

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

VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH TESTŮ BIOTOXICITY PRO STANOVENÍ
NEBEZPEČNOSTI

STÁVAJÍCÍCH A/NEBO POTENCIÁLNÍCH POLUTANTŮ

UTILIZATION OF ALTERNATIVE TESTS OF BIOTOXICITY FOR DETERMINATION
INADVISABILITY OF EXISTING AND/OR POTENTIAL POLUTANTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

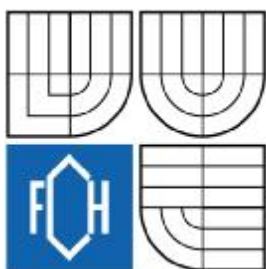
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE VAŠULKOVÁ

BRNO 2008



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

VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH TESTŮ BIOTOXICITY PRO STANOVENÍ NEBEZPEČNOSTI STÁVAJÍCÍCH A/NEBO POTENCIÁLNÍCH POLUTANTŮ

UTILIZATION OF ALTERNATIVE TESTS OF BIOTOXICITY FOR DETERMINATION
INADVISABILITY OF EXISTING AND/OR POTENTIAL POLUTANTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

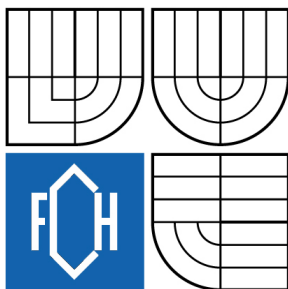
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE VAŠULKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. KAREL BEDNAŘÍK, Ph.D.

BRNO 2008



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0219/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Student(ka)

Vašulková Lucie

Studijní program

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)

Studijní obor

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)

Vedoucí diplomové práce

Ing. Karel Bednařík, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH TESTŮ BIOTOXICITY PRO STANOVENÍ NEBEZPEČNOSTI
STÁVAJÍCÍCH A/NEBO POTENCIÁLNÍCH POLUTANTŮ

Zadání diplomové práce:

Ověření ekotoxicity akrylamidu, oktachlorstyrenu a příbuzných sloučenin pomocí alternativních testů toxicity založených na sladkovodních organizmech. Prověření podmínek testů v závislosti na způsobech jejich provedení (rozsahu koncentrací testovaných polutantů, volba vhodného rozpouštědla a stanovení jeho samostatné toxicity v závislosti na koncentraci, způsobu získání vzorku, optimalizace hodnoty pH atd.), posouzení a eliminace případných negativních vlivů. Následné stanovení toxicit studovaných polutantů, jejich vyhodnocení a případné srovnání s jinými toxikologickými údaji získanými jinými způsoby, případně též u směsí se známým složením s toxicitou jednotlivých složek.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Lucie Vašulková
student(ka)

Ing. Karel Bednařík, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na ověření ekotoxicity oktachlorstyrenu (OCS), jakožto persistentního organického polutantu, který je v životním prostředí stálý, má schopnost se bioakumulovat a působit škodlivě na zdraví člověka, pomocí biologických testů toxicity.

Ke stanovení toxicity OCS byly použity dva alternativní testy, které využívají jako testovací zvíře sladkovodní organismy. První z nich, tzv. Thamnotoxkit, je založen na pozorování pohyblivosti, znehybnění nebo až usmrcení korýše *Thamnocephalus platyurus*, druhý z nich, Daphtoxkit, využívá korýše *Daphnia magna*.

Kromě alternativních testů byl pro srovnání stanovován i jeden standardní test toxicity, a to test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*, a dva testy fytotoxicity – test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor* a test inhibice růstu kořenů cibule *Allium cepa*.

V závěru práce je provedeno srovnání výsledků jednotlivých testů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ekotoxikologie, alternativní testy toxicity, standardní testy toxicity, fytotesty, oktachlorstyren (OCS)

ABSTRACT

This thesis is focused on attestation of ecotoxicity of octachlorstyrene (OCS), persistent organic pollutant (POP), which is stable and bioaccumulative in the environment and can negatively affect human health, by biological tests of toxicity.

The toxicity of OCS was determined by using two kinds of alternative tests applied on fresh water organisms. First of them, so called Thamnotoxkit, is based on observation of mobility, immobilization or even killing of crustacean *Thamnocephalus platyurus*. The second one, Daphtoxkit, applies crustacean *Daphnia magna*.

For purposes of comparison, a standard test of toxicity – so called test of root growth inhibition of *Sinapis alba* and two fytotests – test of growth inhibition of *Lemna minor* and test of root growth inhibition of *Allium cepa* were performed as well.

Results of single tests are compared in conclusion of the thesis.

KEY WORDS

Ecotoxicology, alternative tests of toxicity, standard tests of toxicity, fytotests, octachlorstyrene (OCS)

VAŠULKOVÁ, L. *VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH TESTŮ BIOTOXICITY PRO STANOVENÍ NEBEZPEČNOSTI STÁVAJÍCÍCH A/NEBO POTENCIÁLNÍCH POLUTANTŮ*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Karel Bednařík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

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

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1. Persistentní organické polutanty.....	8
3.1.1. Oktachlorstyren (OCS).....	8
3.2. Ekotoxikologie	11
3.2.1. Definice ekotoxikologie	11
3.2.2. Cíl ekotoxikologie	12
3.2.3. Ekotoxikologické způsoby zkoumání ŽP	12
3.3. Toxikologie.....	13
3.4. Biotest.....	13
3.4.1. Princip ekotoxikologického biotestu	14
3.4.2. Rozdělení biotestů	15
3.4.3. Fytotesty	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1. Výroba oktachlorstyrenu	27
4.2. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	28
4.3. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i>	30
4.4. Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	31
4.5. Thamnotoxkit F TM	33
4.6. Daphtoxkit F TM	36
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Volba vhodného rozpouštědla	39
5.1.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i>	39
5.1.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i>	39
5.2. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	40
5.2.1. Referenční test s dichromanem draselným.....	40
5.2.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu	42
5.3. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i>	43
5.3.1. Referenční test s dichromanem draselným.....	43
5.3.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu	44
5.4. Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	47
5.5. Thamnotoxkit F TM	48
5.5.1. Referenční test s dichromanem draselným.....	48
5.5.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu	49
5.6. Daphtoxkit F TM	51
5.6.1. Referenční test s dichromanem draselným.....	51
5.6.2. Test s OCS rozpuštěným v 0,5 % acetonu	52
6. DISKUZE	54
7. ZÁVĚR.....	57
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	58
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	61
10. SEZNAM PŘÍLOH	62

1. ÚVOD

Všechny složky životního prostředí jsou kontaminovány převážně z antropogenních zdrojů neustálým přísunem nežádoucích látek, jejichž koncentrace často stoupá nad úroveň přirozeného pozadí. Pro hodnocení stupně znečištění hraje nezastupitelnou roli chemická a fyzikální analýza, která při současném stavu přístrojové techniky umožňuje s vysokou přesností stanovit ve vzorcích z životního prostředí velmi malá množství kontaminujících látek. Ani sebecitlivější analytické metody však nemohou zodpovědět všechny otázky týkající se toxických účinků xenobiotik. Na základě přítomnosti a koncentrace jednotlivých sloučenin nelze totiž spolehlivě předpovědět jejich toxický vliv na různé formy života. U směsí toxikantů pak zpravidla nebývá výsledný účinek prostým součtem toxických vlivů jednotlivých složek, a proto nelze předem určit, zda budou toxikanty ve směsi vykazovat synergický nebo naopak antagonistický efekt. Některé kontaminanty vyskytující se v životním prostředí nebyly dokonce dosud spolehlivě identifikovány. Proto se stále ve větší míře využívají biologické metody stanovení toxicity a to především v zemích, kde je péči o životní prostředí věnována zvýšená pozornost. Posouzení kontaminantů z biologického hlediska tvoří vhodný doplněk k tradičně používaným fyzikálně-chemickým metodám.¹

Testy toxicity na organismech vodního prostředí mají svou nezastupitelnou úlohu při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků včetně pesticidů a při klasifikaci odpadů určených pro skládkování. Tyto testy mají rovněž velký význam při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách.²

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je ověření ekotoxicity oktachlorstyrenu zejména pomocí alternativních testů toxicity založených na sladkovodních organismech (Daphtoxkit, Thamnotoxkit). Dále pro srovnání provedení klasických testů toxicity (inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*) a fytotestů (inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor* a kořene cibule *Allium cepa*). Proověření podmínek testů v závislosti na způsobech jejich provedení (rozsahu koncentrací testovaného polutantu, volba vhodného rozpouštědla a stanovení jeho samostatné toxicity v závislosti na koncentraci), posouzení a eliminace případných negativních vlivů. Následné stanovení toxicit studovaných polutantů a jejich vyhodnocení.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Persistentní organické polutanty

Persistentní organické polutanty (POP) jsou chemické látky, které jsou v životním prostředí persistentní neboli stálé, mají schopnost bioakumulovat se přenosem v potravním řetězci a představují riziko vzniku škodlivého účinku na lidské zdraví a životní prostředí vůbec. U těchto látek byla rovněž prokázána jejich schopnost dálkového transportu i do oblastí, ve kterých nikdy nebyly vyráběny nebo používány, což následně vede k jejich globálnímu rozšíření.³

Kromě dobře známých a celosvětově sledovaných POP jako jsou Aldrin, Chlordan, DDT, Dieldrin, Endrin, dioxiny, furany, Heptachlor, HCB, Mirex, PCB, Toxaphen do této skupiny patří i oktachlorstyren.³

3.1.1. Oktachlorstyren (OCS)

3.1.1.1. Úvod

Zatímco globální distribuce chlorovaných aromatických sloučenin (např. polychlorované bifenylly a organochlorované pesticidy) do životního prostředí je dnes již dobře zmonitorována, o globální emisi OCS a jeho geografické distribuci je zatím k dispozici málo informací.⁵

Výroba hořčíku, výroba chlorovaných rozpouštědel a odplyňování hliníku pomocí hexachlorethanu patří k historicky nejzávažnějším zdrojům OCS. V dnešní době se za nejvýznamnější zdroj považuje spalování odpadních materiálů při teplotě 600 – 800 °C, během něhož se formuje OCS jako meziprodukt. Vznik OCS je úzce spjat s tvorbou HCB, stejně jako s tvorbou polychlorovaných dibenzodioxinů (PCDD); obecně lze říci, že kdykoliv je během chemické reakce, jako je např. hoření, spalování, tavení chloridových solí na uhlíkové elektrodě atd., produkován HCB a/nebo PCDD, je s velkou pravděpodobností rovněž formován OCS.⁵

Narozdíl od běžně sledovaných polutantů, jako jsou PCB a organochlorované pesticidy (př. HCB), není OCS pravidelně sledován a environmentální vyšetření je prováděno jen čas od času. Nicméně byly prokázány stálé nálezy OCS ve vzorcích ryb a sedimentů odebíraných v okolí spaloven a poblíž bodových zdrojů průmyslového vypouštění.^{4,5}

3.1.1.2. Vztah mezi OCS a HCB

Mezi hladinami OCS a PCB v životním prostředí existuje statisticky významná korelace, kterou lze vypočítat pro různé druhy a která zřetelně indikuje určitý vztah mezi oběma polutanty. Tento vztah mezi OCS a HCB závisí pravděpodobně jak na biodostupnosti a environmentální přítomnosti každého z polutantů, tak i na schopnosti jednotlivých druhů akumulovat a/nebo metabolizovat OCS a HCB. Podle jistých studií z roku 2003 prováděných Toxikologickým centrem na Universitě v Antverpách v Belgii bylo zjištěno, že všechny testované ryby, ptáci, ježci a slávky zřejmě akumulují OCS ve větším množství než HCB. Naopak u garnátů, sviňuch a lidí dochází k vyšší akumulaci HCB než OCS. Zdá se, že lidé jsou schopni metabolizovat OCS ve větší míře než HCB.⁵

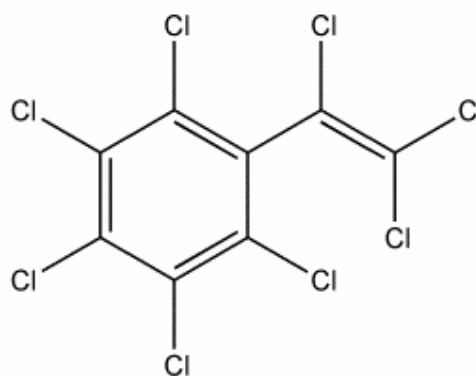
Pan C. D. Sandau ve své publikaci *Environmental Health Perspect* z roku 2002 upozorňuje na relativně vysokou koncentraci 4-heptachlorstyrenu, hlavního metabolitu OCS, v lidské plazmě a játrech.⁵

3.1.1.3. Fyzikální a chemické vlastnosti OCS

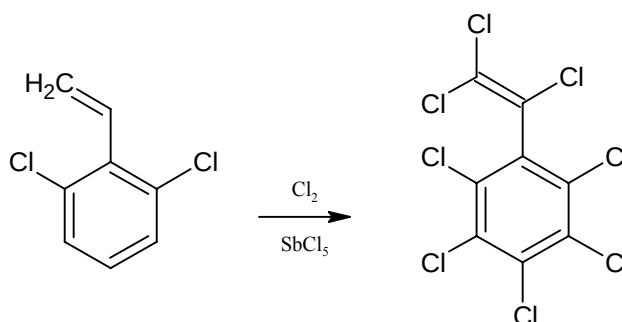
- Triviální název: Oktachlorstyren
- Systematický název: Pentachloro(trichloroethenyl)benzen
- Molekulární vzorec: C_8H_8
- Molekulární hmotnost: 379,71
- Tenze par: 0,0018 Pa (25 °C)
- Rozpustnost ve vodě: 0,00174 mg/l (25 °C)

Polychlorované styreny patří do skupiny sloučenin, ve které jsou uhlíkové atomy styrenové struktury nahrazovány chlorem. V případě oktachlorstyrenu je chlorem nahrazeno všech osm atomů vodíku.

OCS a HCB jsou si velmi podobné svou molekulární strukturou. V obou případech se jedná o „perchlorované“ sloučeniny, ve kterých každá molekula nese tolik atomů chloru, kolik je jen strukturálně možné.⁴



3.1.1.4. Syntéza OCS



Existuje více možností jak syntetizovat OCS. Pro účely této práce byl však syntetizován halogenací 2,6–dichlorstyrenu a to tak, že veškeré atomy vodíku byly nahrazeny atomy chloru.⁶

Během reakce se uplatňují dva mechanismy – chlorace aromatického jádra probíhá na principu *ELEKTROFILNÍ AROMATICKÉ SUBSTITUCE*, zatímco chlorace alkenylové skupiny probíhá na principu *RADIKÁLOVÉ SUBSTITUCE*.⁷

3.1.1.5. Zdroje OCS

OCS je stopově se vyskytující meziprodukt, který se uvolňuje během procesů, kde se spojuje uhlík, chlor a energie. Nicméně se jedná o chemickou sloučeninu, která nikdy nebyla vyráběna ke komerčním účelům, může ovšem vznikat při hoření či spalování látek obsahujících chlorované sloučeniny.^{4, 8}

Je známo, že v *minulosti* byl OCS součástí odpadů vznikajících během elektrolytické výroby chlóru (cca před rokem 1975). Od té doby továrny na výrobu chlóru vylepšily své výrobní procesy a vyřadily z nich používání grafitových anod, jejichž eroze kdysi bývala zdrojem uhlíkových atomů, které se podílely na formování chlorovaného uhlovodíkového odpadu.

Současné zdroje OCS jsou úzce spjaty se zdroji HCB a PCDD. Patří sem např.:

- tavení kovů (měď, nikl, hořčík)
- hliníkové slévárny a sekundární tavící pece
- spalování odpadů
- chlorované pesticidy
- vysokoteplotní procesy výroby kovu využívající chlór/uhlík.⁴

3.1.1.6. Geografická distribuce OCS v životním prostředí

Neznámá sloučenina s osmi atomy chloru byla poprvé zaznamenána ve vzorku tkáně kajky v Nizozemí v roce 1966. Tato záhadná sloučenina byla následně identifikována jako oktachlorstyren.⁴

Jeho rozšiřování do životního prostředí bylo hodnoceno na základě analýzy několika reprezentativních vzorků. OCS nebylo možné detekovat ve vzorcích zeminy z městských či venkovských oblastí ani v sedimentech, ale byl přítomen v průmyslové zemině odebrané v blízkosti chemicky znečištěných oblastí v průměrném množství 5,41 ng/g suché váhy.²³

Zobecnit však geografickou distribuci OCS není možné, neboť jeho výskyt v životním prostředí je značně nerovnoměrný.⁴

- Během konce 80. let probíhal v U.S. celostátní průzkum chemických reziduí, který využíval jako testovací organismy ryby. OCS byl detekován v pouhých 9 % testovaných ryb a to s vysokou pravděpodobností právě u těch, které pocházely z lokalit umístěných relativně blízko zdroje znečištění. K podobnému závěru vedl i průzkum na rybách, který se uskutečnil v letech 1999 – 2000.⁵
- OCS byl detekován i v rybách ze Severního moře, ale nikoliv však ve vzorcích ryb ze Středozemního moře, severního Atlantiku nebo Rudého moře.⁵
- V Norsku byl OSC naměřen pouze ve vejcích jedné ze sedmi kolonií racka mořského a to právě v kolonii zdržující se nejbližší k továrně s elektrolytickou výrobou hořčíku. Další studie prokázala jistou souvislost mezi znečištěním z této továrny a výskytem OSC u krabů žijících o 50 km dále směrem po proudu.⁵

V Evropě byla relativně vysoká hladina OCS detekována podél řeky Labe v Německu ve vzorcích ryb a lidské krve.⁵

3.1.1.7. Opatření proti šíření OCS

Obecně neexistují žádná opatření, která by chránila životní prostředí před znečišťováním OCS. Nicméně existuje celá řada omezení pro HCB a speciálně pro dioxiny. Jak už bylo zmíněno, tvorba OCS je úzce spjata se vznikem HCB, stejně jako celá řada dalších chlorovaných uhlovodíků včetně dioxinů. Proto potenciální možnosti ke snížení OCS jsou obecně ty samé jako možnosti pro snížení dalších chlorovaných uhlovodíkových meziproduktů. Během několika posledních desetiletí byla přijata opatření proti těmto látkám (dioxiny a PCB), což se paralelně projevuje právě snižováním výskytu OCS.⁵

3.1.1.8. Dopad na lidské zdraví

Oktachlorstyren patří do skupiny *podezřelých karcinogenů*, které mohou způsobovat poruchy krvetvorby, jater a ledvin. K expozici na pracovišti (př. slévárna) může dojít inhalací prachu či kožním kontaktem, mimo pracoviště příjmem potravy. Mezi symptomy otravy patří hypersenzitivní dermatitida, astma, bolest hlavy, závratě, nevolnost, zvracení, dezorientace, třes, podrážděnost, křeče, záchvaty, koma až zástava dýchání.

OCS *nejeví známky mutagenity* v bakteriálním biotestu a rovněž *není považován za akutně toxický*, dlouhotrvající dopad chlorovaných styrenů na životní prostředí je však stále nejasný. Studie prokazují, že u dělníků vystavených expozici OCS se statisticky významně objevuje nárůst porfyrinů v moči, který lze detekovat ještě několik let po ukončení expozice.⁴

Právě se zvýšeným množstvím porfyrinů v moči je spojena choroba *PORFYRIE*.

