm 0,019$ mg/l;
- pro musk keton $2,13 \pm 0,02$ mg/l a
- pro musk xylen $2,22 \pm 0,05$ mg/l.

Přítomnost testovaných musk sloučenin v biotických i abiotických vzorcích již před lety nastartovala diskusi na téma používání těchto látek v kosmetických i nekosmetických přípravcích. Hodnoty ekotoxicity zjištěné pro sledované syntetické vonné látky jsou dost nízké, lze tedy na základě zjištěných výsledků konstatovat, že všechny tyto sloučeniny mohou představovat nebezpečí pro životní prostředí.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Rimkus, G.G.: *The Handbook of Environmental Chemistry – Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Birkhäuser. 2004. 338 p.
- [2] Červený, L.: Syntetické vonné a chuťové látky. *Chem. Listy*. 1999, roč. 93, s. 412 - 420
- [3] Osemwenge, L. I., Gerstenberger, S. L.: *Levels of synthetic musk compounds in municipal wastewater for potential estimation of biota exposure in receiving water*. The Royal Society of Chemistry. 2004, vol. 6, p. 533-539
- [4] Aschmann, S. M., Arey, J., Atkinson, R., Simonich, S. L.: Atmospheric Lifetimes and Fates of Selected Frangrance Materials and Volatile Model Compounds. *Environmental Science & Technology*. 2001, vol. 35, is. 18
- [5] Mogensen, B. B., Pritzl, G., Rastogi, S., Glesne, O., Hedlund, B., Hirvi, J., Lundgren, A., Sigurdsson, A.: *Musk Compounds in the Nordic Environment*. Nordic Council of Ministers. Copenhagen, 2004
- [6] Behechti, A., et al. Acute aquatic toxicities of four musk xylene derivatives on *Daphnia magna*. *Water Research*. 1998, vol. 32, is. 5, p. 1704-1707
- [7] Institute for Health and Consumer Protection European Chemicals Bureau, Musk xylene – Summary Risk Assessment Report [cit. 12. 10. 2008]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/index_en.htm>
- [8] Český hydrometeorologický ústav, úsek hydrologie dostupné z: <<http://voda.chmi.cz/ojv2/htm/pasporty/moschus/Galaxolide.htm>> [cit. 20. 11. 2008]
- [9] Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products, Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers concerning Musk Xylene and Musk Ketone [cit. 30. 11. 2008]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out280_en.pdf>
- [10] Bláhová, E.: *Stanovení vybraných MUSK sloučenin v biotických vzorcích*. Diplomová práce, VUT v Brně, Brno. 2008. 73 s
- [11] Balk, F., Ford, R.A.: Environmental risk assessment for the polycyclic musk AHTN and HHCB in EU, I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, is. 1-2, p. 57-59
- [12] Rimkus, G. G., Gatermann, R., Hühnerfuss, H.: Musk xylene and musk ketone aminometabolites in the aquatic environment. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, p. 5-15
- [13] Český hydrometeorologický ústav, úsek hydrologie dostupné z: <<http://voda.chmi.cz/ojv2/htm/pasporty/moschus/Tonalide.htm>> [cit. 20. 11. 2008]
- [14] Scientific Committee on Toxicity and the Environment (CSTEE), Opinion on the Result of the Risk Assessment of Musk Ketone – Environmental Part, 41ST plenary meeting of 8 January 2004 [cit. 30. 11. 2008]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sct/documents/out215_en.pdf>
- [15] Helbling, K. S., Schmid, P., Schlatter, C.: The trace analysis of musk xylene in biological samples problems associated with its ubiquitous occurrence. *Chemosphere*. 1994, vol. 29, is. 3, p. 477-487

- [16] Gatermann, R. et. al.: Occurrence of musk xylene and musk ketone metabolites in the aquatic environment. *Chemosphere*. 1998, vol. 36, is. 11, p. 2535-2547
- [17] Hajslová, J., Gregor, P., Chládková, V., Alterová, K.: Musk compounds in fish from Elbe river. *Organohalogen Compd.* 1998, vol 39, p. 253-256
- [18] Rikmus, G. G., Butte, W., Geyer, H. J.: Critical concentrations on the analysis and bioaccumulation of musk xylene and other synthetic nitro musk in fish. *Chemosphere*. 1997, vol. 35, is. 7, p. 1497-1507
- [19] Dietrich, D. R., Hitzfeld, B. C.: *The Handbook of Environmental Chemistry - Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment*. Berlin: Springer-Verlag. 2004, p. 234-242
- [20] Kuklenyik, Z., et al.: SPE/SPME-GC/MS approach for measuring musk compounds in serum and breast milk. *Journal of Chromatography B*. 2007, vol. 858, is. 1-2, p. 144-183
- [21] Gatermann, R., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Rimkus, G. C., Hecker, M., Karbe, L.: AHTN, AHDI and ATII in Freshwater Fish. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2002, vol 42, p. 437-446
- [22] Chou, Y. J., Dietrich, D. R.: Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Toxicol Lett*. 1999, vol. 111, p. 27-36
- [23] Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S., Kaneko, S.: Identification of musk xylene and musk ketone in freshwater fish collected from the Tama River. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1981, vol. 26, p. 656-662
- [24] Fromme, H., Otto, T., Pilz, K.: (2001). Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Research*. 2001, vol. 35, p. 121-128
- [25] Tas, W., Balk, F., Ford, R. A., van de Plassche, E. J.: Synthetic Musk Fragrances in Lake Michigan. *Chemosphere*. 1997, vol. 35, p. 2973-3002.
- [26] Balk, F., Ford, R. A.: Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB - II. Effect assessment and risk characterisation. *Chemosphere*. 1999, vol 111, p. 81-94
- [27] Behecti, A, Schramm, K. W., Attar, A., Niederfellner, J., Kettrup, A.: Synthetic Musk Toxicity to Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research*. 1998, vol. 32, p. 1704-1707
- [28] Giddings, J. M., Salvito, D., Putt, A. E.: Acute toxicity of 4-amino musk xylene to *Daphnia magna* in laboratory and natural water. *Water Research*. 2000, vol 34, p. 3686-3689
- [29] Schramm, K. W., Kaune, A., Beck, B., Thumm W., Behecti A., Kettrup A., Nikolova P.: Acute toxicities of five nitromusk compounds in *Daphnia*, algae and photoluminescent bacteria. *Water research*. 1996, vol. 30, p. 2247-2250
- [30] McCarty, L. S., Mackay, D., Smith, A. D., Ozburn, G. W., Dixon, D. G.: Toxicokinetic modeling of mixtures of organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 1992, vol. 11, p. 1037-1047

