



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Bulletin

VÚRH *V o d ň a n y*

ročník
volume

47/3/2011

červenec–září / July–September

Tato publikace byla vydána z prostředků Evropského rybářského fondu v rámci projektu „Příprava a vydání 47. ročníku odborného čtvrtletníku Bulletin VÚRH Vodňany“ (CZ.1.25/3.1.00/11.00302)

Uveřejněné příspěvky byly předneseny v rámci konference „Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí“ pořádané ve Vodňanech ve dnech 24.–25. 8. 2011



Evropský rybářský fond
„Investice do udržitelného rybolovu“

OBSAH / CONTENTS

Původní články – Original papers

O. ADAMOVSKÝ, L. BLÁHOVÁ, J. KOHOUTEK, M. ORAVEC, L. BLÁHA

5

Porovnání citlivosti protilátkežívaných k detekci sinicových toxinů v přírodních vodách

• *Comparison of antibodies commonly used in elisa for microcystin analyses in natural waters*

I. BEDNÁŘOVÁ, M. BEKLOVÁ

13

Studium účinků paladia na zástupce producentů ve vodních ekosystémech

• *Study of the impact of palladium on producers in aquatic ecosystems*

L. CHROMCOVÁ, S. MÁCOVÁ, L. PLHALOVÁ, E. PRÁŠKOVÁ, Z. SVOBODOVÁ

19

Vliv vybraných rozpouštědel na embryonální stádia *Danio rerio* • *Effect of selected carrier solvents on embryonal stages of *Danio rerio**

S. JESENSKÁ, K. BRABEC, L. BLÁHA

29

Distribuce citlivosti druhů (Species Sensitivity Distribution – SSD) – využití pro hodnocení rizik pesticidů v evropských řekách • *Species Sensitivity Distribution (SSD) – application in environmental risk assessment of pesticides in european rivers*

A. JONÁŠ, B. JAROŠOVÁ, I. SOVADINOVÁ, L. BLÁHA

39

Embryonální test s *Danio rerio* pro výzkum endokrinní disrupce ve vodním prostředí

• *Danio rerio embryo test for research of endocrine disruption in water environment*

Přehledové články – Review papers

M. BITTNER

51

Metody odstraňování endokrinních disruptorů z vod • *Removing of endocrine disruptors from water*

Pokyny pro autory

61



POROVNÁNÍ CITLIVOSTI PROTILÁTEK UŽÍVANÝCH K DETEKCI SINICOVÝCH TOXINŮ V PŘÍRODNÍCH VODÁCH

COMPARISON OF ANTIBODIES COMMONLY USED IN ELISA FOR MICROCYSTIN ANALYSES IN NATURAL WATERS

O. ADAMOVSÝ, L. BLÁHOVÁ, J. KOHOUTEK, M. ORAVEC, L. BLÁHA

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita (RECETOX), Kamenice 3, CZ-625 00 Brno, Česká republika, e-mail: adamovsky@recetox.muni.cz

ABSTRACT

Microcystins belong to the group of cyanobacterial hepatotoxins that are routinely monitored in natural waters in many countries. Analytical techniques focus mostly on the detection of microcystin-LR, in spite of the presence of other toxic microcystin congeners that significantly contribute to the total toxicity. Two commercially available antibodies, MC10E7 and AD4G2, for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and LC-MS were compared for the detection of a mixture of microcystins (MCs) in raw waters. The suitability of the antibodies for detecting different toxin variants was evaluated using pure toxins in the range 0.06–10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The cross-reactivity of microcystin-RR and -YR was higher using AD4G2 (111 ± 13 , 110 ± 13) than MC10E7 (68 ± 24 , 81 ± 26), showing the higher sensitivity of AD4G2 in detecting a wider range of MC congeners. Further, eight samples of natural cyanobacterial water of different MC composition determined by LC-MS were chosen for comparison of both antibodies in detecting MC in real water samples. In 6 out of 9 samples, ELISA using AD4G2 showed higher MC concentrations than MC10E7, showing the better affinity of AD4G2 for MCs. Our data bring detailed information about the most common screening method for MC detection in raw waters and show the limitations of both antibodies used in ELISA.

Klíčová slova: sinice, microcystin, kongenery, ELISA, AD4G2, MC10E7, LC-MS.

Keywords: cyanobacteria, microcystin, congeners, ELISA, AD4G2, MC10E7, LC-MS.

ÚVOD

Toxický vodní květ sinic je významný environmentální problém v mnoha sladkovodních vodách po celém světě. V České republice se vodní květy sinic vyskytují v 80 % nádrží, včetně nádrží sloužících jako zdroj pitné vody. Biomasa sinic obsahuje asi v 90 % případů toxický peptid microcystin (Marsalek a kol., 2001; Blahova a kol., 2007). Microcystiny (MCs) jsou rozmanitou skupinou cyklických heptapeptidů s hepatotoxickou a promočně karcinogenní aktivitou (Welker a von Dohren, 2006). V prostředí mohou být přítomny MCs v nebezpečných koncentracích (Chorus a Bartram, 1999). Microcystiny jsou často detekovány ve zdrojích pitné vody, které tak reprezentují potencionální zdravotní riziko. Studie z Číny prokazují souvislost vyšší koincidence rakoviny jater u lidí dlouhodobě používající zdroj pitné vody s výskytem MCs (Ueno a kol., 1996; Chen a kol., 2009).

Světová zdravotnická organizace doporučila limit pro tolerovaný denní příjem pro microcystiny, konkrétně však pouze pro jeden kongener, a to microcystin-LR (WHO, 1998), ačkoli microcystiny jsou často přítomny jako směs různých variant (kongenerů) (Chorus a Bartram, 1999; Teneva a kol., 2010). Tento fakt by měl být brán v úvahu v procesu hodnocení rizik. Bylo vyvinuto několik metod pro identifikaci MCs v přírodních vzorcích vod (Lawton a kol., 1994), avšak imunoanalytická metoda detekce ELISA ukazuje schopnost stanovit MCs ve velmi nízkých koncentracích bez nutnosti komplikované a časově náročné úpravy vzorků. V metodě ELISA se používá několik typů protilátek, které však mají zásadní vliv na schopnost stanovit rozdílné kongenery MCs.

V naší studii jsme porovnali citlivost dvou typů monoklonálních protilátek používaných v metodě ELISA. První protilátka MC10E7 (Alexis, kat.č. ALX-804-320) vyvinutá specificky proti MC-LR, druhá protilátka AD4G2 (Alexis, kat.č. ALX-804-585) byla vyvinutá proti neobvyklé hydrofobní aminokyselině ADDA, která je charakteristická pro všechny kongenery MC a je zodpovědná za toxický efekt MC (Sivonen a Jones, 1999). Vzorky přírodních vod byly použity pro studium citlivosti metody ELISA a výsledky jsme porovnali s instrumentální metodou LC-MS, která stanovuje přesnou koncentraci MC jak ve vodě, tak v biomase sinic. Výsledek kalkulací potenciálního rizika spojených s obsahem MC ve vzorku stanoveného jednotlivými metodami diskutujeme v tomto příspěvku.

MATERIÁL A METODIKA

ODBĚR VZORKŮ A EXTRAKCE

Vzorky vod byly odebrány během sezony 2007 z lokalit v České republice, většina z nich slouží jako zdroj pitné vody. Biomasa byla odebírána pomocí planktonní sítky 20 μm a uchována v mrazáku -20 °C. Vzorky biomasy byly lyofilizovány a dále extrahovány 50% metanolem za pomoci ultrazvuku. Vzorek biomasy byl dále filtrován přes střičáčkový filtr 0,45 μm a dále použit pro analýzu.

IMUNOANALYTICKÁ METODA ELISA

Ve studii byla použita přímá kompetitivní metoda ELISA popsána Zeckem a kol., 2001 a s modifikacemi detailně popsanými ve studii Blahova a kol., 2007. Metoda využívá 96jamkové, vysoce vazné mikroděsky (Nunc, Wiesbaden, Germany), které se inkubují po dvanáct hodin s kozí polyklonální anti-myší anti-Fc IgG protilátkou (ICN MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Po odmytí nenavázané protilátky se deska jednu hodinu inkubuje s myší monoklonální protilátkou IgG (MC10E7, nebo AD4G2 – Alexis Biochemicals, USA). Následná kolorimetrická reakce je založena na kompetici volného microcystinu ve vzorku a konjugátu MC-LR-křenová peroxidáza.

Aktivita křenové peroxidázy je stanovena s použitím substrátu 3,3 5,5-tetramethylbenzidine (absorpční vlnová délka, 420 nm; referenční vlnová délka 660 nm) na destičkovém spektrofotometru (BioTek Instruments, Vermont, USA). Každý vzorek byl analyzován v triplicátu. Výsledná koncentrace MC ve vzorku byla vypočítána na základě kalibrační křivky (0,125 až 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$), která byla stanovena pro každé měření zvlášť. Kalibrační křivky čistých toxinů MC-LR, -RR, -YR byly získány na základě dvou nezávislých měření, reálné vzorky vod byly měřeny jednou.

DETERMINACE MC V BIOMASE SINIC POMOCÍ HPLC

Extrakty biomasy sinic připravené extrakcí s 50% MeOH byly analyzovány na HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s použitím kolony Supelcosil ABZ Plus, 150 × 4,6 mm, 5 μm (Supelco), pracovní teplota 30 °C (Adamovský a kol., 2007). Použitý binární gradient mobilních fází se skládal z (A) H₂O + 0,1% TFA a (B) acetonitril + 0,1% TFA (lineární nárůst z 20% B v 0 min na 59% B v 30 min); průtok 1 mL.min⁻¹. Chromatogram byl získán detektorem při 238 nm (Agilent 1100 Series PDA detector – Agilent Technologies), MC byly identifikovány podle jejich specifických retenčních časů a charakteristických UV absorpčních spekter (200–300 nm). Kalibrace HPLC systému byla provedena s využitím externích standardů MC-LR, -RR a -YR.

DETEKCE MC METODOU LC-MS

Microcystiny ve vzorcích přírodních vod byly analyzovány metodou HPLC-MS (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) za použití kolony Supelcosil ABZ Plus 150 × 4,6 mm, 5 μm a binárního gradientu mobilních fází (A) H₂O + 0,1% TFA, (B) MeCN + 0,1% TFA; průtok 0,4 mL.min⁻¹ při 30 °C. Lineární gradient stoupal z 30% B v čase 0 min na 60 % B v 30 min. Chromatogram byl zaznamenáván hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem Agilent 6410 (Agilent Technologies). Záznam hmotnostního spektra byl získán v pozitivním ESI módu s nastavenými parametry iontového zdroje: kapilární napětí 5500 V; sušící plyn – dusík; teplota – 350 °C, průtok plynu 11 mL.min⁻¹; tlak ve zmlžovači – 50 psi. Spektrum bylo zaznamenáváno v SIM módu se záznamem m/z 519,8 pro MC-RR [M+2H]²⁺, 1045,5 pro MC-YR [M+H]⁺, 995,5 pro MC-LR [M+H]⁺. Kvantifikace byla založena na externích standardech MC-LR, -RR, -YR.

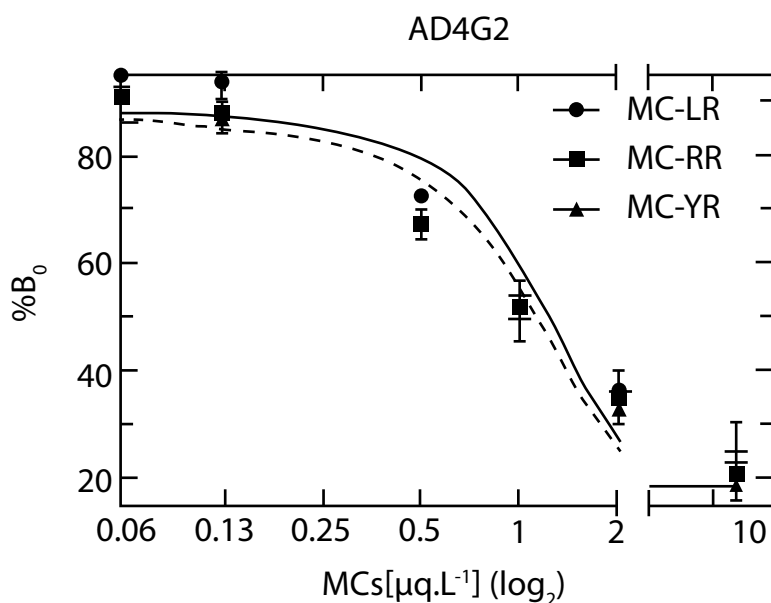
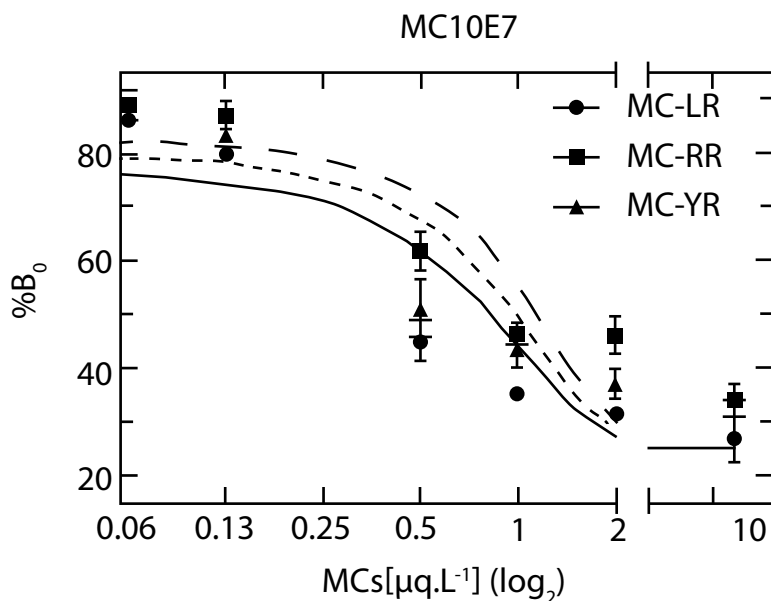
VÝSLEDKY A DISKUSE

Některé z dříve publikovaných studií se zabývají porovnáváním analytických metod pro detekci microcystinů (Rapala a kol., 2002). Nicméně studie porovnávající rozdílné analytické techniky jako ELISA, HPLC, LC-MS na přírodních vzorcích vod jsou velmi vzácné. Předkládané výsledky studie hodnotí vlastnosti imunoanalytické metody ELISA založené na dvou různých protilátkách a metodu kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí na vzorcích přírodních vod z lokality v České republice.

Prvním dílčím úkolem bylo hodnocení schopnosti dvou komerčně dostupných protilátek stanovit nejběžněji se vyskytující kongenery microcystinu (Blahova a kol., 2007). Každá z protilátek byla testována na její křížovou reaktivitu s několika kongenery microcystinu. Ze získaných kalibračních křivek (0,06–10 μg.L⁻¹) byl vypočítán IC₅₀ s použitím nelineární regrese (GrapPad v.5 software). Jak ukazuje graf 1, hodnoty IC₅₀ první protilátky MC10E7 jsou 0,63, 0,92 a 0,77 μg.L⁻¹ pro MC-LR, -RR, -YR zatímco relativně vyšší hodnoty byly pozorovány u protilátky AD4G2 (IC₅₀ 1,08, 0,97, 0,98 μg.L⁻¹ pro MC-LR, -RR, -YR). Ačkoli se obě testované protilátky liší v citlivosti pro jednotlivé varianty (kongenery) microcystinů, jejich detekční limit je pod 1 μg.L⁻¹, tedy limitem stanoveným WHO pro MC-LR v pitné vodě (WHO, 1998). Obě protilátky jsou tedy vhodné pro přímou aplikaci a analýzu bez nutnosti drahého a časově náročného procesu zakoncentrovávání vzorků.

Graf 1: Kalibrační křivka microcystinu -LR, -RR, -YR v koncentračním rozmezí 0,06–10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (osa X) pro dvě komerčně nabízené protilátky vyvinuté proti MC-LR (MC10E7) a proti aminokyselině ADDA přítomné v každém kongeneru MC (AD4G2). Osa Y (%B₀) reprezentuje procento z absorbance negativního vzorků – blanku. Data reprezentují dvě nezávislá měření, každé děláno v triplikátu. Křivka využívá nelineární regrese jako statistického modelu.

Graph 1: ELISA calibration curves for microcystin-LR, -RR, -YR for the range 0.06-10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (axis X) using two commercial antibodies developed against MC-LR (MC10E7) and against amino acid ADDA present in all MC congeners (AD4G2). Axis Y (%B₀) represents the percentage of absorbance of the blank sample. Data represent the mean of two independent experiments, each conducted in three replicates. The curve was created using non-linear regression as a statistical model.

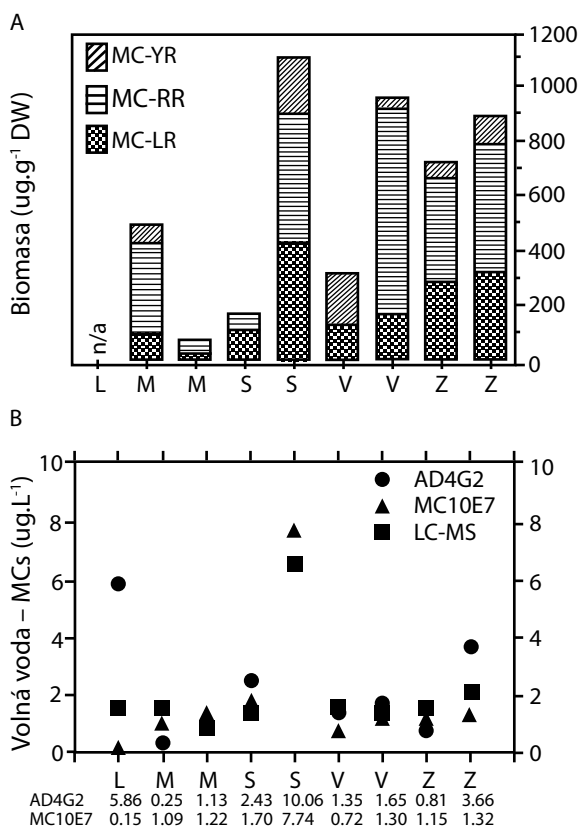


Křížová reaktivita protilátky byla počítána jako poměr hodnot IC_{50} MC-LR a IC_{50} ostatních kongenerů MC. Pro protilátku MC10E7 jsou hodnoty křížových reaktivit 68 ± 24 a 81 ± 26 pro MC-RR a YR. Protilátka proti ADDA (AD4G2) vykazuje vyšší hodnoty pro MC-RR a MC-YR 111 ± 13 a 110 ± 13 . Výsledky ukazují na větší citlivost AD4G2 pro různé varianty microcystinů, včetně těch, jež se v přírodě nenalézají tak často (Zeck a kol., 2001b), nicméně řada z nich se může vyskytovat v přírodě i ve vyšších koncentracích než nejčastěji stanovovaný MC-LR (Blahova a kol., 2007).

Součástí naší studie je hodnocení přírodních vzorků vod z lokalit v České republice a porovnání výsledků získaných použitím rozdílných protilátek v metodě ELISA. Sinicová biomasa, primární zdroj sledovaných toxinů, měla variabilní složení microcystinů na jednotlivých lokalitách (graf 2A). MC-LR byl nejvíce abundantní pouze v jednom z osmi případů biomasy (graf 2A). Analýza vzorků vod ze stejných lokalit metodou LC-MS, která umožňuje identifikaci jednotlivých kongenerů, ukázala ve většině případů porovnatelné zastoupení microcystinů – MC-LR byl dominantní pouze v 1 z 9 vzorků vod.

Graf 2: Koncentrace microcystinů v 5 nádržích v České republice (každá lokalita byla vzorkována 2x (označení vzorků 1 a 2) během letní sezóny 2007; L-Ludkovice, M. Máchovo jezero, S-Skalka, V-Vír, Z-Zelivka). (A) – koncentrace jednotlivých kongenerů MC v biomase ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW); (B) – koncentrace microcystinů v surové vodě ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) analyzované technikou LC-MS a ELISA (MC10E7, AD4G2). Tabeľované hodnoty v dolní části grafu porovnávají celkové koncentrace MCs naměřené metodou ELISA s použitím protilátek AD4G2 a MC10E7.

Graph 2: Concentrations of MCs in 5 reservoirs from the Czech Republic (each locality was sampled 1 or 2 times during the summer of 2007; L-Ludkovice, M. Machovo jezero, S-Skalka, V-Vir, Z-Zelivka reservoirs). (A) – concentrations of individual MC congeners in biomass ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW); (B) – concentrations of microcystins in raw water ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) determined by LC-MS and ELISA (MC10E7, AD4G2). Tabulated values at the bottom show total microcystin concentrations measured by ELISA using the different antibodies AD4G2 and MC10E7.



Vzorky vod byly také analyzovány metodou ELISA poskytující informaci o celkové koncentraci MC bez rozlišení jednotlivých variant (graf 2B). V šesti z devíti vzorků, ELISA používající protilátku AD4G2, naměřila vyšší koncentrace než při použití protilátky MC10E7 (graf 2B) což pozitivně koreluje s vyšší křížovou reaktivitou AD4G2 pro jednotlivé kongenery MC. Za zvýšenou koncentrací jsou zodpovědné ty kongenery microcystinu, pro které je AD4G2 více citlivá. Pro tři analyzované vzorky byly hodnoty koncentrací MC vyšší při použití protilátky MC10E7, což může být vysvětlováno komplexním složením vzorku, jeho vlivem na samotnou analýzu a obecnou limitací imunoanalytických metod. Podle dostupné literatury, mnoha studií a hodnocení koncentrace MC používá metodu ELISA s protilátkou MC10E7, která má menší hodnoty křížových reaktivit a může tak podhodnotit koncentrace ostatních MC variant jako MC-RR, -YR, -LA, -LW aj. (Gurbuz a kol., 2009; Adamovsky a kol., 2007).

Výsledky naší studie ukazují na rozdíly v analýzách přírodních vod na obsah microcystinu při použití různých protilátek v analytické metodě. Vhodný výběr složení imunoanalytické metody je nezbytný předpoklad pro přesné hodnocení koncentrace MC ve vzorcích přírodních vod, zejména však pro analýzu zdravotních a jiných rizik spojených s výskytem microcystinů. Podhodnocení reálné koncentrace MC může vést k podhodnocení rizika, jak jej definuje světová zdravotnická organizace WHO (WHO, 1998).

SOUHRN

Analytické metody se většinou zaměřují na stanovení microcystinu-LR, přestože i ostatní kongenery microcystinů výrazně přispívají k celkové toxicitě. Dvě komerčně dostupné protilátky, MC10E7 a AD4G2 pro imunoanalytickou metodu ELISA, a instrumentální metoda LC-MS byly porovnány v citlivosti detekce směsi microcystinů (MCs) v přírodních vodách. Citlivost jednotlivých protilátek pro jednotlivé čisté varianty microcystinu byla testována v kalibračním rozmezí 0,06–10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Křížová reaktivita microcystinu -RR a -YR byla vyšší pro protilátku AD4G2 (111 ± 13 , 110 ± 13) než pro MC10E7 (68 ± 24 , 81 ± 26). Výsledky ukazují na vyšší senzitivitu protilátky AD4G2 v detekci širšího spektra kongenerů microcystinů. Rozdílnost citlivosti metod byla následně porovnána na 9 přírodních vzorcích vod s obsahem microcystinů stanovených metodou LC-MS. V 6 vzorcích ELISA používající protilátku AD4G2 prokázala vyšší koncentraci MCs než MC10E7 ukazující vyšší afinitu AD4G2 ke sledovaným toxinům. Výsledky studie ukazují významné rozdíly v senzitivitě protilátek běžně používaných pro detekci MCs v přírodních vodách a ukazují na limitace obou protilátek používaných v imunoanalytické metodě ELISA.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla financována projektem CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001) Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace Evropského fondu pro regionální rozvoj a grantem Ministerstva školství ČR (projekt č. MSM 0021622412 INCHEMBIOL).

