



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

PROBLEMATIKA INTERAKCÍ TESTOVANÝCH LÁTEK V EKOTOXIKOLOGII

THE PROBLEMS OF INTERACTION TESTING COMPOUNDS IN ECOTOXICOLOGY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

IVANA PAVLÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0456/2009	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Ivana Pavlíčková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Problematika interakcí testovaných látek v ekotoxikologii.

Zadání bakalářské práce:

Zpracování problematiky vzájemného působení testovaných látek s využitím ekotoxikologických testů. Možnosti a způsoby vyhodnocování vzájemné interakce binárních kombinací vybraných látek s biologickými systémy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

Ivana Pavlíčková
Student(ka)

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

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce shrnuje současné poznatky problematiky interakcí testovaných látek a stanovení ekotoxicity. Práce se zabývá zhodnocením ekotoxicity látek a binárních směsí, toxických kovů nebo biologicky aktivních látek. Součástí práce je stručné shrnutí používaných testů ekotoxicity.

ABSTRACT

Bachelor thesis summarizes current knowledges of the problems of interaction of tested compounds and the determination of ecotoxicity. The work deals with the evaluation of ecotoxicity of binary mixtures of substances, toxic metals, or biologically active substances. The work is a brief summary of ecotoxicity tests used.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxická, směsi, kovy, biologicky aktivní látky

KEY WORDS

ecotoxicity, mixtures, metals, biologically active compounds

PAVLÍČKOVÁ, I. *Problematika interakcí testovaných látek v ekotoxikologii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 37s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis bakaláře

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D. za pomoc při tvorbě bakalářské práci, za odborné vedení, věcné a užitečné rady a připomínky. Také za trpělivost při vzájemné spolupráci a věnovaný čas. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině, zvláště rodičům a bratrově za podporu během studií.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. HODNOCENÍ EKOTOXICITY	7
2.1 Význam a využití testů ekotoxicity	8
2.2 Testy ekotoxicity podle testovaného organismu	8
2.2.1 Testy na baktériích	9
2.2.2 Testy na vodních bezobratlých.....	11
2.2.3 Testy na rybách	12
2.2.4. Testy na řasách	13
2.2.5 Testy na rostlinách	15
2.3 Testy ekotoxicity podle pokročilosti testovacího systému.....	16
2.4 Testy ekotoxicity podle úrovně biologické organizace	17
2.5 Přehled základní legislativy	18
3. TOXICITA A EKOTOXICITA SMĚSÍ TOXICKÝCH LÁTEK	21
3.1 Interakce při vzájemném působení.....	21
3.2 Vzájemné interakce látek	23
3.2.1 Rizikové kovy a ostatní kovy	23
3.2.2 Biologicky aktivní látky	26
3.2.3 Binární směsi kovů a léčiv	29
4. ZÁVĚR.....	32
5. SEZNAM LITERATURY	33
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	37

1. ÚVOD

Vzhledem k faktu, že v současné době prudce stoupá uvolňování cizorodých látek do životního prostředí, aniž známe jejich přesné ekotoxické účinky. Jedná se hlavně o kovy a biologicky aktivní látky. Jsou to látky spojené se zemědělskou činností, průmyslem, výrobou nebo lidskou činností. Všechny tyto látky zatěžují životní prostředí, proto se v poslední době rozvíjí zájem o jejich chování, distribuci a vzájemné interakce. Ročně je vyprodukováno obrovské množství těchto látek a znečišťují všechny složky životního prostředí. Z toho důvodu je nutné identifikovat tyto škodlivé látky, jejich vliv a účinky na organismy a prostředí a snažit se je eliminovat.

Zvýšená koncentrace kovů, léčiv, pesticidů, insekticidů, dezinfekcí, freonů, polychlorovaných bifenylů a dalších škodlivých látek v prostředí vede k jejich kumulaci především v živých organismech. Situace neustále se zvyšujícího množství polutantů v životním prostředí si vyžaduje stále intenzivnější sledování jejich účinků, jak na životní prostředí, tak na organismy v něm. V dnešní době už nestačí jen analytické hodnocení jednotlivých látek. V prostředí škodlivé látky působí dohromady a vzájemně se jejich účinky ovlivňují. Na to abychom mohli prostředí chránit, potřebujeme přesné informace organismů, které se v něm nachází, z těchto odpovědí a reakcí jednotlivých organismů, dostaneme přehled obsahující informace o celých ekosystémech a změnách chování v důsledku pozměněných podmínek. Toto zvyšující se znečištění životního prostředí si vyžaduje vývoj spolehlivých a jednoduchých testů na stanovení ekotoxických účinků škodlivých látek, které se mohou kumulovat v půdě, ovzduší, řekách až oceánech a stát se tak potenciálně nebezpečnými. Z hlediska ekotoxikologie je velmi důležité testování na jednotlivých úrovních potravních řetězců. Ale z ekotoxického účinku jsou důležité i jiné faktory, např. struktura molekuly látky, její vlastnosti, aj.

2. HODNOCENÍ EKOTOXICITY

Moderní definice oboru ekotoxikologie hovoří o hraničním oboru mezi toxikologií a ekologií. Zabývá se působením cizorodých látek na volně žijící organismy v jejich prostředí v užším slova smyslu, v širším pojetí se zabývá také studiem transportu škodlivin a toxických látek z prostředí a mezi jednotlivými složkami životního prostředí, což jsou voda, ovzduší, půda a v neposlední řadě prostřednictvím potravních řetězců [1,2].

Ekotoxicita se definuje jako toxický účinek znečišťující látky, který potlačuje nebo zcela ničí život v ekosystémech. Jde tedy o nepříznivý účinek na testovací organismus vyvolaný toxickou látkou nebo jejich směsí. Závisí na působení koncentrace a času a je ovlivňována proměnnými veličinami (teplota, pH, chemické složení a další). V extrémních případech může být organismus až usmrcen. Existují dvě základní kategorie toxických vlivů, akutní a chronická. Akutní toxicita nastává při velké dávce jedu a krátkém trvání. V případě stanovení akutní toxicity s využitím biotestů je zpravidla určena na expozici, tedy době vystavení v rozsahu 24 – 48 hodin pro bezobratlé a 96 hodin pro ryby. Naopak u chronické toxicity je nízká dávka látky po dlouhou dobu působení, řádově několik stovek hodin (týdny až měsíce). Zde je účinek většinou subletální, to znamená, že účinek se projeví až po delší době působení, např. po několika měsících nebo rocích působení. Často zde dochází ke kumulaci toxických látek v těle organismu. Tento dlouhodobý účinek může být výrazně ovlivněn změnami probíhající u organismu během expozice (změny v růstu, v metabolismu, v přijímání potravy, v reprodukci a jiné) [3,4].

V legislativě se podle koncentrace a ekotoxických indexů rozlišuje několik tříd a stupňů ekotoxicity [4].

Tabulka 1: Třídy ekotoxicity [4]

Třída	Koncentrační rozsah (mg.l ⁻¹)	Látka je toxická
0	$\geq 10^4$	netoxická
1	$10^3 - 10^4$	velmi slabě toxická
2	$10^2 - 10^3$	slabě toxická
3	$10^1 - 10^2$	středně toxická
4	$10^0 - 10^1$	silně toxická
5	$10^{-1} - 10^0$	velmi silně toxická
6	$\leq 10^{-1}$	mimořádně toxická

Tabulka 2: Stupně ekotoxicity [4]

Stupeň	Práh (mg.l ⁻¹)
prakticky netoxický	$\geq 10\ 000$
lehce toxický	1000 – 10 000
středně toxický	100 – 1000
toxický	1 – 100
velmi toxický	≤ 1

Hlavní dvě kriteria určující chování látek v prostředí jsou biologická rozložitelnost a ekotoxická. Jediným možným způsobem, jak stanovit toxicitu je zkouška toxicity, nebo-li test toxicity na živém organismu. Proto hovoříme o biologických testech toxicity. Hlavní význam biologických testů při hodnocení ekotoxikity je, že vystihují souhrn všech účinků přítomných složek na testovaný organismus. Tedy hlavním cílem je stanovení hraniční koncentrace, ve které je možný život testovaných organismů. Ekotoxikologické testy jsou testy sledující reakce, kdy je určený, často jednoduchý organismus u kterého známe životní projevy, fyziologii a stavbu těla v uměle připraveném prostředí (živné médium) vystaven známé látce o přesně definované koncentraci [4].

Protože se organismy nevyskytují náhodně ve svém prostředí a pokaždé nalezneme souvislost mezi typem a vlastnostmi prostředí (teplota, vlhkost, pH) a tvarem těla, způsobem přijímání potravy a dalšími vlastnostmi (fyziologické, fyziognomické, morfologické, aj.) daného živočicha nebo rostliny. Je nemyslitelné studovat organismus a jeho stránky života, včetně působení škodlivin, bez toho, aniž bychom vzali v úvahu jeho okolní prostředí [1].

Organismus může být vystaven i působení neznámého prostředí jako jsou vodné výluhy materiálů, kalů, sedimentů a podobně, v kterých se vyskytují různé koncentrace solí těžkých kovů, organických látek atd.. Z reakce organismu (např. dafnie) vyplývají pak rizika expozice sledované známé nebo neznámé látky pro volně žijící populace toho či jiného organismu. Výsledky testů ekotoxikity lze aproximovat i na působení znečištěných složek životního prostředí na člověka. Testy toxicity a ekotoxikity musí být prováděny za standardních reprodukovatelných podmínek. Můžeme je rozdělit podle několika aspektů, nejdůležitějším je doba expozice, podle úrovně provedení a uspořádání testu. V praxi jsou nejrozšířenější standardní testy toxicity a ekotoxikity. V poslední době se významně rozšiřují také alternativní testy [1,2].

2.1 Význam a využití testů ekotoxikity

Na organizmech mají testy toxicity velmi důležitou úlohu při hodnocení nově vyvinutých a distribuovaných chemických látek, dále přípravků jako pesticidy nebo při klasifikaci odpadů určených ke skládkování. Na analýzu rizika chemických látek a pesticidů se vyžadují výsledky testů akutní toxicity na řasách, dafniích a rybách. Ke stanovení ekotoxikity odpadů a pro jejich zařazení do tříd vyluhovatelnosti se podle legislativy používá metodický pokyn odboru odpadů pro vyhodnocování parametru nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxická [5]. Mezi rozšířené testy patří test inhibice růstu kořene kulturní rostliny hořčice bílé (*Sinapis alba*) a akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*. Pro vyhodnocování nebezpečnosti odpadních vod se využívá test inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*). Uspořádání, hodnocení a rozsah testů je dán cílem, pro který jsou aplikovány [3,5].

2.2 Testy ekotoxikity podle testovaného organismu

Při hodnocení látek, respektive jejich ekotoxických vlastností, jsou používány právě testy ekotoxické. Při analýze chemických látek různých přípravků, pesticidů, odpadů, odpadních vod, splachů, srážek nebo směsí získáváme důležité informace o jejich nebezpečných vlastnostech, ale dostatečně poskytují údaje o ekotoxicitě jednotlivých látek na živé složky,

ale také i v případě směsí, kdy je vyhodnocen ekotoxický účinek směsi bez ohledu na zastoupení jednotlivých látek. Výhodou těchto testů je jejich schopnost určení vlivu znečištění v celém komplexu a to se všemi aditivními, synergistickými a anatagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími složkami. Největší význam při hodnocení toxicity a ekotoxicky je, že vystihují souhrn účinků všech přítomných složek (současně také látek, které nebyly prokázány chemickou analýzou) v testovaném roztoku na testovaný organismus, buňku, kulturu nebo tkáň. Při hodnocení vzorku je samozřejmě důležitá nejen koncentrace látky, ale i doba jejího působení. Výsledkem testů je vyhodnocování hodnot LC50, tedy letální koncentrace pro 50% testovacích organismů, hodnoty EC50, efektivní koncentrace vyvolávající 50% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů a hodnoty IC50, inhibiční koncentrace, tedy koncentrace způsobující 50 % inhibici růstu. Při všech třech hodnotách vycházíme z koncentrace, při které došlo k více než nulové nebo méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci, či zpomalení růstu. Je tedy velmi důležité při provádění testů zvolit správný rozsah koncentrací [3,4].