- [31] Gardner, G. R., Yewich, P. P., Harshbarger, J. C., Malcolm, A. R.: Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment. *Environ Health Perspectives*. 1991, vol. 90, p. 53
- [32] Prietz, A., Fleischhauer, V., Hitzfeld, B., C., Dietrich, D. R.: *Poster*. 10th Annual Meeting of SETAC Europe. 2000
- [33] Biselli, S., Gatermann, R., Kallenborn, R., Rimkus, G. C., Hühnerfuss, H.: *Poster*. 10th Annual Meeting of SETAC Europe. 2000
- [34] Gatermann, R., Rimkus, G. C., Hecker, M., Biselli, S., Hühnerfuss, H.: *Poster*. 9th Annual Meeting of SETAC Europe. 2000[19] Gatermann, R., Hellou, J., Hühnerfuss, H., Rimkus, G. C., Zitko, V.: Polycyclic and nitro musk in the environment: A comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere*. 1999, vol38, p. 3431-3441
- [35] Kočí, V.: Význam testů toxicity pro hodnocení látek na životní prostředí. *Chem. listy*. 2006, is. 100, p. 882-888
- [36] Úplné znění zákona č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 186/2004 Sb., zákonem č. 125/2005 Sb., zákonem č. 345/2005 Sb. a zákonem č. 222/2006 Sb.
- [37] Doležalová Weissmannová, H, Zlámalová Gargošová, H.: Ecotoxicological testing and test methods of chemicals. *Chem. Listy*. 2008, is. 99, p. 1234 – 2345
- [38] Kočí, V., Rakovický, T., Švagr, A.: *Testy akutní a semichromatické toxicity*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2001.
- [39] Pavlíková, D., Pavlík, M., Matějů, L., Balík, J.: *Ekotoxikologie*. 1. Vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrochemie, potravinových a přírodních zdrojů. 2006. 152 s..
- [40] Daphtoxkit FTM – Standard operation procedure, 1. vyd. 2004. 25 p.
- [41] Daphtoxkit F [cit. 20. 11. 2008]. Dostupné z:
<www.jysco.com/product/item.php?it_id=1213591627> [cit. 2. 12. 2008]
- [42] Maršálek, B.: *Mikrobiotesty – druhá generace ekotoxikologických testů* [cit. 2. 11. 2008] Dostupné z:
http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf
- [43] Daphnia magna, water fleas [cit. 20. 10. 2008]. Dostupné z:
<www.daphnia.webplatez.com>
- [44] Thamnotoxkit FTM – Standard operation procedure. 1. vyd. 2004. 27 p.
- [45] Thamnocephalus platyurus [cit. 2. 12. 2008] Dostupné z:
<<http://nabf.iturnrocks.com/index/viewtopic.php?f=1&t=13>>
- [46] Kočí, V., Rakovický, T., Švagr, A.: *Test akutní toxicity na žábřonozkách* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2008
- [47] Artemia salina [cit. 4. 12. 2008] Dostupné z:
<http://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=11081>

- [48] Rotoxkit FTM [cit. 12. 3. 2009]. Dostupné z: <http://www.biohidrica.cl/assay_rotokitf.htm>
- [49] Rotoxkit F – Standard operation procedure
- [50] *Brachionus calicyflorus* [cit. 13. 3. 2009]. Dostupné z: <<http://biology.mcgill.ca/faculty/fussmann/slideShow/brachionusHavanaensis.jpg>>
- [51] Fiskejsó, G.: Technical methods section – Allium test I: 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. 1993, vol. 8, p. 461-470.
- [52] *Allium cepa* [cit. 20. 10. 2008]. Dostupné z: <<http://www.trikyatipy.sk/trikyatipy/index.php/Bylinaichvyuzitie/Cesnakcibulovycibula>>
- [53] Ambrožová, J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT v Praze, 2003. 226 s.
- [54] Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J.: *Ekotoxikologie – Praktická cvičení část I*. 1. vyd. Brno: Veterinární a Farmaceutická univerzita v Brně, 2000. 72 s.
- [55] *Allium cepa* [28. 10. 2008]. Dostupné z: <www.progast.cz/druhy-koreni/?alpha=6>
- [56] Filipi, R., Nesměrák, K., Rucki, M., Roth, Z., Hanzlíková, I., Tichý, M.: Akutní toxicita prvků vzácných zemin a jejich sloučenin. *Chem. Listy*. 2007, vol. 101, s. 793–798
- [57] Fish Channel [cit. 1. 11. 2008]. Dostupné z: <<http://www.fishchannel.com/freshwater-aquariums/fish-food/feeding-fish.aspx>>
- [58] ŠVAGR, A., JIRKŮ, J.: SOP 15 – Test toxicity při semichronické expozici vůči okřehku menšímu *Lemna minor*. 2003. VŠCHT Praha.
- [59] Norma ČSN EN ISO 20079 (2001) Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) - Zkouška inhibice růstu okřehku
- [60] *Lemna minor* [cit 10. 2. 2009]. Dostupné z: <<http://www.akvaryumdoktoru.com/akvaryum/files/images/lemna-minor-2.jpg>>
- [61] Pack, S.: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Annex 10 - A Review of Statistical Data Analysis and Experimental Design in OECD Aquatic Toxicology Test Guidelines. 1993.
- [62] Pack, S: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Annex 6 – A Discussion of the NOEC/ANOVA Approach to Data Analysis. 1998.
- [63] Chapman, P.: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Annex 7 – Alternatives to the NOEC Based on Regression Analysis. 1998.
- [64] Koojiman, S. A. L. M., Bedaux, J. J. M.: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Annex 8 – Dynamic measures for ecotoxicity. 1996.
- [65] Koojiman, S. A. L. M.: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Annex 9 – The Dynamic Energy Budget (DEB) model. 1996.
- [66] Maršálek, B., Nagyová, V., Malá, J.: Možnosti předúpravy vzorků pro ekotoxikologické biotity: příklad ekotoxicky cyanotoxinů [cit. 20. 4. 2009]. Dostupné z:

<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/PredupravaVzorkuEB2.pdf>

[67] Rotoxkit FTM. BioHydrlica [cit. 14. 3. 2009]. Dostupné z
<http://www.biohidrica.cl/assay_rotokitf.htm>

[68] MicroBioTests Inc. [cit. 13. 3. 2009]. Dostupné z: <<http://www.microbiotests.be/>>

[69] Thamnotoxkit F, Freshwater toxicity screening test [cit. 2. 12. 2008]. Dostupné z:
<http://www.biohidrica.cl/pdfs/thamnotoxkit_f-proto.pdf>

[70] Tubifex tubifex [cit. 15. 12. 2008]. Dostupné z: <www.flickr.com/photos/rhfishtank/>
[cit. 2. 12. 2008]

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AHDI	6 - acetyl - 1,1,2,3,3,5 - hexymethyldihydroinden
AHTN	1-(5,6,7,8-tetryhydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethynone
ANOVA	Analysis of variance
ASTM	American Society For Testing And Materials (Americká společnost pro testování a materiály)
BCF	Bioconcentration factor (faktor biokoncentrace)
BC	Benchmark concentration (testovací koncentrace)
BAF	Bioavailable factor (faktor biodostupnosti)
CAS	Chemical Abstracts Service
ČOV	Čistírna odpadních vod
DMSO	dimethylsulfoxid
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(p-chlorofenyl)ethan-1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan-1,1'-(2,2,2-trichlorethyliden)bis(4-chlorbenzen)
EC10	koncentrace látky, která vyvolá 10 % úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu
EC50	koncentrace látky, která vyvolá 50 % úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu
EC90	koncentrace látky, která vyvolá 90 % úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu
EINECS	European Inventory of Existing Chemical Substances
GC	plynová chromatografie
HHCB	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyrane
IC50	koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50 % inhibici růstu kořene <i>Sinapis alba</i> ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
IFRA	International Fragrance Association
ISO	International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci

IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry
LC50	koncentrace látky, která vyvolá 10 % letalitu testovaného organismu
NEC	No-effect concentrations
NOEC	No-observable-effect concentrations
OC0	orientační koncentrace (nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci jedinců)
OC100	orientační koncentrace (nejnižší koncentrace, která působí letálně)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PCB	polychlorované bifenyly
POP's	perzistentní organické polutanty
SCCNPF	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products – Výbor pro kosmetiku a nepotravinové produkty
USD	americký dolar
24h EC50	koncentrace, která způsobí úhyn či imobilizaci 50 % testovaných organismů <i>Daphnia magna</i> v časovém úseku 24 ± 2 hodin
48h EC50	koncentrace, která způsobí úhyn či imobilizaci 50 % testovaných organismů <i>Daphnia magna</i> v časovém úseku 48 ± 2 hodin
72h IC50	koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene hořčice bílé oproti kontrole v časovém úseku 72 ± 2 hodin

10. SEZNAM PŘÍLOH

- P1 Dichroman draselný – dílčí výsledky
- P2 Chlorid draselný – dílčí výsledky
- P3 Galaxolid – dílčí výsledky
- P4 Tonalid – dílčí výsledky
- P5 Musk keton – dílčí výsledky
- P6 Musk xylen – dílčí výsledky
- P7 Tabulka hodnot pro probitovou analýzu

P1. DICHROMAN DRASELNÝ – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P1.1: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba*

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Inhibice růstu kořenů [%]
0	47,2	
5	16,77	64
10	20,37	57
30	23,04	51
60	28,28	40
80	33,9	28
160	35,78	24

Tabulka P1.2: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa*

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Inhibice růstu kořenů [%]
0	32,1	
5	25,4	21
10	21,5	33
30	15,03	53
60	10,55	67
80	28,09	12
160	8,83	72

Tabulka P1.3: Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Inhibice růstu kořenů [%]
0	44,67	
0,01	37,83	15
0,1	27,67	38
1	19,42	57
10	8,75	80
100	2,75	94

Tabulka P1.4: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30	0	0
10	28/30	13/30	7	57
18	20/30	10/30	33	67
32	15/30	4/30	50	87
56	10/30	0/30	67	100
100	0/30	0/30	100	100

Tabulka P1.5: Daphtoxkit FTM

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20	0	0
0,32	20/20	20/20	0	0
0,56	17/20	12/20	30	40
1,0	9/20	8/20	55	60
1,8	6/20	4/20	70	80
3,2	0/20	0/20	100	100

Tabulka P1.6: Thamnotoxkit FTM

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0,032	27/30	10
0,056	21/30	30
0,1	16/30	47
0,18	9/30	70
0,32	0/30	100

