

# 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

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ VYBRANÝCH MONOMERŮ  
POMOCÍ TESTŮ TOXICITY  
ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF SELECTED MONOMERS USING TOXICITY TESTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

LUDMILA ŠOTOLOVÁ

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

# EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ VYBRANÝCH MONOMERŮ POMOCÍ TESTŮ TOXICITY

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF SELECTED MONOMERS USING TOXICITY TESTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

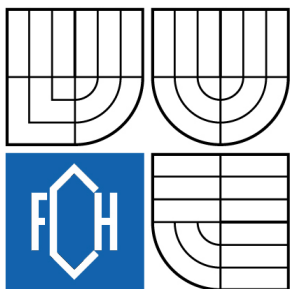
LUDMILA ŠOTOLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ  
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	<b>FCH-DIP0268/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka)	<b>Šotolová Ludmila</b>	
Studijní program	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)	
Studijní obor	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce	<b>MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.</b>	
Konzultanti diplomové práce		

### Název diplomové práce:

Ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů pomocí testů toxicity

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování rešerše
2. Výběr vhodných testů toxicity
3. Zhodnocení získaných výsledků

### 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.

---

Ludmila Šotolová  
student(ka)

---

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Hodnocení ekotoxicity je v současné době vyžadováno legislativou pro všechny chemické látky a chemické přípravky. V poslední době je mu připisován velký význam. Tato práce je zaměřena na ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů a aditiv polymerů pomocí testů toxicity. Testována byla tři aditiva polymerů a dva monomery pomocí čtyř testů ekotoxicity. Byly použity následující testy: test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L. a test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*. Z alternativních testů toxicity byly použity Thamnotoxkit F na testovacím organismu *Thamnocephalus platyurus* a Daphnotoxkit F na testovacím organismu *Daphnia magna*. Na základě výsledků testů byly pro testované látky stanoveny hodnoty LC50, IC50, EC50 a porovnána jejich ekotoxicita.

## ABSTRACT

Evaluation of ecotoxicity is demanded for all chemical substances and chemical preparation following the current Czech legislation. Recently this evaluation is gaining great importance. This work is aimed on ecotoxicity evaluation of selected monomers and additives of polymers via tests of ecotoxicity. Three additives of polymers and two monomers were tested using four ecotoxicity tests. Following tests were used: *Allium cepa* L root growth inhibition toxicity test and *Sinapis alba* root growth inhibition toxicity test. As alternative toxicity tests, Thamnotoxkit F on sense organism *Thamnocephalus platyurus* and Daphnotoxkit F on sense organism *Daphnia magna* were used. On the basis of the test results the values of LC50, IC50, EC50 were determined and ecotoxicity of tested substances was compared.

## KLÍČOVÁ SLOVA

monomer, ekotoxikologie, alternativní testy, testy ekotoxicity, testy fytoxicity

## KEYWORDS

monomer, ecotoxicology, alternative tests, test of ecotoxicity, test of phytotoxicity

ŠOTOLOVÁ, L. *Ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů pomocí testů toxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 77 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

-----  
podpis diplomanta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé závěrečné práce. V neposlední řadě své rodině a mým nejbližším za podporu při studiu.*

## OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
	3.1. Ekotoxikologie.....	9
	3.1.1. Historie.....	9
	3.2. Ekotoxikologický biotest.....	10
	3.2.1. Rozdělení ekotoxikologických biotestů.....	10
	3.2.1.1. Podle doby expozice.....	10
	3.2.1.2. Podle uspořádání testu.....	11
	3.2.1.3. Podle úrovně provedení.....	12
	3.2.1.4. Podle trofické úrovně testovacích organismů.....	13
	3.2.1.5. Podle testované matrice a spektra testovacích organismů.....	14
	3.2.1.6. Podle typu testovaného vzorku a způsoby přípravy vzorků.....	14
	3.2.1.7. Podle stupně komplexnosti detekčního systému.....	14
	3.2.1.8. Podle způsobu vyhodnocení.....	14
	3.3. Metody testování toxicity.....	14
	3.3.1. Ekotoxikologické hodnocení látek na základě testů toxicity.....	15
	3.3.1.1. Předběžný test.....	15
	3.3.1.2. Ověřovací test.....	15
	3.3.1.3. Orientační test.....	15
	3.3.1.4. Základní test.....	16
	3.3.2. Hodnocení výsledků.....	16
	3.4. Standardní metody testování toxicity.....	17
	3.4.1. Akutní imobilizační test toxicity na perloočkách <i>Daphnia magna</i> .....	17
	3.4.2. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	18
	3.4.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas <i>Raphidocellis subcapitata</i> .....	19
	3.4.4. Test akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i> .....	21
	3.5. Testy fytoxicity.....	23
	3.5.1. Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i> .....	23
	3.5.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa L.</i> .....	25
	3.6. Alternativní metody testování toxicity.....	26
	3.6.1. Toxkity.....	27
	3.6.1.1. Algotoxkit F.....	27
	3.6.1.2. Daphnotoxkit F.....	28
	3.6.1.3. Rotokit F.....	28
	3.6.1.4. Thamnotoxkit F.....	29
	3.6.2. Vyhodnocení alternativních testů a interpretace výsledků.....	30
	3.7. Související legislativní předpisy .....	30
	3.8. Polymery.....	31
	3.8.1. Monomery.....	32
	3.8.2. Aditiva polymerů.....	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
	4.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	38
	4.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa L.</i> .....	39

	4.3. Thamnotoxkit F.....	40
	4.4. Daphnotoxkit F.....	43
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	46
	5.1. 1,1,2-trichlorethylen.....	47
	5.1.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	48
	5.1.2. Thamnotoxkit F.....	48
	5.1.3. Daphnotoxkit F.....	49
	5.2. 1,1,2,2-tetrachlorethylen.....	50
	5.2.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	50
	5.2.2. Thamnotoxkit F.....	51
	5.2.3. Daphnotoxkit F.....	52
	5.3. 2-Br-5-Cl-pyridin.....	53
	5.3.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	53
	5.3.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa L.</i> .....	54
	5.3.3. Thamnotoxkit F.....	54
	5.3.4. Daphnotoxkit F.....	55
	5.4. 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid.....	56
	5.4.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	56
	5.4.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa L.</i> .....	57
	5.4.3. Thamnotoxkit F.....	57
	5.4.4. Daphnotoxkit F.....	58
	5.5. sodná sůl 2-merkaptu-5-Cl-pyridin-N-oxidu.....	60
	5.5.1. Test inhibice růstu kořene hořčice <i>Sinapis alba</i> .....	60
	5.5.2. Test inhibice růstu kořene cibule <i>Allium cepa L.</i> .....	61
	5.5.3. Thamnotoxkit F.....	61
	5.5.4. Daphnotoxkit F.....	62
	5.6. Zhodnocení výsledků.....	63
6	ZÁVĚR.....	70
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	72
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	75
9	PŘÍLOHY.....	77

# 1 ÚVOD

Člověk se setkával s jedovatými rostlinami a živočichy po celou dobu své existence. Na základě empirických zkušeností se postupně seznamoval s jejich toxickými účinky na jiné organizmy i příslušníky vlastního druhu a začal tyto poznatky využívat ve svůj prospěch. Teprve s rozvojem moderní chemie a biologie byly nositelé toxicity rostlin, živočichů, ale také dalších forem života rozpoznány. Také bylo poznáno jejich chemické složení a objasněny mechanismy jejich toxického účinku na živé tvory.

Z hlediska toxicity je možné každou látku považovat za potenciální škodlivinu, neboť může mít za daných okolností nějaký nepříznivý účinek. Největší pozornost je věnována látkám, které představují nebezpečí dlouhodobé kontaminace vody, půdy a ovzduší, zvláště pokud jsou spojeny s rizikem jejich přenášení v potravinových řetězcích. Především se jedná o perzistentní toxické sloučeniny, z nichž nejvýznamnější skupinu představují organické polutanty. [1, 2]

Ochranou zdraví a životního prostředí před škodlivými účinky chemických látek a chemických přípravků se zabývá zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů. Pro všechny chemické látky a chemické přípravky jsou tímto zákonem určeny způsoby, jak s nimi zacházet, jak je evidovat, přepravovat, skladovat atd. Všechny chemické látky a přípravky uvedené na trh musí být klasifikovány. Klasifikací se rozumí postup zjišťování a hodnocení nebezpečných vlastností látek nebo přípravků a jejich následné zařazení do jednotlivých skupin nebezpečnosti (například zdraví škodlivé, toxické či nebezpečné pro životní prostředí). [2, 3]

Nařízení REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals – systém registrace, hodnocení a povolování chemických látek), které vstoupilo v platnost dne 1. června 2007, má za úkol zracionalizovat a vylepšit starý legislativní systém Evropské unie pro chemické látky. Jeden z dopadů implementace tohoto nařízení je zlepšit ochranu lidského zdraví a životního prostředí před riziky, které mohou chemické látky představovat. Realizací REACH by mělo být do roku 2020 dosaženo stavu, že v Evropské unii budou vyráběny, používány a dováženy pouze chemické látky se známými vlastnostmi, jejichž bezpečnost bude předem prověřena. [4]

Chemické látky jsou součástí celé řady spotřebních výrobků, které se později stávají odpady. Tato problematika je předmětem zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů. Odpad je hodnocen jako nebezpečný, pokud je uveden v seznamu nebezpečných odpadů nebo se jedná o jiný odpad vykazující jednu nebo více nebezpečných vlastností. K nebezpečným vlastnostem patří i ekotoxicita. Jako ekotoxické jsou označovány látky nebo odpady, které, pokud se uvolní, mohou způsobit okamžité či opožděné nebezpečí v důsledku nepříznivého zatížení životního prostředí. [5, 6]

Hodnocení kvality životního prostředí je u nás tradičně založeno na nástrojích chemické analýzy, a proto je výzvou především pro odbornou chemickou společnost zajímat se rovněž o ekotoxikologické nástroje enviromentálního monitoringu a podporovat jejich vývoj i aplikaci. [7]



## 2 CÍL PRÁCE

Stále vzrůstající produkce nových chemických látek může představovat vážné riziko z hlediska projevení se jejich negativních účinků. K těmto účinkům patří především toxicita, a to nejvíce ta, která působí na lidské zdraví a životní prostředí. Právě ekotoxikologické testy se zabývají hodnocením negativního dopadu chemických látek, směsí, odpadů a polutantů na ekosystém a pomáhají tak řešit otázku bezpečnosti nových látek. Jejich použití je důležité nejen z hlediska posouzení rizik chemických látek a chemických přípravků na zdraví člověka, ale zejména na životní prostředí. Pro komplexní posouzení je výhodné kombinovat ekotoxikologické hodnocení s enviromentální analýzou.

Cílem této diplomové práce je výběr vhodných standardních a alternativních testů toxicity pro posouzení vlivu vybraných monomerů a aditiv polymerů na životní prostředí. Na základě získaných výsledků pomocí vybraných testů toxicity bude hodnocen vliv monomerů a aditiv polymerů na životní prostředí. Pro dosažení cíle bude provedeno:

- ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů a aditiv polymerů pomocí standardních testů toxicity
- ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů a aditiv polymerů pomocí alternativních testů toxicity
- zhodnocení získaných výsledků.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

U každé látky, se kterou přichází do styku organismus či vybraní živočichové, je nutné znát její toxicitu. Touto toxicitou se rozumí ireverzibilní i reverzibilní poškození. Při ireverzibilním poškození důležitých fyziologických funkcí dochází k trvalým nežádoucím následkům, které často vedou až ke smrti. Reverzibilní poškození odezní za určitou dobu po přerušení expozice toxické látky. Ke zjištění toxických účinků látek nebo jejich směsí byla vypracována řada experimentálních testů, které se provádějí jak *in vitro*, tak *in vivo* na vybraných organizmech. Na vypracování těchto zkoušek se podílí Mezinárodní organizace pro normalizaci ISO (International Organization for Standardization). Veškeré biologické testy se musí provádět podle zásad správné laboratorní praxe GLP (Good Laboratory Practice) a podle zásad etické práce s laboratorními zvířaty s ohledem na zákon č. 77/2004 Sb., kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Pomocí ekotoxikologického hodnocení je jednotlivým testům toxicity dodán správný ekologický význam, neboť pomáhají zhodnotit výsledky testů toxicity na různé složky životního prostředí a na různá společenstva.

Ekotoxikologie se převážně zabývá posuzováním toxických účinků látek, směsí, výluhů odpadů, polutantů a vzorků na ekosystémy, a proto by ekotoxikologické studie měly vždy zahrnovat výsledky testů toxicity na několika organizmech z různých trofických pozic sledovaného ekosystému. [7, 8]

### 3.1 Ekotoxikologie

Vědní obor ekotoxikologie je poměrně mladý a zabývá se hodnocením i posuzováním vlivu účinku chemikálií na živé organismy, populace a jejich společenstva kromě člověka. Dále sleduje pohyb látek v přírodě, možnosti jejich odstraňování a prevenci škodlivých účinků chemikálií na všechny složky přírody. Látky přicházející do styku s živými organismy je ovlivňují pozitivně či negativně v závislosti na dávce. [9, 10, 11]

Ekotoxikologie je přírodním oborem, který zahrnuje různé varianty experimentálních i teoretických metod z oborů jako biologie (obzvláště ekologie), chemie, toxikologie, geologie, geografie a fyzika. Hlavním cílem je vývoj metod, které umožňují sledovat nepříznivý vliv chemických látek na živé organismy a jejich společenstva za standardních a reprodukovatelných podmínek. Zvláštní pozornost je věnována potravním řetězcům. [12]

#### 3.1.1 Historie

Poprvé byly pozorovány ekotoxikologické dopady na ekosystém v roce 1850, což spadá do období průmyslové revoluce. Tehdy došlo k abnormálním změnám na kůži některých živočichů. První test akutní toxicity byl proveden v roce 1863 a týkal se sledování, hodnocení a studia působení toxických chemikálií přítomných v odpadních vodách.

Termín ekotoxikologie poprvé použil, okolo roku 1969, člen francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut. Definoval tuto činnost jako studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva. K dalším vědcům zabývajícím se ekotoxikologií

patří i Cairnse a Newman. Cairnse ekotoxikologii definoval jako testování toxicity škodlivých látek na jednu nebo více složek ekosystému. Newman pak do své definice ekotoxikologie o dopadech znečišťujících látek na biosféru zahrnuje i člověka. [12]

V letech 1960, 1970 a 1980 vědci zjistili, že příroda je mnohem rozmanitější než se původně předpokládalo. To přispělo k rozvoji ekotoxikologie zpočátku ve vodním prostředí. Prováděné standardizace v tomto prostředí byly relativně snadné a jednoduché, na rozdíl od standardizace půdy a lidského organismu. [9]

Počáteční studie zahrnovaly základní zdroje definic a identifikace biologie i morfologie jezer, potoků a řek. Tyto studie využívaly zkoumání rostlin, zvířat a mikroorganismů reagujících s biologickými částmi odpadních vod. To vedlo ke snížení organického znečištění.

Nyní existují početné standardní metody na sladkou vodu a na mořské druhy, včetně ryb, bezobratlých i řas, které jsou neodmyslitelnou součástí vod a sedimentů prostředí. [13]

## **3.2 Ekotoxikologický biotest**

Biotest je definován jako zkouška využívající biologický systém. Zahrnuje expozici organismu testovacím materiálem a odpověď organismu. Je to proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismy, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky, chemického přípravku nebo směšného či přírodního vzorku nebo výluhu odpadů, jak je požadováno v zákoně č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů.

Biotest je nespecifický, relativně levný, screeningový test, jehož výhodou je jeho rychlost. Má význam v monitoringu životního prostředí a slouží pro odhad rizik spojených s výskytem toxických látek v životním prostředí.

Pro stanovení sledovaného jevu využívá ekotoxikologický biotest detekční systémy, které jsou relevantní, to znamená, že umožňují interpretaci výsledků a mají dostatečnou výpovědní hodnotu pro sledované ekosystémy nebo hodnocené matrice, např. vodní prostředí, půdní prostředí, odpady či chemické látky. [12, 14]

### **3.2.1 Rozdělení ekotoxikologických biotestů**

#### **3.2.1.1 Podle doby expozice**

##### **Akutní testy**

Akutními testy jsou hodnoceny účinky látek, směsí, výluhů odpadů, polutantů a environmentálních vzorků, které se projeví v krátké době po jednorázovém podání. Příkladem je stanovení mortality, která se vyjadřuje jako LD50 (dávka látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v době testovací studie) nebo LC50 (koncentrace látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v době testovací studie). Prostřednictvím těchto testů se stanoví závislost účinnosti na dávce a následně se vypočítá toxický index. Akutní toxicita bývá výrazně závislá na typu expozice, proto tento údaj, včetně charakterizace testu, musí být u hodnoty stanoveného indexu uveden (orální, inhalační – 4 hod, 8 hod, atd.).

Kontrolní skupina zde není, ale je vhodné kontrolovat správnost souběžně na jiné skupině podáváním referenční látky. [13, 15]

### **Subchronické testy (subakutní)**

Cílem testu je hodnocení biologického účinku látek, směsí, výluhů odpadů, polutantů nebo environmentálních vzorků a patologických změn. Subchronické testy jsou založeny na sledování účinku po dobu rovnající se 10 % předpokládané doby života testovaného organismu. Studie subchronické toxicity vedou k detailnějším informacím o toxických účincích podávané látky. Hodnocení rozpětí koncentrace, při kterých dochází ke kumulativním účinkům, je podkladem pro sledování chronické toxicity. [12, 16]

### **Chronické testy**

Při chronických testech jsou sledovány účinky toxických látek, směsí, výluhů odpadů, polutantů nebo environmentálních vzorků po delší době nebo v delším časovém období. Důraz se klade na sledování vlivu dlouhodobě opakovaných menších dávek na organismus. V průběhu testu jsou sledovány patologické změny pomocí vhodných bioindikátorů, které indikují škodlivý účinek testované chemikálie. Kontrolní skupina je stejně početná jako exponovaná a je testována za stejných podmínek, kromě podávání testovací chemikálie.

Cílem testu je najít nejvyšší dávku, která nevyvolává prokazatelně toxický účinek. Chronické testy poskytují informace nutné ke stanovení hodnot NOAEL (No Observable Adverse Effect Level – nejvyšší dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek) a LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level – nejnižší dávka, při které již byl pozorován škodlivý účinek). [15, 16]

#### ***3.2.1.2 Podle uspořádání testu***

##### **Biotesty 1. generace (klasické, standardní)**

Tyto biotesty jsou nejrozšířenější a uznávané mezinárodní legislativou. Jejich provádění je ekonomicky náročné, neboť kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat. K testu musí být použity pouze zdravé a homogenní kultury. Doba testování se pohybuje v rozmezí 48 až 96 hodin, proto se jedná o testy akutní toxicity, např. na rybách (*Poecilia reticulata*, *Brachidanio rerio*, atd.), imobilizační test na perloočkách (*Daphnia magna*) a test inhibice růstu sladkovodních řas (*Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*). [11, 12]

##### **Biotesty 2. generace (mikrobiotesty)**

Neustálá produkce tisíců nových látek o neznámých účincích na živé organismy vede k rozvoji nových trendů ve vývoji testů. Z tohoto důvodu narůstá potřeba testování ve velkých

sériích za využití miniaturizace zkumavek, kyvet či mikrotitračních destiček. Důsledkem miniaturizace je zkrácení doby inkubace na 24 hodin až na minuty a zjednodušení i zlevnění testů. Testovací organismy pro mikrobiotesty se uchovávají v klidových stádiích (bezobratlí), v lyofilizovaném stavu (bakterie) nebo v imobilizované formě (řasy). [11, 12, 14]

### **Biotesty 3. generace (biosenzory, biosondy, biomarkery)**

Biomarkery přináší změnu v měření buněk nebo biochemických procesů a funkcí ve složkách ekosystému. Identifikace a vhodné měření pomocí biomarkerů umožňuje předpokládat možnou poruchu v ekosystému. V současné době jsou testy třetí generace na úrovni základního výzkumu. Jejich využití se očekává v on – line monitorovacích systémech a ve screeningových testech. [11, 12, 17]

#### **3.2.1.3 Podle úrovně provedení**

##### **Testy na úrovni buněk**

Testy na buněčné úrovni vodních organismů jsou využívány především pro teoretické objasnění účinků toxických agens. Mezi výhody těchto testů patří vysoká citlivost, reprodukovatelnost, nízké finanční a časové nároky. Naopak nevýhodou jsou systémy *in vitro*, které nemohou suplovat enzymaticko – imunitní systém živého organismu, a proto se často liší od faktorů získaných systémem *in vivo*. [11, 14]

##### **Testy na úrovni organismů**

Největší využití zaznamenaly testy na úrovni organismů. Přes potíže s jejich reprodukovatelností a s rizikem při interpretaci získaných výsledků na životní prostředí dosáhly tyto testy velkého rozšíření. Představují kompromis přijatelný z ekonomického i technického hlediska. Výběr organismů je prováděn tak, aby byly postiženy všechny trofické úrovně ve vodním prostředí tj. celý potravní řetězec. Odpověď organismů na přítomnost toxických látek není jednotná, ale ovlivňuje ji mnoho faktorů, např. dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace a schopnost organismu odbourávat škodlivinu. Není vhodné vytvářet závěry z testování pouze na jednom organismu. Při použití většího počtu testovacích organismů dochází k růstu informovanosti o zkoumaném vzorku a následně ke zvyšování výpovědní hodnoty testu. [11, 12, 14]

##### **Testy na úrovni biocenóz**

U testů na úrovni biocenóz je výhodné sledovat toxický účinek v přírodě nebo na modelu přírodě blízkém. Změny ve složení biocenóz nemusí být vždy vyvolány toxickým účinkem, ale mohou být způsobeny narušením potravního řetězce. Velmi obtížné je vytvořit identické podmínky předchozích testů, neboť je omezená reprodukovatelnost výsledků těchto testů.