LITERATURA

- Adamovsky, O., Kopp, R., Hilscherova, K., Babica, P., Palikova, M., Paskova, V., Navratil, S., Marsalek, B., Blaha, L., 2007. Microcystin kinetics (bioaccumulation, elimination) and biochemical responses in common carp and silver carp exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2687–2693.
- Blahova, L., Babica, P., Marsalkova, E., Marsalek, B., Blaha, L., 2007. Concentrations and seasonal trends of extracellular microcystins in freshwaters of the Czech Republic results of the national monitoring program. *Clean-Soil Air Water*, 35(4): 348–354.
- Gurbuz, F., Metcalf, J. S., Karahan, A. G., Codd, G. A., 2009. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407(13): 4038–4046.
- Chen, J., Xie, P., Li, L., Xu, J., 2009. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicological Sciences*, 108(1): 81–9.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, E&FN Spon.
- Lawton, L. A., Edwards, C., Codd, G. A., 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 119: 1525–1530.
- Marsalek, B., Blaha, L., Turanek, J., Neca, J., 2001. Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech republic 1993–1998. *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Chorus, I. Berlin, Springer-Verlag, 56–62.
- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K., 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay – Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*, 466(2): 213–231.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*: 41–111.
- Teneva, I., Mladenov, R., Belkinova, D., Dimitrova-Dyulgerova, I., Dzhabazov, B., 2010. Phytoplankton community of the drinking water supply reservoir Borovitsa (South Bulgaria) with an emphasis on cyanotoxins and water quality. *Central European Journal of Biology*, 5(2): 231–239.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. D., Chen, G. C., Chen, G., Yu, S. Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6): 1317–1321.
- Welker, M., von Dohren, H., 2006. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. *Fems Microbiological Reviews*, 30(4): 530–563.
- WHO, 1998. *Guidelines for drinking water quality*. Geneva, World Health Organisation.
- Zeck, A., Eikenberg, A., Weller, M. G., Niessner, R., 2001a. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 441: 1–13.
- Zeck, A., Weller, M. G., Bursill, D., Niessner, R., 2001b. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst*, 126: 2000–2007.



STUDIUM ÚČINKŮ PALADIA NA ZÁSTUPCE PRODUCENTŮ VE VODNÍCH EKOSYSTÉMECH

STUDY OF THE IMPACT OF PALLADIUM ON PRODUCERS IN AQUATIC ECOSYSTEMS

I. BEDNÁŘOVÁ, M. BEKLOVÁ

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H08001@vfu.cz, beklovam@vfu.cz

ABSTRACT

The production of pollutants resulting from fuel combustion, particularly carbon monoxide and oxides of nitrogen, is eliminated by catalysts. As a catalytically active substance are used platinum group metals. The automotive catalysts are exposed to extreme thermal variations leading to the release of platinum group metals into the environment. From the assessing of the effects of chemical substances, using ecotoxicological bioassays with different trophic levels, can be obtained very valuable information of bioavailability in the ecosystems. Experimentally, we verified the influence of palladium (PdCl_2) on the growth of duckweed (*Lemna minor*), representing the aquatic trophic level of producers. The experiment was carried out according to the methodology specified in CSN EN ISO 20079, using micro-volumes of various concentrations of PdCl_2 in polystyrene macrotitration plates. The value of the effective concentration of PdCl_2 , which causes 50% inhibition of growth of duckweed compared to the control of a time period of 168 ± 2 hours, calculated on the basis of the specific growth rate (μ) was $45.20 \mu\text{M}$. The value of the effective concentration calculated on the basis of the final amount of biomass determined by image analysis was $8.58 \mu\text{M}$. When we compared the obtained values of effective concentrations (168hEC50) we can say that the method using the image analysis appears to be more sensitive.

Klíčová slova: okřehek menší (*Lemna minor*), platinové kovy, paladium, ekotoxikologické biotesty
Keywords: duckweed (*Lemna minor*), platinum group metals, palladium, ecotoxicological biotest

ÚVOD

Doprava patří mezi významné faktory rozvoje společnosti. Z jedné strany je nezbytnou každodenní nutností, ale současně se řadí k nejméně významným zdrojům emisí, které kontaminují životní prostředí (Dubielka-Jackowska a kol., 2009). Problematika dopravy ve vztahu k životnímu prostředí nabývá na aktuálnosti zejména z důvodu narůstajícího počtu osobních i nákladních vozidel. K nejzávažnějším problémům dopravy z hlediska negativního vlivu na zdraví člověka, je emisní znečištění ovzduší, avšak nezanedbatelný je i vliv dopravy na další složky životního prostředí, jako jsou voda a půda. Zejména kvalita povrchových a podzemních vod, které jsou nezbytným surovinovým zdrojem, může být negativně ovlivněna nejrozličnějšími druhy dopravy. V souvislosti se snižováním kvality povrchových a podzemních vod a vzhledem k omezeným zdrojům pitné vody nabývá na významu komplexní ochrana vodních ekosystémů (Šupálková, 2008). K posouzení kvality vodních ekosystémů významně přispívá bioindikace a ekologický monitoring ekotoxikologických změn ve vodním prostředí (Beklová, 2003).

V současné době se v souvislosti se zátěží životního prostředí dopravou soustřeďuje pozornost na platinové kovy, jmenovitě na platinu (Pt), paladium (Pd) a rhodium (Rh) (Wiseman a Zereini, 2009). Tyto kovy se přirozeně vyskytují v životním prostředí jen ve velmi malých množstvích, a to v zemské kůře. Jejich hlavním zdrojem jsou sulfidické rudy obsahující společně nikl a měď, které se nacházejí zejména v Jižní Africe, Kanadě a na Urale. Jejich mimořádná chemická odolnost a mechanické vlastnosti je předurčují pro řadu nejrůznějších aplikací. K nárůstu koncentrací těchto kovů v životním prostředí došlo zejména v posledních třiceti letech právě v souvislosti s narůstající dopravou. Ve snaze snížit produkci škodlivin vznikajících při spalování pohonných hmot byly zaváděny katalyzátory, které slouží k usnadnění oxidačně-redukčních reakcí vedoucích k čištění výfukových plynů (Sikorová a kol., 2011). Používání automobilových katalyzátorů, ve kterých se jako katalyticky účinná substance používá směs platinových kovů, má za následek jejich uvolňování do životního prostředí, což může mít negativní vliv na živé organismy a v neposlední řadě na zdraví člověka (Wiseman a Zereini, 2009, Palacois a kol., 2000, Rauch a kol., 2001, Zereini a kol., 2001, Schäfer a kol., 1998, Djingova a kol., 2003, Moldovan a kol., 2001). Ekotoxikologická analýza, která je založena na stanovení toxických efektů (mortalita, imobilizace, inhibice apod.) u vhodných rostlinných a živočišných druhů, se používá pro určení množství těchto kovů v různých složkách životního prostředí, zejména pro odhad expozice a souvisejících potenciálních rizik pro člověka a další terestrické i vodní organismy (Sikorová a kol., 2011, Soukupová a Beklová, 2009). K posouzení ekotoxických změn ve vodním ekosystému se využívají organismy, které v rámci potravního řetězce zastupují jednotlivé trofické úrovně. Z producentů je to zejména vyšší cévnatá rostlina okřehek menší (*Lemna minor*) (Beklová, 2003). V souvislosti s platinovými kovy byl doposud sledován pouze vliv cytostatika cisplatinu na inhibici růstu *Pseudokirchneriella subcapitata* (Zounková a kol., 2007) a na inhibici růstu okřešku menšího (Zehnálek a kol., 2004).

Cílem práce bylo studium účinku paladia na vegetativní růst kolonií okřešku menšího, jakožto zástupce producentů ve vodním ekosystému. Byl proveden test inhibice růstu okřešku menšího s cílem stanovit akutní toxicitu (168hEC50) chloridu paladnatého (PdCl_2). Hodnotícím kritériem byla průměrná specifická rychlost růstu (μ) a konečné množství biomasy. Konečné množství biomasy bylo hodnoceno na základě celkové plochy lístků stanovené obrazovou analýzou.

MATERIÁL A METODIKA

Test na okřešku byl proveden podle námi modifikované metodiky uvedené v normě ČSN EN ISO 20079 – Jakost vod – Stanovení účinků složek vody a odpadní vody na okřehek menší (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřešku. Modifikace metody spočívá v její miniaturizaci s použitím menšího objemu vzorků a menšího počtu použitých rostlinek, ale současně také v navýšení počtu opakování. Rostlinky byly kultivovány po dobu sedmi dnů v různých koncentracích testované látky (PdCl_2), rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS (Swedish Standard Medium). V testu bylo využito polystyrenových makrotitračních destiček s plochým dnem, s šesti jamkami a maximálním objemem 15 ml a víčkem. Pracovali jsme s objemem vzorků 10 ml. Jednotlivé jamky mají v průměru 4 cm, spodní díl destičky je konstruován tak, že víčko těsně nedoléhá a je zde vytvořen prostor pro volný přístup kyslíku k rostlinám. Do jednotlivých jamek s připravenými koncentracemi PdCl_2 a kontrolních jamek s živným roztokem byly pomocí inokulační kličky přeneseny kolonie okřešku sestávající z pěti lístků. V intervalu 24 hodin byl zaznamenáván stav rostlin a počet lístků. Pro posouzení účinku

paladia na vegetativní růst okřešku menšího byly použity koncentrace 0, 10, 25, 50, 100 μM v pěti opakováních pro každou koncentraci a kontrolu. Validací podmínky testu byly dodrženy. Tato miniaturizovaná metodika byla již experimentálně ověřena na standardech a jeví se jako vhodná alternativa ke konvenčním, standardně používaným ekotoxikologickým biotestům (Soukupová a Beklová, 2009).

Stanovení inhibice růstu, porovnáním růstových rychlostí okřešku menšího v testovaných koncentracích a kontrole, bylo provedeno podle výpočtu uvedeného v citované normě. Inhibice růstu okřešku menšího, na základě konečného množství biomasy, byla vyhodnocena počítačovým programem Cell*D, pracujícím na základě analýzy obrazu celkové plochy lístků pokrývajících hladinu jednotlivých jamek v makrotitračních destičkách.

VÝSLEDKY

Hodnota akutní toxicity PdCl_2 , vypočtená na základě průměrné specifické rychlosti růstu (μ), byla $168\text{hEC}_{50} = 45,20 \mu\text{M}$. Účinek PdCl_2 na konečné množství biomasy, stanovený obrazovou analýzou, byl na základě výpočtu $168\text{hEC}_{50} = 8,58 \mu\text{M}$. Nižší hodnota efektivní koncentrace ukazuje, že metoda hodnocení účinku testované látky na konečné množství biomasy je citlivější.

DISKUSE

Nebezpečnost platinových kovů v životním prostředí, závisí významně na formě kovu a její biologické dostupnosti, která úzce souvisí s rozpustností a mobilitou. Platinové kovy jsou emitovány převážně v kovové formě, dlouhou dobu proto byly považovány za inertní a tím i téměř nedostupné pro živé organismy, což potvrzovala mimo jiné studie stanovující ve výfukových plynech pouze 1 % Pt v rozpustné formě (Artelt a kol., 1999). Novější studie však popisují vyšší podíl rozpustných forem platinových kovů. Za nejvíce rozpustné a mobilní v životním prostředí, a tedy s největším potenciálem vstřebávat se do organismu, je považováno paladium (Moldovan a kol., 2001, Sikorová a kol., 2011).

Ke studiu a porovnání účinků paladia na zástupce producentů ve vodním ekosystému jsme zvolili okřehek menší, který patří mezi významné bioindikátory ekotoxických změn. K bioindikaci mají mnoho vhodných vlastností. Jsou to zejména malá velikost, rychlý vegetativní růst a snadná kultivace v laboratorních podmínkách. Vzhledem ke schopnosti kumulovat kovy jsou vhodné pro použití při monitorování kvality vody a v laboratorních testech toxicity (Beklová, 2001; Horvat a kol., 2007).

Při porovnávání získaných hodnot efektivních koncentrací lze říci, že metoda k stanovení účinků polutantů na konečné množství biomasy s využitím obrazové analýzy se jeví senzitivnější. Je tomu tak zřejmě proto, že je založena na hodnocení celkové plochy lístků pokrývajících hladinu jednotlivých jamek v makrotitračních destičkách. Kdežto metoda stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí je založena na počtu lístků. Lze z toho usuzovat, že toxický efekt přítomného kovu na okřehek se projevuje spíše ve zmenšování velikosti a tím i plochy narůstajících lístků než v jejich počtu jako takovém. Proto je metoda hodnocení toxického vlivu polutantu na růst okřešku menšího na základě konečného množství biomasy s využitím obrazové analýzy a počítačového programu Cell*D pro vyhodnocování vhodnější.

Z výsledku našeho experimentu je zřejmé, že paladium ve vodním prostředí působí jako významný inhibitor růstu, a to již ve velmi nízkých koncentracích.

SOUHRN

Produkce škodlivin vznikajících při spalování pohonných hmot, zejména oxidu uhelnatého a oxidů dusíku, je eliminována zaváděním katalyzátorů, ve kterých se používá jako katalyticky účinná substance směs platinových kovů. Vzhledem k tomu, že katalyzátory jsou vystavovány velkým tepelným rozdílům, dochází k uvolňování platinových kovů do životního prostředí. Ekotoxikologickými biotesty, kdy se k hodnocení vlivu testovaných látek na biotickou složku využívají zástupci různých trofických úrovní ekosystémů, lze získat velmi cenné informace o jejich biodostupnosti. Experimentálně jsme ověřili vliv paladia (PdCl_2) na růst okřešku menšího zastupujícího ve vodním prostředí trofickou úroveň producentů. Experiment byl proveden podle metodiky uvedené v ČSN EN ISO 20079 za použití mikroobjemů různých koncentrací PdCl_2 v polystyrenových makrotitračních destičkách. Hodnota efektivní koncentrace PdCl_2 , která způsobí 50% inhibici růstu okřešku menšího ve srovnání s kontrolou v časovém úseku 168 ± 2 hodin, vypočtená na základě specifické rychlosti růstu (μ), byla $45,20 \mu\text{M}$. Hodnota efektivní koncentrace, vypočtená na základě konečného množství biomasy stanovené analýzou obrazu, byla $8,58 \mu\text{M}$. Při porovnávání získaných hodnot efektivních koncentrací (168h EC_{50}) lze říci, že metoda s využitím obrazové analýzy se jeví jako senzitivnější.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla realizovaná na základě poskytnuté finanční podpory MŠMT 6215712402 a IGA 82/2011/FVHE.

LITERATURA

- Artelt, S., Kock, H., König, H. P., Levsen, K., Rosner, G., 1999. Engine dynamometer experiments: platinum emissions from differently aged three-way catalytic converters. *Atmospheric Environment*, 33(21): 3559–3567.
- Beklová, M., 2001. Toxicita dichromanu draselného pro okřehek menší *Lemna minor* (Toxicity of potassium dichromate in duckweed *Lemna minor*). In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. Vodňany, 184–188.
- Beklová, M., 2003. Využití okřešku menšího *Lemna minor* ve vodní toxikologii (Use of Duckweed *Lemna minor* in Aquatic Toxicology). In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. Soláň, 16–20.
- Djingova, R., Kovacheva, P., Wagner, G., Markert, B., 2003. Distribution of platinum group elements and other traffic related elements among different plants along some highways in Germany. *Science of the Total Environment*, 308: 235–246.
- Dubiella-Jackowska, A., Kudlak, B., Polkowska, Z., Namiesnik, J., 2009. Environmental fate of traffic-derived platinum group metals. *Critical Review in Analytical Chemistry*, 39(4): 25–271.
- Horvat, T., Vidakovic-Cifrek, Z., Orescanin, V., Tkalec, M., Pevalek-Kozlina, B., 2007. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*, 384(1-3): 229–238.
- Moldovan, M., Rauch, S., Gomez, M., Palacios, M., Morrison, G., M., 2001. Bioaccumulation of palladium, platinum and rhodium from urban particulates and sediments by the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Research*, 35: 4175–83.
- Palacois, M., Gomez, M., Moldovan, M., Morison, G., Rauch, S., McLeold, C., Ma, R., Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, F., Bocca, B., Schramel, P., Lustig, S., Zischka, M., Wass, U.,

- Stenbom, B., Luna, M., Saenz, J., C., Santamaría, J., Torrens, J., M., 2000. Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. *Science of the Total Environment*, 257(1): 1–5.
- Rauch, S., Lu, M., Morrison, G., M., 2001. Heterogeneity of platinum group metals in airborne particles. *Environmental Science and Technology*, 35: 595–9.
- Schäfer, J., Hannker, D., Eckhardt, J., D., Stüben, D., 1998. Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements (PGE) by plants. *Science of the Total Environment*, 215: 59–67.
- Sikorová, L., Ličbinský, R., Adamec, V., 2011. Platinové kovy z automobilových katalyzátorů v životním prostředí. *Chemické Listy*, 105: 361–366.
- Soukupová, I., Beklová, M., 2009. Ověření mikrometody pro stanovení toxických účinků chemických látek na okřehek menší (*Lemna minor*) (Verification of microbiotest application for assessing toxic impact of chemicals in duckweed (*Lemna minor*). *Bulletin VÚRH Vodňany*, 45(4): 52–55.
- Šupálková, V., Beklová, M., Baloun, J., Singer, C., Sures, B., Adam, V., Húska, D., Pikula, J., Rauscherová, L., Havel, L., Zehnálek, J., Kizek, R., 2008. Affecting of aquatic vascular plant *Lemna minor* by cisplatin revealed by voltammetry. *Bioelectrochemistry*, 72: 59–65.
- Wiseman, C., L., S., Zereini, F., 2009. Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: a review of recent evidence. *Science of the Total Environment*, 407(8): 2493–500.
- Zehnálek, J., Vacek, J., Kizek, R., 2004. Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals. *Listy cukrovarnické řepařské*, 120: 220–21.
- Zereini, F., Wiseman, C., Alt, F., Messerschmidt, J., Müller, J., Urban, H., 2001. Platinum and rhodium concentrations in airborne particulate matter in Germany from 1988 to 1998. *Science of the Total Environment*, 35: 1996–2000.
- Zounková, R., Odrážka, P., Doležalová, L., Hilscherová, K., Mašálek, B., Bláha, L., 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (10): 2208–214.



VLIV VYBRANÝCH ROZPOUŠTĚDEL NA EMBRYONÁLNÍ STADIA DANIO RERIO

EFFECT OF SELECTED CARRIER SOLVENTS ON EMBRYONAL STAGES OF DANIO RERIO

L. CHROMCOVÁ, S. MÁCOVÁ, L. PLHALOVÁ, E. PRÁŠKOVÁ, Z. SVOBODOVÁ

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10028@vfu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effects of selected solvents (ethanol, acetone, dimethylsulfoxide) on the embryonic stages of zebrafish (*Danio rerio*), to record mortality and different types of changes of embryos after 48 and 96 -hour exposure to solvents in different concentrations. Among the types of observed changes belong: oedema, tail and eye defect, weak pigmentation and deformation of the body. Based on the results were determined the values of NOEC and LOEC. Embryonic toxicity test was conducted according to the OECD guideline 212. Ethanol was tested in concentrations 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2%; acetone in the range of concentrations 0.1, 0.5, 1, 1.25, 1.5%; dimethylsulfoxide 1, 1.5, 2, 2.5 and 3%. The LOEC value of ethanol was detected in 1% concentration of the solution. In this concentration were reported statistically significant changes (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation). After exposure of acetone there was the most common occurrence of oedema after 48-hour from 1% concentration and after 96 -hours from 0.5% concentration (LOEC = 0.5%). The solvent dimethylsulfoxide caused edema after 48 -hours in 2.5% concentration and after 96 -hour exposure at 2% concentration deformation of bodies were recorded. The LOEC value of DMSO was detected in 2% concentration. Based on the NOEC values, we concluded, in what concentrations are the solvents still appropriate. According to our results, the most suitable solvent is dimethylsulfoxide, which could be used up to 1.5% concentration. Ethanol could be used up to 0.5% concentration and at least suitable solvent is acetone, which can be used up to 0.1%. The determined concentrations NOEC of individual solvents are higher than the maximum recommended concentration for toxicity tests on fish. For this argument, it can be assumed that the concentration of solvent allowed by the norm does not affect the conduct and results of tests.

Klíčová slova: danio pruhované, embryonální test toxicity, ethanol, aceton, dimethylsulfoxid
Key word: zebrafish, embryonal tests toxicity, ethanol, acetone, dimethylsulfoxide

ÚVOD

V praxi se často setkáváme s požadavkem hodnocení toxicity látek, které jsou ve vodě špatně rozpustné. Aby bylo možné takovou látku testovat z hlediska toxicity pro vodní organismy, je třeba ji uvést do roztoku. K tomuto účelu jsou často používána organická rozpouštědla. Navzdory tomuto potenciálu mohou rozpouštědla zasahovat do samotného průběhu testu negativním působením na testované organismy a tímto způsobem ovlivňovat výsledky studií (El Jay, 1996, Hutchinson a kol., 2006, Ruffli a kol., 1998).

Metodika směrnice OECD 212 doporučuje přípravu testovaných roztoků látek se sníženou rozpustností ve vodě pomocí fyzikálních metod, jako je míchání, použití ultrazvuku anebo

syťící kolony. Tam, kde je to nezbytně nutné, povoluje použití následujících rozpouštědel: aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Pokud je k přípravě roztoků testované látky použito rozpouštědlo, jsou nasazovány 2 kontroly. V první kontrolní skupině jsou ryby chovány v ředící vodě bez přítomnosti testované látky, ve druhé kontrolní skupině je do vody přidáno použité rozpouštědlo tak, aby jeho výše odpovídala nejvyšší koncentraci rozpouštědla, která byla použita při přípravě roztoků. Výběr vhodného rozpouštědla vychází z charakteru testované látky a jeho koncentrace nesmí překročit hodnotu povolenou příslušným standardním postupem. Tato studie se zaměřuje na tři druhy rozpouštědel, kterými jsou ethanol, aceton a dimethylsulfoxid (DMSO). Syntetický ethanol se používá v chemickém průmyslu jako rozpouštědlo, dehydrogenační činidlo a zprostředkovatel organických syntéz. Rozpouští se ve vodném a taky lipidovém prostředí a snadno prochází biologickými membránami (Gandolli a kol., 1999c). Aceton se získává fermentací nebo chemickou syntézou a používá se k výrobě plastů, vláken, léků a dalších chemikálií, k rozpouštění tuků, olejů, vosků, pryskyřic a v laboratořích slouží k extrakci různých látek z živočišných a rostlinných tkání a jako dehydrogenační činidlo. DMSO má vynikající rozpouštěcí vlastnosti a zlepšuje propustnost kůže pro pronikání léků. Používá se v lokální aplikaci léčiv, k výrobě průmyslových vláken, průmyslových čisticích prostředků a nátěrů, při aplikaci pesticidů a jako přísada do nemrznoucích směsí a hydraulických kapalin (Gandolli a kol., 1999a,b; Wexler a kol., 2005a,b).

