



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Bulletin

VÚRH *V o d ň a n y*

ročník
volume

47/4/2011

říjen–prosinec / October–December

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

P. MACÍKOVÁ, J.P. GIESY, M. BITTNER 5

Vliv huminových látek na fotodegradaci polutantů ve vodách • *Influence of humic substances on photodegradation of pollutants in waters*

P. MACÍKOVÁ, J.P. GIESY, K. HILSCEROVÁ 13

Využití *in vitro* biotestů pro hodnocení kontaminace vodního prostředí AhR-aktivními látkami • *Use of *in vitro* bioassays to evaluate contamination of aquatic environment with AhR-active compounds*

E. PRÁŠKOVÁ, E. VOŠLÁŘOVÁ, Z. SVOBODOVÁ 23

Akutní toxicita sulfamethoxazolu pro danio pruhované (*Danio rerio*) • *The acute toxicity of sulfamethoxazole for zebrafish (*Danio rerio*)*

I. SOVADINOVÁ, P. BABICA, O. ADAMOVSKÝ, A. ALPATOVA, B. UPHAM 27

Epigenetická toxicita komplexních vzorků cyanobakterií: vliv ozonizace a chlorace • *Epigenetic toxicity of cyanobacterial extracts: effects of ozonation and chlorination*

A. STARÁ, J. MÁCHOVÁ, J. VELÍŠEK 37

Vliv chronické expozice simazinu na biomarkery oxidačního stresu a antioxidantní biomarkery jaterní tkáně kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) • *The effect of chronic exposure of simazine on oxidative stress biomarkers and antioxidant biomarkers in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.)*

Přehledové články – Review papers

Z. SVOBODOVÁ, P. SEHONOVÁ, J. KAUT, M. PAZOUROVÁ 47

Analýza příčin havarijního znečištění povrchových vod a následných úhynů ryb v České republice v období 1989–2010 • *Analysis of surface water accidental pollution and fish kills in the Czech Republic in the period 1989–2010*

J. TUMOVÁ, J. ŠVEHLA 57

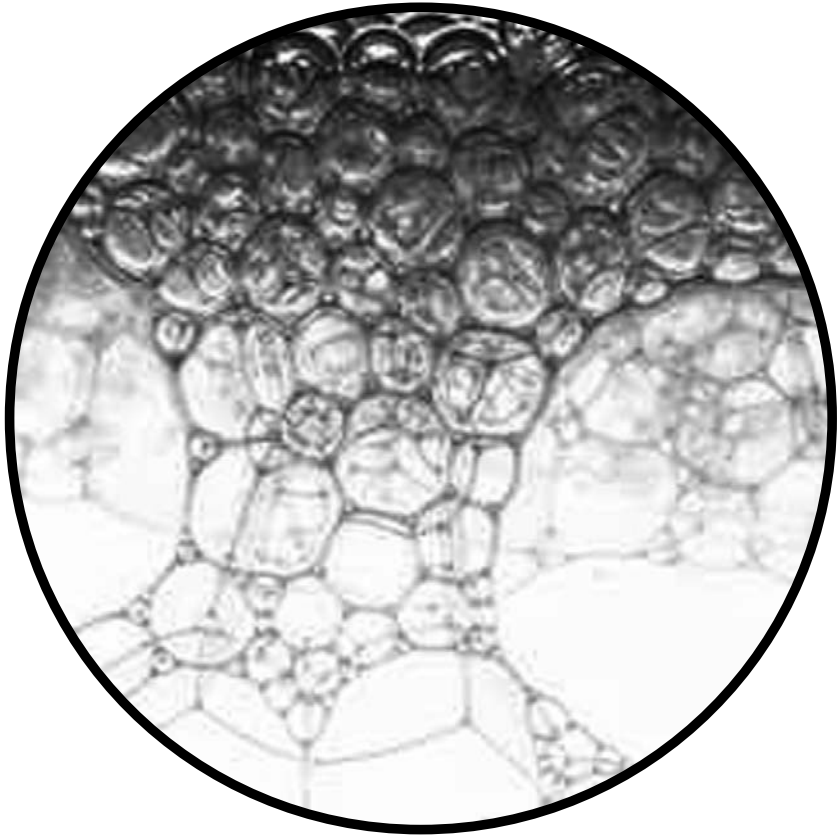
Jednoduchá metoda stanovení souhrnu organických forem rtuti v sedimentech • *Simple method for determination of total organic forms of mercury in sediment*

Pokyny pro autory 64

Zprávy a Informace / News and Information

T. POLICAR 68

Výjimečné sympozium v Praze AQUA 2012 nabídne diskusi o chovu ryb i celosvětovou výstavu



VLIV HUMINOVÝCH LÁTEK NA FOTODEGRADACI POLUTANTŮ VE VODÁCH

INFLUENCE OF HUMIC SUBSTANCES ON PHOTODEGRADATION OF POLLUTANTS IN WATERS

P. MACÍKOVÁ¹, J.P. GIESY², M. BITTNER¹

¹Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX), Masarykova univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, bittner@recetox.muni.cz

²Dept. Biomed. Veter. Sci. and Tox. Centre, Univ. of Saskatchewan, Kanada; Zoology Department and Center for Integrative Toxicology, Michigan State University, East Lansing, USA; Biology and Chemistry Department, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong, SAR, China; School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, China; State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, China