Velké využití mají tyto testy při sledování vlivu chemických látek a přípravků nacházejících se ve vodním prostředí, např. krmiva či farmaka. [11, 14]

#### **3.2.1.4 Podle trofické úrovně testovacích organizmů**

##### **Producenti (sinice, řasy, vyšší rostliny)**

Tento typ testovacích organizmů tvoří hlavní zdroj energie a organické hmoty v ekosystému; kromě toho je zdrojem kyslíku pro ostatní organizmy. Obecně celá skupina producentů je řazena mezi ekonomicky i esteticky významné organizmy, a to z hlediska zdroje surovin i potravin.

Zásadní význam pro celý ekosystém má ekotoxicita producentů způsobující akutní i chronické efekty. Důsledkem akutních efektů na producentech v ekosystému jsou změny složení společenstva, což vede ke ztrátám citlivých druhů producentů, nebo snížení diverzity, kdy zůstává pouze jediný druh. Mezi důsledky chronických efektů patří genotoxicita, poruchy v rozmnožování, populační změny, výskyt chemicky indukovaných nádorů u rostlin či změny genofondu. [11, 12, 16, 17]

##### **Konzumenti (ryby, obojživelníci, ptáci, savci)**

Obratlovci i bezobratlí živočichové vytváří v ekosystému významný článek jako mezistupeň pro konzumenty vyšších řádů a jako regulátor početnosti nižších pater potravních řetězců. Ekonomicky a esteticky velmi významná je skupina terminálních konzumentů (dravců), která je zastoupena v přírodě v malém množství a je velmi citlivá ke stresu.

Také u konzumentů se objevuje akutní i chronická toxicita. Akutní toxicitou se rozumí např. poruchy zdraví a přijímání potravy, jehož důsledkem jsou změny společenstev. Mechanismy chronické toxicity jsou méně známé i studované než akutní efekty, a proto je jejich poznání a identifikace obtížnější. Přesto jsou v přírodě pozorovány důsledky chronické toxicity jako např. genotoxicita, karcinogenita, teratogenita a imunotoxicita. [11, 12, 17]

##### **Destruenti (bakterie, plísně, kvasinky)**

Mikroorganizmy patří mezi důležitou složku ekosystému z hlediska recyklace živin i materiálů, udržení úrodnosti a kvality půdy, biodegradčních procesů v půdě a samočistící schopnosti vody.

Nevýhodou destruentů je vysoká citlivost k ekotoxikantům, které negativně ovlivňují jednobuněčné mikroorganizmy mající velký specifický povrch a slabou buněčnou stěnu či membránu. To je příčinou nízké mechanické ochrany před okolím a následně snadného cíle pro toxické látky. K důsledkům ekotoxicity destruentů patří snížená metabolická aktivita, snížená recyklace materiálu v ekosystému a neschopnost samočištění a biodegradace toxických látek. [11, 12, 17]

### **3.2.1.5 Podle testované matrice a spektra testovacích organismů**

Vhodné testovací matrice pro ekotoxikologické biotesty jsou půda, voda, vzduch, sediment, odpady a chemické látky.

Organizmy, které se testují, je možné rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou jednodruhové organizmy a druhou skupinu tvoří vícedruhové organizmy, a to jak s přírodními populacemi tak i s laboratorními směsmi kultur. [11, 12, 18]

### **3.2.1.6 Podle typu testovaného vzorku a způsobu přípravy vzorku**

U ekotoxikologických biotestů je možné k testování využít čistých chemických látek (hydrofilní, hydrofobní, volatilní), směsi látek (známých i neznámých), ale i přírodních vzorků (většinou neznámé, směsné, s neznámými interakcemi).

Veškeré testované látky mohou být v různém stavu. Nejčastěji se testují známé koncentrace chemických látek a výluhy přírodních vzorků. Také je možné provádět přímé testy a srovnávací testy sorbčních matic. [12, 18]

### **3.2.1.7 Podle stupně komplexnosti detekčního systému**

Dělení testů podle komplexnosti detekčního systému postupuje od nejjednodušších k nejsložitějším – enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury *in vitro*, intaktní živý organismus, populace, mikro/mezo kosmos, terénní experimenty. Zde vývoj chápání ekotoxikologických biotestů pokročil. Původní definice uznávala pouze vliv látek na živé organizmy, ale dnes jsou s pronikáním třetí generace ekotoxikologických biotestů uznávány pro hodnocení rizik také biotesty na úrovni suborganismální. [11, 12]

### **3.2.1.8 Podle způsobu vyhodnocování**

Součástí provedení testu toxicity je i způsob jeho vyhodnocení. Po ukončení testu se mohou objevit např. letální efekty (mortalita, imobilizace), subletální efekty (chování organismů např. rychlost a směr pohybu), hodnocení fyziologické aktivity (fotosyntetická aktivita, enzymatická aktivita, efekty na membránách, přírůstky - např. délka kořene, počet buněk v populaci, hmotnost organismu, náchylnost k napadení chorobami, škůdci či parazity, apod.), reprodukční aktivita, malformace a teratogenita. [11, 12, 18]

## **3.3 Metody testování toxicity**

Podstatou ekotoxikologické práce jsou testy toxicity, které sledují reakce určitého organismu s dobře známými projevy, stavbou těla a fyziologií v uměle připraveném prostředí, kdy je vystaven známé koncentraci známé látky nebo neznámému prostředí. Tyto testy slouží ke zjištění či odhadu možného toxického vlivu testovaných látek na živé organizmy. Ekotoxikologické testy jsou nespecifické, to znamená, že zachycují celkové toxické účinky

všech látek přítomných v testovaných vzorcích bez další bližší znalosti jejich složení či chemické struktury. Tato nespecifičnost má své výhody i nevýhody. Hlavní výhodou je rychlé a dostatečně informativní zhodnocení daných vzorků, např. odpadů či látek uvolněných do prostředí v důsledku ekologické havárie. V těchto případech hraje roli především čas a je třeba na prvním místě vědět, zda je daný vzorek toxický či nikoliv. Podrobná chemická analýza je záležitost dlouhodobější a především nákladnější. Provádí se až u vzorků, které vykazují toxické účinky a je tedy opodstatněné se jimi podrobněji zabývat. Zároveň není možné u vzorku obsahujícího více látek odhadnout, natož určit jeho toxické účinky pouze na základě chemického složení. [16, 19]

V současnosti je zaznamenán zvýšený zájem o testování nových a existujících chemikálií reagujících v prostředí. Proto neustále dochází k rozvoji metod testování toxicity v akvatickém i terestrickém prostředí. [20]

### **3.3.1 Ekotoxikologické hodnocení látek na základě testu toxicity**

#### ***3.3.1.1 Předběžný test***

Vzorek o neznámé toxicitě se podrobí první zkoušce s testovacími organizmy. Účelem předběžného testu je zjistit, zda látka toxické účinky vykazuje či nikoliv. Používají se dvě paralelní nasazení se dvěma kontrolami. Pokud nedojde k žádnému úhynu organismu či inhibici růstu kořenů rostlin, je předběžný test hodnocen jako negativní a provádí se ověřovací test. [12, 21]

#### ***3.3.1.2 Ověřovací test***

Ověřovací test se provádí v šesti paralelních nasazeních v případě negativního výsledku předběžného testu. Výsledek se hodnotí jako negativní, pokud nedojde v testovaných roztocích k úhynu, imobilizaci či inhibici převyšující o 10 % úhyn, imobilizaci či inhibici v kontrole. Poté se další testování neprovádí. Pokud je výsledek pozitivní, tj. úhyn, imobilizace nebo inhibice v testovaném vzorku převyší o více než 10 % úhyn, imobilizaci nebo inhibici v kontrole, záleží další postup na míře úhynu, imobilizace nebo inhibici. Jestliže je mortalita nebo inhibice nižší než 50 %, další testy se neprovádějí. V případě, že mortalita nebo inhibice překročí 50 %, provádí se orientační test. [12, 21, 22]

#### ***3.3.1.3 Orientační test***

U tohoto testu je důležité určit rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> (koncentrace látky, která vyvolá 50 % úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu) nebo IC<sub>50</sub> (koncentrace, která způsobí 50 % inhibici účinnosti) testované látky. Nejčastěji se používá deset koncentrací volených v širokém rozpětí. Do každé testované koncentrace se nasazují čtyři organizmy. Celkově se u orientačního testu, oproti jiným, nasazuje menší počet organismů. Účelem je zjistit nejvyšší koncentraci látky, při které ještě nedochází k úhynu či



imobilizaci jedinců (OC0 – orientační koncentrace 0) a nejnižší koncentraci, která již působí letálně (OC100 – orientační koncentrace 100). [11, 21, 22]

### 3.3.1.4 Základní test

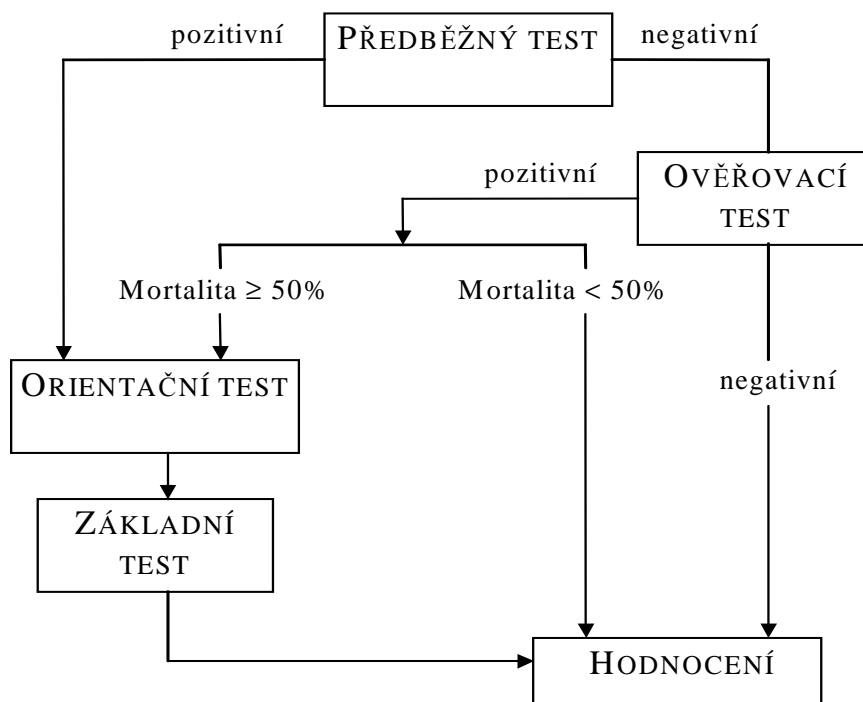
K vlastnímu určení hodnoty LC50, EC50 nebo IC50 slouží základní test. Test se nejčastěji skládá ze sedmi různých koncentrací testované látky v rozmezí stanoveném orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2 – 3 paralelní stanovení. Po 24, 48 nebo 72 hodinách se odečítá počet uhynulých nebo imobilizovaných jedinců nebo se změří délka kořenů rostlin a ze zjištěných údajů se spočítá hodnota LC50, EC50 nebo IC50. V každé testované koncentraci se na začátku i na konci pokusu zaznamenává teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH. [12, 21]

### 3.3.2 Hodnocení výsledků

Výsledek je hodnocen jako negativní, pokud v ověřovacím testu nedojde k překročení 10 % úhynu či imobilizaci nebo je dosaženo 90 % klíčivosti ve srovnání s kontrolou. Hodnotu LC50 či EC50 nelze stanovit, jestliže v ověřovacím testu uhynie méně než 50 % (ale více než 10 %) testovaných organismů.

Výsledek je hodnocen jako pozitivní, pokud testovaná látka způsobí větší než 50 % úhyn, imobilizaci či inhibici.

Výsledkem ekotoxikologické zkoušky je hodnota LC (EC, IC) 50, popř. i doplňkové hodnoty LC (EC, IC) 10, LC (EC, IC) 90, LC (EC, IC) 50/NOEC. [21]



Obr. 1. Schéma postupu při testu toxicity. [21]

### 3.4 Standardní metody testování toxicity

Standardní laboratorní testy akutní toxicity patří mezi nejznámější a nejrozšířenější v laboratorní praxi. Ve světě existuje celá řada ekotoxikologických metodik. Velkou snahou je rozšířit jednotnou metodiku a jednotné hodnocení toxicity látek do všech zemí. Z důvodů porovnatelnosti výpovědní hodnoty jednotlivých testů a použitých organismů, se neprovádí testování látky pouze na jednom typu organismu, ale látka se aplikuje alespoň na tři druhy. Toto paralelní testování se označuje jako základní baterie testů, založené na poznatku o stavbě a propustnosti buněčné stěny u různých organismů, např. destruent, producent a konzument. Baterie testů využívá rozdílného charakteru skladby buněčné stěny bakteriálního, rostlinného a živočišného typu buňky. Nejpoužívanější baterií testů akutní toxicity jsou testy toxicity na řasách (chlorokokální druh *Scenedesmus subspicatus* či *Selenastrum capricornutum*, syn. *Raphidocelis subcapitata*), testy toxicity na semenech (krátkodobý test klíčivosti na semenech hořčice bílé *Sinapis alba*), bezobratlých (testy toxicity na koryšících, např. perloočka *Daphnia magna*) a testy toxicity na rybách (akvarijní rybka *Poecilia reticulata* či *Brachydanio rerio*). [23]

Standardní testy toxicity zaznamenávají velké využití při hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a přípravků, stanovení ekotoxicity odpadů, biologickém testování přítokových a odpadních vod, biologické zkoušce toxicity při haváriích a testování látek s potenciálním dopadem na vodní ekosystémy. [24]

V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří evropské metodiky popsané v normách ISO a OECD (Organization for Economical Cooperation of Development – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj), podle kterých se v České republice identicky provádí čtyři zkoušky akutní toxicity:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN EN 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692; 1989)
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – část 2: Obnovovací metoda
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapsis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů. [3, 25, 26]

#### 3.4.1 Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Po dobu 48 hodin se perloočky vystaví účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Za stejných podmínek se nasadí testovací organizmy do ředící vody bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroluje stav perlooček a zaznamenávají se uhynulí a imobilizovaní jedinci v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Ze získaných hodnot se stanoví střední efektivní koncentrace EC50 v časovém úseku 24 a 48 hodin (24hEC50 a 48hEC50).

Testovacím organismem je *Daphnia magna* (viz obr. 2) ve stáří do 24 hodin nejméně třetí generace.

#### **Platnost testu (validace)**

Výsledky se považují za platné, jestliže koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích na konci testu je větší nebo rovna 2 mg/l, koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace, imobilizace kontrolních organismů je menší nebo rovna 10 % a zjištěná hodnota 24hEC50 dichromanu draselného je v rozsahu od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

#### **Vyhodnocení testu**

Výsledky testu se vyhodnocují graficky s využitím počítačové techniky. [12, 20, 27]



Obr. 2. Testovaný organismus *Daphnia magna*. [24]

#### **3.4.2 Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba***

Vybraná semena hořčice bílé se na dobu 72 hodin vystaví účinkům různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Současně se na stejnou dobu 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. Ze získaných hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, jež způsobí 50 % inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72hIC50). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, výpočet IC50 se neprovádí.

Testovacím organismem jsou přebraná, okrově žlutá, semena hořčice bílé s klíčivostí minimálně 90 % a střední velikosti 1,5 – 2,5 mm.

Výpočet průměrné délky kořene *Sinapis alba*:

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

$n$  je počet semen ve zvolené koncentraci (30)

$L$  je průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm)

$L_i$  je délka  $i$  – tého kořene ve zvolené koncentraci (mm)

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

Výpočet inhibice růstu kořene v testované látce oproti kontrole:

$$I_i = \frac{L_c - L_v}{L_c} \cdot 100, \text{ kde}$$

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

$L_c$  je průměrná délka kořene v kontrole (mm)

$L_v$  je průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

#### Platnost testu (validace)

Výsledky se považují za platné, jestliže je v kontrole dosaženo minimální klíčivosti 90 % a zjištěná hodnota 72hIC50 dichromanu draselného je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

#### Vyhodnocení testu

Výsledky testu se vyhodnocují graficky s využitím počítačové techniky. Základem pro hodnocení inhibičních účinků testované látky na *Sinapis alba* je průměrná délka kořene zjištěná v testovacích miskách ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Semena, která nevyklíčí nebo vyklíčí, ale nevytvoří kořen, se do průměru započítávají jako nulová. Hodnota IC50 se vypočítá pro každé paralelní stanovení zvlášť a výsledná hodnota je průměrem uvedených hodnot. [12, 14, 26, 27]

#### 3.4.3 Test inhibice růstu sladkovodních řas *Raphidocellis subcapitata*

Řasové jednodruhové kmeny se kultivují při teplotě  $25 \pm 2$  °C a kontinuálním osvětlení 6 000 lux v ředící vodě, která obsahuje koncentrační řadu testované látky. Řasy se inkubují po dobu 72 hodin. V době inkubace se v nich jedenkrát za 24 hodin měří hustota buněk a řasová suspenze, která má počáteční koncentraci  $10\,000 \pm 2\,000$  buněk v 1 ml, se minimálně třikrát

denně promíchává. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice, kdy se vyhodnotí 72hIC50, nebo jako stimulace, kdy se výpočet 72hIC50 neprovádí.

Jako testovací organismus je možné použít planktonní sladkovodní řasu *Scenedesmus subspicatus* nebo *Selenastrum capricornutum* (syn. *Raphidocellis subcapitata*).

Řasové inokulum se připraví tak, že se řasová suspenze nechá usadit a horní čirá vrstva roztoku se slije. Tímto způsobem se řasová suspenze zahustí a její hustotu je možné stanovit v Bürkerově počítací komůrce. Řasy je možné počítat v 50 velkých čtvercích, kdy výsledná hodnota se násobí číslem 5 000, nebo ve 100 čtvercích, kdy výsledná hodnota se násobí číslem 2 500. Oběma způsoby se získá počet buněk v 1 ml řasové suspenze.

Výpočet objemu inokula:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}, \text{ kde}$$

$x$  je potřebný objem inokula v ml

$V$  je požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu (počet buněk v 1 ml)

$c$  je množství testovaného roztoku v ml

$a$  je hustota inokulační kultury (počet buněk v 1 ml)

Stanovení hodnoty IC50 pomocí integrálů biomasy:

Výpočet hodnoty IC50 se provádí na základě růstových křivek řasové kultury pro jednotlivé koncentrace, které se porovnají s kontrolou. Inhibici růstu je možné stanovit porovnáním ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a v testovaných vzorcích.