Jedná se o celou skupinu onemocnění způsobených nějakou abnormalitou při chemickém procesu tvorby hemu. Pro tvorbu hemu je nezbytná celá řada složitých enzymů. Pokud jakýkoliv z potřebných enzymů začne vykazovat abnormální chování, proces tvorby hemu nemůže pokračovat a začne se vytvářet jeho meziprodukt, tzv. porfyrin, nebo jeho prekurzor, který se pak vylučuje močí nebo stolicí z těla ven.⁹

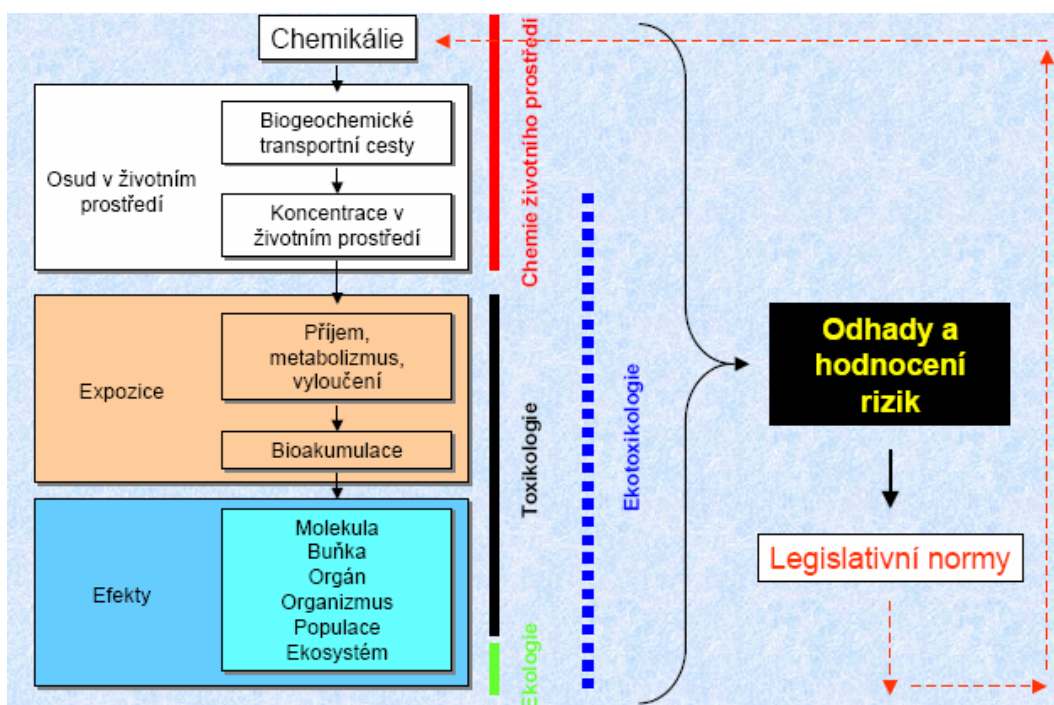
Porfyrická onemocnění lze rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli postihují kůži a nebo nervovou soustavu. *Kožní porfyrie* postihuje kůži. Lidem s touto chorobou se při vystavení se slunečnímu záření objevují na kůži svědící a velmi bolestivé puchýřky a otekliny. *Akutní porfyrie* postihuje nervový systém a mezi její symptomy patří bolest hrudníku, břicha, končetin, zad, dále svalová otupělost, brnění, paralýza či křeče; zvracení; zácpa; změny osobnosti nebo mentální zaostalost.⁹

Porfyrie je nemoc, která se může spustit vlivem působení drog či různých chemikálií, hladovkou, kouřením, pitím alkoholu, infekcí, psychickým nebo fyzickým stresem, působením slunečního záření. Nejčastěji se ale jedná o onemocnění dědičné.⁹

3.2. Ekotoxikologie

3.2.1. Definice ekotoxikologie

Ekotoxikologie je multidisciplinární součástí věd o životním prostředí propojující přístupy chemie životního prostředí, toxikologie a ekologie.¹⁰



Obr. 3.1: Znázornění oblasti zájmu ekotoxikologie jako multidisciplinárního oboru ¹¹

3.2.2. Cíl ekotoxikologie

Ekotoxikologie se zabývá analýzou a porozuměním vlivu chemických látek na všechny biologické úrovně živé přírody. Cílem ekotoxikologie je především ochrana živé přírody a člověka jako její integrální součásti, dále si klade za cíl zabránit poškození a předejít ohrožení ekosystému (prevence), předpovědět a odhadnout škodlivost chemikálií, předpovědět a odhadnout rizika spojená s životním cyklem chemikálií, vývoj praktických nástrojů pro odhady škodlivosti a rizik, analýza a pochopení přímých a nepřímých účinků chemikálií na všechny biologické úrovně ekosystému, studium a hodnocení (škodlivých) účinků chemických látek. ^{11, 12}

3.2.3. Ekotoxikologické způsoby zkoumání ŽP

3.2.3.1. Biomonitoring

Ke zjištění přítomnosti škodliviny je použit indikační organismus tzv. *bioindikátor*. Jedná se o vybrané organismy a jejich společenstva, která reagují citlivě na škodlivé chemikálie a poskytují tak informace o expozici a účincích škodlivin – odrážejí změny jak různých životních funkcí a struktur, tak i bioakumulaci. Reagují vlastně na biologicky dostupnou sumu škodlivin. Přítomnost škodlivin vyvolává stresovou reakci bioindikátoru, což se projeví produkcí *biomarkeru* = zátěžového indikátoru (např. zeslabování vaječné skořápky následkem působení DDT, DDE). Jde o jakýsi *systém včasného varování*. ¹¹

3.2.3.2. Studium chování látek v ŽP

Jedná se o studium procesů, kterým látky v životním prostředí podléhají. Provádí se jednak v podobě laboratorního výzkumu stimulujícího realitu a jednak jako studium chování látek na reálných systémech v přírodě. ¹¹

3.2.3.3. Modelování

Existují 2 možná řešení modelů – tzv. *supermodel* propojuje celou řadu menších, velmi podrobných modelů v jeden velmi složitý celek, je však matematicky prakticky neřešitelný. Proto se častěji využívá druhého, značně *zjednodušeného řešení*, kdy je mimořádně komplexní reálný svět nahrazen zjednodušenými abstrakcemi se silně zjednodušenými předpoklady.¹¹

Cílem modelování životního prostředí je předpověď chování chemické látky v ŽP, výzkum cest, způsobů šíření a perzistence škodlivin, návrhy preventivních opatření u nových látek vzhledem k ekosystému, návrhy preventivních opatření proti škodlivému působení na člověka a ostatní organismy i zavedení zákonných ochranných opatření.¹¹

3.3. Toxikologie

Znalost biologických vlastností chemických látek patří mezi jejich základní charakteristiky, stejně jako jejich chemické a fyzikální vlastnosti. Souborem biologických vlastností, které na organismus působí negativně, se zabývá toxikologie. Toxikologie v užším pojetí je věda o účincích jedů. Pojednává o jedovatých látkách, všímá si vztahů mezi chemickou strukturou a toxickým účinkem. Dále se zabývá mechanismem účinku, vstřebáváním toxické látky, její distribucí v organismu, biotransformací a exkrecí z organismu. Vedle účinků bezprostředních (akutní toxicita) si všímá také účinků pozdních (chronická toxicita), zejména pak po dlouhodobé opakované intoxikaci.¹²

Toxikologie se někdy také dělí na experimentální a klinickou. Toxikologie experimentální studuje účinek jedu na vybraném pokusném zvířeti, toxikologie klinická pak studuje – popisuje účinek na člověka; opírá se přitom o výsledky toxikologie experimentální a je navíc doplňována o nalezení vhodné terapie.¹²

Toxikologie je chápána v několika úrovních. Nejčastěji to bývá úroveň molekulární, buněčná a orgánová. Poslední je spjata s problematikou pokusného biologického objektu, kterým je nejčastěji „laboratorní zvíře“.¹²

3.4. Biotest

Biotest lze definovat jako proces, při kterém je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku. Obecně lze tedy říci, že biotest slouží k hodnocení nepříznivého vlivu škodlivin na biotickou složku životního prostředí.¹³

Biotesty pro vodné různě kontaminované vzorky nebo jejich výluhy jsou navrhovány tak, aby indikátorovými organismy byly typické druhy zastupující nejvýznamnější složky ekosystémů povrchových vod. Bioindikátory mohou reagovat na přítomnost toxikantu např. určitou změnou některé fyziologické funkce, změnou pohyblivosti, růstu nebo produkce. V krajním případě může dojít i k usmrcení testovacího organismu.^{1, 13}

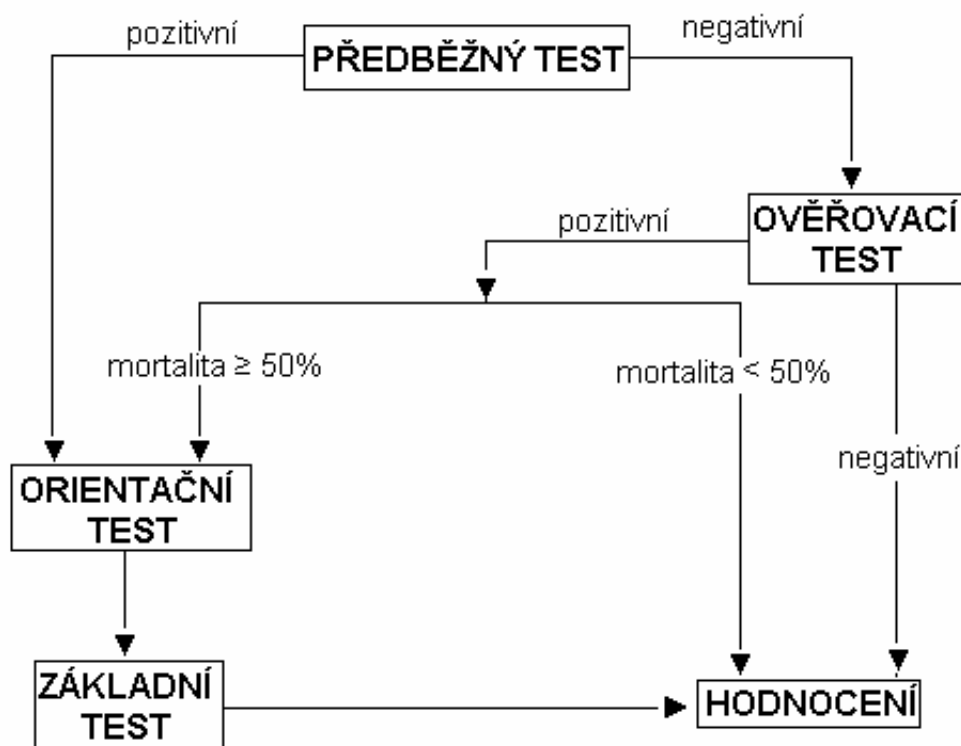
Existuje velké množství biologických testů, které mohou být různým způsobem klasifikovány. Nejběžnější je klasifikace podle délky kontaktu bioindikátoru s testovaným toxikantem, podle které jsou testy členěny na akutní, subakutní a chronické. Je ovšem třeba zdůraznit, že toxicita určité látky může být pro různé organismy různá. Proto je nutné postupovat velmi opatrně při zobecňování informací získaných na jednotlivých testovacích bioindikátorech, zvláště ve vztahu k člověku. Pro zvýšení objektivity se často pro testování

používá nejen jeden druh organismu, ale soubor několika biologických druhů různé složitosti a trofické úrovně (producenti – konzumenti – destruenti).^{6, 10, 14}

3.4.1. Princip ekotoxikologického biotestu

Základním principem testů toxicity je zjištění odezvy organismů v přítomnosti toxické látky. Akvaristické testy toxicity popisují vztah koncentrace (dávka) – odpověď. Akutní testy jsou obvykle navrženy pro zhodnocení vztahu dávka – odpověď, zatímco chronické hodnotí subletální účinky jako růst, reprodukce, chování, zbytky látky v tkáních nebo biochemické účinky a poskytují odhad koncentrace, kdy se neprojevují nepříznivé účinky.¹⁵

Postup ekotoxikologického hodnocení látek je schematicky znázorněn na obrázku 3.2.



Obr. 3.2: Schématické znázornění postupu ekotoxikologického testu¹⁴

3.4.1.1. Předběžný test

V předběžném testu se vzorek o neznámé toxicitě podrobí první zkoušce s testovacími organismy. Jde o to zjistit, zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Používají se dvě paralelní nasazení se dvěmi kontrolami. Nedojde-li k úhynu žádného organismu, je předběžný test hodnocen jako negativní a přistoupí se k ověřovacímu testu.¹⁶

3.4.1.2. Ověřovací test

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

skutečnosti se zaznamenají do protokolu. Překročí-li mortalita 50 %, přistupuje se k orientačnímu testu.¹⁶

3.4.1.3. Orientační test

Účelem tohoto testu je určení rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu EC_{50} testované látky. Používá se zde zpravidla 10 koncentrací vodného výluhu volených v širokém rozpětí. Do tohoto testu se nasazuje menší počet pokusných organismů, obvykle postačuje testovat jednu koncentrační řadu a do každé testované koncentrace nasadit čtyři organismy. Cílem je zjistit nejvyšší koncentraci látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů (EC_0), a nejnižší koncentraci, která již působí letálně (EC_{100}).¹⁶

3.4.1.4. Základní test

Základní test slouží k vlastnímu určení hodnoty EC_{50} . Test sestává zpravidla ze 7-mi různých koncentrací vodného výluhu v rozmezí stanoveném orientačním testem. Ředění se provádí tak, aby kolem předpokládané hodnoty EC_{50} došlo k úhynu nebo imobilizaci 5 – 95 % organismů ve třech či více ředěních. Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěné orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2 - 3 paralelní řady. Po 24 a 48, 72 hodinách se odečítá počet uhynulých či imobilizovaných organismů. Ze zjištěných údajů se spočítá hodnota EC_{50} .¹⁶

3.4.1.5. Interpretace výsledků

Výsledek ekotoxikologických testů je negativní, jestliže v ověřovacím testu nedojde k překročení 10 % imobilizace či úhynu ve srovnání s kontrolou.

Jestliže v ověřovacím testu uhynie méně než 50 % (ale více než 10 %) testovaných organismů, nelze hodnotu EC_{50} stanovit a tato skutečnost se uvede do protokolu. Výsledek je hodnocen jako pozitivní.

Způsobuje-li testovaná látka větší než 50% úhyn nebo imobilizaci, je výsledkem ekotoxikologické zkoušky hodnota EC_{50} .^{1, 16}

3.4.2. Rozdělení biotestů

3.4.2.1. Podle doby expozice

✓ Akutní testy toxicity

Akutní toxicita se odhaduje stanovením letální dávky (LD_{50}), t.j. stanovením dávky, která způsobí akutní úhyn 50 % experimentálních zvířat. Čím nižší jsou hodnoty LD_{50} , tím toxičtější je daná látka. Hodnoty LD_{50} jsou udávány v $mg.kg^{-1}$, což znamená 1 mg účinné látky na 1 kg tělesné váhy testovaného zvířete. Akutní LD_{50} však neodráží celé spektrum toxicity, protože některé látky s nízkou hodnotou akutní LD_{50} mohou mít teratogenní nebo mutagenní účinek v dávkách nižších než ty, co vyvolávají akutní toxicitu. Hodnotě LD_{50} by měl být přikládán jen orientační význam. Výsledek zkoumané látky se projevuje po podání jediné dávky pokusným zvířatům a tato jednorázová expozice obvykle trvá 24 hodin, u inhalace dokonce jen 4 hodiny. Zkoušený přípravek i standard se aplikují vždy ve stejném množství. Úhyn zvířat se počítá nejdříve po 24 hodinách od aplikace a pozorovací doba je 7 dní, pokud není určeno jinak.

V případě, kdy je sledována akutní inhalační toxicita účinné látky, určuje se letální koncentrace (LC_{50}), což je koncentrace toxické látky, která způsobí úhyn 50 %

experimentálních zvířat. Hodnoty LC_{50} se uvádějí v $mg.l^{-1}$. Obecně opět platí, čím je nižší hodnota LC_{50} , tím je účinná látka toxičtější.

Akutními testy jsou hodnocené účinky, které se projeví krátce po jednorázovém podání. Nejčastěji se stanovuje úmrtnost (mortalita) měřená jako LD_{50} nebo LC_{50} . Stanoví se závislost účinnosti na dávce (koncentraci) a vypočítá se toxický index. Na převedení a výpočet indexu existují vypracované postupy včetně statistického zhodnocení získaného údaje. Důležitá je doba trvání testu, protože účinek má svoji dynamiku. I po ukončení testu je u zvířat dále pozorováno, jestli látka nepůsobí opožděně nebo nemá protáhnutou dynamiku. Skupiny mívají 6 – 10 jedinců.^{11,17}

✓ *Subakutní testy toxicity*

Subakutní toxický účinek je vyvolaný podáním sníženého množství škodliviny v porovnání s letální dávkou. Cílem pokusů je získat podklady na hodnocení dlouhodobého biologického účinku látek, zjistit kumulativní účinek, stejně jako patogenní změny organismu.

Subakutní testy toxicity trvají 28 – 90 dnů. Zvířata jsou při nich exponována zpravidla jedenkrát denně. Zvířata jsou rozdělena do dvou přísně homogenních skupin (podle věku, pohlaví, tělesné hmotnosti apod.). S kontrolní skupinou musí být zacházeno stejně jako s exponovanou, ale účinnou látkou se neexponuje. Tím se oddělují vlivy podmínek prostředí od vlivů testované chemikálie.¹⁷

✓ *Chronické testy toxicity*

Představují studium účinků testované látky, která je opakovaně podávána dlouhodobě – déle než tři měsíce. K plánování chronického testu slouží výsledky subakutního testu. Při chronických testech jsou zvířata exponována dlouhou dobu, což většinou znamená po celý dospělý život zvířete. Podle předepsaného režimu se zvířeti podává testovaná chemikálie. Kontrolní skupina je stejně početná jako exponovaná a je držena ve stejných podmínkách, kromě podávání testované chemikálie. U uhynulých zvířat je prováděno patologické a histologické vyšetření, aby se zjistila příčina smrti. Po ukončení testu jsou zvířata utracena a jsou zjišťovány patologické změny na jejich orgánech. Chronické testy poskytují informace nutné ke stanovení hodnoty NOAEL a LOAEL.^{11,17}

3.4.2.2. Podle typu testované matrice

✓ *Biotesty vodního prostředí (aquatické biotesty)*

Studují účinky nových typů málo prostudovaných polutantů (zejména organických látek a organokovů a přírodních toxinů produkovaných sinicemi - microcystinů) a komplexních vzorků z prostředí (sedimenty, odpadní vody) na organismy ve vodním prostředí, především s ohledem na poznání chronických a neletálních účinků (endokrinní disrupce, embryotoxicita, reprodukční toxicita atd.).¹⁸

✓ *Biotesty půdního prostředí (terestické biotesty)*

Zkoumají interakce mezi kontaminanty a biotou v půdním prostředí (ekotoxicita látek a environmentálních směsí), osud kontaminantů v půdě a jejich biodostupnost, bioindikační potenciál mikrobiálních parametrů pro hodnocení biologické kvality půd v terénních studiích.¹⁸

3.4.2.3. Podle testovacího systému

✓ Testy prováděné na buněčné úrovni

Testy na úrovni buněk a tkání jsou zejména využívány pro teoretické objasnění účinku toxické látky. Výhodou těchto testů je jejich vysoká citlivost, reprodukovatelnost, nízké finanční a zejména časové nároky. Naopak nevýhodou je, že systémy in vitro nemohou suplovat enzymaticko – imunitní systém živého organismu, a proto je výsledek testu platný pouze pro ten orgán nebo tu buňku, ze které byla odebrána analyzovaná buňka. Přesto se testování na úrovni buněk a tkání jeví jako vhodné pro mapování možného dopadu na živý organismus, mají tedy svůj význam pro ochranu zvířat i pro ekologii.^{1, 15, 19}

✓ Testy prováděné na úrovni organismů

Většina testů se provádí na úrovni organismů. I když existují jisté problémy s jejich reprodukovatelností a s rizikem při interpretaci výsledků a jejich extrapolaci na přírodní podmínky, představují tyto testy vhodný kompromis přijatelný jak z hlediska technického, tak i ekonomického. Organismy jsou do testu toxicity vybírány tak, aby byly zasaženy všechny trofické úrovně vodního prostředí. V praxi se jedná o čtyři úrovně – bakterie, řasy, planktonní organismy a ryby. Výsledky testů jsou u různých organismů různé, což je dáno různou dosažitelností toxikantu, způsobem přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulací i schopností toxickou látku odbourat. Pro větší výpovědní hodnotu testu je dobré provádět testování na větším počtu organismů.^{1, 15}

✓ Testy prováděné na úrovni biocenóz

Výhodou testů na úrovni biocenóz je možnost sledování toxického účinku přímo v přírodě nebo na modelu, který napodobuje přirozené podmínky s přijatelnou přesností. Nevýhodou testů je to, že změny ve složení biocenóz nemusí být vždy nutně vyvolány účinkem toxické látky, nýbrž může jít o narušení potravního řetězce či působení jiného přírodního faktoru. Také reprodukovatelnost těchto testů je velmi omezená, neboť biocenóza je systém otevřený s druhovou variabilitou, proto je velmi obtížné vytvořit úplně stejné podmínky, při kterých byly prováděny testy předcházející.^{1, 19}

3.4.2.4. Další způsob rozdělení

Podle Blaise(1991) jsou odborníky rozeznávány tři generace biotestů pro monitoring životního prostředí:

1. generace – tzv. klasické (standardní, konvenční) biotesty
2. generace – alternativní testy, mikrotesty, toxikity
3. generace – biosenzory, biosondy, biomarkery¹³

✓ STANDARDNÍ TESTY TOXICITY

Testy první generace jsou ve světě běžně používané. Jde o standardní testy, které podléhají národním, mezinárodním a světovým standardizacím. To zajišťuje řada organizací jako např. Mezinárodní organizace pro standardizaci ISO (Organization for Standardization), WHO (World Health Organization), OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), US-EPA (United States Environmental Protection Agency), které jsou vytvořené národními vládami. V České republice eviduje tyto metody Český normalizační institut (ČSNi).¹³

V České republice jsou doporučovány čtyři konvenční testy metodicky identické s evropskými ISO (International Standardization Organization) normami:

- 48 hod akutní test toxicity na rybách (*Poecilia reticulata*),
- 48 hod imobilizační test na perloočkách (*Daphnia magna*),
- 72 hod růstově inhibiční test semichronické toxicity na řasách (*Raphidocelis subcapitata* nebo *Scenedesmus subspicatus*),
- 72 hod test semichronické fytotoxicity na klíčivost a růst kořenů hořčice (*Sinapis alba*).^{13, 18}

Jak již bylo zmíněno, mají tyto biotesty jednu velkou výhodu, jsou uznávány mezinárodními legislativami. Na druhé straně jejich provedení je značně náročné. Kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat a navíc živočichové se musí krmit dalšími organismy. Samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru (akvária, 250 ml Ehrlenmeyerovy baňky), spotřebovává velké množství testovaného materiálu atd. Hlavním nedostatkem současných biotestů je však dlouhý čas nutný k zjištění výsledků (24–96 hodin).