ABSTRACT

Humic substances (HS) are organic macromolecular compounds present in environmental compartments such as soil and water. HS create 50–70 % of dissolved organic matter in the aquatic environment and serve as very important natural “receptors” of organic and inorganic compounds. Interactions between HS and contaminants can affect bioavailability and toxicity of these compounds. Dissolved HS are brown-coloured and capable to absorb UV-Vis spectrum of sun radiation. This can lead to positive effects on organisms, e.g. protection against the UV radiation, but also to negative effects, because irradiated HS can create reactive oxygen species (ROS) that can be toxic to organisms. However, ROS can also accelerate the photodegradation of contaminants. This study was focused to find out if HS in different concentrations would rather decrease or increase the photodegradation of a model pollutant 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) during sun irradiation. To see the photodegradation effect we observed arylhydrocarbon- (AhR-)mediated activity of pure TCDD water solution and of TCDD in mixture with HS irradiated from 0 to 20 days under sun light. The less coloured Suwannee River NOM accelerated the photodegradation of TCDD in both concentrations (5 and 50 mg.l⁻¹), whereas the more coloured HA Fluka in concentration 50 mg.l⁻¹ strongly reduced the decrease of AhR-mediated toxicity and thus slowed the photodegradation of TCDD. In conclusion, effects of HS irradiation are highly dependent on the type of HS and on the concentration. In case of Suwannee River NOM, creation of ROS and TCDD degradation was the predominant effect, whereas in case of HA Fluka, filter-effect on sun radiation was observed and thus decrease in photodegradation of the contaminant.

Klíčová slova: Huminové látky, ozáření, fotodegradace, vodní prostředí

Keywords: Humic substances, irradiation, photodegradation, aquatic environment

ÚVOD

Huminové látky (HS – Humic Substances) jsou organické makromolekulární látky přirozené se vyskytující ve všech složkách životního prostředí – v půdě, vodě, sedimentech i ve vzduchu (jako součást polévatvého prachu). HS vznikají z odumřelé organické hmoty (např. z ligninu, celulózy, lipidů, proteinů atd.) v procesu tzv. humifikace (Steinberg a kol., 2003). HS tvoří ve vodním prostředí přibližně 50–70 % rozpuštěného organického uhlíku (NOM – Natural Organic Matter; Timofeyev a kol., 2004), jehož koncentrace se ve sladkovodních podmínkách pohybuje od 0,5 do 50 mg.l⁻¹. U sedimentů však může organický uhlík zahrnovat až 20 % hmotnosti sušiny (Steinberg, 2003; Akkanen a kol., 2005). Sladkovodní HS se dle svých vlastností – především molekulové hmotnosti a zastoupení jednotlivých funkčních skupin (např. karboxylových skupin) – dělí na huminové kyseliny (HA – humic acids) a fulvokyseliny (FA – fulvic acids), půdní HS pak ještě obsahují nerozpustnou frakci, tzv. huminy.

Vzhledem k vysokému zastoupení aromatických struktur a funkčních skupin ve struktuře HS byla zjištěna relativně silná interakce mezi HS a anorganickými ionty i organickými látkami (Steinberg, 2003). Vazba kovů či živin s HS má přímé důsledky pro vodní i půdní ekosystémy (Garcia-Mina a kol., 2004). Z ekotoxikologického hlediska je neméně důležitá interakce HS s organickými (především lipofilními) látkami, včetně xenobiotik. Hydrofobní látky interagují s HS např. hydrofobní adsorbci, vodíkovými můstky, kovalentními vazbami či tvorbou (π - π) „charge-transfer“ komplexů (Piccolo a Celano, 1994; Wijnja a kol., 2004). HS tak ovlivňují rozpustnost látek ve vodě, těkavost (Gschwend a Wu, 1985; Marschner, 1998), ale také biokoncentraci a toxicitu organických látek (Bollag a Myers, 1992; Steinberg a kol., 1993). Obecně vzato, HS představují nejdůležitější přirozený „ligand“ organických xenobiotik, a vzniklé interakce tvořící komplexy <HS-xenobiotikum> mohou významně ovlivňovat biodostupnost, a potažmo i toxicitu různých polutantů.

HS přítomné ve vodách mohou mimo nepřímých účinků (zmíněná interakce s živinami, xenobiotiky či zářením) působit na organizmy také přímo. Z fyziologických a biochemických efektů byl popsán vliv HS např. na hladinu proteinů teplotního šoku, expresi biotransformačních enzymů, či na hormonální regulaci vodních organizmů (Menzel a kol., 2005; Steinberg a kol., 2007). Navíc mohou HS usnadňovat život v extrémních podmínkách a umožnit tak prodloužení délky života, jak bylo zjištěno v případě hlístice *Caenorhabditis elegans* (Steinberg a kol., 2007).

FOTOCHEMICKÉ VLASTNOSTI HUMINOVÝCH LÁTEK

Rozpuštěné HS jsou žlutě až hnědě zbarvené a vykazují relativně silnou absorpci v UV-Vis (ultrafialové-viditelné) oblasti spektra slunečního záření (Rasmussen a kol., 1989). Tato absorpce je přisuzována přítomnosti systémů delokalizovaných π -elektronů, které jsou přítomné v aromatických strukturách či konjugovaných dvojných vazbách HS (Steinberg, 2003). Při interakci UV-Vis s HS dochází ke změnám jejich fyzikálních, chemických, ale i biologických vlastností (Amador a kol., 1991; Frimmel, 1998) s důsledky pro vodní ekosystémy.

Z ekotoxikologického pohledu může docházet jak k prospěšným, tak i ke škodlivým důsledkům ozáření HS ve vodách. Prospěšné účinky byly prokázány např. pro bakterie, kdy po ozáření HS dochází k fotodegradaci agregátu HS za snižování průměrné molekulové hmotnosti, kdy se uvolňují nízkomolekulární fragmenty, které jsou následně bakteriemi snadněji využitelné jako zdroj uhlíku (Bertilsson a Tranvik, 1998). Díky schopnosti absorbovat UV-Vis záření fungují HS ve vodách také jako účinný filtr chránící vodní organismy před UV zářením,

jehož intenzita je při současné kulminaci ozónové díry relativně vysoká. Nicméně po ozáření rozpuštěných HS dochází také k jejich fotochemické excitaci a následné produkci reaktivních kyslíkových molekul (ROS – reactive oxygen species), jež mohou toxicky působit na vodní organismy (Frimmel, 1998). Bylo však také prokázáno, že vzniklé ROS mohou účinně oxidovat další organické látky obsažené ve vodném roztoku, například pesticidy DDT, Irgarol a Fenuron (Kulovaara a kol., 1995; Amine-Khodja a kol., 2006), a tímto způsobem ovlivňovat jejich účinnost (tedy toxicitu).