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

$A$  je plocha pod růstovou křivkou

$t_1$  je doba prvního měření od počátku testu (ve dnech)

$t_n$  je doba  $n$  – tého měření od počátku testu (ve dnech)

$N_0$  je jmenovitá počáteční hustota buněk (počet buněk v 1 ml)

$N_1$  je změřená hustota buněk v čase  $t_1$  (počet buněk v 1 ml)

$N_n$  je změřená hustota buněk v době  $t_n$  (počet buněk v 1 ml)

Výpočet inhibice růstu  $I_{Ai}$ :

$$I_{Ai} = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} (\%), \text{ kde}$$

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

$A_i$  je průměrná plocha pro danou koncentraci

$A_c$  je průměrná plocha pro kontrolní vzorek

Stanovení hodnoty IC50 pomocí růstových rychlostí:

Inhibice růstu se také může stanovit porovnáním růstových rychlostí řasové kultury v kontrole a v testovaných vzorcích.

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

$N_n$  je hustota buněk naměřená v závěru testu (počet buněk v 1 ml)

$N_0$  je hustota buněk na počátku testu (počet buněk v 1 ml)

$t_n$  je doba trvání testu (dny)

Výpočet inhibice  $I_i$ :

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

$I_i$  je inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí,  
je – li  $I_i < 0$ , jedná se o stimulaci růstu

$\mu_i$  je růstová rychlost řasové kultury v testované koncentraci

$\mu_c$  je růstová rychlost řasové kultury v kontrole

#### Platnost testu (validace)

Výsledky se považují za platné, jestliže hustota buněk se u kontrolního vzorku zvýší více než šestnáctkrát v průběhu 72 hodin a pH se v kontrolním vzorku nezmění o více než 1,5 jednotky.

#### Vyhodnocení testu

Výsledky testu se vyhodnocují graficky s využitím počítačové techniky. [14, 27]

#### 3.4.4 Test akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

Při tomto testu se ryby vystaví účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě po dobu 48 hodin. Stejným způsobem se nasadí testovací organizmy do ředící vody bez testované látky – kontrola. V průběhu testu se kontroluje stav a chování ryb a odlovují se uhynulí jedinci. V časovém úseku 24 a 48 hodin se zaznamenávají celkové počty uhynulých ryb v jednotlivých koncentracích a v kontrolách. Z těchto hodnot se stanoví střední letální koncentrace LC50 v časovém úseku 24, 48 hodin (24hLC50, 48hLC50). V praxi se tento test obvykle provádí podle normovaných postupů semistatickým

způsobem po dobu 96 hodin s výměnou lázně každých 24 hodin dle ČSN EN ISO 7346 – 2. Je však také možno využívat i metody průtočného testu dle ČSN EN ISO 7346 – 3.

Jako testovací organismus se používá *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) viz obr. 3, která má být k testům akutní toxicity pohlavně diferencovaná, v rozmezí délek těla 15 až 25 mm a ve věku 3 až 4 měsíců. Samice nesmí mít zřetelnou „zárodečnou“ skvrnu. Používají se ryby v přirozeném poměru pohlaví (nejčastěji 1:1), přičemž se ryby do jednotlivých testovacích nádob vybírají náhodně.

Vedle živorodky duhové je možno k testům akutní toxicity použít i další druhy ryb, např. *Brachydanio rerio* (danio pruhované) viz obr. 4. Používají se ryby ve věku 2,5 až 3,5 měsíce a v rozmezí délek těla 25 až 35 mm.

Ryby mají být vybrány z populace jednotného původu, homogenní a dobrého zdravotního stavu. Před testem mají být aklimatizovány nejméně 7 dnů v ředící vodě, při teplotě a osvětlení jako u vlastního testu. Dvacet čtyři hodin před zahájením testu by neměly být ryby již krmeny. K testům toxicity by se neměly používat dlouhodobě vyšlechtěné formy. Po ukončení testu jsou jedinci, kteří přežijí (s výjimkou v kontrolní skupině), usmrceni oxidem uhličitým vyrobeným v sifonové lahvi. Usmrcení je provedeno bezprostředně po ukončení testu osobu způsobilou podle zákona č. 77/2004 Sb., kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

#### Platnost testu (validate)

Výsledky se považují za platné, jestliže koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích a v kontrole během celého testu neklesla pod 60 % nasycení, koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace a mortalita kontrolních ryb nepřekročila 10 % a zjištěná hodnota 24hLC50 standardu je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

#### Vyhodnocení testu

Výsledky testu se vyhodnocují graficky s využitím počítačové techniky. [12, 25, 27]



Obr. 3. Testovaný organismus  
*Poecilia reticulata*. [11]



Obr. 4. Testovaný organismus  
*Brachydanio rerio*. [11]

### 3.5 Testy fytotoxicity

Růstové testy na suchozemských rostlinách vytváří významný ukazatel stupně ekotoxikologického znečištění životního prostředí. Fytotoxicita hodnotí toxicitu a riziko environmentálních škodlivin na rostoucích i stávajících rostlinách. Testy fytotoxicity poskytují informace o vlivu jednotlivých škodlivých látek či jejich směsí v přírodě. Také umožňují posoudit vliv vzájemného působení vnějších a vnitřních faktorů i citlivost jednotlivých rostlinných druhů. Prioritou testů je jejich jednoduchost, flexibilita, materiálová a ekonomická nenáročnost.

Z environmentálního hlediska se fytotesty používají zejména k hodnocení vlivu polutantů na růst rostlin, k hodnocení účinnosti biočisticích technologií, k monitorování průběhu degradace a ke zjištění kvalitativního či kvantitativního zastoupení polutantů a hodnocení jejich vlivu na vegetaci. [12, 28]

I přesto, že následující fytotesty nejsou v ČR standardizovány, jsou v současnosti velmi často i úspěšně využívány. Je možné, že v budoucnu budou tyto testy zařazeny do standardních testů toxicity.

#### 3.5.1 Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Kolonie okřehku se nechají růst při teplotě  $24 \pm 2$  °C po dobu 7 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné v ředící vodě. Za stejných podmínek se kolonie lístků nasadí do ředící vody bez testované látky – kontrola. V testovacích i kontrolních kádinkách s ředící vodou musí být přítomny kolonie okřehku s identickým počtem lístků (9 – 12). Po nasazení se kádinky překryjí potravinářskou fólií a vystaví se kontinuálnímu osvětlení 6 500 – 10 000 lux. Stav rostlin a počet lístků se kontroluje a zaznamenává každých 24 hodin během sedmidenní expozice.

Účelem testu je vyhodnotit účinky látky na vegetativní růst okřehku menšího na základě počtu lístků, rychlosti růstu či na hmotnosti biomasy. Pro kvantifikaci účinků látky se porovnává růst v testovacích vzorcích a kontrol. Výsledkem je určení koncentrace IC50.

Testovacím organismem je okřehek menší *Lemna minor* L. (viz obr. 5), jehož zdravé kolonie jsou tvořeny 2 – 5 lístky.

*Stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí:*

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

$\mu$  je růstová rychlost

$N_n$  je počet lístků v závěru testu

$N_0$  je počet lístků na počátku testu

$t_n$  je doba trvání testu (dny)



Výpočet inhibice růstu  $I_\mu$ :

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

$I_\mu$  je inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí,

je – li  $I_\mu < 0$ , jedná se o stimulaci růstu

$\mu_i$  je růstová rychlost v testované koncentraci

$\mu_c$  je růstová rychlost v kontrole

*Stanovení inhibice růstu porovnáním ploch pod růstovými křivkami:*

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

$A$  je plocha pod růstovou křivkou

$t_1$  je čas prvního odečítání od počátku testu

$t_n$  je čas n – tého odečítání od počátku testu

$N_0$  je počet lístků zjištěný v testované koncentraci nebo v kontrole na začátku testu  $t_0$

$N_1$  je počet lístků zjištěný v testované koncentraci nebo v kontrole v čase  $t_1$

$N_n$  je počet lístků zjištěný v testované koncentraci nebo v kontrole v čase  $t_n$

Výpočet inhibice  $I_A$ :

$$I_{Ai} = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} (\%), \text{ kde}$$

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

$A_c$  je průměrná hodnota plochy pod růstovou křivkou u kontrolního vzorku

$A_i$  je průměrná hodnota plochy pod růstovou křivkou u testovaného vzorku

*Stanovení inhibice růstu porovnáním hmotnosti konečné biomasy:*

$$I_B = \frac{(B_c - B_i) \cdot 100}{B_c} (\%), \text{ kde}$$

$I_B$  je procento produkce biomasy

$B_c$  je konečná biomasa v kontrole

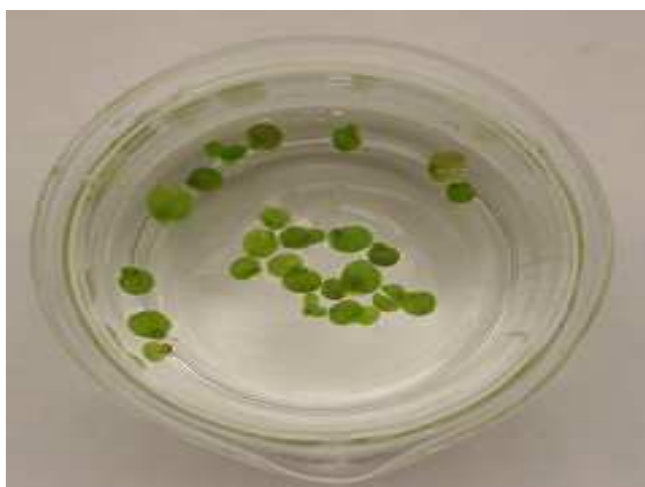
$B_i$  je konečná biomasa u testované koncentrace

### Platnost testu (validace)

Výsledky jsou platné, jestliže průměrný počet lístků v kontrole vzrostl po dobu testu na osminásobek, pH kontrolního vzorku se během testu nezvýší o více než 1,5 jednotky a zjištěná hodnota 168hIC<sub>50</sub> dichromanu draselného je v rozsahu od 10 – 60 mg/l.

### Vyhodnocení testu

Cílem testu je stanovit účinky testované látky na vegetativní růst okřehku, které se určí pomocí rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou nebo množství konečné biomasy. [12, 14, 27]



Obr. 5. Testovaná rostlina *Lemna minor*. [11]

### 3.5.2 Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L.

Malé oloupané cibulky stejné velikosti se při teplotě 20 °C po dobu 48 – 72 hodin nechají kultivovat v různých koncentracích testované látky rozpuštěné v růstovém médiu. Vhodným růstovým médiem je studená vodovodní voda s ověřenou kvalitou, s pH okolo 7 a bez přítomnosti toxických iontů. Každá cibulka musí být položena na hrdlo zkumavky tak, aby kořenová primordia byla ponořena v médiu. Pro každou koncentraci se používá 10 cibulek, ale v případě malého množství testovaných chemikálií nebo vzorku lze použít méně cibulek. Současně se na stejnou dobu nasadí cibulky do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Každých 24 hodin se obmění médium ve zkumavkách se vzorky i s kontrolou. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole změří délka svazku kořenů jednotlivých cibulek. Ze získaných hodnot se pro každou koncentraci a kontrolu vypočítá průměrná délka kořene a určí se koncentrace látky, jež způsobí 50 % inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolou (72hIC<sub>50</sub>). Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, výpočet IC<sub>50</sub> se neprovádí.

Testovacím organismem jsou cibulky cibule *Allium cepa* L. (viz obr. 6) průměrné velikosti 1,5 cm, které nejsou vyschlé ani jinak viditelně poškozené.

## Vyhodnocení testu

Výsledky testu se vyhodnocují graficky s využitím počítačové techniky. [25, 29]



Obr. 6. Testovaná rostlina *Allium cepa* L. [30]

### 3.6 Alternativní metody testování toxicity

Testování toxického účinku chemikálií na jednotlivých organizmech se v současnosti rozšiřuje hlavně proto, aby byl šetřen čas i finanční náklady. Někdy jsou tyto testy označovány jako mikrobiotesty. K testování využívají klidová stádia testovacích organismů (př. vajíčka, cysty), čímž je snadná jejich dostupnost v době potřeby, bez nutnosti ohrožení chovu organismů. Jejich velkou předností je rychlost, jednoduchost a citlivost. K testům je za potřeba malé množství testovaného roztoku, což umožňuje provedení více paralelních testů nebo i jejich opakovatelnost. Výhodné jsou i malé nároky na laboratorní vybavení a prostor. S testem se současně provádí i kontrola, ve které nesmí mortalita přesáhnout 10 %. V kontrole se místo sledované látky použije jen standardní sladká voda.

Mikrobiotesty využívají z jednoduchých organismů prvoky, bičíkovce, bakterie, řasy, klíčky semen rostlin, apod. Dochází k znovuoživení testů na bičíkovcích (*Tetrahymena pyriformis*), ovocných muškách (*Drosophila*), *Daphnia magna*, fosforeskujících bakteriích (*Vibrio fischeri*), na rybkách (*Poecillia* – paví očka) nebo na červech (*Tubifex tubifex* – nitěnky), a další.

Prostřednictvím těchto testů se stanovuje toxicita chemikálií na systémy životního prostředí nebo se využívá ekosystémů k měření bioakumulace a transportu chemikálií a jejich degradačních produktů v různých složkách přírody. Alternativní metody musí pracovat s minimálním počtem organismů.

Mikrobiotesty jsou vhodné pro zhodnocení toxicity kontaminovaného vodního a suchozemského prostředí, odpadních vod a výluhů z pevných odpadů. Některé toxikity se využívají pro detekci biotoxinů ve vodě, která obsahuje sinice (vodní květ) a pro rychlý odhad rizika v kontaminované vodě. Testy toxicity jsou druhově rozdílné, protože žádný druh organismu není shodně citlivý na působení všech chemických látek a přípravků. [10, 14, 31]

### 3.6.1 Toxkity

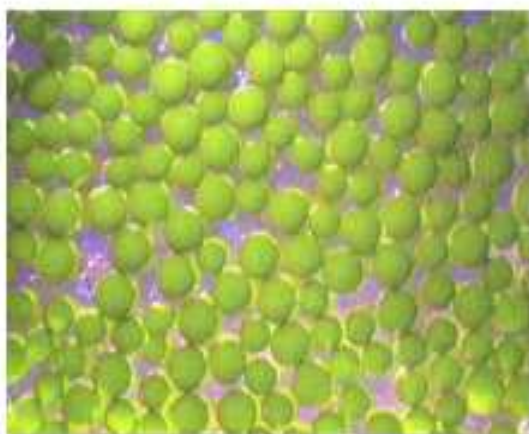
Toxkity jsou celosvětově nejrozšířenější testy toxicity. Přináší s sebou zejména miniaturizaci testu, jednoduchost, dobrou dostupnost, vysokou citlivost a další vlastnosti, které jsou důvodem jejich používání. Testy toxicity „Toxkity“ se provádějí v akvatickém prostředí. Pomocí těchto biotestů je možné hodnotit různé druhy matric (odpadní vody, sedimenty, odpadní vody uvolněné do sladké vody, která ústí do moří nebo odpadní vody, které jsou vypouštěny přímo do moří). Doména, která se udává u každého toxkitu určuje, pro jakou vodu je daný test určen; např. „F“ pro sladkou vodu a „M“ pro vodu slanou, mořskou. [13, 31]

#### 3.6.1.1 Algotoxkit F

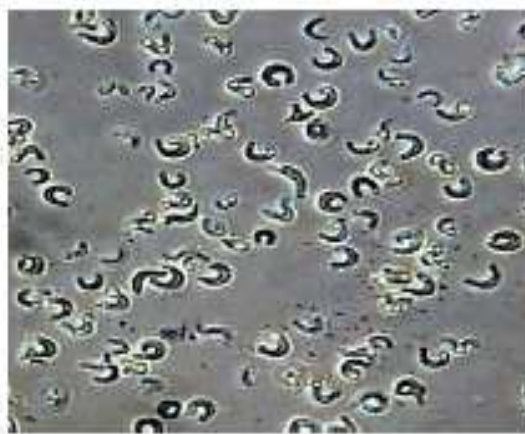
Algotoxkit F je biotest, při kterém se pomocí inhibice růstu testovaného organismu *Selenastrum capricornutum* (viz obr. 7 a 8) stanoví 72hIC50. Využití těchto řas v testech toxicity je velmi výhodné z důvodu jejich rychlého růstu. Před nasazením do testu jsou řasy imobilizovány ve speciálním prostředí, kde jsou schopny přežít i několik měsíců. Deimobilizace se provádí protřepáním a následnou centrifugací při 3 000 otáčkách za minutu po dobu deseti minut.

Vzniklá suspenze řas se poté převede do odměrné baňky o objemu 25 ml a je doplněna kultivačním médiem. Část suspenze se převede do vialky a použije se pro spektrofotometrické stanovení optické hustoty. Obdobný postup se provede i u připravených koncentračních řad připravených vzorků.

Pro spektrofotometrické stanovení optické hustoty je nezbytná třídní inkubace při teplotě 21 – 25 °C. V průběhu inkubace (24, 48 hodin) a po 72 hodinách se stanoví IC50. [31, 32]



Obr. 7. Testovaný organismus *Selenastrum capricornutum* v imobilizované formě. [31]



Obr. 8. Testovaný organismus *Selenastrum capricornutum* v mobilizované formě. [31]

### 3.6.1.2 *Daphnotoxkit F*

*Daphnotoxkit F* patří mezi nejčastěji využívané alternativní testy. Při testu na korýši *Daphnia magna* (viz obr. 9), *Daphnia pulex* nebo *Ceriodaphnia dubia* po 24 a 48 hodin trvajícím testu se stanoví počet mrtvých (LC50) nebo imobilizovaných (EC50) neonatů po expozici testovaným vzorkem.

Daphnie se velmi často používají pro screening působení toxických prostředků na sladkovodní ekosystémy. Vajíčka *Daphnia magna* jsou chráněna chitinovou skořápkou zvanou ephippium, což umožňuje jejich skladování po dlouhou dobu, bez ztráty životaschopnosti. Když jsou ephippia umístěna do specifických životních podmínek, vyvinou se vajíčka během tří dnů v neonaty, které mohou být přímo použity pro testování. Kultivace vajíček *Daphnia magna* se provádí při teplotě 20 – 22 °C, při osvětlení 6 000 lux a v časovém intervalu 72 – 80 hodin. Neonaty jsou vyživovány až do doby použití v testu, při němž již krmení nepokračuje. Pro tento účel se nejčastěji používají lyofilizované řasy *Spirulina microalgae*. [31, 33]



Obr. 9. Testovaný organizmu *Daphnia magna*. [31]

### 3.6.1.3 *Rotokit F*

Tento test byl vyvinut dvěma výzkumnými týmy pracujícími na dvou pracovištích, a to týmem Prof. Dr. Persoona na Státní Gentské Univerzitě a týmem Prof. Dr. T. W. Snella na univerzitě v Tampě na Floridě. Jako testovací organizmus se pro tento typ testu běžně používá vířník *Brachionus calicyflorus* (viz obr. 10) vylíhlý z cyst. Tyto cysty je nutno uskladňovat v ampulích k tomu určených, a to při teplotě okolo 4 °C. Před provedením testu je nezbytné cysty oživit v inkubátoru při teplotě 25 °C za kontinuálního osvětlení, po dobu 16 – 18 hodin. Oživení vířníci se poté podrobí testu toxicity na připravené koncentrační řadě testovaného vzorku. Biotest se provádí v temnu při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin, po ukončení inkubace se zjistí úmrtnost a hodnota LC50. [24, 31, 34]

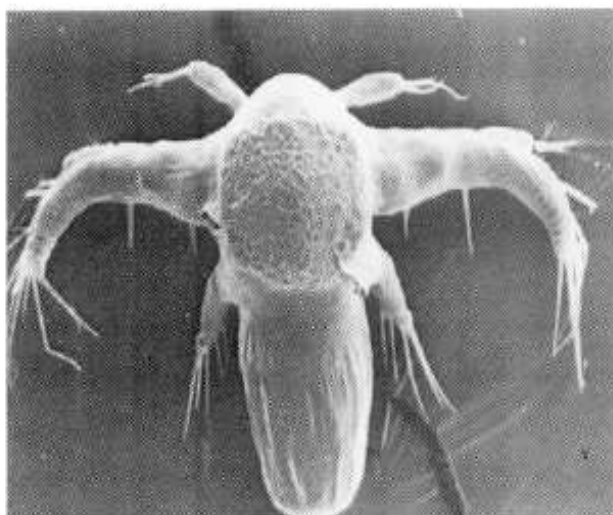


Obr. 10. Testovaný organizmu *Brachionus calicyflorus*. [35]

#### 3.6.1.4 *Thamnotoxkit F*

Jedná se o alternativní biotest, který je v mnohém podobný testu Rotoxkit F. Podobně jako u Rotoxkit F vyvinul tento alternativní test výzkumný tým Prof. Dr. Persoona; pomocí tohoto testu se stanovuje 24hLC50. Testovacím organizmem jsou v tomto případě larvy sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* (viz obr. 11), které jsou vylíhly z cyst. Inkubace probíhá v časovém intervalu 20 – 22 hodin při teplotě 25 °C, za kontinuálního osvětlení.

