

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

STANOVENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK S
VYUŽITÍM ŘASOVÉHO TESTU.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

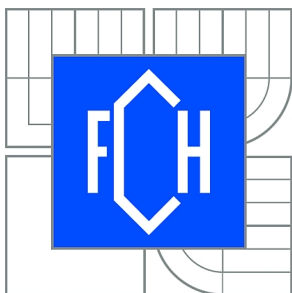
HEDVIKA ŽAJGLOVÁ

BRNO 2011



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

STANOVENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK S VYUŽITÍM ŘASOVÉHO TESTU.

EVALUATION OF ECOTOXICITY OF SELECTED CHEMICALS WITH USING ALGAL TEST.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

HEDVIKA ŽAJGLOVÁ

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-BAK0589/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Hedvika Žajglová	
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:

Stanovení ekotoxicity vybraných chemických látek s využitím řasového testu.

Zadání bakalářské práce:

Vyhodnocení ekotoxicity vybraných chemických látek s využitím řasového testu. Posouzení možných toxických účinků látek a vzorků na vodní producenty.

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.

Hedvika Žajglová
Student(ka)

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

Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá ekotoxickou kyseliny 2-[(2,6-dichlorfenyl)anilin]benzen octové (diklofenak), kyseliny α -methyl-4-(2-methylpropyl)benzen octové (ibuprofen) a směsi diklofenaku s kadmii s využitím řasového testu toxicity v souladu s ČSN EN ISO 8692. V teoretické části je popsána problematika léčiv v životním prostředí, dále charakteristika standardních řasových testů a alternativních testů. U všech realizovaných řasových testů toxicity byly jako testovací organismy použity zelené sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*. Pomocí těchto testů byly stanoveny hodnoty I_rC_{50} pro standardní látku dichroman draselný, samotná léčiva diklofenak a ibuprofen a pro kadmium. Součástí práce je stanovení toxicity kadmia ve směsi s diklofenakem.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the ecotoxicity of 2 - [(2,6-dichlorophenyl)aniline] benzene acetic acid (diclofenac), α - methyl-4-(2-methylpropyl) benzene acetic acid (ibuprofen) and mixture of cadmium and diclofenac and studies the above using algal toxicity test in accordance with ISO 8692. The theoretical part describes the issue of pharmaceuticals in the environment, and characteristics of standards algae tests and alternative tests. Freshwater green algae *Desmodesmus subspicatus* were used as testing organisms in all the implemented algal toxicity tests. By the means of these tests, the I_rC_{50} values for the standard substance potassium dichromate, the drugs diclofenac and ibuprofen and cadmium were determined. The toxicity of cadmium in mixture with diclofenac was also evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

Řasový test, toxicita, ekotoxicita, alternativní řasový mikrobiotest, diklofenak, ibuprofen, kadmium, směs

KEYWORDS

Algal test, toxicity, ecotoxicity, alternative algal microbiotest, diclofenac, ibuprofen, cadmium, mixtures

ŽAJGLOVÁ, H. *Stanovení ekotoxicity vybraných chemických látek s využitím řasového testu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 49 s. 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

Poděkování

Rád bych poděkovala Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při řešení bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Řasové testy toxicity.....	8
2.1.1. Rozdělení řasových testů toxicity	8
2.1.2. Princip řasových testů	9
2.1.3. Řasové testy toxicity se sladkovodními řasami.....	9
2.1.4. Řasové testy toxicity s mořskými řasami	10
2.1.5. Média pro řasové kultury	11
2.1.6. Provedení testu toxicity	13
2.1.7. Spektrofotometrická metoda vyhodnocení řasového testu.....	14
2.1.8. Vyhodnocení EC ₅₀ , IC ₅₀	16
2.2. Alternativní testy	17
2.2.1. Řasový mikrobiotest Algaltokit F TM	17
2.2.2. Řasový mikrobiotest Marine Algaltokit F TM	18
2.3. Přehled norem v oblasti testů ekotoxicity.....	19
2.4. Problematika biologicky aktivních látek ve vodním ekosystému	20
2.4.1. Základní rozdělení léčiv	21
2.4.2. Analgetika	21
2.4.3. Diklofenak.....	22
2.4.4. Ibuprofen	23
2.4.5. Toxicita léčiv pro vodní organismy	24
2.5. Toxicita směsí diklofenaku, ibuprofenu, naproxenu a kyseliny salicylové.....	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1. Chemikálie a testovací organismus	27
3.2. Přístroje a pomůcky	27
3.3. Provedení testu	29
3.3.1. Stanovení ekotoxicity referenční látky dichromanu draselného K ₂ Cr ₂ O ₇	30
3.3.2. Stanovení ekotoxicity ibuprofenu	31
3.3.3. Stanovení ekotoxicity diklofenaku.....	32
3.3.4. Stanovení ekotoxicity kadmia	34
3.3.5. Stanovení ekotoxicity kadmia v binární směsi diklofenak – Cd.....	35

4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1.	Ekotoxicita standardní látky dichromanu draselného.....	37
4.2.	Ekotoxicita ibuprofenu	39
4.3.	Ekotoxicita diklofenaku.....	41
4.4.	Ekotoxicita kadmia	42
4.5.	Ekotoxicita binární směsi diklofenaku a kadmia.....	44
5.	ZÁVĚR	46
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49

1. ÚVOD

Mnoho let je životní prostředí znečišťováno různými polutanty, mezi které patří kovy, polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) a další perzistentní organické látky (POPs). Relativně novým environmentálním polutantem jsou léčiva.

V minulosti byly léčiva rostlinného a živočišného původu. Postupem času se do této oblasti začaly prolínat poznatky z chemie a dnes již většinu léčiv vyrábíme průmyslově. Produkce a spotřeba léčiv je velká a stále stoupá. Lidské tělo nedokáže synteticky vyrobená léčiva rozložit na látky, které by nijak nepůsobily na životní prostředí. A proto dnes nacházíme léčiva ve formě biologicky aktivních látek téměř v každé části životního prostředí. Nejvíce kontaminovanou částí životního prostředí léčivy je voda.

Dnes máme k dispozici mnoho dat o ekotoxicitě jednotlivých léčiv, jejichž akutní toxicita se na životní prostředí výrazně neprojeví. Chronická toxicita však může mít zcela jiné následky. Další skutečností a problémem je, že léčiva a jejich metabolity se v životní prostředí nachází ve směsi spolu s dalšími environmentálními polutanty. Zatím je k dispozici málo informací o tom, jak se navzájem ovlivňují léčiva a další kontaminanty ve vodním prostředí.

Z tohoto důvodu bylo cílem bakalářské práce stanovení nejen ekotoxicity samotných léčiv diklofenaku a ibuprofenu, ale i toxicity kadmia ve směsi a diklofenakem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Řasové testy toxicity

Řasy patří mezi organismy, které jsou pozorovatelné pod mikroskopem a jsou velmi důležitým článkem potravního řetězce. Jejich tělo, které je tvořeno stélkou obsahuje jádro a jadernou membránu, z toho důvodu jsou řazené mezi eukaryotické buňky. Obývají především vodní prostředí, ve kterém tvoří autotrofní složku společenstva.

Fytoplanktonní řasy najdeme ve volných vodách, kde se pasivně vznášejí na hladině a pohybují se pomocí bičíků a brv. Perifytonní řasy tvoří nánosy na rostlinách a kamenech ponořených ve vodě. Bentické řasy obývají dno vod.

Řasy se dělí do šesti hlavních taxonomických skupin – *Rhodophyta* (ruduchy), *Dinophyta* (obrněnky), *Cryptophyta* (skrytěnky), *Chromophyta*, *Euglenophyta* (krásnoočka) a *Chlorophyta* (zelené řasy).

Chlorophyta jsou zelené díky asimilačním pigmentům – chlorofyl a, chlorofyl b, α -chlorofyl, β -chlorofyl a xantofyly, a dělí se do několika tříd, mezi které patří zelenivky (*Chlorophyceae*).

Tato třída obsahuje volně žijící bičíkovce, jednobuněčné kapsální a kokální řasy. Větší část buňky vyplňuje chloroplast, který je ve většině buněk jen jeden. Pokud má buňka nedostatek živin, zastaví se její dělení a chloroplast mění barvu ze zelené na žlutou. Buněčná stěna kokálních zelených řas (např. *Desmodesmus*) se skládá z polysacharidů glukózy, manózy, arabinózy a dalších jednoduchých cukrů.

Některé jednobuněčné zelenivky tvoří kolonie, které obsahují několik generací. Zvláštním útvarem je cenobium. Jedná se o několik buněk v jednom celku, které jsou geometricky uspořádané a jsou z jedné generace [1, 2, 3].



Obrázek 1 *Desmodesmus subspicatus* [4]

2.1.1. Rozdělení řasových testů toxicity

Testy toxicity a ekotoxicity se rozdělují, podle druhu testovacího organismu, doby expozice a koncentrace testované látky.

Podle druhu organismu se testy dělí na terestrické a akvatické. U terestrických testů patří k nejčastěji používaným organismům rousnice, bakterie, žížaly, jednoděložné a dvouděložné rostliny. Mezi terestrické testy patří například test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské (*Allium cepa*). U akvatických testů patří

k nejčastěji používaným organismům ryby, korýši, vodní rostliny, řasy a bakterie. Mezi akvatické testy patří například test toxicity na okřehek menším (*Lemna minor*), test toxicity na korýši *Daphnia magna* a test toxicity na řase *Desmodesmus subspicatus*.

Podle doby expozice se testy dělí na akutní, semichronické a chronické. U akutních testů je doba expozice v intervalu od 24 do 96 hodin. Subchronické testy toxicity trvají několik týdnů až měsíců a chronické testy trvají měsíce až několik let.

Dále se testy toxicity dělí podle pokročilosti designu testovacího systému na testy 1., 2., a 3. generace. Do první generace patří základní (standardní) testy, do druhé generace patří mikrobiotesty a do třetí generace patří biosenzory, biosondy a biomarkery.

Na dělení testů toxicity má vliv i trofická úroveň testovacího organismu, druh testované matrice, typ testovaného vzorku, způsob přípravy vzorku, stupeň komplexnosti detekčního systému a způsob vyhodnocení [5, 6, 7, 8].

2.1.2. Princip řasových testů

Řasové testy toxicity patří mezi standardizované akvatické testy a jsou děleny na testy s mořskými řasami ČSN EN ISO 10253, testy se sladkovodními řasami ČSN EN ISO 8692 a sinicemi.

Testy mají přesně definované podmínky. Tyto podmínky určují druh testovaného organismu, hustotu tohoto organismu na začátku testu, složení kultivačního média, počet opakování u každého vzorku a délku trvání testu. Dále je v podmínkách určena teplota, při které se řasové inokulum vyvíjí a kvalita a intenzita osvětlení, které musí být zajištěno po celou dobu testu [9, 10, 11].

Principem testu je exponenciálně rostoucí řasová kultura, která je vystavena různým koncentracím testované látky, kdy dochází k inhibici růstu této řasové kultury vlivem testované látky. Během relativně krátké doby je účinku této látky vystaveno několik generací řas.

Před testováním látky je vhodné použít referenční látky, díky nimž lze zjistit nevyhovující podmínky testu a předejít tak chybám při stanovování toxicity určitých látek. Dichroman draselný lze použít jako referenční látku. Výsledky řasových testů toxicity s referenční látkou by měly být uvedeny v protokolu [12].

2.1.3. Řasové testy toxicity se sladkovodními řasami

Tento test se používá pro stanovení ekotoxicky různých chemických látek, které se vyskytují v různých složkách vodního ekosystému a mají nepříznivý vliv na růst sladkovodních řas. V ČR je standardizovaná metoda ČSN EN ISO 8692, která je použitelná pro látky snadno rozpustné ve vodě. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas nebo sinic je popsána i směrnicí OECD 201 [8, 13].

Tabulka 1 *Podmínky pro test podle normy ČSN EN ISO 8692 [11]*

Zkušební organismus	sladkovodní druh zelené řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i> nebo <i>Pseudokirchneriella supcapitata</i> z řádu <i>Chlorococcales</i>
Počet organismů na baňku	10 ⁻⁴ buněk/ ml
Kultivační baňky	kónické baňky na 250 ml se zátkami propouštějícími vzduch
Kultivační zařízení	klimatizovaný box nebo místnost s bílou žárovkou
Počet opakování	nejméně 3 x
Doba trvání testu	72 ± 2 hod.
Teplota	23 ± 2 °C
Hodnota pH růstového média	8,1 ± 0,2

2.1.4. Řasové testy toxicity s mořskými řasami

Tento test se používá pro stanovení ekotoxicky různých chemických látek, vyskytujících se ve vodním prostředí. Podmínky testu pro mořské řasy jsou obdobné jako podmínky testu pro sladkovodní řasy. V ČR je standardizovaná metoda ČSN EN ISO 10253 [10].

Tabulka 2 *Podmínky pro test podle normy ČSN EN ISO 10253 [10]*

Zkušební organismus	Mořské řasy <i>Skeletonema costatum</i> nebo <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Počet organismů na baňku	10 ⁴ buněk/ ml
Kultivační baňky	kónické baňky na 250 ml se zátkami propouštějícími vzduch
Kultivační zařízení	klimatizovaný box nebo místnost s bílou žárovkou
Počet opakování	3 x
Doba trvání testu	72 ± 2 hod.
Teplota	20 ± 2 °C
Hodnota pH růstového média	8,1 ± 0,2

2.1.5. Média pro řasové kultury

Jednobuněčné zelené řasy rostou v prostředí živného média, které má přesně definované složení. K přípravě živného média se používá voda o čistotě $< 10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, což znamená, že v takové vodě se nachází velmi málo rozpuštěných iontů. Řasy se v živném mediu vyvíjí exponenciálně a řasové inokulum použité pro test se odebírá právě v exponenciální fázi růstu. Aby byl zajištěn exponenciální růst, musí být hustota řasové suspenze dostatečně nízká. Doporučená hustota je 10^4 buněk/ml. Tato hustota buněk by se v kontrolním roztoku měla za dobu trvání testu zvětšit 16 krát. Pro řasové testy udávají normy několik standardních živných médií [9, 11, 12].