HS tedy ve vodách vykazují významné fotochemické vlastnosti, avšak zda jejich přítomnost zrychlí či zpomalí fotodegradaci přítomných polutantů závisí především na dvou faktorech – na typu přítomných HS a jejich koncentraci. Lze předpokládat, že při nízkých koncentracích bude významnější vliv fotooxidační než „UV-Vis filtrační“ efekt rozpuštěných HS. Naproti tomu při vyšších koncentracích HS (což se již projevuje výrazným žlutým až hnědým zbarvením vody) převládne „UV-Vis filtrační“ vliv HS a fotooxidace polutantů tím bude zpomalena. Potvrzení těchto předpokladů je náplní tohoto příspěvku. Pro detekci fotodegradace (= změny aktivity) modelového polutantu – 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD) byl využit *in vitro* biotest založený na transgenní buněčné linii H4IIE-*luc*.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky HS izolovaných ze dvou různých matric (lignit a říční voda) byly zakoupeny od společnosti Fluka, nyní Sigma-Aldrich (Česká Republika) – dále jen HA, a International Humic Substances Society (IHSS, USA) – Suwannee River NOM – dále jen NOM. Vzorky HS v pevném skupenství byly naváženy a následně rozpuštěny v 0,05M NaOH v koncentraci 10 g.l⁻¹. Koncentraci HS v ozařovaných vodných vzorcích byla 5 a 50 mg.l⁻¹ (což přibližně odpovídá koncentraci rozpuštěného organického uhlíku 2,5 resp. 25 mg C.l⁻¹), pH ozařovaných roztoků bylo upraveno na hodnotu 7,3 a 7,6. Ozařování probíhalo v křemenných zkumavkách uzavřených gumovými septy (zabránění odparu) na volném slunci s přirozeným střídáním dne a noci, a to v první půlce měsíce srpna. Jednotlivé alikvoty byly odebírány v časech 0, 1, 3, 6, 12 a 20 dní.

2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) byl zakoupen od firmy Dr.Ehrenstorfer (Němec-ko). Počáteční koncentrace TCDD v ozařovaných vzorcích 32,2 ng.l⁻¹ (100 pM) byla vybrána tak, aby efekt TCDD při *in vitro* testování byl přibližně na hodnotě EC₅₀.

Toxicita dioxinového typu byla stanovena pomocí tkáňové kultury H4IIE-*luc* odvozené od potkaního hepatokarcinomu (Sanderson a kol., 1996). Tato linie je stabilně transfekovaná genem pro luciferázu pod kontrolou receptoru pro planární aromatické látky (arylhydrokarbonový receptor – AhR). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s 10% fetálním bovinním sérem (PAA, Rakousko) v inkubátoru syćeném 5% CO₂ při 37 °C. Expozice probíhala v kultivačním médiu v 96jamkových deskách (Gama, Česká Republika). Pro každou variantu experimentu byla použita odpovídající rozpouštědlová kontrola. U všech testovaných vzorků (samostatné HS, TCDD, a binární směsi TCDD s HS) byla stanovena AhR-zprostředkovaná aktivita. Výsledky jsou vyjádřeny jako AhR-aktivita normalizovaná u každého vzorku na 100 %, což je AhR-aktivita vzorků v čase 0. Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA).

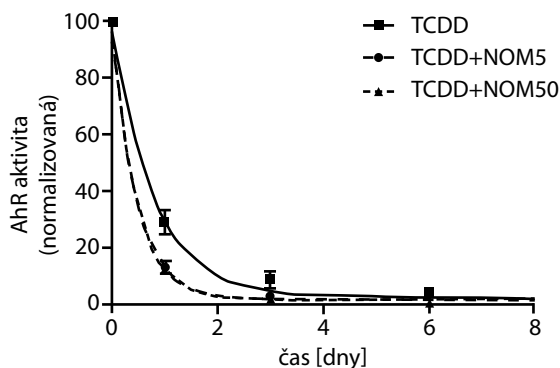
VÝSLEDKY

V průběhu ozařování roztoků TCDD a TCDD+HS v křemenných zkumavkách jsme pozorovali významný pokles absorbance, a to především u vzorků s koncentrací HS 50 mg.l⁻¹, které jsou výrazně barevnější (hnědé).

Otestováním vzorků TCDD a TCDD+HS získaných z jednotlivých časů ozařování v in vitro testu jsme zjistili výrazný pokles AhR-zprostředkované aktivity, a to především během prvních dnů ozařování, kdy již bylo dosaženo prakticky nulové aktivity. Zjištěný pokles AhR-aktivity lze dobře charakterizovat fotodegradačními křivkami, kde pro většinu vzorků lze využít model exponenciálního poklesu; pouze pro směs TCDD+HA50 je vhodnější použít model dávka-odpověď (graf 1 a 2).

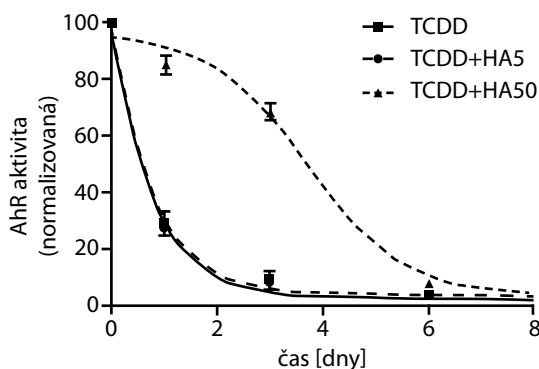
Graph 1. AhR-zprostředkovaná aktivita vzorků TCDD a TCDD ve směsi s NOM (NOM5 značí koncentraci 5 mg.l⁻¹, NOM50 koncentraci 50 mg.l⁻¹) v závislosti na době ozařování sluncem. Degradace křivky TCDD+NOM5 a TCDD+NOM50 se překrývají. Pro lepší rozlišení jednotlivých křivek je zobrazeno pouze prvních 8 dnů ozařování z celkových 20 dnů, pro vyhodnocení degradační křivky však byly použity všechny vzorky (tedy i v časech 12 a 20 dnů). Hodnoty představují průměry ± SD ze tří měření.