Tabulka P1.7: Rotoxkit FTM

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
3,2	29/30	3
5,6	22/30	27
10	15/30	50
18	6/30	80
32	0/30	100

P2. CHLORID DRASELNÝ – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P1.1: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	134,5	
5	120	11
10	88	35
20	60,5	55
30	29,5	78
40	10	93
50	0	100

Tabulka P2.2: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,232749	
5	0,224088	4
10	0,218008	6
20	0,194425	16
30	0,105991	54
40	0,048067	79
50	0	100

Tabulka P2.3: *Lemna minor* – porovnání hmotností konečné biomasy

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0063	
5	0,0053	16
10	0,0039	38
20	0,0032	49
30	0,0031	51
40	0,0019	70
50	0,0003	95

P3. GALAXOLID – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P3.1: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,77			
0+5% DMSO	40,7	40,7	0,5000	2,55
10	21,3	20,4	0,7333	51

Tabulka P3.2: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	39,03			
0+5% DMSO	38,15	38,13	0,0965	2,26
3	20,13	20,13	0,6000	48
6	17,9	17,90	1,8300	54
9	15,77	15,77	0,0000	60
11	12,57	12,55	0,3500	68
13	7,08	7,08	0,0500	82
15	5,28	5,29	0,6850	86

Tabulka P3.3: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	49,67			
0+5% DMSO	46,9	46,90	0,6700	5,57
3,7	26,18	26,19	0,0150	47
3,9	25,33	25,34	0,6350	49
4,1	24,88	24,94	0,5650	50
4,3	22,95	22,95	0,0200	54
4,5	22,42	22,42	0,2150	55
4,7	19,97	19,965	1,4350	60

Tabulka P3.4: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	7,9			
0+5% DMSO	7,78	7,78	0,2833	1,48
10	3,67	3,67	0,1000	54

Tabulka P3.5: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	10,6			
0+5% DMSO	10,02	10,02	0,2850	5,5
3	7,77	7,77	0,3000	27
6	6,68	6,68	0,3500	37
9	3,93	3,93	0,9000	63
11	3,55	3,55	0,1500	67
13	2,42	2,42	0,8150	77
15	1,12	1,10	0,1000	89

Tabulka P3.6: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	14,13			
0+5% DMSO	13,63	13,64	0,2650	3,54
5,9	8,15	8,15	0,4200	42
6,1	7,40	7,40	0,0700	48
6,3	7,02	7,02	0,1850	50
6,5	6,72	6,72	0,4850	52
6,7	6,43	6,43	0,5000	54
6,9	6,33	6,33	0,5000	55

Tabulka P3.7: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	42,33			
0+5% DMSO	40,75	40,75	0,4167	2,43
15	24	18,33	0,3333	58

Tabulka P3.8: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,8			
0+5% DMSO	40,67	40,67	1,6650	2,79
3	23,58	23,59	0,0850	44
6	21,67	21,67	0,1650	51
9	20,33	20,33	0,0000	54
11	19,17	19,17	0,0000	55
13	10,08	10,09	0,4150	76
15	9,08	9,35	0,6500	78

Tabulka P3.9: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,17			
0+5% DMSO	39,17	39,17	0,1650	4,86
4,7	21,25	22,34	0,6650	48
4,9	21,00	21,25	0,0800	49
5,1	20,67	20,25	0,5800	50
5,3	19,67	19,67	1,0000	52
5,5	19,25	18,34	1,1650	53
5,7	18,00	18,00	1,1700	56

Tabulka P3.10: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5 % DMSO	30/30	30/30	0	0
10	1/30	100	97	100

Tabulka P3.11: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
2	18/30	15/30	40	50
4	15/30	12/30	50	60
6	12/30	8/30	60	73
8	10/30	5/30	67	83
10	8/30	0/30	73	100

Tabulka P3.12: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	30/30	30/30	0	0
1,7	22/30	16/30	27	47
1,9	18/30	15/30	40	50
2,1	16/30	14/30	47	53
2,3	15/30	13/30	50	57
2,5	13/30	11/30	57	63

Tabulka P3.13: Daphtoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20		19/20	
0+5% DMSO	20/20	0	20/20	0
5	5/20	75	0/20	100

Tabulka P3.14: Daphtoxkit FTM předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	19/20	0	5
1	17/20	10/20	15	50
2	15/20	8/20	25	60
3	10/20	6/20	50	70
4	8/20	0/20	60	100
5	5/20	0/20	75	100

Tabulka P3.15: Daphtoxkit FTM základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
0,9	15/20	13/20	25	35
1,0	13/20	12/20	35	40
1,1	12/20	10/20	40	50
1,2	10/20	9/20	50	55
1,3	9/20	8/20	55	60

Tabulka P3.16: Thamnotoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0 + 5% DMSO	29/30	3
5	0/30	100

Tabulka P3.17: Thamnotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0+5% DMSO	30/30	0
1	17/30	43
2	13/30	57
3	3/30	90
4	0/30	100
5	0/30	100

Tabulka P3.18: Thamnotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0+5% DMSO	30/30	0
1,1	16/30	47
1,2	16/30	47
1,3	14/30	53
1,4	13/30	57
1,5	10/30	67

Tabulka P3.19: Rotokit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
0+5% DMSO	27/30	10
2	14/30	53
4	12/30	60
6	6/30	80
8	4/30	87
10	0/30	100

Tabulka P3.20: Rotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	29/30	
0+5% DMSO	28/30	7
1	19/30	37
1,5	17/30	43
2	15/30	50
2,5	14/30	53
3	11/30	63

Tabulka P3.21: *Lemna minor* předběžný test – porovnání ploch pod růstovými křivkami předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	134,5	
0+5% DMSO	103	23
1	125	7
3	105	22
5	59,5	56
10	25	81
15	17,5	87
20	0	100