Nejprve se provede limitní test, ten zjišťuje reakci testovacích organismů při koncentraci 100 mg.l⁻¹ testovaného vzorku. Neuhyne-li žádný z testovacích organismů, další testy se nevyžadují, v opačném případě nastupuje předběžný test. Tento test se provádí s malým počtem testovacích organismů (např. u dafnií 10 kusů) a nasazuje se na velké rozmezí koncentrací sledované látky. Na základě výsledků aplikujeme základní test, při kterém se volí užší rozsah koncentrací s předpokládaným účinkem. Z výsledku základního testu se vypočítá hodnota LC, EC nebo IC50 a nasazuje se tedy větší počet organismů (např. 20 dafnií). Součástí každého testu je kontrola, ta se provádí za stejných podmínek a se stejnými organismy jako celý test s látkou, výluhem apod.. Kontrolní testovací organismy se dávají do ředící vody nebo živného média bez přítomnosti látek, tím ověříme kondici a zdravotní stav testovacích organismů a podmínky testu. K testům ekotoxicity je výběr testovacích organismů prováděn tak, aby byly zastoupeny jednotlivé trofické úrovně. V praxi to jsou hlavně řasy, bezobratlí, bakterie a ryby a rostliny [3].

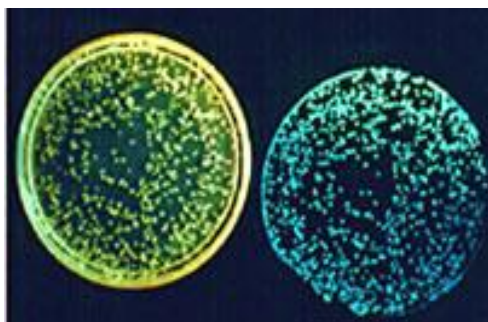
2.2.1 Testy na baktériích

Bakteriální biotesty můžeme rozdělit na testy založené na aktivitě enzymů, biosyntéze enzymů, na růstové rychlosti a měření fyziologických procesů. Principem testu je například měření inhibice oxidace nitritů na nitráty, příkladem takového testu je PolyToxTM [4,6].



Obrázek 1: Test PolyToxTM [6]

Tento test skládající se ze směsi specializovaných bakteriálních kultur navržených tak, aby zajistil jednoduché, rychlé a ekonomicky výhodné výsledky. Pracuje za méně než třicet minut a poskytuje konzistentní výsledky bez použití drahého vybavení, je bezpečný a šetrný k životnímu prostředí. Ze standardně známých a dostupných testů se využívá směs bakterií z aktivačních nádrží a měří se produkce CO₂. Velmi známé a používané bakteriální testy v ekotoxikologii vodního prostředí jsou bakteriální bioluminiscenční testy toxicity. Tyto biotesty využívají kultur mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri*, které emitují světelné záření v případě optimálních podmínek prostředí, ve kterém žijí. Úbytek intenzity emitovaného záření se využívá pro detekci inhibice. Tato metoda se zakládá na sledování změny luminiscence způsobené vystavení působení toxické látky a zjištění hodnoty relativní inhibice bioluminiscence. K provedení testu se používá komerčních luminometrů, které měří množství emitovaného světla před a po přidání testované látky. Možnému toxickému vlivu testované látky odpovídá změna intenzity luminiscence. Pro stanovení toxických látek ve vodách, půdách a sedimentech lze použít bakteriálních mikrobiotestů. Směsí živného media s testovaným vzorkem jsou oživeny bakteriálními kultury *E. coli*. Princip je založen tak, že toxikant inhibuje enzymy v kmeni *E. coli*, který je vyšlechtěn pro vysokou citlivost k širokému spektru škodlivých látek [4,6,7,8].



Obrázek 2: Bakteriální bioluminiscenční test toxicity LUMISTox [8]

Další z řady bakteriálních bioluminiscenčních testů je LUMISTox, jeho procedura je také založena na schopnosti mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* reagovat změnou bioluminiscence na přítomnost xenobiotik v jejich okolí. Luminiscenční bakterie jsou dodávány v dehydratovaném stavu, který zaručuje dostatečnou reziduální bioluminiscenci. Bakterie se až do stanovení toxicity uchovávají v chladu a až těsně před testováním se rehydratují. V luminometru se nejprve změří výchozí bioluminiscence bakteriální suspenze v nepřítomnosti cizorodých látek. Poté se přidá testovaná látka v několika koncentracích, směsi se určitou dobu inkubují a nakonec se změří výsledná hodnota bioluminiscence. Čím je testovaná látka toxičtější, tedy čím vyšší je koncentrace toxické látky ve vzorku, tím je pokles bioluminiscence výraznější. Jako referenční roztok (blank) se používá netoxický solvent (2% NaCl), jeho koncentraci je třeba dodržet, protože luminiscenční bakterie jsou mořské mikroorganismy, které by při nižší osmolaritě lyzovaly. Bioluminiscence je enzymový proces, který závisí na teplotě, proto se provádí inkubace s toxikantem i měření v temperovaném prostředí. Z naměřených hodnot bioluminiscence v přítomnosti a nepřítomnosti toxické látky

se určí efektivní koncentrace. Nejvyžívanější standardní test je vyhledávací test akutní toxicity na bakterie. Tento test poskytne rychlou odpověď na toxicitu látky vůči bakteriím. Základem testu je difúze testované látky z filtračního papíru do pevné živné půdy, což je tuhé médium obsahující živiny a substráty, v tomto případě naočkované bakteriální kulturou. Účinek toxicity se projeví šířkou inhibiční zóny, vytvořené v bakteriálním prostoru kolem proužku papíru. Používá se metoda povrchové difúze, kdy se proužek filtračního papíru pokládá na povrch živné půdy. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 11348-1 (2009), ČSN EN ISO 11348-2 (2009), ČSN EN ISO 11348-3 (2009) [4,6,7,8,19,20,22].

2.2.2 Testy na vodních bezobratlých

Mezi nejpoužívanější testy ekotoxicity patří nepochybně testy na vodních bezobratlých. Kromě standardních testů ekotoxicity dle ISO norem a normativ OCED jsou v poslední době nejčastěji používané alternativní testy s korýši, které jsou snadno dostupné a experimentálně nenáročné. K těmto testům využívajících korýšů patří Daphtoxkit FTM, který pracuje s *Daphnia magna* nebo *Daphia pulex*. Další test je Thamnotoxkit FTM, který využívá korýše *Thamnocephalus platyurus*, ten je velmi citlivý testovací organismus. Dále biotest Streptoxkit FTM se žábřonožkou *Streptocephalus proboscideus*. Biotest Rotoxkit FTM, který využívá vířníka *Brachionus calyciflorus*, zde se jedná se poměrně rychlý a citlivý biotest. Další z řady je Ceriodaphtoxkit, který využívá perloočky *Ceriodaphnia dubia*, tento test se používá také jako chronický test ekotoxicity. Biotest Spirotox využívá prvoka *Spirostomum ambiguum*, který je také velmi citlivým organismem [4,9].



Obrázek 3: Daphtoxkit FTM [10]



Obrázek 4: Rotoxkit FTM [9]

Jedním z nejznámějších standardních testů je akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* (hrotnatka velká). Tento test se zabývá vlivem látek na planktonní organismy, které jsou hlavní potravní složkou ryb, jeho cílem je tedy stanovit akutní toxicitu právě na perloočkách. Princip testu je sledování přežívání perlooček v odstupňovaných koncentracích toxické látky s dobou působení 24 a 48 hodin. Z těchto planktonních testovacích organismů je nejčastěji používaná perloočka *Daphnia magna*, protože je to organismus, který snáší poměrně vysoké organické zatížení, tím patří mezi nejcitlivější organismy k většině cizorodých látek. Mezi další důvody, proč má v biotestech nezastupitelné

místo, patří její významné postavení v potravním řetězci, krátká generační doba, snadná kultivace, malé nároky na spotřebu vody, patří k hojně rozšířenému druhu v přírodních podmínkách, aktivně neuniká před toxickým prostředím a existuje celá řada metodik použití v biotitech. Perloočky se nechají po dobu působení účinku testované látky rozpuštěné v ředící vodě při různých koncentracích. Pro kontrolu se současně nasadí testovací organismy i do ředící vody bez testované látky. Během expozice se kontroluje stav perlooček a zaznamenávají se uhynulí a imobilizovaní jedinci v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 6341 (1998), OECD no 202 (2004) [4,7,11, 15,23,24].



Obrázek 5: *Daphnia magna* [12]

Testování neprobíhá jen na planktonních organismech, mezi další bezobratlé testovací organismy patří i nitěnka (*Tubifex tubifex*) nebo ploštěnka (*Planaria tigrina*). Tyto testy akutní ekotoxicity probíhají za podobných podmínek. Test hodnotí působení ekotoxicity na ploštěnky nebo nitěnky, které patří mezi nejdéle používané testovací organismy. Test se skládá s pozorování chování a přežívání nitěnek v odstupňovaných koncentracích látky, po dobu expozice 48 hodin, ve srovnání s kontrolou v ředící vodě, tedy v destilované nebo deionizované vodě s přidavkem soli, která má definovanou iontovou sílu, osmotický tlak a chemické složení. Test akutní toxicity na ploštěnku (*Planaria tigrina*) bývá často doplňkovým testem k testu na nitěnku (*Tubifex tubifex*) [4,7].

2.2.3 Testy na rybách

Rybám je věnována prvořadá pozornost zejména vodní ekotoxikologie. Hlavně protože ryby jsou konečným článkem potravního řetězce ve vodním prostředí a současně také protože jsou hospodářsky významnými vodními organismy. Chované ryby jsou také využívány k indikaci dlouhodobých změn kvality vody na úrovni subletálních koncentrací cizorodých toxických látek. Například se provádí biotest se pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss*), který indikuje kvalitu přitékající surové vody při vodárenské úpravě. Použití pstruha duhového jako indikátoru se projeví změnou chování ryb a následným úhynem. Moderní způsob zpracování kvality surové vody přitékající na úpravnu jsou založeny na biologickém monitoringu. Tímto podrobným vyšetřením pstruhů duhových po jednoletém pobytu v přítokové surové vodě lze odhalit přítomnost případných xenobiotik v subletálních

koncentracích. Lze to provést dvojím způsobem a to chemickým monitorováním (průkazem xenobiotik ve tkáních ryb) nebo použitím tzv. biomarkerů (biologických a biochemických indikátorů kontaminace). Testy toxicity u ryb mají výhodu v toxikologické praxi pro svou reprodukovatelnost, homogenitu testovaných složek a testovacích podmínek, rychlost a možnost rutinního znovu provedení. Přesně takové výhody má test akutní ekotoxicity pro živorodku duhovou (*Poecilia reticulata*), který slouží často ke stanovení vlivu látek a odpadních vod na chování a samotné přežívání ryb. Test spočívá v pozorování těchto akvarijních ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 48 až 96 hodin. Může být doplněn právě testem na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), zejména v rybářské ekotoxikologii a v poslední době při kontrole technologie čistírny odpadních vod pro odtékající vodu z čistírny zpět do recipientu. Průběh testu je následovný, ryby se vystaví po dobu expozice účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné v ředící vodě a současně i do ředící vody bez testované látky, pro kontrolu. Během průběhu testu se pozoruje stav a chování ryb a odlovují se uhynulý jedinci. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 7346-1 (1999), ČSN EN ISO 7346-2 (1999), ČSN EN ISO 7346-3 (1999), OECD no 203 (1992) [4,7,25,26,27,24,28].