Tabulka 3 Živné médium podle normy ČSN EN ISO 8692 [11]

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku $[\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$
Zásobní roztok 1: makrosložky živin	NH_4Cl	1,50
	$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,20
	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,80
	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,50
	KH_2PO_4	0,16
Zásobní roztok 2: Fe-EDTA	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$64,00\cdot 10^{-3}$
	$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$100,00\cdot 10^{-3}$
Zásobní roztok 3: stopové prvky	H_3BO_3	$185,00\cdot 10^{-3}$
	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$415,00\cdot 10^{-3}$
	ZnCl_2	$3,00\cdot 10^{-3}$
	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,50\cdot 10^{-3}$
	$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,01\cdot 10^{-3}$
	$\text{Na}_2\text{MnO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$7,00\cdot 10^{-3}$
Zásobní roztok 4: NaHCO_3	NaHCO_3	50,00

Tabulka 4 Živné médium BB (*Bristol modif. Bold*) [14]

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku [g·l ⁻¹]
Zásobní roztok 1:	NaNO ₃	25,00
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50
	K ₂ HPO ₄	7,50
	KH ₂ PO ₄	17,50
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50
	NaCl	2,50
Zásobní roztok 2:	Chelaton III	50,00
	KOH	31,00
Zásobní roztok 3:	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98
	H ₂ SO ₄ konc.	1,00
Zásobní roztok 4:	H ₃ BO ₃	11,42
Zásobní roztok 5:	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,42
	nebo MoO ₃	0,71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49

Mořské řasy se kultivují v živném médiu, které se skládá ze syntetické nebo přírodní mořské vody a z přesně definovaného množství živin (chemikálie čistoty p. a.). Pokud se použije přírodní mořská voda, je nutné, aby byla zbavena nečistot. Pro přípravu syntetické mořské vody se používá deionizovaná voda [10].

Tabulka 5 *Syntetická mořská voda* [10]

Sůl	Hmotnostní koncentrace
	[g·l ⁻¹]
NaCl	22,000
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,700
Na ₂ SO ₄ (bezvodý)	3,700
CaCl ₂ (bezvodý)	1,000
KCl	0,650
NaHCO ₃	0,200
H ₃ BO ₃	0,023

Tabulka 6 *Množství živin pro živné médium pro mořské řasy* [10]

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku [g·l ⁻¹]
Zásobní roztok 1:	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,044
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,144
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,045
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157·10 ⁻³
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,404·10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	1,140
	Na ₂ EDTA	1,000
Zásobní roztok 2:	Thianin hydrochlorid	0,050
	Biotin	0,010·10 ⁻³
	Vitamin B ₁₂	0,100·10 ⁻³
Zásobní roztok 3:	K ₃ PO ₄	3,000
	NaNO ₃	50,000
	Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	14,000

2.1.6. Provedení testu toxicity

Před určením vlastní hodnoty EC₅₀ (efektivní koncentrace) nebo IC₅₀ (inhibiční koncentrace) se provádí řada testů, ve kterých se zjišťuje, jak působí látka o neznámé toxicitě na testovací organismus.

Limitní test

V této první zkoušce zjistíme, zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Koncentrace testované látky je $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, aby se prokázalo, že hodnota EC_{50} testované látky je vyšší než koncentrace $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Test se provádí ve dvou paralelních nasazeních. Pokud nedojde k úhynu testovaného organismu, hodnotí se test jako negativní a provede se ověřovací test. Jestliže k úhynu dojde, hodnotí se test jako pozitivní a provede se test orientační [6, 8].

Ověřovací test

V tomto testu dojde k ověření negativního výsledku u limitního testu. Test se provádí v šesti paralelních nasazení. Pokud úhyn v roztocích nepřevyšuje o 10 % úhyn v kontrole, hodnotí se test jako negativní a další testy se již neprovádějí. Pokud je úhyn v roztocích o 10 až 50 % vyšší než v kontrole, hodnotí se test jako pozitivní. Výsledky se zaznamenají do protokolu, ale další testování se neprovádí. Pokud je úhyn nad 50 %, přistoupí se k orientačnímu testu [6].

Orientační test

Cílem orientačního testu je zjistit nejvyšší koncentraci testované látky, ve které ještě nedojde k úhynu a nejnižší koncentraci látky, ve které dojde k úplnému úhynu tetovacích organismů. V koncentračním rozmezí tedy lze očekávat hodnotu EC_{50} .

Nejvyšší koncentrace, která ještě nepůsobí na organismus toxicky je označena jako OC_0 a nejnižší koncentrace, kde dochází k 100 % úhynu, je označena jako OC_{100} [6].

Určení koncentračního rozmezí

Uspořádání koncentrační řady by mělo být geometrické s minimálně 5 koncentracemi. Optimální počet koncentrací je 7. Jedna hodnota koncentrace je blízká hodnotě EC_{50} a zbývající koncentrace jsou symetricky rozděleny mezi interval OC_0 až EC_{50} a EC_{50} až OC_{100} . Dvě koncentrace odpovídají hodnotám OC_0 a OC_{100} [6].

Základní test

V základním testu se určí vlastní hodnota EC_{50} . Rozmezí koncentrací je určené orientačním testem. Koncentrace jsou rozděleny kolem předpokládané hodnoty EC_{50} tak, aby došlo k zaznamenání 5 – 95 % úhynu testovaného organismu. Nejvyšší a nejnižší koncentrace jsou limitní koncentrace zjištěné v orientačním testu [6].

2.1.7. Spektrofotometrická metoda vyhodnocení řasového testu

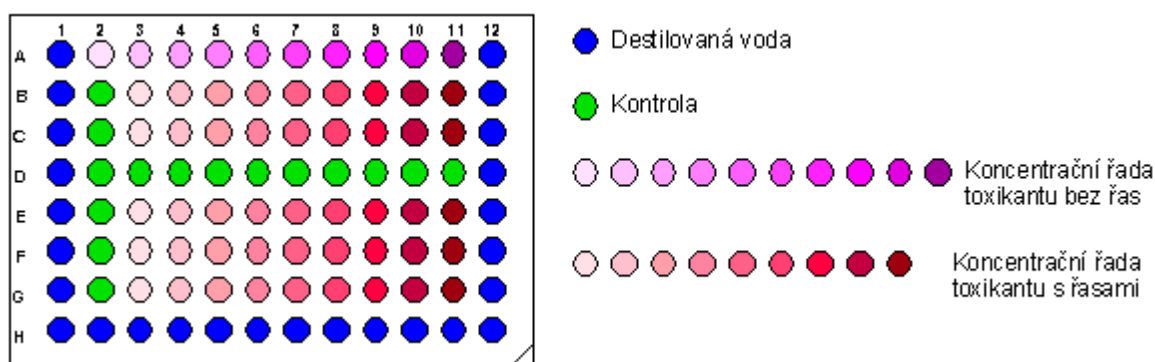
V standardním řasovém testu jsou používány běžné laboratorní pomůcky. Řasy musí mít dostatek místa pro vývoj a zároveň jim musí být poskytnut stálý přísun vzduchu. Z tohoto důvodu se jako kultivační baňky používají 250 ml Erlenmayerovy baňky, které mají pro tento vývin vhodný tvar. Hrdlo musí být opatřeno takovou zátkou, kterou bude proudit vzduch dovnitř baňky, ale která zároveň zabrání přestupu kontaminantů a nečistot. Baňky jsou

umístěny v kultivačním zařízení, kde je zajištěna stálá teplota a rovnovážné osvětlení. V případě, že je v průběhu testu použito třepání, nesmí objem roztoku přesáhnout 50 % z celkového objemu baňky.

Při vyhodnocování řasových testů je měřen růst řasového inokula na základě kvantifikace počtu buněk. Kvantifikace je prováděna pomocí světelného mikroskopu a spektrofotometru. Pod mikroskopem jsou buňky při několikanásobném zvětšení počítány na Cyrusově nebo Bürkerově komůrce. V komůrce se spočítá množství řasových buněk na určité ploše čtverců. Z napočítaného množství buněk a počtu vyšetřených čtverců, získáme hodnotu koncentrace buněk na ml.

Nejdříve se tedy stanoví počet buněk v zásobní kultuře. Ředěním kultury se získá řada koncentrací. Z každé koncentrace se odpipetuje malé množství roztoku na počítací komůrku, kde se spočítá množství buněk na ml a zároveň se změří absorbance každé koncentrace. Zelené řasy obsahují chlorofyl, který absorbuje světlo při vlnové délce 683 nm. Tato absorbance je měřena na spektrofotometru. Získaná data se vyhodnocují ve formě korelace, vyjadřující závislost absorbance na počtu buněk. Z této korelace se získá rovnice regrese ve formě $y = ax + b$. Tato rovnice se později použije pro výpočet hustoty řas v samotném testu toxicity [9, 12].

Jiným způsobem vyhodnocení testu pomocí spektrofotometrické metody je miniaturizovaná forma klasického řasového testu, který probíhá na mikrotitračních destičkách. Spotřebuje se tedy mnohem menší množství kultivačních médií i samotného testovaného vzorku. Dávkovaný objem připravených roztoků do mikrotitračních destiček je 250 μ l do jamky. Rozložení všech roztoků použitých v testu je uvedeno na obrázku.



Obrázek 2 Schéma dávkování vzorků do jamek mikrotitrační destičky [15]

Stanovení hustoty buněk pomocí spektrofotometru probíhá dvěma způsoby. Buď měřením absorbance při 670 nm, kdy absorbance odpovídá množství chlorofylu nebo měření zákalu při 750 nm. U měření absorbance nemají na stanovení počtu buněk, vliv případné bakterie nebo nerozpuštěné látky, které se mohou ve vzorku vyskytovat. Vlivem fyziologických pochodů se však koncentrace chlorofylu může měnit, a z toho důvodu je někdy upřednostňováno měření zákalu. Vlivem různé velikosti buněk se může hodnota zákalu měnit. V tomto případě se zákal převede na sušinu, protože její hodnota se vlivem velikosti buněk měnit nebude.

Hodnota EC_{50} se počítá pomocí vzorců uvedených níže [15].

Tabulka 7 Podmínky řasového mikrobiotestu [15]

Zkušební organismus	sladkovodní druh zelené řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i>
Počet organismů	10 ⁴ buněk/ ml
Stáří	řasy musí být v exponenciální fázi růstu
Množství testovaného roztoku	250 µl
Počet opakování	5
Doba trvání testu	72 ± 2 hod
Teplota	27 ± 2 °C
Osvětlení	kontinuální 6000 až 10000 lux
Ostatní podmínky	bez areace promíchávání suspenze alespoň 3x denně

2.1.8. Vyhodnocení EC₅₀, IC₅₀

Nejčastěji vyhodnocovaným parametrem je hodnota EC₅₀, IC₅₀. Tuto hodnotu lze vyhodnotit dvěma způsoby. Podle integrálu biomasy A nebo pomocí růstových rychlostí. U integrálu biomasy A se EC₅₀, IC₅₀ vyhodnotí pomocí porovnání ploch pod růstovými křivkami řasového inokula v testovaných koncentracích a v kontrole. Při vyhodnocování pomocí růstových rychlostí se do grafu vynese závislost inhibice růstu I_i na logaritmu koncentrace a z rovnice regrese se vypočítá přesná hodnota EC₅₀, IC₅₀ [9].

Výpočet EC₅₀, IC₅₀ podle integrálu biomasy A:

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

t₁, t₂, t_{n-1}, t_n ... časy měření [d]

N₀, N₂, N₁, N_{n-1}, N_n ... počet buněk v jednotlivých časových měřeních [buněk/ml]

Z vypočítaných hodnot A se počítá inhibice růstu I_{Ai}:

$$I_{Ai} = \frac{A_K - A_i}{A_K} \quad (2)$$

A_K ... průměrná plocha pro kontrolu

A_i ... průměrná plocha pro i-tou koncentraci

Výpočet EC₅₀, IC₅₀ podle růstové rychlosti μ :

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (3)$$

N_n ... hustota buněk na konci testu [buňky/ml]

N₀ ... hustota buněk na začátku testu [buňky/ml]

t_n ... doba trvání testu [1/d]

Pro výpočet přesnější růstové rychlosti lze použít následující vzorec:

$$\mu_i = \frac{\ln\left(\frac{N_1 - N_0}{t_1 - t_0}\right) + \dots + \ln\left(\frac{N_n - N_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}\right)}{n - 1} \quad (4)$$

n ... počet měření

Z vypočítaných hodnot μ je počítána inhibice růstu I_i:

$$I_i = \frac{\mu_K - \mu_i}{\mu_K} \times 100 \quad (5)$$

μ_K ... růstová rychlost kontrolní koncentrace

μ_i ... růstová rychlost určité koncentrace [9, 15]

Definice dalších vyhodnocovacích parametrů:

LC₅₀ je hodnota letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovaných organismů v době expozice.

EC_x je koncentrace testované látky rozpuštěná ve zkušebním mediu, kde „x“ jsou procenta snížení růstu, mobility, reprodukce atd., testovaného organismu za dobu expozice.

LOEC je nejnižší koncentrace, ve které je pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu ve srovnání s kontrolou v danou dobu expozice.

NOEC je koncentrace bezprostředně nižší než LOEC a nejvyšší zkušební koncentrace, u které není pozorován statisticky významný škodlivý účinek látky [16].

Směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) klasifikuje látky podle nejnižší naměřené hodnoty EC₅₀ v různých třídách rizik. EC₅₀ < 1 mg·l⁻¹ by znamenalo klasifikaci, "vysoce toxický pro vodní organismy"; od 1 do 10 mg·l⁻¹ "toxický pro vodní organismy", a od 11 až 100 mg·l⁻¹ "škodlivý pro vodní organismy". Látky s EC₅₀ > 100 mg·l⁻¹ by neměly být klasifikovány a lze je považovat za neškodné pro vodní organismy [17].

2.2. Alternativní testy

2.2.1. Řasový mikrobiotest Algatoxkit FTM

Algatoxkit FTM obsahuje všechny materiály potřebné k testu, včetně zkušebních organismů *Selenastrum capricornutum*, které jsou imobilizované v řasových kuličkách, pro provedení dvou kompletních testů inhibice růstu řas, v souladu s mezinárodně uznávanými standardními metodami. Zkouška se může provést do 30 minut po demobilizaci řas z kuliček. Ta se

provede přidáním živného média do zkušavky, která obsahuje řasovou kuličku. Následně proběhne třepání zkušavkou tak, aby se matrice rozpustila. Po rozpuštění matrice se zkušavka vloží do centrifugy, následně se odlije voda nad sedimentem, přidá se deionizovaná voda a celý proces se ještě jednou opakuje. Z takto připravených řas se vytvoří zásobní roztoky řasových kultur, které se použijí pro samotný test.