USA EPA z roku 1975 uvádí maximální akceptovatelné limity rozpouštědel užitých v testech toxicity na vodních organismech. Pro testy akutní toxicity je limit stanoven na 0,05 % a pro chronické testy toxicity je limit 0,01 % (Eaton a kol., 1975; Hallare a kol., 2006).

Danio pruhované (*Danio rerio*) patří mezi důležité modelové organismy ve vývojové biologii (Bilotta a kol., 2002). Existuje celá řada výhod proč ke studiím používat právě embrya *D. rerio*. K výhodám patří například to, že dospělci mají schopnost produkovat velké množství jiker a také proto, že tyto jikry jsou průhledné a jejich vývoj lze zkoumat, aniž by došlo k porušení vývoje (Bilotta a kol., 2002; Nagel, 2002).

Cílem této studie bylo zjistit účinky působení ethanolu, acetonu a DMSO v různých koncentracích na embrya *D. rerio*, sledovat mortalitu a morfologické změny (edém, abnormality ocasních částí těla a očí, sníženou pigmentaci a deformace těla) po 48 a 96 hodinovém působení těchto rozpouštědel a na základě získaných výsledků stanovit hodnoty NOEC a LOEC.

MATERIÁL A METODIKA

TESTOVANÉ LÁTKY

Pro studii byly vybrány tři druhy rozpouštědel – ethylalkohol MULTIPUR (CAS No. 64-17-5) CHROMSERVIS s.r.o., Česká republika, dimethylsulfoxid ACS (CAS No. 67-68-5) SIGMA-ALDRICH, CHEMIE GmbH, Německo a aceton (CAS No. 67-64-1) CHROMSERVIS s.r.o., Česká republika. Tato rozpouštědla byla použita v 5 rozdílných expozičních koncentracích. Ethylalkohol byl testován v koncentracích: 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dimethylsulfoxid 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% a aceton 0,1%, 0,5%, 1%, 1,25%, 1,5%.

POKUSNÝ MATERIÁL

Testování bylo provedeno na embryích dania pruhovaného (*D. rerio*). Oplozené jikry byly získány od stálého lokálního dodavatele. Pod lupou byly vybrány pouze jikry ve fázi blastuly (3–4 hodiny po oplození). Jikry byly umístěny po 10 kusech do Petriho misek s připravenými

roztoky testované látky. Kontrolní organismy byly umístěny do ředící vody bez přítomnosti testované látky. Každé z rozpouštědel se testovalo ve 12 sériích, to znamená, že u každé koncentrace i kontroly bylo použito 120 kusů embryí. Petriho misky s testovanými organismy byly dány do inkubátoru se stabilní teplotou 26,8 °C. Testování bylo ukončeno po vykulení a vstřebání žloutkového vřívku v kontrole.

TEST TOXICITY

Test toxicity na embryích byl proveden dle OECD 212 (Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages) semistatickou metodou.

Podmínky embryonálního testu toxicity:

- výměna lázně: 1 × za 24 hodin,
- objem roztoku: 20 ml,
- nasycení vody kyslíkem nad 60%,
- pH v rozmezí 7,5–8,5.

Ředící voda použitá v testu toxicity byla vodovodní odstátá voda, jejíž základní fyzikální a chemické parametry byly: $\text{KNK}_{4,5}$ 3,6–3,7 mmol.l⁻¹, CHSK_{Mn} 1,4–1,9 mg.l⁻¹, celkový amoniak pod mezí stanovitelnosti, NO_3^- 24,5–31,4 mg.l⁻¹, NO_2^- pod mezí stanovitelnosti, Cl^- 18,9–19,1 mg.l⁻¹, $\Sigma \text{Ca} + \text{Mg}$ 3,06 mmol.l⁻¹.

Doba líhnutí embryí a mortalita byla zaznamenána každých 24, 48, 72 a 96 hodin. Morfologické změny – edém, abnormality ocasní části těla a očí, snížená pigmentace a deformace těla byly pozorovány pomocí lupy po 48 a 96 hodinách.

STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Unistat 5.1. (Unistat Ltd., GB). Rozdíly četností sledovaných morfologických změn byly hodnoceny za použití kontingenčních tabulek. Statistické významnosti rozdílů byly hodnoceny na hladině významnosti * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

VÝSLEDKY

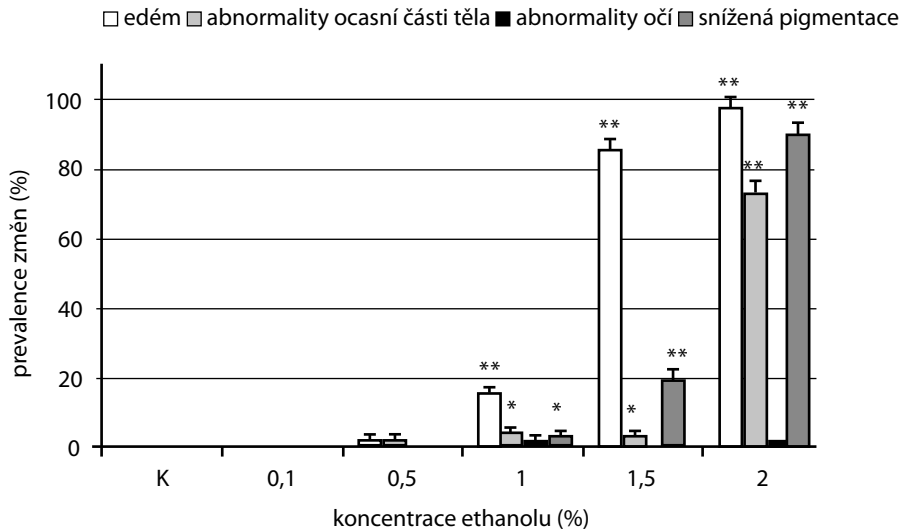
U pokusných organismů byl po 48 a 96hodinové expozici testovaným rozpouštědly – ethanolu, acetonu a DMSO zaznamenán výskyt morfologických změn, jako např. edém, abnormality ocasních částí těla a očí, snížená pigmentace a deformace těla. Procentuální zastoupení těchto abnormalit v jednotlivých koncentracích testované látky bylo statisticky vyhodnoceno. Pokřivení těla bylo sledováno až po 96 hodinách, neboť po 48 hodinách nebyla ještě vykulena všechna embrya a v důsledku toho by mohlo dojít ke zkeslení četnosti výskytu této změny.

Ethanol

Statisticky významný výskyt změn ($P < 0,05$) oproti kontrole byl zachycen po 48 hodinách od 1% koncentrace ethanolu (graf 1a). Po 96hodinovém působení ethanolu se vysoce statisticky významné změny ($P < 0,01$) objevily v 1% koncentraci (graf 1b). V 2% koncentraci došlo po 96hodinové expozici tímto rozpouštědlem k úhynu všech pokusných organismů, a proto nebylo možné zaznamenat morfologické změny, které se projeví v nižších koncentracích v průběhu expozice (graf 1b).

Graf 1a: Vliv ethanolu na jednotlivé morfologické změny po 48h expozici

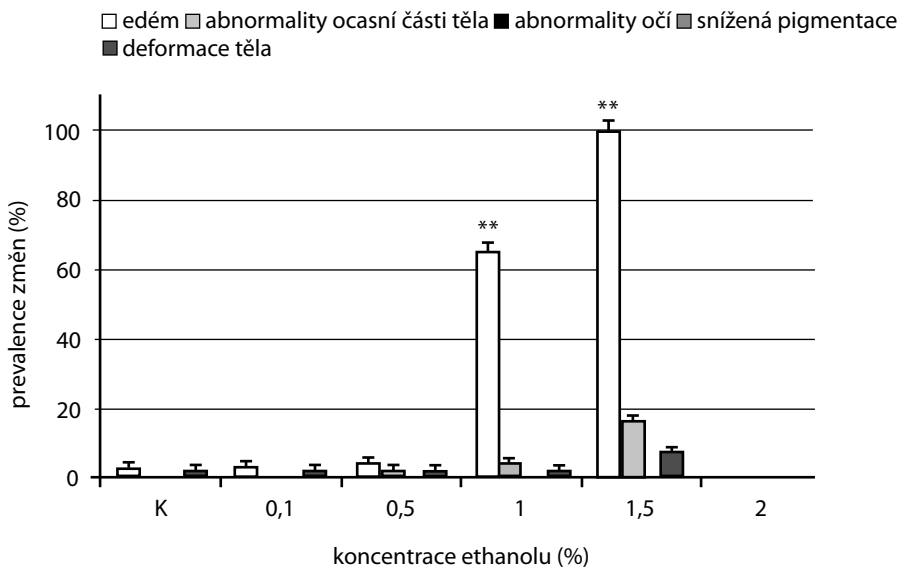
Graph 1a: The effect of solvent ethanol on developmental morphological defects after 48h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation)



Pozn. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Graf 1b: Vliv ethanolu na jednotlivé morfologické změny po 96h expozici

Graph 1b: The effect of solvent ethanol on developmental morphological defects after 96h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation and deformation of the body)



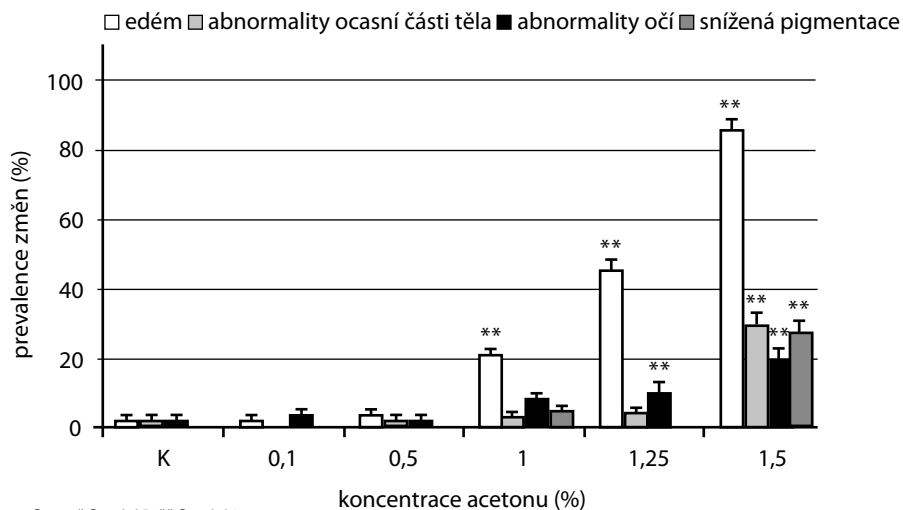
Pozn. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Aceton

Vysoce statisticky významné zvýšení výskytu morfologických změn ($P < 0,01$) oproti kontrole bylo zjištěno v 1% koncentraci acetonu po 48hodinovém působení (graf 2a) a po 96 hodinách ($P < 0,05$) v 0,5% koncentraci roztoku (graf 2b).

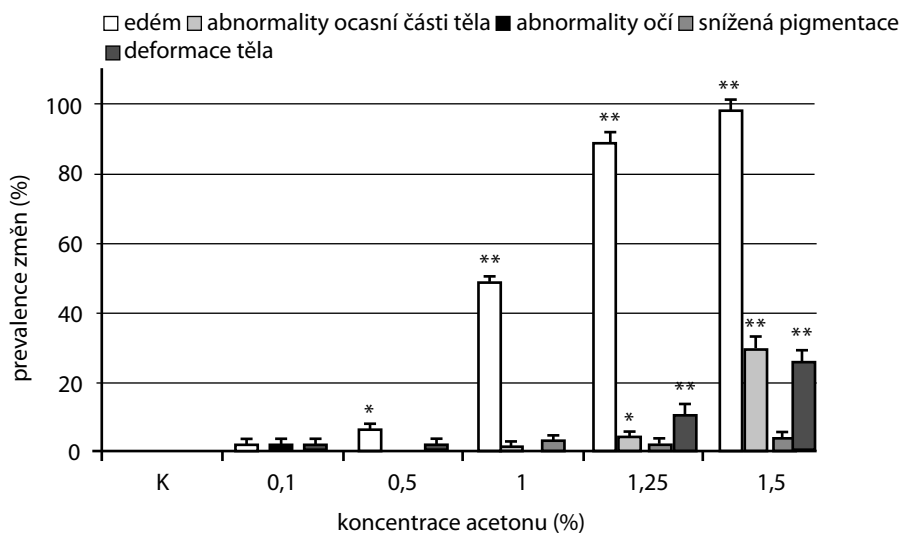
Graf 2a: Vliv acetonu na jednotlivé morfologické změny po 48h expozici

Graph 2a: The effect of solvent acetone on developmental morphological defects after 48h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation)



Graf 2b: Vliv acetonu na jednotlivé morfologické změny po 96h expozici

Graph 2b: The effect of solvent acetone on developmental morphological defects after 96h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation and deformation of the body)

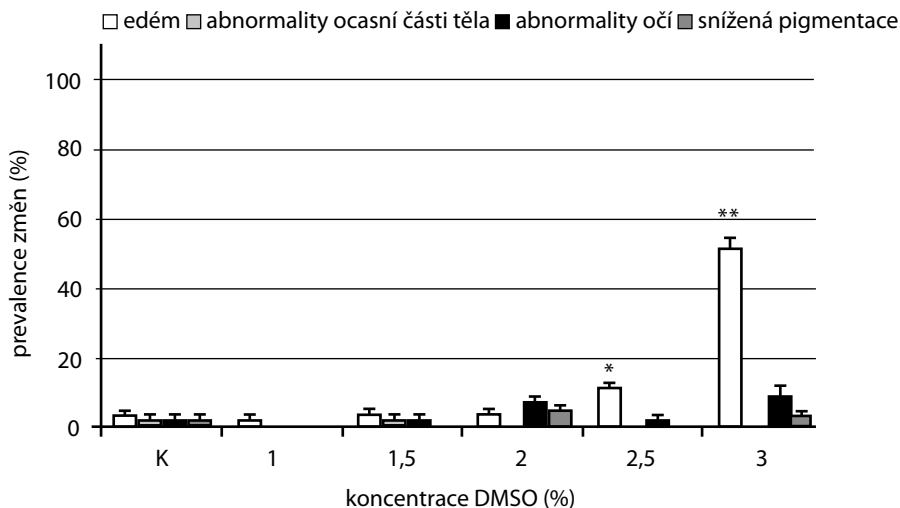


Dimethylsulfoxid

Rozpouštědlo DMSO vyvolalo po 48hodinovém působení statisticky významný výskyt morfologických změn ($P < 0,05$) v koncentraci od 2,5% roztoku (graf 3a) a po 96 hodinovém působení ($P < 0,01$) od 2% koncentrace (graf 3b).

Graf 3a: Vliv DMSO na jednotlivé morfologické změny po 48h expozici

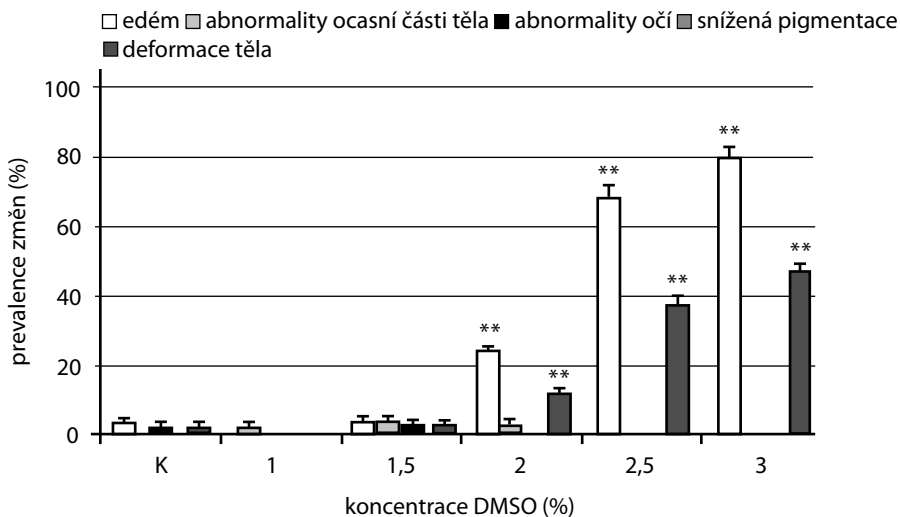
Graph 3a: The effect of solvent DMSO on developmental morphological defects after 48h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation)



Pozn. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Graf 3b: Vliv DMSO na jednotlivé morfologické změny po 96h expozici

Graph 3b: The effect of solvent DMSO on developmental morphological defects after 96h exposure (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation and deformation of the body)



Pozn. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

MORTALITA EMBRYÍ

Mortalita embryí v kontrolní skupině v testech s ethanolem, acetonem a DMSO byla vždy do 20 %, což odpovídá podmínkám platnosti testu dle metodiky OECD 212. Zvýšená mortalita u rozpouštědla ethanol byla zaznamenána po 96 hodinách v 1,5% koncentraci a v 2% koncentraci roztoku uhynula všechna embrya, u acetonu byla mortalita vyšší než 20 % zaznamenána v koncentracích 1,25 % a 1,5 % a v případě DMSO 2,5 % a 3 % (tab. 1).

Tab. 1: Mortalita embryí v testu toxicity s rozpouštědly

ethanol		aceton		DMSO	
koncentrace	mortalita (%)	koncentrace	mortalita (%)	koncentrace	mortalita (%)
(%)	48h 96h	(%)	48h 96h	(%)	48h 96h
K	0,9 1,8	K	1,7 1,7	K	1,7 4,1
0,1	1,8 7,3	0,1	2,5 0	1	3,3 5,8
0,5	1,8 8,2	0,5	1,7 3,3	1,5	2,5 4,1
1	2,7 14,5	1	1,7 18,3	2	1,7 3,3
1,5	5,5 81,8	1,25	4,2 32,5	2,5	3,3 30
2	18,2 100	1,5	5,8 59,2	3	4,2 79,2

HODNOTY NOEC A LOEC

Po 96hodinovém embryonálním testu toxicity byly zjištěny hodnoty NOEC (no-observed effect concentration) – nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky a LOEC (lowest observed effect concentration) – nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky. Hodnoty byly stanoveny na základě zjištění morfologických změn, jejichž výskyt je citlivý indikátor působení rozpouštědel (tab. 2).

Tab. 2: Hodnoty NOEC a LOEC

	ethanol	aceton	DMSO
NOEC	0,5%	0,1%	1,5%
LOEC	1%	0,5%	2%

DISKUSE

V předložené práci jsou popsány účinky tří rozpouštědel ethanolu, acetonu a DMSO na embrya *D. rerio*.

Naše výsledky neodporují doporučeným maximálním akceptovatelným limitům rozpouštědel pro akutní testy toxicity 0,05 % a pro chronické testy toxicity, kde je limit 0,01 % (Eaton a kol., 1975; Hallare a kol., 2006). Z naší studie vyplývá, že by se pro akutní embryonální testy toxicity na rybách mohly používat i vyšší koncentrace rozpouštědel, které jsou vyjádřené hodnotou NOEC pro ethanol až 0,5%, pro aceton 0,1% a pro DMSO až 1,5%.

Statisticky významně zvýšený výskyt morfologických změn embryí se začal objevovat v testu s ethanolem v koncentraci roztoků od 1 %, kdy byly pozorovány po 48hodinovém působení

rozpouštědla edémy, abnormality ocasní části těla a snížená pigmentace. Obdobné výsledky uvádí ve své práci také Hallare a kol. (2006) a Chen a kol. (2011), kteří pozorovali navíc edémy žloutkového váčku a po 96hodinovém působení deformace těla. V souladu s výše uvedenými autory bylo zjištěno statisticky významné zvýšení výskytu morfologických změn v koncentraci 1,5% roztoku ethanolu. V 2% koncentraci roztoku ethanolu, což byla naše nejvyšší použitá koncentrace, jsme ve shodě s Hallarem a kol. (2006) po 48hodinovém působení pozorovali zastavení vývoje embryí a po 96 hodinách byla zaznamenána 100% mortalita testovaných organismů.

Statisticky významně zvýšený výskyt edémů se objevil u rozpouštědla aceton oproti kontrole po 48 hodinovém působení v koncentraci od 1% roztoku a po 96 hodinách od 0,5% koncentrace roztoku. Hallare a kol. (2006) výskyty změn uvádí až v koncentracích 1,5–2% roztoku acetonu. U ostatních sledovaných morfologických změn nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

Hallare a kol. (2004) ve svých studiích používal k lepšímu rozpouštění diclofenaku rozpouštědlo DMSO, a to v koncentracích od 0,00002%–0,04% a prokázal, že nedochází k žádným změnám oproti kontrolní skupině, ve které nebylo použito DMSO. Máchová a kol. (2009) pozorovala vliv DMSO na růst, vývoj a mortalitu kapra obecného v období jeho raného vývoje, a to v testovaných koncentracích od 0,2; 0,5; 1,0 a 5 ml.l⁻¹ (0,02; 0,05; 0,1 a 0,5%). Organismy vystavené koncentracím 0,02 – 0,1% roztoku DMSO nevykazovaly žádné změny v porovnání s kontrolou, signifikantní změny růstu v porovnání s kontrolou vykazovaly až v 0,5% koncentraci. Defekty v embryonálním vývoji dania popisuje od 1% koncentrace Chen a kol. (2011). V našem testování jsme zjistili, že tvorba edému u embryí se začíná vyskytovat až v 2,5% koncentraci po 48 hodinách a v 2% koncentraci po 96hodinovém působení se kromě edémů vyskytovaly i deformace těla. Při porovnání těchto výsledků se embrya *D. rerio* jeví méně citlivá k působení DMSO než raná vývojová stádia kapra obecného. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben rozdílnou délkou expozice u *D. rerio* (96 hodin) a kapra obecného (29 dní).

SOUHRN

Cílem práce bylo posoudit účinky 48 a 96hodinové expozice ethanolu (0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2%), acetonu (0,1; 0,5; 1; 1,25 a 1,5%) a dimethylsulfoxidu (1; 1,5; 2; 2,5 a 3%) na embrya *D. rerio*. Uvedená rozpouštědla byla hodnocena z hlediska jejich vlivu na mortalitu embryí a na výskyt morfologických změn. Pro ethanol byla zjištěna hodnota NOEC 0,5 % a LOEC 1 %, pro aceton NOEC = 0,1 % a LOEC = 0,5 % a pro DMSO NOEC = 1,5 % a LOEC = 2 %. Na základě výsledků našich testů byla porovnána toxicita výše uvedených rozpouštědel pro embrya *D. rerio* a bylo konstatováno, že jako nejvhodnější rozpouštědlo se jeví dimethylsulfoxid, a to do koncentrace 1,5%, dále pak rozpouštědlo ethanol do koncentrace 0,5%. Nejméně vhodným rozpouštědlem je aceton, který můžeme používat do 0,1% koncentrace. Zjištěné koncentrace NOEC jednotlivých rozpouštědel jsou vyšší než maximální koncentrace doporučené normami pro testy toxicity na rybách. Z toho důvodu lze předpokládat, že koncentrace rozpouštědel povolené normou neovlivní průběh a výsledky prováděných testů.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla financována v rámci výzkumného záměru MŠMT 6215712402.