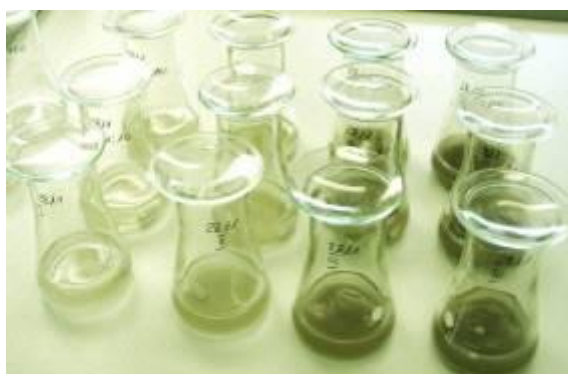


Obrázek 6: Živorodka duhová *Poecilia reticulata* [12]

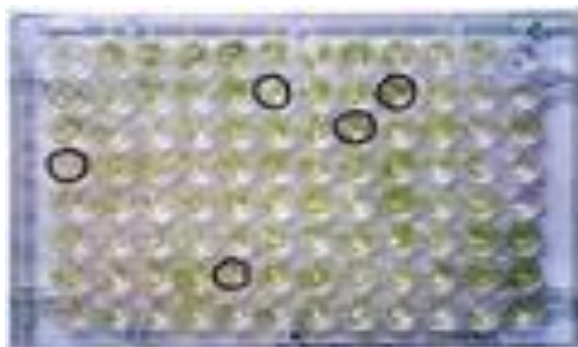
2.2.4. Testy na řasách

Nezastupitelné místo v testech toxicity a ekotoxicity mají řasové testy, hlavně proto, že řasy jsou primární producenti. Stojí na začátku potravního řetězce a nelze je nahradit jinými testovacími systémy. Nevýhodou u testů ekotoxicity na řasách v klasickém standardním provedení je velká náročnost na preciznost a reprodukovatelnost provedení a také na laboratorní vybavení. Nejpoužívanější testy toxicity na řasách jsou založené na inhibici růstu řas. Růstový biotest řas je spolehlivým kritériem pro stanovení ekotoxicity. Nejčastěji se v dnešní době využívá růstu řas v mikrotitračních destičkách, v tzv. mikrodestičkovém uspořádání a inhibice růstu je sledována spektrofotometricky. V poslední době se stávají velmi nutným doplňkem fyziologické a biochemické řasové testy ekotoxicity. Z těchto testů se doposud nejvíce používá test založený na fixaci CO₂ a test založený na iniciaci variabilní fluorescence chlorofylu. Testy s řasami bývají často založeny na ovlivnění fotosyntézy. Některé velmi rychlé testy využívají změn fluorescence chlorofylu působením např.

herbicidů, ty reagují již ve zlomcích sekundy. Vyžadují však drahé zařízení. Z těch středně rychlých testů využívají ovlivnění temnostní fáze fotosyntézy, tedy příjmu CO₂ nebo výdeje kyslíku, které reagují řádově v minutách až hodinách. Existují řasové testy s mořskými i se sladkovodními řasami. Nejčastěji používané řasy k testům ekotoxicity se sladkovodními řasami jsou *Desmodesmus quadricauda*, *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 8692 (2005), OECD no 201 (1984). V řasových testech s mořskými řasami se jako testovací organismy používají rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 10253 (2007), OECD no 201 (1984) [4,11,29,30,31].



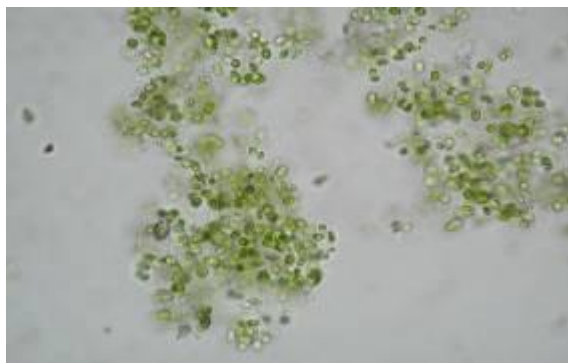
Obrázek 7: Standardní provedení řasového testu [12]



Obrázek 8: Mikrodestičkové provedení řasového testu [12]

Nejznámějším a nejvyužívanějším standardním testem je test inhibice růstu *Desmodesmus subspicatus*. Tento test slouží k pozorování vlivu látek na růst kultury nejjednodušších autotrofních rostlin, tedy řas. Je založený na sledování změn růstu kultur řas v závislosti na koncentraci testované látky ve srovnání s kontrolou v médiu, nebo-li živném roztoku, který je definovaný jako tekuté prostředí obsahující živiny a substráty, kde živiny (nutriety) jsou látky potřebné pro kultivaci mikroorganismů a substráty jsou látky, na kterých rostou mikroorganismy a jsou vyživovány enzymovým aparátem organismů. Jedno druhové řasové

kmeny se po dobu 72 hodin kultivují v definovaném živném médiu, v tomto testu je to nejčastěji ředící voda, která obsahuje testovanou látku v různém rozsahu koncentrací. Toxický účinek testované látky se na řasovou kulturu projeví v inhibici růstové rychlosti ve srovnání s růstem kontrolních kultur jen v čisté ředící vodě, bez přidané testované látky. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 8692 (2005), OECD no 201 (1984) [4,7,24,30,31].



Obrázek 9: Řasy *Desmodesmus subspicatus* [12]

2.2.5 Testy na rostlinách

Mezi často používané testy patří i testy na rostlinách. Tyto testy poskytují výsledky s vysokou vypovídací schopností. Při testech na rostlinách se často využívá kulturních a vyšších rostlin, příkladem těchto suchozemských rostlin je hořčice bílá (*Sinapis alba*), cibule (*Allium cepa*) nebo salát (*Lactuca sativa*) a také vodní rostliny, např. okřehek menší (*Lemna minor*). Při testování se nejčastěji pozoruje klíčivost semen, elongace (růst) kořene, inhibice růstu a produkce fotosyntetických barviv. Při studiích ekotoxických účinků kovů, léčiv, pesticidů lze při těchto testech pozorovat kumulaci těchto látek v rostlinných tkáních. Testy na rostlinách lze rozdělit na testy klasické a kontaktní. Při kontaktních testech, což jsou testy prováděné v půdě se rostliny pěstují ve standardizovaných půdách o chemicky známém složení (např. Lufa) a sleduje se vývoj celé rostliny (např. u kukuřice nárůst biomasy) s rostoucí koncentrací toxikantu v půdě. Kontaktní testy a jejich výsledky jsou použitelné nejen pro zpracování analýzy rizika, ale i pro stanovení sanace ekologických zátěží [4,12,13].



Obrázek 10: Kontaktní test u hořčice bílé *Sinapis alba* [13]

Ke klasickým testům na rostlinách patří test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a test inhibice růstu okřehek menšího (*Lemna minor*). Oba tyto testy patří v ekotoxikologii k nejznámějším a nejvyužívanějším. Poskytují přesné informace, používají se při stanovování ekotoxicity kovů nebo léčiv [4].

Terestrický test – test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) vznikl k testování neškodnosti odpadních vod pro závlahy, testuje se vliv vody na klíčení a růst kořenů hořčice (*Sinapis alba*), která je zástupce kulturních a vyšších rostlin. Test spočívá v kultivaci semen na podložce nasyceného roztoku testované látky v různých koncentracích v porovnání s kulturou, která roste na podložce nasycené ředící vody. Doba expozice je 72 hodin. Hlavní pozornost se věnuje poměru délek hypokolytu a kořene, i když na hypokolytu se nepříznivý vliv prostředí neprojevuje tak výrazně, je to z důvodu, že hypokolyt přijímá roztok prostřednictvím kořene. Výsledkem v případě dobrých růstových podmínek je kratší hypokolyt než kořen. V případě nepříznivých podmínek je hypokolyt větší než kořen, roste více než kořen, který přestává růst nebo i odumírá [4,7].

Okřehek menší (*Lemna minor*) je jedním z nejcitlivějších testovacích organismů při stanovování ekotoxických účinků škodlivých látek pro vodní ekosystémy. Při realizaci testu inhibice růstu se rostliny nechají po dobu 7 dnů růst v živném roztoku, ke kterému je přidána testovaná látka v různých koncentracích. Pro kontrolu se nasadí testovací rostlina i do živného roztoku bez testované látky. V časovém intervalu 24 hodin se zaznamenává stav rostlin a počet lístků (stélek). Cílem je určit účinek látky na růstovou rychlost, tedy vegetativní růst, založený na počtu lístků při různých koncentracích testované látky ve srovnání s růstovou rychlostí v kontrolním roztoku bez testované látky. Tento test se používá na posouzení přímé toxicity odpadních vod, slouží k posouzení toxicity odpadních vod na vegetativní růst rostlin. Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 20019 (2007), OECD no 208 (1984) [4,7,24,32,33].



Obrázek 11: Okřehek menší (*Lemna minor*) [21]

2.3 Testy ekotoxicity podle pokročilosti testovacího systému

Pro testování ekotoxicity látek jsou používány tři generace testů.

Testy 1. generace jsou běžně používány po celém světě. Využívají klasických, standardních a konvenčních metod založených na akutních testech prováděných v laboratoři

na chovaných testovacích organismech a kulturách. Mezi nejčastěji používané patří akutní test toxicity na rybách (*Poecilia reticulata* – živorodka duhová nebo *Brachydanio trio* – danio pruhovaný), imobilizační test na perloočkách (*Daphnia magna* – hrotnatka obecná) a růstově inhibiční test na řasách (chlorokokální řasy druhu *Scenedesmus subspicatus* nebo *Scenedesmus quadricaudata*) nebo test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis Alba*). Výhodou těchto testů je, že jsou uznávány mezinárodními legislativami. Jejich nevýhodou je značně ekonomicky náročné provedení, z důvodu nutnosti dlouhodobě udržet kultury testovacích organismů [4,14].

Testy 2. generace (tzv. mikrobiotesty nebo také alternativní testy ekotoxicity), které se v současné době používají stále víc. Patří sem alternativní biotesty, pod názvem mikrobiotesty. Nárůst produkce řady nových látek s neznámým vlivem na živé organismy nese potřebu provádět velké série testů. Tato potřeba přivedla vývoj k novým trendům, jako je miniaturizace (používají se hlavně mikrotitrační destičky, kyvety, zkumavky), zlevnění testů nebo krácení doby inkubace. Přispívají také nové vědecké poznatky, jako např. řízení reprodukce klidových stádií, uchování řasových kultur apod.). Testy druhé generace využívají klidová stadia testovaných organismů, ty se dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích a ožijí se až před vlastním testováním. Například u testů na bezobratlých se používají ehipia (u dafnií) nebo cysty (u perlooček a vírníků), u testů na rybách se využívají jikry a tkáňové kultury, u testů na bakteriích se používají jejich lyofilizované kultury a při řasových testech jejich imobilizované a hluboce zamrazené řasové kultury [4,14].

Při testech 3. generace se využívají biosenzory a biosondy, které jsou založeny na fluorescenčním značení toxické látky, tyto testy jsou na počáteční úrovni. V současnosti jde stále o jejich základní výzkum, ale i tak mají velké uplatnění zejména v on-line monitorovacích a screeningových testech ekotoxicity. Příkladem takového testu je například biosenzor s imobilizovanými řasami, kde je jako biosenzor použita běžně používaná řasa, např. chlorokokální *Raphidocoealis capricornuta*, ta je imobilizována do agaru a tento biosenzor je přelit testovaným vzorkem (nasyceným CO₂, exponován na světle). Důkaz probíhající fotosyntézy a zároveň měřítkem nezávadnosti je vzrůst pH. Výhodou je možnost provedení testu i v terénu [4,14].