Pro měření optické hustoty řas slouží jednorázové cely o délce 10 cm, které umožňují rychlé a přímé vyhodnocení, za použití jakéhokoli spektrofotometru, který je vybavený držákem na 10 cm cely. Tyto jednorázové cely jsou součástí dodávaného setu.

Roztoky s různými koncentracemi testované látky a počtem buněk 10^4 na ml se umístí do dlouhých cel. Cely jsou náhodně uloženy v zásobníku. Víko každé cely se nechá na jednom konci otevřené a podepřené plastovým páskem, aby se zajistila výměna vzduchu. Cely se ponechají tři dny v inkubátoru nebo v místnosti s konstantním osvětlením a teplotou 21-25 °C. Každých 24 hodin se stanoví hustota buněk v každé cele. Po 72 hodinách se stanoví hodnota $I_{rC_{50}}$.

Mikrobiotesty se podle různých druhů organismů dělí na Daphtoxkit FTM manga (korýš *Daphnia manga*), Daphtoxkit FTM pulex (korýš *Daphnia pulex*), Ceriodaphtoxkit F (korýš *Ceriodaphnia dubia*), Thamnotoxkit FTM (korýš *Thamnocephalus platyurus*), Protoxkit F (prvok *Tetrahymena thermophila*) a další [18].



Obrázek 3 Set řady Algaltoxkit FTM s obsahem potřebného materiálu.[19]

2.2.2. Řasový mikrobiotest Marine Algaltoxkit FTM

Marine Algaltoxkit FTM obsahuje všechny materiály potřebné k testu, včetně zkušebních organismů *Phaeodactylum tricornutum*, pro provedení dvou kompletních testů inhibice růstu řas, v souladu s mezinárodně uznávanými standardními metodami.

Dodávaný set obsahuje zásobní roztoky pro přípravu syntetické mořské vody a zásobní roztoky s přesně definovaným množstvím živin, které jsou potřebné při kultivaci řasové kultury. Součástí setu jsou i cely o délce 10 cm, které slouží pro měření optické hustoty řas. Řasová kultura se inkubuje po dobu 3 dnů v inkubátoru se stálou teplotou 20 ± 2 °C a stálým osvětlením 10000 lux. Po 3 dnech se tato zásobní kultura přeočkuje. Roztoky s různými koncentracemi testované látky a počtem buněk 10^4 na ml se umístí do dlouhých cel. Cely jsou náhodně uloženy v zásobníku. Víko každé cely se nechá na jednom konci otevřené a podepřené plastovým páskem, aby se zajistila výměna vzduchu. Cely se ponechají tři dny v inkubátoru nebo v místnosti s konstantním osvětlením a teplotou 20 ± 2 °C. Každých 24 hodin se stanoví hustota buněk v každé cele. Po 72 hodinách se stanoví hodnota I_{rC50} [20].

2.3. Přehled norem v oblasti testů ekotoxicity

ISO (International Standardization Organization), nabízí standardizované metodiky a normy z různých oblastí ekotoxikologických biotestů, jako je vzorkování, přeprava vzorku a jeho uchování, metody přípravy vzorku, průběh biotestů pro vodní ekosystémy a další. V České republice se legislativa pro ekologické biotesty stále vyvíjí. Níže jsou uvedeny některé normy z oblasti ekologických biotestů [8].

ČSN EN ISO 8692: Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Vydána: červenec 2005. Účinnost: 2005.08.01 [8, 21]

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 [8, 21]

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 [8, 21]

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 [8, 21]

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 [8, 21]

ČSN EN ISO 10253: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu mořských řas *Skeletonem costatum* a *Phaeodactylum tricornutum*. Vydána 2006.12.01. Účinnost: 2007.01.01 [8, 21]

ČSN EN ISO 5667-16: Jakost vod – Odběr vzorků – Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků. Vydána: říjen 1999.10.01. Účinnost: 1999.11.01 [8, 21]

ČSN EN ISO 10712: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu na *Pseudomonas putida* (zkouška inhibice rozmnožování buněk *Pseudomonas*) Vydána: 1997.12.01. Účinnost: 1998.01.01 [8, 21]

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 [8, 21]

ČSN ISO 10706: Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera*, *Crustacea*). Vydána: 2001.12.01. Účinnost: 2002.01.01 [8, 21]

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 [8, 21]

ČSN EN ISO 7346-2: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoilton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Část 1: Obnovovací metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01 [8, 21]

ČSN EN ISO 7346-3: Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamoilton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Část 1: Průtočná metoda. Vydána: 1999.02.01. Účinnost: 1999.03.01 [8, 21]

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 [8, 21]

2.4. Problematika biologicky aktivních látek ve vodním ekosystému

Spotřeba léčiv v rámci EU stále stoupá. Lidstvo spotřebuje miliony balení deseti tisíců druhů léčiv, které obsahují 300 různých účinných látek. Nejčastěji používanými léčivy jsou antibiotika, antidepresiva, léčiva pro diabetiky, hormonální antikoncepce, léčiva tlumící bolest a zánět. Do vodního prostředí se léčiva dostávají vlivem lidského metabolismu, kdy jsou požitá látka vyloučena z těla ven ve stále aktivním stavu a odcházejí díky spláskům až do čistírny odpadních vod. Velmi častá je skutečnost, že většina lidí se zbavuje léčiv spláchnutím do toalety nebo vyhozením do opadu. Ve Velké Británii byla provedena řada výzkumů, která dokazuje, že mezi odpadky končí až dvě třetiny prošlých léků a z toho se až jedna pětina dostane do odpadní vody. Znečištění vody léčivy může být způsobené také průsakem ze skládek, které jsou špatně zabezpečené. K úniku léčiv přímo z výroby dochází ve velmi malé míře. Některá léčiva jsou schopna eliminace vlivem radikálového rozpadu vlivem oxidovadel na hydroxyl, alkylproxyl a atomární kyslík. Eliminace může probíhat i sorpcí na aktivovaný kal (ve Švýcarsku je zakázáno používat tento kal jako hnojivo). Jiné látky jsou schopny se eliminovat biodegradací.

V čistírnách odpadních vod (ČOV) lze léčiva účinně odstranit pomocí ozonace. Pomocí ozonace lze například odstranit paracetamol za vzniku CO₂ a jednoduchých dikarboxylových

kyselin. Degradací produkty vznikající při ozonaci ztratí svoji biologickou aktivitu a jsou lépe rozpustné ve vodě a tak jsou připravené pro další biotransformaci. Jako vedlejší účinek ozonace je dezinfekce vody. Léčiva lze na ČOV účinně odstraňovat i membránovými procesy nebo pomocí aktivního uhlí ve formě granulí nebo prášku. Bohužel, ale na stávajících ČOV ve většině případů tyto procesy čištění chybí. Pokud nejsou látky dostatečně zachyceny na ČOV, dostávají se dále do povrchových vod, kde mohou působit na říční biocenózu, a tím může dojít ke kontaminaci dalších částí ekosystému, například podzemních vod, které většinou slouží jako zdroj pitné vody.

Otázka míry znečištění vod léčivy si získává čím dál větší mezinárodní pozornost. V roce 2008 byl zrealizován projekt KNAPPE (Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters), který prováděl monitoring léčiv ve vodním prostředí ve 24 zemích světa. Nejvíce znečištěná voda léčivy byla v Německu. Většina údajů v databázi KNAPPE se vztahuje k povrchovým vodám, 11 % údajů se týká podzemních vod a 2,2 % se týká pitných vod. Data získaná v zahraničí lze pro ČR využít jen částečně, z důvodů jiné struktury a spotřeby léků, jiné technologie úpravy vody a jiného podílu využití povrchových a podzemních vod k úpravě na pitnou vodu. Proto je nutné se tomuto problému v ČR intenzivněji věnovat. Zatím je získáno velmi málo údajů [22, 23].

2.4.1. Základní rozdělení léčiv

Léčiva se dělí na látky ovlivňující periferní nervový systém, látky ovlivňující centrální nervový systém, léčiva ovlivňující bolest a zánět, látky ovlivňující hladké svalstvo, diuretika, látky ovlivňující kardiovaskulární systém, hypolipidemika, antiobezitika, lokální hormony (autokoidy), léčiva ovlivňující trávicí a močový trakt, léčiva chorob dýchacích cest, léčiva ovlivňující trombózu a hormony [24].

2.4.2. Analgetika

Analgetika se dělí na opioidní analgetika a nesteroidní protizánětlivé látky NSAID (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*).

Opioidní analgetika:

Tyto látky se používají pro tlumení silné bolesti, ale příčinu bolesti nijak neovlivňují. Ve vyšších dávkách mohou opioida vyvolat kromě analgezie také spánek až ztrátu vědomí. Při účinku látky dojde k interakci s opioidními receptory v centrálním nervovém systému. Látka působí jako agonista, jehož přirozenými ligandy jsou endorfiny. Molekula látky (ligand) se naváže na selektivní vazebné místo receptoru za vzniku komplexu ligand-receptor. Receptor je takto aktivován a následuje buněčná odpověď. Odpověď je závislá na dávce nebo koncentraci účinné látky.

Opioidní analgetika jsou přírodní a syntetické. Mezi přírodní látky patří morfin a kodein. Jedná se o alkaloidy, které jsou syntetizované z opia, což je suchá šťáva získaná z nezralých makovic máku setého.

Nesteroidní protizánětlivé látky:

NSAID jsou méně účinné a mají analgetické, antipyretické a protizánětlivé účinky. Všechna tato léčiva mají podobný mechanismus účinku. Některé z těchto léčiv jsou volně dostupná bez

lékařského předpisu. Antipyretický účinek zajišťuje pokles horečky. Analgetické a protizánětlivé látky způsobují inhibici enzymu cyklooxygenasy (COX). Cyklooxygenasa COX je důležitá pro syntézu prostaglandinů, které se podílí na vzniku bolesti a zánětu. Existují dvě formy cyklooxygenasy značené jako COX-1 a COX-2. NSAID tedy působí neselektivně na obě COX (ibuprofen, diklofenak, naproxen) nebo působí selektivně, kdy blokují výhradně COX-2. Selektivní inhibitory jsou vysoce účinné a vykazují minimální vedlejší účinky na gastrointestinální trakt. U některých z těchto látek se však objevily vedlejší účinky na kardiovaskulární systém.

Mezi nežádoucí reakce na tyto látky patří průjemy, nauzea, zvracení, krvácení nebo perforace žaludeční stěny. Ze 100 pacientů, kteří jsou léčeni po dobu jednoho roku, má 1 – 2 % komplikace způsobené krvácením nebo perforací. V USA je 16 000 úmrtí za rok díky těmto komplikacím.

NSAID se dělí na deriváty anilinu (Paralen), deriváty kyseliny salicylové (Aspirin), deriváty kyseliny anthranilové, deriváty kyseliny 2-aryalkanové (Dolmina, Ibalgin), deriváty pyrazolonu a pyrazolidindionu a oxikamy [24, 25].

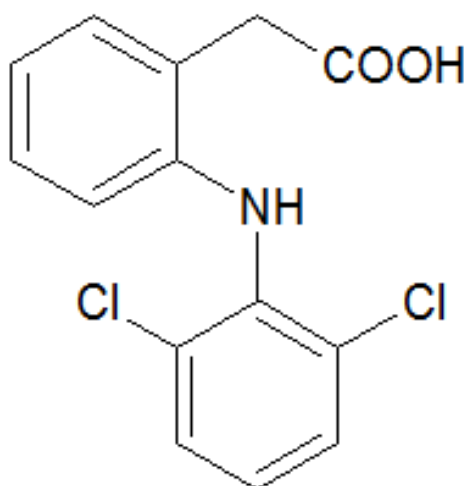
2.4.3. Diklofenak

Diklofenak je nesteroidní protizánětlivý lék (antirevmatikum). Má analgetické a antipyretické účinky. Používá se u akutních a chronických onemocnění kloubů a svalů. Zmírňuje pooperační a poúrazové záněty. Působí na bolesti různého druhu a lokalizace (bolesti zubů, hlavy, svalů atd.). Protože snižuje zvýšenou teplotu, může být užíván i při bolestech spojených s chřipkou nebo nachlazením.

Pokud se u pacienta projevují některé z následujících potíží, měl by se s užíváním diklofenaku nejdříve poradit s lékařem. Žaludeční vředy, zánětlivé onemocnění tlustého střeva, těžší porucha jater nebo ledvin, porucha krevní srážlivosti, onemocnění srdce a cév spojené se zadržováním vody.

Stejně jako u všech léčiv i u diklofenaku může dojít k projevu nežádoucích účinků, jako jsou nevolnost, bolesti žaludku, bolesti hlavy, závratě, alergické kožní reakce, zadržování vody, otoky. Vzácně se mohou projevit žaludeční vředy, poruchy krvetvorby, poruchy funkce jater nebo ledvin, nespavost, únava.

Obvyklá dávka pro dospělého je 25 – 50 mg (tj. 1 – 2 tablety) 1 – 3 krát denně. Děti ve věku 1 – 6 let mohou přijmout dávku $0,5 - 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$, která je podána ve 2 – 3 dílčích dávkách. Obvyklá dávka pro děti starších 6 let je $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$, podaná ve dvou dílčích dávkách. Bez porady s lékařem lze diklofenak užívat bez přerušení několik dnů až dva týdny. Mezi přípravky patří APO-DICLO, DICLOFENAC, DOLMINA, REWODINA (jedná se o volně prodejné léky) [26].



Obrázek 4 Vzorec diklofenaku [27]

Tabulka 8 Fyzikální a chemické vlastnosti diklofenaku [27]

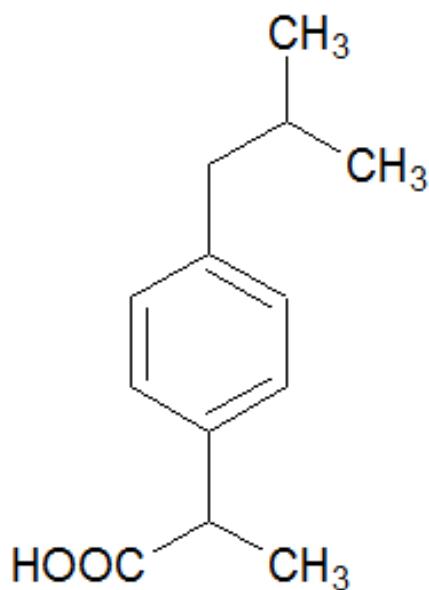
Název léčiva	Diklofekak
Systematický název	Kyselina 2-[2,6-dichlorfenyl)amino]benzenoctová
Vzorec	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Molekulová hmotnost	296, 149 $g \cdot mol^{-1}$
CAS registrační číslo	15307-86-5
pK_a	4,15
Bod varu	156 - 158 °C
$\log K_{ow}$	4,15
Rozpustnost ve vodě	2,37 $mg \cdot l^{-1}$ při 25 °C
Henryho konstanta	$4,7 \cdot 10^{-12} \text{ atm} \cdot m^3 \cdot mol^{-1}$

2.4.4. Ibuprofen

Charakteristika ibuprofenu, jeho působení i nežádoucí účinky a délka terapie, jsou stejné jako u diklofenaku.