LITERATURA

- Bilotta, J., Saszik, S., Givin C. M., Heather, H. R., Sutherland, S. E., 2002. Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicol. Teratol.*, 24: 759–766.
- Eaton, J. G., Kenaga, E. E., Kimerle, R. A., Ladd, E. C., Macek, K. J., Marking, L. L., Mayer, F. L., McCann, J. A., Parrish, P. R., Stephan, C. E., 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. U. S. Environmental Protection Agency, Corvallis, USA.
- El Jay, A., 1996. Effect of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31: 84–90.
- Gandolli, S., Anderson, D., Chadwick, J., Ebdon, L., Gammon, D., King, L., McClellan, R., Rowland, I., Solbé, J., Sugimura, T., Bladeren, P. (Editors), 1999a. The dictionary of substances and their effects, 1. The Royal Society of Chemistry, UK, 889 pp.
- Gandolli, S., Anderson, D., Chadwick, J., Ebdon, L., Gammon, D., King, L., McClellan, R., Rowland, I., Solbé, J., Sugimura, T., Bladeren, P. (Editors), 1999b. The dictionary of substances and their effects, 3. The Royal Society of Chemistry, UK, 832 pp.
- Gandolli, S., Anderson, D., Chadwick, J., Ebdon, L., Gammon, D., King, L., McClellan, R., Rowland, I., Solbé, J., Sugimura, T., Bladeren, P. (Editors), 1999c. The dictionary of substances and their effects, 14. The Royal Society of Chemistry, UK, 897 pp.
- Hallare, A. V., Köhler, H. R., Triebskorn, R., 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56: 659–666.
- Hallare, A. V., Nagel, K., Kohler, H. R., Triebskorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotox. Environ. Saf.*, 63: 378–388.
- Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effect of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.*, 76: 69–92.
- Chen, T.-H., Wang, Y.-H., Wu, Y.-H., 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat. Toxicol.*, 102: 162–166.
- Máchová, J., Prokeš, M., Kroupová, H., Svobodová, Z., Mácová, S., Doleželová, P., Velíšek J., 2009. Early ontogeny, growth and mortality of common carp (*Cyprinus carpio*) at low concentrations of dimethyl sulfoxide. *Acta Vet.*, 78: 505–512.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19: 38–48.
- Rufli, H., Fisk, P. R., Girling, A. E., King, J. M. H., Länge, R., Lejeune, X., Stelter, N., Stevens, C., Suteau, P., Tapp, J. F., Thus, J., Versteeg, D. J., Niessen H. J., 1998. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile, and unstable substances and interpretation and use of data. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 39: 72–77.
- Wexler, P., Anderson B. D., Peyster, A., Gad, S. C., Hakkinen, P. J., Kamrin, M. A., Locey, B. J., Mehendale, H. M., Pope, C. N., Shugart, L. R. (Editors), 2005a. *Encyclopedia of Toxicology*, 1. Elsevier, UK, 794 pp.
- Wexler, P., Anderson B. D., Peyster, A., Gad, S. C., Hakkinen, P. J., Kamrin, M. A., Locey, B. J., Mehendale, H. M., Pope, C. N., Shugart, L. R. (Editors), 2005b. *Encyclopedia of Toxicology*, 2. Elsevier, UK, 754 pp.



DISTRIBUCE CITLIVOSTI DRUHŮ (SPECIES SENSITIVITY DISTRIBUTION – SSD) – VYUŽITÍ PRO HODNOCENÍ RIZIK PESTICIDŮ V EVROPSKÝCH ŘEKÁCH

SPECIES SENSITIVITY DISTRIBUTION (SSD) – APPLICATION IN ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF PESTICIDES IN EUROPEAN RIVERS

S. JESENSKÁ, K. BRABEC, L. BLÁHA

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, jesenska@recetox.muni.cz

ABSTRACT

We present an application of the Species Sensitivity Distribution (SSD) modelling in retrospective risk assessment of a river ecosystem. The SSD method is relatively new but it has already been incorporated in the European Union legislation of prospective ecotoxicological risk assessment. Toxicity data of seven pesticides relevant to the Scheldt river basin (Belgium) investigated in the AQUAREHAB project were compiled (bentazone, glyphosate, isoproturon, MCPA, mecoprop, simazine, terbuthylazine), validated and SSD curves were developed. Derived parameters of the curves (mean and standard deviation) were used for prediction of potentially affected fraction (PAF) and multisubstance potentially affected fraction (msPAF) of organisms at monitored localities in the Scheldt river basin – pesticides concentrations, which were measured at 37 localities monthly during the years 1997–2009, were translated into PAF values and these were combined into a single metric; msPAFs. There is a clear decrease in msPAF over the years 1997–2009. Nevertheless, there are several problematic stations, where elevated msPAFs were observed within more recent years. At 23 out of the 37 studied sites, the critical msPAF value of 0.05 (more than 5% community is likely to be affected), was exceeded at least once between 2007 and 2009 (mostly in June–July). At two localities the maximal msPAF > 0.1 were recorded in all three years. This indicates significant impacts of pesticides on river organisms in spring and summer. Therefore, we recommend monitoring of pesticides during this period more frequently to find the true level of the impact.

Klíčová slova: distribuce citlivosti druhů, hodnocení environmentálních rizik, pesticidy, znečištění řek

Keywords: species sensitivity distribution, environmental risk assessment, pesticides, river pollution

ÚVOD

Hodnocení environmentálních rizik toxických látek v reálných vodních ekosystémech, jejich účinků na strukturu a funkci společenství organismů a celkového vlivu směsí chemických látek na prostředí je komplexní problematika, která vyžaduje řadu předpokladů a zjednodušení. Proto se tato oblast ekotoxikologie stále intenzivně vyvíjí (Solomon a kol., 2008).

K odvození environmentálních standardů (EQSs – environmental quality standards), jako je např. koncentrace, při které se nepředpokládá účinek na organismy v ekosystému (PNEC – Predicted No-effect Concentration) se nejčastěji používají faktory nejistoty (AF – Assessment

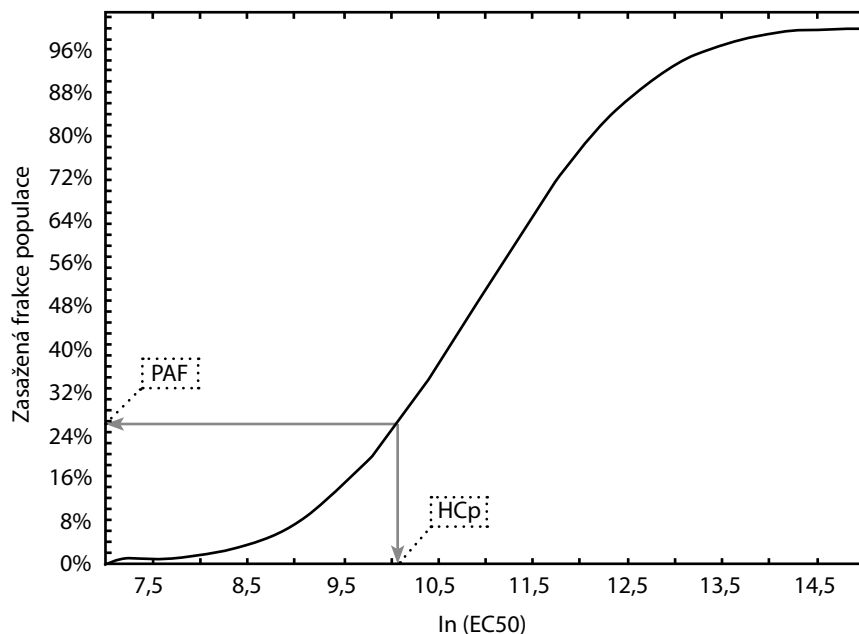
Factor). PNEC se zpravidla počítá jako podíl zjištěné hodnoty toxicity (např. NOEC – nejvyšší koncentrace látky, která ještě nevyvolá účinek) a AF. Hodnoty AF se liší podle míry extrapolace a pohybují se od 1 až do 1000 (EC, 2003). Nejnížší hodnoty AF jsou užívány při testech s modelovými ekosystémy (např. mesokosmy), které jsou ovšem časově i finančně náročné, a také při použití finančně nenáročných statistických metod Species Sensitivity Distribution (distribuce citlivosti druhů; SSD), kde AF je zpravidla 1–5 (EC, 2003).

Základní metoda SSD je založena na předpokladu, že citlivosti všech druhů organismů žijících v určitém ekosystému na určitou toxickou látku vyjádřené jako logaritmy koncentrace (např. $\log\text{NOEC}$ či $\log\text{EC}_{50}$; EC_{50} je koncentrace látky, při které se účinek projeví na 50% testovaných jedinců) mají statisticky normální distribuci (Posthuma a kol., 2002). Ta je charakterizována pouze dvěma parametry – aritmetickým průměrem a směrodatnou odchylkou. SSD křivka může být modelována ze souborů dat získaných z různých testů toxicity (NOEC či častěji se vyskytující hodnoty EC_{50}), které jsou dostupné v databázích jako např. ECOTOX (US EPA) nebo PAN Pesticide Database.

Pokud se SSD vyjádří jako kumulativní distribuční funkce, potom lze snadno předpovědět procento organismů, které bude zasaženo při určité koncentraci dané chemické látky v ekosystému (hodnota PAF – potentially affected fraction) a naopak lze také odhadovat koncentraci látky, při které bude zasaženo p% populace (HC_p – hazardous concentration to p% of species) – obr. 1 (Aldenberg a Luttik, 2002).

Obr. 1. Určení hodnot PAF a HC_p z kumulativní distribuční funkce normálního rozložení citlivosti druhů; na ose x jsou hodnoty $\ln(\text{EC}_{50})$ určité látky pro různé druhy organismů.

Fig. 1. Derivation of PAF and HC_p values from cumulative distribution function of normal distribution of the species sensitivities; x-axis – $\ln(\text{EC}_{50})$ values of one substance for different species.



Metoda SSD tedy může být využita jak pro retrospektivní hodnocení rizik (určení PAF), tak pro prospektivní analýzu rizik (určení HC_p). Jako hraniční koncentrace určité látky, která ještě nemá významný vliv na populaci, je brána taková, která ovlivní maximálně 5 % organismů ($PAF = 5\%$) a značí se HC_5 . Pokud je AF pro určitou SSD křivku roven jedné, potom HC_5 odpovídá PNEC ($PNEC = HC_5/AF$). SSD pro předpověď PNEC je doporučeno Evropskou unií a např. i legislativou USA (EPA, 1995; EC, 2003).

Přestože se v posledních letech objevuje řada nových postupů při tvorbě SSD modelů (viz diskuse), v evropských zemích a obecně v EU existuje pro stanovení sladkovodních PNECs doporučený postup. Je doporučeno používání chronických NOEC hodnot, které ovšem nejsou ve veřejné literatuře často dostupné a nemusí být kvalitní. Proto se používá také akutních EC_{50} (Bachman, 2009). Dále je doporučeno zahrnout druhy z různých taxonů: ryby, obojživelníci, korýši, ostatní bezobratlí, hmyz, řasy a vyšší rostliny. Minimální počet použitých druhů, které by měly pocházet z alespoň 8 odlišných taxonů, je 10 (lépe 15). Pro popsání distribuce NOEC (či EC_{50}) hodnot je doporučována základní log-normální aproximace (především pro její jednoduchost), musí však být ověřena normalita zlogaritmovaných dat (EC, 2003).

Návod pro použití SSD v retrospektivní analýze rizik je zahrnut např. v národní legislativě Nizozemí, v legislativě EU zatím chybí. Nicméně postup vychází ze stejných principů jako v analýze prospektivní.

V této práci byla SSD metoda využita pro retrospektivní hodnocení rizik pesticidů ve sladkovodních ekosystémech, konkrétně pro určení msPAF (multisubstance PAF; procento organismů, které je potenciálně ohroženo při určitých koncentracích látek přítomných ve směsi) v povodí řeky Scheldt (Belgie).

Model SSD byl zvolen, protože řeší i problematiku směsí látek a také umožňuje předpovědět míru ovlivnění organismů (kvantitativní hodnocení) a nejen to, jestli je či není překročen PNEC (obecně používaný kvalitativní přístup).

Práce je prováděna v rámci EU FP7 projektu SQUAREHAB a jejím hlavním cílem je vytvořit jednoduchý software, který umožní rychlé zhodnocení míry znečištění evropských řek. Látky, pro které byly modelovány SSD křivky a následně počítáno msPAF, jsou pesticidy v Evropě široce používané (nyní nebo v minulosti) a byly vybrány v rámci projektu.

MATERIÁL A METODIKA

SBĚR EKOTOXIKOLOGICKÝCH DAT

Pesticidy, pro které bylo zjišťováno msPAF organismů řeky Scheldt, byly vybrány podle údajů z monitoringu Vlámské agentury pro životní prostředí (The Flemish Environment Agency; <http://www.vmm.be>). Jednalo se o bentazon, glyfosát, isoproturon, MCPA (2-methyl-4-chlor-fenoxyoctová kyselina), mecoprop, simazin a terbutylazin.

Ekotoxikologická data pro tyto látky byla primárně získána z databáze ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) a doplněna o hodnoty z nejnovější dostupné literatury. Sběr dat byl ukončen v prosinci 2010. Vytvořená databáze obsahovala kromě hodnot toxicity (EC_{50} , NOEC,...) i další informace o testech (jako název testovaného druhu, sledovaný efekt, délka a způsob expozice, atd.).

VÝBĚR A VALIDACE DAT

Protože v databázích i v dostupné literatuře téměř chybí hodnoty NOEC, pro tvorbu SSD křivek byly použity hodnoty EC50. Do databáze byly zahrnuty obecně testované efekty jako mortalita (fauna), reprodukce (fauna), změny v populaci (flora), růst (flora), imobilizace (fauna), změny biochemických ukazatelů (flora), změny fyziologických ukazatelů (flora), změny chování (fauna) a abnormality v morfologii a vývoji (fauna). Pro výpočet SSD byla použita data „akutní“ toxicity, která byla získána v testech trvajících 1–7 dní (expozice delší než 4 dny se ve většině případů týkala ryb). V databázi byly zahrnuté druhy z nižších a vyšších rostlin, hmyzu, koryšů, kroužkoců, měkkýšů, ostatních bezobratlých, obojživelníků a ryb. Nebyla zahrnuta data, která byla získána z testů s injekční či podobnou expozicí. Data, která byla zaznamenána, jako např. „EC50 > 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ “, nebyla použita.

Speciální pozornost musela být věnována glyfosátu, protože ve více než polovině dat, byly hodnoty EC50 získány testováním směsi (např. Round-UP) a ne čistého glyfosátu. Tato data nebyla do SSD databáze zařazena. U ostatních pesticidů se hodnoty EC50 získané testováním směsí vyskytovaly v mnohem menší míře. Do SSD databáze byla vždy zařazena pouze data získaná testováním čistých pesticidů nebo směsí s minimálním obsahem pesticidu 95%.

MODELOVÁNÍ SSD

Po výběru a validaci dat došlo k velkému úbytku dostupných hodnot EC50 (tab. 1). Kromě mecopropu však pro všechny studované pesticidy byl splněn limit 10 druhů. Protože někteří autoři uvádějí jako nutné minimum pouze tři druhy (Suter G.W., 2002), mecoprop byl do studie zařazen.

Tab. 1. Počet dat sensitivity před a po validaci.

Tab. 1. Number of sensitivity data before and after validation.

Pesticid	Počet dat před validací	Počet dat (EC50) po validaci	Počet druhových dat (EC50) po validaci
<i>bentazon</i>	192	26	16
<i>glyfosát</i>	553	93	18
<i>isoproturon</i>	112	22	14
<i>MCPA</i>	130	33	19
<i>mecoprop</i>	29	6	5
<i>simazin</i>	915	161	58
<i>terbutylazin</i>	99	36	16

V souladu se všeobecně uplatňovaným postupem (Bachman, 2009; EC, 2003), byly SSD křivky modelovány tak, že každý druh byl použit pouze jednou (pro více hodnot EC50 jednoho druhu byl použit geometrický průměr).

Logaritmy druhových hodnot EC50 byly aproximovány normální distribucí a rozložení hodnot testována na normalitu (Kolmogorovův-Smirnovův a Shapiro-Wilkův test), která byla splněna ve všech případech. Byly určeny parametry rozložení – aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

SSD křivky byly modelovány z akutních EC50 hodnot a parametry „chronických SSD“ křivek (potřebných pro výpočet PAFs) byly odvozeny s využitím ACR (acute-to-chronic ratio; $\text{ACR} = \text{EC50}/\text{NOEC}$) (Kenaga, 1982). Protože ACR hodnoty se velmi liší pro různé toxické látky (Heger a kol., 1995), byly určeny pro každý pesticid zvlášť (tab. 2) vyhledáním ACR pro dané

(nalezeno pouze pro simazin) či strukturně nejbližší pesticidy v literatuře a porovnáním EC50 a NOEC hodnot z ECOTOX databáze. Vždy byla zvolena vyšší hodnota ACR odvozená z těchto dvou přístupů a zaokrouhlena směrem nahoru (z důvodu zajištění ochrany společenstev). Pokud byl faktor příliš nízký a byl odvozen z nedostatečného množství dat (bentazon), byla použita hodnota 15, jakožto spodní hranice doporučených hodnot ACR pro pesticidy (Laenge a kol., 1998).

Tab. 2: Hodnoty ACR (acute-to-chronic ratio) použité pro odvození „chronických SSD“.

Tab. 2: ACR (acute-to-chronic ratio) values for derivation of „chronic SSD“.

Pesticid	ACR
<i>bentazon</i>	15
<i>glyfosát</i>	14
<i>isoproturon</i>	15
<i>MCPA</i>	15
<i>mecoprop</i>	15
<i>simazin</i>	17
<i>terbutylazin</i>	17

Posledním krokem byl výpočet msPAF pro celkem 37 lokalit v povodí řeky Scheldt (belgická část) (obr. 2), ve kterých byly jednou měsíčně v období leden 1997–prosinec 2009 monitorovány koncentrace uvedených pesticidů. Koncentrace byly poskytnuty Vlámskou agenturou pro životní prostředí a byly naměřeny v rámci monitoringu pesticidů v Belgii.

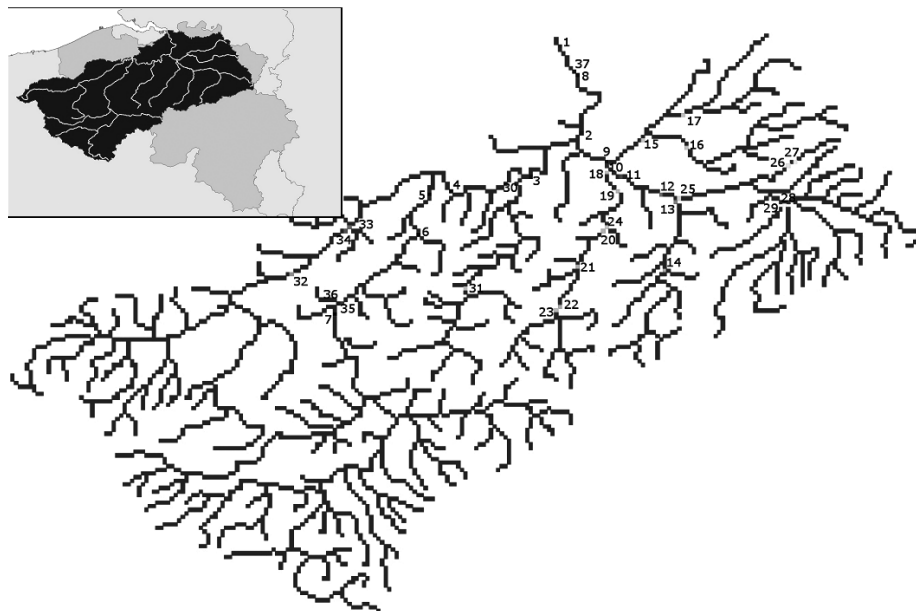
Hodnoty msPAF pro všechny lokality a měsíce byly vypočítány z hodnot PAF pro jednotlivé pesticidy na základě principu modelu nezávislého působení:

$$\text{msPAF} = 1 - \prod(1 - \text{PAF}_i); \text{ kde } i \text{ je pesticid } 1 \text{ až } 7.$$

Výpočty a modelování SSD křivek byly prováděny s využitím softwaru Microsoft Excel 2007, Statistica 9.1 and ETX 2.0.

Obr. 2. Schéma monitorovacích míst v belgické části povodí Scheldt a lokalizace povodí na území Belgie (výřez).

Fig. 2. Monitoring stations in the Belgium part of the Scheldt river basin and localisation of the river basin on the Belgium area (cut-out picture).



VÝSLEDKY

Parametry „akutních“ i pomocí ACR odvozených „chronických“ SSD křivek pro sedm studovaných pesticidů jsou uvedeny v tab. 3.

Tab. 3. Parametry (aritmetický průměr; μ a směrodatná odchylka; SD) „akutních log(EC50)“ a odvozených „chronických log(NOEC)“ SSD křivek.

Tab. 3. Parameters (mean; μ and standard deviation; SD) of “acute EC50” and estimated “chronic NOEC” SSD curves.