2.4 Testy ekotoxicity podle úrovně biologické organizace

Testy ekotoxicity se provádějí na třech úrovních, tou první je úroveň buněk a tkání, druhou úroveň organismů a třetí je na úrovni společenstev (biocenózy) [4].

a) Testy na úrovni buněk a tkání

Buněčné kultury jsou využívány hlavně k teoretickému objasnění účinku toxického agens, avšak hlavně v poslední době se tkáňové kultury využívají pro rutinní provádění testů ekotoxicity. Jejich výhody jsou vysoká citlivost, reprodukovatelnost, nízké náklady i nároky na provedení i na čas. Nevýhodou je suplování systému in vitro, ten nemůže suplovat enzymaticko-imunitní systém živého organismu, výsledek je proto poplatný pouze k použité buněčné linii nebo zdrojovému orgánu či tkáni. I přes tuto nevýhodu jsou testy ekotoxicity na buněčných kulturách vhodný screening před provedením testů na živých testovacích organismech. Testy na buněčných kulturách lze vyhodnocovat přímými i nepřímými metodami. Ty přímé spočívají v posouzení celkového počtu uhynulých buněk a rozsahu

cytopatických efektů. Jedná se o poměrně časově nenáročné metody, které jsou však zatíženy subjektivní chybou. Nepřímé metody jsou založeny na fyziologických reakcích buněk, jejich hodnocení probíhá na základě barevných reakcí [4].

b) Testy na úrovni organismů (jedinců)

V dnešní době využívány nejvíce, i když u nich stále přetrvávají problémy s reprodukovatelností. Testy na úrovni organismů se používají k hodnocení jak akutní, tak případně chronické ekotoxicity. K testům se užívá výběr testovacích organismů tak, aby postiženy jednotlivé trofické úrovně. Například tedy ve vodním prostředí to znamená – bakterie, řasy, planktonní (bentické) organismy a ryby. Odpověď na přítomnost toxických látek u jednotlivých organismů není jednotná, je ovlivněna více faktory, např. dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost toxickou látku odbourávat. Proto se většinou při ekologickém monitoringu nedělají závěry z testování pouze na jednom organismu. Pozorováním většího testu organismů získáváme více informací o zkoumaném vzorku, tím se zvyšuje výpovědní hodnota celé metody. Individuální testy jsou vybírány tak, aby bylo možno detekovat co nejvíce skupin toxikantů s vysokou spolehlivostí [3,4].

c) Testy na úrovni biocenóz

Hlavní výhodou testů na úrovni biocenóz je samotné pozorování toxického účinku, který se pozoruje přímo v přírodě nebo na modelu, který je jí blízký. Nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně tedy, že změny ve složení biocenóz nemusí být vždy vyvolány přímým toxickým účinkem na určitý druh (různé reakce na určitý druh), může to být například výsledek narušení potravního řetězce apod., proto je reprodukovatelnost těchto testů značně omezená. Těchto testů na úrovni biocenóz se využívá hlavně při sledování vlivu látek aplikovaných do vodního nebo půdního prostředí z preventivních a terapeutických důvodů. Sleduje se hlavně vliv těchto látek a přípravků na složky vodního, popř. půdního systému a ubývání reziduí těchto látek v různých složkách vodního nebo tedy půdního ekosystému [4,11].

Při testování účinků škodlivých látek na biologické úrovni máme tedy tři trofické úrovně, které umožňují zjistit údaje o akutním a chronickém ekotoxickém účinku. Trofickou úroveň číslo jedna charakterizuje primární producent, v případě testů toxicity jsou to řasy. Trofickou úroveň dvě charakterizuje primární konzument, v biotestech např. *Daphnia magna*. A ve třetí trofické úrovni je charakterizující sekundární (popř. vyšší) konzument [16].

2.5 Přehled základní legislativy

Metodika testů se řídí podle ISO norem a normativ OECD. Z hlediska požadavků na standardizaci se do dnešního dne vytvořilo velké množství testů, které mají přesně definované mezinárodně odsouhlasené protokoly a zahrnují přesně definované reprezentativní druhy (E.C., U.S. EPA, OECD). Existuje jich celá řada. U nás jsou tyto normy a předpisy přijímány jako ČSN EN ISO normy a vycházejí především z OECD předpisů. Rozdělení také záleží, na tom jestli měříme akutní nebo chronickou ekotoxicitu [16].

a) U bakterií je to:

ČSN EN ISO 11348-1: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01 [19]

ČSN EN ISO 11348-2: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01 [20]

ČSN EN ISO 11348-3: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01 [22]

b) U bezobratlých podle:

ČSN EN ISO 6341: Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. Vydána: 1997.12.01. Účinnost: 1998.01.01 [15]

ČSN ISO 10706: Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera*, *Crustacea*). Vydána: 2001.12.01. Účinnost: 2002.01.01 [17]

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. 2004 [23,24]

c) U ryb je to:

ČSN EN ISO 7346-1: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoulton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Část 1: Statická metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01 [25]

ČSN EN ISO 7346-2: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoulton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Část 2: Obnovovací metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01 [26]

ČSN EN ISO 7346-3: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoulton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Část 3: Průtočná metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01 [27]

ČSN ISO 10229: Jakost vod – Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (*Teleostei*, *Salmonidae*)]. Vydána: 1997.03.01. Účinnost: 1997.04.01 [18]

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. 1992 [24,28]

d) U řas podle:

ČSN EN ISO 8692: Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Vzdána: červenec 2005. Účinnost: 2005.08.01 [30]

ČSN EN ISO 10253: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu mořských řas *Skeletonem costatum* a *Phaeodactylum tricornutum*. Vzdána 2006.12.01. Účinnost: 2007.01.01 [29]

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 201. Alga, Growth Inhibition Test. 1984 [24,31]

e) U rostlin:

ČSN EN ISO 20019: Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřešku. Vydána: 2007.05.01. Účinnost: 2007.06.01 [32]

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 208. Terrestrial Plants, Growth Test. 1984 [24,33]

3. TOXICITA A EKOTOXICITA SMĚSÍ TOXICKÝCH LÁTEK

Samotné působení chemických škodlivin na člověka a samo životní prostředí je zcela běžné. Chemické látky vstupují do našeho prostředí z mnoha oblastí lidské činnosti, jako je zemědělství, průmyslová výroba a činnost, farmacie, zdravotnictví, doprava, také je to důsledek jejich poměrně vysokého průmyslového využití a mnoha dalších. Snadno tedy mohou působit společně, na jednom místě škodlivé látky z více odvětví, například opad z průmyslové výroby, odpad a léčivo. Toxicita jednotlivých látek je více známá, než jejich vzájemné interakce. Právě toto jejich společné působení se stanovuje při testech na testovaných organismech [34,49].

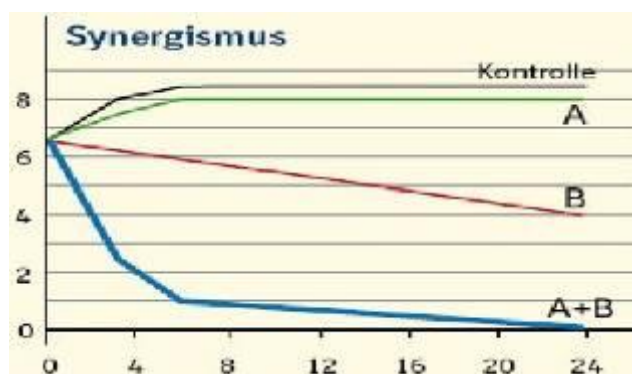
3.1 Interakce při vzájemném působení

Podání jedné látky ovlivní určitým způsobem účinek látky jiné, hovoříme o interakci. Kromě případů, kdy dochází k nezávislému účinku, tedy k současné expozici dvěma škodlivinám nedochází k žádnému vzájemnému ovlivnění, můžou mít látky spolupůsobení za následek zesílení nebo zeslabení účinku jedné látky vlivem druhé. Ta se často projevují jako synergismy nebo antagonismy [1,37].

Mezi nejdůležitější působení látek je synergistické a antagonistické působení látek. Synergismus a antagonismus jako výsledky působení je, kdy jedna z obou vzájemně působících látek zesiluje nebo oslabuje účinek látky druhé. Přítomnost dvou (a více) takových sloučenin může už i malých koncentracích vyvolat nečekaně vážné toxické účinky. Při kombinování dvou a více látek musíme být obeznámeni s mechanismy jejich působení. Potenciování nežádoucích vedlejších účinků je velmi nebezpečné. Při fyziologickém synergismu nebo antagonismu se souhlasné nebo protichůdné účinky organismu také vzájemně ovlivňují [1,35].

Synergismus

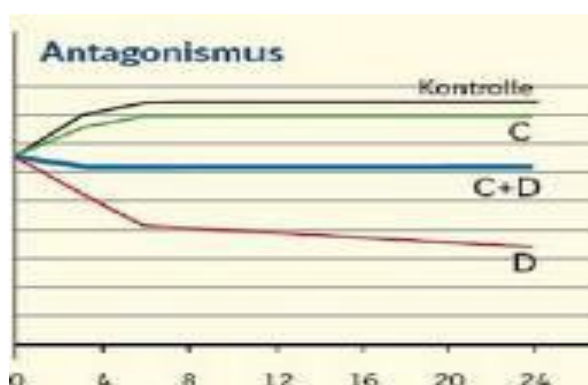
Souhlasné působení dvou látek se označuje jako synergismus. Přidáním synergisty se účinek samotného agonisty zesiluje. Při jednostranném synergismu jedna z obou látek zesiluje účinek druhé látky, ale ne naopak. Při oboustranném nebo-li vzájemném synergismu jsou obě látky schopny zesílit účinek látky druhé. Při chemickém synergismu je látka chráněna před inaktivací (nejčastěji inhibicí rozkládajících enzymů). Mluvíme-li teda o synergistickém efektu, víme, že se jedná o souhlasné působení dvou látek, kdy dochází k zesílení toxického účinku, např. CCl_4 + ethanol [1,35,36].



Obrázek 13: Synergismus [50]

Antagonismus

Antagonismem označujeme u dvou látek protichůdné působení. Účinek agonisty oslabuje přidání jiného antagonisty, účinek slábne, případně je úplně potlačen nebo dokonce invertuje. Při jednosměrném antagonismu jedna z obou látek oslabuje účinek látky druhé, ale zase ne naopak. Při oboustranném (vzájemném) antagonismu je každá z obou látek schopna oslabit účinek druhé látky. Při chemickém antagonismu se látky chemicky rozkládá nebo váže působením látky druhé. Při antagonistickém efektu jde o protichůdné působení dvou látek a dochází k zeslabení jejich vzájemného toxického účinku, např. rtuť v působení s dimerkaprolem (BAL) [1,35,36,37].



Obrázek 14: Antagonismus [50]

Adice (sumace)

Při adice nebo-li sumaci, jde o prosté sčítání intenzity účinků dvou látek jako z kvantitativního hlediska konečného efektu, ale ne z hlediska mechanismu účinku. Je to způsobeno různou cestou účinku dvou látek se stejným finálním efektem. Jestliže aditivní efekt je prosté sčítání intenzity účinků dvou látek, dochází ke zvýšení, respektive sečtení jejich toxického účinku, např. $\text{CCl}_4 + \text{CHCl}_3$ [1,35,36].