Tabulka P3.22: *Lemna minor* – porovnání rychlosti růstu předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,232749	
0+5% DMSO	0,228484	2
1	0,211658	9
3	0,205012	12
5	0,147088	37
10	0,091693	61
15	0,042872	82
20	0	100

Tabulka P3.23: *Lemna minor* – porovnání hmotnosti konečné biomasy předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0072	
0+5% DMSO	0,0069	4
1	0,0044	39
3	0,00375	48
5	0,0034	53
10	0,00305	58
15	0,00275	62
20	0,00215	70

Tabulka P3.24: *Lemna minor* předběžný test – porovnání ploch pod růstovými křivkami základní test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	162	
0+5% DMSO	146	10
3,5	127,5	21
4,0	92,5	43
4,5	78	52
5,0	64	60
5,5	57,5	65
6,0	47,5	71

Tabulka P3.25: *Lemna minor* – porovnání rychlosti růstu základní test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,248638	
0+5% DMSO	0,240914	3
3,5	0,20157	19
4,0	0,174825	30
4,5	0,147088	41
5,0	0,125067	50
5,5	0,118987	52
6,0	0,112637	55

Tabulka P3.26: *Lemna minor* – porovnání hmotnosti konečné biomasy základní test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0073	
0+5% DMSO	0,0072	1
3,5	0,00395	46
4,0	0,0036	51
4,5	0,00345	53
5,0	0,00295	60
5,5	0,00275	62
6,0	0,00235	68

P4. TONALID – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P4.1: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,77			
0+5% DMSO	40,7	40,7	0,5000	2,55
10	19,98	19,98	11,9500	51

Tabulka P4.2: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	39,03			
0+5% DMSO	38,15	38,15	0,0815	2,26
3	20,97	20,97	0,2335	46
6	19,27	19,27	1,4665	51
9	17,38	17,38	1,3165	55
11	12,42	12,42	0,1150	68
13	9,78	9,79	0,8150	75
15	3,83	3,84	0,3650	90

Tabulka P4.3: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	49,67			
0+5% DMSO	46,9	46,90	0,6700	5,57
4,2	27,6	27,60	0,3300	44
4,4	25,22	25,22	1,9150	49
4,6	23,67	23,67	0,6350	52
4,8	22,82	22,82	0,6150	54
5,0	21,27	21,16	0,0900	57
5,2	20,73	20,73	2,9350	58

Tabulka P4.4: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	7,9			
0+5% DMSO	7,78	7,78	0,2833	1,48
10	3,7	3,7	0,3000	53

Tabulka P4.5: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	10,60			
0+5% DMSO	10,02	10,02	0,2850	5,5
3	9,12	9,12	0,3850	14
6	7,38	7,39	0,1150	30
9	6,18	6,19	0,4850	42
11	2,93	2,94	0,3650	72
13	1,33	1,34	0,3650	87
15	0,80	0,80	0,0000	92

Tabulka P4.6: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	14,13			
0+5% DMSO	13,63	13,64	0,2650	3,54
6,9	7,97	7,97	0,0650	44
7,1	7,50	7,50	0,5700	47
7,3	7,00	7,00	0,4000	50
7,5	6,97	6,97	0,0650	51
7,7	6,38	6,38	1,2200	55
7,9	6,02	6,02	0,4500	57

Tabulka P4.7: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	42,33			
0+5% DMSO	40,75	40,75	0,4167	2,4
10	18,75	18,75	4,2500	57

Tabulka P4.8: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,83			
0+5% DMSO	40,67	40,67	1,6650	2,79
3	28,50	28,50	0,5000	21
6	21,67	21,67	1,3350	23
9	19,84	19,84	0,1650	52
11	9,00	9,00	0,6700	57
13	7,00	7,00	2,0000	67
15	2,00	2,00	0,3300	95

Tabulka P4.9: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,17			
0+5% DMSO	39,17	39,17	0,1650	4,86
7,4	22,25	22,25	0,0800	46
7,6	21,42	21,42	1,5850	48
7,8	20,25	20,25	0,9200	51
8,0	19,25	19,25	1,2500	53
8,2	18,50	18,50	1,3300	55
8,4	18,25	18,25	1,0800	56

Tabulka P4.10: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	30/30	30/30	0	0
10	3/30	0/30	90	100

Tabulka P4.11: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
2	30/30	25/30	0	17
4	20/30	18/30	33	40
6	12/30	10/30	60	67
8	8/30	5/30	73	83
10	5/30	1/30	83	97

Tabulka P4.12: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	30/30	30/30	0	0
2,0	21/30	17/30	30	43
2,2	17/30	16/30	43	47
2,4	16/30	14/30	47	53
2,6	13/30	11/30	57	63
2,8	11/30	8/30	63	73

Tabulka P4.13: Daphtoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	19/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
5	0/20	0/20	100	100

Tabulka P4.14: Daphtoxkit FTM předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	19/20	0	5
1	18/20	12/20	10	40
2	12/20	8/20	40	60
3	10/20	2/20	50	90
4	4/20	0/20	80	100
5	0/20	0/5	100	100

Tabulka P4.15: Daphtoxkit FTM základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
1,1	18/20	14/20	10	30
1,2	17/20	12/20	15	40
1,3	15/20	10/20	25	50
1,4	12/20	9/20	40	55
1,5	10/20	8/20	50	60

Tabulka P4.16: Thamnotoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0 + 5 % DMSO	29/30	3
5	0/30	100

Tabulka P4.17: Thamnotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0+5% DMSO	30/30	0
1	25/30	17
2	17/30	43
3	13/30	57
4	0/30	100
5	0/30	100

Tabulka P4.18: Thamnotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
0+5% DMSO	30/30	0
4	20/30	33
5	19/30	37
6	16/30	47
7	14/30	53
8	10/30	67