Při ekologických haváriích se proto může kontaminace během doby testování toxicity rozšířit na rozsáhlé území a dojde k velkým ekologickým i ekonomickým škodám. Minimalizace času nutného k určení toxicity různých materiálů je žádoucí i v mnoha dalších případech; například zbytečně dlouhé skladování velkého množství podezřelého odpadu do té doby, než je známa jeho případná toxicita, přináší problémy a finanční ztráty.^{16, 18}

Biotesty založené na mortalitě mají nutně diskrétní charakter, tzn. že poskytují jen odpověď typu ano/ne, která neumožňuje jemněji kvantifikovat slabší toxický účinek a už vůbec ne eventuální stimulaci. Používán je termín letální koncentrace LC.²⁰

Další nevýhodou všech původních toxikologických biotestů je, že využívají eukaryotické organismy, takže xenobiotika a kontaminanty preferenčně působící na prokaryota, která tvoří základ trofické pyramidy vodních ekosystémů, mohou uniknout pozornosti.²⁰

Test akutní toxicity na rybách

Testovacím organismem nejčastěji bývá *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný) a *Poecilia reticulata* (živorodka duhová), ale může to být *Pimephales promelas* (střevce), *Cyprinus carpio* (kapr obecný) či *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový).¹

Po dobu 48 hodin se ryby vystaví účinkům různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Je nezbytné kontrolovat v průběhu testu stav, chování a odlov uhynulých jedinců. Po 24 a 48 hodinách se stanoví $_{24h}LC_{50}$ a $_{48h}LC_{50}$. Jedinci se do testu vybírají náhodně, ale podmínkou je, aby poměr pohlaví byl 1:1. Před testem se jedinci aklimatizují 7 dnů v ředící vodě při teplotě a osvětlení jako při vlastním testu. 24 hodin před zahájením testu se ryby již nekrmí. V průběhu testu se zaznamenává teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po ukončení testu se přeživší jedinci usmrtí oxidem uhličitým vyrobeným v sifonové lahvi, jak je stanoveno podle § 17 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.¹



Obr. 3.3: *Poecilia reticulata*²¹



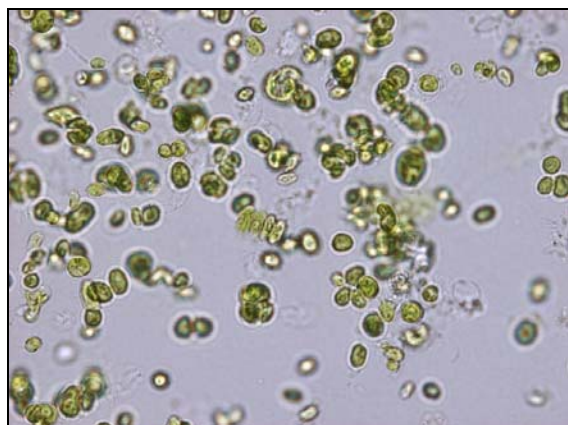
Obr. 3.4: *Brachydanio rerio*²²

Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

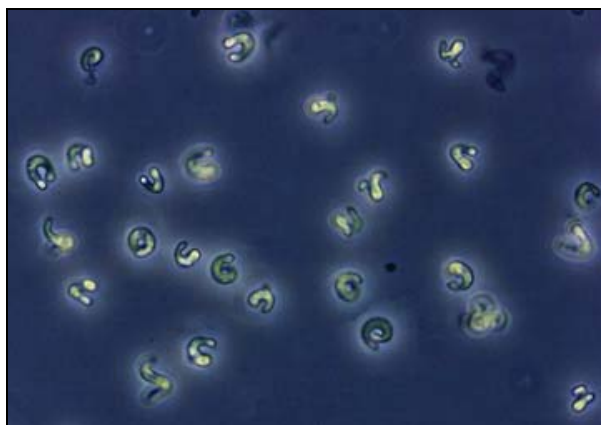
Tento test je nejčastěji aplikován při ekotoxikologickém hodnocení. Po dobu 48 hodin se *Daphnia magna* vystaví účinkům různých koncentrací testované látky. Součástí testu je jeho provedení také pro kontrolu, kde je přítomna pouze standardně připravená ředící voda. Po 24 hodinách se vyhodnotí stav perlooček a zaznamenají se uhynulí a imobilizovaní jedinci nejen v kontrole, ale také v jednotlivých koncentracích. Ze získaných hodnot se následně stanoví $_{24h}EC_{50}$ a $_{48h}EC_{50}$.²³

Test inhibice růstu sladkovodních řas

Nejčastěji využívanými rostlinkami pro test inhibice růstu sladkovodních řas bývají *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum* a *Raphidocelis subcapitata*. Jedná se o zástupce zelených řas hojně se vyskytujících v našich vodách a představujících důležitý článek potravního řetězce. Princip testu spočívá ve stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky na inhibici růstu a rozmnožování chlorokokální řasy v jednotlivých koncentracích sledované látky ve srovnání s kontrolami v čistém živném roztoku. Řasy se inkubují po dobu 72 hodin v daném živném médiu a každých 24 hodin se v nich měří hustota buněk. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice (snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur) a potom se vyhodnotí $_{72h}IC_{50}$. V případě, že namísto inhibice dojde ke stimulaci, se výpočet $_{72h}IC_{50}$ neprovádí.^{1, 24}



Obr. 3.5: *Scenedesmus subspicatus*²⁵



Obr. 3.6: *Selenastrum capricornutum*²⁶

Test inhibice růstu kořene hořčice bílé Sinapis alba

Test byl vyvinut k testování neškodnosti odpadních vod, jež by mohly být použity pro závlahy např. zemědělských plodin. Testuje se vliv vody na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé *Sinapis alba* v počátečních stádiích vývoje. Test spočívá v kultivaci semen na podložkách nasycených roztoky zkoumané látky ve srovnání se semeny, které rostou na podložce nasycené ředící vodou. V testech toxicity představuje hořčice zástupce kulturních plodin a vyšších rostlin vůbec.²⁷

Semena hořčice bílé se vystaví na dobu 72 hodin účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě, současně se na dobu 72 hodin nasadí semena do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a změří se délka kořenů. Z naměřených hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou ($_{72h}IC_{50}$). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně (průměrná délka kořene v testované látce je větší než v kontrole), výpočet IC_{50} se neprovádí. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působí inhibičně, vyhodnocuje se IC_{50} za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu.¹

✓ ALTERNATIVNÍ TESTY TOXICITY

Rostoucí potřeba testovat ve velkých sériích nové chemické látky a vzorky z životního prostředí vedla k následujícím trendům ve vývoji biotestů: miniaturizace, zkrácení doby inkubace, zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testů, zlevnění biotestů, zapojení testů reprezentujících různé trofické úrovně v ekosystému, přehodnocování standardních testů (OECD, ISO, EPA ad.) a využití nových vědeckých poznatků (např. řízení produkce klidových stádií, uchovávání řasových kultur).²³

Proto se poslední dobou těší zvýšené pozornosti MIKROBIOTESTY, jejichž hlavním posláním je měřit specifický efekt testovaného kapalného vzorku, kterým byl exponován jednobuněčný nebo malý vícebuněčný organismus.²³

Testovací organismy využívané v mikrobiotestech mohou představovat bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury, ad., tyto organismy se dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích (bezobratlí), lyofilizovaném stavu (bakterie) nebo v imobilizované formě (řasy) a podle potřeby se mohou oživit před vlastním testováním. Dále již samotný název mikrobiotest napovídá, že je miniaturizovaný, jako testovací nádoby se používají zkumavky, kyvety nebo mikrotitrační destičky. Doba vlastního akutního testu toxicity se zkracuje na 24 hodin až několik minut a konečný výstup z testu může mít různý charakter, např. počet mrtvých nebo nepohyblivých organismů, změna absorpance, fluorescence nebo luminiscence atd.²³

Jedním z nejčastěji používaných typů mikrobiotestu jsou tzv. TOXKIT. Jde o mikrobiotesty využívající klidových stádií zooplanktonu. Laboratoř pro biologický výzkum vodních polutantů při universitě v Ghentu (Belgie) se zabývá více než 25 let životními cykly vodních bezobratlých. V posledních pěti letech vyústil tento výzkum do vývoje technologií pro monitoring životního prostředí. Nyní je k dispozici sada mikrobiotestů využívajících klidových stádií bezobratlých.²³

Průběh celého testování je u toxkitů založen na stejném principu s menšími modifikacemi u konkrétního testu. Testovací organismus je vylíhnut z klidových stádií (cyst, efiipií) během

20 – 24 hodin. 24-hodinový akutní test toxicity probíhá na destičkách při teplotě 25°C. Kritériem hodnocení je mortalita, ze které se počítá hodnota LC_{50} – letální koncentrace způsobující smrt 50 % testovaných organismů.²³

Testy, jejichž vývoj byl již dokončen, jsou k dispozici v komerčním balení, které obsahuje všechny materiál k jejich provedení: kultivační nádoby, pipety, testovací destičky, živné médium, standardní toxikant, dormantní stádia testovacích organismů, protokol o provedené zkoušce a návod k použití.²³

Použití těchto testů bylo odzkoušeno v 183 laboratořích z Evropy, USA a Kanady. V průběhu let 1992 – 1993 proběhly okružní testy s téměř 500 toxikity s přijatelnými koeficienty variace. Na základě získaných výsledků byly biotesty dále vylepšeny.²³

Vysoká kvalita cyst produkovaných za přísně kontrolovaných podmínek vylučuje jakoukoliv variabilitu, která se objevuje u klasických testů toxicity právě díky chovu živých organismů. To zajišťuje výbornou reprodukovatelnost testů spolu s dalšími faktory jako např. vysoká jednotnost testovacího média, které lze snadno získat jednoduchým naředěním koncentrovaných solí nebo testovací nádobky speciálně vyrobené z biologicky inertního materiálu zajišťující jednotnost při expozici.²⁰

Porovnáním výsledků je možné díky jejich vysoké standardizaci. Reprodukovatelnost zkoušky pak zajišťuje přesnost a vysokou citlivost. Jednotlivá srovnání citlivosti testu konvenčního a alternativního ukázala, že mikrotesty jsou tak citlivé jako konvenční testy vykonané se zkušebními druhy a dávají ekvivalentní výsledky.^{19, 20}

Z ekonomického hlediska nemají toxikity žádnou konkurenci, neboť vynikají velmi nízkou cenou v porovnání s klasickými testy toxicity. Tím, že se organismy zakoupí ve formě klidových stádií, která lze "oživit", kdy je třeba, se eliminují náklady spojené s údržbou inventářů živých testovacích organismů. Není třeba zřizovat speciální prostory pro chov a pěstování organismů ani pořizovat nákladné přístrojové vybavení.²⁰

Celková časová náročnost provedení toxikity je téměř nesrovnatelná s časovou náročností konvenčních testů. Samotné provedení obou testů je sice časově srovnatelné, markantní rozdíl však vzniká při přípravě organismů ke zkoušce.¹⁹

Thamnotoxkit FTM

Využívá jako testovací organismus nižšího korýše *Thamnocephalus platyurus*, který díky své velké citlivosti a úspěšnějšímu líhnutí cyst již zcela nahradil původní variantu Streptoxkit F s korýšem *Streptocephalus proboscideus*. Používá se jednak ke zjištění toxicity nově zaváděných chemikálií, jednak pro průmyslové odpadní vody, povrchové vody, pitné vody, podzemní vody, sedimenty a toxiny.^{28, 29}

Každý Thamnotoxit F obsahuje veškeré materiály nezbytné k provedení šesti akutních testů toxicity včetně podrobného návodu s ilustracemi.²⁸

Testovaný organismus se uchovává ve spící formě jako tzv. cysta. Do aktivního stádia jej lze uvést zásobením čerstvou potravou. Inkubace se provádí po dobu 24 hodin v testovacích roztocích za temna při teplotě 25 °C. Po uplynutí doby stanovené pro vykonání testu, tj. 24 hodin, se sečtou mrtví jedinci a ze závislosti mortality v procentech na koncentraci testovaného roztoku se vypočte a stanoví hodnota LC_{50} .¹³



Obr. 3.7: *Thamnocephalus platyurus* ³⁰



Obr. 3.8: Sada Thamnotoxkit ²⁹

Daphtoxkit FTM

Daphtoxkit je dalším testem toxicity relevantním pro sladkovodní a terestické životní prostředí, který je založen na pozorování pohyblivosti, znehybnění nebo až usmrcení sladkovodního korýše *Daphnia magna* nebo *Daphnia pulex*. Standardní délka testu je 24 až 48 hodin. Zkušební organismy jsou uchovávány ve své spící formě. V případě potřeby mohou být korýši asi během 72 hodin probuzeni a uvedeni tak do aktivní formy. Sada daphtoxkit obsahuje veškeré materiály potřebné k provedení šesti akutních 48 hodinových testů pohybové inhibice až usmrcení testovaných jedinců. Výsledkem testu je hodnota EC₅₀ nebo LC₅₀. ^{19, 31}



Obr. 3.9: *Daphnia magna*³²

Obr. 3.10: Sada Daphtoxkit³³

Rotoxkit FTM

Dalším významným alternativním testem toxicity zejména pro sladkovodní životní prostředí je rotoxkit. Tento test se vytváří ve dvou alternativách, a to jako akutní 24h test a nebo jako chronický 48h test. Obě dvě formy rotoxkit se provádí na sladkovodním vířníku *Brachionus calyciflorus*, jenž tvoří významnou část sladkovodního zooplanktonu. Test slouží k prověřování toxicity směsí, průmyslových odpadních vod, sedimentů, povrchové a podzemní vody.³⁴

Jako u všech toxkitů je jedinec uchováván ve spící formě jako tzv. cysta a v případě nutnosti je během méně než 24 hodin probuzen a připraven k testování. U akutního testu se sleduje úmrtnost v průběhu 24 hodin a nakonec se vypočítá hodnota LC₅₀. Chronický rotoxkit testuje organismy z hlediska snížení jejich reprodukce po vystavení 48 hodin toxické látky a nakonec se stanovuje hodnota EC₅₀.³⁴

Algaltoxkit FTM

Zkušebními organismy jsou zelené sladkovodní řasy mikroskopických rozměrů *Selenastrum capricornutum*. Klidová stadia řas vytvářejí útvary zvané řasové korále, přičemž velikost korálů je asi 2 mm a v jednom korálu se nachází až jeden milión řasových buněk.³⁵

Převedení řas z imobilizovaného stavu do aktivního trvá zhruba 30 minut. Časová náročnost testu je 72 hodin a sleduje se při tom růstová inhibice mikroskopických řas. Během testu se jednoduchým spektrofotometrem měří optická hustota testovaného vzorku se zelenou řasou. Ze stanovené optické hustoty se zjistí koncentrace počtu buněk řas ve vzorku (při 670 nm platí přibližně lineární vztah mezi optickou hustotou a koncentrací). Optická hustota se zaznamenává vždy po 24 hodinách. Ze zjištěných hodnot se vypočítá EC₅₀.³⁵

Další mikrobiotesty pro sladkovodní a suchozemské prostředí

- Rotoxkit FTM
- Protoxkit FTM
- Rapidtoxkit FTM
- Phytotoxkit FTM
- Ceriodaphtoxkit FTM
- Ostracodtoxkit FTM

Viz příloha P2.