Obvyklá dávka pro dospělého je 200 – 400 mg (tj. 1 – 2 tablety) 3 – 4 krát denně. Obvyklá dávka pro děti od 3 let je 10 $mg \cdot kg^{-1}$ 2 – 3 krát denně. Pro děti do 3 let je tato látka ve formě sirupu.

Mezi přípravky patří ADVIL, BRUFEN, IBALGIN, NUROFEN, NUROFEN FORTE, NUROFEN pro děti (jedná se o volně prodejné léky) [26].



Obrázek 5 Vzorec ibuprofenu [28]

Tabulka 9 Fyzikální a chemické vlastnosti ibuprofenu [28, 29, 30]

Název léčiva	Ibuprofen
Systematický název	α -methyl-4-(isobutyl)fenyloctová kyselina
Vzorec	$C_{13}H_{18}O_2$
Molekulová hmotnost	$206,28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
CAS registrační číslo	15687-27-1
pK _a	4,91; 5,2
Bod varu	157 °C
log K _{ow}	3,97
Rozpustnost ve vodě	21 mg·l ⁻¹ při 25 °C
Henryho konstanta	$9,83 \cdot 10^{-5}$; $5,03 \cdot 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$

2.4.5. Toxicita léčiv pro vodní organismy

Citlivost vodních organismů na léčiva je rozdílná. V roce 2002 byl proveden soubor biotestů se třemi různými vodními organismy *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus* a *Lemna minor*. Organismy byly vystaveny různým koncentracím a směsím léčiv. *Lemna minor* se ve většině případů projevil jako nejvíce citlivý testovaný druh [31].

Tabulka 10 Hodnoty EC_{50} pro jednotlivé organismy a jednotlivé léčiva. [31]

Látka	EC_{50} [mg·l ⁻¹]		
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	<i>Lemna minor</i>
Karbamazepin	> 100	74	25,5
Ibuprofen - Na	108	315	22
Diklofenak - Na	68	72	7,5
Naproxen - Na	174	> 320	24,2
Kaptoprilem	> 100	168	25
Metformin	64	> 320	110
Propranolol	7,5	5,8	114
Metoprolol	> 100	7,3	> 320

2.5. Toxicita směsí diklofenaku, ibuprofenu, naproxenu a kyseliny salicylové

V časopisu *Ecotoxicology and Environmental Safety* byl v roce 2004 uveřejněn článek o toxicitě směsí diklofenaku, ibuprofenu, naproxenu a kyseliny salicylové. Ekotoxicita těchto léčiv byla hodnocena pomocí akutního testu na korýši *Daphnia magna* a na řasových testech. Řasové testy toxicity byly prováděny podle evropských směrnic.

Pro test byly jako testovací organismy použity planktonní zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*. Podmínky řasového testu byly stejné, jako podmínky uvedené v tabulce č. 1. Kvantifikace řas byla provedena pomocí měření fluorescence chlorofylu. Vyhodnocení bylo prováděno pomocí průměrné rychlosti růstu řas. Pro stanovení účinku látek byl použit software ToxRat (Toxicity Response analysis and testing, ToxRat Solutions GmbH). Tento software slouží pro statistické vyhodnocení biotestů standardizovaných v souladu s mezinárodními směrnicemi ISO, OECD.

Z výsledku studie vyplývalo že, toxicita směsí byla značná i při koncentracích, kdy jednotlivé látky neprokázaly žádný nebo velmi malý vliv na testovací organismy.

Toxicita jednotlivých látek byla relativně nízká. Hodnoty EC_{50} získané pomocí řasových testů byly v rozmezích od 72 do 626 mg·l⁻¹. U většiny testovaných léčiv byly hodnoty $EC_{50} > 100$ mg·l⁻¹. Pouze diklofenak s hodnotou EC_{50} 71,9 mg·l⁻¹, mohl být klasifikován jako škodlivý pro vodní organismy. U léčiv se tedy mohou projevit spíše účinky chronické než akutní. Důležitý je také druh organismu, který se pro test používá, protože každý organismus jinak reaguje a vyznačuje se s rozdílnou sensitivitou k testované látce nebo směsi. Například u vodní rostliny *Lemna minor* byly naměřené hodnoty až 10 krát nižší než u řasy *Desmodesmus subspicatus* [17, 32].

Tabulka 11 Výsledné hodnoty EC_{5-80} s 95 % intervalem spolehlivosti pro jednotlivá léčiva pro *Desmodesmus subspicatus* [17]

Látka	EC_5 [mg·l ⁻¹]	EC_{10} [mg·l ⁻¹]	EC_{20} [mg·l ⁻¹]	EC_{50} [mg·l ⁻¹]	EC_{80} [mg·l ⁻¹]
Diklofenak	44,2 (35,7 - 50,5)	49,2 (41,2 - 55,2)	56,1 (48,8 - 61,9)	71,9 (65,5 - 71,9)	92,2 (83,4 - 106,4)
Ibuprofen	72,9 (26,1 - 121,8)	102,7 (44,1 - 159,2)	155,5 (82,4 - 222,9)	342,2 (242,4 - 471,5)	753,2 (537,6 - 1323,2)
Naproxen	266 _*	321,5 _*	404,3 _*	625,5 _*	967,5 _*
ASA	86,4 (74,2 - 90,8)	90,6 (81,6 - 93,7)	95,8 (91,6 - 97,3)	106,7 (104,4 - 114,3)	118,9 (112,1 - 142,5)

* 95 % interval spolehlivosti není u naproxenu definován

Tabulka 12 Koncentrace testovaných léčiv, které byly použity ve směsi, ve srovnání s individuálními hodnotami NOEC u jednicových léčiv pro *Desmodesmus subspicatus* [17]

Látka	$EC_{5/4}$ [mg·l ⁻¹]	$EC_{10/4}$ [mg·l ⁻¹]	$EC_{20/4}$ [mg·l ⁻¹]	$EC_{50/4}$ [mg·l ⁻¹]	$EC_{80/4}$ [mg·l ⁻¹]	NOEC [mg·l ⁻¹]
Diklofenak	11,1	12,3	14	18	23,1	50
Ibuprofen	18,2	25,7	38,9	85,6	188,3	32
Naproxen	66,5	80,4	101,1	156,4	241,9	100
ASA	21,6	22,6	24	26,7	29,7	32

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie a testovací organismus

Diklofenak-Na (Kyselina 2-[2,6-dichlorfenyl]amino]benzenoová) CAS 15307-86-5; ibuprofen-Na (α -methyl-4-(isobutyl)fenyloctová kyselina) CAS 15687-27-1; kadmium CAS 7440-43-9; dichroman draselný CAS 7778-50-9; chlorid amonný CAS 12125-02-9; chlorid hořečnatý hexahydrát CAS 7791-18-6; chlorid vápenatý dihydrát CAS 10035-04-8; síran hořečnatý heptahydrát CAS 10034-99-8; dihydrogen fosforečnan draselný CAS 7778-77-0; chlorid železitý hexahydrát CAS 10025-77-1/2; chelaton III. CAS 6381-92-6; kyselina trihydrogen boritá CAS 10043-35-3; chlorid manganatý tetrahydrát CAS 13446-34-9; chlorid zinečnatý CAS 7646-85-7; chlorid kobaltnatý hexahydrát CAS 7791-13-1; chlorid měďnatý dihydrát CAS 10125-13-0; molybdenan sodný dihydrát CAS 10102-40-6; hydrogenuhličitan sodný 144-55-8 [33].

Desmodesmus subspicatus byl zvolen jako testovací organismus. Tento organismus byl dodán ze sbírky autotrofních organismů (CCALA) z Botanického ústavu akademie věd v ČR, Třeboň.

3.2. Přístroje a pomůcky

Mikroskop

Pro stanovení počtu buněk v daném roztoku byl použit světelný mikroskop Intra miko L1100B. Tento mikroskop nabízí několik zvětšení. Pro bakalářskou práci bylo použito zvětšení 20 $\times$ na okuláru a 10 $\times$ /0,25 na objektivu. Celkové používané zvětšení bylo 800 $\times$.



Obrázek 6 Mikroskop Intra miko L1100B

Počítací komůrka Cyrus I

Komůrka z optického skla se dvěma kovovými nožkami pro uchycení krycího sklíčka, má na ploše 100 mm^2 40×40 čtverečků, na kterých se při určitém zvětšení pod mikroskopem, počítá množství buněk.



Obrázek 7 Počítací komůrka Cyrus I. [34]

Spektrofotometr

Na spektrofotometru HACH DR/4000 U byla měřena absorbance testovaných roztoků a absorbance řasových kultur při vlnové délce 683 nm. Zjištěná data byla použita pro vytvoření korelace pro závislost absorbance a počet buněk.



Obrázek 8 Spektrofotometr HACH DR/4000 U

Třepačka

Při inkubaci řasové kultury a testovaných roztoků bylo použito třepání, aby nedocházelo k usazování buněk na dno použité nádoby a aby docházelo k lepšímu přestupu CO_2 ze vzduchu do roztoku, čímž se zabránilo změnám pH. V práci byla použita třepačka s vodní lázní CERTOMAT typ 886 362/8 WR. Testované roztoky byly umístěny ve vodní lázni, která zajišťovala stálou teplotu 24°C . Protože třepačka neměla zdroj osvětlení, byla nad ní umístěna zářivka, která poskytovala kontinuální osvětlení 6 000 - 10 000 lux.

Analytické váhy

Analytické váhy AND A&D INSTRUMENTS LTD. HR – 120 – EC byly použity pro vážení chemických látek, které byly použity pro přípravu živného média a dalších roztoků potřebných v testu.

pH metr

Pomocí pH metru Inolab 2 (WTW) bylo měřeno pH živného média a testovaných roztoků. U testovaných roztoků bylo pH měřeno na začátku a na konci testu s podmínkou, že hodnota pH se během testu mohla změnit nejvýše o 1,5 jednotky.

3.3. Provedení testu

Příprava živného média

Do 50 ml odměrných baněk byly připraveny čtyři zásobní roztoky (viz. Tabulka 3). Přesně definované množství živin bylo přepočítáno na 50 ml. Vypočítané množství živin bylo nejdříve naváženo na analytických vahách na předvážkách a následně bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky. Pokud bylo vypočítané množství na 50 ml malé, byl připraven koncentrovanější roztok, ze kterého bylo odebráno potřebné množství. Do odměrné baňky o objemu 1 l bylo nalito 500 ml deionizované vody. K tomuto množství vody bylo přidáno 10 ml prvního zásobního roztoku a 1 ml z ostatních zásobních roztoků. Odměrná baňka byla doplněna po rysku a řádně protřepána. Takto připravené živné médium bylo vždy před použitím probubláváno vzduchem po dobu 30 minut a byla u něj stanovena hodnota pH. Hodnota pH živného média bylo vždy v rozmezí 7,6 – 7,9. Všechny chemikálie použité pro přípravu živného média byly analytické čistoty p. a. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě a v chladu při teplotě 4 °C v laboratorní ledničce.

Kultivace řasové kultury

K 150 ml živného média ve 250 ml Erlenmayerově baňce, bylo přidáno 10 ml řasové kultury z předkultivace. Takto připravená kultivace byla ponechána v klimatizované místnosti při 23 °C, za stálého osvětlení a třepání po dobu 4 dnů. V zásobní řasové kultuře byl vždy stanoven počet buněk na ml, aby se mohlo použít potřebné množství inokula pro vlastní test. Přeočkování řasové kultury probíhalo vždy po 5 dnech, aby bylo vyhověno podmínce odbírání řasové kultury pro test v exponenciální fázi růstu.

Kvantifikace buněk na komůrce Cyrus I.

Při kvantifikaci buněk bylo vždy vyšetřeno 100 čtverců, které leželi uprostřed celé plochy 100 mm². Každý ze 100 čtverců byl vyšetřen samostatně. Následně proběhla sumarizace všech spočítaných buněk a tato hodnota byla dosazena do vzorce 6. Takto byl stanoven počet buněk na ml u každého roztoku, který byl použit pro vytvoření korelace.

$$X = \frac{a \cdot K}{n \cdot z \cdot V} \quad (6)$$

X ... počet buněk v 1 ml
 a ... počet buněk v n čtverečcích
 n ... počet vyšetřených čtverečků
 z ... zahuštění vzorku
 K ... celkový počet čtverečků (Cyrus I K = 1600)
 V ... objem komůrky (Cyrus I V = 0,01 ml)

Provedení testu s testovanými látkami

K řasovým suspenzím v Erlenmayerových baňkách byly přidány testované látky (diklofenak, ibalgin, kadmium, směs diklofenak – kadmium) v požadovaných koncentračních rozmezích. Erlenmayerovy baňky byly inkubovány při teplotě 24 °C a při kontinuálním osvětlení 6 000 - 10 000 lux po dobu 72 hod. Po ukončení inkubace byl test vyhodnocen.

3.3.1. Stanovení ekotoxicity referenční látky dichromanu draselného $K_2Cr_2O_7$

Volba koncentrační řady $K_2Cr_2O_7$

Koncentrační řada byla volena podle známých hodnot I_rC_{50} pro referenční látky. Zvoleno bylo pět koncentrací v geometrické posloupnosti, tak aby byly vždy dvě koncentrace pod hodnotou I_rC_{50} a dvě koncentrace nad hodnotou I_rC_{50} . Koncentrace byly v rozmezí 0,4 – 0,9 mg·l⁻¹.

Příprava roztoků

Do 50 ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok dichromanu draselného. Koncentrace zásobního zátoku byla 10 mg·50 ml⁻¹. Do Erlenmayerových baňek bylo pipetováno 5 ml živného média, které bylo před použitím 30 minut probubláváno vzduchem. K tomuto objemu živného média byly přidány 2 ml řasového inokula a vypočtené množství roztoku dichromanu draselného. Všechny roztoky byly doplněny živným médiem na 50 ml. Takto byly připraveny dvě paralelní řady roztoků.