Tyto testy slouží k prověřování toxicity směsí chemických látek, průmyslových odpadních vod, sedimentů, povrchové a podzemní vody a biotoxinů. [24, 31, 36]



Obr. 11. Testovaný organizmu *Thamnocephalus platyurus*. [31]



### 3.6.2 Vyhodnocení alternativních testů a interpretace výsledků

Testy se vyhodnocují graficky. Počet mrtvých jedinců se vyjádří v procentech a nanese se na osu  $y$ . Na ose  $x$  jsou logaritmy koncentrací ( $\log c$ ). Získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, body se proloží přímkou (rovnice lineární regrese) nebo se rovnice lineární regrese vypočítá metodou nejmenších čtverců. Z rovnice lineární regrese se vypočítá hodnota letální koncentrace LC50 a to tak, že za hodnotu  $y$  v rovnici se dosadí hodnota odpovídající 50 % mortalitě, tj. hodnota 0,5 a z rovnice se vypočítá logaritmus koncentrace  $x$ . Zpětným odlogaritmováním se získá koncentrace látky v mg/l, při které dochází k 50 % úmrtnosti testovaných organismů. [31]

### 3.7 Související legislativní předpisy

Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů, se zabývá nebezpečnými vlastnostmi chemických látek a chemických přípravků a způsobem zajištění ochrany zdraví i životního prostředí před škodlivými účinky těchto látek. Nebezpečné látky nebo přípravky jsou látky nebo přípravky, které za podmínek stanovených tímto zákonem mají jednu nebo více nebezpečných vlastností. Řadu nebezpečných vlastností mohou obsahovat i některé monomery, které při vstupu do životního prostředí způsobí nebo mohou způsobit okamžité nebo opožděné nebezpečí pro jednu či více složek životního prostředí. Nebezpečné látky nebo přípravky musí být v souladu s tímto zákonem opatřeny bezpečnostním listem. Bezpečnostní list obsahuje identifikační údaje o výrobcu nebo dovozci, údaje o nebezpečné látce nebo přípravku a údaje potřebné pro ochranu zdraví a životního prostředí. Podle tohoto zákona lze testované látky charakterizovat z hlediska jejich rizikovitosti tzv. R-věťami (standardní věty označující specifickou rizikovost):

- R 50 Vysoce toxické pro vodní organismy  $LC_{50} (EC_{50}, IC_{50}) \leq 1 \text{ mg/l}$
- R 51 Toxické pro vodní organismy  $1 \text{ mg/l} < LC_{50} (EC_{50}, IC_{50}) \leq 10 \text{ mg/l}$
- R 52 Škodlivé pro vodní organismy  $10 \text{ mg/l} < LC_{50} (EC_{50}, IC_{50}) \leq 100 \text{ mg/l}$

Rozhodující pro zařazení látky do třídy toxicity je zjištěná hodnota LC50 (EC50, IC50) pro nejcitlivější druh z testovacích organismů. [3]

Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků, mimo jiné klasifikuje chemické látky na základě účinků na životní prostředí. Látky nebo přípravky klasifikované jako nebezpečné musí být opatřeny obalem a označeny tak, aby vyhovovaly podmínkám stanoveným touto vyhláškou (např. chemický název látky, výstražné symboly a písemná označení nebezpečných vlastností, R-věty, standardní pokyny pro bezpečné zacházení (S-věty), atd.). [37]

Okolo roku 2000 se na trhu EU vyskytovalo necelých 3 000 nových látek s prověřeným rizikem a více než 30 000 již existujících látek, u kterých nebylo riziko komplexně prověřeno. Tato zcela nevyhovující situace je řešena nařízením REACH. Je to nařízení o registraci,

hodnocení, povolování a omezování chemických látek, které vstoupilo v platnost 1.června 2007; v podstatě se REACH vztahuje na všechny chemické látky, a to jak na chemické látky používané v průmyslových procesech, tak i na ty, které se využívají v domácnostech, např. čisticí prostředky, nátěrové hmoty, atd.

REACH nahrazuje přibližně 40 právních předpisů jedním zmodernizovaným a zdokonaleným legislativním nařízením. Toto nařízení přenáší většinu odpovědnosti za kontrolu rizik, které chemické látky mohou představovat, a za poskytování bezpečnostních informací uživatelům. REACH také předpokládá systém povolování, který má zajistit, aby se látky vzbuzující mimořádné obavy systematicky kontrolovaly a postupně se nahrazovaly bezpečnějšími látkami. Výrobci a dovozci musí uživatelům poskytnout informace o všech rizicích chemických látek, aby mohly být bezpečně používány. Do třinácti let od uvedení v platnosti nařízení REACH by měly být vyráběny a používány pouze ty látky, které budou mít známé vlastnosti bezpečně ověřeny, např. ekotoxicky a bezpečnostně zajištěny. [4, 38, 39]

Vyhláška č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů ve znění pozdějších předpisů, hodnotí odpad jako odpad nebezpečný, jestliže je překročeno jedno z kritérií pro nebezpečné vlastnosti odpadů. Tyto nebezpečné vlastnosti odpadů jsou označovány jako H1 – H14. Poslední nebezpečnou vlastností je ekotoxicita (H14). Výsledky testů ekotoxicity na určených testovacích organizmech slouží k zařazení odpadů do tříd vyluhovatelnosti podle vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění pozdějších předpisů. [5, 26, 40]

### 3.8 Polymery

Velmi využívanými a důležitými materiály současnosti jsou polymery. Polymery jsou chemické látky obsahující ve svých velkých molekulách většinou atomy uhlíku, vodíku, kyslíku, často i dusíku, chloru a jiných prvků. V určitém stádiu zpracování se polymery nachází v kapalném stavu, který mu dovoluje, většinou za zvýšené teploty a tlaku, vymodelovat tvar pro konečný stav. Vzniklý polymer již bývá ve stavu tuhém.

Synonymem k pojmu polymer je pojem makromolekulární látka. Základní stavební částice polymerů se tedy nazývají makromolekuly. Vznikají spojováním molekul nízkomolekulárních látek tzv. monomerních jednotek chemickými vazbami. Podle typu makromolekul je možné polymery dělit na:

- lineární (tvořené nerozvětvenými makromolekulami)
- větvené (tvořené makromolekulami, u nichž jsou na hlavním řetězci navázány různě dlouhé postranní řetězce)
- síťované (tvořené z makromolekul navzájem spojených příčnými vazbami).

Polymery se také kromě typu makromolekul liší velikostí, molekulovou hmotností, chemickým složením a mnoha dalšími faktory. [41, 42]



## Základní klasifikace polymerů

Polymery se z hlediska svého chování za běžné a zvýšené teploty dělí na:

- elastomery
- plasty.

Elastomery jsou polymery s vysoce elastickou vlastností. Malým napětím značně deformují, ale po uvolnění napětí se rychle nebo pomalu vrací do původního tvaru. Do této skupiny jsou převážně řazeny přírodní a syntetické kaučuky.

Plasty jsou polymery většinou tvrdé často i křehké, ale při zvýšené teplotě se stávají plastickými a tvarovatelnými. Plasty se dále dělí na:

- termoplasty (vratná změna z plastického stavu do tuhého stavu)
- reaktoplasty (nevratná změna z plastického stavu do tuhého). [41, 42]

## Použití polymerů

Obrovská rozmanitost vlastností polymerů sebou přináší i široký rozsah použití. Využití makromolekul se projevuje např. v oblasti technické výroby, spotřebního zboží, k výrobě lisovacích hmot, lehčených hmot, nátěrových hmot či prostředků pro úpravu papíru, textilu, dřeva, kůže, atd. [41]

### 3.8.1 Monomery

Výchozí nízkomolekulární sloučeniny, které jsou stavebními jednotkami polymerního řetězce, se nazývají monomery. Monomer je možné označit za sloučeninu skládající se z molekul, z nichž každá může poskytnout jednu nebo více monomerních jednotek. U některých polymerů může být stavební a strukturní jednotka shodná. Vývoj produkce monomerů je úzce spjat s výrobou polymerů, jejich aplikací a v neposlední řadě souvisí s celkovou úrovní chemických technologií. [43, 44, 45]

## Rozdělení monomerů

Dělení monomerů se provádí podle různých hledisek, a to podle:

- klasifikace organické sloučeniny
- převládajícího použití připravených polymerů (př. pryskyřice, elastomery, aj.)
- způsobu výroby
- iniciace polymerizace, atd. [43]

Monomery mohou být také rozděleny podle polariry na:

- monomery nerozpustné ve vodě (styren, butadien, vyšší akryláty a methakryláty)
- monomery částečně rozpustné ve vodě, jejichž polymery jsou ve vodě nerozpustné (akrylonitril, methylmethakrylát)
- monomery částečně rozpustné ve vodě, jejichž polymery mají hydrofilní charakter (vinylacetát)
- monomery, které jsou zcela rozpustné ve vodě a jejichž polymery a kopolymery jsou ve vodě buď také rozpustné, nebo v ní bobtnají (akrylová a methakrylová kyselina). [44]

Mezi nejvhodnější rozdělení monomerů patří dělení podle procesu řetězení, které vede ke vzniku polymerů. [43]

### Využití monomerů

Nízkomolekulární látky, monomery, jsou výchozí látky používané k výrobě makromolekulárních látek tzv. polymerů. K výrobě polymerů je nutné, aby molekuly monomeru byly schopné vytvořit se sousedními molekulami příslušný počet chemických vazeb. Molekuly výchozích monomerů obsahující funkční skupiny mohou být z hlediska jejich reakcí při syntéze makromolekuly jedno-, dvoj-, troj-, čtyř- i vícefunkční. Pod pojmem funkční skupina se rozumí např. aktivní atom vodíku, skupiny – OH, – NH<sub>2</sub>, – COOH, – SH, atd. Základním předpokladem a podmínkou pro vznik makromolekuly je existence nejméně dvou vhodných funkčních skupin v molekule monomeru; funkčnost monomeru musí být proto 2 nebo vyšší. Nejjednodušší makromolekuly s lineárním řetězcem jsou tvořeny monomery dvojfunkčními. Pokud jsou při syntéze použity monomery vyšší než dvojfunkční, vznikají makromolekuly s větvenou strukturou, případně trojrozměrné polymerní sítě. [43, 44, 45]

Problémem bývají odpady z výroby polymerů. Ty obsahují polyfunkční reagující monomery, z nichž mnohé jsou nebezpečné; např. formaldehyd a styren. Uvolňují plynné emise znečištěné nebezpečnými těkavými monomery, ale zejména reakčními zbytky s obsahem monomerů, polymerů, rozpouštědel, emulgátorů a dalších nečistot. Jiné odpady mohou představovat znečištěné monomery či kaly ze zpracování reakčních směsí s obsahem těžkých kovů a pigmenty. [46]

### 3.8.2 Aditiva polymerů

Aditiva (přísky) jsou látky přidávané k polymerům za účelem úpravy jejich vlastností. Používání samotných tzv. čistých polymerů se v podstatě nevyužívá. Na výrobky z polymerů jsou kladeny tak různorodé požadavky, že je nutné je ještě upravovat pomocí dalších látek – přísad, které spolu s nimi tvoří polymerní směsi. [41]

### **Zvláštní aditiva – odolná vůči biologickým činitelům**

Do skupiny zvláštních aditiv se zařazují takové přísady, které dávají polymerním materiálům specifické vlastnosti. Přidávají se pouze do některých směsí, a to v různých dávkách.

Aditiva odolná vůči biologickým činitelům jsou novou skupinou přísad, která poskytuje ochranu proti plísním, houbám a bakteriálnímu růstu na povrchu polymerů. Rozhodujícím faktorem možnosti napadení polymerního materiálu mikroorganismy je jeho chemické složení.

U všech dosud známých aditiv je vyžadována registrace v mezinárodní organizaci US – EPA (United States Environmental Protection Agency – Americká agentura ochrany životního prostředí). [41, 47]

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem zadané diplomové práce bylo ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů, případně aditiv polymerů, která byla cíleně vyrobena v laboratoři na Ústavu chemie materiálů VUT v Brně. Pro účely tohoto ekotoxikologického hodnocení byly zvoleny dva alternativní testy, a to Thamnotoxkit F na testovacím organismu *Thamnocephalus platyurus* a Daphnotoxkit F na testovacím organismu *Daphnia magna* a dva fytotesty, test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*, který je standardním testem fytotoxicity a test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* patří mezi testy alternativní. Na základě výsledků těchto testů byla porovnána ekotoxicita testovaných látek.

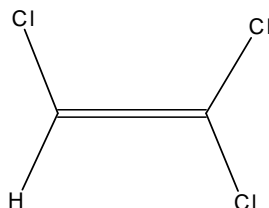
Vybrané monomery byly v kapalném stavu o koncentraci 5 g/l rozpuštěné v methanolu. Všechna vybraná aditiva byla v pevném stavu, a proto byla převedena do roztoku o koncentraci 1 g/l v příslušném rozpouštědle (např. destilovaná voda nebo standardně sladká voda pro příslušný organismus). Pro testování byly vybrány následující látky:

monomery	aditiva polymerů
1,1,2-trichlorethylen	2-Br-5-Cl-pyridin
1,1,2,2-tetrachlorethylen	2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid
	sodná sůl 2-merkpto-5-Cl-pyridin-N-oxidu

### Stručná charakteristika jednotlivých látek

#### *Trichlorethylen*

Trichlorethylen (1,1,2-trichlorethylen, trichlorethen, TCE) je bezbarvá viskóznější kapalina s nasládlým zápachem podobným chloroformu. Jedná se o látku těkavou a mírně hořlavou. Rozpouští se dobře v organických rozpouštědlech (ether, chloroform, aceton). Zařazuje se do skupiny těkavých organických látek (VOC – volatile organic compounds). Strukturu molekuly této látky znázorňuje obr. 12.



Obr. 12. Struktura molekuly trichlorethylenu.

teplota varu (°C)	teplota tání (°C)	rozpustnost ve vodě při 25°C (g/l)	hustota (kg/m <sup>3</sup> )
87,2	84,7	1,1	1465

Trichlorethylen je stabilní, nekorozivní a je velmi dobrým rozpouštědlem, proto byl nejvíce využíván jako odmašťovací činidlo. V současnosti se uplatňuje v průmyslovém odmašťování

kovových výrobků, jako přísada v některých lepidlech, pro syntézy v chemickém průmyslu, jako surovina pro výrobu hydrochlorofluorouhlovodíků (HCFC) a jako rozpouštědlo pro různé výrobky.

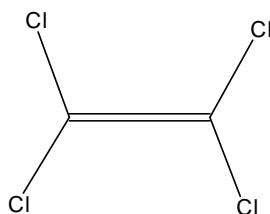
Jedná se o syntetickou látku užívanou a vyrobenou člověkem, a proto její přirozené zdroje emisí neexistují. Antropogenním zdrojem emisí trichlorethylenu mohou být úniky při jeho výrobě nebo úniky spojené s jeho transportem nebo manipulací. Stopová množství této chemikálie se mohou dostat do životního prostředí při neodborné likvidaci autovraků. Výjimečně lze trichlorethylen nalézt v odpadních olejích a v některých součástech motorových vozidel.

Tato látka může ohrožovat životní prostředí, ale v naprosté většině případů se vyskytuje pouze ve velmi nízkých koncentracích, avšak na mnoha územích. Nebylo dokázáno, že by se trichlorethylen významným způsobem biokoncentroval v rostlinách a živočišných organizmech. Pokud se trichlorethylen dostane do povrchových vod, velice rychle se odpaří do ovzduší. V půdě se může sorbovat na přítomné částice a setrvat zde relativně dlouho. V životním prostředí se převážná část trichlorethylenu nachází ve formě par v ovzduší, kde může reagovat s dalšími látkami a takto přispívat ke tvorbě škodlivého přízemního ozónu.

Na základě uvedených vlastností trichlorethylenu je pravděpodobné, že tato látka nevykazuje globální negativní dopady na životní prostředí. [48, 50]

### ***Tetrachlorethylen***

Tetrachlorethylen (1,1,2,2-tetrachlorethylen, perchlorethylen, PCE) je bezbarvá nehořlavá kapalina nasládlé vůně. Jedná se o látku velmi těkavou, a proto se zařazuje do skupiny těkavých organických látek (VOC). Struktura molekuly této látky je znázorněna na obr. 13.



*Obr. 13. Struktura molekuly tetrachlorethylenu.*

teplota varu (°C)	teplota tání (°C)	rozpustnost ve vodě při 25°C (mg/l)	hustota (kg/m <sup>3</sup> )
121,3	-22,3	150	1623

Tetrachlorethylen se používá jako čisticí prostředek, rozpouštědlo nebo jako extrakční činidlo pro tuky, pryskyřice, oleje, vosky atd. Ve stopových množstvích může být také nalezen ve spotřebitelském zboží jako jsou inkousty do tiskáren, lepidla, nosiče barev a silikonová maziva. Výhodné vlastnosti tetrachlorethylenu lze ovšem plně využít jen v technologicky dokonalém zařízení a při dodržení aplikačních postupů.

Jedná se o syntetickou látku užívanou a vyrobenou člověkem, proto její přirozené zdroje emisí neexistují. Tetrachlorethylen může být vzhledem ke své těkavosti uvolňován všude tam,

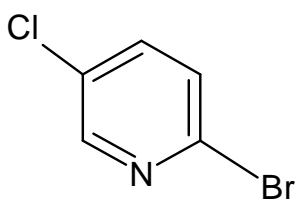
kde se používá a kde není zcela dokonale zajištěna recirkulace vznikajících par. Jedná se především o úniky při chemickém čištění oděvů, při průmyslové výrobě tetrachlorethylenu nebo o emise pocházející ze skládek odpadů.

Pokud se tetrachlorethylen dostane do vody nebo půdy, má snahu se rychle odpařit do ovzduší. V půdě může být přítomen ve formě volné fáze, nebo rozpuštěný ve vodě, kde může být pomalu odbouráván přítomnými organizmy.

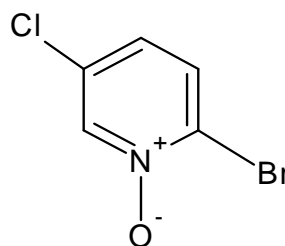
Tetrachlorethylen nejeví sklony k bioakumulaci v rybách ani jiných živočišných organizmech, a proto se nepředpokládá, že by tato látka měla výraznější globální dopady na životní prostředí. [49, 50]

### ***Aditiva polymerů***

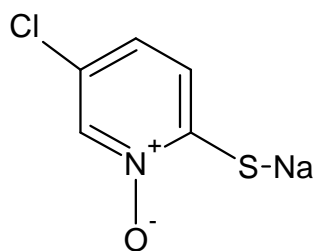
Testované látky je možné zařadit do skupiny aditiv odolných vůči působení biologických činitelů. Všechny tři látky patří k prekurzorům fungicidních a mikrobiálních činidel. Vlastnosti jednotlivých látek nejsou uvedeny, protože byly syntetizovány na Ústavu chemie materiálů FCH VUT v Brně a jejich charakterizace není dosud dokončena. Struktura molekuly 2-Br-5-Cl-pyridinu je znázorněna na obr. 14; struktura molekuly 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxidu na obr. 15. a struktura molekuly sodné soli 2-merkpto-5-Cl-pyridin-N-oxidu na obr. 16.