Potenciace (supraadice)

Jako o potencování nebo-li supraadici, mluvíme o mnohonásobném zesílení efektu, velmi značně přesahující u jednotlivých samotných látek součet účinků. Způsobuje to různý mechanismus účinku dvou látek se stejným konečným efektem. Potenciace je tedy mnohonásobné zesílení efektu, při němž dochází k znásobení toxického účinku, např. isopropanol + CCl₄ [1,35,36].

3.2 Vzájemné interakce látek

Existuje celá řada látek, které jsou v užším nebo širším smyslu slova toxické. V životním prostředí se vyskytují volně nebo z důsledku lidské činnosti, sem patří léčiva (kde k toxickému účinku může dojít i při nevhodné volbě léčiva, výběru nevhodné dávky, tak i při nevhodné indikaci, aplikaci nebo při nevhodné kombinaci léčiv). Vedle léčiv sem patří i pesticidy (tedy chemické přípravky, které jsou určeny na tlumení výskytu nebo přímo na hubení rostlinných a živočišných škůdců. Pod pojem pesticidy patří herbicidy, fungicidy, insekticidy a rodenticidy. Dále sem patří upravená hnojiva. Zvláště při zemědělství v polní hospodářské praxi se používá celá řada látek, které jsou určeny na ovlivňování produkce rostlinné a živočišné výroby. Mezi těmito látky dominují dusičnanová hnojiva (dusičnan draselný, sodný, amonný nebo vápenatý), které jsou považovány za významný zdroj dusičnanů a dusitanů v krmivu a potravinách rostlinného původu, popř. v pitné a užitkové vodě a představují významný kontaminant potravinového řetězce. Stejně tak i fosforečnanová hnojiva představují riziko pro životní prostředí, způsobují eutrofizaci povrchových vod a často bývají kontaminované rezidui toxických elementů, nejčastěji kadmium a rtuť [48].

3.2.1 Rizikové kovy a ostatní kovy

Existuje řada toxických prvků, které se při vzájemném působení ovlivňují. V několika posledních letech zastupují kovy značnou část látek znečišťujících životní prostředí. Většina kovů brání růstu rostlin poškozováním kořene. Dlouhodobá expozice rostliny se zvýšenou koncentrací kovu může také ovlivnit její syntézu chlorofylu. Mají tedy významnou roli na vývoj chloroplastů a inhibici fotosyntézy. Právě pokles produkce fotosyntetických pigmentů je častý příznak přítomnosti kovů v rostlině [38].

V rámci studie pro porovnání toxicity vybraných potenciálně toxických prvků byl pozorován toxický účinek Cd, Cu, Pb, Se a Zn. Modelovým objektem pro všechny testy byly semenáčky hořčice bílé *Sinapis alba*, které byly pěstovány v hydroponickém roztoku. Předmětem zkoušky bylo stanovení ekotoxického účinku kovu, který byl určován prostřednictvím inhibice kořenového růstu a produkce fotosyntetických pigmentů (chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy). Kumulace kovů v kořenech byla stanovena pomocí metody atomové absorpční spektrometrie. Na základě výsledků pro inhibici růstu kořene jsou kovy uspořádány v pořadí Cu > Se > Cd > Zn > Pb. Při hodnocení účinku kovu na tvorbu fotosyntetických pigmentů byl zaznamenán nejnižší inhibiční účinek na všechny zjišťované pigmenty u selenu, naopak nejvyšší inhibiční účinek mělo olovo. Kadmium obecně inhibuje klíčení semen a růst rostlin, ale z výsledků studie vyplynulo, že ionty kadmia jsou z kořenů

přenášeny do celé rostliny a hromadí se v listech mnohem víc, než v jiných částech rostliny a tím výrazně inhibuje fotosyntézu. Měď jako základní biologický prvek se účastní v mnoha fyziologických pochodech, je tedy potřebná, nicméně, v nadměrné koncentraci je pro rostliny toxická. Studie prokázala její škodlivé účinky způsobující inhibici růstu a změny propustnosti plazmatické membrány. I olovo je pro většinu živých organismů toxické, není prokázána jeho biologická potřeba, proto už první kontakt olova s organismem vyvolává toxický účinek. Při laboratorním experimentu byl prokázán inhibiční účinek na růst, fotosyntézu a poškození pigmentových barviv. I selen patří mezi základní biologické prvky, proto jsou koncentrace stopových množství žádoucí, ale nadměrné množství selenu je jedovaté (dokonce více než rtuť a arsen). Rozdíl mezi základní a toxickou dávkou je poměrně úzký. Studie prokázala, že už malé množství selenu může nepříznivě ovlivnit klíčivost semen a růst rostliny. Hlavně při vyšších koncentracích se selen kumuloval ve tkáních rostlin. I zinek hraje důležitou roli jako esenciální stopový prvek ve všech živých organismech, od bakterií až po člověka. Toxicita zinku je obecně nízká. Obsah zinku v rostlině je druhově specifický, závislý na věku, vegetaci a dostupnosti zinku. Studie prokázala, že mobilita a další příznaky toxicity zinku v rostlinách je mírná v porovnání s ostatními prvky. Při experimentu bylo prokázáno, že Cd a Cu jsou vysoce toxické kovy (zejména Cu), ve srovnání s toxicitou obou těchto kovů je toxicita olova nízká. V hydroponickém roztoku klesala kumulace nahromaděné množství kovů v kořenech v pořadí $Cd > Zn > Se > Pb > Cu$. I když kumulace mědi v kořenech byla velmi nízká, její nepříznivý vliv na růst kořene byl nejsilnější ze všech testovaných kovů. Naopak měla měď, nižší inhibiční účinek na fotosyntetické pigmenty, dokonce nižší než olovo a zinek, ale silnější než vliv selenu a kadmia. Experimentem se dospělo k závěru, že z dosažených výsledků měla měď a selen nejsilnější nepříznivý vliv na růst kořenů. Měď také výrazně ovlivnila inhibici fotosyntetických pigmentů, zde měl nejnižší efekt ze všech použitých kovů selen. Nejvíce se v kořenech rostlin kumulovalo kadmium, následováno zinkem, mědí, olovem a nejméně se kumuloval selen [38].

Mezi mnohými toxickými prvky se těžké kovy, ale i kadmium, olovo, rtuť nebo zinek vyskytují v životním prostředí obvykle z důvodu jejich poměrně vysokého průmyslového použití. Zatím co toxicitu samotných prvků známe, jejich vzájemné působení už moc ne. Proto pozorujeme jejich vzájemné interakce. Byl proveden experiment, na vliv interakcí různých koncentrací zinku a kadmia na letalitu *Artemia Franciscana*, kde se sledoval vzájemný účinek kombinace $ZnSO_4$ a $CdCl_2$. Pokus měl za cíl sledování synergických nebo antagonistických vlastností těchto dvou kovů. Výsledkem bylo zjištění, že v závislosti na koncentraci může kadmium zvyšovat i snižovat toxicitu zinku. Navíc u vyšší koncentrace $CdCl_2$ nad 100 mg.l^{-1} je vidět synergistický toxický účinek obou látek. Z pozorování však lze usoudit, že při použití optimálních, relativně nízkých koncentrací (do 50 mg.l^{-1}) kadmia dochází k výraznému snížení letality *Artemia Franciscana* způsobené $ZnSO_4$ (v koncentracích 50 až 250 mg.l^{-1}) [34].

Byla provedena studie na vliv selenu v páru s metalovým kovem (Cd, Zn, Cu, Pb) na produkci fotosyntetických produktů a akumulaci kovů v sazenicích *Sinapis alba*. Prioritou této studie bylo zjistit, jak se vzájemně ovlivňuje ekotoxicita selenu s kovy ve dvojicích. Jako model experimentu byly použity sazenice hořčice bílé v hydroponickém roztoku. Určovala se ekotoxicita jednotlivých kovů i dvojic selen-kov na produkci fotosyntetických barviv (chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů) a akumulace kovů v kořenech pomocí metody atomové absorpční spektrometrie. Selen je esenciální stopový prvek, ale při zvýšených

koncentracích je pro rostliny a jiné organismy toxický. Selen vzniká a v přírodě se kumuluje převážně ze znečištění lidských zdrojů. Toxické účinky selenu souvisí s jeho podobností se sírou. Některé enzymy metabolismu síry mohou katalyzovat se selen-substráty. Bylo zjištěno, že k poškození rostlin dochází při nahrazení v proteinech síry selenem. Některé rostliny jsou k selenu tolerantní a rychle ho kumulují, pro jiné je už stopové množství toxické. Selen poškozuje klíčení a růst semen. Avšak vzhledem k jiným kovům funguje selen jako protivník k vyrovnaní toxicitě kovů, jako u rtuti, kadmia, arzenu, mědi, stříbra nebo olova. Na druhou stranu, některé kovy, jako je zinek a telur jsou protivníci selenu a mohou ovlivňovat jeho toxicitu. V současné době se zvýšila pozornost okolo selenu, vzhledem k jeho schopnosti účinného snižování mutagenity. Selen může také reagovat přímo s karcinogenem a brání mu v interakci s DNA. Při párových kombinací s vybranými prvky bylo prokázáno, že přestože samostatně jsou prvky vysoce toxické, při vzájemném působení se vzájemně ovlivňují. Byl prokázán silný inhibiční účinek selenu k druhému kovu v páru s kadmíem, mědí, olovem a zinkem. Vztah mezi selen a těžkými kovy je závislá na poměru mezi prvky. V páru s mědí, olovem a kadmíem selen snižoval jejich vzájemnou ekotoxicitu a inhibiční účinek klesal. Vůči těmto prvků selen působí jako antagonist. Avšak ve dvojici se zinkem nedocházelo ke snížení ekotoxicity. Výsledky byly úměrné součtu ekotoxických účinku jednotlivých prvků, v tom případě mezi selenem a zinkem dochází k adici [39].

Při hodnocení směsi těžkých kovů na okřehek menší (*Lemna minor*) bylo cílem studie pozorovat a zjistit ekotoxický účinek vyvolaný směsí kovů (Pb, Mn, Ni, Zn a Fe) na bioindikátor, kterým je právě okřehek. Tento test je často používán u kontroly povrchových vod, při kontrole průmyslových zařízení, čistíren odpadních vod, galvanoven (zpracování elektrolytickým pokovováním) a dalších zařízení, kde přitéká voda zpět do recipientu. Při vypouštění takto kontaminovaných vod do životního prostředí jde o spolehlivý zdroj kumulace kovů v povrchových vodách. I když vypouštění je regulováno zákony, je mnoho zdrojů s malým rozsahem, které nejsou zákonem omezeny a nařízení se na ně neuplatňuje, avšak i tyto malá zařízení svojí činností zasahují do životního prostředí. Experiment se soustředil na růst a metabolismus rostliny. Také se měřila kumulace kovů v rostlinách. I když se normálně těžké kovy ve sladkých vodách vyskytují v poměrně nízkých koncentracích, při kontaktu recipientu s kontaminovaným přítokem se výrazně zvyšuje účinek na okolí a koncentrace prudce stoupá. Kovy se kumulují a mohou se dostávat až do potravních řetězců. Ke studii byl vybrán okřehek menší (*Lemna minor*), protože je to vodní rostlina a jde o vztah k obsahu kovu z vodního prostředí, používá se jako významný bioindikátor při detekci a monitorování znečištění kovy a je známý svojí citlivostí při kumulaci kovů. U takto kontaminovaných vod nelze zcela předvídat chování směsi kovů, ani poskytnout informace vztahující se ke specifickým podmínkám v prostředí. Experimentem byl prokázán předpokládaný ekotoxický účinek. U okřehku došlo k viditelnému poškození (změna v počtu a velikosti listů, nižší hmotnost, inhibice růstu). Byla pozorována ekotoxicita samostatných prvků i směsi. Při směsi se nepříznivý účinek jednotlivých kovů buď snižoval, to bylo způsobeno zinkem, který působí jako antagonist. Nebo se v porovnání s účinkem jednotlivých kovů neměnil. Všechny kovy se kumulovaly v kořenech rostliny [40].