Graph 1. AhR-mediated activity of TCDD samples and samples of TCDD in mixture with NOM (NOM5 means concentration 5 mg.l⁻¹, NOM50 means concentration 50 mg.l⁻¹) in dependence on time of sun irradiation. Degradation curves of TCDD+NOM5 and TCDD+NOM50 are almost overlapped. For better resolution of each curve, only first 8 days of irradiation are shown in the graph, however, curves were calculated using results from all the samples (i.e. including 12 and 20 days). Depicted values are means ± SD from three measurements.



Graph 2. AhR-zprostředkovaná aktivita vzorků TCDD a TCDD ve směsi s HA (HA5 značí koncentraci 5 mg.l⁻¹, HA50 koncentraci 50 mg.l⁻¹) v závislosti na době ozařování sluncem. Degradace křivky pro TCDD a TCDD+HA5 se téměř překrývají. Pro lepší rozlišení jednotlivých křivek je zobrazeno pouze prvních 8 dnů ozařování z celkových 20 dnů, pro vyhodnocení degradační křivky však byly použity všechny vzorky (tedy i v časech 12 a 20 dnů). Hodnoty představují průměry ± SD ze tří měření.

Graph 2. AhR-mediated activity of TCDD samples and samples of TCDD in mixture with HA (HA5 means concentration 5 mg.l⁻¹, HA50 means concentration 50 mg.l⁻¹) in dependence on time of sun irradiation. Degradation curves of TCDD and TCDD+HA5 are almost overlapped. For better resolution of each curve, only first 8 days of irradiation from total 20 days of irradiation are shown in the graph, however, curves were calculated using results from all the samples (i.e. including times 12 and 20 days). Depicted values are means ± SD from three measurements.



Vliv HS na rychlost fotodegradace TCDD lze zjistit porovnáním hodnot poločasů degradace – $t_{1/2}$, které byly spočítány z příslušných rovnic fotodegradace (Tabulka 1).

Tab. 1. Souhrn rovnic fotodegradace TCDD a jeho směsí s HS, poločasů degradace ($t_{1/2}$) a hodnot R^2 charakterizujících věrnost proložení vybraného modelu* naměřenými hodnotami AhR-zprostředkované aktivity.

Tab. 1. Summary of equations of photodegradation, half-lives values ($t_{1/2}$) and R^2 values that describe the goodness of fit of selected model to measured AhR-mediated activity.

Rovnice a poločas fotodegradace TCDD a jeho směsí s HS					
	TCDD	TCDD+NOM5	TCDD+NOM50	TCDD+HA5	TCDD+HA50
rovnice	$y=97,4e^{(-1,255x)}+2,4$	$y=98,3e^{(-2,1x)}+1,7$	$y=98,3e^{(-2,2x)}+1,7$	$y=96,7e^{(-1,3x)}+3,0$	$y=3,3+92,9/(1+10^{(-1,8+0,5x)})$
$t_{1/2}$ (dny)	0,55	0,32	0,31	0,54	3,70
R^2	0,988	0,984	0,991	0,988	0,983

* modely byly vybrány tak, aby co nejlépe charakterizovaly naměřená data

DISKUSE

Porovnáním poločasů degradace samotného TCDD a TCDD ve směsi s dvěma druhy huminových látek bylo zjištěno, že Suwannee River NOM urychluje degradaci TCDD ve vodním prostředí, a to v obou koncentracích 5 i 50 mg.l⁻¹ ozařovaného roztoku. Poločas degradace samotného TCDD je přibližně 13 hodin, zatímco v přítomnosti NOM se poločas zkrátí přibližně na 7,5 hodiny (včetně temné fáze dne). Roztok Suwannee River NOM v nižší i vyšší koncentraci je nepříliš výrazně zbarvený, filtrační efekt se proto příliš neprojeví. Za převládající mechanismus účinku lze považovat tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů, jež urychlují rozklad organických polutantů (nepřímá fotolýza); existuje i možnost přímé fotolýzy fotocitlivých polutantů, ke kterým pronikne sluneční záření. Naopak v případě HA Fluka nebylo pozorováno účinné zrychlení fotodegradace TCDD. V ozařovaném roztoku s koncentrací HA 5 mg.l⁻¹ probíhala degradace TCDD přibližně stejně rychle jako v čisté vodě, avšak v přítomnosti většího množství HA (konc. 50 mg.l⁻¹) poločas rozkladu TCDD vzrostl téměř sedmkrát z původní hodnoty 0,55 dne až na 3,7 dne. HA Fluka je významně více zbarvena než Suwannee River NOM a proto výrazněji absorbuje účinné vlnové délky slunečního záření (má větší filtrační efekt; Boreen a kol., 2004). Další mechanismy zpomalení fotodegradace polutantů vlivem huminových látek mohou spočívat v záchytu reaktivních kyslíkových molekul (Brezonik a Fulkerson-Brekken, 1998) nebo v záchytu dalších reaktivních částic vzniklých fotochemicky, např. tripletových forem HS (Canonica a Laubscher, 2008). Huminové látky se někdy využívají jako sorbenty hydrofobních organických látek při dekontaminaci ve vodách *in situ*, avšak ve světle těchto zjištění (zpomalování fotodegradace vyššími koncentracemi HS) a předchozích zjištění, že rozpuštěné HS mohou zvyšovat toxicitu polutantů (Bittner a kol., 2011), je třeba toto využití přehodnotit.