Tabulka P4.19: Rotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30	
0+5% DMSO	27	10
2	19	37
4	15	50
6	14	53
8	10	67
10	0	100

Tabulka P4.20: Rotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	29/30	
0+5% DMSO	28/30	7
3	20/30	33
3,5	18/30	40
4	17/30	43
4,5	14/30	53
5	11/30	63

Tabulka P4.21: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	134,5	
0+5% DMSO	102,75	23
1	71,5	47
3	55	59
5	40,5	70
10	34,75	74
15	18,25	86
20	0	100

Tabulka P4.22: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,232749	
0+5% DMSO	0,228484	2
1	0,190714	18
3	0,17056	27
5	0,130899	44
10	0,115847	50
15	0,087884	62
20	0	100

Tabulka P4.23: *Lemna minor* – porovnání hmotností konečné biomasy předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,006	
0+5% DMSO	0,0062	-
1	0,0039	35
3	0,00355	41
5	0,00345	42
10	0,0027	55
15	0,00205	66
20	0,0017	72

Tabulka P4.24: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami základní test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	162	
0+5% DMSO	146	10
4,0	104,5	35
4,5	76,5	53
5,0	62	62
5,5	55,5	66
6,0	38,5	76
6,5	21	87

Tabulka P4.25: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí základní test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,248638	
0+5% DMSO	0,240914	3
4,0	0,208374	16
4,5	0,178966	28
5,0	0,156945	37
5,5	0,141893	43
6,0	0,118987	52
6,5	0,112637	55

Tabulka P4.26: *Lemna minor* – porovnání hmotností konečné biomasy základní test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0073	
0+5% DMSO	0,0072	1
4,0	0,00385	47
4,5	0,0035	52
5,0	0,0032	56
5,5	0,003	59
6,0	0,00275	62
6,5	0,0025	66

P5. MUSK KETON – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P5.1: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,77			
0+5% DMSO	40,7	40,7	0,5000	2,56
10	20,72	20,72	2,2167	50

Tabulka P5.2: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	39,03			
0+5% DMSO	38,15	38,15	0,0815	2,26
3	25,97	25,97	0,7000	33
6	20,13	20,13	0,6000	48
9	16,03	16,04	0,0350	59
11	12,57	12,57	0,3650	68
13	7,17	7,17	0,0350	82
15	5,33	5,34	0,6350	86

Tabulka P5.3: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	51,33			
0+5% DMSO	49,92	49,92	2,1165	2,76
4,5	27,16	27,13	1,0985	47
5,0	25,43	25,43	1,9000	50
5,5	24,02	24,02	0,7850	53
6,0	22,38	22,38	1,4500	56
6,5	21,47	21,47	1,5350	58
7,0	20,08	20,08	0,1150	61

Tabulka P5.4: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	7,9			
0+5% DMSO	7,78	7,78	0,2833	1,48
10	3,85	3,85	0,0500	51

Tabulka P5.5: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	10,6			
0+5% DMSO	10,02	10,02	0,2850	5,5
3	8,22	8,22	0,1500	22
6	6,20	6,20	0,3000	42
9	5,13	5,14	0,1350	52
11	4,73	4,73	0,3015	55
13	3,92	3,92	0,6150	63
15	1,90	1,90	0,0300	82

Tabulka P5.6: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	11,067			
0+5% DMSO	10,89	10,89	0,3850	1,66
7,0	5,89	5,89	0,4850	48
7,2	5,55	5,55	0,2200	53
7,4	5,25	5,25	0,0500	55
7,6	5,12	5,12	0,1150	56
7,8	4,97	4,97	0,2000	59
8,0	4,87	4,87	1,5000	60

Tabulka P5.7: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	42,33			
0+5% DMSO	40,75	40,75	0,4167	2,43
10	18,25	18,25	0,2500	58

Tabulka P5.8: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,80			
0+5% DMSO	40,67	40,67	1,6650	2,79
3	31,00	31,00	0,3300	26
6	25,50	25,50	0,1700	39
9	16,83	16,84	0,6650	60
11	15,00	15,00	0,5000	64
13	8,83	8,80	0,8000	79
15	4,25	4,24	1,0650	90

Tabulka P5.9: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,17			
0+5% DMSO	39,17	39,17	0,1650	4,86
6	23,08	23,09	1,9150	44
6,2	21,83	21,84	0,3350	47
6,4	20,92	20,92	0,7500	49
6,6	19,67	19,67	0,5000	52
6,8	18,75	18,75	0,0800	54
7,0	17,75	17,75	1,7500	57

Tabulka P5.10: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	30/30	30/30	0	0
10	5/30	0/30	83	100

Tabulka P5.11: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
2	30/30	26/30	0	13
4	29/30	20/30	3	33
6	15/30	14/30	50	53
8	12/30	7/30	60	77
10	11/30	3/30	63	90

Tabulka P5.12: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
4,7	18/30	16/30	40	47
4,8	17/30	14/30	43	53
4,9	15/30	12/30	50	60
5,0	14/30	11/30	53	63
5,1	13/30	10/30	57	67

Tabulka P5.13: Daphtoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	19/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
5	5/20	0/20	75	100

Tabulka P5.14: Daphtoxkit FTM předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	19/20	0	5
1	20/20	15/20	0	25
2	16/20	12/20	20	40
3	14/20	10/20	30	50
4	10/20	5/20	50	75
5	6/20	0/20	70	100

Tabulka P5.15: Daphtoxkit FTM základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
2,0	14/20	12/20	30	40
2,1	14/20	10/20	30	50
2,2	12/20	9/20	40	55
2,3	10/20	8/20	50	60
2,4	9/20	7/20	55	65

Tabulka P5.16: Thamnotoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0 + 5 % DMSO	29/30	3
5	0/30	100