Pesticidy	μ ; SD (akutní log(EC50[$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]) distribuce)	μ ; SD (odvozené log(NOEC[$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]) distribuce)
bentazon	4,73; 0,88	3,56; 0,88
glyfosát	4,66; 0,5	3,52; 0,5
isoproturon	1,53; 0,32	0,35; 0,32
MCPA	4,25; 1,01	3,07; 1,01
mecoprop	4,73; 0,79	3,55; 0,79
simazin	73,2 \times 102; 1,31	2,65; 1,31
terbutylazin	2,71; 1,27	1,48; 1,27

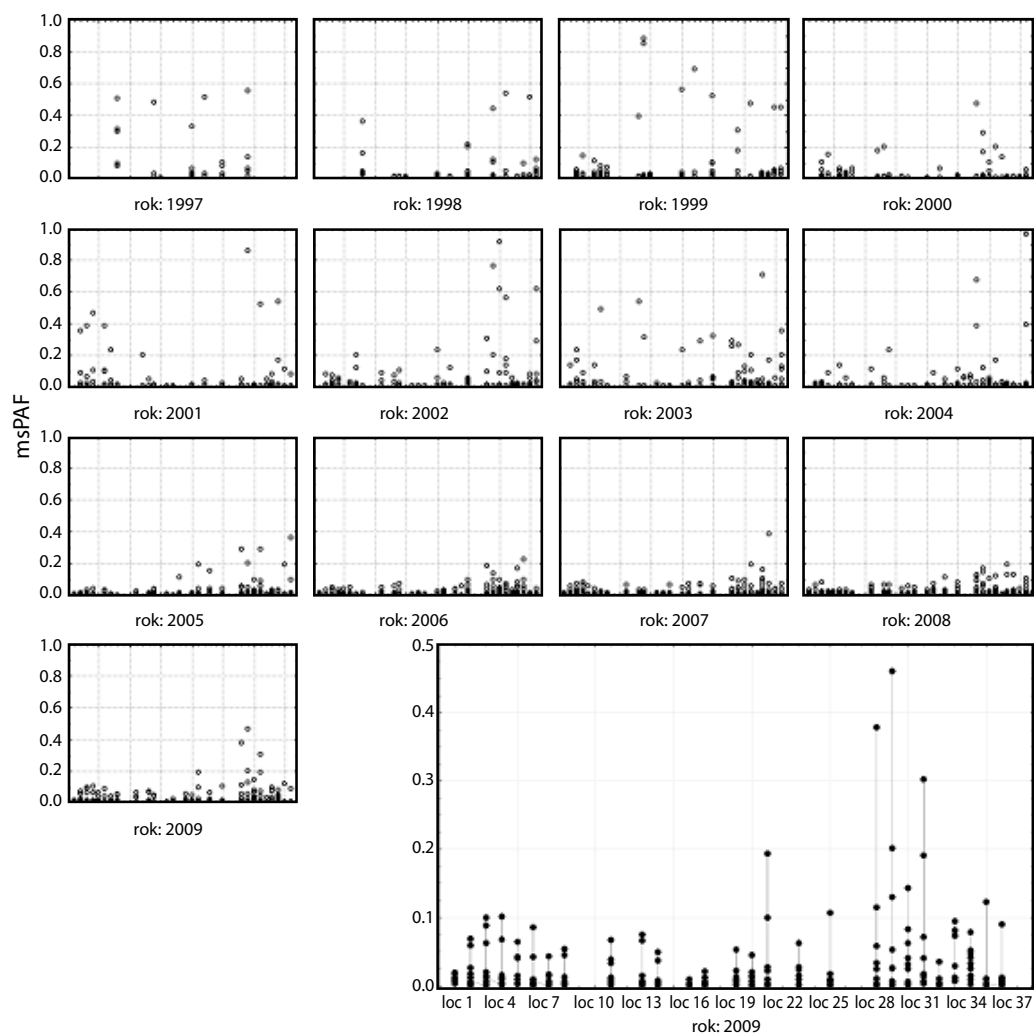
Výsledky hodnocení ekotoxikologických rizik pesticidů v belgické části povodí řeky Scheldt pomocí hodnot msPAF jsou na obrázku 3. V tabulce 4 jsou uvedeny průměrné a maximální hodnoty msPAF (max msPAF) těch monitorovacích míst, kde max msPAF přesáhly v uvedených časových obdobích alespoň při jednom odběru hodnotu 0,05 (5%). Tyto hodnoty již indikují potenciální ohrožení společenstva organismů.

V tab. 4 je vidět, že žádná střední hodnota (mediánová) msPAF nejvíce znečištěných lokalit nepřesáhla hranici 0,05. Kritická hranice 5 % byla překračována zpravidla v jarních a letních měsících (nejčastěji červen-červenec).

Z obr. 3 i tab. 4 vyplývá, že v období 1997–2009 docházelo k výraznému snižování zátěže (snižování msPAF), především pak v období 2005–2009. Stále ovšem v povodí řeky zůstávají problematické oblasti a lokality. V roce 2009 (zvětšený graf v obrázku č. 3) byla mírně překročena 5% max msPAF v monitorovacích lokalitách č. 5, 6, 11, 19, 23 (jednou), č. 2, 4, 13, 34 (dvakrát), a č. 3 (tříkrát). Výrazně překročena v roce 2009 byla alespoň jednou (ve většině případů třikrát) na lokalitách č. 21, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 35 a 36 (obr. 3; zvětšená část).

Obr. 3. Hodnoty msPAF na jednotlivých lokalitách řeky Scheldt (na ose X vzestupně lokality č. 1-37) v letech 1997–2009.

Fig. 3. msPAF values at individual localities (plotted on X-axis, sequentially no. 1-37) during years 1997–2009.



Tab. 4. Hodnoty msPAF na monitorovacích místech, kde max msPAF v letech 2007–2009 byla větší než 0,05 (hodnoty max msPAF > 0,1 jsou označené tučně).

Tab. 4. msPAF at monitoring stations, where max msPAF reached values were higher than 0,05 during years 2007–2009 (max msPAF > 0,1 are in bold text).

Monitorovací místo	Roky 1997–2009		Roky 1997–2006		Rok 2007		Rok 2008		Rok 2009	
	median msPAF	max msPAF	median msPAF	max msPAF	median msPAF	max msPAF	median msPAF	max msPAF	median msPAF	max msPAF
2	0,006	0,352	0,006	0,352	0,007	0,057	0,010	0,067	0,005	0,069
3	0,009	0,381	0,008	0,381	0,009	0,073	0,008	0,084	0,013	0,100
4	0,007	0,463	0,007	0,463	0,007	0,081	0,005	0,026	0,011	0,101
5	0,006	0,064	0,004	0,041	0,004	0,056	0,006	0,024	0,010	0,064
6	0,007	0,381	0,008	0,381	0,007	0,044	0,006	0,035	0,005	0,086
8	0,005	0,507	0,005	0,507	0,003	0,015	0,002	0,015	0,004	0,053
11	0,008	0,115	0,007	0,115	0,010	0,068	0,007	0,064	0,010	0,067
13	0,007	0,539	0,007	0,539	0,009	0,034	0,008	0,064	0,006	0,075
14	0,006	0,881	0,007	0,881	0,002	0,036	0,007	0,066	0,003	0,049
17	0,005	0,058	0,005	0,016	0,003	0,014	0,003	0,058	0,002	0,021
18	0,005	0,109	0,005	0,109	0,007	0,064	0,009	0,046	-	-
19	0,006	0,053	-	-	-	-	-	-	0,006	0,053
21	0,008	0,196	0,006	0,196	0,008	0,071	0,009	0,069	0,009	0,194
23	0,006	0,291	0,005	0,291	0,006	0,074	0,012	0,110	0,014	0,062
25	0,014	0,522	0,016	0,522	0,008	0,060	0,032	0,081	0,007	0,106
28	0,013	0,670	0,010	0,670	0,010	0,104	0,047	0,130	0,025	0,379
29	0,018	0,859	0,018	0,859	0,010	0,090	0,024	0,165	0,026	0,461
30	0,019	0,911	0,018	0,911	0,019	0,099	0,021	0,106	0,031	0,143
31	0,011	0,558	0,011	0,558	0,004	0,195	0,014	0,122	0,017	0,303
33	0,016	0,701	0,014	0,701	0,042	0,163	0,021	0,194	0,012	0,095
34	0,012	0,538	0,011	0,538	0,018	0,387	0,022	0,129	0,032	0,078
35	0,005	0,509	0,005	0,509	0,004	0,044	0,005	0,042	0,002	0,123
36	0,010	0,961	0,018	0,961	0,003	0,075	0,009	0,102	0,003	0,090

DISKUSE

Modelování SSD křivek a jejich aplikace při hodnocení rizik použita v prezentované studii je v souladu s doporučením legislativy EU i odborné literatury. Metoda SSD se však neustále vyvíjí a názory na správné provedení se liší. Týká se to především použití statistických metod a výběru dat sensitivity.

V této práci byla v souladu s doporučeními EU použita log-normální distribuce. Někteří autoři ovšem upřednostňují distribuci log-logistickou (Newman a kol., 2000) a v poslední době je některými autory doporučováno použití neparametrických metod (např. bootstrapping) (Newman a kol., 2000; Wheeler a kol., 2002) nebo bayesovské statistiky (Aldenberg a Jaworska, 2000), která lépe řeší intervaly spolehlivosti rozložení. Pokročilé metody jsou ovšem časově náročnější a v praxi nejsou často používány.

V této práci byla vždy vytvořena jedna křivka SSD pro různé taxonomické skupiny (pro jednu křivku byla využita data citlivosti rostlin, bezobratlých i obratlovců) především kvůli jedno-

duchosti a srozumitelnosti výsledků. Existují však názory, že tento přístup je méně relevantní, protože nevystihuje reálné zastoupení organismů v ekosystému (Forbes a Calow, 2002).

Duboudin a kol. (2004) proto navrhuje tzv. Species Sensitivity Weighted Distribution (SSWD – vážená SSD), kterou jsme v rámci naší práce aplikovali na vybrané pesticidy. Bylo zjištěno, že tzv. „Enviro Weighted Approach“ (metoda, která zahrnuje i vnitrodruhovou variabilitu a dává různým taxonům různou váhu podle ekologicky relevantního zastoupení), dává více protektivní výsledky (tzn. že poskytuje nižší hodnoty HC_5) než použitá základní metoda (detailní výsledky nejsou prezentovány). Princip SSWD ovšem není všeobecně používán ani validován.

Kefford a kol. (2005) navrhuje další způsob, který řeší správné zastoupení druhů při tvorbě SSD křivky s využitím tzv. rapid testing. Vychází z otestování přirozeného společenstva makroskopických bezobratlých vzorkovaných přímo ze studovaného ekosystému. Tento přístup však zatím neřeší další taxony jako rostliny a obratlovce a je finančně i časově méně výhodný než využívání dat citlivosti z dostupných databází.

Při tvorbě SSD křivek bylo zjištěno, že křivka herbicidu simazinu sice splňuje testy normality, ale její rozložení vykazuje znaky bimodality. Pro herbicid isoproturon zase v literatuře existovala pouze data rostlin a řas (pro ostatní herbicidy byla v různé míře zastoupená i data pro bezobratlé a obratlovce). Proto se jeví jako vhodnější sestavit vždy zvlášť SSD pro různé taxony. Optimalizace těchto postupů bude probíhat v rámci našich dalších studií.

Využití SSD metody pro retrospektivní hodnocení ekotoxikologických rizik pesticidů v belgickém povodí řeky Scheldt ukázalo, že především od roku 2005 do roku 2009 došlo k výraznému snížení frakce potenciálně ohrožených organismů. Mediány hodnot msPAF v monitorovacím období 1997–2009 nepřesáhly 5 %, ale jarní a letní hodnoty (období nejběžnější aplikace pesticidů) tuto hranici často překračují a to i v letech 2007–2009. Nejproblémovější jsou lokality ve středních až spodních tocích řek, které všeobecně bývají více kontaminovány např. splachy ze zemědělských půd. I když se jedná o krátkodobé překročení doporučené hodnoty msPAF (obyčejně v období jara až léta – cca 2 měsíce), může dojít k výraznému ovlivnění společenstva, především s ohledem na periodu rozmnožování vodních organismů. V obdobích, kdy jsou pesticidy ve větší míře aplikovány, by proto měl být monitoring prováděn v častějších intervalech.

Výsledky získané v této práci budou jako součást výstupů projektu SQUAREHAB 7. rámcového programu EU použity pro zhodnocení a vylepšení stavu povodí Scheldt. Použité metody mohou být v budoucnu také aplikovány na zhodnocení stavu českých povodí.

SOUHRN

Využitím metody Species Sensitivity Distribution (SSD) v retrospektivní analýze ekotoxikologických rizik pesticidů v povodí řeky Scheldt byl zhodnocen potenciální účinek v Evropě používaných pesticidů na říční společenstva organismů. Byl analyzován vliv směsi pesticidů bentazonu, glyfosátu, isoproturonu, MCPA, mecopropu, simazinu a terbutylazinu v letech 1997–2009 na 37 měsíčně monitorovaných lokalitách povodí. Z naměřených koncentrací pesticidů a vytvořených SSD křivek byly spočítány frakce organismů, které jsou potenciálně ohroženy při určitých koncentracích směsí pesticidů (msPAF). Z výsledků studie je vidět zřetelné snížení msPAF v letech 1997–2009 (tudíž i snížení ohrožení organismů uvedenými pesticidy), i v letech 2007–2009 se však v povodí vyskytovala řada lokalit (celkem 23), ve kterých byla alespoň jednou překročena 5% hranice ovlivnění společenstva (obyčejně k tomu docházelo v červnu–červenci). Tyto hodnoty již indikují potenciální ohrožení společenstva organismů a tudíž celého ekosystému. Na dvou lokalitách byla dokonce překročena hranice 10 % ve všech třech letech. Na postižených

lokality by proto bylo vhodné provádět v období aplikace pesticidů monitoring častěji než jednou měsíčně, aby bylo možno lépe odhadnout skutečné postižení říčních ekosystémů, které jsou v rámci ochrany životního prostředí velmi důležité.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla financována projekty EU FP7 SQUAREHAB a CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001).

LITERATURA

- Aldenberg, T., Jaworska, J. S., 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(1): 1–18.
- Aldenberg, T., Luttik, R., 2002. Normal Species Distributions and Probabilistic Ecological Risk Assessment. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Posthuma, L., Traas, T. P., Suter, G.W. Boca Raton (FL), Lewis Publishers, 50–102.
- Bachman, J., 2009. Use of Probabilistic Methods in Environmental Risk Assessment Species Sensitivity Distribution (SSD) and HC5, German Federal Environment Agency, Dessau.
- EC, 2003. Technical Guidance Document (TGD) on Risk Assessment, Part II, Luxembourg.
- EPA, U. S., 1995. Final water quality guidance for Great Lakes system. EPA, U. S., Federal Register, 15366–15425.
- Forbes, V. E., Calow, P., 2002. Species sensitivity distributions revisited: A critical appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(3): 473–492.
- Heger, W., Jung, S. J., Martin, S., Peter, H., 1995. Acute and Prolonged Toxicity to Aquatic Organisms of New and Existing Chemicals and Pesticides. *Chemosphere*, 31(2): 2707–2726.
- Kenaga, E. E., 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1(4): 347–358.
- Laenge, R., Hutchinson, T. H., Scholz, N., Solbe, J., 1998. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database. II – Comparison of acute to chronic ratios for various aquatic organisms and chemical substances. *Chemosphere*, 36: 115–127.
- Newman, M. C., Ownby, D. R., Mezin, L. C. A., Powell, D. C., Christensen, T. R. L., Lerberg, S. B., Anderson, B. A., 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: Assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(2): 508–515.
- Posthuma, L., Traas, T. P., Suter, G. W., 2002. General Introduction to Species Sensitivity Distributions *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Posthuma, L., Suter, G. W., Traas, T. P. Boca Raton (FL), Lewis Publishers, 3–9.
- Solomon, K. R., Brock, T. C. M., Zwart, D. D., 2008. Extrapolation in the Context of Criteria Setting and Risk Assessment. *Extrapolation Practice for Ecotoxicological Effect Characterization of Chemicals*. Solomon, K. R., Brock, T. C. M. and Zwart, D. D. Boca Raton (FL), CRC Press, 2–31.
- Suter G.W., T. T. P., Posthuma L., 2002. Issues and Practices in the Derivation and Use of Species Sensitivity Distributions. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Posthuma L., S. G. W., Traas T.P. Boca Raton (FL), Lewis Publishers, 437–474.
- Wheeler, J. R., Grist, E. P. M., Leung, K. M. Y., Morrill, D., Crane, M., 2002. Species sensitivity distributions: data and model choice. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 192–202.

EMBRYONÁLNÍ TEST S *Danio rerio* PRO VÝZKUM ENDOKRINNÍ DISRUPCE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

DANIO RERIO EMBRYO TEST FOR RESEARCH OF ENDOCRINE DISRUPTION IN WATER ENVIRONMENT

A. JONÁŠ, B. JAROŠOVÁ, I. SOVADINOVÁ, L. BLÁHA

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, jonas@recetox.muni.cz.

ABSTRACT

Standardised alternative non-animal test employing *Danio rerio* embryos is a promising alternative to acute test with adult specimen. This embryo test finds broad application including prediction of specific long term effects. In the present study, we have investigated effects of 7 waste water treatment plants originating from the Czech Republic on *D. rerio* embryos in the acute test setup according to ISO 15088 and OECD. Further, we discuss possible extension of the current assay by investigating other highly sensitive parameters of chronic toxicity such as expression of specific genes including aromatase B, vitellogenin 1, estrogen receptor α and β -actin. Our results of the acute standard tests showed rather minor effects with respect to lethality (< 10%) but non-lethal malformations were often recorded (heard oedema being most frequent sublethal endpoint). These findings emphasized the need to identify long term effects in the water effluents as also supported by a parallel study which showed estrogenicity *in vitro* at the same waste water samples. These preliminary data serve as a basis for our ongoing research addressing development of *Danio rerio* model for measuring estrogenicity and possibly other sensitive endpoints (such as immunomodulations) by quantitative RT-PCR.

Klíčová slova: *Danio rerio*, *in vitro* test s reportérovým genem, RT-PCR, čistírný odpadních vod.
Keywords: *Danio rerio*, *in vitro* reporter gene test for estrogenicity, RT-PCR, waste water treatment works.

ÚVOD

Embryonální test s *Danio rerio* (Hamilton, 1822) je rychlým moderním testem využívajícím raná vývojová stadia této ryby (Nagel, 2002). Akutní forma tohoto testu je již standardizována v ISO 15088 (ISO, 2008) a je rutinně používána na německých čistírnách odpadních vod (ČOV) (Voelker a kol., 2007) jako takzvaný test toxicity celkového odtoku (Grothe a kol., 1996). Tento test v akutní formě je zahrnut i mezi OECD normami (OECD, 2006). Výsledky embryonálního testu jsou srovnatelné s výsledky dosaženými standardním akutním testem s dospělci ryb (ISO, 1996; ISO, 2008; Lammer a kol., 2009), což bylo dokázáno mimo jiné ve studii srovnávající toxikologické výsledky 143 látek (Lammer a kol., 2009). Výhodou embryonálního testu však je, že se podle evropské legislativy nepovažuje do pěti dnů po fertilizaci embryí za test na zvířatech (EU, 1986; Strähle a kol., 2011) a navíc se uvádí, že embrya během tohoto testu necítí bolest (Voelker a kol., 2007). Test je tedy považován za zlepšení (refinement) a ještě častěji za nahrazení (replacement) testu se zvířaty (Scholz a kol., 2008) v souladu se směrnicí REACH (Braunbeck a Lammer, 2005), která na omezování testů se zvířaty klade důraz na základě

takzvaných 3R (z anglického reduction, refinement, replacement) (Russell a Burch, 1959). Další výhody testu, jako je transparentnost a rychlý vývoj embryí, rychlé dospívání ryb, velké množství často kladených jiker, nízká cena a dobrá dostupnost *D. rerio*, udělaly z této ryby jeden z hlavních modelů v neurologii, toxikologii, molekulární a vývojové biologii (Braunbeck a Lammer, 2005). *D. rerio* pochází stejně jako kapr obecný z čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*), původně z Indie, Pákistánu a Bhútánu a je velmi tolerantním organismem obývajícím různé ekologické niky v rámci vodního ekosystému (van der Sar a kol., 2004; Lawrence, 2007).

Mimo akutní variantu tohoto testu je však test s *D. rerio* velmi vhodným modelem pro výzkum, který je zaměřený na porozumění toxickým mechanismům a indikaci možných dlouhodobých efektů polutantů (Scholz a kol., 2008). Jedním z těchto dlouhodobých efektů mohou být endokrinní disrupce, tedy narušení hormonální rovnováhy organismů s negativními dopady včetně účinků na populace (Hutchinson a kol., 2005). Endokrinní disrupce je efektem často spojovaným s čistírnami odpadních vod (Hecker a kol., 2002).

Výzkum v oblasti estrogenních endokrinních disruptorů v kombinaci s embryonálním testem na *D. rerio* se soustředí převážně na identifikaci vhodných biomarkerů. Jako biomarkery jsou používány například vhodné geny, které jsou indukovány estrogenními látkami (Muncke a Eggen, 2006; Muncke a kol., 2007; Chandrasekar a kol., 2010). Tyto pokusy jsou zpravidla realizovány s roztoky o přesně definovaném složení známých endokrinních disruptorů, a tak použitelnost těchto postupů u vzorků ze životního prostředí zůstává nepotvrzena.

Výzkum prezentovaný v této studii je proto zaměřen především na analýzu vzorků odtoků z ČOV pro potvrzení možného využití těchto postupů pro sledování v životním prostředí. Zaměřili jsme se na expresi tří genů: vitellogenin 1 (*vtg1*), estrogenní receptor alfa (*esr1*) a cytochrom P450 aromatáza B (*aromB*) za pomoci kvantitativní real-time RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), jako referenční gen slouží β -actin.

Vitellogenin 1 (*vtg1*) je spojený s produkcí žloutkového proteinu vitellogeninu (VTG), který je u ryb a ostatních vejcorodých živočichů aktivován estrogenními hormony (Navas a Segner, 2006). VTG protein se za normálních podmínek tvoří zejména v tělech samic stimulací jaterních buněk 17β -estradiolem (E₂), z jater se tento glykofosfoprotein s vysokým obsahem vápníku o velké molekulové hmotnosti krevním řečištěm dostává do vaječnicků, kde je zabudován do zrajících oocytů (Tyler a kol., 1998). VTG je jasným biomarkerem endokrinní disrupce zejména v tělech samců ryb, kde by se buď neměl vyskytovat vůbec, nebo ve velmi nízkých koncentracích (Tyler a kol., 1998). Samotný protein VTG je však u embryí ryb obtížné používat jako biomarker, neboť je ve velkém množství součástí žloutkového vajíčku, a je tedy obtížné rozlišit VTG vyprodukovaný v závislosti na expozici ligandem a VTG ze žloutkového vajíčku (Scholz a kol., 2008). Proto se místo samotného proteinu VTG může užít sledování exprese genu *vtg 1* (Muncke a Eggen, 2006; Muncke a kol., 2007).

Cytochrom P450 aromatáza B (*aromB*) je zodpovědná za přeměnu androgenů na estrogeny, působí při vývoji sexuálního chování v mozku a díky tomu, že je indukována estrogenními hormony, je také používána jako indikátor endokrinní disrupce (Sawyer a kol., 2006).

Estrogenní receptory jsou intracelulární receptory, které jsou indukovány hormonem 17β -estradiolem a dalšími estrogenními látkami (Marty a kol., 2011). *D. rerio* má tři typy těchto receptorů: *esr1*, *esr2a* a *esr2b* a pro výzkum endokrinní disrupce se z těchto tří typů jeví nejvhodnější *esr1* (Chandrasekar a kol., 2010), který je použit i v této studii.

β -actin byl vybrán jako referenční gen, protože jeho koncentrace je během prvních pěti dnů vývoje embrya konstantní a exprese ostatních genů může být podle něj standardizována (Muncke a Eggen, 2006; Voelker a kol., 2008).

Tento článek se dále věnuje zejména metodickému zvládnutí dané problematiky. Dílčí cíle celé studie, z kterých jsou plně hotové pouze body 3 a 4, částečně pak bod 1, jsou:

1. Validovat použitelnost tří genových biomarkerů na známé koncentraci 100 ng.l⁻¹ ethinyl-estradiolu (EE2).
2. Validovat jejich použitelnost při koncentracích EE2 odpovídajících koncentracím ve vodních ekosystémech a u odtoků z čistíren odpadních vod.
3. Provést standardní test dle ISO 15088 a OECD fish embryo toxicity test (OECD, 2006; ISO, 2008) na odtoku sedmi ČOV v České republice pro identifikaci toxicity jednotlivých čistíren.
4. Zjistit estrogenní potenciály jednotlivých ČOV za pomoci *in vitro* buněčných kultur upravených pro zjišťování estrogenity.
5. Na základě standardních testů a výsledků z *in vitro* buněčných kultur vybrat vhodné vzorky ČOV a na vzorcích z odtoku provést test s *D. rerio* s modifikací pro zjištění endokrinní disrupce.
6. Srovnat výsledky získané s *D. rerio* s účinky na buněčných kulturách *in vitro*.