Při pozorování vzájemného účinku párových kombinací Cd s Cu, Zn, Pb a Fe na růst kořene a akumulaci kovů v kořeni a nadzemních částech klíčících rostlin hořčice bílé (*Sinapis alba*) bylo zjištěno, že všechny párové kombinace, v porovnání s kontrolou i s každým kovem samostatně výrazně inhibovaly růst kořene. Kovy se ve větším množství kumulovaly

v kořenech než v nadzemních částech, ať už byly do roztoku přidávány jednotlivě nebo v párech. Zjistilo se, že nejvíc se v obou částech rostliny kumulovalo Cd, resp. Cu. Kovy přidávané v kombinaci se v kořenech kumulovaly v menším množství než při odděleném přidavku [41].

V jiném experimentu se určoval účinek vzájemných interakcí pěti stopových prvků Cu, Ni, Mo, Mn a V na produkci fotosyntetických pigmentů v semenách sazenic hořčice bílé (*Sinapis alba*). Testování kovů probíhalo jak jednotlivě, tak ve vzájemných párových kombinacích. Výsledkem bylo zjištění, že při růstu semen jen v přítomnosti Mn, V a Cu se velmi snižovala tvorba chlorofylu a i chlorofylu b, spolu s karotenoidy. Naopak Mo a Ni neměli nepříznivý vliv na tvorbu chlorofylu ani karotenoidů, průkazně snižovali jen obsah chlorofylu b. Při většině párových kombinací se nepříznivý účinek jednotlivých kovů na tvorbu pigmentů buď snižoval nebo se v porovnání s účinkem jednotlivých kovů neměnil [42].

3.2.2 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou látky, které při kontaktu s organismem vyvolávají nějaký účinek. Účinkem se rozumí biologická změna, tedy projev interakce látky s organismem. Tato biologická změna je vyvolaná nebo souvisí s působením látky na organismus. Účinek chemikálie je tedy následek interakce mezi škodlivinou a biologickým systémem. Při této interakci působí sloučenina na organismus (vyvolává účinek), ale působí i organismus na sloučeninu (biotransformace, nebo-li přeměnou škodliviny v organismu biochemickými mechanismy). Sledovaný účinek tedy nemusí být vždy vyvolán původní látkou, která je aplikována, ale jejím metabolitem. Na organismus mohou působit škodlivě, jak látky syntetické, tedy v živém organismu se normálně nevyskytující, pro organismus cizí, tyto cizorodé látky se nazývají xenobiotika. Na organismus můžou škodlivě působit i látky organismu vlastní nebo pro život nezbytné (vitamíny, hormony, metabolity, stopové esenciální prvky) působí-li ve větším množství než fyziologickém. Chemickou škodlivinou (noxou) se rozumí látky schopná způsobit poškození, vyvolat onemocnění nebo odchylku od normálního stavu. Tato odchylka lze odhalit v průběhu styku se škodlivinou, v návaznosti, v pozdějším období života organismu nebo až v budoucích generacích organismu. Z hlediska ekotoxikologie je možné považovat za potenciální škodlivinu každou látku. Všechny sloučeniny jsou toxické. Neexistuje sloučenina, která by nebyla jedem. Rozdíl mezi lékem a jedem je dávka a její velikost. Každá látka může mít za určitých okolností nějaký nepříznivý účinek. Neexistuje žádná látka pro organismus zcela indiferentní, ale rozdíly v intenzitě účinku mohou být obrovské. Všechny chemické látky mají svou strukturu, ta podmiňuje jejich biologické účinky. Biologické účinky vyvolávají humánní a ekologická rizika, tedy akutní ohrožení daným jevem v konkrétní situaci. Je-li účinek látky vázán na konfiguraci molekuly a již malé změny ve struktuře látky mohou podstatně ovlivnit působení, označuje se účinek škodliviny jako specifický. Dochází k zásahům do biochemických pochodů. Při biotransformaci dochází ke změně chemické struktury původní škodliviny a tím ke změně všech jejích vlastností. Důsledkem biotransformace může být jak snížení až vymizení ekotoxicity, tak její zvýšení. V případě účinku zapříčiněného některou obecnou fyzikálně chemickou vlastností látky, málo závislou na struktuře škodliviny, hovoříme o nespecifickém působení látek [43,44].

Biologicky aktivní látky ovlivňují organismy a vyskytují se v ovzduší, v půdách, ve vodě. Do životního prostředí se dostávají hlavně z vody, protože se nedají účinně eliminovat technologiemi v čistírnách odpadních vod a odtud se dál šíří do prostředí. Často se kumulují a usazují v tkáních organismů. Příkladem biologicky aktivních látek jsou látky jednak přírodní (hormony, alkaloidy nebo přírodní toxiny), které už v prostředí jsou, ale záleží na dávce, působení a interakci s organismem a látky syntetické, které se do prostředí dostávají z průmyslové výroby, zemědělské a lidské činnosti apod. (DDT, humánní a veterinární léčiva, pesticidy, dezinfekce) [43,44,45].

Léčiva vyskytující se v životním prostředí mají při dlouhodobějším účinku toxický a ekotoxický vliv na organismy ve složkách životního prostředí. Spotřeba léčiv prudce stoupá. Existuje desetitisíce druhů léků s obsahem okolo 300 různých účinných látek. Nejčastěji se vyskytují antibiotika a hormonální antikoncepce. Z léčiv působících na centrální nervovou soustavu jsou nejčastější anestetika, která působí celkové nebo částečné znecitlivění (diethyleter, halotan, barbituráty, thiopental), hypnotika a sedativa mají uspávací a uklidňující účinky (ethanol, nitrazepam, triazolam). Další skupinou jsou neuroleptika tlumící psychické stavy (thalidomid, fenothiazin), analgetika (kodein, heroin). Antagonistou morfinu je jeho derivát naloxon. Do skupiny analgetik patří i kyseliny acetylsalicylové, která je jednou z nejvíce vyskytujících se látek ve vodním prostředí. Vedle kyseliny acetylsalicylové se ve vodním prostředí prokázaly rostoucí koncentrace paracetamolu, antipyrinu. Vedle léčiv se do životního prostředí dostávají i drogy (amfetamin, methamfetamin, efedrin, lysergamid), pesticidy, insekticidy (DDT), dezinfekce (formaldehyd), freony, polychlorované bifenyly. Léčiva se do vodního prostředí dostávají vlivem lidské činnosti, a to jejich používáním. V stále aktivním stavu se léčiva do vod dostávají nesprávnou likvidací léčiv v domácnostech (odpadní vody) nebo také jejich metabolity vznikající při aplikaci léčiv, které vzniknou biotransformací v lidském organismu a následnou jejich eliminací. Kontaminovaná voda z např. z domácností odtéká kanalizační sítí a následně do čistíren odpadních vod, které však nejsou schopny všechny tyto látky odstranit, tím se dostávají dále do životního prostředí. Ať už do povrchových vod, kde působí na ryby, nebo podzemních vod, které složí jako zdroj pitné vody, stejně tak se váží na kal v čistírně, ten se využívá jako hnojivo, kontaminují se půdy a látky se dostávají do potravního řetězce [45].

Působení léčiv na vodní organismy se v poslední době staly aktuálním tématem v oblasti stanovení jejich ekotoxicity pro vodní organismy. V roce 2002 byla provedena studie, která zhodnotila ekotoxický účinek na organismy *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus* a *Lemna minor*. Organismy byly vystaveny různým koncentracím a směsím léčiv. Studie určila, že okřehek menší (*Lemna minor*) se projevil jako vysoce sensitivní testovaný druh [30]. Při měření hodnot EC 50 pro tyto organismy a některé léčiva byly naměřeny následující hodnoty. U ibuprofenu byly hodnoty EC 50 na *Daphnii magna* 108 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* 315 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 22 mg.l⁻¹. U diklofenaku sodného na *Daphnii magna* 68 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* 72 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 7,5 mg.l⁻¹. U kyseliny 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionové (clofibrin) na *Daphnii magna* 72 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* 115 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 12,5 mg.l⁻¹. U naxoprenanu sodného na *Daphnii magna* 174 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* více než 320 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 24,2 mg.l⁻¹. U karbamazepinu na *Daphnii magna* více než 100 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* 74 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 25,5 mg.l⁻¹. U kaptoprilenu na *Daphnii magna* více než 100 mg.l⁻¹, u *Desmodesmus subspicatus* 168 mg.l⁻¹ a u *Lemna minor* 25 mg.l⁻¹ [46].

V posledních letech se zvýšil výskyt reziduí léčiv v povrchových a pitných vodách, tím vzrostl i zájem o jejich zpracování ve vědeckých publikacích. Mnoho studií ukázalo, že farmaceutické sloučeniny jsou ve vodním prostředí přítomny ve zvýšených koncentracích. Mezi nejčastější zjištěné látky patří beta-blokátory, analgetiky, estrogeny nebo třeba antibiotika. Dlouhodobý monitoring z čistíren odpadních vod a povrchových vod na různých vodních tocích a jezerách, prokázal, že diklofenak je jeden z nejčastěji se vyskytujících farmaceutických látek přítomných ve vodním cyklu. Vzhledem k jejich specifickému způsobu účinku a skutečnosti, že tyto sloučeniny jsou záměrně navrženy tak, aby ovlivňovali organismus lidí, savců nebo jiných obratlovců. Rezidua léčiv v životním prostředí vyvolávají větší ekotoxický účinek, než působí třeba pesticidy, herbicidy a další chemické látky, které ovlivňují rostliny, plevel, houby a bezobratlé organismy. Zvláště u některých malých vodních toků je příjem množství těchto látek relativně velký, takto značně znečištěná voda má koncentrace těchto léčiv až více než 1 mg.l. I přesto však není stále u některých druhů léčiv prokázán způsob účinku léčiv o obecném tvrzení jejich možných ekologických znečištění. Studie posouzení možných ekotoxických účinků na rezidua léčiv jsou rozptýlené a velmi málo obsahují informace a údaje o toxicitě jejich směsí. Tyto studie jsou velmi důležité, protože zbytky léčiv, které se obvykle nacházejí ve vodním prostředí se vyskytují jako směsi. Tyto látky se při čištění vody částečně odstraňují, ale nejdou odstranit úplně. Nevýhodou je málo informací o ekotoxických účincích reziduí léčiv, na rozdíl od množství analytických údajů kovů. Avšak v dnešní době se výzkum těchto látek hojně rozšířil. Byla provedena studie, kde byla pozorována vodní ekotoxicita léčiv, včetně jejich vzájemných účinků na vodní organismy [46,47].