3.4.3. Fytotesty

Testy fytotoxicity se využívaly již od počátku 20. století, ale jen velmi sporadicky. Teprve v roce 1970 byly vytvořeny testovací metody, které se v současnosti používají ke stanovení toxických účinků komerčně vyráběných chemických látek (především pesticidů), nebezpečných odpadů (zvláště průmyslových a městských odpadních vod), výluhů a kontaminovaných sedimentů. Velkou předností těchto testů je jejich jednoduchost, variabilita, materiálová a ekonomická nenáročnost.³⁶

V průběhu posledních patnácti let zařadila většina významných environmentálních agentur testy fytotoxicity jako součást environmentálního monitoringu a hodnocení rizik.³⁶

POUŽÍVANÉ TESTY FYTOTOXICITY:

Test	Měřená odezva
1. Elongace kořene	Délka kořene
2. Enzymatický test	Aktivita enzymů
3. Fyziologické testy	Rychlost fotosyntézy, rychlost respirace
4. Klíčivost semen	Procento vyklíčených semen
5. Produkce biomasy	Sušina
6. Růst klíčících rostlin	Výška rostlin, velikost listové plochy
7. Životní cyklus	Výška rostliny, sušina, počet květů, plodů a semen

Testy toxicity s rostlinami, především test klíčivosti semen, test elongace kořene a test růstu klíčících rostlin, mají na rozdíl od testů s živočichy několik výhod. Například semena rostlin jsou získávána ve velkém množství a lze je uchovat po dobu jednoho roku i déle. Náklady na verifikaci testu jsou tedy minimální. Vzorky vod s nízkou hodnotou rozpuštěného kyslíku (odpadní nebo podzemní vody) není třeba pro testy fytotoxicity provzdušňovat. Vzorky vod s vysokým stupněm turbidity není nutné filtrovat. Testy klíčivosti a elongace kořene nevyžadují v kontrolním roztoku (destilovaná voda) přítomnost živin, které by mohly být sorbovány rostlinným materiálem a interagovat s ním. Mezi nevýhody testu fytotoxicity patří časová náročnost testů spojená s nutností dlouhodobé expozice toxickou látkou. Nevýhodou je také to, že účinky testované látky mohou být stimulující nebo inhibující v závislosti na její koncentraci. Růst látek i toxicita rostlin může být zkreslována působením půdních faktorů.³⁶

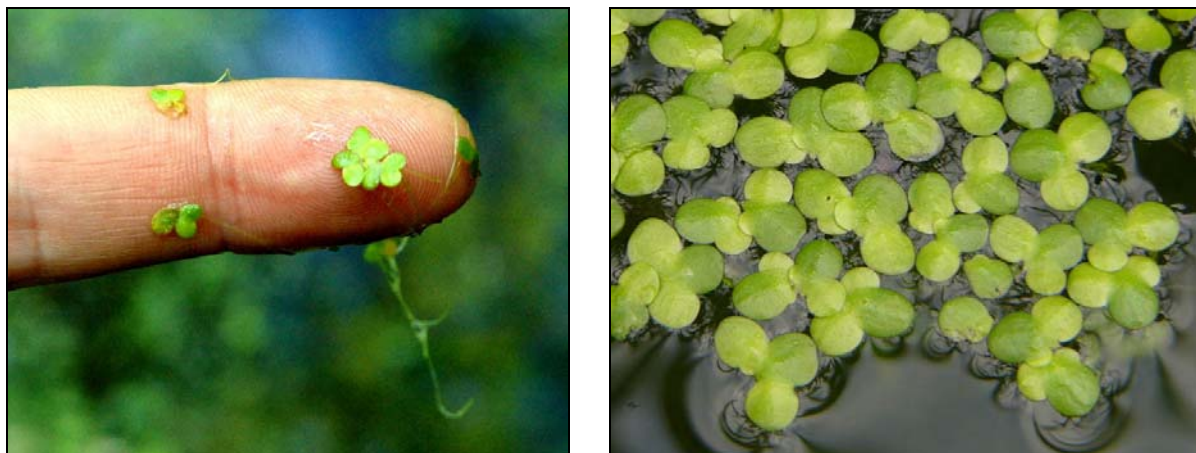
Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Okřehky porůstají hladinu stojatých vod a jsou nejznámějším zástupcem pleustonického společenstva. Za příhodných podmínek vytvářejí kompaktní porosty, které nepropouštějí světlo a jejich asimilační kyslík uniká do vzduchu, což vede ke zhoršení jakosti vod pod nimi.³⁷

Test se používá k testování toxicity roztoků a suspenzí vůči zástupci vyšších vodních rostlin okřehku menšímu. Testuje se, obdobně jako u řas, inhibice růstu podle růstové křivky.³⁷

Rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*) se nechají růst po dobu 7 až 24 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS (Swedish Standard Medium). Současně se nasadí testovací rostliny do živného roztoku bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet lístků. Cílem testu je kvantifikovat účinky látky na vegetativní růst okřehku menšího posouzením počtu listů, rychlosti růstu a také zhodnocením hmotnosti biomasy. Pro kvantifikaci účinků látky se srovnává růst v testovaných roztocích s růstem kontrol a stanovuje se koncentrace IC₅₀, tzn. koncentrace vyvolávající 50% inhibici růstu. Kromě toho se může zjišťovat i nejnižší koncentrace, při které jsou pozorovány účinky (LOEC), a nejvyšší koncentrace nevyvolávající žádné pozorované účinky (NOEC). V některých případech se testovaná látka může projevit stimulací růstu (růst rostlin v testované látce je větší než v kontrole). V tom případě se hodnota IC₅₀ nestanovuje. Pokud testovaná látka působí

stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působí inhibičně, vyhodnocuje se IC za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice.¹



Obr. 3.11: *Lemna minor*^{38, 39}

Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

Tato metoda je vhodná pro snadné vyhodnocení celkové toxicity chemických látek, která je vyjádřena jako míra inhibice růstu kořene cibule. Výsledky tohoto testu lze zařadit k výsledkům baterie testů na prokaryotech a/nebo jiných eukaryotech.¹⁰

Tato metoda je vhodná pro vyhodnocení toxicity vzorků přírodních vod (jezer, řek, studní), pitné vody (voda z řádu), odpadních vod z domácností a průmyslu včetně kalů a výluhů, chemických látek rozpustných ve vodě a v organických rozpouštědlech.³⁶

Princip testu spočívá v inhibici růstu kořene při expozici toxickými látkami, nevhodným pH nebo nerozpustnými látkami, které zamezují přístupu živin. Pro přesné vyhodnocení účinku chemikálií, sloučenin neznámého složení, které mohou být – v případě zjištěného biologického poškození testovaného materiálu vzorkem – následně chemicky analyzovány, je proto nezbytné zajistit úplné rozpuštění složek a upravit pH na hodnotu 4 až 10.^{36, 40}

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Primárním úkolem zadané diplomové práce bylo hodnocení možných toxických účinků oktachlorstyrenu pomocí alternativních testů toxicity. OCS byl pro experimentální účely této práce vyroben v laboratoři podle níže popsaného postupu. Kromě alternativních testů toxicity (Daphtoxkit FTM a Thamnotoxkit FTM) byl pro srovnání proveden i standardní test toxicity (inhibice růstu kořene *Sinapis alba*) a fytotesty (inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor* a inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*).

4.1. Výroba oktachlorstyrenu

Do litrové baňky s kulatým dnem byl umístěn 1 g 2,6-dichlorstyrenu spolu s 400 ml tetrachlormethanu a do tohoto roztoku bylo pouštěno asi 2000 ml (0,82 mol) chloru. Chlor byl generován tak, že do baňky (750 ml) opatřené elektrickou míchačkou bylo umístěno cca 100 g manganistanu draselného, ke kterému bylo pomalu přikapáváno 450 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Vznikající chlor byl pak zaváděn přes promývací nádobu s koncentrovanou kyselinou sírovou do reakční směsi, která se zbarvila do žluta (Obr. 4.1). Celá reakce trvala asi 5 hodin. Reakční směs se poté přes noc nechala míchat elektrickou míchačkou při pokojové teplotě (cca 20 hodin).⁶



Obr. 4.1: Chlorace dichlorstyrenu



Obr. 4.2: Zahřívání OCS v silikonové lázni

Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce, ke zbylé olejovité kapalině bylo přidáno 10 g (33 mmol) chloridu antimonického a vše bylo zahříváno v silikonové lázni pod zpětným chladičem při teplotě 190 °C po dobu 4 hodin (Obr. 4.2). Do vzniklého produktu bylo přidáno 40 ml 20% kyseliny chlorovodíkové (cca 24 ml 36% HCl + 25 ml vody) a směs byla extrahována 50 ml hexanu. Hexanová vrstva byla oddělena a vodná fáze byla opět extrahována 50 ml hexanu. Poté byla hexanová fáze promývána 100 ml vody, vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Zbylý olej byl při zahřívání pod chladičem rozpuštěn v 70 ml methanolu a ponechán krystalizovat v mrazničce. Jehličkovité krystalky oktachlorstyrenu byly ještě jednou rozpuštěny ve 30 ml methanolu a opět ponechány krystalizovat.⁶

- **Výtěžek:** 1,15 g
- **Teplota tání:** 98 – 99 °C

4.2. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Podmínky testu toxicity na organismu Sinapis alba:

testovaný organismus	hořčice bílá <i>Sinapis alba</i>
barva semen	okrově žlutá
velikost semen	střední, 1,5 – 2 mm
klíčivost semen	minimálně 90 %
počet semen v jedné Petriho misce	30
sledovaná odezva	inhibice růstu kořene ve srovnání s kontrolou ($_{72h}IC_{50}$)
opakování	2
objem testované koncentrace	5 ml v 1 Petriho misce
teplota	20 °C
doba expozice	72 hodin
osvětlení	bez přístupu světla
chemikálie	výchozí roztok testované látky, zředovací voda dle ISO 7346
pomůcky a zařízení	Petriho misky, filtrační papír, odměrné baňky, pipety, termostat, milimetrové měřítko

Příprava ředící vody:

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky, rozpuštěním příslušných navážek (Tab. 4.1) do odměrných baněk o objemu 1 litr.

Tab. 4.1: Navážky solí pro přípravu zásobních roztoků

zásobní roztok č.1	11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
zásobní roztok č.2	4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
zásobní roztok č.3	2,59 g $NaHCO_3$
zásobní roztok č.4	0,23 g KCl

Do odměrné baňky o objemu 1 litr byla nalita část destilované vody, k ní bylo nadávkováno 25 ml každého zásobního roztoku a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravená voda byla 24 hodin provzdušňována vzdušným kyslíkem. Poté byla dalších 24 hodin nechána odstát a bylo zkontrolováno pH a případně upraveno tak, aby se pohybovalo v rozmezí $7,8 \pm 0,2$.¹

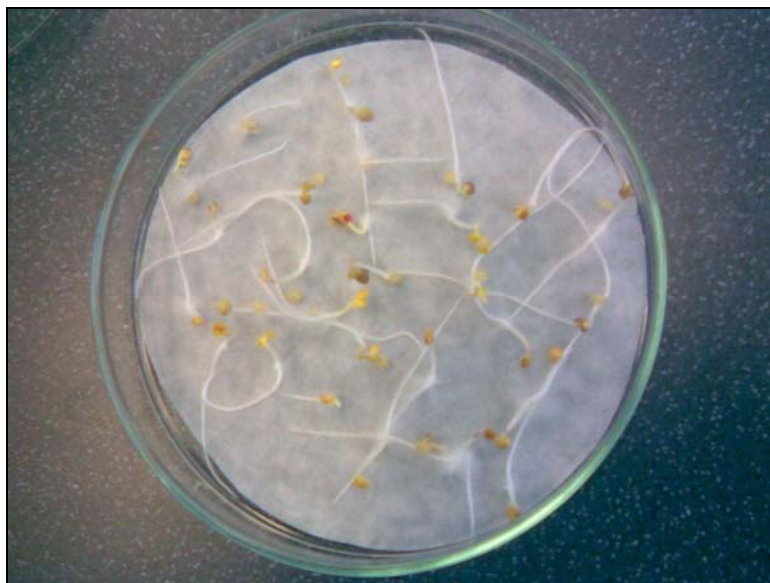
Pracovní postup

Na dno Petriho misky byla vložena 1 vrstva filtračního papíru, na který bylo nadávkováno pipetou 5 ml testovaného roztoku (filtrační papír musel být vlhký, ale nesměla na něm stát voda).

Na navlhčený filtrační papír byla pinzetou pokládána přebraná semena hořčice bílé (v šesti řadách po pěti semenech), misky byly přikryty víčkem a uloženy do termostatu.

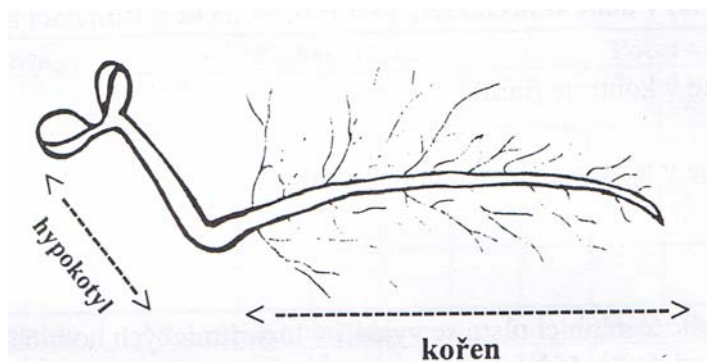
Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z termostatu a u jednotlivých vyklíčených semen byla změřena délka kořene s přesností na 1 mm.

Výsledky byly považovány za platné, jestliže bylo v kontrole dosaženo minimální klíčivosti 90 %.¹



Obr. 4.3: Vyklíčená semena hořčice bílé *Sinapis alba*

Vyhodnocení výsledků



Obr. 4.4: Měření délky kořene¹

Pro každé ředění byl vypočítán aritmetický průměr délky kořenu z obou paralelních stanovení. Na základě průměrných délek kořenů v jednotlivých koncentracích byla spočítána inhibice růstu podle následujícího vzorce:

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

I_i inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci; je-li $I < 0$, jedná se o stimulaci růstu

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

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

Výsledná hodnota IC_{50} byla zjištěna pomocí lineární regrese, kdy inhibice růstu byla dána do závislosti na dekadickém logaritmu koncentrace. Z průsečíku proložené přímky

a souřadnice inhibice 50 % byla spuštěna kolmice na osu x a byla odečtena příslušná hodnota log c, odlogaritmováním této hodnoty byla získána koncentrace IC_{50} .^{1,27}

4.3. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

Podmínky testu toxicity na organismu Allium cepa:

testovaný organismus	cibulky <i>Allium cepa</i>
velikost	cca 1,5 cm v průměru
počet cibulek pro každou koncentraci	min 6
skladování	v suchu při 10 – 20 °C
sledovaná odezva	inhibice růstu kořene ve srovnání s kontrolou ($_{72h}IC_{50}$)
rozpouštědlo	nesmí způsobovat omezení růstu kořene, popř. minimální; rozpouštědlo s ředící vodou použito jako kontrola
objem testované koncentrace	30 ml v 1 zkumavce
teplota	20 °C
doba expozice	72 hodin
osvětlení	chráněno před přímým slunečním osvětlením
chemikálie	výchozí roztok testované látky, růstové médium
pomůcky a zařízení	skleněné zkumavky, stojánek na zkumavky, nůž, pravítko

Růstové médium

Pro kontrolu i nařazení testovaných vzorků byla použita studená vodovodní voda, která se nechala 3 minuty odtéct (odtečením byla z vody alespoň částečně odstraněna měď přítomná v důsledku vedení pitné vody měděným vodovodním potrubím).¹

Pracovní postup:

Malým ostrým nožem byly odstraněny veškeré žlutohnědé vnější slupky a pokud možno i hnědé plaky při bázi cibulky tak, aby nedošlo k poškození primordia cibulek. Cibulky byly uchovávány v nádobě s vodou po dobu 24 hod.

Pro každou testovanou koncentraci bylo připraveno do stojánku minimálně 6 zkumavek, které byly naplněny testovanými vzorky. Aby se alespoň částečně zabránilo odpařování, byl přes hrdlo každé zkumavky přetáhnut parafilm. V parafilmu byl udělán malý otvor, na který byla posazena osušená cibulka tak, aby kořenové primordium bylo ponořeno v médiu. Po 24 a 48 hod. bylo doplňováno odpařené médium vždy na původní množství.

Po 72 hodinách byla změřena délka všech kořenových svazků v každé testované řadě. Do měření nebyly zahrnuty výjimečně krátké nebo dlouhé kořeny, byla vypočítána průměrná délka kořenů v každé řadě.¹

Vyhodnocení výsledků

Míra toxicity vzorků byla vyjádřena hodnotami průměrných délek kořene cibule. Růstová křivka byla vyhodnocena na základě hodnot získaných porovnáním růstu kořene v kontrole a testovaných koncentracích, vyjádřených v procentech. Z této křivky byla zjištěna hodnota $_{72h}EC_{50}$.¹



Obr. 4.5: Cibulky klíčící na zkumavkách

4.4. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Podmínky testu toxicity na organismu Lemna minor:

testovací organismus	okřehek menší <i>Lemna minor</i>
barva	zelená
velikost	0,5 – 3 cm
počet iniciačních lístků v jedné koncentraci	9 – 12
sledovaná odezva	inhibice růstu (IC ₅₀)
opakování	2
objem testované koncentrace	100 ml v 1 kelímku
teplota	24 ± 2 °C
doba expozice	7 – 25 hodin
osvětlení	světlo
chemikálie	výchozí roztok testované látky, standardní živný roztok
pomůcky a zařízení	200 ml kelímky, odměrné baňky, pipety, potravinářská fólie, pH - metr

Příprava živného roztoku

Zásobní roztoky byly připraveny v destilované vodě podle složení uvedeného v následující tabulce (Tab. 4.2)

Tab. 4.2: Navážky solí pro přípravu zásobních roztoků

zásobní roztok	chemikálie	(g/l)
I	NaNO_3	8,500
	KH_2PO_4	1,340
II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15,000
III	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,200
IV	Na_2CO_3	4,000
V	H_3BO_3	1,000
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,200
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,010
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,050
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,010
VI	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,168
	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,280

Pro přípravu 1 litru SIS živného roztoku bylo k 900 ml destilované vody přidáno:

- 10 ml zásobního roztoku I,
- 5 ml zásobního roztoku II,
- 5 ml zásobního roztoku III,
- 5 ml zásobního roztoku IV,
- 1 ml zásobního roztoku V,
- 5 ml zásobního roztoku VI.

Živný roztok pro testování byl připraven 2 dny před použitím, aby se stabilizovalo pH. Životnost kultivačního roztoku byla zachována přibližně 6 – 8 týdnů tím, že byl uskladněn v temnu a chladnu.¹



Obr. 4.6: Rozmnožování okřehku v kultivačním médiu

Pracovní postup

Do testovacích kelímků s připravenými koncentracemi testované látky i do kontrolního kelímku s živným roztokem byly pomocí pinzety přeneseny kolonie okřehku sestávající ze 2 – 4 lístků. V každém kelímku musel být identický počet lístků (9 – 12). Kelímky byly překryty potravinářskou fólií a umístěny na okno v laboratoři.

Na začátku a na konci testu bylo v jednotlivých koncentracích i v kontrole změřeno a do protokolu zaznamenáno pH a teplota.

Počet lístků a vzhled kolonií (nekróza = odumřelá tkáň listu – bílá nebo rozmočená; chloróza = zežloutnutí tkáně listu) byl kontrolován alespoň každé 3 dny, tzn. alespoň dvakrát během sedmidenní expozice a při ukončení testu.¹

Vyhodnocení testu

➤ *Stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí (μ) v testovaných koncentracích a kontrole:*

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

N_n počet lístků v závěru testu

N_0 počet lístků na počátku testu

t_n doba trvání testu (dny)

Z vypočtených hodnot μ pro každou testovanou koncentraci a kontrolu byla vypočítána inhibice (případně stimulace) růstu I_μ v % z následující rovnice:

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c} (\%), \text{ kde}$$

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

μ_i růstová rychlost v testované koncentraci

μ_c růstová rychlost v kontrole¹

4.5. Thamnotoxkit FTM

^{24h}LC₅₀ biotest byl prováděn v multišachtové testovací desce za použití růstového stádia larev sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus*, které byly vylíhnuty z cyst. Cysty byly skladovány v suchém stavu v lednici při 5 ± 2 °C (lze je skladovat nejméně šest měsíců bez ztráty jejich životaschopnosti).²⁸

Podmínky testu toxicity na organismu *Thamnocephalus platyurus*:

testovací organismus	sladkovodní korýš <i>Thamnocephalus platyurus</i>
barva	světlá
velikost	0,5 – 1 mm
líhnivost	min 90 %
počet jedinců v jedné testovací misce	10
sledovaná odezva	mortalita
opakování	3
objem testované koncentrace	1 ml v jedné testovací šachtě
teplota	25 °C
doba expozice	24 hodin
osvětlení	tma
chemikálie	výchozí roztok testované látky, SFW
pomůcky a zařízení	veškerý jednorázový materiál dodán v Thamnotoxkitu, světelná deska, inkubátor, standardní laboratorní sklo

Příprava standardní sladké vody

Součástí sady Thamnotoxkit byly ampule s koncentrovanými solnými roztoky, které byly použity k přípravě standardní sladké vody (SFW). SFW sloužila jako médium pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu sérií roztoků toxikantů.

Odměrná láhev o objemu 1 l byla naplněna přibližně 800 ml destilované vody. Postupně byly otevírány vialky s koncentrovanými solnými roztoky označenými čísly 1 až 4 a vlitý do láhve (Tab. 4.3).²⁸

Tab. 4.3: Koncentrované soli používané na přípravu SFW

	koncentrovaná sůl	počet vialek
roztok č.1	NaHCO ₃	1x
roztok č.2	CaSO ₄	2x
roztok č.3	MgSO ₄	1x
roztok č.4	KCl	1x

Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a protřepána.