Současně byly připraveny dva kontrolní roztoky, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze 2 ml řasového inokula. U všech roztoků bylo na začátku změřeno pH, jehož hodnota činila 7,8.

Tabulka 13 *Koncentrační řada dichroman draselného a množství látky odebírané ze zásobního roztoku, které je potřebné k získání těchto koncentrací*

Koncentrační řada $K_2Cr_2O_7$		
c	c	V
[mg·l ⁻¹]	[mg·50 ml ⁻¹]	[μl]
0,4	0,020	100
0,6	0,030	150
0,7	0,035	175
0,8	0,040	200
0,9	0,045	225

Inkubace

Inkubace probíhala ve třepačce popsané v kapitole 3.2. po dobu 72 hodin, při teplotě 24 °C a za stálého osvětlení. Erlenmayerovy baňky byly opatřeny zátkami, přes které byl zajištěn stálý přísun vzduchu do roztoku.

Korelace

Aby mohla být vytvořena korelace závislosti absorbance na počtu buněk, byla připravena řada šesti roztoků. Roztoky byly tvořeny 1, 2, 3, 4 a 5 ml řasového inokula ze zásobní kultury, které byly doplněny na celkový objem 5 ml. U všech těchto roztoků proběhla kvantifikace řas na komůrce Cyrus I pod mikroskopem. Nejkoncentrovanější roztok, který obsahoval 5 ml řasového inokula, byl zdrojem informace o počtu buněk na ml v zásobní kultuře. Pomocí toho bylo vypočítáno potřebné množství řasového inokula tak, aby koncentrace ve všech testovaných roztocích byla 10^5 buněk/ml. Kontrolní roztok byl zvolen jako šestý roztok pro vytvoření korelace. Zároveň u něj byla provedena kontrola požadované koncentrace buněk. Stejně jako u ostatních 5 roztoků i zde byl spočítán počet buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem. Na závěr byla u všech roztoků změřena absorbance při 683 nm. Ze získaných hodnot byla vytvořena korelační přímka. Rovnice regrese z korelační křivky byla použita pro zjištění počtu buněk v testovaných roztocích po 72 hodinách inkubace. Za „y“ byla vždy dosazena hodnota absorbance konkrétního roztoku a vypočtená hodnota „x“ znamenala vždy počet buněk v testovaném roztoku.

3.3.2. Stanovení ekotoxicity ibuprofenu

Volba koncentrační řady ibuprofenu

Koncentrační řada byla volena podle známých hodnot $I_{rC_{50}}$ z literatury [18]. Zvoleno bylo šest koncentrací v geometrické posloupnosti, tak aby byly dvě koncentrace blízko předpovídané hodnoty $I_{rC_{50}}$, dvě koncentrace pod hodnotou $I_{rC_{50}}$ a dvě koncentrace nad hodnotou $I_{rC_{50}}$. Koncentrace byly v rozmezí 100 – 600 mg·l⁻¹.

Příprava roztoků

Do 100 ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok ibuprofenu. Koncentrace zásobního roztoku byla 0,1 g·100 ml⁻¹. Do Erlenmayerových baněk bylo pipetováno 5 ml živného média, které bylo před použitím 30 minut probubláváno vzduchem. K tomuto objemu živného média byly přidány 4 ml řasového inokula a vypočtené množství roztoku ibuprofenu. Všechny roztoky byly doplněny živným médiem na 50 ml. Takto byly připraveny dvě paralelní řady roztoků.

Současně byly připraveny dva kontrolní roztoky, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze 4 ml řasového inokula. U všech roztoků bylo na začátku změřeno pH, jehož hodnota činila 7,9.

Tabulka 14 *Koncentrační řada Ibuprofenu a množství látky odebírané ze zásobního roztoku, které je potřebné k získání těchto koncentrací*

Koncentrační řada Ibuprofenu		
c	c	V
[mg·l ⁻¹]	[mg·50 ml ⁻¹]	[ml]
100	5,0	2,50
250	12,5	6,25
300	15,0	7,50
380	19,0	9,50
500	25,0	12,50
600	30,0	15,00

Inkubace

Inkubace probíhala ve třepačce popsané v kapitole 3.2. po dobu 72 hodin, při teplotě 24 °C a za stálého osvětlení. Erlenmayerovy baňky byly opatřeny zátkami, přes které byl zajištěn stálý přísun vzduchu do roztoku.

Korelace

Aby mohla být vytvořena korelace závislosti absorbance na počtu buněk, byla připravena řada šesti roztoků. Roztoky byly tvořeny 1, 2, 3, 4 a 5 ml řasového inokula ze zásobní kultury, které byly doplněny na celkový objem 5 ml. U všech těchto roztoků proběhla kvantifikace řas na komůrce Cyrus I pod mikroskopem. Nejkoncentrovanější roztok, který obsahoval 5 ml řasového inokula, byl zdrojem informace o počtu buněk na ml v zásobní kultuře. Pomocí toho bylo vypočítáno potřebné množství řasového inokula tak, aby koncentrace ve všech testovaných roztocích byla 10⁵ buněk/ml. Kontrolní roztok byl zvolen jako šestý roztok pro vytvoření korelace. Zároveň u něj byla provedena kontrola požadované koncentrace buněk. Stejně jako u ostatních 5 roztoků i zde byl spočítán počet buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem. Na závěr byla u všech roztoků změřena absorbance při 683 nm. Ze získaných hodnot byla vytvořena korelační přímka. Rovnice regrese z korelační křivky byla použita pro zjištění počtu buněk v testovaných roztocích po 72 hodinách inkubace. Za „y“ byla vždy dosazena hodnota absorbance konkrétního roztoku a vypočtená hodnota „x“ znamenala vždy počet buněk v testovaném roztoku.

3.3.3. Stanovení ekotoxicity diklofenaku

Volba koncentrační řady diklofenaku

Koncentrační řada byla volena podle známých hodnot I_rC₅₀ z literatury [18]. Zvoleno bylo šest koncentrací v geometrické posloupnosti, tak aby byla jedna koncentrace blízko předpokládané I_rC₅₀. Ostatní koncentrace byly symetricky rozděleny kolem této hodnoty. Koncentrace byly v rozmezí 30 – 150 mg·l⁻¹.

Příprava roztoků

Do 100 ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok diklofenaku. Koncentrace zásobního roztoku byla $0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$. Do Erlenmayerových baněk bylo pipetováno 5 ml živného média, které bylo před použitím 30 minut probubláváno vzduchem. K tomuto objemu živného média bylo přidáno 1,2 ml řasového inokula a vypočtené množství roztoku diklofenaku. Všechny roztoky byly doplněny živným médiem na 50 ml. Takto byly připraveny dvě paralelní řady roztoků.

Současně byly připraveny dva kontrolní roztoky, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze 1,2 ml řasového inokula. U všech roztoků bylo na začátku změřeno pH, jehož hodnota činila 7,9.

Tabulka 15 *Koncentrační řada diklofenaku a množství látky odebírané ze zásobního roztoku, které je potřebné k získání těchto koncentrací*

Koncentrační řada Diklofenaku		
c	c	V
$[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$[\text{mg} \cdot 50 \text{ ml}^{-1}]$	[ml]
30	1,5	0,75
40	2,0	1,00
50	2,5	1,25
60	3,0	1,50
100	5,0	2,50
150	7,5	3,75

Inkubace

Inkubace probíhala ve třepačce popsané v kapitole 3.2. po dobu 72 hodin, při teplotě 24°C a za stálého osvětlení. Erlenmayerovy baňky byly opatřeny zátkami, přes které byl zajištěn stálý přísun vzduchu do roztoku.

Korelace

Aby mohla být vytvořena korelace závislosti absorbance na počtu buněk, byla připravena řada šesti roztoků. Roztoky byly tvořeny 1, 2, 3, 4 a 5 ml řasového inokula ze zásobní kultury, které byly doplněny na celkový objem 5 ml. U všech těchto roztoků proběhla kvantifikace řas na komůrce Cyrus I pod mikroskopem. Nejkoncentrovanější roztok, který obsahoval 5 ml řasového inokula, byl zdrojem informace o počtu buněk na ml v zásobní kultuře. Pomocí toho bylo vypočítáno potřebné množství řasového inokula tak, aby koncentrace ve všech testovaných roztocích byla 10^5 buněk/ml. Kontrolní roztok byl zvolen jako šestý roztok pro vytvoření korelace. Zároveň u něj byla provedena kontrola požadované koncentrace buněk. Stejně jako u ostatních 5 roztoků i zde byl spočítán počet buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem. Na závěr byla u všech roztoků změřena absorbance při 683 nm. Ze získaných hodnot byla vytvořena korelační přímka. Rovnice regrese z korelační křivky byla použita pro zjištění počtu buněk v testovaných roztocích po 72 hodinách inkubace. Za „y“ byla vždy

dosazena hodnota absorpance konkrétního roztoku a vypočtená hodnota „x“ znamenala vždy počet buněk v testovaném roztoku.

3.3.4. Stanovení ekotoxicity kadmia

Volba koncentrační řady kadmia

Zvoleno bylo sedm koncentrací v geometrické posloupnosti, tak aby byla jedna koncentrace blízko předpokládané hodnoty $I_{rC_{50}}$. Ostatní koncentrace byly symetricky rozděleny kolem této hodnoty. Koncentrace byly v rozmezí $0,2 - 2,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Příprava roztoků

Do 50 ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok kadmia. Koncentrace zásobního roztoku byla $50 \text{ mg} \cdot 50 \text{ ml}^{-1}$. Do Erlenmayerových baněk bylo pipetováno 5 ml živného média, které bylo před použitím 30 minut probubláváno vzduchem. K tomuto objemu živného média bylo přidáno 2 ml řasového inokula a vypočtené množství roztoku kadmia. Všechny roztoky byly doplněny živným médiem na 50 ml. Takto byly připraveny dvě paralelní řady roztoků.

Současně byly připraveny dva kontrolní roztoky, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze 2 ml řasového inokula. U všech roztoků bylo na začátku změřeno pH, jehož hodnota činila 7,7.

Tabulka 16 *Koncentrační řada kadmia a množství látky odebírané ze zásobního roztoku, které je potřebné k získání těchto koncentrací*

Koncentrační řada kadmia		
c	c	V
$[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$[\text{mg} \cdot 50 \text{ ml}^{-1}]$	$[\mu\text{l}]$
0,2	0,01	10
0,5	0,025	25
0,7	0,035	35
1	0,05	50
1,5	0,075	75
2	0,1	100
2,5	0,125	125

Inkubace

Inkubace probíhala ve třepačce popsané v kapitole 3.2. po dobu 72 hodin, při teplotě 24°C a za stálého osvětlení. Erlenmayerovy baňky byly opatřeny zátkami, přes které byl zajištěn stálý přísun vzduchu do roztoku.

Korelace

Aby mohla být vytvořena korelace závislosti absorbance na počtu buněk, byla připravena řada šesti roztoků. Roztoky byly tvořeny 1, 2, 3, 4 a 5 ml řasového inokula ze zásobní kultury, které byly doplněny na celkový objem 5 ml. U všech těchto roztoků proběhla kvantifikace řas na komůrce Cyrus I pod mikroskopem. Nejkoncentrovanější roztok, který obsahoval 5 ml řasového inokula, byl zdrojem informace o počtu buněk na ml v zásobní kultuře. Pomocí toho bylo vypočítáno potřebné množství řasového inokula tak, aby koncentrace ve všech testovaných roztocích byla 10^5 buněk/ml. Kontrolní roztok byl zvolen jako šestý roztok pro vytvoření korelace. Zároveň u něj byla provedena kontrola požadované koncentrace buněk. Stejně jako u ostatních 5 roztoků i zde byl spočítán počet buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem. Na závěr byla u všech roztoků změřena absorbance při 683 nm. Ze získaných hodnot byla vytvořena korelační přímka. Rovnice regrese z korelační křivky byla použita pro zjištění počtu buněk v testovaných roztocích po 72 hodinách inkubace. Za „y“ byla vždy dosazena hodnota absorbance konkrétního roztoku a vypočtená hodnota „x“ znamenala vždy počet buněk v testovaném roztoku.

3.3.5. Stanovení ekotoxicity kadmia v binární směsi diklofenak – Cd

Volba koncentrační řady

Byly zvoleny dvě koncentrace diklofenaku $0,1$ a $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, které se v koncentrační řadě směsi neměnily. Měnila se pouze koncentrace kadmia v rozmezí $0,0089 - 0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tabulka 17 *Koncentrace kadmia, koncentrace diklofenaku a poměr těchto dvou koncentrací*

Poměr	C _{Cd}	C _{dik.}
	[mmol·l ⁻¹]	[mmol·l ⁻¹]
1:0,089	0,0089	0,1
1:0,178	0,0178	
1:0,267	0,0267	
1:0,356	0,0356	
1:0,5	0,05	
1:1	0,1	
1:1,5	0,15	
1:2	0,2	
1:5	0,5	
1:10	1	

Tabulka 18 *Koncentrace kadmia, koncentrace diklofenaku a poměr těchto dvou koncentrací*

Poměr	C _{Cd}	C _{dik.}
	[mmol·l ⁻¹]	[mmol·l ⁻¹]
1:0,045	0,0089	0,2
1:0,089	0,0178	
1:0,133	0,0267	
1:0,178	0,0356	
1:0,5	0,1	
1:1	0,2	
1:1,5	0,3	

Příprava roztoků

Koncentrace zásobního zátoku kadmia byla 50 mg·50 ml⁻¹. Koncentrace zásobního roztoku diklofenaku byla 0,1g·100 ml⁻¹. Do Erlenmayerových baněk bylo pipetováno 5 ml živného média, které bylo před použitím 30 minut probubláváno vzduchem. K tomuto objemu živného média byly přidány 3 ml řasového inokula a vypočtené množství roztoku kadmia a diklofenaku. Všechny roztoky byly doplněny živným médiem na 50 ml. Takto byly připraveny dvě paralelní řady roztoků.

Současně byly připraveny dva kontrolní roztoky, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze 3 ml řasového inokula. U všech roztoků bylo na začátku změřeno pH, jehož hodnota činila 7,9.

Inkubace

Inkubace probíhala ve třepačce popsané v kapitole 3.2. po dobu 72 hodin, při teplotě 24 °C a za stálého osvětlení. Erlenmeyerovy baňky byly opatřeny zátkami, přes které byl zajištěn stálý přísun vzduchu do roztoku.