MATERIÁL A METODIKA

CHOV DANIO RERIO

Chov je udržován dle metodik popsaných v odborných publikacích a normách (Nagel, 2002; Braunbeck a Lammer, 2005; OECD, 2006; Voelker a kol., 2007; ISO, 2008). Kmen *D. rerio* byl pořízen z UFZ Leipzig, Německo. Teplota v akváriích je udržována na $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Světelný režim je nastaven na 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Ryby jsou krmeny třikrát denně komerčně dostupnou sušenou potravou s příměsí komerčně dostupné lyofilizované *Artemia salina*. Dva dny před experimentem jsou pak krmeny čerstvě vylíhnutými *Artemia salina* (Hermsen a kol., 2011).

EXPOZICE JIKER

Sběr jiker pro test probíhá ráno přibližně 20 minut po rozsvícení světla. Ryby kladou jikry kolem umělé vegetace připevněné na dóze se sítí. Ta dospělcům zabrání jikry ihned po naklazení zkonsumovat. Nakladené jikry jsou tříděny pod stereomikroskopem, pouze oplodněné a správně se vyvíjející jikry jsou vybrány pro test. Jikry jsou následně exponovány do 2 hodin po naklazení. Expoziční medium je připraveno dle ISO 15088 (ISO, 2008) a musí se 24 hodin před testem provzdušnit tak, aby na konci testu dosahovalo nasycení kyslíkem minimálně 50% (OECD, 2006; ISO, 2008). Expozice pro RT-PCR se provádí v Petriho miskách o průměru 8,5 cm s objemem testovacího roztoku 40 ml. V jedné misce se nachází 20 embryí *D. rerio*. Expozice embryí trvá pět dní a je provedena v expoziční komoře, při teplotě $26 \pm 1^\circ\text{C}$ a světelném režimu 14 hodin světla a 10 hodin tmy.

Pro expoziční roztok EE2 rozpouštěný v etanolu přidává do standardního testovacího média tak, aby výsledná koncentrace v testu nepřekročila 0,01% etanolu, tato koncentrace etanolu nemá dle literatury vliv na výsledek testu (Hallare a kol., 2006; Muncke a Eggen, 2006). Expozice je prováděna ve třech skupinách: kontrola, kontrola rozpouštědla (etanol) a expoziční vzorkem (v této studii uvedeném případě je to 100 ng.l⁻¹ EE2, v budoucnu bude vzorkem odpadní voda). Test se provádí ve třech opakováních. Expozice trvá 5 dní. Každý den je test kontrolován a mrtvá embrya odstraňována. Testovací medium nebylo během testu

s modelovou látkou EE2 měněno. V plánovaných testech s odpadní vodou pak medium bude měněno každý den. Pro extrakci RNA cílových genů jsou na konci expozice použita všechna živá embrya.

V případě akutního testu dle upraveného standardního testu ISO (ISO, 2008) a OECD (OECD, 2006) se postupuje obdobně, jako je uvedeno v předchozím odstavci, expozice trvá dva dny, jikry jsou exponovány ředěním vzorků z čistírny odpadních vod. Sleduje se mortalita a morfologické změny (OECD, 2006; ISO, 2008; Jonáš a kol., 2011). Ředění byla u prvního screeningového testu všech vzorků 50% a 100% odpadní vody v duplikátu. Na základě tohoto testu byly vybrány dva vzorky s dobře viditelnými efekty. První byl protestován s větším počtem ředění (0, 8%, 17%, 33%, 50%, 100%) dle ISO 15088 (ISO, 2008) a druhý dle upraveného OECD (OECD, 2006) s použitím pouze dvou ředění 50% a 100%, ale ve čtyřech opakováních.

EXTRAKCE RNA

Na konci expozice byla embrya z jednotlivých misek přemístěna do 800 μ l TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a homogenizována. Po odstátí a centrifugaci bylo přidáno 80 μ l 1-bromo-3-chloropropanu (Sigma-Aldrich), který po odstátí a centrifugaci vzorek rozdělil na části obsahující DNA, RNA a proteiny. RNA byla odpipetována a přidána k 400 μ l isopropanolu (Lachner, Česká republika). Po promíchání, odstátí a centrifugaci byl supernatant odpipetován a na dně zůstala RNA, která byla následně promíchána se 75% etanolem (AppliChem, Germany). Po centrifugaci byl etanol slit a vzorek vysušen. Následně bylo přidáno 40 μ l miliQ vody (Eppendorf), čímž byla extrakce RNA dokončena. Pro zjištění koncentrace a čistoty RNA byl využit spektrofotometr NanoDrop® ND-1000. Dále byla provedena elektroforéza RNA na agarovém gelu, kde se sledovala možná kontaminace RNA.

RT-PCR

Syntéza cDNA byla provedena s 2 μ g RNA na reakci. Reakční směs dále obsahuje: 1 μ l 10xD pufru, 2 μ l DNase (Promega), 5 μ l miliQ vody (Eppendorf), 4 μ l 5x reaction pufru (Fermentas), 0,5 μ l RiboLock RNase Inhibitoru (Fermentas), 1 μ l 10 mM DTP mix, 2 μ l Oligo (dT) primer (Fermentas) a 1 μ l RevertAid H minus Reverse Transcriptase (Fermentas). Byl využit přístroj Thermocycler Px2 (Thermo Electron Corporation).

Návrh primerů pro studované geny byl vytvořen s využitím programu Beacon Designer 7 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA). Sekvence genů byly získány z National Center for Biotechnology Information; NCBI. Výsledné sekvence primerů (tab. 1) byly porovnány s lidským genomem a genomem *D. rerio* za pomoci databáze BLAST, aby se předešlo amplifikaci nežádoucí DNA či RNA. Podobné sekvence byly vyloučeny. Primery byly navrhovány na optimální teplotu tání T_m 55°C. Primery byly navrženy na rozhraní exon/intron, aby se předešlo amplifikaci DNA. Pomocí funkce „Template structure search“ v programu Beacon Designer byly vyloučeny také primery, u kterých byla možnost, že by tvořily sekundární struktury a snižovaly tím efektivitu amplifikace. Primery byly nasyntetizovány firmou Elisabeth Pharmacon (Brno, Česká republika).

Tab. 1: Použité primery.

Tab. 1: Primers.

Jméno genu	Přístupové číslo v NCBI	Sekvence primeru (5'-3')
<i>Aromatáza B</i>	NM_131642	GAGGACGGCAGGTCTGAG TTACCACATGCTCCATCATCAC
<i>Vitellogenin 1</i>	NM_001044897	AGCAGCAGCAGTCGTAAC CAATGATGGTGGCAGTCTTAG
<i>Estrogenní receptor α</i>	NM_152959	AGCCTGTAATGGGACTCAAG CGCTGTGCTCCTCTTAG
β -actin	NM_131031	GGCTTCTGCTCTGTATGG AGTGGTAAACGCTTCTGG

Pro konvenční RT-PCR bylo použito na jednu reakci 1 μ g (1 μ l) cDNA, 5 μ l GoTaq Reaction Buffer (Promega), 0,5 μ l dNTP, 5 μ l pravého primeru, 5 μ l levého primeru a 0,125 μ l Go Tag Polymerase (Promega) s využitím přístroje Thermocycler P \times 2 (Thermo Electron Corporation). Bylo použito 30 teplotních cyklů. Produkty kvantitativní RT-PCR byly ověřeny elektroforézou na agarovém gelu s ethidiumbromidem (Promega), a zobrazeny za pomoci dokumentačního systému AlphaDigiDoc RT2 (East Port Praha, Česká republika).

Konvenční RT-PCR byla provedena pro ověření funkčnosti nasyntetizovaných primerů.

Kvantitativní RT-PCR využila pro reakci 1 μ g (1 μ l) cDNA, 10,3 μ l miliQ vody (Eppendorf), 2 μ l 10 \times HotStar PCR Buffer (QIAGEN), 0,8 μ l MgCl₂ (QIAGEN), 0,4 μ l 5 μ M levého a 0,4 μ l 5 μ M pravého primeru, 0,1 μ l Taq polymerase (QIAGEN) a 1,6 μ l 0,2 \times SybrGreen (Sigma-Aldrich). Celkový objem reakce je 20 μ l. Použit byl přístroj Rotor-Gene 3000A (QIAGEN).

ODBĚR ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ

Odpadní voda byla v létě 2010 vzorkována na odtoku sedmi různých ČOV v České republice. Jednalo se o běžné mechanicko-biologické čistírny s aktivačními nádržemi. Dvě čistírny byly dimenzovány pro méně než 5000 ekvivalentních obyvatel, dvě pro 10 000–100 000 a tři pro více než 100 000 ekvivalentních obyvatel. Směsné vzorky byly odebírány automatickými vzorkovači po dobu 24 hodin. Neupravené vzorky byly ihned po odebrání použity na akutní test s *D. rerio* (Jonáš a kol., 2011), zbylá část vzorků byla zpracována pro *in vitro* test.

PŘÍPRAVA ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ PRO MĚŘENÍ ESTROGENITY POMOCÍ IN VITRO TESTU

Vzorky odpadní vody byly filtrovány přes filtry ze skleněných vláken o velikosti pórů 1 μ m (Whatman). Ihned po odběru a filtraci následovala extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction, SPE) s využitím SDB Waters Oasis (500 mg sorbentu, kondicionace 8 ml 100% metanolu a ekvibrace 8 ml vody bez podtlaku, převedení vzorku za použití podtlaku max. 10 mm Hg (1,3 kPa), průtok přibližně 5 ml.min⁻¹). Po převedení vzorku byly kolony sušeny proudem vzduchu cca 15 minut. Eluce byla provedena 5–10 ml metanolu bez použití podtlaku. Extrakty byly dále pomocí proudu dusíku odpařeny na objem, který tvořil tisícinásobný koncentrát původních vzorků a skladovány při -18 °C. Studie zaměřená na hodnocení estrogenní aktivity vzorků ČOV s využitím buněčných kultur byla podrobněji publikována (Jedličková a kol., 2011).

MĚŘENÍ ESTROGENITY ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ POMOCÍ IN VITRO TESTU

Estrogenita vzorků byla hodnocena pomocí buněk lidského karcinomu prsu MVLN stabilně transfekovaných genem pro luciferázu. Syntéza enzymu luciferázy je řízena aktivací estrogenního receptoru. V přítomnosti estrogenních látek je tedy produkován enzym, který lze snadno stanovit pomocí měření emitovaného luminiscenčního záření. Výsledky lze kvantifikovat a využít ke stanovení celkové koncentrace přítomných estrogenů. Hodnocení přítomnosti antiestrogenů se provádí sledováním úbytku luminiscence při přidání vzorků ke známým koncentracím standardních estrogenů (Hilscherova a kol., 2000).

Množství estrogenní aktivity je vyjádřeno v toxických ekvivalentech standardního estrogenu. Jako standard byl použit 17β -estradiol. Hodnota estrogenního ekvivalentu (EEQ) tak vyjadřuje, jaká koncentrace 17β -estradiolu by způsobila stejný efekt, který byl pozorován u hodnoceného vzorku.

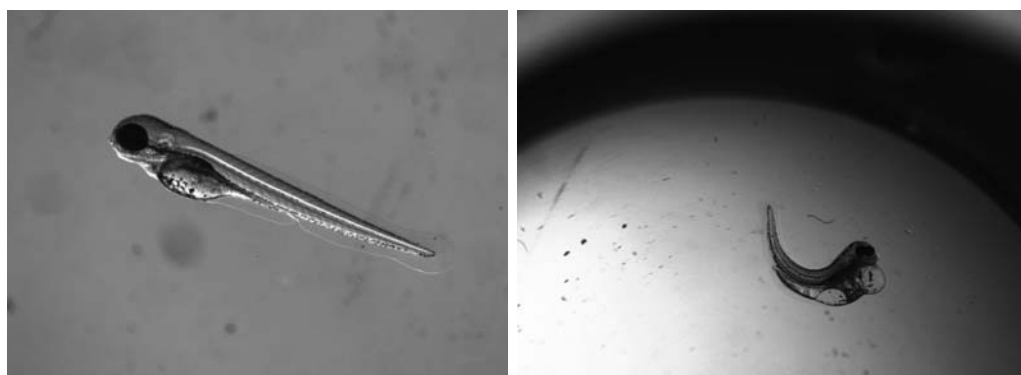
VÝSLEDKY

STANDARDNÍ AKUTNÍ TEST S DANIO RERIO

Během akutních testů s odtoky z ČOV nedošlo k mortalitě embryí ani při aplikaci neředěných vzorků, byly však pozorovány subletální efekty morfologického charakteru. Jednalo se zejména o deformace v oblasti srdce, konkrétně o srdeční edémy (obr. 1 a 2). Ty se u vzorku testovaného ve více ředěních statisticky významně vyskytovaly už při 17 objemových procentech vzorku v testovacím mediu, pro testování byl použit Williams test (Jonáš a kol., 2011).

Obr. 1 a 2. Embrya *Danio rerio* 5 dní po oplodnění, vlevo na obrázku 1 je vidět správně se vyvíjející embryo v kontrole, na obrázku 2 deformované embryo exponované odpadní vodou z ČOV.

Fig. 1 and 2. *Danio rerio* embryos 5 days post fertilization, on the left is healthy embryo in control, on the right malformed embryo exposed to waste water treatment plant effluent.



MĚŘENÍ ESTROGENITY ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ POMOCÍ IN VITRO TESTU

Zjištěný estrogenní potenciál extraktů vzorků odpadní vody se pohyboval v rozmezí od < 0,5 do 2,0 ng.l⁻¹ EEQ (Jedličková a kol., 2011). Z výsledků dále není patrný žádný významný rozdíl mezi jednotlivými ČOV v závislosti na velikosti jejich kapacity ani složení přítoku (tab. 2).

Tab. 2. Výsledky estrogenních ekvivalentů u čistíren odpadních vod, upraveno dle (Jedličková a kol., 2011).

Tab. 2. Results of estrogen equivalents, modified according to (Jedličková a kol., 2011).

Typ ČOV	Označení ČOV	ng/l EEQ
ČOV přijímající jen splašky	ČOV 1	méně než 0,5
	ČOV 2	1,0
ČOV přijímající splašky a dešťové vody	ČOV 3	0,8
	ČOV 4	2,0
	ČOV 5	2,0
ČOV přijímající splašky, dešťové a průmyslové vody	ČOV 6	0,7
	ČOV 7	1,0

EXTRAKCE RNA

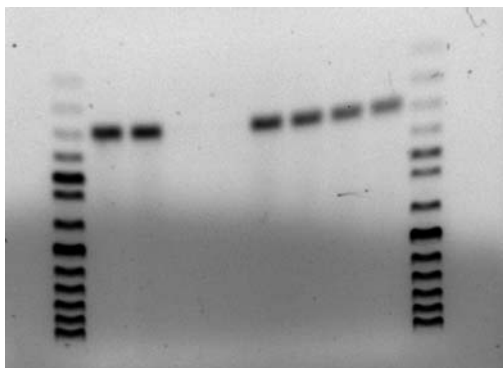
Optimalizace počátečního počtu embryí na jednu misku (použito 20, 30, 40 a 80 embryí na jednu misku) ukázala, že i s použitím 20 embryí lze dosáhnout dostatečného výtěžku RNA pro následné RT-PCR. Extrahovaná RNA na 20 použitých embryí je v průměru 21 µg. S využitím popsané metody byla získána nedegradovaná RNA bez kontaminace, což bylo ověřeno za pomoci spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 a elektroforéz RNA na agarových gelech.

RT-PCR

Postupy uvedené v části Materiál a metodika byly testovány v řadě kroků (detaily optimalizace nejsou prezentovány) a s využitím optimalizované metody byla úspěšně realizována konvenční RT-PCR (obr. 3) a kvantitativní RT-PCR (obr. 4). Referenční gen β -actin byl v našich experimentech dobře viditelný a vytvářel pouze specifické produkty. Protože se zatím jedná o předběžnou studii, nebyly vzorky embryí exponovaných endokrinním disruptorům zatím s využitím RT-PCR zpracovány.

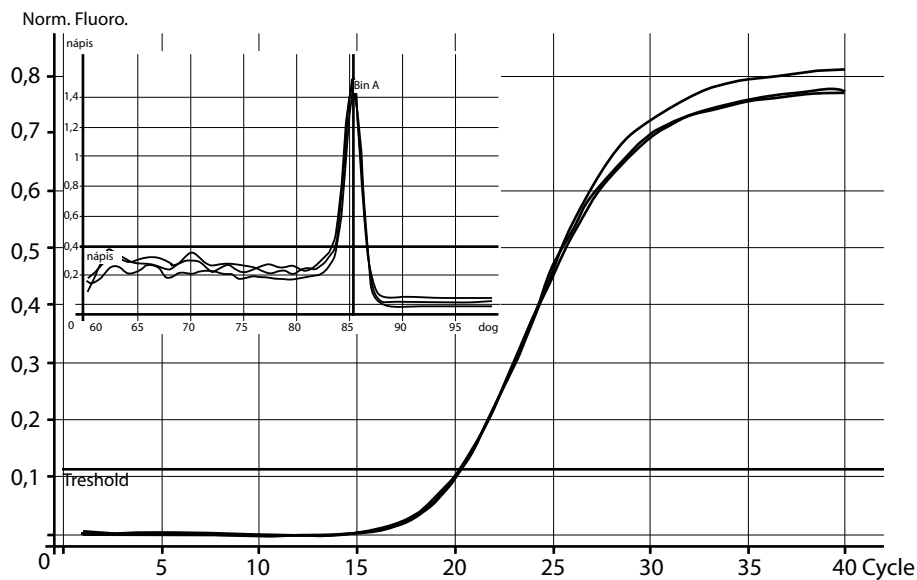
Obr. 3. Agarový gel po elektroforéze, můžeme vidět specifické produkty konvenční RT-PCR o správné velikosti, jedná se o β -actin.

Fig. 3. Agarose gel after electrophoresis with visible specific β -actin products.



Obr. 4. Záznam z kvantitativní RT-PCR s vyznačeným threshold na 21 cyklu. Na vsunuté křivce táni v levém horním rohu je vidět, že produkty jsou specifické. Jedná se o β -actin.

Fig. 4. Quantification data from real-time RT-PCR with threshold line approximately at 21st cycle. On the melting curve in the top left corner is visible that a product, in this case β -actin, was specific.



DISKUSE

Vzhledem k tomu, že během standardních akutních testů toxicity na ČOV nebyla u žádného ze vzorků pozorována mortalita, lze konstatovat, že všechny testované ČOV v České republice by splnily zákonné limity kladené na ČOV v Německu. U těchto testů je totiž zohledňována pouze mortalita (ISO, 2008; Lammer a kol., 2009). Subletální efekty však ukazují na nutnost další identifikace mechanismů účinku těchto jevů a potenciálních následků pro populace ryb a dalších rizik s tím spojených.

Estrogenní potenciál extraktů odpadních vod na výtoku z českých ČOV naměřený za pomoci *in vitro* testu s reportérovým genem je dobře srovnatelný s daty z jiných evropských studií (Munk a kol., 2002; Svenson a kol., 2003). To ukazuje na podobnost ČOV v České republice s evropskou situací, a tím i na možnost extrapolace našich získaných výsledků na širší evropský prostor. I toto tvrzení však bude třeba ověřit větším počtem testovaných vzorků.

Optimalizační kroky provedené v rámci studie ukázaly, že použití 20 embryí pro extrakci RNA se jeví jako dostačující. Tento počet vyhovuje i prostorovým požadavkům uváděným v ISO 15088 (ISO, 2008). V jiných studiích s endokrinními disruptory však bylo využito např. až 70 embryí na Petriho misku (Muncke a kol., 2007), což spíše odpovídá sníženým prostorovým nárokům zmíněným v reportu, který byl připraven pro německou agenturu životního prostředí (Braunbeck a Lammer, 2005). Metodika připravená během této studie je k dispozici pro další výzkum vlivu modelových látek i vzorků z prostředí.

SOUHRN

Alternativní test s embryi *Danio rerio* může být perspektivně nejen vhodnou náhradou akutního testu s dospělci ryb (Lammer a kol., 2009), ale nalézá také široké uplatnění při výzkumu specifických toxických účinků. Ty mohou predikovat budoucí patologické změny v organizmech. Jedním z takovýchto příkladů je výzkum endokrinní disrupce za pomoci RT-PCR. Vzhledem ke spojitosti ČOV a endokrinních disruptorů byla tato kombinace vybrána jako modelový příklad sledování estrogenních efektů v životním prostředí. Použití standardního akutního testu na ČOV poukázalo na subletální efekty a potřebu identifikovat specifické způsoby působení polutantů. *In vitro* estrogenní potenciál extraktů odpadních vod z výtoků ČOV v České republice byl srovnatelný s daty z literatury. Publikovaná data slouží jako základ pro realizaci kvantitativní RT-PCR pro sledování estrogenních efektů na cílových genech (vtg1, aromB, esr1 a β -actin).

PODĚKOVÁNÍ

Výzkum byl podporován z projektů INCHEMBIOL (MSM0021622412) a CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001). Adam Jonáš je příjemcem finanční podpory od statutárního města Brna v programu Brno PhD Talent.

LITERATURA

- Braunbeck, T., Lammer, E., 2005. Draft detailed review paper on fish embryo toxicity assays. Aquatic Ecology & Toxicology Department of Zoology, U. o. H., Germany, German Federal Environmental Agency.
- EU, 1986 Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 358, O. J. L., European Council, 0001–0028.
- Grothe, D. R., Dickson, K. L., Reed-Judkins, D. K., 1996. Whole Effluent Toxicity Testing: An Evaluation of Methods and Prediction of Receiving System Impacts., Setac Press.
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3): 378–388.
- Hecker, M., Tyler, C. R., Hoffmann, M., Maddix, S., Karbe, L., 2002. Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environmental Science & Technology*, 36(11): 2311–2321.
- Hermesen, S. A. B., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L. T. M., Piersma, A. H., 2011. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3): 745–753.
- Hilscherova, K., Machala, M., Kannan, K., Blankenship, A. L., Giesy, J. P., 2000. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 7(3): 159–171.
- Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., Tyler, C. R., 2005. Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish - Biomarkers As "Signposts" Not "Traffic Lights" in Risk Assessment. *Environ Health Perspect*, 114(S-1).
- Chandrasekar, G., Archer, A., Gustafsson, J. A., Lendahl, M. A., 2010. Levels of 17 beta-Estradiol Receptors Expressed in Embryonic and Adult Zebrafish Following In Vivo Treatment of Natural or Synthetic Ligands. *Plos One*, 5(3).
- ISO, 1996. ISO 7346 – Water Quality – Determination of the Acute Lethal Toxicity of Substances to a Freshwater Fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static method; Part 2 – Semi-Static Method.
- ISO, 2008 International Standard Organization, Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). European Standard EN ISO 15088.
- Jedličková, B., Hilscherová, K., Bláha, L., 2011. Monitoring of Endocrine Disruptors in Czech waste waters and their recipients. *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae*, 19.
- Jonáš, A., Jedličková, B., Bláha, L., 2011. Application of the fish embryo toxicity test for the assessment of waste water treatment plant effluents. *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae*, 19.
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2): 196–209.
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4): 1–20.