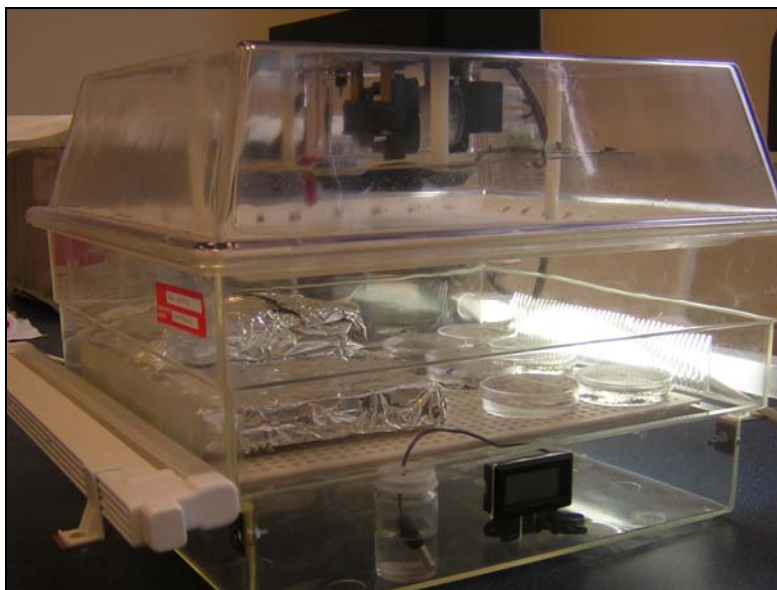
Před použitím pro inkubaci cyst a před přípravou roztoků chemické látky byla SFW 15 minut provzdušňována, poté byl změřen a zaznamenán obsah kyslíku. Zbylá SFW, byla skladována do dalšího použití v temnu v ledničce. Před samotným použitím ji bylo nutné nechat zteplat na laboratorní teplotu a opět provzdušnit.²⁸

Inkubace cyst

Inkubace cyst byla započata 24 hodin před samotným začátkem testování. K jejímu provedení bylo nutné připravit zředěnou SFW, a to v poměru 1:8 s destilovanou vodou (2,5 ml SFW + 17,5 ml destilované vody).

Trubička s cystami byla naplněna přibližně 1 ml zředěného inkubačního média, uzavřena zátkou a 30 minut v pravidelných intervalech protřepávána. Obsah kyvety s hydratovanými cystami byl vyprázdněn do malé Petriho misky, bylo přidáno 10 ml zředěné SFW a cysty byly

krouživým pohybem rovnoměrně rozptýleny. Inkubační Petriho miska byla zakryta víčkem a inkubována 20 až 22 hodin při 25 °C za kontinuálního osvětlení (světelný zdroj 3000 – 4000 lux).²⁸



Obr. 4.7: Inkubátor

Pracovní postup

Každá koncentrace toxikantu byla přenesena do šachet jednoho sloupce testovací desky. Distribuce testovaných roztoků byla vždy prováděna od kontroly (sloupec 1, vlevo) směrem k nejvyšší koncentraci (sloupec 6, vpravo).

K přenosu larev žábronožek byla použita mikropipeta a tento přenos byl uskutečněn ve dvou krocích. V prvním kroku bylo přeneseno přibližně 50 larev z Petriho misky do tzv. mycí šachty (řádek D), což minimalizovalo zředění. Ve druhém kroku bylo do každé testovací šachty (řádky A, B, C) přeneseno přesně 10 larev; transport byl uskutečněn pokud možno s co nejmenším množstvím kapaliny.

Naplněná testovací destička byla poté překryta parafilmem a pevně uzavřena víčkem. Protože nebyl k dispozici temný inkubátor, byla testovací destička zabalena do alobalu, vložena do inkubátoru a ponechána po 24 hodin inkubovat při teplotě 25 °C.²⁸

Vyhodnocení výsledků

Po 24 hod. byla testovací destička vyjmuta z inkubátoru a byl zaznamenáván počet mrtvých jedinců. Larvy byly považovány za mrtvé, pokud během 10 sekund nevykazovaly žádný pohyb. Pro každou koncentraci byl sečten počet mrtvých jedinců a byla vypočítána úmrtnost (%).

Pomocí probitové tabulky (viz příloha P1) byly jednotlivé hodnoty úmrtnosti převedeny na probity. Výsledná hodnota LC50 byla zjištěna pomocí lineární regrese, kdy probitové hodnoty byly dány do závislosti na dekadickém logaritmu koncentrace. Z průsečíku proložené přímky a souřadnice probitu 5 (odpovídající 50% úmrtnosti) byla spuštěna kolmice na osu x a byla odečtena příslušná hodnota log c, odlogaritmováním této hodnoty byla získána koncentrace LC50.²⁸

4.6. Daphtoxkit FTM

*Podmínky testu toxicity na organismu *Daphnia magna*:*

testovací organismus	žábřonožka <i>Daphnia magna</i>
barva	světlá
velikost	1 mm
líhnivost	min 90 %
počet jedinců v jedné testovací misce	5
sledovaná odezva	mortalita
opakování	4
objem testované koncentrace	10 ml v jedné testovací šachtě
teplota	20 – 25 °C
doba expozice	24 a 48 hodin
osvětlení	tma
chemikálie	výchozí roztok testované látky, SFW
pomůcky a zařízení	veškerý jednorázový materiál dodán v Daphtoxkitu, světlá deska, inkubátor, standardní laboratorní sklo

Pro Daphtoxkit byla použita spící vajíčka korýšů *Daphnia magna*, chráněna chitinovou skořápkou zvanou ephippium. Skladována byla v temnu při teplotě 5 ± 2 °C (za těchto podmínek je lze skladovat po dlouhou dobu bez ztráty životaschopnosti).³¹

Příprava standardní sladké vody

SFW byla používána jako inkubační médium pro ephippia a pro přípravu série roztoků toxikantů. Odměrná baňka o objemu 2 litry byla naplněna asi jedním litrem destilované vody. Podobně jako při přípravě ředící vody u Thamnotoxkit byly postupně otevřeny všechny čtyři ampulky (Tab. 4.4) a nality do odměrné baňky.

Tab. 4.4: Koncentrované soli používané na přípravu SFW

	koncentrovaná sůl	počet vialek
roztok č.1	NaHCO ₃	1x
roztok č.2	Ca Cl ₂	1x
roztok č.3	MgSO ₄	1x
roztok č.4	KCl	1x

Odměrná baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku. Protože ředící voda nebyla ihned spotřebována, byla skladována v temnu v ledničce. Před dalším použitím bylo médium opatrně přivedeno zpět na laboratorní teplotu. Ředící voda byla před použitím 15 minut provzdušňována, byl změřen a zaznamenán obsah kyslíku.³¹

Inkubace ephippií

Inkubace ephippií byla započata 3 dny před začátkem testů biotoxicity. Obsah ampule s ephippií byl nalit na mikrosíto a pod proudem vodovodní vody byl důkladně promýván. Poté byly ephippie přeneseny v 15 ml provzdušněné SFW na malou inkubační Petriho misku. Miska byla zakryta víčkem a inkubována 72 hodin při teplotě 20 – 22 °C za kontinuálního ozařování 6000 luxy.³¹

Předkrmení testovacích organismů

Aby bylo zabráněno úmrtnosti organismů vyhladováním, které by narušovalo výsledky testu, byly neonaty 2 hodiny před nasazením do vlastního testu tzv. předkrmovány suspenzí řasy *Spiruliny microalgae*. Tento příjem jídla jim zajistil "energetickou rezervu", neboť během následujících 48 hodin testovací expozice nebyly krmeny.

Předkrmení bylo provedeno tak, že jedna ampule prášku *Spiruliny* byla naplněna SFW a intenzivně protřepána, aby došlo k homogenizaci obsahu. Suspenze řas byla nalita na inkubační misku 2 hodiny před odebráním neolitů pro test, a to tak, aby byla rovnoměrně rozptýlena v celém objemu.³¹

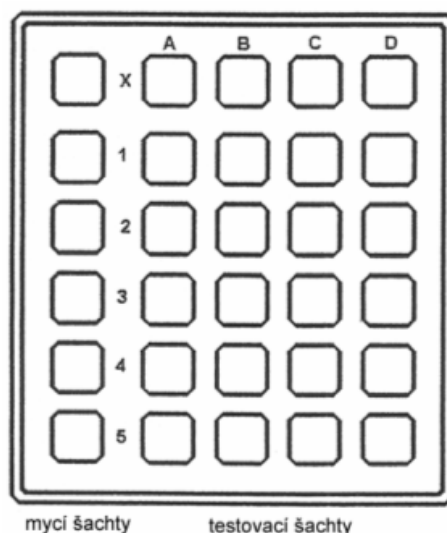
Pracovní postup

10 ml ředící vody bylo přeneseno do každé šachty v kontrolním řádku a 10 ml příslušné koncentrace toxikantu do šachet ostatních řádků v pořadí podle klesající koncentrace.

Poté bylo do každé mycí jamky přeneseno pomocí mikropipety nejméně 20 aktivně plovoucích neonatů. Neonaty byly transportovány z Petriho misek pokud možno v co nejmenším množství kapaliny.

V dalším kroku byly neonaty přenášeny z mycích šachet do ostatních čtyř šachet v témže řádku a to přesně po 5 organismech na šachtu. Důležité bylo během transportu neonatů do testovacích šachet zasunout špičku pipety do kapaliny a nekapat organismy na její povrch. Působením povrchového napětí totiž způsobuje zachycení organismů na hladině, odkud nejsou schopny se samy osvobodit a uhynou. To samozřejmě ohrožuje výsledky testu.

Připravená testovací destička byla překryta parafilmem a dobře utěsněna víčkem. Byla zabalena do alobalu, aby byla dodržena podmínka inkubace v temnu, a umístěna do zatemněného inkubátoru o teplotě 20 °C.³¹



Obr. 4.8: Testovací destička³¹

Vyhodnocení výsledků

Po 24 a 48 hodinách byla testovací deska vyjmuta z inkubátoru a na světelné desce byl spočítán počet mrtvých a imobilizovaných jedinců oproti aktivně plavoucím organismům v každé šachtě. Neonaty, které nebyly schopny plavat ani po jemném promíchání kapaliny, byly považovány za imobilizované, i když dosud hýbaly tykadly.

Byl spočítán celkový počet mrtvých a imobilizovaných neonatů pro každou koncentraci toxikantu a vypočítána úmrtnost. Stejně jako u Thamnotoxkitu byly hodnoty úmrtnosti převedeny na probity. Probitovou analýzou byla vyhodnocena EC50.³¹

5. VÝSLEDKY

5.1. Volba vhodného rozpouštědla

Protože OCS je pevná krystalická látka, která není rozpustná ve vodě, bylo nezbytné použít nějaké rozpouštědlo. Byly provedeny testy toxicity s 0,5 %, 1 %, 2 % a 4 % roztoky líhu a acetonu a to testem inhibice růstu kořene *Sinapis alba* a testem inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*. Na základě zjištěných výsledků byl pro další testování vybrán 1 % roztok acetonu. Přestože aceton má škodlivé účinky na organismy vodního prostředí, byl upřednostněn, neboť se v jeho roztocích OSC lépe rozpouští než v ethanolu. Snahou bylo vybrat co nejzředěnější roztok acetonu, aby ovlivňoval růst v kontrole co nejméně, ale zároveň aby dostatečně účinně rozpouštěl OCS.

5.1.1. Test inhibice růstu kořene hořčice *Sinapis alba*

➤ Aceton:

Koncentrace (%)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
Kontrola	35,6	-
0,5	34,7	2,528
1	34,2	3,933
2	30,4	14,607
4	26,7	25,000

➤ Ethanol:

koncentrace (%)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
Kontrola	25,6	-
0,5	24,8	3,125
1	24,7	3,516
2	23,2	9,375
4	18,8	26,563

Z testu vyplývá, že s rostoucí koncentrací mají obě rozpouštědla větší a větší vliv na inhibici růstu kořene hořčice bílé. Míra inhibice je u ethanolu i acetonu srovnatelná.

5.1.2. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

➤ Aceton:

koncentrace (%)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
Kontrola	2,60	-
0,5	1,45	44,231
1	1,20	53,846
2	0,40	84,615
4	0,07	97,308

➤ Ethanol:

koncentrace (%)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
Kontrola	2,60	-
0,5	1,36	47,692
1	1,04	60,000
2	0,84	67,692
4	0,20	92,308

Z provedeného testu inhibice růstu kořene cibule lze vyčíst, že jak ethanol tak i aceton ovlivňují růst kořene do značné míry, a to i v případě velmi nízkých koncentrací. Již 0,5% roztok jak acetonu, tak i ethanolu, způsobuje téměř 50% inhibici růstu kořenového svazku oproti ředící vodě. Je zřejmé, že cibule je mnohem citlivější k působení rozpouštědel než hořčice.

5.2. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

5.2.1. Referenční test s dichromanem draselným

Byla připravena koncentrační řada dichromanu draselného: 0 (kontrola), 10; 20; 40; 80; 160 a 320 mg.l⁻¹. Pro nasazení do testu byl připraven objem 10 ml každé koncentrace.

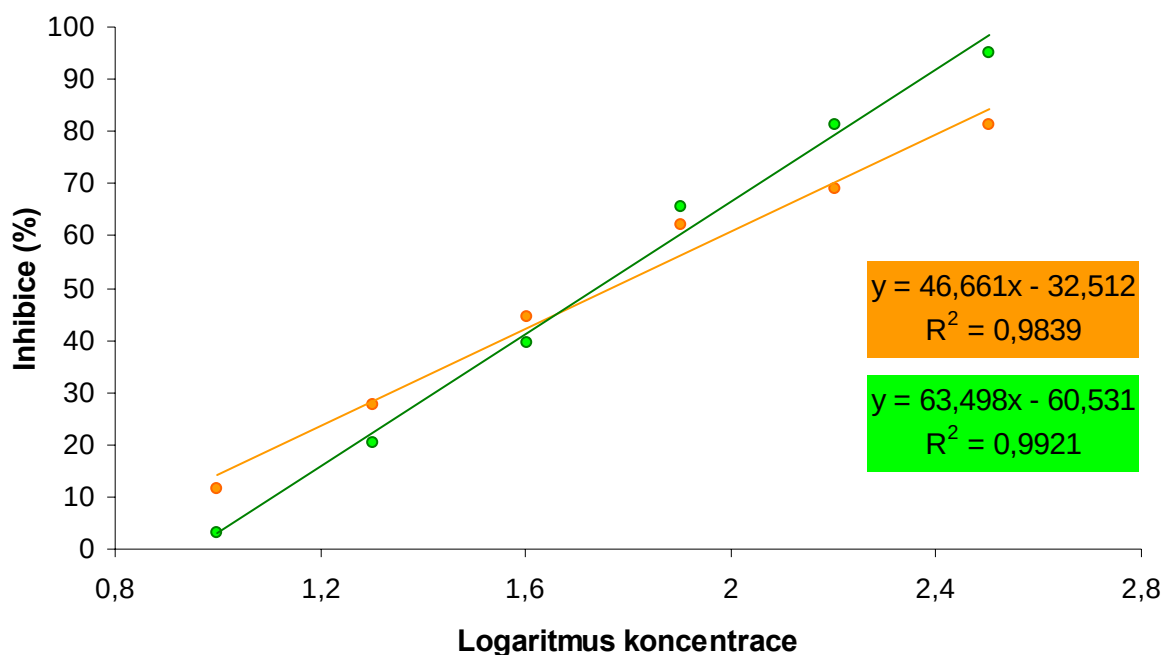
Příklad výpočtu inhibice pro koncentraci 10 mg.l⁻¹ z 1. řady měření:

$$I_i = \frac{\bar{L}_c - \bar{L}_v}{\bar{L}_c} \cdot 100 = \frac{29,73 - 26,35}{29,73} \cdot 100 = 11,37 \%$$

Byl proveden *test klíčivosti semen v kontrole*. V 1. i ve 2. řadě měření vyklíčilo ze 30 semen 29, to znamená, že bylo dosaženo klíčivosti 96,7 %. Tím pádem byla splněna podmínka platnosti testu, kdy minimální klíčivost musí dosahovat 90 %.

koncentrace (mg.l ⁻¹)	1. řada měření		2. řada měření	
	průměrná délka (mm)	inhibice (%)	průměrná délka (mm)	Inhibice (%)
kontrola	29,73	-	35,60	-
10	26,35	11,37	34,50	3,09
20	21,56	27,48	28,40	20,23
40	16,48	44,57	21,60	39,33
80	11,32	61,92	12,23	65,65
160	9,26	68,85	6,70	81,18
320	5,53	81,34	1,75	95,06

Sinapis alba - dichroman draselný



Rovnice regrese byla vypočítána v MS Excelu pomocí funkce LINREGRESE. Obecný tvar rovnice je: $y = ax + b$.

Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný:

✓ $y = 46,661x - 32,512$ (pro 1. měření)

✓ $y = 63,498x - 60,531$ (pro 2. měření)

Za y byla dosazena hodnota 50 (odpovídá 50% inhibici) a bylo vypočítáno x , což je logaritmus koncentrace. Zpětným odlogaritmováním této hodnoty byla získána hledaná koncentrace ${}_{72h}IC_{50}$.

$$x_1 = \frac{y + 32,512}{46,661} = \frac{50 + 32,512}{46,661} = 1,7683$$

$$c_1 = 10^x = 10^{1,7683} = 58,658 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$x_2 = \frac{y + 60,531}{63,498} = \frac{50 + 60,531}{63,498} = 1,7407$$

$$c_2 = 10^x = 10^{1,7407} = 55,042 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota ${}_{72h}IC_{50}$ je průměrem IC_{50} z prvního a druhého měření:

$${}_{72h}IC_{50} = 56,85 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Rozmezí ${}_{72h}IC_{50}$ uváděné pro referenční test inhibice růstu kořene *Sinapis alba* s $K_2Cr_2O_7$ je 50 – 80 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Vypočtená hodnota odpovídá tomuto rozmezí, to znamená, že test byl prováděn správně a s dostatečnou přesností.

5.2.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu

Jak už bylo zmíněno, OCS není rozpustný ve vodě, a proto muselo být vybráno vhodné rozpouštědlo. Na základě testů byl jako vhodné rozpouštědlo zvolen aceton, přesněji řečeno jeho 1% roztok.

Celá připravovaná koncentrační řada OCS musela obsahovat 1 % acetonu. Tím pádem jako kontrola nebyla brána čistá ředící voda, nýbrž 1% roztok acetonu v ředící vodě. Zvolená koncentrační řada pro OCS: 1 % roztok acetonu v ředící vodě; 0,05; 0,5; 5 a 50 mg.l⁻¹. Viz „Příprava koncentrační řady OCS v 1 % acetonu“. Pro nasazení do testu byl připraven objem 10 ml každé koncentrace.

Příprava zásobních roztoků

Protože zvolené koncentrační rozpětí zahrnovalo nízké koncentrace a OSC je pevná látka, bylo nutné připravit si zásobní roztoky, které pak byly použity k ředění.