SOUHRN

Huminové látky (HS) jsou organické makromolekulární látky přítomné v životním prostředí především v půdě a vodě. Ve vodním prostředí tvoří 50–70 % rozpuštěné organické hmoty a slouží jako důležitý přirozený receptor organických i anorganických látek. Interakce HS s kontaminanty může ovlivnit jejich biodostupnost a toxicitu. Rozpuštěné HS jsou žluté či

hnědě zbarvené a schopné absorbovat UV-Vis spektrum slunečního záření. To může vést k prospěšným účinkům na organismy, např. k ochraně před UV zářením, ale také k negativním účinkům, protože ozářením HS se mohou tvořit reaktivní kyslíkové molekuly (ROS), jež jsou pro organismy toxické. Nicméně ROS mohou také urychlit fotodegradaci kontaminantů. Tato studie se zaměřila na zjištění, zda HS v různých koncentracích spíše zpomalí či urychlí fotodegradaci modelové látky 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD) během působení slunečního záření. Pro zjištění fotodegradčního účinku byla sledována aktivita zprostředkovaná receptorem pro planární aromatické látky (AhR) u vodných roztoků čistého TCDD a TCDD ve směsi s vybranými HS vystavených slunečnímu záření po dobu 0 až 20 dnů. Méně zbarvená Suwannee River NOM urychlila fotodegradaci TCDD v obou koncentracích (5 i 50 mg.l⁻¹), zatímco více zbarvená HA Fluka v koncentraci 50 mg.l⁻¹ silně zpomalila úbytek AhR-zprostředkované aktivity, zpomalila tedy fotodegradaci TCDD. Obecně lze říci, že účinek ozáření HS je velmi závislý na typu HS a na jejich koncentraci. V případě Suwannee River NOM byla hlavním důsledkem ozáření tvorba ROS a urychlení degradace TCDD, zatímco v případě HA Fluka se projevil filtrační účinek (pohlcení účinných vlnových délek slunečního záření) a tím i pokles v účinnosti fotodegradace TCDD.

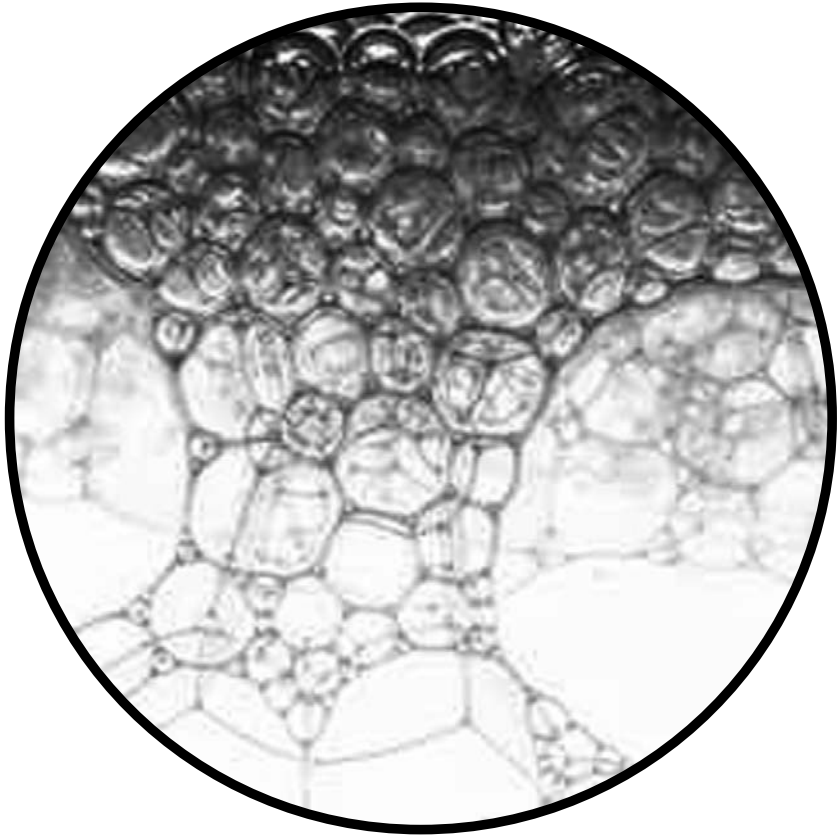
PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla financována projekty CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001) a INCHEMBIOL (MŠM 0021622412).

LITERATURA

- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A., Kukkonen, J. V. K., 2005. Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere*, 60(11): 1608–1615.
- Amador, J. A., Alexander, M., Zika, R. G., 1991. Degradation of Aromatic-Compounds Bound to Humic-Acid by the Combined Action of Sunlight and Microorganisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(4): 475–482.
- Amine-Khodja, A., Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Cavani, L., Ciavatta, C., Guyot, G., Richard, C., 2006. Humic-like substances extracted from composts can promote the photo degradation of Irgarol 1051 in solar light. *Chemosphere*, 62(6): 1021–1027.
- Bertilsson, S., Tranvik, L. J., 1998. Photochemically produced carboxylic acids as substrates for freshwater bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 43(5): 885–895.
- Bittner, M., Macikova, P., Giesy, J. P., Hilscherova, K., 2011. Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environment International*, 37(5): 960–964.
- Bollag, J. M., Myers, C., 1992. Detoxification of Aquatic and Terrestrial Sites through Binding of Pollutants to Humic Substances. *Science of the Total Environment*, 118: 357–366.
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., McNeill, K., 2004. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 228: U637–U637.
- Brezonik, P. L., Fulkerson-Brekken, J., 1998. Nitrate-induced photolysis in natural waters: Controls on concentrations of hydroxyl radical photo-intermediates by natural scavenging agents. *Environmental Science & Technology*, 32(19): 3004–3010.
- Canonica, S., Laubscher, H. U., 2008. Inhibitory effect of dissolved organic matter on triplet-induced oxidation of aquatic contaminants. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(5): 547–551.