*Obr. 14. Struktura molekuly 2-Br-5-Cl-pyridinu.*



*Obr. 15. Struktura molekuly 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxidu.*



*Obr. 16. Struktura molekuly sodné soli 2-merkpto-5-Cl-pyridin-N-oxidu.*

## 4.1 Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

### Příprava ředící vody

Nejprve byly připraveny čtyři zásobní roztoky. Na analytických vahách bylo naváženo 11,76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněno destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byly připraveny další roztoky, ve kterých byly rozpuštěny navážky 4,93 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  a 0,23 g  $\text{KCl}$ . Na 1 litr ředící vody bylo nadávkováno 25 ml každého zásobního roztoku. Takto připravená ředící voda byla 24 hodin sycena vzdušným kyslíkem, poté nechána 24 hodin odstát a nakonec byla zkontrolována hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí  $7,8 \pm 0,2$ . V případě jiné hodnoty je nutno pH upravit roztokem 1 mol/l  $\text{NaOH}$  nebo 1 mol/l  $\text{HCl}$ . [27]

### Provedení testu

Pro testování monomerních látek byly k nasazení předběžného testu připraveny roztoky o koncentracích 0, 20, 40, 60, 80 a 100 mg/l. K přípravě roztoku o koncentraci 100 mg/l testované látky byl odebrán 1 ml roztoku o koncentraci 5 g/l testované látky a doplněn ředící vodou do 50 ml. Ostatní roztoky byly připraveny následovně:

- 20 mg/l – odebráno 2 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 10 ml
- 40 mg/l – odebráno 4 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 10 ml
- 60 mg/l – odebráno 6 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 10 ml
- 80 mg/l – odebráno 8 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 10 ml

Pro testování aditivních látek byly k nasazení předběžného testu připraveny roztoky o koncentracích 0, 20, 40, 60, 80, 100, 160 a 320 mg/l. K přípravě roztoku o koncentraci 20 mg/l testované látky bylo odebráno 0,5 ml roztoku o koncentraci 1 g/l testované látky a doplněno ředící vodou do 25 ml. Obdobným způsobem byly připraveny další roztoky:

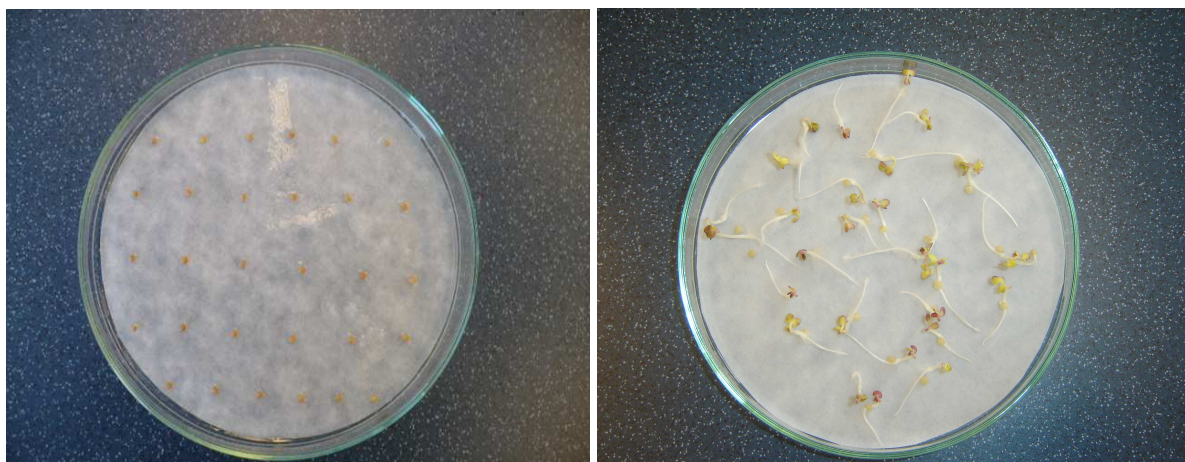
- 40 mg/l – odebrán 1 ml a doplněno do 25 ml
- 60 mg/l – odebráno 1,5 ml a doplněno do 25 ml
- 80 mg/l – odebráno 2 ml a doplněno do 25 ml
- 100 mg/l – odebráno 2,5 ml a doplněno do 25 ml
- 160 mg/l – odebráno 4 ml a doplněno do 25 ml
- 320 mg/l – odebráno 8 ml a doplněno do 25 ml

Na dno Petriho misky o průměru 120 až 140 mm byl vložen filtrační papír, na který bylo napipetováno 5 ml příslušného roztoku (filtrační papír byl vlhký, ale nestála na něm voda). Na takto připravený filtrační papír byla pinzetou pokládána přebraná semena hořčice bílé, v šesti řadách po pěti semenech, viz obr. 17; misky byly přikryty víčkem a vloženy do temného inkubátoru o teplotě  $20 \pm 2$  °C. Všechny testované roztoky byly připraveny paralelně, kromě roztoku o koncentraci 0 mg/l. [27]

Na základě výsledků předběžného testu byla následně připravena individuální série koncentrací pro každou testovanou látku (základní test).

## Vyhodnocení testu

Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z temného inkubátoru a u jednotlivých vyklíčených semen byla změřena délka kořene s přesností na 1 mm. Vyklíčená semena po inkubaci znázorňuje obr. 18. Z průměrných délek kořenů byla následně vypočítána hodnota 72hIC50. [27]



Obr. 17. Semena hořčice bílé při nasazení. Obr. 18. Semena hořčice bílé po 72 hodinách.

## 4.2 Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L.

### Růstové médium

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

### Provedení testu

Pro nasazení testu byly připraveny roztoky o koncentracích 0; 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l každé testované látky. K přípravě roztoku o koncentraci 100 mg/l testované látky byly odebrány 2 ml roztoku o koncentraci 5 g/l testované látky a doplněny růstovým médiem na objem 100 ml. Ostatní roztoky byly připraveny následovně:

- 10 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 100 ml
- 1 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 10 mg/l a doplněno do 100 ml
- 0,1 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 1 mg/l a doplněno do 100 ml
- 0,01 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 0,1 mg/l a doplněno do 100 ml

Roztoky pro aditivní látky byly připraveny stejným způsobem jen s tím rozdílem, že výchozí roztok byl o koncentraci 1 g/l.



Veškeré vnější slupky cibulek byly odstraněny tak, aby nebyla poškozena jejich kořenová primordia. Takto očištěné cibulky byly ponechány 24 hodin v nádobě s vodou. Poté byly cibulky vytaženy z nádoby, osušeny jemným papírem a položeny na hrdlo zkumavky s testovanými roztoky tak, aby kořenová primordia byla ponořena v médiu. Pro všechny testované roztoky bylo použito 7 cibulek, kromě roztoku o koncentraci 0 mg/l, kde byly použity pouze 2 cibulky. Takto připravené cibulky byly ponechány při laboratorní teplotě bez přímého slunečního záření po dobu 72 hodin (viz obr. 19). Po 24 hodinách byly roztoky ve zkumavkách doplňovány. [29]

Na základě výsledků předběžného testu byla následně připravena individuální série koncentrací pro každou testovanou látku (základní test).

### Vyhodnocení testu

Po 72 hodinách byla změřena délka kořenových svazků v každém testovaném roztoku. Z průměrných délek kořenů byla následně vypočítána hodnota 72hIC<sub>50</sub>. [29]



*Obr. 19. Test na cibuli po 72 hodinách.*

## 4.3 Thamnotoxkit F

### Příprava standardní sladké vody

Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna cca 800 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule s koncentrovaným sodným roztokem označena číslem 1 ( $\text{NaHCO}_3$ ) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi obsahujícími koncentrované roztoky, tj. dvě ampule označené číslem 2 ( $\text{CaSO}_4$ ), jedna ampule s číslem 3 ( $\text{MgSO}_4$ ) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Toto pořadí bylo dodrženo. Nakonec byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a promíchána.

Standardní sladká voda slouží dále jako médium pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu série roztoků toxikantů. Před jejím použitím pro inkubaci cyst a před přípravou roztoků toxikantů musí být 15 minut provzdušňována. Standardní sladká voda byla uchovávána v ledničce při teplotě maximálně 4°C. [31, 36]

### **Inkubace cyst *Thamnocephalus platyurus***

Inkubace cyst byla započata 24 hodin před začátkem testování a provádí se ve zředěné standardní sladké vodě.

Zředěná standardní sladká voda byla připravena smícháním 17,5 ml destilované vody s 2,5 ml standardní sladké vody. Trubička s cystami byla naplněna zředěnou standardní sladkou vodou (1 ml) a byla 30 minut protřepávána. Poté byly cysty kvantitativně přeneseny do malé Petriho misky, kam bylo přidáno 10 ml zředěné standardní sladké vody. Cysty se nechaly inkubovat při 25 °C po dobu 20 – 22 hodin za kontinuálního osvětlení (3 000 – 4 000 lux). [31, 36]

### **Příprava roztoků toxikantů**

Pro nasazení předběžného testu byla připravena série koncentrací 0, 0,01, 0,1, 1, 10 a 100 mg/l každé testované látky. K přípravě roztoku o koncentraci 100 mg/l testované látky bylo odebráno 0,2 ml roztoku o koncentraci 5 g/l testované látky a doplněno standardní sladkou vodou do 10 ml. Ostatní roztoky byly připraveny následovně:

- 10 mg/l – odebrán 1 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 10 ml
- 1 mg/l – odebrán 1 ml z roztoku o koncentraci 10 mg/l a doplněno do 10 ml
- 0,1 mg/l – odebrán 1 ml z roztoku o koncentraci 1 mg/l a doplněno do 10 ml
- 0,01 mg/l – odebrán 1 ml z roztoku o koncentraci 0,1 mg/l a doplněno do 10 ml

Roztoky pro testování aditivních látek byly připraveny stejným způsobem, pouze s takovým rozdílem, že výchozí roztok byl o koncentraci 1 g/l.

Na základě výsledků předběžného testu byla následně připravena individuální série koncentrací pro každou testovanou látku (základní test).

### **Plnění testovací desky**

Šachty jsou označeny 1 až 6 horizontálně a A až D vertikálně. Přenos testovaných roztoků byl vždy prováděn směrem od kontroly (první sloupec vlevo) k nejvyšší koncentraci (šestý sloupec vpravo).

Do každé šachty sloupce 1 (šachty A1, B1, C1 a D1) byl napipetován 1 ml standardní sladké vody (kontrola), do každé šachty v sloupci 2 (šachty A2, B2, C2 a D2) byl přenesen 1 ml ze zkumavky 5 (nejnižší koncentrace). Tento postup byl opakován se zkumavkami 4, 3, 2 a 1 k naplnění šachet sloupců 3, 4, 5 a 6. Každá zkumavka s roztoky byla vždy před napipetováním intenzivně protřepána. Ukázka testovací desky je znázorněna na obr. 20. [31, 36]

### Přenos larev do testovacích šachet

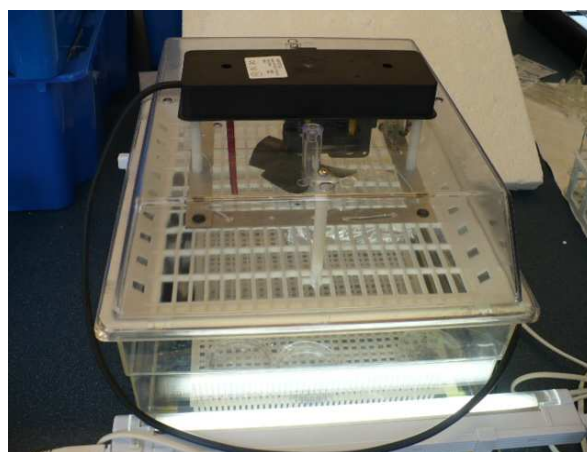
Ke shromáždění larev byla Petriho miska vyjmuta z inkubátoru asi 5 minut před nanesením do šachet. Následující kroky byly prováděny pod mikroskopem, při zvětšení 10 – 12x. Pomocí mikropipety bylo přeneseno nejméně 30 larev z Petriho misky do každé mycí šachty v řádku D v pořadí D1 až D6 (s rostoucí koncentrací toxikantu). Snahou bylo přenést co nejméně kapaliny, aby nedošlo k naředění jednotlivých koncentrací. Z mycí šachty D1 bylo do ostatních šachet v sloupci (A1, B1 a C1) přeneseno 10 larev. Tento přenos byl následně zopakován pro sloupce 2, 3, 4, 5 a 6 v tomto pořadí. Nakonec byla přiložena parafilmová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla obalena alobalem (inkubace probíhá v temnu) a vložena do inkubátoru (viz obr. 21) o teplotě 25°C na dobu 24 hodin. [31,36]

### Vyhodnocení testu

Po 24 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a ve všech šachtách v řádcích A, B i C byl zjištěn počet mrtvých a živých larev. Larvy byly považovány za mrtvé, pokud během 10 sekund pozorování nevykazovaly žádný pohyb. Pokud by kontrola přesáhla 10 % mortalitu, je biotest považován za chybný a je nutno ho opakovat. Ze získaných výsledků se vypočítalo procento úmrtnosti a zjistila se hodnota 24hLC50. [31, 36]



Obr. 20. Testovací deska.



Obr. 21. Inkubátor.

## 4.4 Daphnotoxkit F

### Příprava standardní sladké vody

Dvoulitrová odměrná baňka byl naplněna asi 1 000 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule označená číslem 1 obsahující koncentrovaný sodný roztok  $\text{NaHCO}_3$  a její obsah byl převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi s koncentrovanými roztoky, tj. jedna ampule označená číslem 2 ( $\text{CaCl}_2$ ), jedna ampule s číslem 3 ( $\text{MgSO}_4$ ) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Toto pořadí bylo dodrženo. Nakonec byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a promíchána.

Standardní sladká voda slouží jako médium pro inkubaci ehippií a pro přípravu série roztoků toxikantů. Před jejím použitím pro inkubaci ehippií a před přípravou roztoků toxikantů musí být 15 minut provzdušňována. Standardní sladká voda byla uchovávána v ledničce. [31, 33]

### Inkubace ehippií *Daphnia magna*

Inkubace ehippií byla započata 3 dny před začátkem testů toxicity. Ehippia byla z ampule kvantitativně převedena na mikrosítka a byla důkladně promyta vodovodní vodou. V 15 ml provzdušněné standardní sladké vodě byla ehippia přenesena na inkubační Petriho misku a takto se inkubovala 72 hodin při 20 – 22°C za kontinuálního osvětlení 6 000 lux. [31, 33]

### Příprava roztoků toxikantů

Pro nasazení předběžného testu byla připravena série koncentrací 0; 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l každé testované látky. K přípravě roztoku o koncentraci 100 mg/l testované látky byly odebrány 2 ml roztoku o koncentraci 5 g/l testované látky a doplněny standardní sladkou vodou do 100 ml. Ostatní roztoky byly připraveny následovně:

- 10 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 100 mg/l a doplněno do 100 ml
- 1 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 10 mg/l a doplněno do 100 ml
- 0,1 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 1 mg/l a doplněno do 100 ml
- 0,01 mg/l – odebráno 10 ml z roztoku o koncentraci 0,1 mg/l a doplněno do 100 ml

Roztoky pro aditivní látky byly připraveny stejným způsobem jen s tím rozdílem, že výchozí roztok byl o koncentraci 1 g/l.

Na základě výsledků předběžného testu byla následně připravena individuální série koncentrací pro každou testovanou látku (základní test).

### **Předkrmení testovacích organizmů**

Dvě hodiny před odebráním neonatů byla suspenze řas *Spirulina microalgae* protřepána se standardní sladkou vodou a nalita na inkubační misku. Opatrným otáčením obsahu byl předkrm rovnoměrně rozptýlen. [31, 33]

### **Plnění testovací desky**

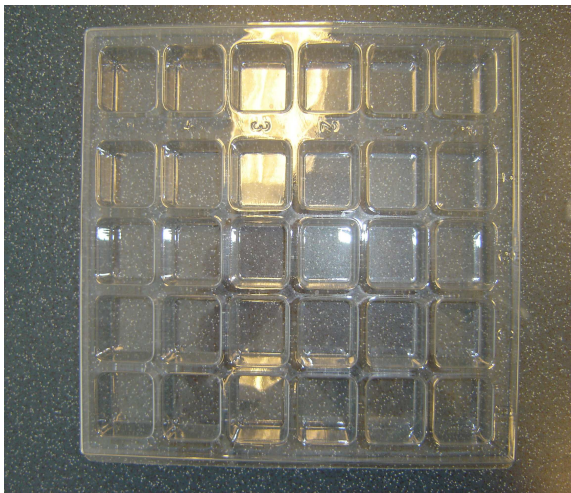
Sloupce testovacích šachet byly označeny A, B, C, D a řádky písmenem X (kontrola), vždy 1 až 5 pro pět koncentrací toxikantu. Všechny šachty v každém řádku byly plněny jednou koncentrací toxikantu. Do každé šachty v kontrolním řádku bylo převedeno 10 ml standardní sladké vody. Do šachet ostatních řádků bylo převedeno 10 ml příslušné koncentrace toxikantu, v pořadí podle klesající koncentrace. Ukázka testovací desky je uvedena na obr. 22. [31, 33]

### **Přenos neonatů do testovacích šachet**

Následující kroky byly prováděny pod mikroskopem při zvětšení 10x nebo na světelné tabuli s tmavým okrajem (viz obr. 23). Pomocí mikropipety bylo přeneseno nejméně 20 neonatů z Petriho misky do každé mycí šachty v řádku X, 1. až 5. řádek (s rostoucí koncentrací toxikantu). Snahou bylo přenést co nejméně kapaliny. Z každé mycí šachty bylo do ostatních šachet (A, B, C a D) v každém řádku přeneseno 5 neonatů. Nakonec byla přiložena parafilmová páska a pevně přiložen kryt. Destička byla vložena do zatemnělého inkubátoru o teplotě 20°C na dobu 24 a 48 hodin. [31, 33]

### **Vyhodnocení testu**

Po 24 a 48 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a ve všech šachtách byl zjištěn počet mrtvých a imobilizovaných neonatů. Neonaty, které nebyly schopny plavat po 15 sekundovém promíchání kapaliny, i když hýbaly svými tykadly, byly považovány za imobilizované. Z celkového počtu mrtvých a imobilizovaných neonatů bylo pro každou koncentraci vypočítáno procento úmrtnosti. Pokud by kontrola přesáhla 10 % mortalitu je biotest považován za chybný a je nutno ho opakovat. Ze získaných výsledků byla zjištěna hodnota 24h a 48hEC50 nebo LC50. [31, 33]



*Obr. 22. Testovací deska.*



*Obr. 23. Světelná tabule.*

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Vybrané organické látky byly hodnoceny pomocí dvou testů fytoxicity na *Sinapis alba* a *Allium cepa* L. Také byly hodnoceny pomocí alternativních testů ekotoxicity Thamnotoxkit F a Daphnotoxkit F. Výsledky testů byly pro každou látku zpracovány do tabulek. Ověření správnosti postupů a kvality semen, cibulek i citlivost organismů bylo provedeno pomocí standardních testů toxicity s dichromanem draselným ( $K_2Cr_2O_7$ ). Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 dichromanu draselného vyhovovaly limitům odpovídajícím pro daný standard.

### Standardní testy

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

Získané hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách; tabulka č. 1 test na hořčici, tabulka č. 2 test na cibuli, tabulka č. 3 test na koryšících a tabulka č. 4 test na perloočkách.

Tabulka č. 1: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (standardní test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	47,5		
5	41,7	0,12	12
10	38,6	0,18	18
30	38,2	0,20	20
60	23,3	0,51	51
80	16,9	0,64	64
160	11,3	0,76	76

Hodnota 72hIC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 53,5 mg/l.

Tabulka č. 2: Výpočet inhibice růstu kořenů cibule (standardní test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	24,0		
0,01	19,0	0,21	21
0,1	12,7	0,47	47
1	12,1	0,50	50
10	6,0	0,75	75
100	3,4	0,86	86

Hodnota 72hIC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,44 mg/l.



Tabulka č. 3: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (standardní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality
0	30/30	0
0,032	30/30	0
0,056	27/30	10
0,10	13/30	57
0,18	0/30	100
0,32	0/30	100

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,08 mg/l.

Tabulka č. 4: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (standardní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	20/20	19/20	0	5
0,32	19/20	18/20	5	10
0,56	19/20	17/20	5	15
1,0	15/20	11/20	25	45
1,8	3/20	1/20	85	95
3,2	0/20	0/20	100	100

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,94 mg/l.

Výsledné hodnoty dichromanu draselného pro jednotlivé testy vyhovovaly limitům odpovídajícím pro daný standard.

## 5.1 1,1,2-trichlorethylen

Počet testů provedených s 1,1,2- trichlorethylenem byl přizpůsoben množství testované látky, které bylo k dispozici na testování. Z tohoto důvodu byly u hořčice a perlooček provedeny pouze testy předběžné. Test na cibuli, který vyžaduje velké množství testovacího média a tím klade i vysoké nároky na množství testované látky, byl zcela vynechán. Pouze test na korýši *Thamnocephalus platyurus* byl proveden komplexně.