Stejně zásobní roztoky (ZR 1, ZR 2 a ZR 3) byly používány pro přípravu koncentračních řad i v následujících testech.

zásobní roztok	koncentrace	způsob přípravy
ZR 1	50 g.l ⁻¹	100 mg OCS rozpuštěno ve 2 ml čistého acetonu
ZR 2	500 mg.l ⁻¹	10 µl ZR 1 + 990 µl čistého acetonu
ZR 3	50 mg.l ⁻¹	100 µl ZR 2 + 900 µl čistého acetonu

Příprava koncentrační řady OCS v 1 % acetonu

koncentrace	způsob přípravy
0,5 g.l ⁻¹	10 ml *ŘV + 100 µl ZR 1
50 mg.l ⁻¹	10 ml ŘV + 10 µl ZR 1 + 90 µl čistého acetonu
5 mg.l ⁻¹	10 ml ŘV + 100 µl ZR 2
0,5 mg.l ⁻¹	10 ml ŘV + 10 µl ZR 2 + 90 µl čistého acetonu
0,05 mg.l ⁻¹	10 ml ŘV + 10 µl ZR 3 + 90 µl čistého acetonu

*ŘV = ředící voda

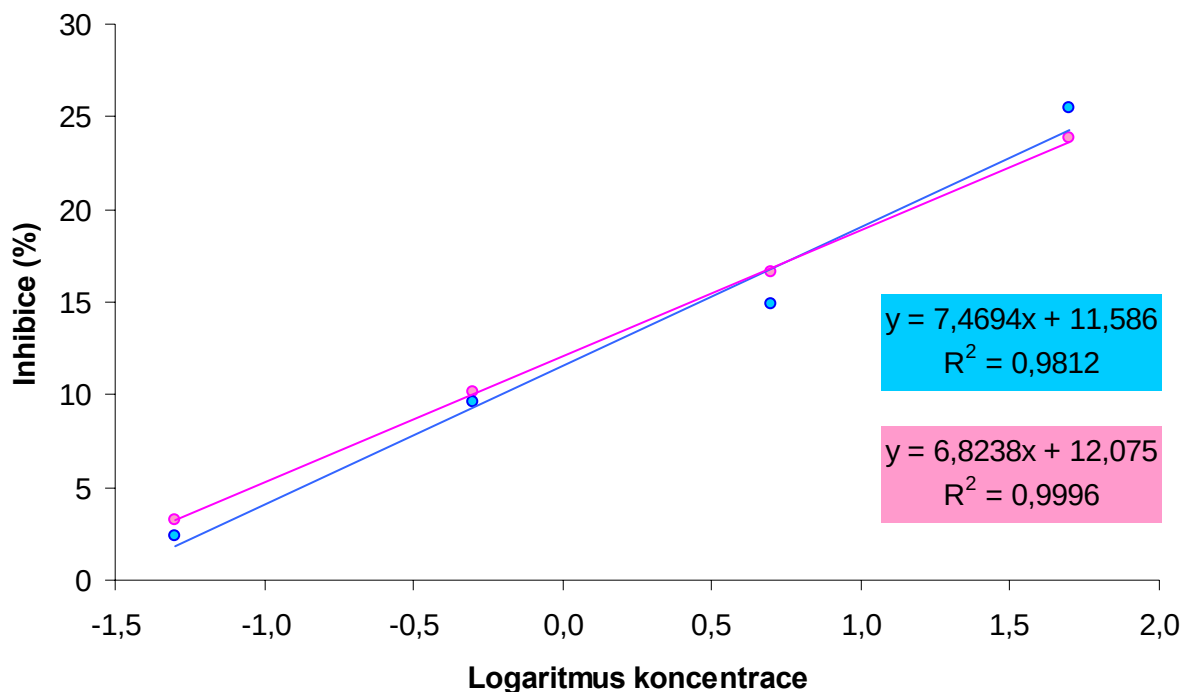
V první sérii byla snaha připravit roztok OCS o koncentraci 0,5 g.l⁻¹, což se ovšem nepovedlo, neboť se při této koncentraci OCS v 1 % acetonu nerozpouštěl. Proto pro další pokusy je jako nejvyšší možná koncentrace uváděna koncentrace 50 mg.l⁻¹.

Výsledky testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba* s OCS v 1 % acetonu

koncentrace (mg.l ⁻¹)	1. řada měření		2. řada měření	
	průměrná délka (mm)	inhibice (%)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
1 % aceton (kontrola)	43,70	-	44,10	-
0,05	42,30	3,204	43,07	2,336
0,5	39,27	10,137	39,87	9,592
5	36,45	16,590	37,53	14,898
50	33,3	23,799	32,87	25,465

Klíčivosti semen v kontrole dosáhla v 1. řadě měření 93,3 % (vyklíčilo 28 semen ze 30) a ve 2. řadě měření 96,7 % (vyklíčilo 29 semen ze 30). Podmínka minimální klíčivosti 90 %, byla splněna.

Sinapis alba - OCS v 1% Ac.



Rovnice regrese odečtená z grafu pro OCS v 1 % Ac.:

- ✓ $y = 7,4694x + 11,586$ (pro 1. měření)
- ✓ $y = 6,8238x + 12,075$ (pro 2. měření)

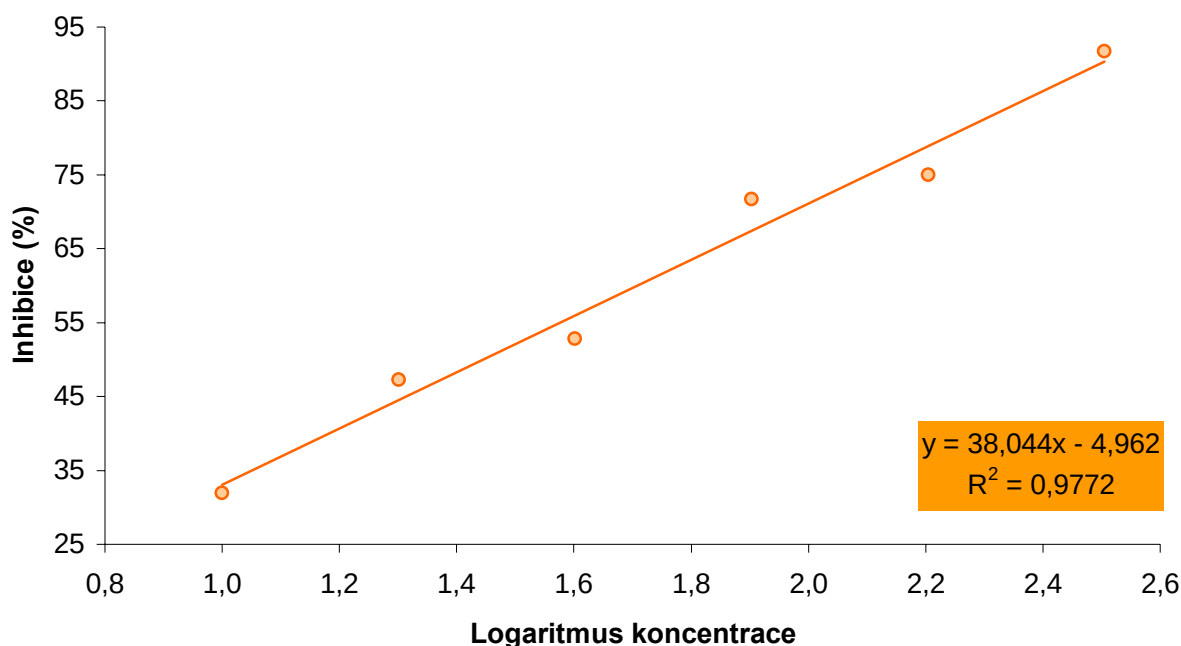
Výpočet IC_{50} nebyl prováděn, neboť v testovaném koncentračním rozmezí dochází maximálně k 25% inhibici, takže ani při nejvyšší koncentraci 50 mg.l^{-1} nedošlo k 50% inhibici a koncentrovanější roztok již nebylo možno připravit.

5.3. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

5.3.1. Referenční test s dichromanem draselným

koncentrace (mg.l^{-1})	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
kontrola	3,60	-
10	2,45	31,944
20	1,90	47,222
40	1,70	52,778
80	1,02	71,667
160	0,90	75,000
320	0,30	91,667

Test inhibice růstu kořene cibule - dichroman draselný



Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný: $y = 38,044x - 4,962$

$$x_1 = \frac{50 + 4,962}{38,044} = 1,4445$$

$$c_1 = 10^{1,445} = 27,8417 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota koncentrace inhibice pro $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ je: ${}_{72\text{h}}\text{IC}_{50} = 27,84 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

5.3.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu

Příprava koncentrační řady OCS v 1 % acetonu

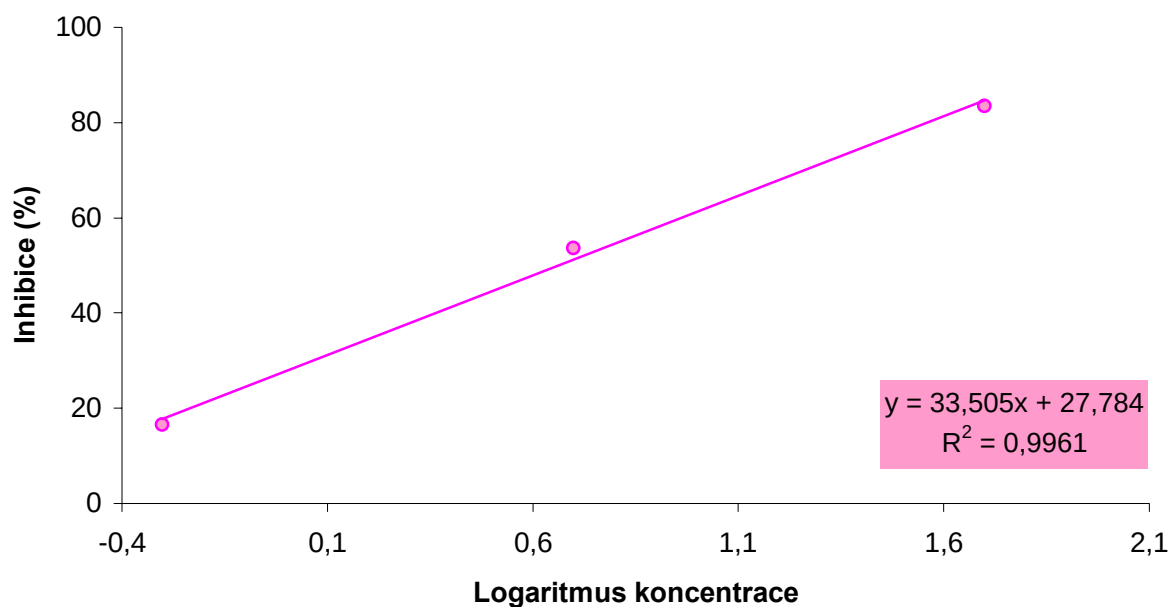
Zvolený rozsah koncentrační řady i zásobní roztoky byly stejné jako u testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*. Zásobní roztok č.1 (ZR 1) měl koncentraci $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a zásobní roztok č.2 (ZR 2) měl koncentraci $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro test inhibice růstu kořene cibule bylo třeba připravit 100 ml každé koncentrace.

koncentrace	způsob přípravy
$50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	100 ml ŘV + 100 μl ZR 1 + 900 μl čistého acetonu
$5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	100 ml ŘV + 10 μl ZR 1 + 990 μl čistého acetonu
$0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	100 ml ŘV + 100 μl ZR 2 + 900 μl čistého acetonu
$0,05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	100 ml ŘV + 10 μl ZR 2 + 990 μl čistého acetonu

Výsledky testu inhibice růstu kořene cibule s OCS v 1 % acetonu

koncentrace (mg.l ⁻¹)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
ŘV	25,5	-
1 % aceton (Kontrola)	12,125	52,451
0,05	14,625	-20,619
0,5	10,125	16,495
5	5,625	53,608
50	2,000	83,505

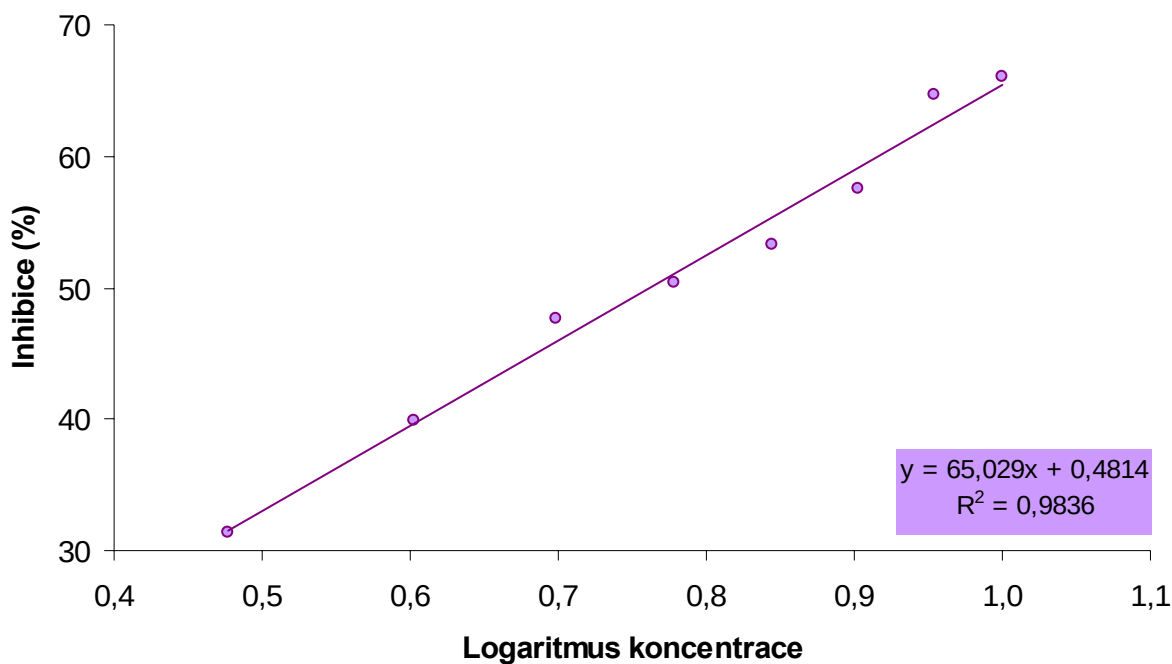
Test inhibice růstu kořene cibule - OCS v 1 % Ac



Z hodnot vynesných do grafu byla vyloučena nejnižší koncentrace OCS (0,05 mg.l⁻¹), neboť zde nedocházelo k inhibici oproti kontrole (= 1 % roztok acetonu) nýbrž ke stimulaci. Z výsledků je zřejmé, že hledaná IC₅₀ se nachází někde v rozmezí 0,5 až 10 mg.l⁻¹. Byl proto proveden test s užší koncentrační řadou a na základě výsledku vypočtena IC₅₀.

koncentrace (mg.l ⁻¹)	průměrná délka (mm)	inhibice (%)
ŘV	24,570	-
1 % aceton (Kontrola)	19,125	22,161
1	14,750	22,876
2	13,625	28,758
3	13,125	31,373
4	11,500	39,869
5	10,000	47,712
6	9,500	50,327
7	8,925	53,333
8	8,125	57,516
9	6,750	64,706
10	6,500	66,013

Test inhibice růstu kořene cibule - OCS v 1 % Ac



Z grafu byly vyloučeny dvě nejnižší koncentrace (1 a 2 mg.l⁻¹), neboť mírně vybočovaly z lineární závislosti.

Rovnice regrese odečtená z grafu pro OCS v 1 % Ac.: $y = 65,029x + 0,4814$

$$x_1 = \frac{50 - 0,4814}{65,029} = 0,7615$$

$$c_1 = 10^{0,7615} = 5,7741 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota inhibiční koncentrace pro OCS v 1 % Ac. je: ${}_{72h}\text{IC}_{50} = 5,77 \text{ mg.l}^{-1}$

5.4. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Možností jak vyhodnotit inhibici růstu okřehku existuje několik, v tomto případě byla použita metoda „Stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí (μ) v testovaných koncentracích a kontrole“ popsaná v experimentální části. Doporučená délka provádění testu je 7 až 24 dní. V tomto případě byl růst lístků okřehku pozorován 14 dní.

Příprava koncentrační řady OCS v 1 % acetonu

Rozsah zvolených koncentrací byl: 0,05; 0,5; 3; 5; 10 a 50 mg.l⁻¹. Pro nasazení do testu bylo připraveno 100 ml od každé koncentrace. Ředění bylo prováděno stejným způsobem jako u testu inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*.

Výsledky testu inhibice růstu okřehku s OCS v 1 % acetonu

- Počet lístků na začátku testu $N_0 = 12$
- Počet lístků na konci testu $N_n = N_{14}$
- Doba trvání testu $t_n = 14$ dní

Záznam růstu lístků okřehku během 14-ti denního testu:

koncentrace (mg.l ⁻¹)	počet lístků							
	N ₂	N ₅	N ₆	N ₇	N ₈	N ₁₂	N ₁₃	N ₁₄
ŘV	23	26	30	35	38	56	66	72
1 % Ac	16	22	25	27	29	49	54	57
0,05	20	25	29	37	38	59	67	71
0,5	20	25	29	34	38	58	66	70
3	19	24	28	33	36	56	62	68
5	19	26	26	33	34	55	62	66
10	19	23	26	32	32	52	60	61
50	18	22	25	30	32	45	47	49

Podmínky na začátku a na konci testu:

koncentrace (mg.l ⁻¹)	začátek testu		konec testu	
	pH	T (°C)	pH	T (°C)
ŘV	7,13	21,7	7,15	21,9
1 % Ac	6,99	21,7	7,05	21,8
0,05	7,00	21,9	7,13	21,9
0,5	7,05	21,9	6,98	21,8
3	7,07	21,8	7,00	21,7
5	6,98	21,8	7,04	21,7
10	6,97	21,8	6,99	21,7
50	6,98	22,1	6,95	21,9

Vypočtené hodnoty inhibice růstu:

koncentrace (mg.l ⁻¹)	μ	I_μ
1 % Ac (kontrola)	0,111	-
0,05	0,127	- 14,096
0,5	0,126	- 13,185
3	0,124	- 11,325
5	0,122	- 9,409
10	0,116	- 4,353
50	0,100	9,706

Příklad výpočtu pro koncentraci 50 mg.l⁻¹:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} = \frac{\ln 49 - \ln 12}{14} = 0,100$$

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c} = \frac{(0,111 - 0,100) \cdot 100}{0,111} = 9,706$$

Protože téměř ve všech koncentracích došlo ke stimulaci růstu proti kontrole, IC₅₀ nebylo počítáno a tedy nebyl sestavován ani graf. Navíc nebyla splněna základní podmínka testu, neboť počet lístků v kontrole se za 14-ti denní testovací období nezvětšil o osminásobek. Po celé testovací období zůstávaly lístky okřehku zelené bez známek nekrózy a/nebo chlorózy.

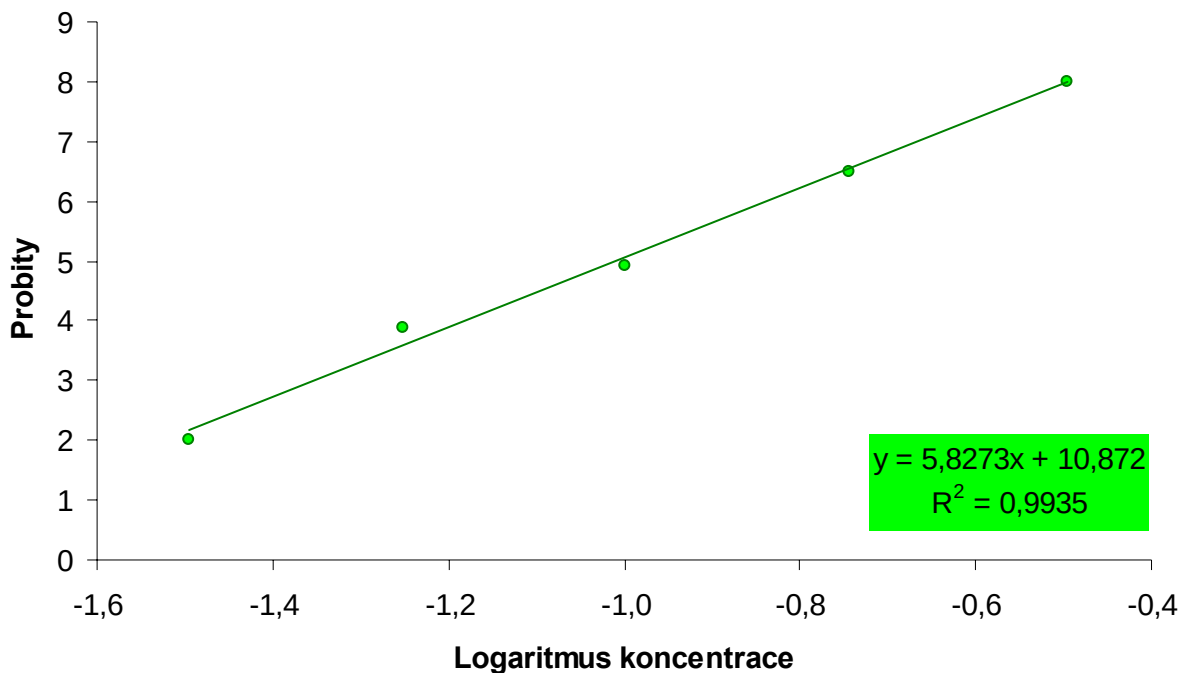
5.5. Thamnotoxkit FTM

LC₅₀ u Thamnotoxkitu bývá nejčastěji vyhodnocována tzv. probitovou analýzou (převodová tabulka viz příloha P1). Princip výpočtu je uveden v experimentální části.