Studie hodnotila ekotoxické relevance farmaceutických sloučenin a směsí pomocí biotestů. Byly vybrány tři testy, inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*), imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* a řasový test na zelené sladkovodní řase *Desmodesmus subspicatus*. Tím, že se analyzuje ekotoxický účinek více látek v jedné směsi, dochází ke kombinaci efektů, které musíme vzít v úvahu při tomto hodnocení těchto složitých směsí různých látek. Při těchto látkách musíme brát v úvahu, jestli koncentrace jednotlivých látek přítomných ve směsi, vyvolá stejný ekotoxikologický účinek, který způsobí stejný efekt samostatně jako ve směsi, protože existuje rozdílné působení látek ve směsi. Látkami použitými pro experiment byly deriváty kyseliny 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionové (metabolit z řady léčiv hypolipidematik), karbamazepin (antiepileptikum), propranolol a metoprolol (b-blokátory), ibuprofen sodná sůl, sůl diklofenaku sodného a naproxen sodný (analgetika), kaptopril (anti-hypertenziva) a metformin (anti-diabetika). Testování látek proběhlo samostatně i v různých kombinacích. Bylo zjištěno, že samostatné látky se ve směsích výrazně ovlivňují, například ve dvojici 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionové kyseliny a karbamazepinu došlo při spojení ke zvýšení ekotoxického účinku. Silný efekt nastal i u kombinace ibuprofen a diklofenak. I když se zbytky léčiv do životního prostředí dostávají postupně a v nižších koncentracích, rozpadají se pomalu a dají se špatně odstranit, tím dochází k jejich kumulaci a růstu ekotoxického účinku. Navíc vybrané sloučeniny patří do různých tříd léčiv s rozmanitými specifickými účinky, kdy každá sloučenina na organismus působí odlišně. Podle výsledků byl nejvíce toxický diklofenak a nejméně naproxen. Je ale třeba brát v úvahu způsob účinku těchto látek, který je znám pouze pro cílové organismy (tedy člověka, popř. pár laboratorních savců). Experiment prokázal obecný fakt, že když se léčiva používají k zeslabení nebo zesílení léčby, je třeba vzít v úvahu, že pokud mají zesilující nebo zeslabující účinek v této fázi, budou se tak vzájemně ovlivňovat i při vzájemných

interakcích. V důsledku toho bychom měli mít v úvahu, že pokud jedna látka vyvolá toxicitu, může i silně zvýšit toxicitu v kombinaci s jinou látkou, zejména u látek s vzájemným působícím účinkem. Jedná-li se o léčiva, dochází k vzájemnému ovlivnění velmi často. Výsledky potvrdily, že pokud jde o hodnocení rizik pro životní prostředí léčiv, jsou pro jednotlivé látky účinky mírné, ale v případě spojení účinků látek může dojít i v případě, že toxicita jedné látky je nízká, ke zvýšení ekotoxického účinku, z důvodů společné kombinace vzájemných účinků. Zkoušky s kombinacemi různých léčiv odhalil silnější účinky, než se očekávalo po měření účinků jednotlivých látek [46,47].

Podobná studie byla také provedena pro stanovení ekotoxicity směsi diclofenacu, ibuprofenu, naproxenu a kyseliny acetylsalicylové. K testování byly vybrány dva testy, imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* a řasový test na *Desmodesmus subspicatus*. Výsledky jsou podobné, akutní toxicita těchto látek se zdá být nepravděpodobná, to je vzhledem k faktu, že testované látky jsou léčiva logické, protože silné akutní účinky nemůžeme ve skutečnosti očekávat, protože akutní toxicita by omezila farmaceutický prospěch sloučeniny. Při kumulování v životním prostředí však může docházet k chronickým účinkům. Stejně je to i s ekotoxickým účinkem a akutní toxicitou všech testovaných látek, u jednotlivých látek je mírný, avšak ve směsi byl značný a to už i při koncentracích, při kterých jednotlivé látky neprokázaly žádný nebo jen velmi malý vliv. Naměřené hodnoty EC50 prokázaly, že potenciálně škodlivý pro vodní organismy je pouze diklofenak. Při hodnocení ekotoxicity směsí byly naměřeny vysoké hodnoty EC50, z toho vyplývá, že pokud látky působí zároveň, způsobují vyšší ekotoxické účinky než samotné látky. Toxičtější byly směsi v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou [47].

3.2.3 Binární směsi kovů a léčiv

Toxikologická studie sledovala akutní toxicitu binárních směsí těžkých kovů a léčiv [49]. Tuto studii lze považovat za přelomovou v problematice stanovení toxicity binárních směsí kov-léčivo a lze z ní vycházet také pro hodnocení ekotoxicity binárních směsí různých látek (kov-kov, kov-léčivo a jiné typy binárních kombinací látek). Tato studie je pouze jediná, která se zabývá působením kovů v kombinaci s léčivy, prozatím byly provedeny studie kombinace kovů mezi sebou nebo kombinace léčiv [41,46,47,49].

Vzhledem k současnému působení škodlivých látek z různých oblastí může na jednom místě působit společně odpad z průmyslové výroby, léčiv a zemědělství. Pro experiment [49] byly použity léčiva diklofenak a 3,4-dichloranilin v kombinaci s kationy niklu, protože tvoří část znečišťujících látek v životním prostředí. Jde o polutanty, které se do životního prostředí dostávají z různých zdrojů (farmacie, chemický průmysl, zemědělství) a působí rozdílnými mechanismy. Nikelnaté ionty jsou pro organismy esenciální, nicméně výroba tisíců tun sloučenin niklu, průmyslové emise i zemědělství má za následek kontaminaci ovzduší, půdy i vod sloučeninami niklu. Hlavně produkce chloridu nikelnatého se mnohonásobně znásobila. Chlorid nikelnatý je klasifikován jako toxický se symbolem T, je podezřelý z karcinogenity, genotoxicity a z alergizujících účinků. Proto tedy, i když je nikl pro organismy esenciální, je v nadměrném množství toxický. Podobně jako 3,4-dichloranilin, který se dostává do životního prostředí rozkladem herbicidů diuronu, linuronu a propanilu, používaných v zemědělství k ochraně rostlin. Látka 3,4-dichloranilin se snadno váže na organický materiál v půdě a tam

se kumuluje. Jako třetí byl vybrán diklofenak, jehož účinnou látkou je kyselina 2-[2,6-dichlorfenyl]amino]benzenoctová, a je často užívána jako účinná látka v protizánětlivých nesteroidních léčivech, která má analgetické a antipyretické vlastnosti, proto je často užíván v lécích tlumících bolest kloubů a svalů. Spolu se svými metabolity značně kontaminuje životní prostředí. Protože není vždy známé, jak se složky v účincích navzájem ovlivní, není odhad rizika expozice směsím chemických látek jednoduchý. I když je předpoklad, že se velikosti účinků jednotlivých složek sčítají, nemusí to tak být. Při stanovení nebezpečnosti styku s chemickými látkami je důležitou vlastností jejich akutní toxicita. Pro její stanovení je v současné době snaha použít alternativní test k testům na zvířatech jak *in vitro*, tak *in silico*, které by původní testy na obratlovcích nahradili. Takovým testem by mohl být i test na primárních hepatocytech z potkana, který v sobě spojuje výhody testů na nižších organismech s výhodami testů na vyšších organismech. Výhodou testů na nižších organismech je práce s roztoky sloučenin a velký počet testovacích „jednotek“, tedy jaterních buněk. U testů vyšších organismů jde o buňky savců. Pro testování toxicity není použití jaterních buněk nová záležitost. Cílem této studie bylo stanovit akutní toxicitu dvou směsí látek s rozdílným působením a původem, chloridu nikelnatého s diklofenakem a chloridu nikelnatého s 3,4-dichloranilinem. Pro stanovení toxicity těchto směsí byly použity primární hepatocyty z potkana. Byly stanoveny efektivní koncentrace pro ireversibilní poškození membrán buněk barvením trypanovou modří, viabilitu a efektivní koncentraci pro zásah do metabolických funkcí buněk [49].

Experiment byl proveden následovně, nejprve byly izolovány hepatocyty, po odstranění vápenatých iontů z jater perfuzí roztokem, obsahujícím chelatační činidlo EGTA, byly buňky uvolněny perfuzí roztokem obsahujícím kolagenosu, ta uvolní kolagenové buňky ve struktuře jaterní tkáně. Získaná suspenze se převedla do kultivačního média, do něho se přidává testovaná látka v různých koncentracích. U každé je stanovena životnost (viabilita) hepatocytů barvením Trypanovou modří. Průměrná životnost se pohybuje kolem 80%. K optickému rozlišení ireversibilního poškození buněčné membrány hepatocytů použijeme mikroskop, pod ním se vitální hepatocyty zobrazí morfologicky bez poruchy, jako samostatné kulaté buňky. Barvivo neproniká do neporušených, živých buněk a obarví jen buňky s poškozenou membránou, mrtvé buňky. Životnost je kvantifikována jako poměr počtu živých buněk proti celkovému (živé i mrtvé) počtu buněk. Pokud tedy nedojde k úhynu a všechny buňky zůstanou živé, je životnost 100%. Vyhodnocení se provádí pomocí Bürkerovy komůrky. Průměr poměrů mezi živými buňkami a celkovým počtem buněk je označen za počáteční (nulovou) životnost připravené suspenze hepatocytů. Životnost blanku (kontrola bez jakékoliv látky) zmenšená o počáteční životnost je pokládána za 100% životnost. Účinnost všech koncentrací testované látky je počítána po 60 minutách expozice v procentech ze 100% životnosti kontrolního roztoku. Z výsledků jednotlivých měření je konstruována křivka závislost velikosti účinku, životnost na koncentraci a vypočítá se EC50. Tento test stanovuje funkční integritu a metabolickou schopnost nebo neschopnost hepatocytů a nabourání jejich metabolických cest. Narušení metabolických cest je charakterizováno změnou schopnosti měnit ornitin v močovinu. Koncentrace močoviny se měří spektrofotometricky. Rozdíl mezi koncentrací močoviny na počátku pokusu před přidáním testované látky a po 30 minutách expozice sledovanou látkou odpovídá tvorbě močoviny. Tento rozdíl ve vzorku, do kterého nebyla přidána žádná látka je pokládán za 100% a hodnoty exponovaných vzorků jsou k této kontrolní hodnotě vztaženy. Stanovení se provádělo v tomtéž roztoku, jako byla měřena životnost barvením Trypanovou modří. Poté byla

sestrojena křivka závislosti velikosti účinku na koncentraci testované látky. Hodnoty EC50 v molárních koncentracích udávají koncentraci testovaných látek v roztoku, při které dochází ke snížení životnosti buněk nebo metabolické aktivity na 50% [49].

Pro testování byl použit chlorid nikelnatý, 3,4-dichloranilin a diklofenak sodný. Účinek binárních směsí byl testován při různém molárním poměru látek ve směsi. Pro jednotlivé směsi byla stanovena EC50 jako souhrnná koncentrace látek ve směsi, která způsobuje účinek. Byly měřeny hodnoty EC50 pro samostatné látky a pro směsi chloridu nikelnatého s 3,4-dichloranilinem a směsi chloridu nikelnatého se sodnou solí diklofenaku. Výsledky prokázaly, že toxicita směsi diklofenaku s 3,4-dichloranilinem má aditivní účinek, tedy velikosti účinků jednotlivých složek směsi se sčítají a dochází jen k nepatrnému vzájemnému ovlivnění. Naopak ve směsi diklofenaku s chloridem nikelnatým dochází k prudkým vzájemným interakcím a výraznému ovlivnění. V této směsi dochází k vytvoření světlezelené sraženiny. Při porovnání s toxicitou roztoku samotného chloridu nikelnatého, která byla při jeho přebytku vysoká, ale ve směsi s diklofenakem toxicita sole diklofenaku byla postupně eliminována, právě za vzniku sraženiny. V závislosti na poměru koncentrací složek toxicita směsí klesá až téměř k žádné. Vedle tvorby sraženiny, lze i předpokládat vliv nikelnatých iontů na metabolismus diklofenaku. Toxické účinky diklofenaku nejsou zanedbatelné, naopak patří k vysoce toxickým látkám, avšak v přítomnosti niklu se jeho toxicita výrazně snižuje. To znamená, že v přírodě může docházet i ke snižování ekotoxicity některé složky znečištění působením jiné složky [49].