- Marty, M. S., Carney, E. W., Rowlands, J. C., 2011. Endocrine Disruption: Historical Perspectives and Its Impact on the Future of Toxicology Testing. *Toxicological Sciences*, 120(suppl 1): 93–108.
- Muncke, J., Eggen, R. I. L., 2006. Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(10): 2734–2741.
- Muncke, J., Junghans, M., Eggen, R. I. L., 2007. Testing estrogenicity of known and novel (xeno) estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 22(2): 185–193.
- Murk, A. J., Legler, J., van Lipzig, M. M. H., Meerman, J. H. N., Belfroid, A. C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G. B. J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1): 16–23.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten*, 19: 38–48.
- Navas, J. M., Segner, H., 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquatic Toxicology*, 80(1): 1–22.
- OECD, 2006 Organisation for Economic Co-operation and development, Fish embryo toxicity (FET) test, Draft OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline, přístup: 10/4/2010. <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L., 1959. *The principles of humane experimental techniques*. London, UK, Methuen.
- Sawyer, S. J., Gerstner, K. A., Callard, G. V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2): 108–117.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment–applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5): 394–404.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2011. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, In Press, Corrected Proof.
- Svenson, A., Allard, A. S., Ek, M., 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*, 37(18): 4433–4443.
- Tyler, C. R., Jobling, S., Sumpter, J. P., 1998. Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28(4): 319–361.
- van der Sar, A. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Bitter, W., 2004. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in Microbiology*, 12(10): 451–457.
- Voelker, D., Stetefeld, N., Schirmer, K., Scholz, S., 2008. The role of cyp1a and heme oxygenase 1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 86(1): 112–120.
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G. W., Geisler, R., Schirmer, K., Scholz, S., 2007. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 81(4): 355–364.



METODY ODSTRAŇOVÁNÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ Z VOD

REMOVING OF ENDOCRINE DISRUPTORS FROM WATER

M. BITTNER

Masarykova univerzita, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Kamenice 126/3, 625 00 Brno
email: bittner@recetox.muni.cz

ABSTRACT

Endocrine disruptors, such as various pesticides or industrial chemicals, are water contaminants of emerging concern. Exposure of animals to these compounds can eventually lead to their sexual and developmental impairments. For this reason, some of these compounds are regulated, and in case of exceeding their water limit concentration, they must be removed. This mini-review mainly focuses on relatively new group of endocrine disruptors – phthalates, and to methods of their removing. In conventional waste water treatment plant, phthalates are either biodegraded or adsorbed onto activated sludge with often more than 90% removing efficiency. Very efficient are also membrane separation methods with nearly 100% efficiency (especially when using reverse osmosis), but this methods have number of limitations, e.g. high energy consumption or amount of liquid waste. Interesting is also application of membrane bioreactors that utilize advantages of both mentioned methods – biodegradation and sorption on activated sludge with final cleaning on membrane modules. Often is also used activated carbon (and their analogues) as a very efficient sorbent for various (especially hydrophobic) contaminants. Last group of discussed methods are advanced oxidation processes such as ozonation, UV oxidation and their combinations (with ozone, H₂O₂, ultrasound) or photo/Fenton methods. Photo-Fenton oxidation usually degraded more than 90% of organic compounds that can be eventually mineralized. Nevertheless, final choice of appropriate method depends not only on process efficiency, but also on other factors such as purchase and operational costs, type of contaminated water, etc.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, membránové bioreaktory, ftaláty, znečišťující látky
Keywords: endocrine disrupters, membrane bioreactors, phthalates, emerging pollutants

SEZNAM ZKRATEK

AC – aktivní uhlí (activated carbon)
AOP – pokročilé oxidační procesy (advanced oxidation processes)
BBP – butyl benzyl ftalát (phthalate)
ČOV – čistírna odpadních vod
DEHP – di-ethylhexyl ftalát
DEP – diethyl ftalát
DIBP – di-iso-butyl ftalát
DMP – dimethyl ftalát
DnBP – di-n-butyl ftalát
DnOP – di-n-oktyl ftalát
ED – endokrinní disruptory
GAC – granulované aktivní uhlí (granulated activated carbon)

MBRs – membránové bioreaktory (membrane bioreactors)
MF – mikrofiltrace
NF – nanofiltrace
PAC – práškové aktivní uhlí (powdered activated carbon)
RO – reverzní osmóza
UF – ultrafiltrace
US.EPA – United States Environmental Protection Agency

ÚVOD

Endokrinní disruptory (ED) jsou organické látky mající potenciál narušovat hormonální systém organismů, což může mít za důsledek např. poruchy pohlavního vývoje vodních obratlovců v kontaminovaných vodách. V případě konzumace pitné vody kontaminované ED může být snížen počet spermií u mužů, zvýšeno riziko rakoviny prostaty či další poruchy reprodukčního systému lidí (Vethaak a kol., 2005). Mezi endokrinní disruptory jsou řazeny některé pesticidy (např. DDT, vinclozolin, methoxychlor, linuron, diuron) a průmyslové chemikálie (např. polychlorované bifenylly, alkylfenol ethoxyláty, vybrané polykondenzované aromatické uhlovodíky, bisfenol A, organocínové sloučeniny). Relativně novou skupinou znečišťujících látek (tzv. emerging pollutants), řazených mezi endokrinní disruptory, jsou diestery kyseliny ftalové (ftaláty) (Pak a kol., 2011). Z tohoto důvodu bude obsah příspěvku zaměřen především na tyto látky.

Ftaláty jsou řazeny mezi antropogenní polutanty životního prostředí, a to především vody (povrchové i pitné), půdy či vnitřního ovzduší. Do vod se dostávají buď znečištěnými odpadními vodami z výroben plastických hmot (kde se používají např. jako plasticizéry PVC, gumy, celulózy, styrenu, rozpouštědla, lubrikanty atd.), či výluhem z výrobků, ve kterých jsou ftaláty obsažené (např. při průsaku vody skládkami plastů). Stejnými cestami může být kontaminována i půda. Vnitřní ovzduší je kontaminováno ftaláty, které těkají z výrobků tyto látky obsahujících (Bodzek a kol., 2004), např. výrobky z měkčeného PVC (vinylové podlahy, obalové materiály atd), některé čisticí přípravky a kosmetické výrobky atd.

Di-ethylhexyl ftalát (DEHP) zaujímá čtvrtinu spotřeby všech ftalátů, je zařazen mezi 33 rizikových látek dle Rámcové směrnice pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky (Water European Framework Directive, 2000/60/EC), a nařízením 2008/105/EC byla stanovena limitní hodnota DEHP pro povrchové vody $1,3 \mu\text{g l}^{-1}$ (Clara a kol., 2010). Americká Agentura pro ochranu přírody (US. EPA) stanovila pro pitnou vodu limit $6 \mu\text{g l}^{-1}$ DEHP, nicméně snahou je dosáhnout v pitné vodě nulové koncentrace tohoto kontaminantu (US.EPA, 2009). Cílem uvedeného příspěvku je představit metody, které lze použít pro odstraňování endokrinních disruptorů z vod se zaměřením na ftaláty.

METODY ODSTRAŇOVÁNÍ FTALÁTŮ Z VOD

AKTIVOVANÝ KAL A SEDIMENTACE

V konvenčních čistírnách odpadních vod (ČOV) dochází k nejvýraznějšímu odstraňování DEHP a dalších ftalátů především v procesu primární sedimentace a ve stupni biologického čištění aktivovaným kalem. Hlavním mechanismem propadu je sorpce hydrofobních ftalátů na suspendované částice či povrch aktivovaného kalu. K biodegradaci aktivovaným kalem dochází jen v omezené míře (Dargnat a kol., 2009), nicméně lze zvýšit biodegradovatelnost ftalátů (především persistentního DEHP) předchozí foto-Fentonovou reakcí (Chen a kol., 2009).

V ČOV v Marne Aval (Francie) byla účinnost odstraňování DEHP 78 % (Dargnat a kol., 2009). Podobné účinnosti (75 %) odstraňování DEHP bylo dosahováno na ČOV v Kanadě, kde byly používány stejné čisticí technologie (Fernandez a kol., 2007). Vyšších účinností bylo dosahováno např. ve Finsku (94 %), kde byl použit také denitrifikačně/nitrifikační stupeň čištění vody (Marttinen a kol., 2003), a také v Dánsku (96 %) za použití speciálního biodegradačního stupně (Fauser a kol., 2003). Účinnost odstraňování DEHP v pěti australských ČOV (všechny používající čištění s aktivovaným kalem) byla v rozsahu 18–84 %. Čím byl způsoben tento rozdíl v účinnostech, však autoři publikace neobjasňují (Tan a kol., 2007b).

Další z řady ftalátů – dimethyl ftalát (DMP), diethyl ftalát (DEP), di-n-butyl ftalát (DnBP), butyl benzyl ftalát (BBP) a di-n-oktyl ftalát (DnOP) byly ve francouzské ČOV odstraňovány s průměrnou účinností 73–90 % (Dargnat a kol., 2009). V Austrálii bylo dosahováno podobných účinností, a to pro BBP 50%, DnBP 94% a DEP 98% (Tan a kol., 2007a).

MEMBRÁNOVÉ SEPARAČNÍ TECHNIKY

Membránové separační techniky je souhrnný název pro metody, které využívají k separaci rozpuštěných organických látek polopropustné membrány – ultrafiltrace (UF), nanofiltrace (NF) a reverzní osmóza (RO). Tyto metody se čím dál častěji používají jako alternativní metody při úpravě pitné vody v případě, že výchozí voda obsahuje velká množství organických kontaminantů (např. polykondenzované aromatické uhlovodíky, pesticidy, trihalometany a ftaláty) (Bodzek a kol., 2004). Dalším membránovým procesem je mikrofiltrace (MF), která se však pro odstraňování rozpuštěných látek z vod vzhledem k velikosti pórů nepoužívá, protože zachycuje částice jílu nebo bakterie.

Tyto velmi účinné metody jsou ale relativně energeticky náročné vzhledem k nutnosti použití čerpadlo pro vytvoření dostatečného tlaku vody, který je pro UF řádově v desetinách MPa a pro NF a RO řádově v jednotkách MPa. Díky rychlému vývoji v této oblasti však dochází k výraznému zlevňování použití membránových technik, a stávají se tak ekonomicky výhodné. To je způsobené jak zlevňováním membrán, tak i zlepšováním jejich kvality, což prodlužuje dobu, po které je nutno membránu vyměnit (Owen a kol., 1995). Provozní náklady čištění vody kontaminované organickými polutanty se pohybují v řádech setin až jednotek dolarů za 1 m³ vody, záleží na typu použité membránové techniky a druhu kontaminace (bez započítání nákladů na konstrukci přístroje) (Nandi a kol., 2009; Shaalan, 2009).

Při laboratorních testech separace ftalátů z pitné vody, která byla řízeně kontaminována, se jako velmi účinné osvědčily nejen metody RO a NF (účinnost zachytu vyšší než 95 %), ale překvapivě také UF. V případě UF byla hmotnost molekul schopných procházet přes membránu 8000 Da (tzv. *cut off* hodnota), zatímco hmotnost testovaných ftalátů (DEP, DnBP a DEHP) byla v rozsahu 222–390 Da. Přesto byla účinnost zachytu testovaných ftalátů 90–100 %).

V případě zvýšených koncentrací ftalátů (až 1400 µg l⁻¹) a obecně přítomných organických látek, docházelo k ucpávání RO a MF membrán a místně také UF membrány. Účinnost zachytu kontaminantů zůstala stále velmi vysoká (99,9 %), nicméně se snižoval tok vyčištěné vody (Bodzek a kol., 2004). Důsledkem je snižování produkce vyčištěné vody a zvyšování tlaku na membráně. Pro prodloužení životnosti membránových modulů je proto vhodné z čištěné vody nejprve odstranit co největší množství nerozpuštěných látek (např. filtrací přes 1 či 5 µm filtr, sedimentací atd.), ale také co nejvíce snížit množství rozpuštěných organických látek. Velmi se osvědčil také multibariérový koncept, kdy jsou kontaminanty separovány nejprve za použití MF/UF a následně pak pomocí RO (Snyder a kol., 2007). Zde je však nutno počítat se zvýšenými energetickými náklady pro vytvoření dostatečného tlaku vody.

Při použití separace kontaminantů pomocí membrán ale vzniká množství odpadní vody, ve které jsou tyto kontaminanty zakoncentrovány. Stupeň zakoncentrování lze řídit vytvořením smyčky, kdy je tato odpadní voda přiváděna zpět na membránu. Konečná separace zakoncentrovaných kontaminantů pak může být řešena např. sorpcí na pevný sorbent – např. aktivní uhlí či aktivovaný kal, s kterým jsou pak odstraněny v pevné fázi.

MEMBRÁNOVÉ BIOREAKTORY

Membránové bioreaktory (MBRs – Membrane Bioreactors) se jako alternativa ke konvenčnímu čištění (pomocí aktivovaného kalu) vyznačují výrazně kompaktnějšími rozměry čisticí jednotky a většinou také účinnějším procesem čištění vody. MBRs kombinují biologickou degradaci odpadních látek s membránovou filtrací. Biologická jednotka na bázi aktivovaného kalu je zodpovědná za biodegradaci organických látek. Zároveň dochází k sorpci hydrofobních látek na povrch kalu, se kterým pak mohou být odstraňovány. Membránová jednotka (většinou typu MF nebo UF – póry o velikosti 0,4–0,05 μm) slouží k fyzikální separaci vyčištěné vody a roztoku odpadní vody a aktivovaného kalu.

Konstrukce MBRs je provedena buď formou integrovaného (ponořeného), nebo recirkulačního (externího) MBR (Cicek, 2002). V případě integrovaných MBRs je plocha membrány přímo vnořena do bioreaktoru. Hnací silou membránové separace je buď tlak vyvíjený na bioreaktor, či podtlak na straně výtoky (Rosenberger a kol., 2002). Čištění membrány je zajišťováno častými „zpětnými pulzy“ permeátu (čištěné vody) či příležitostným chemickým zpětným proplachem. Vhodné umístění difuzéru (zdroje kyslíku) pod vnořenou membránu také napomáhá mechanickému očištění filtračního povrchu.

K výhodám uvedeným v začátku kapitoly (výrazně kompaktnější rozměry a často účinnější stupeň vyčištění) patří také delší doba zadržování aktivovaného kalu v reaktoru, což umožňuje rozvoj i pomaleji rostoucích bakterií (např. *Bacillus subtilis*) schopných degradace specifických organických polutantů včetně ftalátů (Pham a kol., 2011). Dalším důsledkem větší zadržování kalu je minimalizace jeho množství jako pevného odpadu (Le-Clech, 2010).

Nevýhody MBRs oproti konvenčnímu biologickému čištění vody jsou následující:

- 1) Odpadní voda musí být nejprve zbavena všech částí, které by mohly porušit membránový modul či aerátory, jako jsou různé vláknité materiály, chlupy, prach či jiné abrazivní materiály. Toto se většinou řeší použitím filtrace odpadní vody přes 0,5mm filtr.
- 2) Tendence membrán k ucpávání nárůstem bakterií či, v případě hydrofobních membrán, sorpcí hydrofobních organických látek na membránu. Membrány je tedy nutné pravidelně udržovat (mechanické čištění zpětným proplachem, chemické čištění NaClO, atd.), což výrazně prodlouží jejich dobu použitelnosti (Le-Clech, 2010).
- 3) Vyšší energetická spotřeba – spotřeba energie velké ČOV založené na principu MBRs je přibližně 0,8–1 kWh na 1 m³ vyčištěné vody, u menších MBRs je jednotková spotřeba ještě vyšší – 1,8–6 kWh m³ (Fenu a kol., 2010). V případě separace specifických organických polutantů z vod, jako jsou např. ftaláty, většinou vykazují MBRs vyšší účinnost než konvenční ČOV. Účinnost separace je dána především fyzikálně chemickými vlastnostmi separovaných látek, jejich velikostí a nábojem (Tadkaew a kol., 2010). Dokonce i při srovnání účinnosti separace ftalátů ČOV s terciárním stupněm čištění a MBR vykazoval MBR vyšší účinnost při odstraňování DEP, DnBP a BBP. V případě DEHP však MBR vykazoval účinnost nižší danou především zvýšenou rezistencí této látky vůči biodegradaci. Hlavním mechanismem odstraňování DEHP je především sorpce na aktivovaný kal s následným odstraněním pískovou filtrací (Cases a kol., 2011). Srovnání účinnosti odstraňování ftalátů a dalších ED je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1 Průměrná míra odstraňování vybraných ED v procesu čištění odpadních vod (Cases a kol., 2011). CAS-TT – konvenční ČOV s terciárním stupněm, MBR-FS – čistírna s membránovým bioreaktorem s plochou deskovou membránou, MBR-HF – čistírna s membránovým bioreaktorem s membránou z dutého vlákna, 4tOP – 4-(terc-oktyl) fenol, NP – 4-nonylfenol, 4OP – 4-oktylfenol, BPA – bisfenol A, DOP – di-n-oktyl ftalát, E1 – estron, EE2 – 17 α -ethynyl estradiol, další zkratky jsou vysvětleny v seznamu zkratk.

Tab. 1. Average removal efficiency of the selected endocrine disrupting compounds by sewage treatment processes (Cases et al., 2011). CAS-TT – conventional activated sludge plant with a tertiary treatment, MBR-FS – membrane bioreactor pilot plant with flat sheet module, MBR-HF – membrane bioreactor pilot plant with hollow fibre module, 4tOP – 4-

ED	Míra odstranění v % (průměrné hodnoty \pm SD)		
	CAS-TT	MBR-FS	MBR-HF
DMP	nd	nd	nd
DEP	59 \pm 41	79 \pm 33	69 \pm 25
4tOP	99 \pm 1	99 \pm 1	98 \pm 1
NP	70 \pm 43	64 \pm 40	86 \pm 9
4OP	nd	nd	nd
DBP64 \pm 56	87 \pm 19	97 \pm 1	
BBP	80 \pm 28	98 \pm 5	89 \pm 12
BPA	96 \pm 5	92 \pm 9	97 \pm 2
BEHP	79 \pm 38	56 \pm 31	57 \pm 44
DOP	nd	nd	nd
E1	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 1
EE2	nd	nd	nd

nd – nedetekováno; SD – směrodatná odchylka

Vzhledem k relativně malému zachytu perzistentních organických látek na MF a UF membránách MBRs (Snyder a kol., 2007) je pro separaci takovýchto látek aktuálním trendem kombinace MBRs s pokročilejšími způsoby čištění kontaminovaných vod, a to za použití aktivovaného uhlí, post-ozonace či RO (Le-Clech, 2010). Díky těmto „dočišťovacím modulům“ je možno dosáhnout výrazně vyšších účinností při odstraňování dalších organických látek, což bylo ověřeno na spektru 40 stopových organických kontaminantů, kde došlo k více než 95% snížení jejich koncentrace (Alturki a kol., 2010).

SORPCE NA AKTIVNÍ UHLÍ A DALŠÍ SORBENTY

Sorpce různorodých organických kontaminantů na aktivní uhlí (AC) představuje velmi účinný mechanismus jejich odstraňování z odpadních vod. Nejčastěji se používá aktivní uhlí ve formě granulovaného (GAC – granulated activated carbon) a práškového aktivního uhlí (PAC – powdered activated carbon). Pro odstraňování organických látek z vody se osvědčily oba typy aktivního uhlí, kdy při vhodné optimalizaci procesu čištění (především výška lože AC a rychlosti průtoku čištěné vody) je možno dosáhnout téměř 100% účinnosti (Snyder a kol., 2007). Další výhodou je možnost snadné výměny sorbentu po jeho nasycení kontaminanty a jeho regenerace (v případě GAC). V potaz však musí být brány náklady na regeneraci probíhající v pecích při vysoké teplotě (650–760 °C) či zvážit nutnost skládkování kontaminovaného AC (US.EPA, 2001).

Nevýhodou AC je, že v případě hydrofilních kontaminantů dochází k snadnějšímu průrazu lože a průniku kontaminantů do čištěného roztoku. Tato vlastnost AC však v případě hydrofobních ftalátů není příliš významná. Další nevýhodou je náchylnost AC na vyšší koncentrace přírodní

rozpuštěné organické hmoty v čištěné vodě, která je na AC silně absorbována a blokuje tak vazná místa pro ostatní kontaminanty (Snyder a kol., 2007). I přes tato omezení je dle US.EPA použití GAC nejlepší dostupnou technologií pro odstraňování DEP a DEHP z pitné vody (US.EPA, 2001).

Dále bylo prokázáno, že se snižujícím se pH dochází k výraznému zvyšování účinnosti adsorpce ftalátů na AC, zatímco při vysokých hodnotách pH je účinnost sorpce velmi nízká (Adhoum a Monser, 2004; Ayranci a Bayram, 2005). Dalšího významného zvýšení sorpce ftalátů na AC lze docílit impregnací AC mědí či tetrabutylamoniem (Adhoum a Monser, 2004).

Vzhledem k relativně vysoké ceně AC řada autorů s úspěchem testuje sorpci ED včetně ftalátů na alternativní sorbety. Mezi známé sorbety řadíme například „sférický mikroporéz- ní uhlík“ připravený z odpadních polymerních iontoměničů (Long a kol., 2009), hydrofobní polysulfonové částice (Zhao a kol., 2004), montmorillonit či hybridní polymerní částice (Sun a kol., 2011).

POKROČILÉ OXIDAČNÍ PROCESY

Látky obtížně biodegradovatelné či toxické mohou být degradovány chemicky, a to především oxidací, nejlépe až mineralizovány na CO₂ a další jednoduché látky. V současnosti jsou používány tzv. pokročilé oxidativní procesy (AOP – advanced oxidation processes), které jsou založeny na tvorbě značně reaktivních a neselektivních hydroxylových radikálů (OH·).

Existuje řada procesů, při kterých vznikají tyto radikály (např. fotochemickým rozkladem vody za katalýzy TiO₂, O₃/UV rozkladem) a osvědčily se v degradaci ftalátů (Gultekin a Ince, 2007), avšak jsou často velmi energeticky náročné, vyjma Fentonovy reakce. Fentonova reakce je reakcí peroxidu vodíku (H₂O₂) s Fe²⁺ v kyselém prostředí (např. v přítomnosti H₂SO₄): Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH· kdy železnaté ionty jsou zpět regenerovány reakcí Fe³⁺ s H₂O₂ za tvorby dalších reaktivních kyslíkových molekul (Yang a kol., 2005). Přehled významných AOP je shrnut v tabulce 2.

Tab. 2. Nejčastěji používané AOP pro čištění odpadních vod (Gultekin a Ince, 2007).