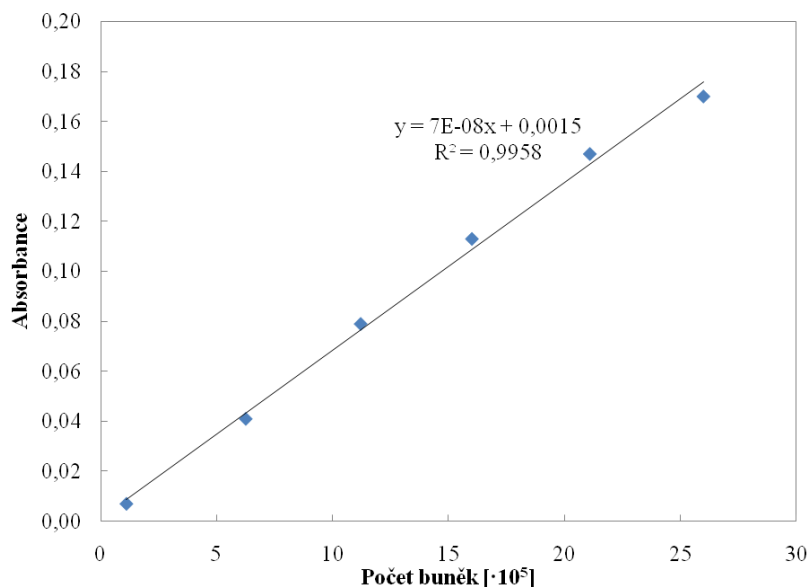
Korelace

Korelační závislost absorbance na počtu buněk byla provedena stejně jako u jednotlivých testovaných látek.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

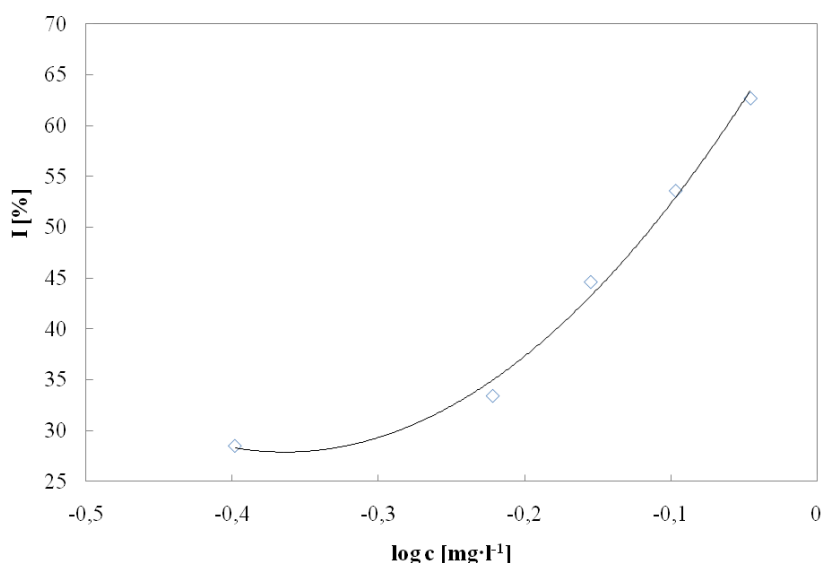
4.1. Ekotoxicita standardní látky dichromanu draselného

Závislost absorbance na počtu buněk byla lineární. Tato závislost je znázorněna na obrázku 9.

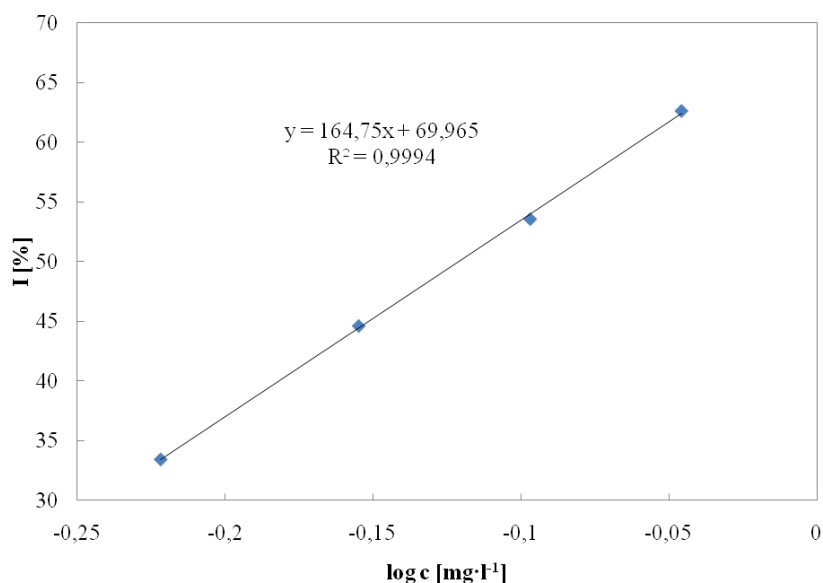


Obrázek 9 Závislost absorbance na počtu řasových buněk

Test s dichromanem draselným slouží k ověření platnosti podmínek testu a ověření stavu řasové kultury. Po 72 hodinách inkubace byla změřena absorbance každého roztoku. Pomocí této absorbance a regresní rovnice (obrázek 10) byl spočítán počet buněk v každém roztoku. Ze zjištěného počtu buněk na konci testu a počtu buněk na začátku testu, byla podle vzorce 3 spočítána růstová rychlost μ pro každou koncentraci dichromanu draselného. Z vypočítané růstové rychlosti byla zjištěna pomocí vzorce 5 inhibice růstu řasové kultury. Zjištěné hodnoty inhibice růstu jsou znázorněny v grafu v závislosti na logaritmu koncentrace.



Obrázek 10 Inhibice růst v závislosti na logaritmu koncentrace



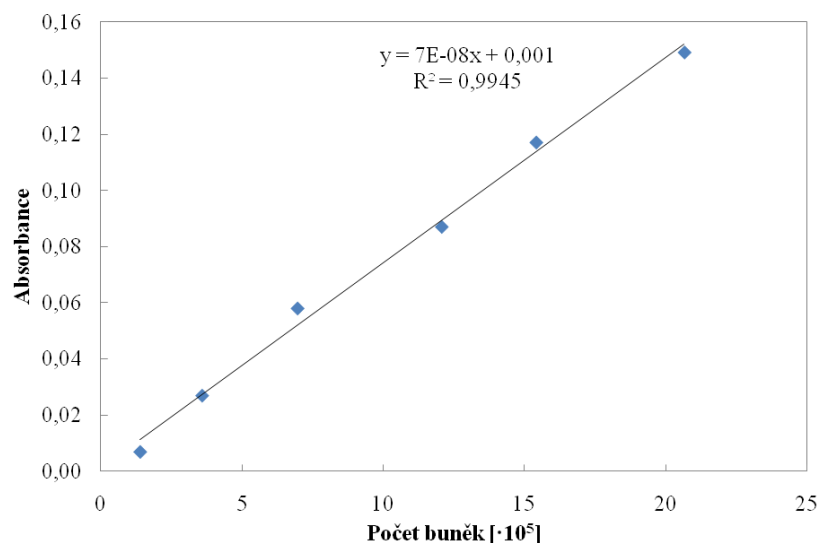
Obrázek 11 Lineární úsek, ve kterém se nachází hodnota I_rC_{50}

Do rovnice přímky byla za „y“ dosazena hodnota 50 %. Vypočítaná hodnota „x“ představovala hodnotu $\log I_rC_{50}$, která byla rovna $-0,12$. Po odlogaritmování této hodnoty byla zjištěna vlastní hodnota I_rC_{50} , která byla rovna $0,76 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Dichroman draselný byl použit jako referenční látka před provedením experimentálních řasových testů toxicity. Tato látka slouží k ověření správnosti podmínek pro test. Regresní přímka má korelační koeficient R^2 0,9958 (Obrázek 9). Znamená to, že rovnice regrese je vhodná pro všechny naměřené data, což zajišťuje správnost hodnot počtů buněk v jednotlivých testovaných roztocích, které jsou důležité pro výpočet růstové rychlosti μ . Pomocí růstové rychlosti byla vypočítána procentuální inhibice, která je znázorněná na obrázku 10. Inhibice růstu se stoupající koncentrací dichromanu draselného exponenciálně rostla. Proto pro přesnější určení hodnoty I_rC_{50} byly zvoleny lineární část datové přímky, aby regresní rovnice tyto data popisovala co přesněji (Obrázek 11). Z rovnice přímky byla vypočítána hodnota I_rC_{50} , která činila $0,76 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Literatura uvádí hodnotu I_rC_{50} $0,75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Odchylka mohla být způsobena změnou pH. Změna pH byla o 0,6 jednotky. Na konci testu byla tedy hodnota pH 8,4.

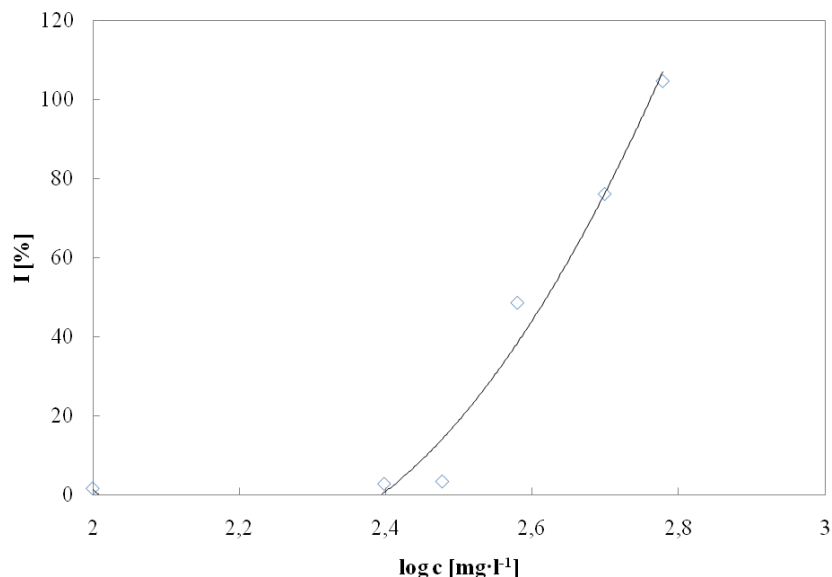
4.2. Ekotoxicita ibuprofenu

Závislost absorbance na počtu buněk byla lineární. Tato závislost je znázorněna na obrázku 12.

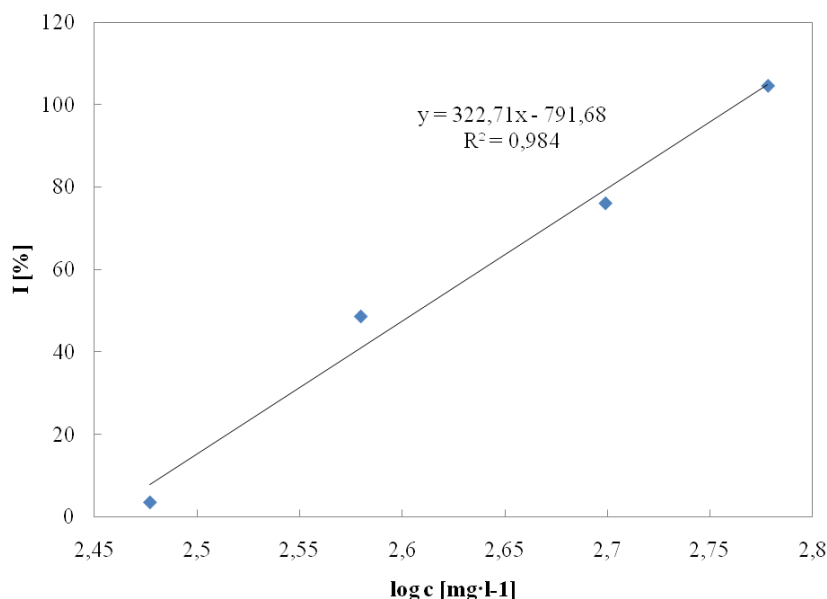


Obrázek 12 Závislost absorbance na počtu řasových buněk

Po 72 hodinách inkubace byla změřena absorbance každého roztoku. Pomocí této absorbance a regresní rovnice byl spočítán počet buněk v každém roztoku. Ze zjištěného počtu buněk na konci testu a počtu buněk na začátku test, byla podle vzorce 3 spočítána růstová rychlost μ pro každou koncentraci Ibuprofenu. Z vypočítané růstové rychlosti byla zjištěna pomocí vzorce 5 inhibice růstu řasové kultury. Zjištěné hodnoty inhibice růstu jsou znázorněny v grafu v závislosti na logaritmu koncentrace.