- Frimmel, F. H., 1998. Impact of light on the properties of aquatic natural organic matter. *Environment International*, 24(5-6): 559–571.
- Garcia-Mina, J. M., Antolin, M. C., Sanchez-Diaz, M., 2004. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil*, 258(1): 57–68.
- Gschwend, P. M., Wu, S. C., 1985. On the Constancy of Sediment Water Partition-Coefficients of Hydrophobic Organic Pollutants. *Environmental Science & Technology*, 19(1): 90–96.
- Kulovaara, M., Backlund, P., Corin, N., 1995. Light-Induced Degradation of DDT in Humic Water. *Science of the Total Environment*, 170(3): 185–191.
- Marschner, B., 1998. DOM-Enhanced Mobilization of Benzo(a)pyrene in a Contaminated Soil Under Different Chemical Conditions. *Physics and Chemistry of The Earth*, 23(2): 199–203.
- Menzel, R., Sturzenbaum, S., Barenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C. E. W., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology*, 39(21): 8324–8332.
- Piccolo, A., Celano, G., 1994. Hydrogen-Bonding Interactions between the Herbicide Glyphosate and Water-Soluble Humic Substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(11): 1737–1741.
- Rasmussen, J. B., Godbout, L., Schallenberg, M., 1989. The Humic Content of Lake Water and Its Relationship to Watershed and Lake Morphometry. *Limnology and Oceanography*, 34(7): 1336–1343.
- Sanderson, J. T., Aarts, J., Brouwer, A., Froese, K. L., Denison, M. S., Giesy, J. P., 1996. Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: Implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137(2): 316–325.
- Steinberg, C. E. W., 2003. Ecology of Humic Substances in Freshwaters – Determinants from Geochemistry to Ecological Niches. BERLIN, Springer.
- Steinberg, C. E. W., Paul, A., Pflugmacher, S., Meinelt, T., Klocking, R., Wiegand, C., 2003. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – A review. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(5): 391–401.
- Steinberg, C. E. W., Saul, N., Pietsch, K., Meinelt, T., Rienau, S., Menzel, R., 2007. Dissolved Humic Substances Facilitate Fish Life in Extreme Aquatic environments and Have the Potential to Extend the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*. *Annals of Environmental Science*, 1: 81–90.
- Steinberg, C. E. W., Xu, Y., Lee, S. K., Freitag, D., Kettrup, A., 1993. Effect of dissolved humic material (DHM) on bioavailability of some organic xenobiotics to *Daphnia magna*. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 5(1): 1–9.
- Timofeyev, M. A., Wiegand, C., Burnison, B. K., Shatilina, Z. M., Pflugmacher, S., Steinberg, C. E. W., 2004. Impact of natural organic matter (NOM) on freshwater amphipods. *Science of the Total Environment*, 319(1–3): 115–121.
- Wijnja, H., Pignatello, J. J., Malekani, K., 2004. Formation of pi-pi complexes between phenanthrene and model pi-acceptor humic subunits. *Journal of Environmental Quality*, 33(1): 265–275.



VYUŽITÍ *IN VITRO* BIOTESTŮ PRO HODNOCENÍ KONTAMINACE VODNÍHO PROSTŘEDÍ AhR-AKTIVNÍMI LÁTKAMI

USE OF *IN VITRO* BIOASSAYS TO EVALUATE CONTAMINATION OF AQUATIC ENVIRONMENT WITH AhR-ACTIVE COMPOUNDS

P. MACÍKOVÁ¹, J. P. GIESY², K. HILSCHEROVÁ¹

¹ Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (Recetox), Masarykova Univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, macikova@recetox.muni.cz

² Dept. Biomed. Veter. Sci. and Tox. Centre, Univ. of Saskatchewan, Kanada; Zoology Department and Center for Integrative Toxicology, Michigan State University, East Lansing, USA; Biology and Chemistry Department, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong, SAR, China; School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, China; State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, China

ABSTRACT

The aquatic environment is contaminated with many types of chemical compounds that can be dissolved in water or bound to solid particles and in sediments. In complex mixtures, compounds can interact through various modes of action, therefore, it is very difficult to estimate their toxic potential. Many types of hydrophobic persistent pollutants are able to activate arylhydrocarbon receptor (AhR) that might have negative consequences for organisms' health. Suitable tools to assess AhR-active (dioxin-like) compounds in aquatic samples are *in vitro* bioassays in combination with chemical analysis. Samples of river sediment and water were taken in Zlin region (Czech Republic) and assessed for their dioxin-like toxicity potential. Water was sampled using silicone rubber (SR) as a passive sampler of hydrophobic compounds and extracts of SR were tested in the same way as spot samples. Sediments were found to be contaminated with AhR-active compounds in the range of 0.4–7.8 ng TCDD equiv./g d.w. sed. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were responsible in average for 15–27% of observed dioxin-like activity. AhR-dependent activity in SR extracts as well as concentration of AhR-active PAHs in SR and sediment extracts was increasing from June to November. This finding did not correspond with the concentration of PAHs detected in water spot samples. Silicone rubber was found to be appropriate tool to sample AhR-active compounds from water.

Klíčová slova: AhR-zprostředkovaná toxicita, říční ekosystém, pasivní vzorkování, *in vitro* testy
Keywords: AhR-dependent toxicity, river ecosystem, passive sampling, *in vitro* assays

ÚVOD

Chemické látky vyskytující se v životním prostředí mohou negativně ovlivňovat organismy, jejich populace a společenstva a narušovat tak fungování celých ekosystémů. V prostředí se nalézají složité směsi přírodních a syntetických látek, v nichž hrají významnou roli vzájemné interakce látek. Jejich výsledkem mohou být nejen aditivní, ale také synergistické či antagonistické účinky. Proto je velmi náročné stanovit celkovou nebezpečnost komplexních směsí.