### 5.1.1 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.1 pro monomerní látky.

Získané výsledky z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce č. 5. V kontrole (0 mg/l) bylo dosaženo minimální klíčivosti semen 90 %, a tím byla splněna jedna z podmínek validity testu.

Tabulka č. 5: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (předběžný test).

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	38,8		
20	35,0	0,10	10
40	35,9	0,08	8
60	25,6	0,34	34
80	25,3	0,35	35
100	21,0	0,46	46

Z výsledků předběžného testu vyplývá, že tato látka bude vykazovat 50 % inhibici při koncentraci vyšší než 100 mg/l. Z tohoto důvodu byla pro ověření graficky vyhodnocena 50 % inhibice, jejíž hodnota činila 141,11 mg/l. Rozmezí koncentrací pro základní test tak bylo stanoveno na 100 až 250 mg/l. Základní test nebyl proveden z důvodu nedostatku testované látky neboť při tomto testu je potřeba, na rozdíl od testů na aquatických organismech, velké množství testovacího media a tím i testované látky.

### 5.1.2 Thamnotoxkit F

Předběžný test byl připraven s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.3. Potom byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 6 a výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 7. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č. 6: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality
0	30/30	0
0,01	0/30	100
0,1	27/30	10
1	5/30	83
10	27/30	10
100	0/30	100

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test 1 až 60 mg/l.

Tabulka č. 7: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality	probity
0	29/30	3	3,12
1	29/30	3	3,12
10	29/30	3	3,12
30	28/30	7	3,52
45	18/30	40	4,75
60	0/30	100	8,09

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 51,64 mg/l. Hodnota 24hLC50 byla pro porovnání rovněž stanovena také pomocí probitové analýzy a činila 27,72 mg/l. Porovnáním obou výsledků je zřejmé, že hodnoty se od sebe zřetelně liší. Hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 23,92 mg/l nižší než hodnota stanovená graficky. Tento rozdíl mohl být pravděpodobně způsoben nestandardností organismů; pro objasnění by bylo vhodné provést více testování a porovnat získané hodnoty. Teprve potom můžeme s definitivní platností stanovit správnou hodnotu.

### 5.1.3 Daphnotoxkit F

Předběžný test byl testován s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.4. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 8. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č. 8: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	20/20	19/20	0	5
0,01	19/20	18/20	5	10
0,1	19/20	17/20	5	15
1	17/20	14/20	15	30
10	16/20	15/20	20	25
100	11/20	9/20	45	55

Porovnáním výsledků z tabulky č. 8 po 24 a 48 hodinách testování bylo stanoveno rozmezí základního testu v rozsahu koncentrací 10 až 100 mg/l. Pro bližší zhodnocení byla pro ověření graficky vyhodnocena 50 % imobilizace, jejíž hodnota EC činila 68,10 mg/l. Rozmezí koncentrací pro základní test tak bylo stanoveno na 50 až 90 mg/l. Základní test nebyl proveden z důvodu nedostatku testované látky.

## 5.2 1,1,2,2-tetrachlorethylen

Počet testů provedených s 1,1,2,2 - tetrachlorethylenem byl také přizpůsoben množství testované látky, které bylo k dispozici na testování. Z tohoto důvodu byly u hořčice a perlooček provedeny pouze testy předběžné. Test na cibuli, který vyžaduje velké množství testovacího media a tím klade i vysoké nároky na množství testované látky, byl zcela vynechán. Pouze test na korýši *Thamnocephalus platyurus* byl proveden komplexně.

### 5.2.1 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.1 pro monomerní látky.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce č. 9. V kontrole (0 mg/l) bylo dosaženo minimální klíčivosti 90 %.

Tabulka č. 9: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	31,3		
20	28,3	0,10	10
40	26,8	0,14	14
60	23,7	0,24	24
80	23,3	0,26	26
100	22,7	0,28	28

Z výsledků předběžného testu je zřejmé, že tato látka bude vykazovat 50 % inhibici při koncentracích o mnohonásobně převyšujících hodnotu 100 mg/l. Z tohoto důvodu byla pro ověření graficky vyhodnocena 50 % inhibice, jejíž hodnota činila 626,61 mg/l. Rozmezí koncentrací pro základní test tak bylo stanoveno na 550 až 700 mg/l. Základní test nebyl proveden z důvodu nedostatku testované látky neboť při tomto testu je potřeba, na rozdíl od testů na aquatických organismech, velké množství testovacího media a tím i testované látky.

### 5.2.2 Thamnotoxkit F

Předběžný test byl připraven s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.3. Poté byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 10 a výsledky ze základního testu jsou následně prezentovány v tabulce č. 11. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č.10: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organizmy/celkem organizmů	% mortality
0	30/30	0
0,01	29/30	3
0,1	30/30	0
1	29/30	3
10	29/30	3
100	9/30	70

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test 10 až 300 mg/l.

Tabulka č. 11: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality	probity
0	30/30	0	0
10	30/30	0	0
50	29/30	3	3,12
100	11/30	63	5,33
200	2/30	93	6,48
300	0/30	100	8,09

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 74,39 mg/l. Hodnota 24hLC50 byla zjištěna také pomocí probitové analýzy; v tomto případě byla stanovená hodnota vyšší, a to 93,13 mg/l. Porovnáním obou výsledků je zřejmé, že hodnoty se od sebe zřetelně liší. Hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 18,74 mg/l vyšší než hodnota stanovená graficky. I v tomto případě nelze jednoznačně tento rozdíl objasnit, bylo by patrně zapotřebí provést větší počet hodnocení.

### 5.2.3 Daphnotoxkit F

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.4. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 12. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č. 12: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	20/20	20/20	0	0
0,01	20/20	19/20	0	5
0,1	19/20	18/20	5	10
1	18/20	16/20	10	20
10	14/20	11/20	30	45
100	11/20	7/20	45	65

Porovnáním zjištěných hodnot z tabulky č. 12 stanovených po 24 a 48 hodinách testování bylo určeno rozmezí základního testu v rozsahu koncentrací 10 až 100 mg/l. Pro bližší zhodnocení byla graficky vyhodnocena 50 % imobilizace, jejíž hodnota činila 22,62 mg/l; tato hodnota byla prokázána po 24 nebo 48 hodinách testování. Rozmezí koncentrací pro základní test tak bylo stanoveno na 10 až 50 mg/l.

### 5.3 2-Br-5-Cl-pyridin

#### 5.3.1 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Nejdříve byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.1. Následně byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce č. 13, výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 14. U kontroly (0 mg/l) byly v obou případech splněny podmínky, kdy bylo dosaženo minimální klíčivosti semen 90 %.

Tabulka č. 13: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (předběžný test).

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	29,4		
20	29,6	-0,007	0,7
40	25,6	0,13	13
60	28,5	0,03	3
80	22,5	0,24	24
100	23,9	0,19	19
160	20,0	0,32	32
320	11,0	0,63	63

Záporná hodnota značí stimulaci růstu, proto již nebyla zařazena do dalšího hodnocení. Na základě výsledků předběžného testu bylo pro základní test stanoveno rozmezí koncentrací 220 až 380 mg/l.

Tabulka č. 14: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (základní test).

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	33,0		
220	25,0	0,24	24
260	19,2	0,42	42
300	18,3	0,45	45
340	12,0	0,64	64
380	10,6	0,68	68

Hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 300,38 mg/l.

### 5.3.2 Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L.

Test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.2. Výsledky testu jsou zaznamenány v následující tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Výpočet inhibice růstu kořenů cibule.

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	29,0		
0,01	22,7	0,22	22
0,1	18,3	0,37	37
1	21,7	0,25	25
10	25,7	0,11	11
100	4,0	0,86	86

Hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 21,21 mg/l.

### 5.3.3 Thamnotoxkit F

Předběžný test byl připraven s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.3. Potom byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených tímto předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 16. Výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 17. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č.16: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (předběžný test).

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>živé organismy/celkem organismů</b>	<b>% mortality</b>
0	29/30	4
0,01	29/30	4
0,1	29/30	4
1	26/30	13
10	25/30	17
100	0/30	100

Na základě výsledků předběžného testu bylo pro základní test stanoveno rozmezí koncentrací 0,1 až 50 mg/l.

Tabulka č. 17: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality	probity
0	30/30	0	0
0,1	29/30	3	3,12
1	28/30	7	3,52
10	25/30	17	4,05
30	14/30	53	5,08
50	5/30	83	5,95

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 20,53 mg/l. Hodnota 24hLC50 byla zjištěna také pomocí probitové analýzy; pomocí tohoto postupu bylo dosaženo hodnoty 21,54 mg/l. Z porovnání obou hodnot je zřejmé, že hodnoty se od sebe příliš neliší, hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 1,01 mg/l vyšší než hodnota stanovená graficky. V tomto případě bylo u obou způsobů hodnocení dosaženo lepší shody.

#### 5.3.4 Daphnotoxkit F

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.4. Na jeho podkladě byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 18. Výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 19. Spolu s testovanou látkou byla u obou testů hodnocena i kontrola, ve které mortalita nepřesáhla hranici 10 %.

Tabulka č. 18: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	20/20	20/20	0	0
0,01	17/20	15/20	15	25
0,1	20/20	17/20	0	15
1	15/20	13/20	25	35
10	14/20	12/20	30	40
100	0/20	0/20	100	100

Porovnáním hodnot testování z tabulky č. 18, které byly odečítány po 24 a 48 hodinách testování bylo stanoveno rozmezí definitivního testu v rozsahu koncentrací 10 až 100 mg/l.



Tabulka č. 19: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace		probity	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	19/20	19/20	5	5	3,36	3,36
10	19/20	12/20	5	40	3,36	4,75
18	15/20	7/20	25	65	4,33	5,39
32	3/20	2/20	85	90	6,04	6,28
56	0/20	0/20	100	100	8,09	8,09
100	0/20	0/20	100	100	8,09	8,09

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 10,86 mg/l. Hodnota 48hEC50 byla zjištěna také pomocí probitové analýzy, a byly stanoveny na 12,51 mg/l. Porovnáním obou výsledků je zřejmé, že hodnoty se od sebe výrazně neliší, hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 1,65 mg/l vyšší než hodnota stanovená graficky. Také v tomto případě lze konstatovat, že u obou způsobů hodnocení bylo dosaženo lepší shody.

## 5.4 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid

### 5.4.1 Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Nejprve byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.1. Následně byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce č. 20, výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 21. U obou testů byly splněny podmínky, kdy v kontrole (0 mg/l) bylo dosaženo minimální klíčivosti 90 %.

Tabulka č. 20: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	38,4		
20	37,4	0,03	3
40	30,2	0,21	21
60	26,3	0,32	32
80	24,1	0,37	37
100	21,1	0,45	45
160	19,2	0,50	50
320	10,0	0,74	74

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací 90 až 170 mg/l pro základní test.

Tabulka č. 21: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (základní test).

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	32,6		
90	19,9	0,39	39
110	18,0	0,45	45
130	18,7	0,43	43
150	16,1	0,51	51
170	13,7	0,58	58

Hodnota 72hIC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 141,83 mg/l.

#### 5.4.2 Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L.

Test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.2. Výsledky z testu jsou zaznamenány v tabulce č. 22.

Tabulka č. 22: Výpočet inhibice růstu kořenů cibule.

<b>c (koncentrace) mg/l</b>	<b>L (průměrná délka kořenů) mm</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů)</b>	<b>Ii (inhibice růstu kořenů) %</b>
0	28,5		
0,01	16,0	0,44	44
0,1	17,7	0,38	38
1	14,4	0,50	50
10	11,1	0,61	61
100	12,0	0,58	58

Hodnota 72hIC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,98 mg/l.

#### 5.4.3 Thamnotoxkit F

Byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.3. Následně byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 23 a výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 24. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č.23: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organizmy/celkem organizmů	% mortality
0	30/30	0
0,01	29/30	4
0,1	26/30	14
1	5/30	84
10	0/30	100
100	0/30	100

Na základě výsledků předběžného testu (tabulka č. 23), kdy se 50 % mortalita nacházela v rozmezí koncentrací testované látky 0,1 až 1 mg/l je zřejmé, že základní test musí být proveden v rozsahu těchto koncentrací.

Tabulka č. 24: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organizmy/celkem organizmů	% mortality	probity
0	30/30	0	0
0,10	30/30	0	0
0,18	30/30	0	0
0,32	30/30	0	0
0,56	19/30	37	4,67
1,00	1/30	97	6,88

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,57 mg/l. Hodnota 24hLC50 byla zjištěna také pomocí probitové analýzy a byla stanovena na 0,74 mg/l. Porovnáním obou výsledků je zřejmé, že hodnoty se od sebe příliš neliší, i když hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 0,17 mg/l vyšší než hodnota stanovená graficky. Rovněž v tomto případě lze konstatovat, že oba postupy hodnocení poskytly dobrou shodu.

#### 5.4.4 Daphnotoxkit F

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.4. Na základě poznatků získaných z tohoto testování byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 25, výsledky ze základního testu jsou následně uvedeny v tabulce č. 26. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č. 25: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	18/20	18/20	10	10
0,01	16/20	14/20	20	30
0,1	16/20	12/20	20	40
1	14/20	10/20	30	50
10	8/20	4/20	40	80
100	0/20	0/20	100	100

Porovnáním výsledků z tabulky č. 25 po 24 a 48 hodinách testování bylo stanoveno rozmezí základního testu v rozsahu koncentrací 1 až 10 mg/l.

Tabulka č. 26: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace		probity	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	20/20	19/20	0	5	0	3,36
1,0	18/20	16/20	10	20	3,72	4,16
1,8	17/20	16/20	15	20	3,96	4,16
3,2	10/20	7/20	50	65	5,00	5,39
5,6	0/20	0/20	100	100	8,09	8,09
10,0	5/20	2/20	75	90	5,67	6,28

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 2,51 mg/l. Hodnota 48hEC50 byla zjištěna také pomocí probitové analýzy a v tomto případě bylo dosaženo hodnoty 2,06 mg/l. Porovnáním obou postupů hodnocení je zřejmé, že hodnoty se od sebe příliš neliší, i když hodnota zjištěná probitovou analýzou byla o 0,45 mg/l nižší než hodnota stanovená graficky. Proto i v tomto případě je možné vyslovit závěr, že oba způsoby hodnocení poskytly dobrou shodu.

## 5.5 Sodná sůl 2-merkapto-5-Cl-pyridin-N-oxidu

### 5.5.1 Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Nejdříve byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.1. Následně byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce č. 27 a výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce č. 28. U obou testů byly splněny podmínky vyžadující, aby v kontrole (0 mg/l) bylo dosaženo minimální klíčivosti 90 %.

Tabulka č. 27: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	44,9		
20	18,2	0,60	60
40	9,3	0,79	79
60	5,3	0,88	88
80	5,9	0,87	87
100	2,5	0,94	94
160	1,5	0,97	97
320	0,6	0,99	99

Na základě výsledků předběžného testu (tabulka č. 27) bylo pro základní test stanoveno rozmezí koncentrací 2 až 10 mg/l.

Tabulka č. 28: Výpočet inhibice růstu kořenů hořčice (základní test).

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	44,5		
2	46,7	-0,05	5
4	36,6	0,18	18
6	25,8	0,42	42
8	20,4	0,54	54
10	15,5	0,65	65

Záporná hodnota značí stimulaci růstu, a proto již nebyla zařazena do dalšího hodnocení. Hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 7,33 mg/l.

### 5.5.2 Test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa* L.

Následující test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.2. Výsledky z testu jsou zaznamenány v tabulce č. 29.

Tabulka č. 29: Výpočet inhibice růstu kořenů cibule.

c (koncentrace) mg/l	L (průměrná délka kořenů) mm	Ii (inhibice růstu kořenů)	Ii (inhibice růstu kořenů) %
0	22,5		
0,01	22,4	0,004	0,4
0,1	18,6	0,17	17
1	16,4	0,27	27
10	6,7	0,70	70
100	1,3	0,94	94

Hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 2,18 mg/l.

### 5.5.3 Thamnotoxkit F

Byl proveden předběžný test s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.3. Následně byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 30 a výsledky ze základního testu v tabulce č. 31. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č.30: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality
0	30/30	0
0,01	0/30	100
0,1	0/30	100
1	0/30	100
10	0/30	100
100	0/30	100

Na základě výsledků předběžného testu (tabulka č. 30) bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test 0,01 až 0,001 mg/l. V tomto rozmezí opět ve všech případech vycházela 100 % mortalita pro všechny koncentrace, a proto bylo stanoveno další rozmezí koncentrací. Konečné testované rozmezí koncentrací pro základní test bylo 0,001 až 0,0001 mg/l.

Tabulka č. 31: Výpočet mortality pro organismus *Thamnocephalus platyurus* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů	% mortality	probity
0	28/30	7	3,52
0,0001	24/30	20	4,16
0,00018	14/30	53	5,08
0,00032	10/30	67	5,44
0,00056	0/30	100	8,09
0,001	0/30	100	8,09

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,00019 mg/l. Hodnota 24hLC50 byla prokázána také pomocí probitové analýzy; při tomto způsobu hodnocení byla 0,00017 mg/l. Z porovnání obou výsledků vyplývá, že hodnoty se od sebe téměř neliší, i když hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 0,00002 mg/l nižší než hodnota stanovená graficky. V tomto případě bylo prozatím dosaženo nejlepší shody.

#### 5.5.4 Daphnotoxkit F

Také tento předběžný test byl prováděn s roztoky o koncentracích uvedených v kapitole 4.4. Na jejich podkladě byl připraven základní test v rozsahu koncentrací stanovených předběžným testem.

Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce č. 32 a výsledky ze základního testu v tabulce č. 33. Spolu s testovanou látkou byla u obou typů testu hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka č. 32: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (předběžný test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace	
	24h	48h	24h	48h
0	20/20	19/20	0	5
0,01	15/20	12/20	25	40
0,1	6/20	1/20	70	95
1	3/20	1/20	85	95
10	0/20	0/20	100	100
100	0/20	0/20	100	100

Porovnáním výsledků z tabulky č. 32 po 24 a 48 hodinách testování bylo stanoveno rozmezí základního testu v rozsahu koncentrací 0,01 až 0,1 mg/l.

Tabulka č. 33: Výpočet imobilizace pro organismus *Daphnia magna* (základní test).

c (koncentrace) mg/l	živé organismy/celkem organismů		% imobilizace		probity	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	20/20	19/20	0	5	0	3,36
0,01	17/20	13/20	15	35	3,96	4,62
0,018	16/20	13/20	20	35	4,16	4,62
0,032	14/20	8/20	30	60	4,48	5,25
0,056	12/20	5/20	40	75	4,75	5,67
0,1	10/20	3/20	50	85	5,00	6,04

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 0,023 mg/l. Hodnota 48hEC50 byla prokázána také pomocí probitové analýzy a činila 0,022 mg/l. Porovnáním obou výsledků je zřejmé, že hodnoty se téměř shodují, i když hodnota zjištěná probitovou analýzou je o 0,001 mg/l nižší než hodnota stanovená graficky; i v tomto případě bylo dosaženo dobré shody při použití obou způsobů hodnocení.

## 5.6 Zhodnocení výsledků

Jak vyplývá z předložených výsledků, byla hodnocena toxicita některých monomerů a aditiv polymerů prostřednictvím testů ekotoxicity. Tyto látky byly vybrány proto, že jsou prekurzorem při syntézách mnoha složitějších polymerních látek. Na našem pracovišti nelze provádět veškeré standardní testy podle OECD. Z tohoto důvodu byly pro testování těchto látek použity dva alternativní testy toxicity na testovacích organismech *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus* a dva fytotesty, přičemž test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* je testem standardním a test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa L* je testem alternativním. Ekotoxikologické hodnocení těchto látek je podle našeho názoru velmi důležité a jeho výsledky by měly být nedílnou součástí základních charakteristik všech vyráběných chemických substancí, neboť tyto se stávají součástí mnoha spotřebních výrobků

Pro lepší porovnání a zhodnocení výsledků testování byly získané hodnoty shrnuty do následujících tabulek a grafů. V tabulce č. 34 jsou pro přehlednost prezentovány výsledné hodnoty LC, IC, EC50 pro testované monomery a v následující tabulce č. 35 jsou uvedeny výsledné hodnoty LC, IC, EC50 pro aditiva polymerů.