Obrázek 13 Inhibice růst v závislosti na logaritmu koncentrace



Obrázek 14 Lineární úsek, ve kterém se nachází hodnota $I_{rC_{50}}$

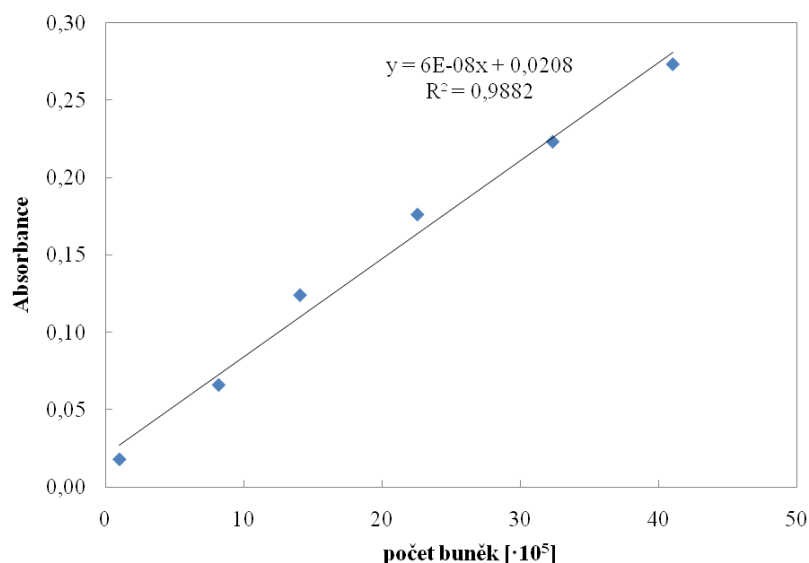
Do regresní rovnice byla za „y“ dosazena hodnota 50 %. Vypočítaná hodnota „x“ představovala hodnotu $\log I_{rC_{50}}$, která byla rovna 2,61. Po odlogaritmování této hodnoty byla zjištěna vlastní hodnota $I_{rC_{50}}$, která byla rovna 405,66 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Korelační přímka vytvořená pro výpočty potřebné pro zjištění potenciální škodlivosti ibuprofenu, byla proložena regresní přímkou a zjištěný koeficient korelace R^2 byl 0,9945 (Obrázek 12). Tato spolehlivost zajišťuje správný výpočet množství buněk v testovaných koncentracích ibuprofenu i v kontrolním roztoku, který neobsahoval testovanou látku. Správně vypočítané množství buněk je důležité pro výpočet růstové rychlosti μ . Ze spočítaných hodnot procentuální inhibice byl vytvořen exponenciální sled dat (Obrázek 13). Znamená to, že inhibice růstu s rostoucí koncentrací ibuprofenu rostla. Protože hodnota $I_{rC_{50}}$ ležela v lineární části datové přímky, byla tato část zvolena pro její přesnější výpočet. Vyhodnocení dat bylo tedy provedeno z lineárního úseku křivky a příslušný korelační koeficient R^2 byl 0,984 (obrázek 14). Hodnota $I_{rC_{50}}$ vypočítaná z regresní rovnice činila 405,66 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V literatuře je uvedena hodnota $I_{rC_{50}}$ v rozmezí 242,4 - 471,5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Naměřená experimentální hodnota leží v tomto intervalu hodnot. Rozpětí intervalu je velmi široké. Odlišné hodnoty $I_{rC_{50}}$ naměřené v tomto intervalu může způsobit druh použitého ibuprofenu. Ibuprofen vyrábí mnoho firem a jeho složení se tedy může mírně lišit. Změna hodnoty pH během testu může značně ovlivnit výsledek. V našem případě byla změna pH o 0,2 jednotky, což je v souladu s podmínkami testu.

Podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) nemůže být hodnota $I_{rC_{50}}$ 405,66 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ hodnocena ani jako škodlivá pro vodní organismy. Akutní toxicita této látky tedy nebyla klasifikována.

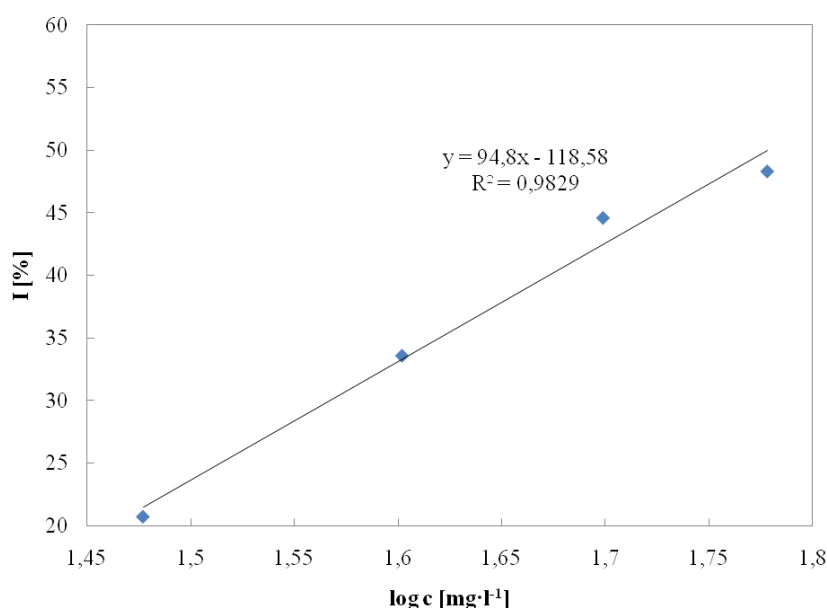
4.3. Ekotoxicita diklofenaku

Závislost absorbance na počtu buněk byla lineární. Tato závislost je znázorněna na obrázku 15.



Obrázek 15 Závislost absorbance na počtu řasových buněk

Po 72 hodinách inkubace byla změřena absorbance každého roztoku. Pomocí této absorbance a regresní rovnice byl spočítán počet buněk v každém roztoku. Ze zjištěného počtu buněk na konci testu a počtu buněk na začátku test, byla podle vzorce 3 spočítána růstová rychlost μ pro každou koncentraci Ibuprofenu. Z vypočítané růstové rychlosti byla zjištěna pomocí vzorce 5 inhibice růstu řasové kultury. Zjištěné hodnoty inhibice růstu jsou znázorněny v grafu v závislosti na logaritmu koncentrace.



Obrázek 16 Inhibice růst v závislosti na logaritmu koncentrace

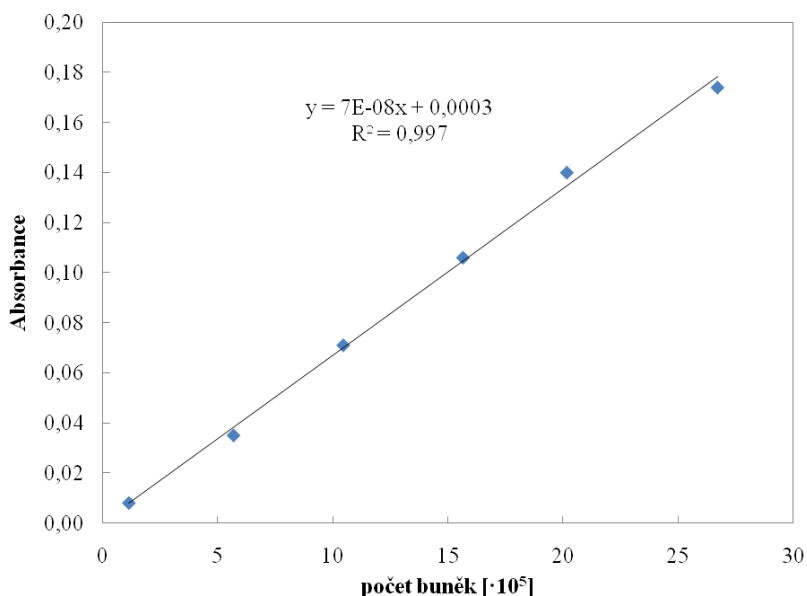
Do rovnice přímky byla za „y“ dosazena hodnota 50 %. Vypočítaná hodnota „x“ představovala hodnotu $\log I_{rC_{50}}$, která byla rovna 1,78. Po odlogaritmování této hodnoty byla zjištěna vlastní hodnota $I_{rC_{50}}$, která byla rovna $60,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Lineární regrese závislosti absorbance na počtu buněk měla korelační koeficient R^2 0,9882 (obrázek 15). Tato hodnota korelačního koeficientu zaručuje, že všechna naměřená data jsou zahrnuta v regresní rovnici. Z této rovnice byly vypočítané hodnoty množství buněk. Na obrázku 11 jsou pouze čtyři hodnoty z toho důvodu, že u koncentrace 100 a $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ došlo k úplné inhibici růstu a vypočítané hodnoty přesahovaly hodnoty 100 %. Z tohoto důvodu mají data v grafu lineární tvar. Spolehlivost regresní rovnice je vysoká, což znamená, že hodnota $I_{rC_{50}}$ vypočítaná z této rovnice je správně. Její hodnota je $60,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V literatuře se uvádí hodnota $I_{rC_{50}}$ v rozmezí $65,5 - 71,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Stanovené hodnoty $I_{rC_{50}}$ se mohou lišit ze stejných důvodů jako u ibuprofenu. Látka není vždy od stejného dodavatele a v průběhu testů se mohou lišit změny pH, což může mít značný vliv na výsledek. U tohoto testu došlo ke změně pH o 0,9 jednotky. Povolena hranice je 1,5 jednotky.

Podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) byl diklofenak klasifikován jako škodlivý pro vodní organismy.

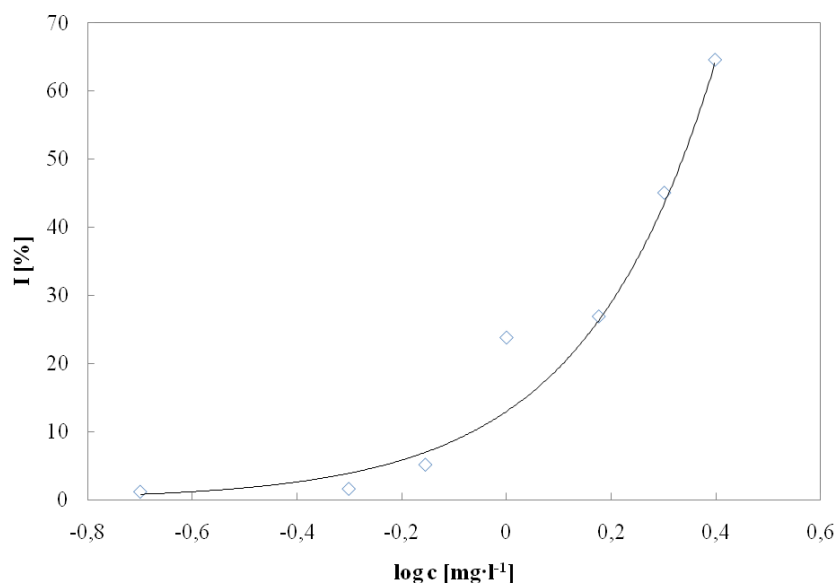
4.4. Ekotoxicita kadmia

Závislost absorbance na počtu buněk byla lineární. Tato závislost je znázorněna na obrázku 17.

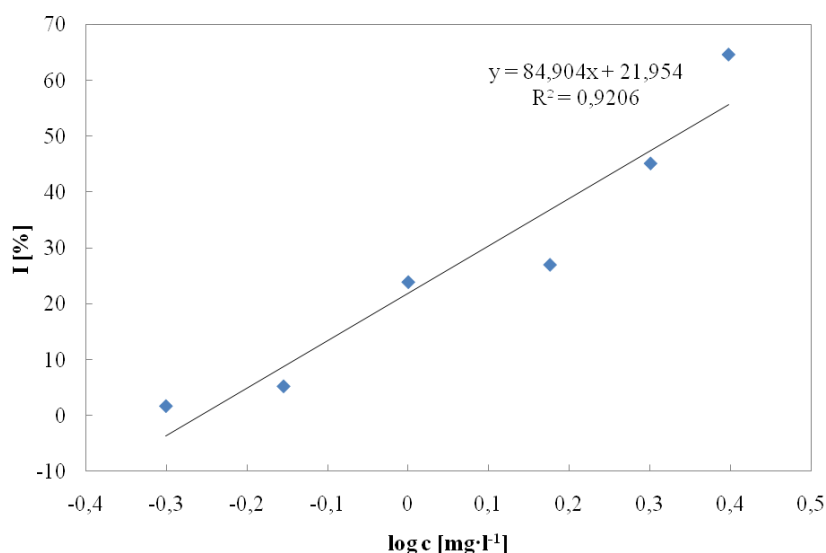


Obrázek 17 Závislost absorbance na počtu buněk

Po 72 hodinách inkubace byla změřena absorbance každého roztoku. Pomocí této absorbance a regresní rovnice byl spočítán počet buněk v každém roztoku. Ze zjištěného počtu buněk na konci testu a počtu buněk na začátku test, byla podle vzorce 3 spočítána růstová rychlost μ pro každou koncentraci Ibuprofenu. Z vypočítané růstové rychlosti byla zjištěna pomocí vzorce 5 inhibice růstu řasové kultury. Zjištěné hodnoty inhibice růstu jsou znázorněny v grafu v závislosti na logaritmu koncentrace.



Obrázek 18 *Inhibice růst v závislosti na logaritmu koncentrace*



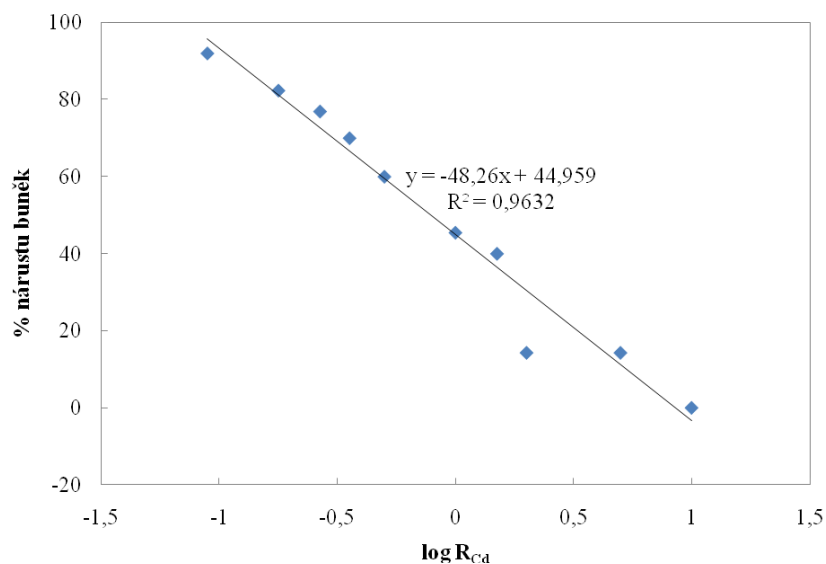
Obrázek 19 *Lineární úsek, ve kterém se nachází hodnota $I_{rC_{50}}$*

Do rovnice přímky byla za „y“ dosazena hodnota 50 %. Vypočítaná hodnota „x“ představovala hodnotu $\log I_{rC_{50}}$, která byla rovna 0,33. Po odlogaritmování této hodnoty byla zjištěna vlastní hodnota $I_{rC_{50}}$, která byla rovna $2,14 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

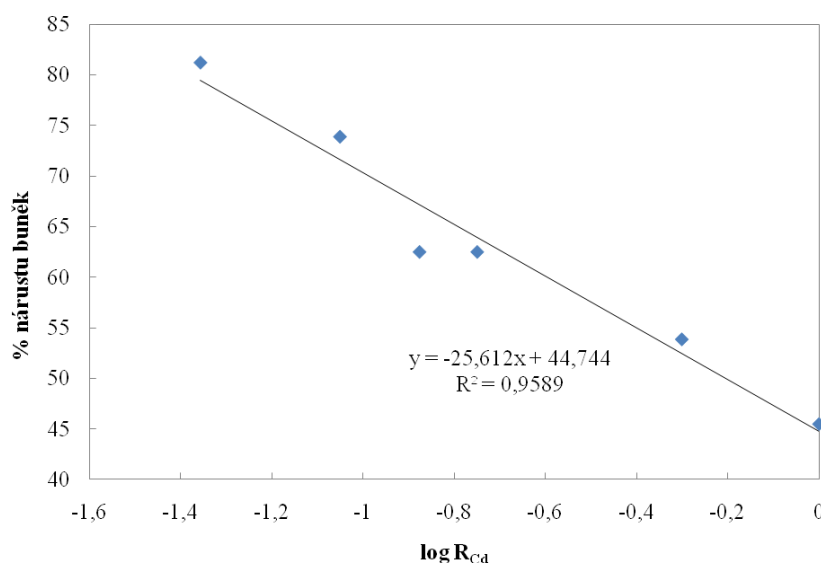
Hodnoty množství buněk, které byly počítány z rovnice regrese, jsou velmi přesné ($R^2 = 0,92$). S rostoucí koncentrací exponenciálně rostla i inhibice růstu řas (Obrázek 18). Pro přesnější stanovení hodnoty $I_{rC_{50}}$ a z důvodu, že tato hodnota ležela v lineární části získaných dat, byla tato data proložena regresní přímkou (obrázek 19). Hodnota $I_{rC_{50}}$ získaná z této rovnice činila $2,14 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Změna pH, byla o 0,9 jednotky. Podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) bylo kadmium klasifikováno jako toxické pro vodní organismy.