Vodní prostředí je znečišťováno prostřednictvím splachů kontaminantů z půd a skládek odpadů, suché a mokré atmosférické depozice, průmyslovou činností, případně i vypouštěním výtoků z čistíren odpadních vod. Pro osud a účinky kontaminantů ve vodním prostředí je velmi důležitá jejich asociace se sedimenty a suspendovanými částicemi. Sedimenty představují zásobárnu mnoha hydrofobních organických polutantů, které mohou v této matici přetrvávat po dlouhou dobu a díky tomu se kumulovat v organismech žijících v sedimentech a následně v potravním řetězci. Během přenosu sedimentů, např. vlivem záplav, se polutanty mohou ze sedimentů uvolnit zpět do vodního prostředí a způsobit tak sekundární kontaminaci (Hilscherova a kol., 2007).

Při sledování kvality vody a sedimentů se obvykle provádějí s určitou pravidelností jednorázové (bodové) odběry, jejichž provedení je relativně jednoduché a levné. Jednorázový odběr však zaznamená pouze aktuální situaci na daném místě v daný čas a nezachytí epizodní události. Proto se při vzorkování chemických látek ve vodním prostředí stále častěji využívají techniky pasivního vzorkování založené na volném toku molekul analytu ze vzorkovaného média (vody) do média sběrného na základě rozdílu chemických potenciálů analytu v těchto médiích. Tímto postupem jsou z vody izolovány a současně zakoncentrovány sledované analyty (Vrana a kol., 2005).

Předmětem zájmu jsou často polutanty schopné aktivovat arylhydrokarbonový receptor (AhR). Aktivace tohoto receptoru je spojována s řadou škodlivých účinků včetně neurotoxicity, embryotoxicity, imunotoxicity či karcinogeneze (Janošek, 2006). V organismech není znám přirozený endogenní ligand AhR. Ke klasickým ligandům AhR se řadí planární aromatické sloučeniny jako polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), planární polychlorované bifenylly (PCB), dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany (PCDD/F). Ligandem s doposud nejsilnější známou afinitou k AhR je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), proto jsou látky schopné aktivace AhR někdy nazývány též látkami dioxinového typu. Užitečným nástrojem pro měření aktivity zprostředkované AhR (nebo též dioxinové toxicity) jsou *in vitro* biotesty, jež poskytují informace o aktivitě celé komplexní směsi látek přítomné ve vzorku. Při porovnání s výsledky chemických analýz je pak možno odvodit, které látky byly ve vzorku zodpovědné za sledovanou AhR-zprostředkovanou aktivitu.

Tato práce je součástí obsáhlé studie, která probíhala v letech 2007–2008 ve Zlínském kraji. Oblast byla zvolena za modelovou pro svůj průmyslový a zemědělský význam. Již po několik desetiletí je tato oblast zatížena průmyslem chemickým, gumárenským a obuvnickým, výrobou a zpracováním plastů a v neposlední řadě také potravinářským průmyslem. Uvedené zdroje znečištění mají významný vliv na kvalitu vodního i terestrického prostředí (Hilscherova a kol., 2007). Hlavním cílem studie bylo charakterizovat celoroční dynamiku kontaminace modelového říčního ekosystému a distribuci polutantů mezi jednotlivými abiotickými složkami a dále validovat nové vzorkovací, analytické a testovací techniky. Tento příspěvek je zaměřen na zhodnocení AhR-zprostředkované toxicity extraktů sedimentů a silikonových membrán (jakožto pasivních vzorkovačů) pomocí *in vitro* biotestů a nalezení souvislostí s obsahem sledovaných polutantů v sedimentech a vodách.

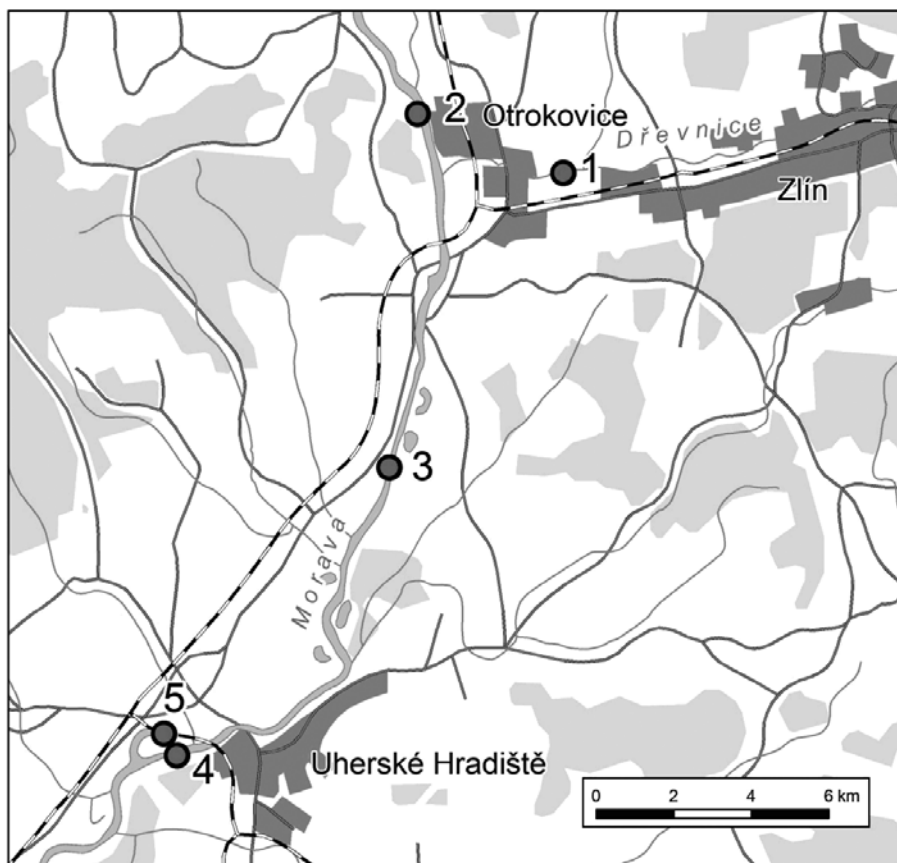
MATERIÁL A METODIKA

Odběr vzorků sedimentů a vod byl proveden ve Zlínském kraji v řece Moravě a Dřevnici. Celkem bylo sledováno pět lokalit (obr. 1). Odběrové lokality byly situovány do míst s pomalejším tokem, kde sedimentují jemné částice suspendované v říčním toku, na něž mohou být ve značné míře adsorbovány polutanty. Data o průtoku vody byla získána ze stanovišť