Tabulka P5.17: Thamnotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0+5% DMSO	30/30	0
1	28/30	7
2	20/30	33
3	12/30	60
4	0/30	100
5	0/30	100

Tabulka P5.18: Thamnotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0+5% DMSO	30/30	0
4	20/30	33
5	17/30	43
6	15/30	50
7	14/30	53
8	12/30	60

Tabulka P5.19: Rotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
0+5% DMSO	27/30	10
2	19/30	37
4	17/30	43
6	15/30	50
8	6/30	80
10	0/30	100

Tabulka P5.20: Rotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	29/30	
0+5% DMSO	28/30	7
3	17/30	43
3,5	16/30	47
4	15/30	50
4,5	14/30	53
5	12/30	60

Tabulka P5.21: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	134,5	
0+5% DMSO	103,75	23
1	96,5	28
3	79,75	41
5	61,75	54
10	31	77
15	10,25	92
20	0	100

Tabulka P5.22: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,232749	
0+5% DMSO	0,228484	2
1	0,214868	8
3	0,196245	16
5	0,163915	30
10	0,091693	61
15	0,042872	82
20	0	100

Tabulka P5.23: *Lemna minor* – porovnání hmotností koneční biomasy předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0048	
0+5% DMSO	0,0048	0
1	0,0043	10
3	0,00345	28
5	0,00295	39
10	0,0017	65
15	0,0017	65
20	0,00125	74

Tabulka P5.24: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami základní test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	162	
0+5% DMSO	146	10
4,5	96,5	40
5,0	80	51
5,5	65,5	60
6,0	52,5	68
6,5	45,5	72
7,0	33,75	79

Tabulka P5.25: : *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí základní test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,248638	
0+5% DMSO	0,240914	3
4,5	0,190714	23
5,0	0,182991	26
5,5	0,152102	39
6,0	0,141893	43
6,5	0,125067	50
7,0	0,109353	56

Tabulka P5.26: *Lemna minor* – porovnání hmotností koneční biomasy základní test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0073	
0+5% DMSO	0,0072	1
4,5	0,0038	48
5,0	0,00325	55
5,5	0,00305	58
6,0	0,00295	60
6,5	0,00275	62
7,0	0,00235	68

P6. MUSK XYLEN – DÍLČÍ VÝSLEDKY

Tabulka P6.1: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,77			
0+5% DMSO	40,7	40,7	0,5000	2,55
10	20,52	20,52	0,1167	51

Tabulka P6.2: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	39,03			
0+5% DMSO	38,15	38,15	0,0830	2,26
3	29,25	29,25	0,1815	25
6	17,92	17,92	0,2500	54
9	14,92	14,92	0,5850	62
11	13,47	13,47	0,4350	65
13	11,18	11,39	1,2850	71
15	3,07	3,07	0,0665	92

Tabulka P6.3: Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	51,33			
0+5% DMSO	49,92	49,92	2,1165	2,76
4,5	30,58	30,59	3,8150	40
5,0	28,40	28,40	2,0700	45
5,5	27,33	27,34	2,0650	47
6,0	26,68	26,69	2,0850	48
6,5	24,22	24,22	0,5150	53
7,0	21,95	21,95	0,5500	57

Tabulka P6.4: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	7,90			
0+5% DMSO	7,78	7,78	0,2833	1,48
10	3,78	3,78	0,8833	52

Tabulka P6.5: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	10,60			
0+5% DMSO	10,02	10,02	0,2850	5,5
3	8,38	8,39	0,0150	21
6	5,57	5,57	0,0350	47
9	5,48	5,47	0,3350	48
11	4,62	4,62	0,1150	56
13	3,27	3,27	0,0350	69
15	2,00	2,00	0,3000	81

Tabulka P6.6: Test inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	11,07			
0+5% DMSO	10,88	10,88	0,3835	1,66
7,0	5,65	5,65	0,3500	48
7,2	5,30	5,30	0,3700	53
7,4	5,00	5,00	0,4000	55
7,6	4,85	4,85	0,1500	56
7,8	4,58	4,58	0,2500	59
8,0	4,35	4,35	0,0200	60

Tabulka P6.7: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* úvodní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	42,33			
0+5% DSMO	40,75	40,75	0,4167	2,43
10	19,00	19,00	1,0000	56

Tabulka P6.8: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* předběžný test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,83			
0+5% DMSO	40,67	40,67	1,6650	2,79
3	33,080	33,08	0,7500	21
6	32,000	32,00	1,1700	23
9	20,170	20,17	0,0000	52
11	17,750	17,75	0,5800	57
13	13,920	13,92	0,7500	67
15	2,09	2,09	0,0850	95

Tabulka P6.9: Test inhibice růstu kořene *Allium cepa* základní test

koncentrace c [mg/l]	Průměrná délka kořenů L [mm]	Medián	Směrodatná odchylka	Inhibice růstu kořenů [%]
0	41,17			
0+5% DMSO	39,17	39,17	0,1650	4,86
7,4	21,92	21,92	0,7500	47
7,6	21,25	21,25	1,5800	48
7,8	20,92	20,92	2,2500	49
8,0	20,00	20,00	0,6700	51
8,2	18,08	18,08	1,2500	56
8,4	17,33	17,33	3,0000	58

Tabulka P6.10: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	30/30	29/30	0	3
10	3/30	0	90	100

Tabulka P6.11: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
2	30/30	25/30	0	14
4	20/30	18/30	33	40
6	12/30	10/30	60	67
8	8/30	5/30	73	83
10	5/30	1/30	83	97

Tabulka P6.12: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	30/30	30/30		
0+5% DMSO	29/30	29/30	3	3
3,9	19/30	17/30	37	43
4,0	18/30	16/30	40	47
4,1	16/30	15/30	47	50
4,2	15/30	12/30	50	60
4,3	12/30	10/30	60	67