4.5. Ekotoxicita binární směsi diklofenaku a kadmia

Po 72 hodinách inkubace byla změřena absorbance každého roztoku připravené směsi diklofenak-kadmium. U každé ze dvou měřených řad koncentrací, byla vždy u nejnižší (minimální) hodnoty absorbance zvolená hodnota nárůstu buněk 0 %, tzn. 100% inhibice růstu. Z této hodnoty byly dopočítány nárůsty/inhibice buněk při dalších naměřených absorbancích. Tyto vypočítané hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na logaritmu poměru kadmia R_{Cd} . Poměr R kadmia ve směsi byl určen podle článku [35].



Obrázek 20 Závislost procentuálního nárůstu buněk na logaritmu poměru kadmia R_{Cd} pro koncentraci diklofenaku $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$



Obrázek 21 Závislost procentuálního nárůstu buněk na logaritmu poměru kadmia R_{Cd} pro koncentraci diklofenaku $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Do rovnice přímky byla za „y“ dosazena hodnota 50 %. Vypočítané hodnoty „x“ představovaly hodnoty logaritmů poměru kadmia R_{Cd} . Po odlogaritmování těchto hodnot byl získán poměr koncentrací diklofenaku a kadmia, při kterém je 50% nárůst buněk. Z těchto hodnot byla stanovena hodnota IC_{50} kadmia.

Tabulka 19 *Poměr kadmia, při kterém je 50% nárůst buněk a hodnota IC₅₀ kadmia pro koncentraci diklofenaku 0,1 mmol·l⁻¹*

log R _{Cd}	R _{Cd}	IC ₅₀	IC ₅₀
		[mg·l ⁻¹]	[mmol·l ⁻¹]
-0,1045	0,786	8,84	0,0786

Tabulka 20 *Poměr kadmia, při kterém je 50% nárůst buněk a hodnota IC₅₀ kadmia pro koncentraci diklofenaku 0,2 mmol·l⁻¹*

log R _{Cd}	R _{Cd}	IC ₅₀	IC ₅₀
		[mg·l ⁻¹]	[mmol·l ⁻¹]
-0,2052	0,623	7,00	0,0623

Na obrázcích 20 a 21 jsou znázorněná naměřená data. Zjištěná data s rostoucí koncentrací kadmia lineárně klesají. Regresní rovnice mají hodnoty koeficientů korelace R^2 0,9632 (Obrázek 20) a 0,9589 (Obrázek 21). V kapitole 3.4.4. je popsána toxicita samotného kadmia. I_rC_{50} samotného kadmia činila 2,14 mg·l⁻¹, což je po přepočtu 0,0185 mmol·l⁻¹. Pokud porovnáme tuto hodnotu I_rC_{50} s hodnotami IC₅₀ získanými z experimentálního měření zjistíme, že hodnoty toxicity kadmia jsou v přítomnosti diklofenaku nižší. Znamená to, že diklofenak eliminuje toxický účinek kadmia. Protože byla použita sodná sůl diklofenaku je pravděpodobné, že došlo k výměně sodných a kademnatých kationtů, což způsobilo eliminaci toxicity kadmia možným vznikem kademnaté soli diklofenaku. Ve směsi, která obsahovala 0,2 mmol·l⁻¹ diklofenaku byla eliminace toxického účinku nižší. Kadmium nebylo hodnoceno u každého poměru koncentrací zvlášť, ale bylo hodnoceno jako celek (obrázek 20 a 21). To může vysvětlit, proč nedošlo u větší koncentrace diklofenaku k větší eliminaci toxického účinku kadmia. Průměrná koncentrace kadmia byla u směsi s diklofenakem o koncentraci 0,1 mmol·l⁻¹ větší než u směsi s diklofenakem o koncentraci 0,2 mmol·l⁻¹. Tato skutečnost se tedy mohla projevit na výsledcích tím, že se ve směsi s diklofenakem o koncentraci 0,2 mmol·l⁻¹ eliminovalo menší množství kadmia. Avšak v obou případech došlo ke snížení ekotoxicity kadmia s přidavkem léčiva diklofenaku vůči čistému kadmiu. Lze tedy říci, že přítomnost diklofenaku snižuje výrazně (až 4 násobně) ekotoxicitu kadmia.

Podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) lze však stanovené hodnoty IC₅₀ kadmia ve směsi s diklofenakem stále klasifikovat jako toxické pro vodní organismy.

5. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla sledována ekotoxicita diklofenaku, ibuprofenu, kadmia a směsi kadmia s diklofenakem.

Před provedením řasového testu toxicity na uvedených látkách, byla stanovena ekotoxicita dichromanu draselného, který sloužil jako referenční látka. Hodnota I_rC_{50} pro dichroman draselný činila $0,76 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato hodnota se shodovala s hodnotou uvedené v ČSN ISO 8692 normě, a proto byly podmínky testu hodnoceny jako vyhovující pro testování dalších látek.

Hodnota I_rC_{50} pro ibuprofen činila $405,66 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ibuprofen podle klasifikace ve směrnici EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) nelze považovat za škodlivý pro vodní organismy. Hodnota I_rC_{50} pro diklofenak činila $60,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Diklofenak byl podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) klasifikován jako škodlivý pro vodní organismy.

Protože byl diklofenak pro vodní organismy škodlivější než ibuprofen, byl vybrán do směsi s kadmíem. Hodnota I_rC_{50} pro samotné kadmium činila $2,14 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ve směsi s diklofenakem mělo kadmium odlišné hodnoty IC_{50} . Kadmium ve směsi s diklofenakem o koncentraci $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mělo hodnotu IC_{50} $0,0786 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a ve směsi s diklofenakem o koncentraci $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mělo hodnotu IC_{50} $0,0623 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnoty IC_{50} pro kadmium ve směsi se lišily oproti hodnotě I_rC_{50} pro samotné kadmium. Z výsledků vyplívá, že diklofenak snižuje ekotoxicitu kadmia ve vodním prostředí. I po snížení ekotoxicity kadmia ve směsi s diklofenakem lze stanovené hodnoty binární směsi klasifikovat podle směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství, 1996) jako toxické pro vodní organismy.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník : Řasy* [online]. Praha : VCHŠT Praha, 2007 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=R002>.
- [2] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník : Zelené řasy, oddělení Chlorophyta* [online]. Praha : VCHŠT Praha, 2007 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=Z019>.
- [3] KALINA, Tomáš; VÁŇA, Jiří. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Karolinum, 2005. 606 s. ISBN 80-246-1036-1.
- [4] *Botanický ústav AV ČR v.v.i. : Úsek ekologie rostlin* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Culture Collection of Autotrophic Organisms. Dostupné z WWW: <http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/688.jpg>.
- [5] HÁJKOVÁ, Tereza. *Využití řasových testů v ekotoxikologii*. Brno, 2010. 61 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [6] KOČÍ, Vladimír; MOCO VÁ, Klára. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT Praha, 2009. 199 s. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [7] KNEJZLÍK, Zdeněk ; RUM L, Tomáš. NEPŘÍZNIVÝ VLIV XENOBIOTIK NA LIDSKÝ ORGANISMUS A METODY JEHO TESTOVÁNÍ. *Chemické listy*. 1999, 93, s. 607-615.
- [8] PAVLÍKOVÁ, Daniela , et al. *Ekotoxikologie*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2007. 152 s. ISBN 978-80-213-1690-4.
- [9] FARGAŠOVÁ, A. *Ekotoxikologické biotesty*. Bratislava : Perfekt, 2009. 317 s. ISBN 978-80-8046-422-6.
- [10] ČSN EN ISO 10253. *Jakost vod - Zkouška inhibice růstu mořských řas *Skeletonema costatum* a *Phaeodactylum tricornutum**. Praha : Český normalizační institut, 2006. 16 s.
- [11] ČSN EN ISO 8692. *Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Praha : Český normalizační institut, 2005. 20 s.
- [12] Alga, Growth Inhibition Test. *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS*. 1984, 201, s. 1-14.
- [13] OECD 201. *OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS : Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. Paříž : OECD nakladatelství, 2006. 26 s.
- [14] *Botanický ústav AV ČR v.v.i. : Media* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Culture Collection of Autotrophic Organisms. Dostupné z WWW: <<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php?page=me>>.
- [15] KOČÍ, Vladimír; MLEJNEK, Martin. *Vysoká škola Chemicko-Technologická* [online]. 2006 [cit. 2011-04-25]. Řasový mikrobiotest. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/mikrometodaras.htm>>.
- [16] *Minister of Economy, Trade and Industry* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Algal Growth Inhibition Test, Daphnia Acute Immobilization Test, and Fish Acute Toxicity Test. Dostupné z WWW: <http://www.meti.go.jp/english/information/data/TESTalga_daphnia.html>.

- [17] CLEUVERS, Michael. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, 59, s. 309–315.
- [18] *Microbiotests Inc.* : *ALGALTOXKIT FTM* [online]. 2008 [cit. 2011-05-02]. THE PRODUCT RANGE. Dostupné z WWW: <<http://www.microbiotests.be/product.htm>>.
- [19] *Microbiotests Inc.* [online]. 2008 [cit. 2011-04-25]. Microbiotests. Dostupné z WWW: <<http://www.microbiotests.be/>>.
- [20] *Microbiotests Inc.* : *MARINE ALGALTOXKIT FTM* [online]. 2008 [cit. 2011-05-02]. THE PRODUCT RANGE. Dostupné z WWW: <<http://www.microbiotests.be/product.htm>>.
- [21] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví [online]. 2011 [cit. 2011-05-02]. ČSN online. Dostupné z WWW: <<http://csnonline.unmz.cz/Vysledky.aspx>>.
- [22] KOTYZA, Jan, et al. LÉČIVA – „NOVÝ“ ENVIROMENTÁLNÍ POLUTANT. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 540-547.
- [23] *Vodárenství* [online]. 2010 [cit. 2011-05-03]. Mohou nás ohrozit léčiva v pitné vodě?. Dostupné z WWW: <<http://www.vodarenstvi.cz/clanky/mohou-nas-ohrozit-leciva-v-pitne-vode>>.
- [24] MARTÍNKOVÁ, Jiřina, et al. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2007. 380 s.
- [25] HAMPL, František; RÁDL, Stanislav; PALEČEK, Jaroslav. *Farmakochemie*. Praha : Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. 450 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [26] SUCHOPÁR, Josef; ŠVIHOVEC, Jan. *Volně prodejná léčiva : [publikace pro odborné pracovníky lékáren] : význam pro samoléčení, propagace, registrace, prodej*. Praha : PANAX, 2000. 195 s. ISBN 80-902126-9-7.
- [27] *TOXNET®: Toxicology Data Network : Hazardous Substances Data Bank* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Diclofenac. Dostupné z WWW: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~BqaBhT:1:cpp>>.
- [28] *TOXNET®: Toxicology Data Network : Hazardous Substances Data Bank* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Ibuprofen. Dostupné z WWW: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~lB6ToG:1>>.
- [29] HLAVÍNEK, Petr. *Xenobiotika* [online]. 2009 [cit. 2011-04-25]. Ibuprofen. Dostupné z WWW: <<http://www.xenobiotika.cz/index.php?page=databaze.php&lang=cz&id=2>>.
- [30] *ChemBlink* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Ibuprofen. Dostupné z WWW: <<http://www.chemblink.com/products/15687-27-1.htm>>.
- [31] CLEUVERS, Michael. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 2003, 142, s. 185-194.
- [32] *ToxRat* [online]. 2011 [cit. 2011-05-02]. Characteristics. Dostupné z WWW: <http://www.toxrat-solutions.de/Software_e/Eigenschaften_e/eigenschaften_e.html>.
- [33] *Lach:ner* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Chemikálie. Dostupné z WWW: <<http://www.lach-ner.com/chemikalie/c-58966/>>.
- [34] *L.E.T. Optomechanika* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Příslušenství mikroskopů. Dostupné z WWW: <<http://www.letpraha.cz/>>.
- [35] POKORNÁ, Adéla, et al. STANOVENÍ TOXICITY BINÁRNÍCH SMĚSÍ POMOCÍ HEPATOCYTŮ Z POTKANA. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 575-580.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ČSN	Česká státní norma
EN	Evropská norma
ISO	International Organization for Standardization
PCB	Polychlorované bifenyly
PAHs	Polycyklické aromatické uhlovodíky
POPs	Perzistentní organické látky
ČR	Česká republika
BB	Bristol modif. Bold
EC ₅₀	koncentrace, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
LC ₅₀	letální koncentrace, která způsobí 50 % mortalitu testovacích organismů ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku
OC	Observed Concentration
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
NOEC	No Observed Effect Concentration
EU	Evropská unie
EHS	Evropská hospodářská společnost
ČOV	Čistička odpadních vod
KNAPPE	Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Water
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammanatory Drugs
COX	cyklooxygenasa
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
ToxRat	Toxicity Response analysis and testing
CAS	Chemical Abstracts Service
CCALA	Culture Collection of the Centre of Algology