5.5.1. Referenční test s dichromanem draselným

koncentrace (mg.l ⁻¹)	počet mrtvých/celkem	inhibice (%)	probity
kontrola	0/30	-	-
0,032	0/30	0,000	2,000
0,056	4/30	13,333	3,887
0,100	15/30	46,670	4,917
0,180	30/30	93,333	6,502
0,320	30/30	100,000	8,000

Thamnotoxkit - dichroman draselný



Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný: $y = 5,8237x + 10,872$

V probitové analýze bylo za y dosazováno číslo 5, což odpovídá podle převodové tabulky právě 50% mortalitě.

$$x_1 = \frac{5 - 10,872}{5,8237} = -1,0077$$

$$c_1 = 10^x = 10^{-1,0077} = 0,0982 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota letální koncentrace pro $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ je: ${}_{24\text{h}}\text{LC}_{50} = 0,098 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Literatura uvádí hodnotu ${}_{24\text{h}}\text{LC}_{50} = 0,095 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, to znamená, že referenční test s dichromanem byl prováděn metodicky správně a s dostatečnou přesností.

5.5.2. Test s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu

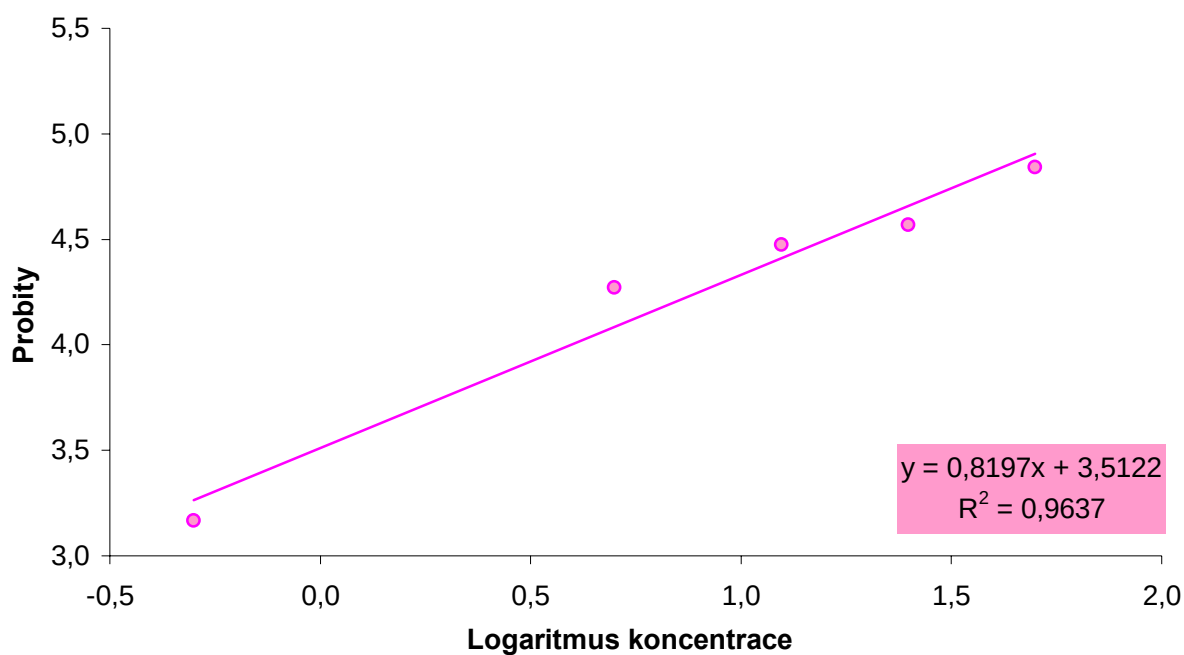
Rozsah koncentrační řady byl zvolen: 50; 25; 12,5; 5; 0,5 a 0,05 mg/l. Pro provedení Thamnotoxkitu bylo třeba připravit 10 ml každé koncentrace. Ředění bylo prováděno stejným způsobem jako příprava roztoků pro test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*.

koncentrace (mg.l ⁻¹)	počet mrtvých/celkem	mortalita (%)	probity
1% Ac. (kontrola)	2/30	6,67	3,498
0,05	0/30	0,00	2,000
0,5	1/30	3,33	3,166
5	7/30	23,33	4,272
12,5	9/30	30,00	4,476
25	10/30	33,33	4,569
50	13/30	43,33	4,842

- ✓ Obsah kyslíku na začátku testu: 9,83 mg.l⁻¹
- ✓ Obsah kyslíku na konci testu: 8,67 mg.l⁻¹

Podmínka platnosti, maximální mortalita v kontrole 10 %, byla splněna, neboť dosahovala 6,67 %.

Thamnotoxkit - OCS v 1% Ac.



Přestože testovaný rozsah koncentrací nedosahoval ani 50% mortality, byl proveden teoretický výpočet LC₅₀.

Rovnice regrese odečtená z grafu pro OCS v 1 % Ac.: $y = 0,8197x + 3,5122$

$$x_1 = \frac{5 - 3,5122}{0,8197} = 1,8151$$

$$c_1 = 10^x = 10^{1,8151} = 65,3212 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota letální koncentrace pro OCS v 1% Ac. je: **${}_{24h}LC_{50} = 65,32 \text{ mg.l}^{-1}$**

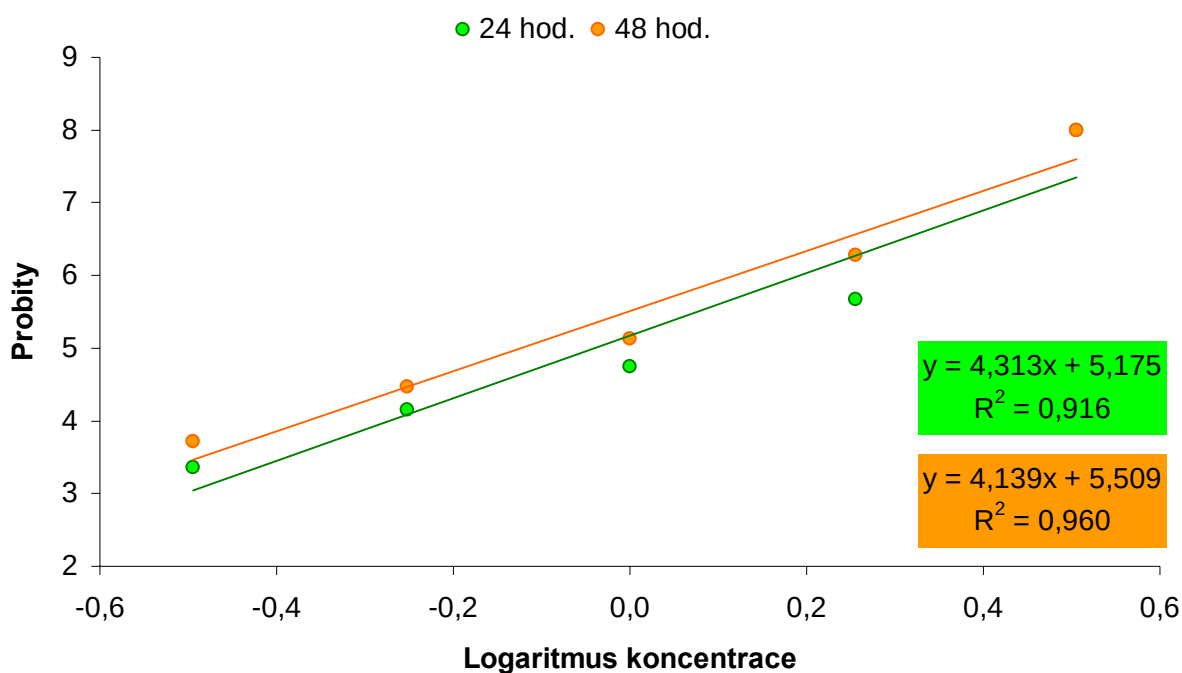
5.6. Daphtoxkit FTM

Stejně jako Thamnotoxkit byla výsledná hodnota počítána pomocí probitů (převodová tabulka viz příloha P1).

5.6.1. Referenční test s dichromanem draselným

koncentrace (mg.l ⁻¹)	po 24 hodinách			po 48 hodinách		
	mrtvý/ celkem	inhibice (%)	probity	mrtvý/ celkem	inhibice (%)	probity
Kontrola	0/20	0	2,000	1/20	5	3,355
0,32	1/20	5	3,355	2/20	10	3,718
0,56	4/20	20	4,158	6/20	30	4,476
1,00	8/20	40	4,747	11/20	55	5,126
1,80	15/20	75	5,674	18/20	90	6,282
3,20	20/20	100	8,000	20/20	100	8,000

Daphtoxkit - dichroman draselný



Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný:

✓ $y = 4,313x + 5,175$ (po 24 hodinách)

✓ $y = 4,139x + 5,509$ (po 48 hodinách)

$$x_{24} = \frac{5 - 5,175}{4,313} = -0,0406$$

$$c_{24} = 10^x = 10^{-0,0406} = 0,9108 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$x_{48} = \frac{5 - 5,509}{4,139} = -0,1230$$

$$c_{48} = 10^{-0,1230} = 0,7534 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota EC₅₀ pro K₂Cr₂O₇ vypočítaná pomocí probitů je:

$${}_{24h}EC_{50} = 0,91 \text{ mg.l}^{-1}$$

$${}_{48h}EC_{50} = 0,75 \text{ mg.l}^{-1}$$

Literatura uvádí hodnotu ${}_{24h}EC_{50} = 1,12 \text{ mg.l}^{-1}$ a ${}_{48h}EC_{50} = 0,83 \text{ mg.l}^{-1}$, to znamená, že referenční test s dichromanem lze považovat za správně provedený, i když hodnoty EC_{50} vyšly nižší.

5.6.2. Test s OCS rozpuštěným v 0,5 % acetonu

Protože při testování toxicity OCS v 1% acetonu nebyla splněna základní podmínka, a to maximální úmrtnost organismů v kontrole do 10 %, byl OCS rozpouštěn v 0,5% roztoku acetonu. Koncentrační řada byla zvolena v rozmezí 0,1 až 50 mg.l^{-1} , tak že bylo namícháno 10 různých koncentrací. Požadované množství pro každou koncentraci činilo 50 ml.

Ředění bylo prováděno tak, že bylo nejprve vytvořeno 100 ml roztoku o koncentraci 50 mg.l^{-1} , který se pak vždy zředil na polovinu ředící vodou. Do 100 ml odměrné baňky bylo vždy napipetováno 50 ml ředící vody, přidáno 0,25 ml čistého acetonu, aby byla zachována podmínka 0,5% roztoku acetonu, a až poté bylo přidáno 50 ml roztoku, který měl být ředěn na poloviční koncentraci.

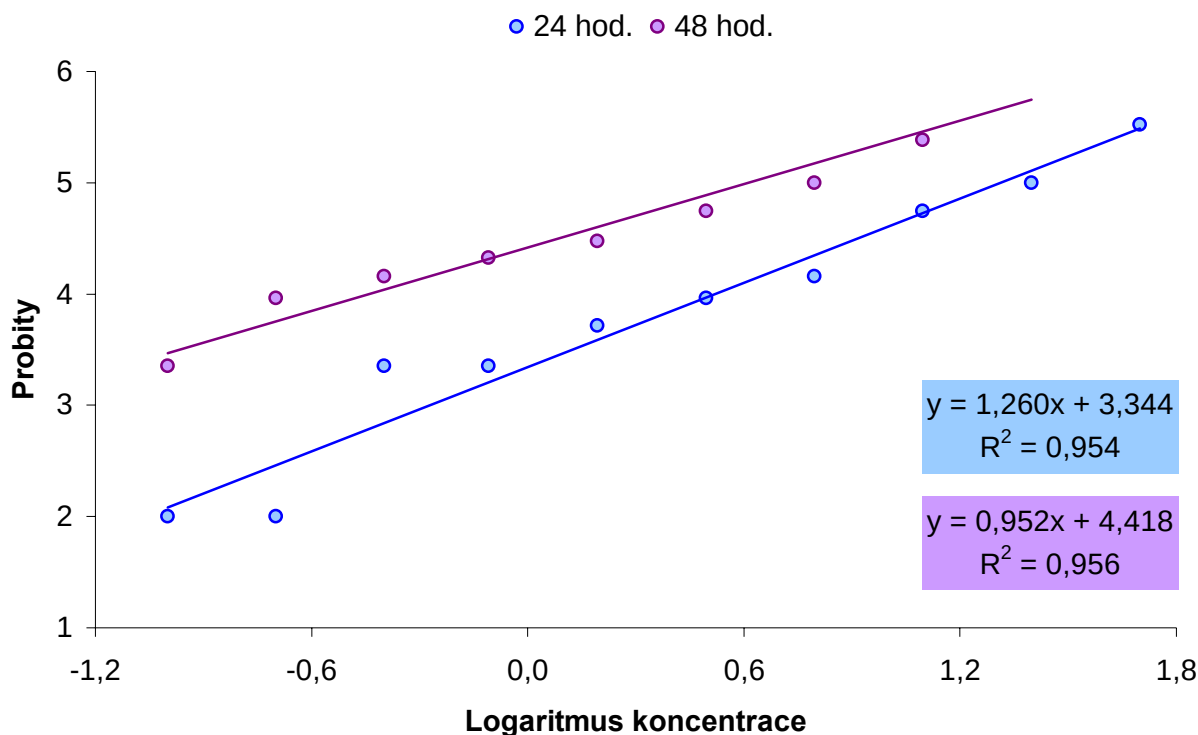
koncentrace (mg.l^{-1})	po 24 hodinách			po 48 hodinách		
	mrtvý/ celkem	inhibice (%)	probity	mrtvý/ celkem	inhibice (%)	probity
0,5 % Ac. (kontrola)	1/20	5	2,574	2/20	10	3,718
0,1	0/20	0	2,000	1/20	5	3,355
0,2	0/20	0	2,000	3/20	15	3,964
0,4	1/20	5	3,355	4/20	20	4,158
0,78	1/20	5	3,355	5/20	25	4,326
1,56	2/20	10	3,718	6/20	30	4,476
3,125	3/20	15	3,964	8/20	40	4,747
6,25	4/20	20	4,158	10/20	50	5,000
12,5	8/20	40	4,747	13/20	65	5,385
25	10/20	50	5,000	17/20	85	6,036
50	14/20	70	5,524	20/20	100	8,000

✓ Obsah kyslíku na začátku testu: 9,42 mg.l^{-1}

✓ Obsah kyslíku na konci testu: 8,95 mg.l^{-1}

Podmínka platnosti testu byla tentokrát splněna, neboť mortalita v kontrole nepřekročila 10 %.

Daphtoxkit - OCS v 0,5 % Ac



Rovnice regrese odečtená z grafu pro OSC v 0,5 % acetonu:

✓ $y = 1,260x + 3,344$ (po 24 hodinách)

✓ $y = 0,952x + 4,418$ (po 48 hodinách)

$$x_{24} = \frac{5 - 3,344}{1,260} = 1,3143$$

$$c_{24} = 10^{1,3143} = 20,6199 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$x_{48} = \frac{5 - 4,418}{0,952} = 0,6113$$

$$c_{48} = 10^{0,6113} = 4,0864 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hledaná hodnota EC_{50} pro OCS rozpuštěném v 0,5% acetonu je:

$${}_{24h}EC_{50} = 20,62 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$${}_{48h}EC_{50} = 4,09 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

6. DISKUZE

Jak již bylo dříve zmíněno v teoretické části diplomové práce, jsou biologické testy toxicity vhodným doplňkem ke klasickým analyticko-chemickým metodám, neboť poskytují informace o škodlivém účinku látky na organismus – tuto informaci nám žádný přístroj poskytnout nedokáže.

V této práci byly testy toxicity prováděny s oktachlorstyrenem, jakožto persistentním organickým polutantem, vyskytujícím se v životním prostředí a negativně působícím na živou přírodu.

Hlavním cílem diplomové práce bylo testování toxicity OCS pomocí alternativních testů toxicity. Na testování byl použit toxkit využívající sladkovodního organismus *Daphnia magna* tzv. Daphtoxkit a *Thamnocephalus platyurus* tzv. Thamnotoxkit. Protože byla testována jenom jedna látka a zakoupení většího množství různých toxkitů by bylo finančně náročné, byly pro srovnání prováděny rovněž testy klasické a fytotesty. Zástupcem klasického testu byl test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, zástupcem fytotestů byl test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* a test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*.

OCS byl připraven z 2,6-dichlorstyrenu. Identifikace produktu a stanovení čistoty bylo provedeno na základě teploty tání a TLC, teplota tání byla stanovena na 99 °C. Literatura uvádí teplotu tání OCS 99,5 – 101 °C, takže vyrobenou látku lze považovat za dostatečně čistou. TLC neukázala přítomnost dalších látek. Rovněž struktura látky odpovídala popisu – bílé, jehlicovité krystalky.

Kromě samostatného testování toxicity OCS byly prováděny stejné testy i s referenční chemickou látkou dichromanem draselným. To umožňovalo ověřit si správnost metodického postupu, případně srovnat míru toxicity OCS a dichromanu.

Tab. 6.1: Souhrn výsledků měření:

		Referenční látka $K_2Cr_2O_7$	OCS v 1 % acetonu
1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	$72hIC_{50} = 56,85 \text{ mg.l}^{-1}$	Bylo dosaženo maximálně 25% inhibice u nejvyšší koncentrace 50 mg.l^{-1}
2.	Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa</i>	$72hIC_{50} = 27,84 \text{ mg.l}^{-1}$	$72hIC_{50} = 5,61 \text{ mg.l}^{-1}$
3.	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	Nebyl prováděn.	Nedošlo k inhibici, nýbrž ke stimulaci.
4.	Thamnotoxkit	$24hLC_{50} = 0,098 \text{ mg.l}^{-1}$	Nebylo dosaženo 50% inhibice ani při nejvyšší koncentraci 50 mg.l^{-1}
		Referenční látka $K_2Cr_2O_7$	OCS v 0,5 % acetonu
5.	Daphtoxkit	$24hEC_{50} = 0,91 \text{ mg.l}^{-1}$ $48hEC_{50} = 0,75 \text{ mg.l}^{-1}$	$24hEC_{50} = 20,62 \text{ mg.l}^{-1}$ $48hEC_{48} = 4,09 \text{ mg.l}^{-1}$

Tab. 6.2: Hodnocení chemických látek a přípravků se provádí dle nařízení vlády č. 25/1998 a podle vyhlášky Mze ČR č.84/1997:

R věty	hodnocení toxicity	LC ₅₀ (popř. EC ₅₀ , IC ₅₀)
R50	vysoce toxické pro vodní organismy	LC ₅₀ ≤ 1 mg.l ⁻¹
R51	toxické pro vodní organismy	1 mg.l ⁻¹ < LC ₅₀ ≤ 10 mg.l ⁻¹
R52	škodlivé pro vodní organismy	10 mg.l ⁻¹ < LC ₅₀ ≤ 100 mg.l ⁻¹

Testované látky a přípravky se označují z hlediska rizik tzv. R větami. Rozhodující je zjištěná hodnota pro nejcitlivější druh organismu.

1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé:

Test byl prováděn na skleněných Petriho miskách a největším problémem, který se vyskytl v průběhu testu, bylo vysychání Petriho misek v inkubátoru. Proto byly Petriho misky s klíčovými semeny uloženy do zásuvky pracovního stolu v laboratoři a teplota v místnosti byla udržována pomocí klimatizace. Klíčivost vždy dosahovala minimálně požadovaných 90 %.

Každopádně ani při nejvyšší připravené koncentraci 50 mg.l⁻¹ nereagovala rostlina dostatečně citlivě a maximální inhibice, které bylo dosaženo činila cca 25 %. Z tohoto důvodu nelze vypočítat hodnotu IC₅₀.

2. Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa*

Cibule reagovala na roztok OCS v 1% acetonu mnohem citlivěji než hořčice bílá. Již v samotné kontrole (= 1 % aceton) docházelo k markantní inhibici oproti ředící vodě a to v případě prvního testu o 52 % a v případě druhého testu o 22 %. Růst kořene v testu s OCS rozpuštěným v 1 % acetonu byl vyjádřen v korelaci k růstu kořene v kontrolním testu s rozpouštědlem.

^{72h}IC₅₀ byla z rovnice regrese vypočítaná na 5,61 mg.l⁻¹.

3. Inhibice růstu okřehku *Lemna minor*

Test inhibice růstu okřehku byl prováděn spíše pro účely porovnání co největšího množství různých testů toxicity a rovněž pro seznámení se s provedením testu. Každopádně výsledek testu je neplatný, neboť nebyla splněna podmínka, že se počet lístků v kontrole během testu 8krát zvětší. Dále v testu namísto inhibice docházelo ke stimulaci růstu proti kontrole, kterou byl 1% roztok acetonu.

Během 14-ti denní testovací periody došlo k tomu, že se OCS v některých kelímcích částečně vysrážel. Kelímky, které byly umístěny na okně nebyly zřejmě dostatečně utěsněny (byly překryty jen potravinářskou fólií) a došlo k odpaření acetonu – právě ten zajišťoval, že byl OCS v ředící vodě rozpuštěn (ve vodě je nerozpustný).

Kelímky byly z plastového materiálu, který se působením acetonu částečně rozpouští. I tento fakt mohl zkreslit výsledky.

4. *Thamnotoxkit*

Pro vyhodnocení výsledků *Thamnotoxkitu* byla použita tzv. probitová analýza, kdy je hodnotě mortality v % přiřazena číselná hodnota v probitech. Dále byl sestaven graf závislosti probitů na logaritmu koncentrace a pomocí lineární regrese vypočtena hodnota LC₅₀.

Přestože při nejvyšší testované koncentraci 50 mg.l^{-1} došlo pouze k 43% úmrtnosti testovaných organismů, byla vypočítána hodnota ${}_{24\text{h}}\text{LD}_{50} = 65,32 \text{ mg.l}^{-1}$. Lze konstatovat, že podle výše uvedených R vět, splňuje OCS podmínku věty R52, která o látce říká, že je škodlivá pro vodní organismy.

5. *Daphtoxkit*

Daphtoxkit byl nejprve prováděn jako všechny předešlé testy s roztokem OCS v 1% acetonu. Výsledek testů byl však neplatný, neboť úmrtnost organismů v kontrole překročila hranici 10 %. Proto byla další série testů prováděna s roztokem OCS v 0,5 % acetonu. Výsledkem byla hodnota ${}_{24\text{h}}\text{EC}_{50} = 20,62 \text{ mg.l}^{-1}$ a ${}_{48\text{h}}\text{EC}_{50} = 4,09 \text{ mg.l}^{-1}$. Lze konstatovat, že *Daphnia magna* reaguje na roztoky OCS citlivěji než *Thamnocephalus platyurus*, což je patrné z právě prezentovaných výsledků.

Při 48hodinovém testu lze OCS zařadit podle Tab. 6.2, mezi látky toxické pro vodní organismy.

Celkově lze říci, že nejcitlivěji na OCS rozpuštěný v 1% acetonu (případně 0,5%) reaguje cibule *Allium cepa* ve fytotestu – testu inhibice růstu kořene a dále sladkovodní organismus *Daphnia magna* v alternativním testu toxicity – Daphtoxkitu. U ostatních testů nebylo ani při nejvyšší testované koncentraci 50 mg.l^{-1} dosaženo alespoň 50% inhibice růstu či úmrtnosti.

Pro další testování by bylo proto nutné zvolit buď jiné biologické testy toxicity nebo jiné koncentrační rozmezí, zahrnující koncentraci vyšší než 50 mg.l^{-1} . To by ovšem vedlo k problémům s nalezením vhodného rozpouštědla, ve kterém by byl OCS rozpustný, ale při tom by neovlivňovalo výsledky testu nadměrnou inhibicí či úmrtností v kontrole.

7. ZÁVĚR

Z provedených testů toxicity, bylo možné stanovit 50% inhibici růstu nebo úmrtnost pouze ve dvou případech. Výsledkem testu inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* je hodnota $_{72h}IC_{50} = 5,61 \text{ mg.l}^{-1}$ a výsledkem Daphtoxkitu jsou hodnoty $_{24h}EC_{50} = 20,62 \text{ mg.l}^{-1}$ a $_{48h}EC_{48} = 4,09 \text{ mg.l}^{-1}$. Letální koncentrace byla vypočtena i u Thamnotoxkitu $_{24h}LC_{50} = 65,32 \text{ mg.l}^{-1}$, má však spíše orientační význam, neboť maximální dosažená mortalita činila pouze 43 %. V případě testu inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* bylo dosaženo při maximální koncentraci pouze 25% inhibice, takže nebyla IC_{50} vůbec počítána, stejně jako u testu inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*, kde namísto inhibice docházelo ke stimulaci růstu oproti kontrole.

OCS je pro různé organismy různě toxický, nelze tedy jeho výslednou toxicitu nijak zobecnit. Je však zjevné, že jisté škodlivé účinky na životní prostředí má.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. SVOBODOVÁ, Z., et al. *Ekotoxikologie : Praktická cvičení, část I.* 1. vyd. [s.l.] : Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, 2000. 72 s. ISBN 80-85114-95-X.
2. KAFKA, Z., PUNČOCHOVÁ, J. *Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí*. Chem. Listy 93. [s.l.] : Vysoká škola chemicko-technologická Praha, 1999. 604 - 606 s.
3. *Persistent organic pollutants* [online]. 1996 [cit. 2008-02-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.chem.unep.ch/pops>>
4. CHU, S., COVACI, A.. The distribution of octachlorstyrene (OCS) in environmental samples from Europe. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2003 [cit. 2008-02-05], s. 1-7. Dostupný z WWW: <<http://www.rsc.org/Publishing/Journals/EM/article.asp?doi=b304364a>>
5. BESTER, Kai, et al. Chlorostyrenes in fish and sediment samples from the river Elbe. *Pergamon* [online]. 1998 [cit. 2008-02-05], s. 2459-2471. ISSN 0045-6535/98
6. BIENIEK, D., KORTE, F. Simple synthesis of octachlorstyrene. *Chemosphere*. 1978, vol. 7, no. 9, s. 729-730.
7. SOLOMONS, T. W. Graham, FRYHLE, Craig B. Organic Chemistry. 8th edition. [s.l.]: WILEY, 2004. 1344 s. ISBN 978-0-471-41799-6.
8. Great Lakes Binational Toxics Strategy. *U.S. Environmental Protection Agency Chicago* [online]. 2004 [cit. 2008-02-05]
9. *Porphyria* [online]. 2003 [cit. 2008-02-13]. Dostupný z WWW: <<http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/porphyria/index.htm>>.
10. PICKA, K., MATOUŠEK, J. *Základy obecné a speciální toxikologie*. [s.l.] : VUT v Brně, 1996. 103 s. ISBN 80-85368-91-9.
11. ČABALA. *Ekotoxikologie : Hranice mezi ekologií a toxikologií?* [online]. 2007 [cit. 2008-02-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/20070806NH1.pdf>>.
12. MATRKA, M., RUSEK, V. *Průmyslová toxikologie : Úvod do obecné a speciální toxikologie*. 2. vyd. [s.l.] : Fakulta chemicko-technologická Univerzita Pardubice, 1994. 157 s. ISBN 80-85113-85-6.
13. *Alternativní testy toxicity* [online]. 2007 [cit. 2008-02-26]. Dostupný z WWW: <http://recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf>.
14. MARŠÁLEK, B.. *Ekotoxikologické biotesty : Rozdělení, přehled, použití* [online]. [cit. 2008-02-15]. Dostupný z WWW: <http://recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf>.
15. HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton : CRC Press, 2003. 1290 s. 2. ISBN 1-56670-546-0.
16. KOČÍ, V., RAKOVNICKÝ, T., ŠVAGR, A.. *Testy akutní a semichronické toxicity* [online]. VŠCHT v Praze, 2001 [cit. 2008-02-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Obecna.htm>>.
17. BALOG, K., ZAPLETALOVÁ - BARTLOVÁ, I. *Základy toxikologie*. 1. vyd.: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě, 1998. 107 s. ISBN 80-86111-29-6.

18. *Ekotoxikologie* [online]. [cit. 2008-02-28]. Dostupný z WWW:
<<http://ekologie.upol.cz/ku/etxo/EkotoxII.pdf>>.
19. JOZÍFKOVÁ, Z. *Využití alternativních testů biotoxicity pro stanovení nebezpečnosti polutantů*. [s.l.]. Bakalářská práce: VUT v Brně, 2007. 39 s.
20. *Biotesty* [online]. [cit. 2008-02-28]. Dostupný z WWW:
<<http://www.toxicita.cz/biotesty/nevyhody-biotestu-ryba-dafnie-rasa>>.
21. *Poecilia reticulata*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://www.animalsholding.cz/zvirata/poecilia_reticulata.jpg>.
22. *Brachydanio rerio*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://www.aquahobby.com/gallery/img/Danio_rerio_6.jpg>.
23. *Alternativní testy toxicity* [online]. [cit. 2008-02-28]. Dostupný z WWW:
<<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=9287>>.
24. AMBROŽOVÁ, J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. [s.l.] : VŠCHT v Praze, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8
25. *Scenedesmus subspicatus*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://www.vustah.cz/laboratore/zlatelab/images/scenedesmus_subspicatus.jpg>.
26. *Selenastrum capricornutum*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://silicasecchidisk.conncoll.edu/Pics/Other%20Algae/Green_jpegs/Selenastrum_Key217.jpg>.
27. KOČÍ, V., RAKOVNICKÝ, T., ŠVAGR, A.. *Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba* [online]. VŠCHT v Praze, 2001 [cit. 2008-03-05]. Dostupný z WWW:
<<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm>>.
28. Thamnotoxkit FTM – standard operational procedure, 28 p.
29. *Thamnotoxkit F* [online]. [cit. 2008-03-12]. Dostupný z WWW:
<<http://www.microbiotests.be/toxkits/thamnotoxkitf.pdf>>.
30. *Thamnocephalus platyurus*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://www.mk.uni-pannon.hu/kv/04Munkatars/kovats_kutatas/toxlab/image1.jpg>.
31. Daphtoxkit FTM – standard operational procedure, 27 p.
32. *Daphnia magna*. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<http://www.ulrichhopp.de/bilder/kleinkrebse/Kleink_13_Daphnia_magna_2_fertig_013.jpg>.
33. Daphtoxkit. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<<http://www.biohidrica.cl/images/daphtoxkit03.jpg>>.
34. Rotoxkit FTM – standard operational procedure, 27 p.
35. *Microbiotests* [online]. [cit. 2008-03-25]. Dostupný z WWW:
<<http://www.microbiotests.be/>>.
36. BAKALOVÁ, L.. *Testy fytotoxicity a jejich využití pro hodnocení vlivu xenobiotik*. Bakalářská práce: Masarykova univerzita Brno, 2006. 41 s. Dostupný z WWW:
<http://is.muni.cz/th/106666/prif_b/bakalarka_nova.pdf>.
37. ŠVAGR, A., JIRKŮ, J.. *Test při semichronické expozici vůči okřešku menšímu (Lemna minor)* [online]. VŠCHT v Praze, 2003 [cit. 2008-03-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Okrehek.htm>>.
38. *Lemna minor*. [cit. 2008-03-27]. Dostupný z WWW:
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c9/Lemna_minor.jpg/748px-Lemna_minor.jpg>.

39. Lemna minor. [cit. 2008-03-27]. Dostupný z WWW:
<<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/4473.jpg>>.
40. DUBOVÁ, J., SMÍŠKOVÁ, A.. *Od rostlinné kultury in vitro k biotechnologiím*
[online]. [cit. 2008-03-27]. Dostupný z WWW:
<<http://svp.muni.cz/ukazat.php?docId=592>>.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

OCS	oktachlorstyren
POP	persistentní organické polutanty
HCB	hexachlorbenzen
DDT	2,2-bis(4-chlorfenyl)-1,1,1-trichlorethan
DDE	2,2-bis(4-chlorfenyl)-1,1-dichlorethen
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	polychlorované dibenzo- <i>p</i> -dioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
ISO	Organization for Standardization; mezinárodní organizace, která provádí standardizace
WHO	World Health Organization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development; mezinárodní organizace, která provádí standardizaci
US-EPA	United States Environmental Protection Agency
ČSN	Český normalizační institut
EC ₅₀	koncentrace testovaného vzorku, která způsobuje úhyn nebo imobilizaci 50 % testovaných organismů
IC ₅₀	koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50 % inhibici růstu ve srovnání s kontrolou
LC ₅₀	koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů
^{24h} LC ₅₀	koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v časovém úseku 24 hodin
^{48h} LC ₅₀	koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v časovém úseku 48 hodin
LOEC/L	nejnižší koncentrace/dávka testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (Lowest Observed Effect Concentration/Level)
LOAEL	nejnižší dávka testovaného vzorku, která již vyvolává škodlivý účinek na zdraví člověka a zvířat (Lowest Observed Adverse Effect Level)
NOEC/L	nejvyšší koncentrace/dávka testované látky, která nevyvolává žádný pozorovatelný účinek (No Observable Effect Concentration/Level)
NOAEL	nejvyšší dávka testovaného vzorku, která ještě nevyvolává škodlivý účinek na zdraví člověka nebo zvířat (No Observable Adverse Effect Level)
SFW	Standard Fresh Water; standardní sladká voda

10. SEZNAM PŘÍLOH

P1 Tabulka hodnot pro probitovou analýzu	65
P2 Alternativní testy toxicity využívané pro testování sladkovodního prostředí	66
P2.1 Povrchová voda	66
P2.2 Sedimenty	67
P2.3 Odpadní voda	68
P2.4 Kontaminovaná voda – pohotovostní testy	68
P2.5 Biotoxiny produkované modro-zelenými řasami	68

P1: Tabulka hodnot pro probitovou analýzu

%	probit y	%	probit y	%	probit y	%	probit Y
0,2	2,122	21,0	4,194	51,0	5,025	82,0	5,915
0,4	2,348	22,0	4,228	52,0	5,050	83,0	5,954
0,6	2,488	23,0	4,261	53,0	5,075	84,0	5,994
0,8	2,591	24,0	4,294	54,0	5,100	85,0	6,036
1,0	2,574	25,0	4,326	55,0	5,126	86,0	6,080
1,2	2,743	26,0	4,357	56,0	5,151	87,0	6,126
1,4	2,803	27,0	4,387	57,0	5,176	88,0	6,175
1,6	2,856	28,0	4,417	58,0	5,202	89,0	6,227
1,8	2,903	29,0	4,447	59,0	5,228	90,0	6,282
2,0	2,946	30,0	4,476	60,0	5,253	91,0	6,341
2,5	3,040	31,0	4,504	61,0	5,278	92,0	6,405
3,0	3,123	32,0	4,532	62,0	5,305	93,0	6,476
3,5	3,188	33,0	4,560	63,0	5,332	94,0	6,555
4,0	3,249	34,0	4,588	64,0	5,358	95,0	6,645
4,5	3,305	35,0	4,615	65,0	5,385	95,5	6,695
5,0	3,355	36,0	4,642	66,0	5,412	96,0	6,751
6,0	3,445	37,0	4,668	67,0	5,440	96,5	6,812
7,0	3,524	38,0	4,695	68,0	5,468	97,0	6,881
8,0	3,595	39,0	4,722	69,0	5,496	97,5	6,960
9,0	3,659	40,0	4,747	70,0	5,524	98,0	7,054
10,0	3,718	41,0	4,772	71,0	5,553	98,2	7,096
11,0	3,773	42,0	4,798	72,0	5,583	98,4	7,144
12,0	3,825	43,0	4,824	73,0	5,613	98,6	7,197
13,0	3,874	44,0	4,849	74,0	5,643	98,8	7,257
14,0	3,920	45,0	4,874	75,0	5,674	99,0	7,326
15,0	3,964	46,0	4,900	76,0	5,706	99,2	7,409
16,0	4,006	47,0	4,925	77,0	5,739	99,4	7,512
17,0	4,046	48,0	4,950	78,0	5,772	99,6	7,652
18,0	4,085	49,0	4,975	79,0	5,806	99,8	7,878
19,0	4,122	50,0	5,000	80,0	5,842		
20,0	4,158			81,0	5,878		

P2: ALTERNATIVNÍ TESTY TOXICITY VYUŽÍVANÉ PRO TESTOVÁNÍ SLADKOVODNÍHO PROSTŘEDÍ

P2.1: Povrchová voda

Trofická úroveň	Skupina organismů	Toxkit	Typ testu	Testovací kritérium	Trvání testu	Testovací organismy
Producenti	Mikro-řasy	Algaltoxkit F	Krátkodobý-chronický	Inhibice růstu	72h	<i>Selenastrum capricornutum</i>
Konzumenti	Vířníci	Rotoxkit F	Akutní	Mortalita	24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>
		Rotoxkit krátkodobý-chronický	Krátkodobý-chronický	Reprodukce	48h	<i>Brachionus calyciflorus</i>
	Korýši	Daphtoxkit F magna	Akutní	Mortalita/Imobilita	24-48h	<i>Daphnia magna</i>
		Daphtoxkit F pulex	Akutní	Mortalita	24h	<i>Daphnia pulex</i>
		Ceriodaphtoxkit F	Akutní	Mortalita	24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Destruenti	Prvoci	Protoxkit F	Krátkodobý-chronický	Inhibice růstu	24h	<i>Tetrahymena thermophila</i>
	Bakterie	Microtox*	Akutní	Inhibice luminiscence	15-30min	<i>Vibrio fischeri</i>

P2.2: Sedimenty

Voda z pórů sedimentu

Pro toxickou analýzu juvenilní vody lze použít stejné testy jako pro vodu povrchovou. Před testováním ale nejprve musíme juvenilní vodu extrahovat ze sedimentu pomocí filtrace nebo odtředění.

Celkový sediment

Trofická úroveň	Skupina organismů	Toxkit	Typ testu	Testovací kritérium	Trvání testu	Testovací organismy
Producenti	Vyšší rostliny	Phytotoxkit	Krátkodobý-chronický	Klíčení semen Růst rostliny	3 dny	<i>Sorghum saccharatum</i> <i>Lepidium sativum</i> <i>Sinapis alba</i> (nebo jakákoliv jiná rostlina s rychlým klíčením semen a snadným růstem)
Konzumenti	Korýši	Ostracodtoxkit	Krátkodobý-chronický	Mortalita Inhibice růstu	6 dní	<i>Heterocypris incongruens</i>
Destruenti	Bakterie	Pevná fáze Microtox*	Akutní	Inhibice luminescence	30 min	<i>Vibrio fischeri</i>

P2.3: Odpadní voda

Pro toxickou analýzu průmyslových a komunálních odpadních vody se využívá stejných testů jako pro povrchovou vodu.

P2.4: Kontaminovaná voda – pohotovostní testy (rychlé)

Trofická úroveň	Skupina organismů	Toxkit	Typ testu	Testovací kritérium	Trvání testu	Testovací organismy
Producenti		Nejsou k dispozici žádné specifické rychlé toxikity				
Konzumenti	Korýši	Rapidtoxkit	Acute	Inhibice specifického příjmu	15-60 min	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
Destruenti	Bakterie	Microtox*	Akutní	Inhibice luminiscence	15-30 min	<i>Vibrio fischeri</i>

P2.5: Biotoxiny produkované modro-zelenými řasami (cyanotoxiny)

Trofická úroveň	Skupina organismů	Toxkit	Typ testu	Testovací kritérium	Trvání testu	Testovací organismy
Producenti		Nejsou k dispozici žádné specifické toxikity				
Konzumenti	Korýši	Thamnotoxkit	Acute	Mortalita	24 h	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
Destruenti	Bakterie	Microtox*	Akutní	Inhibice luminiscence	15-30 min	<i>Vibrio fischeri</i>