Tabulka P6.13: Daphtoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	19/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
5	6/20	0/20	70	100

Tabulka P6.14: Daphtoxkit FTM předběžný test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	19/20	0	5
1	20/20	18/20	0	10
2	15/20	10/20	25	50
3	11/20	7/20	45	65
4	9/20	5/20	55	75
5	4/20	0/20	80	100

Tabulka P6.15: Daphtoxkit FTM základní test

Koncentrace [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů		Mortalita [%]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	20/20	20/20		
0+5% DMSO	20/20	20/20	0	0
2,0	16/20	12/20	20	40
2,1	15/20	11/20	25	45
2,2	13/20	10/20	40	50
2,3	11/20	9/20	45	55
2,4	10/20	9/20	50	55

Tabulka P6.16: Thamnotoxkit FTM úvodní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	0
0 + 5 % DMSO	29/30	3
10	0/30	100

Tabulka P6.17: Thamnotoxkit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
c	30/30	0
3	25/30	17
6	17/30	43
9	13/30	57
12	0/30	100
15	0/30	100

Tabulka P6.18: Thamnotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
0 + 5 % DMSO	30/30	0
5	20/30	33
6	19/30	37
7	16/30	47
8	14/30	53
9	10/30	67

Tabulka P6.19: Rotokit FTM předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	30/30	
0+5% DMSO	27/30	10
2	19/30	37
4	15/30	50
6	9/30	70
8	5/30	83
10	0/30	100

Tabulka P6.20: Rotoxkit FTM základní test

Koncentrace c [mg/l]	Živé organismy/celkem organismů	Mortalita [%]
0	29/30	
0+5% DMSO	28/30	7
2	21/30	30
2,5	17/30	43
3	14/30	53
3,5	12/30	60
4	10/30	67

Tabulka P6.21: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	134,5	
0+5% DMSO	103	23
1	70,5	48
3	41	70
5	32	76
10	17	87
15	3,5	97
20	0	100

Tabulka P6.22: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,232749	
0+5% DMSO	0,228484	2
1	0,172709	26
3	0,139223	40
5	0,105991	54
10	0,075804	67
15	0,053081	77
20	0	100

Tabulka P6.23: *Lemna minor* – porovnání hmotností konečné biomasy předběžný test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0065	
0+5% DMSO	0,0062	5
1	0,00445	32
3	0,00415	36
5	0,00395	39
10	0,0036	45
15	0,00325	50
20	0,0025	62

Tabulka P6.24: *Lemna minor* – porovnání ploch pod růstovými křivkami základní test

Koncentrace c [mg/l]	Plocha pod růstovou křivkou	Inhibice [%]
0	162	
0+5% DMSO	146	10
4,5	95,5	41
5,0	79	51
5,5	70,5	56
6,0	57	65
6,5	48,5	70
7,0	32,5	80

Tabulka P6.25: *Lemna minor* – porovnání růstových rychlostí základní test

Koncentrace c [mg/l]	Rychlost růstu	Inhibice [%]
0	0,248638	
0+5% DMSO	0,240914	3
4,5	0,20157	19
5,0	0,182991	26
5,5	0,161629	35
6,0	0,136502	45
6,5	0,130899	47
7,0	0,105991	57

Tabulka P6.26: *Lemna minor* – porovnání hmotností konečné biomasy základní test

Koncentrace c [mg/l]	Hmotnost konečné biomasy [g]	Inhibice [%]
0	0,0073	
0+5% DMSO	0,0072	1
4,5	0,0036	51
5,0	0,00345	53
5,5	0,0031	58
6,0	0,0028	62
6,5	0,00255	65
7,0	0,00225	69

P7. TABULKA HODNOT PRO PROBITOVOU ANALÝZU

Tabulka P7.1: Probitové hodnoty

%	probity	%	probity	%	probity	%	probity
0,2	2,122	21	4,194	52	5,05	83	5,954
0,4	2,348	22	4,228	53	5,075	84	5,994
0,6	2,488	23	4,261	54	5,1	85	6,036
0,8	2,591	24	4,294	55	5,126	86	6,08
1	2,574	25	4,326	56	5,151	87	6,126
1,2	2,743	26	4,357	57	5,176	88	6,175
1,4	2,803	27	4,387	58	5,202	89	6,227
1,6	2,856	28	4,417	59	5,228	90	6,282
1,8	2,903	29	4,447	60	5,253	91	6,341
2	2,946	30	4,476	61	5,278	92	6,405
2,5	3,04	31	4,504	62	5,305	93	6,476
3	3,123	32	4,532	63	5,332	94	6,555
3,5	3,188	33	4,56	64	5,358	95	6,645
4	3,249	34	4,588	65	5,385	95,5	6,695
4,5	3,305	35	4,615	66	5,412	96	6,751
5	3,355	36	4,642	67	5,44	96,5	6,812
6	3,445	37	4,668	68	5,468	97	6,881
7	3,524	38	4,695	69	5,496	97,5	6,96
8	3,595	39	4,722	70	5,524	98	7,054
9	3,659	40	4,747	71	5,553	98,2	7,096
10	3,718	41	4,772	72	5,583	98,4	7,144
11	3,773	42	4,798	73	5,613	98,6	7,197
12	3,825	43	4,824	74	5,643	98,8	7,257
13	3,874	44	4,849	75	5,674	99	7,326
14	3,92	45	4,874	76	5,706	99,2	7,409
15	3,964	46	4,9	77	5,739	99,4	7,512
16	4,006	47	4,925	78	5,772	99,6	7,652
17	4,046	48	4,95	79	5,806	99,8	7,878
18	4,085	49	4,975	80	5,842		
19	4,122	50	5	81	5,878		
20	4,158	51	5,025	82	5,915		