I když tato studie je z oblasti toxikologie její význam spočívá v její aplikaci pro studium ekotoxických účinků binárních kombinací kov-léčivo, které nebyly dosud studovány. Tato studie může ovlivnit další vývoj stanovování ekotoxických účinků binárních směsí pro vodní nebo terestrické organismy, kdy mohou být aplikovány testy ekotoxicity na analogickém principu. Dalším důležitým faktem je způsob vyhodnocování toxických účinků s využitím normalizace účinku pro binární směsi. Způsob realizace, metodika a vyhodnocování testu lze také využít v stanovení ekotoxicity binárních směsí [49].

4. ZÁVĚR

V dnešní době je působení chemických škodlivin na člověka a na životní prostředí zcela běžné. Chemické látky vstupují do našeho prostředí z mnoha oblastí lidské činnosti, zemědělství, průmyslové výroba, farmacie, zdravotnictví a dopravy. Nejen toxické kovy a chemické škodliviny, ale i biologicky aktivní látky vyvolávají při kontaktu s organismem účinek, tedy nějakou biologickou změnu. Při všech vzájemných interakcích se látky vzájemně ovlivňují. Práce se zabývá právě těmito interakcemi, které posuzují, jestli se při kontaktu dvou nebo více látek jejich toxický a ekotoxický účinek zvětšuje, zmenšuje, sčítá nebo násobí. Výsledky jsou přínosné při různých stanovení běžně užívaných v praxi. Zatím co, toxicita jednotlivých látek je více známá, jejich vzájemné interakce už tolik ne. Právě toto jejich společné působení je jednou z možností, která se dá určit při testech ekotoxicity na testovacích organismech. Z ekotoxicity jednotlivých látek se dá určit účinek při stanovení binárních směsí. A při stanovení pro složitější interakce se zase vychází z výsledků u binárních směsí. Práce shrnuje poznatky, kterých je stále celkem málo, hlavně při interakcích kovů s léčivy, ale vzhledem k vývoji velkému množství nových chemických látek je nezbytné neustále rozvíjet a studovat tyto interakce a jejich vzájemné ovlivňování.

5. SEZNAM LITERATURY

- [1] PROKEŠ, J. et al. *Základy toxikologie. Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Galen, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum ISBN 80-7262-301-X
- [2] LAPČÍKOVÁ, A.: *Posouzení ekotoxicky vybraných syntetických vonných látek*. Brno: FCH VUT v Brně, 2009. 120s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- [3] SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J.: *Ekotoxikologie – praktická cvičení, část I*. 1. Vydání. Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Brno 2000. 72s. ISBN 80-85114-95-X
- [4] AMBROŽOVÁ, J., *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2.vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha. 2003. 226s. ISBN: 80-7080-521-8
- [5] Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Ministerstvo životního prostředí České republiky. Odbor odpadů. [online] [cit. 2011-19-03]. Dostupné z WWW: <http://www.inisoft.cz/public/upload/attachments/k-strankam/legislativni-prirucka/metodicke-pokyny/mp_ekotoxicita.pdf> 17 s. Praha. 2007.
- [6] *PolyTox™*. Capitol Scientific, Inc. [online] [cit. 2011-17-03]. Dostupné z WWW: <[http://www.capitolscientific.com/estylez_ps.aspx?searchmode=category&searchcatcontext="+7eSAFETY+7eSAFE-A+2fL+7eEYE+26FACE~LABORATORY~LAB-T%2fU~LAB-TESTKI~TESTK-POLY](http://www.capitolscientific.com/estylez_ps.aspx?searchmode=category&searchcatcontext=)>
- [7] SVOBODOVÁ, Z., BEKLOVÁ, M., MÁCHOVÁ, J., DOBŠÍKOVÁ, R., MÁCOVÁ, S., MODRÁ, H., VELÍŠEK, J.: *Ekotoxikologie – praktická cvičení, Testy na organismech vodního prostředí*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Brno 2010. 84s. ISBN 978-80-7305-120-4
- [8] Bakteriální bioluminiscenční test toxicity (BBTT) – LUMISTox. Toxicita.cz. [online] [cit. 2011-21-03]. Dostupné z WWW: <<http://www.toxicita.cz/biotesty/bakterialni-bioluminiscenčni-test-toxicity-lumistox/>>
- [9] Bioassay Kits for water analysis. BioHidrica. [online] [cit. 2011-21-03]. Dostupné z WWW: <http://www.biohidrica.cl/biohidrica_productsenvironment_water.htm>
- [10] Test Daphtoxkit F magna. Test procedure. Slide show of toxki testing procedures. [online] [cit. 2011-21-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.microbiotests.be/>>
- [11] HÁJKOVÁ, T.: *Využití řasových testů v ekotoxikologii*. Brno: FCH VUT v Brně 2010. 61s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- [12] Kontaktní testy toxicity. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě. [online] Ostrava. [cit. 2011-07-04]. Dostupné z WWW: <http://www.zuova.cz/sluzby/kontaktni-testy-toxicity.php>

- [13] Kontaktní testy ekotoxicity. Envisan GEM, a.s., Geologie, Ekologie, Mikrobiologie. [online] [cit. 2011-09-04]. Dostupné z WWW: <http://www.envisan.cz/index.php?lang=cz&kategorie_id=44>
- [14] ŠTĚPÁNKOVÁ, I.: *Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity*. Brno: FCH VUT v Brně, 2009. 57s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- [15] ČSN EN ISO 6341: Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. Vydána: 1997.12.01. Účinnost: 1998.01.01 Český normalizační ústav. 1998.
- [16] FARGAŠOVÁ, A.: *Využívání ekotoxikologických testů na hodnocení kvality životního prostředí*. Univerzita Komenského v Bratislavě. Přírodovědecká fakulta.
- [17] ČSN ISO 10706: Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera*, *Crustacea*). Vydána: 2001.12.01. Účinnost: 2002.01.01. Český normalizační ústav. 2002.
- [18] ČSN ISO 10229: Jakost vod – Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (*Teleostei*, *Salmonidae*)]. Vydána: 1997.03.01. Účinnost: 1997.04.01. Český normalizační ústav. 1997.
- [19] ČSN EN ISO 11348-1: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01. Český normalizační ústav. 2009.
- [20] ČSN EN ISO 11348-2: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01. Český normalizační ústav. 2009.
- [21] Okřehek menší. Wikipedie, otevřená encyklopedie. [online] [cit. 2011-07-04]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ok%C5%99ehek_men%C5%A1%C3%AD>
- [22] ČSN EN ISO 11348-3: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Vydána: 2009.05.01. Účinnost: 2009.06.01. Český normalizační ústav. 2009.
- [23] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. 2004. 16 s.
- [24] OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. Environment Directorate. Chemicals Testing – Guidelines. [online] [cit. 2011-17-03]. Dostupné z WWW: http://www.oecd.org/document/33/0,3746,en_2649_34377_45375841_1_1_1_1,00.html

- [25] ČSN EN ISO 7346-1: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoilton – Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – Část 1: Statická metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01. Český normalizační ústav. 1999.
- [26] ČSN EN ISO 7346-2: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoilton – Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – Část 2: Obnovovací metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01. Český normalizační ústav. 1999.
- [27] ČSN EN ISO 7346-3: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoilton – Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – Část 3: Průtočná metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01. Český normalizační ústav. 1999.
- [28] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. 1992. 9 s.
- [29] ČSN EN ISO 10253: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu mořských řas *Skeletonem costatum* a *Phaeodactylum tricornutum*. Vzdána 2006.12.01. Účinnost: 2007.01.01. Český normalizační ústav. 2007.
- [30] ČSN EN ISO 8692: Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Vzdána: červenec 2005. Účinnost: 2005.08.01. Český normalizační ústav. 2005. 20s
- [31] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 201. Alga, Growth Inhibition Test. 1984. 14 s.
- [32] ČSN EN ISO 20019: Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehku. Vydána: 2007.05.01. Účinnost: 2007.06.01. Český normalizační ústav. 2007.
- [33] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. No. 208. Terrestrial Plants, Growth Test. 1984. 6 s.
- [34] NOVÁKOVÁ, J., DAŇOVÁ, D., STRÍŠKOVÁ, K., HROMAD, R., MIČKOVÁ, H., RABIŠKOVÁ, M.: *Zinc and kadmium toxicity using a biotit with Artemia franciscana*. Acta veterinaria. 2007. Ročník 76. Číslo 4. Strana 635-642
- [35] PROKEŠ, J.: *Úvod do toxikologie*. Praha 2005. 69s.
- [36] DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H., *Obecná toxikologie*. FCH VUT v Brně, 2011. [online] [cit. 2011-04-04] Přednášky. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=95652>>
- [37] KOMÍNKOVÁ, D., *Ekotoxikologie*. České vysoké učení technické v Praze, Nakladatelství ČVUT, 2008, 1.vydání, 156 s., ISBN 978-80-01-04058-4

- [38] FARGAŠOVÁ, A.,: *Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of Sinapis alba*. Plant, Soil and Environment. 2004. Ročník 50. Číslo 1. strana 33-38
- [39] FARGAŠOVÁ, A., PASTIEROVÁ, J., SVETKOVÁ, K.,: *Effect of S-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in Sinapis alba L. seedlings*. Plant, Soil and Environmental. 2006. Ročník 52. Číslo 1. Strana 8-15
- [40] HORVAT, T., VIDA KOVIĆ-CIFREK, Ž., OREŠČANIN, V., TKALEC, M., PEVALEK-KOZLINA, B.: *Toxicity assessment of heavy metal mixtures by Lemna minor*. Science of the Total Environment. 2007. Strana 229-238
- [41] FARGAŠOVÁ, A.,: *Effect of Cd in combination with Cu, Zn, P and Fe on root prolongation and metal accumulation in the roots and cotyledons of mustard (Sinapis alba) seedlings*. Rostlinná výroba. 2001. Ročník 47. Číslo 3. strana 97-103
- [42] FARGAŠOVÁ, A.,: *Trace metal interactions expressed through photosynthetic pigment contents in Sinapis alba seedlings*. Rostlinná výroba. 2000. Ročník 46. Číslo 8. strana 337-342
- [43] PICKA, K., MATOUŠEK, J.,: *Základy obecné a speciální toxikologie*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. 1996. Ministerstvo Životního prostředí České republiky. Svazek 28. 103 s. ISBN: 80-85-368-91-9
- [44] TICHÝ, M., *Toxikologie pro chemiky. Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 2. Vydání. Nakladatelství Karolinum. Univerzita Karlova v Praze. Praha. 2004. ISBN: 80-246-0566-X
- [45] PROKEŠ, J. et al. *Základy toxikologie I. Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Univerzita Karlova v Praze. Vydavatelství Karolinum. 1. vydání. Praha. 1997. ISBN 80-7184-418-7
- [46] CLEUVERS, M.,: *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology Letters. 2003. Číslo 142. strana 185-194
- [47] CLEUVERS, M.,: *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2004. Číslo 59. strana 309-315
- [48] BALOG, K., ZAPLETALOVÁ-BÁRTLOVÁ, I., *Základy toxikologie*. 1. Vydání. Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě. 1998. 107s. ISBN: 80-86111-29-6
- [49] POKORNÁ, A., TICHÝ, M., NERUDOVÁ, J., TUMOVÁ, J., HANZLÍKOVÁ, I.,: *Stanovení toxicity binárních směsí pomocí hepatocytů z potkana*. Chemické Listy. 2009. Číslo 103, str. 575-580
- [50] Synergismus, antagonismus. [online] [cit. 2011-11-04]. Dostupné z WWW: <http://www.animal-health-online.de/rtest/fruehzeitig.html>

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CHCl_3 – trichlormethan

CCl_4 – tetrachlormethan

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EC – European Commission

EC50 – efektivní koncentrace (střední koncentrace), half maximal effective concentration, koncentrace látky, která vyvolá 50% úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu

EGTA – etylen glykol tetraoctová kyselina

DDT – dichlordifenyltrichlormethylmethan

ISO – International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)

US EPA – U.S. Environmental Protection Agency