Tabulka č. 34: Výsledné hodnoty LC, IC, EC50 pro testované monomery.

	<i>Sinapis alba</i> (72hIC50) mg/l	Thamnotoxkit F (24hLC50) mg/l	Daphnotoxkit F (48hEC50) mg/l
<b>1,1,2-trichlorethylen</b>	141,11	51,64 (g)	68,10 (g)
<b>1,1,2,2-tetrachlorethylen</b>	626,61	74,39 (g)	22,62 (g)

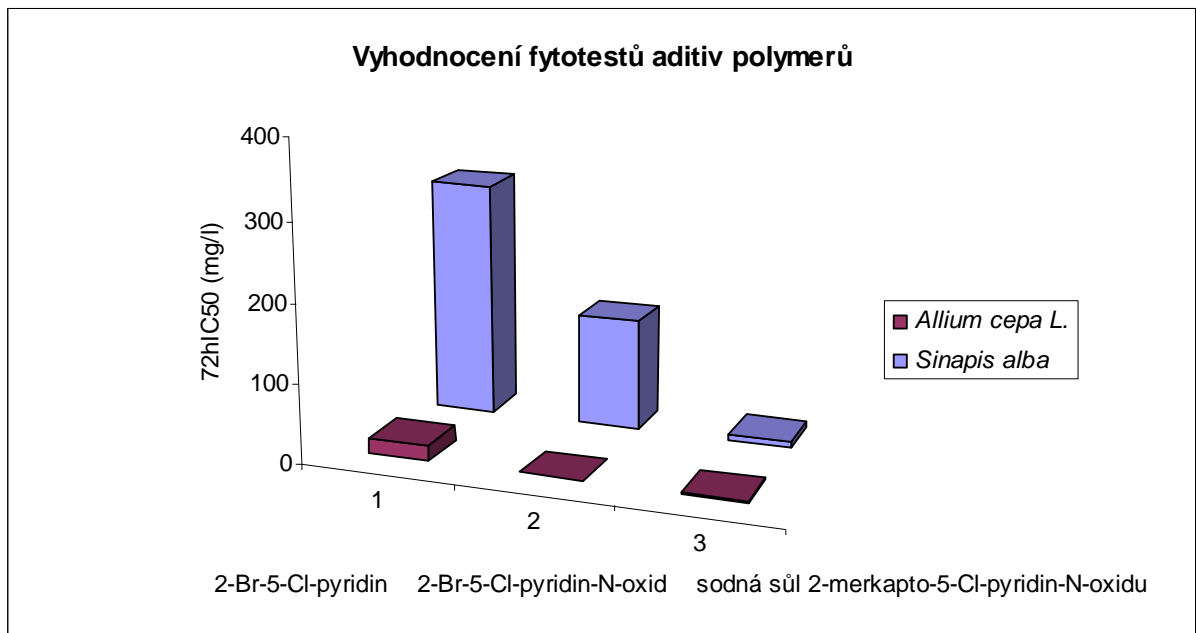
Tabulka č. 35: Výsledné hodnoty LC, IC, EC50 pro testovaná aditiva monomerů.

	<i>Sinapis alba</i> (72hIC50) mg/l	<i>Allium cepa L.</i> (72hIC50) mg/l	Thamnotoxkit F (24hLC50) mg/l	Daphnotoxkit F (48hEC50) mg/l
<b>2-Br-5-Cl-pyridin</b>	300,38	21,21	20,53 (g)	10,86 (g)
<b>2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid</b>	141,83	0,98	0,57 (g)	2,51 (g)
<b>sodná sůl 2-merkapt-5- Cl-pyridin-N- oxidu</b>	7,33	2,18	0,00019 (g)	0,023 (g)

g – výsledek stanoven graficky pomocí regresní přímky

Z výsledků testů ekotoxicity u obou skupin látek vyplývá, že testy na aquatických organizmech jsou citlivější, než testy využívající jako testovací organismus vyšší rostliny. Ve skupině fytotestů je pak citlivější test na *Allium cepa*; prostřednictvím tohoto testu byly u testovaných aditiv polymerů získány nižší hodnoty 72IC50, což znamená, že u tohoto organismu jsou negativní účinky látek vyvolány mnohem nižšími koncentracemi, než je tomu u *Sinapis alba*. Pro lepší znázornění této skutečnosti jsou v grafu č. 1 uvedeny hodnoty 72hIC50 stanovené pro aditiva polymerů prostřednictvím dvou fytotestů.

Monomery byly testovány pouze prostřednictvím jednoho fytotestu, a to testem inhibice růstu kořene *Sinapis alba*. Tyto výsledky korespondují s výsledky jiných prací [25], ve kterých je také jako citlivější testovací organismus ve zmiňovaných fytotestech uváděna *Allium cepa*.

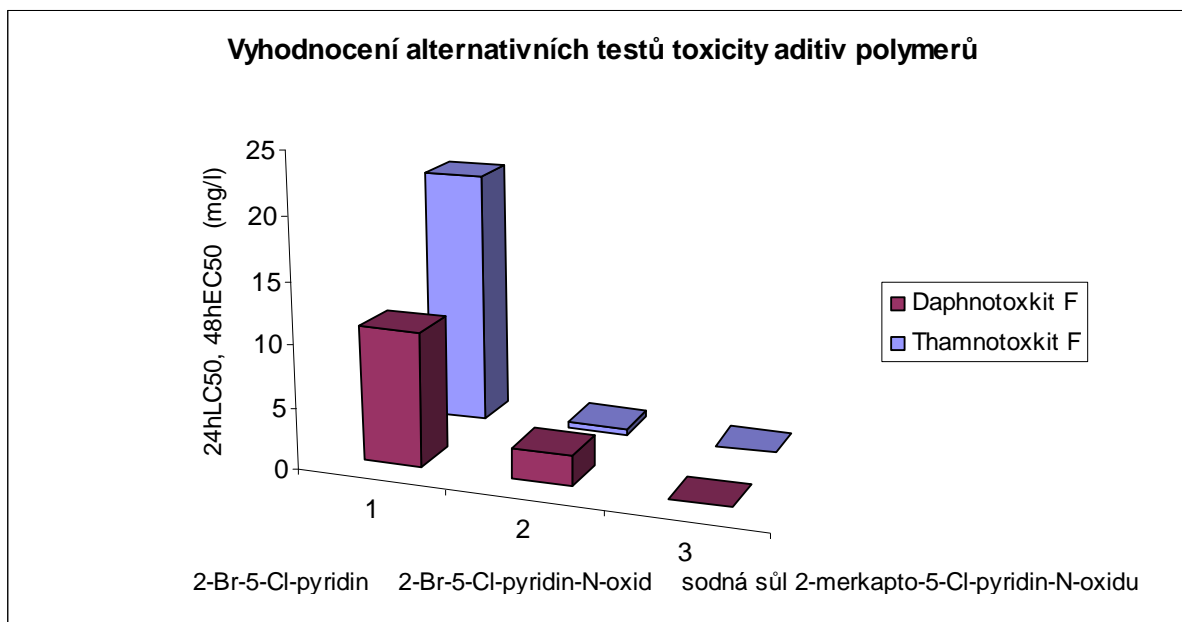


Graf č. 1: Porovnání výsledků fytotestů pro testovaná aditiva polymerů.

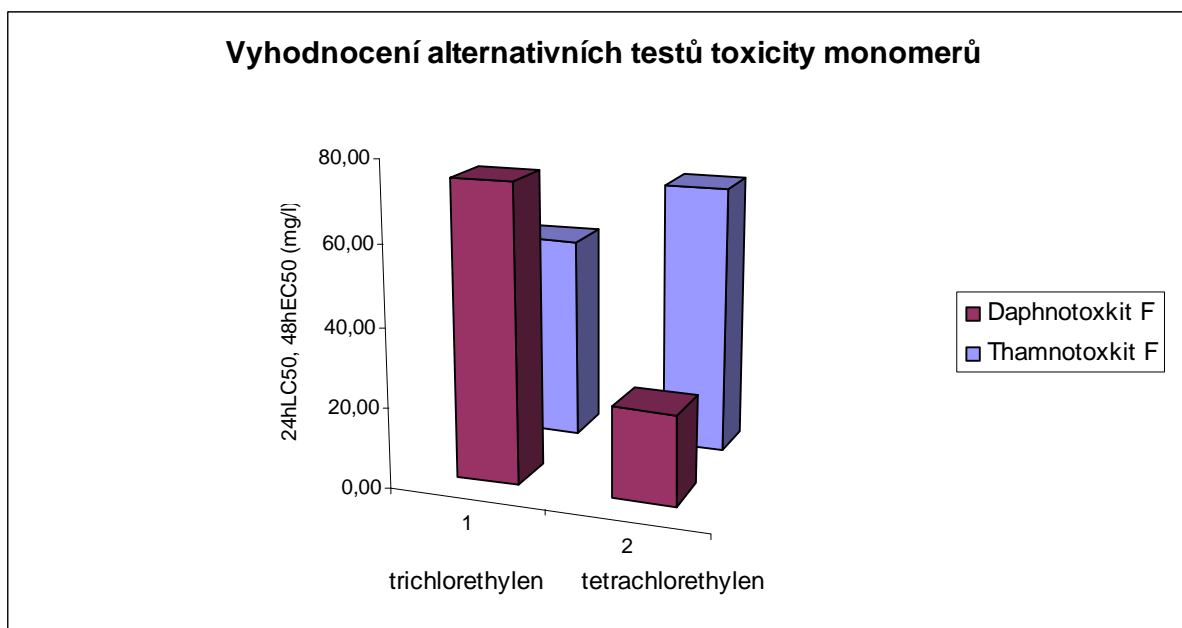
Z tohoto grafu vyplývá nejenom již výše zmiňovaná vyšší citlivost testu na organismu *Allium cepa*, ale také ekotoxicita aditiv polymerů hodnocená prostřednictvím těchto testů. Největší ekotoxické účinky vykazuje sodná sůl 2-merkaptto-5-Cl-pyridin-N-oxidu. Hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla u této testované látky 2,18 mg/l pro *Allium cepa* a pro *Sinapis alba* 7,33 mg/l; 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid vykazoval již nižší ekotoxicitu, hodnota 72hIC<sub>50</sub> byla stanovena na 141,83 mg/l pro *Sinapis Alba* a 0,98 mg/l pro *Allium cepa*. Jako nejméně ekotoxický se z testovaných aditiv polymerů na základě hodnocení pomocí testů fytotoxicity projevil 2-Br-5-Cl-pyridin. V testu inhibice kořene *Sinapis alba* a *Allium cepa* vykazoval tyto hodnoty ekotoxicity; 72hIC<sub>50</sub> bylo 300,38 mg/l a 21,21 mg/l.

Podobný trend při porovnávání ekotoxicity jednotlivých aditiv polymerů vykazují tyto látky také v případě, jsou-li hodnoceny prostřednictvím alternativních testů ekotoxicity na aquatických organismech (graf č. 2). Z tohoto pohledu se množství a charakter substituentů zdá být určujícím faktorem ekotoxicity, neboť hodnota chemického individua pyridu 48EC<sub>50</sub> je podle údajů bezpečnostního listu 940 mg/l.

Při porovnání ekotoxicity testovaných monomerů (tab. č. 34, graf č. 3) lze říci, že 1,1,2,2-tetrachlorethylen vykazuje nižší ekotoxicitu, neboť stanovené hodnoty IC, EC a LC 50 pro tuto látku jsou téměř ve všech případech vyšší. Výjimku tvoří pouze výsledek testu na *Dafnii magna*, kdy hodnota 48EC<sub>50</sub> pro tuto látku byla 22,62 mg/l, zatímco pro 1,1,2-trichlorethylen byla 68,1 mg/l. Tato skutečnost nemohla být potvrzena ani vyvrácena opakováním testu pro nedostatečné množství testované látky. Domníváme se, že tento výsledek mohl být způsoben vysokou těkavostí obou látek, takže nemohla být zcela zaručena koncentrace testované látky. Hodnota 48EC<sub>50</sub> námi stanovená pro 1,1,2-trichlorethylen je téměř ve shodě s údaji, které uvádí bezpečnostní list pro tuto chemickou substanci, kde je uvedena hodnota 24EC<sub>50</sub> a činí 76 mg/l.



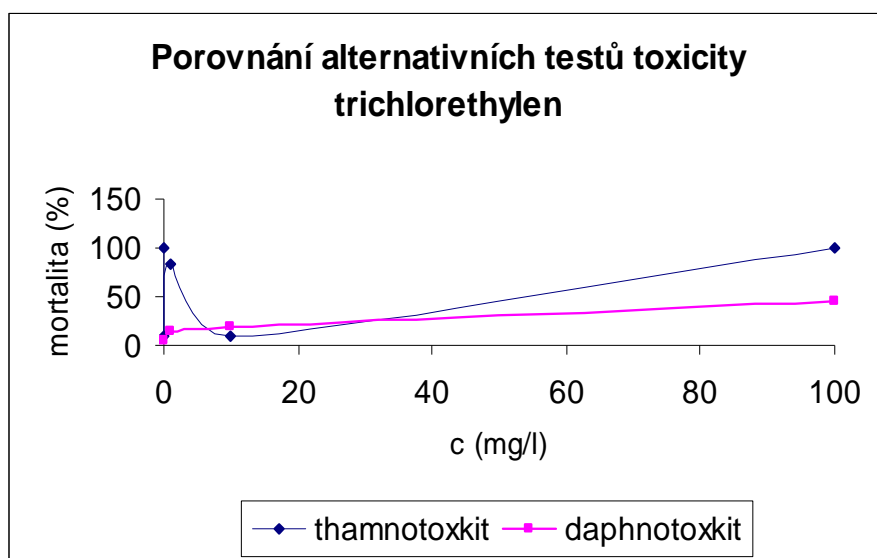
Graf č. 2: Porovnání výsledků alternativních testů pro testovaná aditiva polymerů.



Graf č. 3: Porovnání výsledků alternativních testů pro testované monomery.

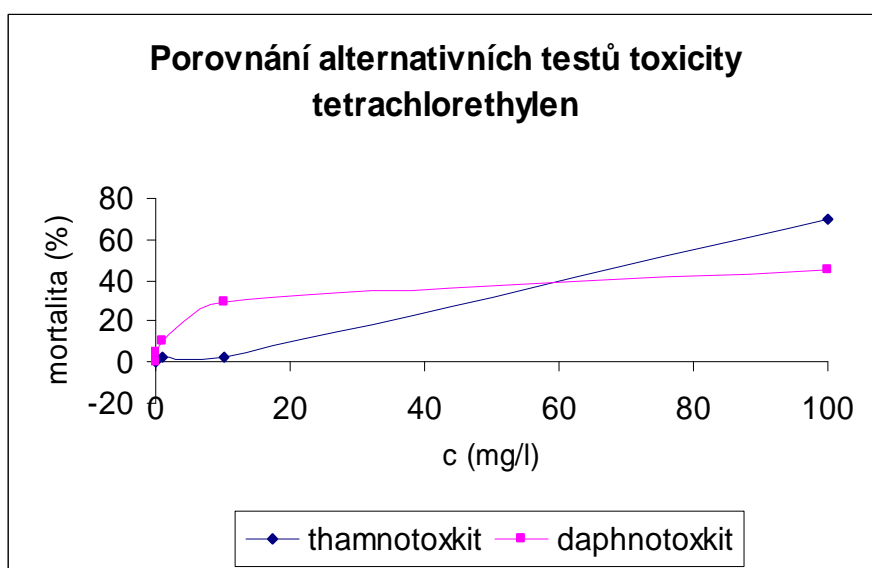
Rovněž bylo provedeno posouzení citlivosti a vhodnosti dvou použitých alternativních testů toxicity Thamnotoxkit F a Daphnotoxkit F pro všechny testované látky. Následující grafy č. 4 až 8 znázorňují přehledné porovnání citlivosti alternativních testů toxicity na aquatických organizmech pro všechny testované látky. Pro názornější porovnání vychází tyto

grafy z výsledků předběžných testů, ve kterých byla pro oba testy zvolena stejná koncentrace testovaných látek. Pro porovnání byl použit Daphnotoxkit F odečítaný za 24 hodin, aby byla také shodná testovací doba obou alternativních testů.



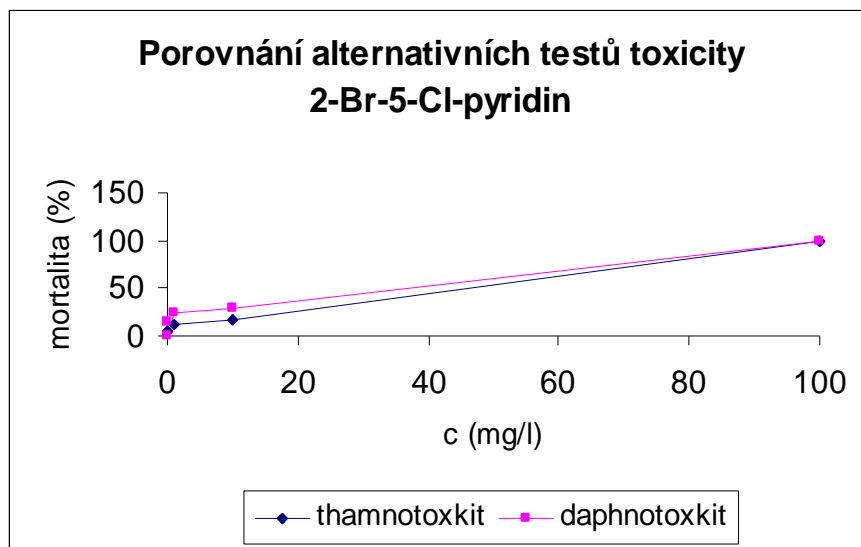
Graf č. 4: Porovnání mortality při použití dvou alternativních testů pro trichlorethylen.

Z grafu č. 4, kde je provedeno porovnání použitých alternativních testů pro trichlorethylen vyplývá, že poněkud vyšší mortalita byla prokázána téměř v celé koncentrační řadě pomocí testu Thamnotoxkit F; výjimku tvoří rozmezí koncentrací cca 10 – 40 mg/l testované látky, kde se mortalita a tedy i citlivost testovaných organismů téměř shoduje.



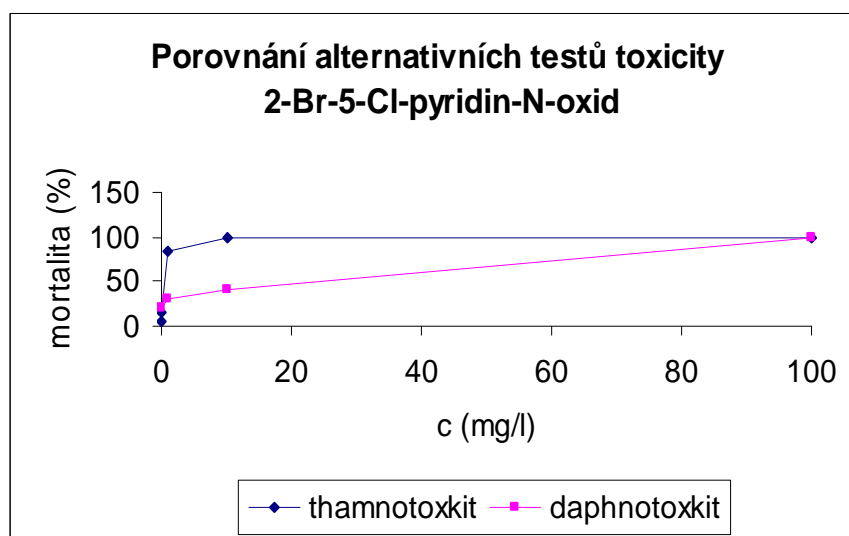
Graf č. 5: Porovnání mortality při použití dvou alternativních testů pro tetrachlorethylen.

Poněkud odlišný trend vykazuje grafické porovnání alternativních testů pro tetrachlorethylen (graf č. 5). U této testované látky byla prokázána vyšší mortalita pro nižší koncentrace pomocí testu Daphnotoxkit F – 24. Naopak se vzrůstající koncentrací, počínaje hodnotou koncentrace 60 mg/l, vykazuje vyšší mortalitu test Thamnotoxkit F.