Tab. 2. The most common AOP used for waste water treatment (Gultekin and Ince, 2007)

Pokročilé oxidační procesy	
Fotochemické procesy	Nefotochemické procesy
UV-oxidační procesy	Ozonizace
UV/H ₂ O ₂	Fentonova reakce
UV/O ₃	Ultrazvuk (US)
UV/H ₂ O ₂ /O ₃	US/H ₂ O ₂ US/O ₃ US/Fenton
UV/Ultrazvuk	Elektrochemická oxidace
Foto-Fentonova reakce	Superkritická vodní oxidace
Fotokatalýza	Ionizační záření
Sonofotokatalýza	Ozařování elektronovým paprskem
Vakuové UV (VUV)	Oxidace vlhkým vzduchem
Mikrovlny	Pulzní plazma

Účinnost degradace ED obsažených v odpadní vodě z papíren je dle provedených experimentů Fentonovou reakcí velmi vysoká. Účinnost je ovšem závislá na faktorech, jako je poměr obsahu H_2O_2 : Fe^{2+} , doba degradace ED nebo přítomnost UV záření (tzv. foto-Fentonova reakce). V případě optimálních podmínek bylo Fentonovou reakcí dosahováno 80% účinnosti degradace ED, v případě foto-Fentonovy reakce až 95% účinnosti. Účinnost degradace stejných látek anaerobní biodegradací byla přibližně 65 % a aerobní biodegradací 73 % (Balabanic a kol., 2010).

Degradace DnBP (200 mg.l^{-1}) Fentonovou reakcí (pH 3, přítomnost FeSO_4 nebo kal bohatý na Fe z ČOV) po dobu 2 h s následnou koagulací přidáním NaOH (pH 8) a sedimentací 1 h vedla k 90% poklesu organické hmoty. Autoři však nevyklučují možné odstranění DnBP také sorpcí na přítomný kal (Swiderska-Dabrowska a kol., 2008). Jiní autoři dosáhli v případě DnBP za použití foto-Fentonovy reakce účinnosti mineralizace až 92 % během 90 minut (Chiou a kol., 2006). Podobně účinná (87 %) byla i degradace di-iso-butyl ftalátu (DIBP) Fentonovým činidlem (pH 3 a molární poměr $[\text{H}_2\text{O}_2] : [\text{Fe}^{2+}] : [\text{DIBP}] = 5:5:1$), kde k degradaci DIBP došlo již během několika minut (Wongniramaikul a kol., 2007). V případě degradace DEP foto-Fentonovou reakcí bylo dosaženo 76% degradace během 120 minut (Yang a kol., 2005).

Nevýhodou foto-Fentonovy reakce je poměrně velké množství železitého kalu a nutnost zajistit kontinuální přísun H_2O_2 a železnatých iontů. Tuto nevýhodu nemají AOP založené na ozonizaci či kombinaci O_3/UV , kdy produktem jsou většinou jen CO_2 a voda. Na rozdíl od všech ostatních čistících procesů, kdy dochází „jen“ k přemístování ftalátů z jednoho místa na jiné nebo vzniká množství kontaminovaného kalu, žádné další odpadní produkty nevznikají.

DISKUSE

Endokrinní disruptory představují kontaminanty vod, kterým je v poslední době věnována zvýšená pozornost. V České republice představuje kontaminace povrchových vod a sedimentů ftaláty významný problém, např. v řece Moravě byly v sedimentech stanoveny řádově mikrogramy DEHP na gram sedimentu (Vondracek a kol., 2001).

Většina ftalátů kontaminujících povrchové vody je odstraňována s ostatními kontaminanty v konvenčních ČOV. V případě lokálních úniků významného množství ftalátů z výroben plastů či skládek do povrchových vod je pak nutno zvážit některou z dalších účinných separačních metod popsaných v tomto článku. Cílem je zajistit, aby byly dodrženy hygienické limity, které jsou již pro některé ED (např. DEHP) stanovené, aby tak nedocházelo k významnému znečišťování životního prostředí.

Z přehledu metod uvedených výše je zřejmé, že existuje řada procesů, které jsou použitelné pro odstranění ftalátů z odpadních vod. Každá z popsaných metod má však své výhody i nevýhody, jak již bylo diskutováno při popisu jednotlivých metod. Jedná se především o různou energetickou náročnost, nároky na prostor, vznik množství odpadních látek, různou účinnost, náklady na konstrukci či pořízení přístroje a další. V případě výběru nevhodnější metody pro odstranění ftalátů z vod tedy bude záležet nejen na účinnosti metody, ale i na konkrétních podmínkách vhodnosti použití dané metody, požadavcích na míru odstranění kontaminantů z vody a také na finančních možnostech uživatele.

PODĚKOVÁNÍ

Vypracování této práce bylo finančně podpořeno společností Vodní zdroje Holešov a. s., a projektem CETOCOEN (Evropský regionální rozvojový fond č. CZ.1.05/2.1.00/01.0001).

LITERATURA

- 2000/60/EC: Směrnice evropského parlamentu a rady 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky; Úřední věstník Evropské unie, 22. 12. 2000.
- 2008/105/EC: Směrnice evropského parlamentu a rady 2008/105/ES ze dne 16. prosince 2008 o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky, změně a následném zrušení směrnic Rady 82/176/EHS, 83/513/EHS, 84/156/EHS, 84/491/EHS a 86/280/EHS a změně směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES; Úřední věstník Evropské unie, 24. 12. 2008.
- Adhoum, N., Monser, L., 2004. Removal of phthalate on modified activated carbon: application to the treatment of industrial wastewater. *Sep. Purif. Technol.*, 38(3): 233–239.
- Alturki, A. A., Tadkaew, N., McDonald, J. A., Khan, S. J., Price, W. E., Nghiem, L. D., 2010. Combining MBR and NF/RO membrane filtration for the removal of trace organics in indirect potable water reuse applications. *J. Membrane Sci.*, 365(1–2): 206–215.
- Ayranci, E., Bayram, E., 2005. Adsorption of phthalic acid and its esters onto high-area activated carbon-cloth studied by in situ UV-spectroscopy. *J. Hazard. Mater.*, 122(1–2): 147–153.
- Balabanic, D., Hermosilla, D., Blanco, A., Merayo, N., Klemencic, A. K., 2010. The possibility of removal of endocrine disrupters from paper mill waste waters using anaerobic and aerobic biological treatment, membrane bioreactor, ultra-filtration, reverse osmosis and advanced oxidation processes. *Environmental Toxicology III*, 132: 33–44.
- Bodzek, M., Dudziak, M., Luks-Betlej, K., 2004. Application of membrane techniques to water purification. Removal of phthalates. *Desalination*, 162(1–3): 121–128.
- Cases, V., Alonso, V., Argandona, V., Rodriguez, M., Prats, D., 2011. Endocrine disrupting compounds: A comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors. *Desalination*, 272(1–3): 240–245.
- Cicek, N., 2002. Membrane bioreactors in the treatment of waste water generated from agricultural industries and activities. AIC 2002 meeting, Saskatchewan, CANADA.
- Clara, M., Windhofer, G., Hartl, W., Braun, K., Simon, M., Gans, O., Scheffknecht, C., Chovanec, A., 2010. Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. *Chemosphere*, 79(10): 1017–1018.
- Dargnat, C., Teil, M. J., Chevreuil, M., Blanchard, M., 2009. Phthalate removal throughout wastewater treatment plant Case study of Marne Aval station (France). *Science of the Total Environment*, 407(4): 1235–1244.
- Fausser, P., Vikelsoe, J., Sorensen, P. B., Carlsen, L., 2003. Phthalates, nonylphenols and LAS in an alternately operated wastewater treatment plant – fate modelling based on measured concentrations in wastewater and sludge. *Water Res.*, 37(6): 1288–1295.
- Fenu, A., Roels, J., Wambecq, T., De Gussem, K., Thoeys, C., De Guedre, G., Van De Steene, B., 2010. Energy audit of a full scale MBR system. *Desalination*, 262(1–3): 121–128.
- Fernandez, M. P., Ikonomou, M. G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment*, 373(1): 250–269.
- Gultekin, I., Ince, N. H., 2007. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *J. Environ. Manage.*, 85(4): 816–832.
- Chen, C. Y., Wu, P. S., Chung, Y. C., 2009. Coupled biological and photo-Fenton pretreatment system for the removal of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from water. *Bioresource Technol.*, 100(19): 4531–4534.

- Chiou, C. S., Chen, Y. H., Chang-Tang, C., Chang, C. Y., Shie, J. L., Li, Y. S., 2006. Photochemical mineralization of di-n-butyl phthalate with $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$. *J. Hazard. Mater.*, 135(1–3): 344–349.
- Le-Clech, P., 2010. Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *App. Microbiol. Biot.*, 88(6): 1253–1260.
- Long, C., Lu, J. D., Li, A. M., Zhang, Q. X., 2009. Removal of endocrine disrupting chemicals from aqueous phase using spherical microporous carbon prepared from waste polymeric exchanger. *Water Sci. Technol.*, 60(6): 1607–1614.
- Marttinen, S. K., Kettunen, R. H., Sormunen, K. M., Rintala, J. A., 2003. Removal of bis (2-ethylhexyl) phthalate at a sewage treatment plant. *Water Res.*, 37(6): 1385–1393.
- Nandi, B.K., Uppaluri, R., Purkait, M.K., 2009. Treatment of oily waste water using low-cost ceramic membrane: flux decline mechanism and economic feasibility. *Sep. Sci. Technol.*, 44(12): 2840–2869.
- Owen, G., Bandi, M., Howell, J. A., Churchhouse, S. J., 1995. Economic-assessment of membrane processes for water and waste-water treatment. *J. Membrane Sci.*, 102: 77–91.
- Pak, V. M., McCauley, L. A., Pinto-Martin, J., 2011. Phthalate exposures and human health concerns: a review and implications for practice. *AAOHN Journal*, 59(5): 228–233.
- Pham, T. T. H., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., 2011. Effect of ultrasonication and Fenton oxidation on biodegradation of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in wastewater sludge. *Chemosphere*, 82(6): 923–928.
- Rosenberger, S., Kruger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U., Kraume, M., 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Res.*, 36(2): 413–420.
- Shalan, H. F., 2009. Treatment of pesticides containing effluents using organoclays/nanofiltration systems: rational design and cost indicators. *Desalin. Water Treat.*, 5(1–3): 153–158.
- Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E. C., Yoon, Y., 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 202(1–3): 156–181.
- Sun, S. D., Hunag, J., Zhao, C. S., 2011. Polymeric particles for the removal of endocrine disruptors. *Sep. Purif. Rev.*, 40(4): 312–337.
- Swiderska-Dabrowska, R., Piaskowski, K., Schmidt, R., 2008. Use of iron-rich sludges for oxidation of phthalates in Fenton process. *Przem. Chem.*, 87(5): 587–589.
- Tadkaew, N., Sivakumar, M., Khan, S. J., McDonald, J. A., Nghiem, L. D., 2010. Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresource Technol.*, 101(5): 1494–1500.
- Tan, B. L. L., Hawker, D. W., Mueller, J. F., Leusch, F. D. L., Tremblay, L. A., Chapman, H. F., 2007a. Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. *Chemosphere*, 69(4): 644–654.
- Tan, B. L. L., Hawker, D. W., Muller, J. F., Leusch, F. D. L., Tremblay, L. A., Chapman, H. F., 2007b. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ. Int.*, 33(5): 654–669.
- US.EPA, 2001. Removal of endocrine disruptor chemicals using drinking water treatment processes, EPA/625/R-00/015.
- US.EPA, 2009. Consumer factsheet on Di (2-Ethylhexyl)phthalate. Part of national primary drinking water regulations.

- Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B. J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A. S., Grinwis, G. C. M., Kuiper, R. V., Legler, J., Murk, T. A. J., Peijnenburg, W., Verhaar, H. J. M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59(4): 511–524.
- Vondracek, J., Machala, M., Minksova, K., Blaha, L., Murk, A. J., Kozubik, A., Hofmanova, J., Hilscherova, K., Ulrich, R., Ciganek, M., Neca, J., Svrckova, D., Holoubek, I., 2001. Monitoring river sediments contaminated predominantly with polyaromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(7): 1499–1506.
- Wongniramaikul, W., Liao, C. H., Kanatharana, P., 2007. Diisobutyl phthalate degradation by Fenton treatment. *J. Environ. Sci. Heal. A*, 42(5): 567–572.
- Yang, G. P., Zhao, X. K., Sun, X. J., Lu, X. L., 2005. Oxidative degradation of diethyl phthalate by photochemically-enhanced Fenton reaction. *J. Hazard. Mater.*, 126(1–3): 112–118.
- Zhao, C. S., Wei, Q. R., Yang, K. G., Liu, X. D., Nomizu, M., Nishi, N., 2004. Preparation of porous polysulfone beads for selective removal of endocrine disruptors. *Sep. Purif. Technol.*, 40(3): 297–302.

Pokyny pro autory

ODBORNÉ ZAMĚŘENÍ ČASOPISU

Bulletin VÚRH přijímá k publikování a následně po lektorování uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení, přehledové referáty a recenze, týkající se všech aspektů sladkovodního rybářství, ichtyologie a akvakultury. Tato odborná oblast zahrnuje především vědecké práce týkající se: biologie, fyziologie, reprodukce, genetiky, šlechtění, chovu, výživy a nemocí sladkovodních ryb a dále také sladkovodní ekologie, toxikologie, hydrobiologie, rybářské statistiky a ekonomiky chovu ryb. Příležitostně jsou v něm publikovány i příspěvky přednesené na vědeckých a odborných konferencích či seminářích.

AUTORSKÁ PRÁVA PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autor předkládané práce je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. Autor se při předkládání práce do redakce časopisu zaručuje, že tato práce je jeho autorské dílo, které nebylo nikde publikováno a neporušuje (či nebude porušovat) autorská díla třetích osob. První autor předkládané práce přebírá veškerou zodpovědnost za všechny spoluautory práce. Autoři práce se zaručují, že žádná část jejich práce nebude dále publikována či nijak rozšiřována bez souhlasu vydavatele Bulletinu VÚRH Vodňany.

V případě využití částí děl jiných autorů se autor zavazuje dodržovat citační pravidla dle § 31 autorského zákona 121/2000 Sb.

PROCES PŘEDLOŽENÍ, POSOUZENÍ, LEKTOROVÁNÍ A NÁSLEDNÉ UVEŘEJNĚNÍ PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autoři předkládají práce (především odborné a přehledové články) výhradně elektronicky bez tištěného originálu na emailovou adresu dvorakz@frov.jcu.cz. Předložená práce je posouzena redakcí časopisu. Poté je práce zaslána ke korektuře. Dva nezávislí odborní oponenti z jiných českých vědecko-výzkumných institucí posoudí předloženou práci z hlediska odborného a věcného. Po korektuře a případných vyžádaných úpravách, které jsou realizovány a odsouhlaseny samotnými autory, je předložená práce doporučena k uveřejnění. O konečném uveřejnění prací rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k vědeckému významu, přínosu a kvalitě předložené práce. Před konečným uveřejněním první autor práce odsouhlasí publikování práce v konečné podobě vlastním podpisem na speciálním formuláři „Souhlas s vytištěním dané publikace“. Po tomto odsouhlasení se práce stává majetkem vydavatele. Všechna následná autorská práva jsou poté chráněna copyrigthem vydavatele.

TECHNICKÁ ÚPRAVA RUKOPISU

Text příspěvku bude zpracovaný v českém jazyce v programu Microsoft Word (pokud možno v co nejaktuálnější verzi) s příponou *.rtf. Vyžadovaný formát příspěvku je: formát stránky A4; řádkování 2; zarovnání textu do bloku; font Times New Roman CE; základní písmo textu velikosti 12; okraje 2,5 cm po všech stranách; stránky i řádky textu budou průběžně číslovány; u každého odstavce bude odsazení prvního řádku 1 cm; žádný text ani informace nesmí být v záhlaví ani v zápatí stránky. Text je doporučeno graficky upravit tak, jak si jej autor přeje otisknout, tedy s vložením tabulek, grafů i obrázků přímo do textu. Vyžaduje se tabulky přímo vytvářet v programu Microsoft Word. Obrázky a grafy se vyžaduje vkládat do textu jako grafický formát „obrázek“ a to v černobílém provedení (stupních šedi). Všechny grafy a obrázky musí být dělány s dostatečným rozlišením, velikostí písma atd., aby byly přehledné a čitelné i po zmenšení na jednu stránku formátu velikosti B5. Nepřehledné, barevné či jinak neodpo-

vídající grafy a tabulky nebudou do textu zařazeny. Pro kvalitnější otištění se vyžaduje grafy a obrázky zaslat ještě elektronicky ve formátu *.tif, *.bmp, *.jpg. Na každou tabulku, graf či obrázek musí být odkaz v textu (jako např.: tab. 1 nebo obr. 1). U tabulek nejsou povoleny žádné barevné prvky ani stínování buněk tabulky. Nadpis a legenda tabulky, grafu a obrázku jsou vždy umístěny nad tabulkou, grafem či obrázkem velikostí písma 12, s řezem písma obyčejné. Pod českým názvem je vyžadován anglický překlad nadpisu a legendy, který je psán kurzívou s velikostí písma 12.

V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě SI. Pokud autor používá v práci zkratku jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byla zkratka při prvním použití vysvětlena. V názvu práce a v souhrnu se použití zkratk nedoporučuje. Jakékoliv cizí názvosloví je nutné při prvním použití v textu vysvětlit v českém jazyce. Při první zmínce v textu o živočišném či rostlinném taxonomickém subjektu je nutné uveřejnit jejich vědecký český (pokud je znám) i latinský název.

VLASTNÍ ÚPRAVA PRÁCE

Název

Název se píše velkými písmeny, tučně se zarovnáním na střed, velikost písma 14. Anglický název se uvede hned pod český název velkými písmeny, kurzívou (ne tučně), velikost písma 13 se zarovnáním na střed. Mezi českým a anglickým názvem není žádné odsazení řádků.

Autoři

Autorský kolektiv se uvede pod název práce s odsazením jednoho řádku, velikost písma 12, tučně, zarovnání na střed, všechna písmena velká. Uvádí se nejprve počáteční písmeno křestního jména autora následované celým příjmením daného autora. Jednotliví autoři se od sebe oddělují čárkou, za počátečním písmenem křestního jména daného autora se dává tečka (bez čárky).

Afilace

Pod jména autorů se s odsazením jednoho řádku uvádí adresy pracoviště autorů včetně e-mailových adres. Velikost písma 10, kurzíva, zarovnání do bloku. Jsou-li autoři z více pracovišť, uvede se na každý řádek jedno pracoviště a u jednotlivých autorů se jejich příslušnost k adrese vyznačí číslicí s horním indexem za jejich příjmením.

Abstrakt

Po afilaci autorů s odsazením 2 řádků následuje anglický abstrakt. Abstrakt se píše kurzívou, velikost písma 10, zarovnání do bloku. Vypracování abstraktu je nutné věnovat zvláštní péči. Autor do něj má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být zdokumentováno. Abstrakt má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru článku, nikoli však jeho pouhým popisem. V abstraktu se nepoužívají žádné zkratky. Abstrakt musí obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Abstrakt se uvádí jen v jednom odstavci a jeho rozsah je maximálně 250 slov.

Klíčová slova

Klíčová slova následují s odsazením 1 řádku po anglickém abstraktu v českém a následně anglickém jazyce. Velikost písma 10, zarovnání do bloku, klíčová slova v českém jazyce – obyčejný řez písma, klíčová slova v anglickém jazyce – kurzíva.

Úvod

Má obsahovat současný stav studovaného problému a hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna. Je nutno se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům.

Materiál a metodika

Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat. Členění textu na podseky je možné, grafické řešení ale musí být řešeno přehledně a srozumitelně.

Výsledky

Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy a hodnoty. Doporučuje se dát přednost grafickému vyjádření a minimalizovat počet tabulek. Tabulky, grafy a obrázky v textu nesmí obsahovat zdvojené informace. Tzn., co se vyjádří v textu, se již nesmí uvádět v tabulce či jiném grafickém vyjádření.

Diskuse

Obsahuje zhodnocení práce a vlastní postřehy autorů. Výsledky práce se konfrontují s dříve publikovanými výsledky, pokud mají souvislost nebo jsou s předloženou prací srovnatelné.

Souhrn (v českém jazyce)

U původních prací (včetně přehledových prací) následuje po diskusi souhrn v českém jazyce, který je obdobou anglického abstraktu na začátku předložené práce.

Poděkování

Zde se uvádí především titul, číslo a zdroj finančních prostředků poskytnutých k provádění publikované práce a dále poděkování těm spolupracovníkům, kteří svým úsilím jakkoliv významně přispěli k realizaci publikované práce.

Literatura

Všechny publikace citované v textu příspěvku musí být zahrnuty do seznamu použité literatury. Velikost písma u seznamu literatury je 10. První řádek každého literárního odkazu je předsazen o 1 cm.

Literární odkazy v textu musí obsahovat jméno autora a rok vydání, podle vzoru: (Al-Sabti, 1986); ... jak uvádí Linhart (1991) ... Práce kolektivu tří a více autorů budou v textu citovány podle vzoru: (Kouřil a kol., 1988); ... podle Streisingera a kol. (1984)... V těchto případech však budou u příslušného příspěvku v seznamu literatury uvedeni všichni spoluautoři.

Seznam literatury bude sestaven abecedně podle jmen autorů a chronologicky u jednotlivých autorů podle pořadí: 1) chronologický seznam publikací autora, 2) chronologický seznam publikací téhož autora s jedním spoluautorem, 3) chronologický seznam publikací téhož autora s více než jedním spoluautorem. Více prací jednoho autora v témž roce bude odlišeno písmenem (např. 1989a, 1989b, atd.).

PUBLIKACE BUDOU V SEZNAMU LITERATURY UVEDENY PODLE VZORU:

Publikace v periodikách:

Svobodová, Z., Vykusová, B., Máchová, J., Bastl, J., Hrbková, M., Svobodník, J., 1993. Monitoring cizorodých látek v rybách z řeky Jizery v lokalitě Otradovice. Bull. VÚRH Vodňany, 29(1): 28–42.

Publikace z konferencí ve sbornících a zvláštních vydáních periodik:

Flajšhans, M., Ráb, P., Kálal, L., 1993. Genetics of salmonids in Czechoslovakia: Current status of knowledge. In: J.G. Cloud and G.H. Thorgaard (Editors), Genetic Conservation of Salmonid Fishes. Proceedings of NATO.ASI, June 24 – July 5 1991 at Moscow, ID and Pullman, WA, U.S.A. Plenum Press, New York: pp. 231–242.

Knižní publikace:

Bartík, M. and Piskač, A. (Editors), 1981. Veterinary toxicology. Developments in Animal and Veterinary Sciences, 7. Elsevier, Amsterdam, 346 pp.

Další zdroje publikací:

Citace nepublikovaných příspěvků se neuvádějí. Informace v dopise se uvádí zkratkou (in litt.), osobní sdělení zkratkou a časovým údajem, tj. rokem (Fuka, os. sděl., 1993); podle Fuky (os. sděl., 1993). Při nedostupnosti původního zdroje se citace uvádějí formou: Meske, 1983 (ex Hamáčková a kol., 1993).

PŘÍSPĚVKY, KTERÉ NESPLŇJÍ POŽADAVKY DLE POKYNŮ PRO AUTORY, BUDOU PŘED POSOUZENÍM A VLASTNÍM LEKTOROVÁNÍM VRÁCENY ZPĚT K PŘEPRACOVÁNÍ.