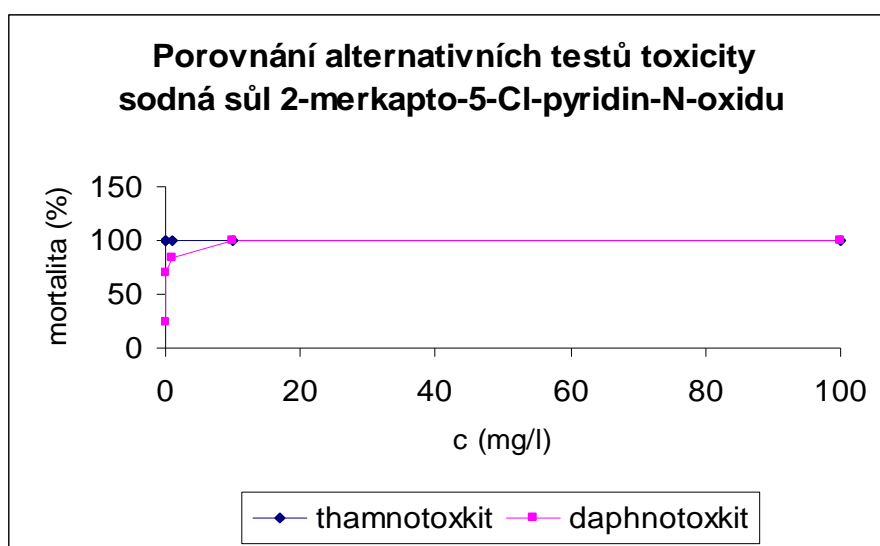
Graf č. 6: Porovnání mortality při použití dvou alternativních testů pro 2-Br-5-Cl-pyridin.

Posouzení vhodnosti obou alternativních testů bylo provedeno také při testování aditiv polymerů. Jako první byl hodnocen 2-Br-5-Cl-pyridin (graf č. 6). Z tohoto porovnání je zřejmé, že mezi oběma testy nebyl prokázán téměř žádný rozdíl. Pouze nepatrné rozdíly vykazovaly oba testy v nižších koncentracích, kdy vyšší mortalita byla prokázána pomocí testu Daphnotoxkit F



Graf č. 7: Porovnání mortality při použití dvou alternativních testů pro 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid.

V grafech č. 7 a 8 jsou znázorněny výsledky posouzení vhodnosti obou alternativních testů pro další testovaná aditiva polymerů, a to pro 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid a pro sodnou sůl 2-merkapt-5-Cl-pyridin-N-oxidu. Z porovnání použitých alternativních testů u obou aditiv je zřejmé, že poněkud vyšší mortalita byla prokázána pro Thamnotoxkit F. Zatímco u testované látky 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxidu vykazuje mortalita obou testů podobný trend až u vyšších koncentrací, u sodné soli 2-merkapt-5-Cl-pyridin-N-oxidu vykazují oba testy shodnou 100 % mortalitu již při nízkých koncentracích této látky, což vyplývá z hodnot vysoké ekotoxicity prokázané pro tuto látku.



Graf č. 8: Porovnání mortality při použití dvou alternativních testů pro sodnou sůl 2-merkapt-5-Cl-pyridin-N-oxidu.

## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na ekotoxikologické hodnocení dvou monomerů ze skupiny chlorovaných alifatických uhlovodíků a tří aditiv polymerů reprezentujících šestičtené heterocyklické sloučeniny. Jednalo se o následující chemické látky: 1,1,2-trichlorethylen; 1,1,2,2-tetrachlorethylen; 2-Br-5-Cl-pyridin; 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid a sodnou sůl 2-merkapt-5-Cl-pyridin-N-oxidu. Přibližná toxicita pro životní prostředí všech testovaných látek nebyla známa, proto byly vždy provedeny testy předběžné, na jejichž základě byl stanoven rozsah koncentrací pro provedení základního testu, jehož výsledky umožnily stanovení LC, IC a EC50 pro všechny testované látky.

- V rámci teoretické části byla zpracována rešerše o možnosti využití ekotoxikologických testů pro hodnocení vybraných monomerů a aditiv polymerů; její součástí byl přehled nejčastěji využívaných testů.
- K ekotoxikologickému hodnocení vybraných chemických substancí byly využity dva alternativní testy toxicity a dva testy fytoxicity. Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou. Rovněž byly provedeny referenční testy za účelem prověření korektnosti provedené testovací procedury a citlivosti testovacích organismů. Jako standard pro kontrolu kvality byl použit dichroman draselný  $K_2Cr_2O_7$ . Všechny stanovené hodnoty 48hEC50, 24hLC50 a 72hIC50 pro použité testy toxicity jsou ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.
- Z alternativních testů byly použity testy toxicity pro vodní ekosystémy Thamnotoxkit F a Daphnotoxkit F. Pro terestrické ekosystémy byly použity dva fyfotesty: test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, jako představitel standardních testů toxicity a test inhibice růstu kořene cibule *Allium cepa L*, který patří do skupiny alternativních testů.
- Z testovaných monomerů 1,1,2-trichlorethylenu a 1,1,2,2-tetrachlorethylenu vykazoval vyšší ekotoxicitu téměř ve všech testech 1,1,2-trichlorethylen, výjimku tvořily výsledky testů ekotoxicity získané prostřednictvím alternativního testu na *Daphnia magna*. Tuto skutečnost lze vysvětlit vysokou těkavostí standardu této látky.
- U testovaných aditiv polymerů se stanovená ekotoxicita zvyšovala s množstvím a charakterem substituentů, přičemž tento trend vykazovaly hodnoty téměř všech použitých testů. Nejvyšší ekotoxicita byla takto prokázána u sodné soli 2-merkapt-5-Cl-pyridin-N-oxidu následoval 2-Br-5-Cl-pyridin-N-oxid a nejnižší ekotoxicita byla prokázána u 2-Br-5-Cl-pyridinu.
- Z porovnání citlivosti alternativních testů nevyplýval zcela jednoznačný závěr; Thamnotoxkit F se však jeví mírně citlivější, neboť testovací organizmus *Thamnocephalus platyurus* vykazoval vyšší mortalitu ve více případech oproti testu na *Daphnia magna*. Rozdíly však nebyly signifikantní.
- Porovnáním citlivosti testů fytoxicity jsme došli k závěru, že pro testování látek ve vlastnosti ekotoxicita je citlivější test s využitím *Allium cepa L*. Tento test však prozatím není pro svoji větší náročnost běžně využíván.
- Na základě porovnání ekotoxicity obou skupin organických látek, tj. monomerů a aditiv polymerů lze konstatovat, že větší nebezpečí pro životní prostředí představují aditiva, neboť vykazují větší ekotoxicitu.

Monomery a aditiva polymerů, jsou výchozími látkami pro tvorbu polymerů a je nutné brát zřetel na jejich ekotoxicitu. Jejich používání, skladování a recyklování by nemělo negativně ovlivňovat životní prostředí. Porovnáním výsledků testovaných látek s hodnotami pro kategorie nebezpečnosti látek stanovenými zákonem č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích, je možné vyslovit závěr, že testované monomery i aditiva polymerů by na základě výsledků této diplomové práce neměly představovat významné riziko pro životní prostředí.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Picka, K., Matoušek, J.: *Základy obecné a speciální toxikologie*. Ministerstvo Životního prostředí České republiky, 1. vyd. Praha, 1996. 103 s. ISBN 80-85368-91-9.
2. Patočka, J.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing a.s., 2004. 180 s. ISBN 80-247-0608-3.
3. Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích ve znění pozdějších předpisů.
4. REACH. [online]. 2007, [cit. 2008-02-12]. Dostupné z: [http://reach.jrc.it/about\\_reach\\_en.htm](http://reach.jrc.it/about_reach_en.htm).
5. Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů.
6. Kizlink, J.: *Nakládání s odpady*. Fakulta chemická VUT v Brně, 1. vyd. Brno, 2007. 284 s. ISBN 978-80-214-3348-9.
7. Kočí, V.: *Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí*. Chemické listy 100. 882-888 (2006).
8. Vopršálková, M., Žáčková, P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Univerzita Karlova v Praze, 1. vyd. Karolinum Praha, 2000. 231 s. ISBN 80-7184-282-6.
9. Schüürmann, G., Market, B.: *Ecotoxicology*. Johl Wiley & Sons. Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, 1998. 900 p. ISBN 0-471-17644-3.
10. Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky – Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. Univerzita Karlova v Praze, 2. vyd. Karolinum Praha, 2004. 119 s. ISBN 80-246-0566-X.
11. Kočí, V.: *Ekotoxikologie* [online]. 2007, VŠCHT v Praze, Fakulta chemie ochrany prostředí, [cit. 2007-05-20]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni\\_materialy/Ekotox/Ekotox%201.pdf](http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox/Ekotox%201.pdf).
12. Pavlíková, D., Pavlík, M., Matějů, L., Balík, J.: *Ekotoxikologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrochemie, potravinových a přírodních zdrojů, 1. vyd. Praha, 2006. 152 s. ISBN 80-213-1528-8.
13. Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Buton, G. A. Jr., Cairns, J. Jr.: *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press LLC, 2nd ed. Boca Raton, 2003. 1290 p. ISBN 1-56670-546-0.
14. Ambrožová, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. VŠCHT v Praze, 2. vyd. Praha, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8.
15. Horák, J., Linhart, I., Klusoň, P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. VŠCHT v Praze, 1. vyd. Praha, 2004. 187 s. ISBN 80-7080-548-X.
16. Prokeš, J.: *Základy toxikologie – Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Galén, 1. vyd. Praha, 2005. 248 s. ISBN 80-7262-301-X.
17. Stine, K. E., Brown, T. M.: *Principles of toxicology*. CRC Press LLC, Taylor & Francis Group, 2nd ed. Boca Raton, 2006. 374 p. ISBN 0-8493-2856-X.
18. Maršálek, B.: *Ekotoxikologické biotesty – rozdělení, přehled, použití*. [online]. 2006, [cit. 2008-01-29]. Dostupné z: [http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB\\_prezentace/Rozdeleni\\_EB.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf).

19. *Testy toxicity*. [online]. 2007, [cit. 2007-10-09]. Dostupné z: <http://sweb.cz/ekotoxikologie/toxlab/ekotoxikologie/testy.htm>.
20. Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B.: *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis Group, 2nd ed. London, 2001. 309 p. ISBN 0-7484-0939-4.
21. Kočí, V., Rakovnický, T., Švagr, A.: *Testy akutní a semichronické toxicity*. [online]. 2007, VŠCHT v Praze, [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: <http://sweb.cz/ekotoxikologie/toxlab/vyuka/obecna.htm>.
22. Newman, M. C.: *Fundamentals of ecotoxicology*. CRC Press LLC, 1st ed. Boca Raton, 2001. 281 p. ISBN 1-57504-013-1.
23. Říhová Ambrožová, J.: *Akutní testy toxicity – Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník*. [online]. 2007, VŠCHT v Praze, [cit. 2007-10-09]. Dostupné z: [http://vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=A008](http://vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=A008).
24. Hilscherová, K., Maršálek, B.: *Ekotoxikologické biotesty s bezobratlými*. [online]. 2006, [cit. 2008-01-29]. Dostupné z: <http://www.recetox.muni.cz/index.php?s=studium&f=download>.
25. Vránová, J.: *Posouzení vhodnosti vybraných testů ekotoxicity pro vodní a terestrické ekosystémy při hodnocení vyluhů polymerů*. Diplomová práce, VUT v Brně, Brno 2007. 96 s.
26. Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Věstník MŽP, ročník XVII, částka 4, duben 2007. ISSN 0862-9013.
27. Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J.: *Ekotoxikologie – Praktická cvičení část I*. Veterinární a Farmaceutická univerzita v Brně, 1. vyd. Brno, 2000. 72 s. ISBN 80-85114-95-X.
28. Wright, D. A., Welbourn, P.: *Environmental toxicology*. Cambridge univerzity, 1st ed. Press, 2002. 630 p. ISBN 0-521-58860-X.
29. Fiskesjó, G.: *Technical methods section – Allium test I: 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (Allium cepa L.)*. [online]. 1985a, [cit. 2008-02-12]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.2530080410>.
30. *Medicina Avangada – Dra. Shirley de Campos*. [online]. 2003, [cit. 2008-04-10]. Dostupné z: <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/5146>.
31. *Toxkit microbiotest*. [online]. 2001, [cit. 2007-10-10]. Dostupné z: <http://www.microbiotest.be>.
32. *Algatoxkit F<sup>TM</sup> – Standard operation procedure*. 1. vyd. 2004. 34 s.
33. *Daphnotoxkit F<sup>TM</sup> magna – Standard operation procedure*. 1. vyd. 2004. 25 s.
34. *Rotoxkit F<sup>TM</sup> – Standard operation procedure*. 1. vyd. 2004. 24 s.
35. *Jorge Ciros – Departament de Microbiologia i Ecologia*. [online]. 1998, [cit. 2008-04-30]. Dostupné z: <http://www.uv.es/~ciros/index.html>.
36. *Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> – Standard operation procedure*. 1. vyd. 2004. 27 s.
37. Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků.
38. Petira, O.: *Nová příručka „REACH – Chemická legislativa nejen pro chemiky“*. VUOS Pardubice ve spolupráci s CENIA, českou informační agenturou životního prostředí, 2007. 17 s.

39. *Dobry den, tady REACH!* [online]. 2006, [cit. 2008-02-12]. Dostupné z: <http://www.schp.cz>.
40. Vyhláška MŽP č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů ve znění pozdějších předpisů.
41. Ducháček, V.: *Polymery – Výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. VŠCHT v Praze, Fakulta chemické technologie, 1. vyd. Praha, 1995. 354 s. ISBN 80-7080-241-3.
42. Ehrenstein, G. W.: *Polymeric materials – Structure, properties, applications*. Carl Hanser Verlag, Munich, 2001. 277 p. ISBN 3-446-21461-5.
43. Maroušek, V.: *Chemie a technologie monomerů*. VŠCHT v Praze, Fakulta chemické technologie, 3. vyd. Praha, 2005. 177 s. ISBN 80-7080-379-7.
44. Šňupárek, J.: *Makromolekulární chemie – Úvod do chemie a technologie polymerů*. Univerzita Pardubice, 1. vyd. Pardubice, 2006. 167 s. ISBN 80-7194-863-2.
45. *World of chemistry – Monomer*. [online]. 2005 – 2006, [cit. 2008-02-12]. Dostupné z: <http://www.bookrags.com/research/monomer-woc>.
46. Filip, J.: *Odpadové hospodářství*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1. vyd. Brno, 2002. 118 s. ISBN 80-7157-608-5.
47. Mark, H. F.: *Encyclopedia of polymer science and technology*. John Wiley & Sons. Inc, 3rd ed. 1 volume set. 2003. 3005 p. ISBN 0-471-28824-1.
48. *Trichlorethylen*. [online]. c2005-2006, [cit. 2008-02-20]. Dostupné z: <http://irz.cz/repository/latky/trichlorethylen.pdf>.
49. *Tetrachlorethylen*. [online]. c2005-2006, [cit. 2008-02-20]. Dostupné z: <http://irz.cz/repository/latky/tetrachlorethylen.pdf>.
50. Mackay, D., et al.: *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate of organic chemicals – Halogenated hydrocarbons*. Taylor & Francis Group, 2nd ed. Boca Raton, 2006. 921-2167 p. ISBN 1-56670-687-4.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- REACH:** Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek)
- ISO:** International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
- GLP:** Good Laboratory Practice (správná laboratorní praxe)
- OECD:** Organization for Economical Cooperation of Development (Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj)
- US – EPA:** United States Environmental Protection Agency (Americká agentura ochrany životního prostředí)
- LD50:** dávka látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v době testovací studie
- LC50:** koncentrace látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v době testovací studie
- EC50:** koncentrace látky, která vyvolá 50 % úhyn nebo imobilizaci testovaného organismu
- IC50:** koncentrace, která způsobí 50 % inhibici účinnosti sledované látky
- NOAEL:** No Observable Adverse Effect Level (nejvyšší dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek)
- LOAEL:** Lowest Observable Adverse Effect Level (nejnižší dávka, při které již byl pozorován škodlivý účinek)
- OC0:** orientační koncentrace (nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci jedinců)
- OC100:** orientační koncentrace (nejnižší koncentrace, která již působí letálně)
- 24h EC50:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn či imobilizaci 50 % testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku  $24 \pm 2$  hodin
- 48h EC50:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn či imobilizaci 50 % testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku  $48 \pm 2$  hodin
- 72h IC50:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene hořčice bílé oproti kontrole v časovém úseku  $72 \pm 2$  hodin
- 24h LC50:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovaných ryb v časovém úseku  $24 \pm 2$  hodin
- 48h LC50:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovaných ryb v časovém úseku  $48 \pm 2$  hodin
- R-věta:** standardní věta označující specifickou rizikovost
- S-věta:** standardní pokyn pro bezpečné zacházení
- VOC:** volatile organic compounds (těkavé organické látky)
- TCE:** trichlorethylen
- PCE:** tetrachlorethylen

**Imobilizace *Daphnia magna*:** makroskopicky pozorovatelná neschopnost samostatného prostorového pohybu *Daphnia magna* do 15 s po krouživém zamíchání lázně, jako imobilizované organizmy hodnotíme i jedince, kteří pohybují tykadly 2. páru, ale výše uvedeného pohybu nejsou schopny

**Inhibice růstu kořene:** zkrácení průměrné délky kořene hořčice bílé v testovaném vzorku ve srovnání s kontrolou

**Stimulace růstu kořene:** prodloužení průměrné délky kořene hořčice bílé v testovaném vzorku ve srovnání s kontrolou

**Inhibice růstu řas:** snížení růstu řas na základě zjištěné hustoty řasové kultury ve srovnání s kontrolou

**Stimulace růstu řas:** zvýšení růstu řas na základě zjištěné hustoty řasové kultury ve srovnání s kontrolou

**Inokulum:** množství buněk vložených do testovacích baněk na začátku testu, vyjádřené jako hustota řasové kultury na začátku testu (počet buněk v 1 ml)

## 9 PŘÍLOHY

Tabulka č. 36: Probitové hodnoty.

<b>%</b>	<b>probity</b>	<b>%</b>	<b>probity</b>	<b>%</b>	<b>probity</b>	<b>%</b>	<b>probity</b>
0,2	2,12	21,0	4,19	52,0	5,05	83,0	5,95
0,4	2,35	22,0	4,23	53,0	5,08	84,0	5,99
0,6	2,49	23,0	4,26	54,0	5,10	85,0	6,04
0,8	2,59	24,0	4,29	55,0	5,13	86,0	6,08
1,0	2,57	25,0	4,33	56,0	5,15	87,0	6,13
1,2	2,74	26,0	4,36	57,0	5,18	88,0	6,18
1,4	2,80	27,0	4,39	58,0	5,20	89,0	6,23
1,6	2,86	28,0	4,42	59,0	5,23	90,0	6,28
1,8	2,90	29,0	4,45	60,0	5,25	91,0	6,34
2,0	2,95	30,0	4,48	61,0	5,28	92,0	6,41
2,5	3,04	31,0	4,50	62,0	5,31	93,0	6,48
3,0	3,12	32,0	4,53	63,0	5,33	94,0	6,56
3,5	3,19	33,0	4,56	64,0	5,36	95,0	6,65
4,0	3,25	34,0	4,59	65,0	5,39	95,5	6,70
4,5	3,31	35,0	4,62	66,0	5,41	96,0	6,75
5,0	3,36	36,0	4,64	67,0	5,44	96,5	6,81
6,0	3,45	37,0	4,67	68,0	5,47	97,0	6,88
7,0	3,52	38,0	4,70	69,0	5,50	97,5	6,96
8,0	3,60	39,0	4,72	70,0	5,52	98,0	7,05
9,0	3,66	40,0	4,75	71,0	5,55	98,2	7,10
10,0	3,72	41,0	4,77	72,0	5,58	98,4	7,14
11,0	3,77	42,0	4,80	73,0	5,61	98,6	7,20
12,0	3,83	43,0	4,82	74,0	5,64	98,8	7,26
13,0	3,87	44,0	4,85	75,0	5,67	99,0	7,33
14,0	3,92	45,0	4,87	76,0	5,71	99,2	7,41
15,0	3,96	46,0	4,90	77,0	5,74	99,4	7,51
16,0	4,01	47,0	4,93	78,0	5,77	99,6	7,65
17,0	4,05	48,0	4,95	79,0	5,81	99,8	7,88
18,0	4,09	49,0	4,98	80,0	5,84		
19,0	4,12	50,0	5,00	81,0	5,88		
20,0	4,16	51,0	5,03	82,0	5,92		