Českého hydrometeorologického ústavu ve Zlíně (Dřevnice; reprezentuje lokalitu Malenovice), Kroměříži (Morava; reprezentuje lokalitu Bělov) a na lokalitě Spytihněv (Morava). Průměrná hodnota průtoku řeky Dřevnice byla v období červen až listopad 2007 přibližně $1 \text{ m}^3/\text{s}$. Řeka Morava se vyznačuje řádově vyšším průtokem, který dosahoval na lokalitě Bělov průměrně $26 \text{ m}^3/\text{s}$, na lokalitě Spytihněv $28 \text{ m}^3/\text{s}$. Možné zdroje znečištění jsou na všech odběrových lokalitách podobné, patří mezi ně zejména zemědělství, staré ekologické zátěže, odpadní vody, emise z dopravy či průmysl (Hilscherova, 2010). Unikátní lokalitou je slepé říční rameno Čerták, které je s řekou Moravou propojeno prostřednictvím podzemní výpusti. Není ovlivněno krátkodobými změnami v průtoku řeky a představuje stabilní úložiště sedimentů z řeky Moravy (Babek a kol., 2008).

Jednorázové odběry sedimentů a vod probíhaly od června 2007 do července 2008 každých 28 dní, celkem bylo provedeno 15 odběrových kampaní. Silikonové membrány (SM) od výrobců Rubena a Altesil byly v říční vodě exponovány vždy ve dvou opakováních, a to v době mezi jednotlivými odběry sedimentů (tj. 28 dní, celkem 14 kampaní). Pro účely této práce byly vybrány vzorky sedimentů z období červen až listopad 2007 ze všech lokalit a vzorky vod a SM ze stejného období pouze z lokality Spytihněv.

Obr. 1. Odběrové lokality. 1. Malenovice (Dřevnice), 2. Bělov (Morava), 3. Spytihněv (Morava), 4. U Čertáku (Morava), 5. Čerták (slepé rameno).
Fig. 1. Sampling sites. 1. Malenovice (Dřevnice), 2. Belov (Morava), 3. Spytihnev (Morava), 4. U Certaku (Morava), 5. Certak (oxbow lake).



Příprava vzorků sedimentů – odstranění větších částic (listy atd.), homogenizace, lyofilizace, přesátí (síto s průměrem ok 2 mm), Soxhletova extrakce dichlormetanem (DCM); vzorky pro *in vitro* testování ošetřeny mědí, převedeny do etanolu; vzorky pro chemickou analýzu před extrakcí obohaceny standardy pro určení výtěžnosti, po extrakci a přečištění sloupcovou chromatografií přidán vnitřní standard. Příprava vzorků SM – před expozicí předčištění (3 dny třepání v etylacetátu, 12 h Soxhlet. extrakce metanolem), po expozici 12 h Soxhlet. extrakce metanolem, rozdělení extraktu na 2 poloviny; polovina pro *in vitro* testování, polovina pro chemickou analýzu (přidány standardy). Příprava vzorků vod pro chemickou analýzu – přidavek standardu pro určení výtěžnosti, filtrace, extrakce na tuhou fázi, eluce směsí *n*-hexan/DCM 1/1 (objemový podíl), přesušení bezvodým Na₂SO₄, sloupcová chromatografie. Vzorky byly pro konečné analýzy zahuštěny pod proudem dusíku. Podrobná metodika je uvedena v pracích kolektivů autorů Valentová (2008), Macíková (2009) a Prokes a kol. (2010).

AhR-zprostředkovaná aktivita vzorků byla stanovena s použitím buněčné linie H4IIE.luc (Murk a kol., 1996) a vyhodnocena s užitím konceptu toxických ekvivalentů (BioTEQ). Aktivita testovaných vzorků se porovnává s aktivitou referenční látky 2,3,7,8-TCDD. V programu GraphPad byly z křivek dávka-odpověď stanoveny koncentrace TCDD a extraktů vyvolávající 50% účinek (EC50). Na jejich základě byly vypočítány ekvivalenty dioxinové toxicity dle vztahu $BioTEQ = EC50(TCDD)/EC50(vzorek)$. BioTEQ vyjadřují ekvivalentní množství TCDD na objem/množství vzorku, které by vyvolalo stejnou odpověď jako jednotka objemu/množství vzorku.

Pomocí plynového chromatografu HP 6 890 s hmotnostně selektivním detektorem bylo stanoveno celkem 16 látek ze skupiny PAH (tab. 1). Výsledky byly využity pro výpočet toxických ekvivalentů (PAH-TEQ) ze vztahu $PAH-TEQ = c * REP$, kde *c* je koncentrace látky a REP je relativní potence látky stanovená v konkrétním typu biotestu (někdy též značená TEF, toxický ekvivalentní faktor). Hodnoty REP pro PAH byly převzaty podle Machaly a kol. (2001) (tab. 1).

Tab. 1. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) stanovené ve vzorcích a jejich relativní potence (REP) v testu s buňkami H4IIE.luc (Machala a kol., 2001).

Tab. 1. Polycyclic aromatic hydrocarbons analysed (PAH) in samples and their relative potencies (REP) in H4IIE.luc cell bioassay (Machala a kol., 2001).

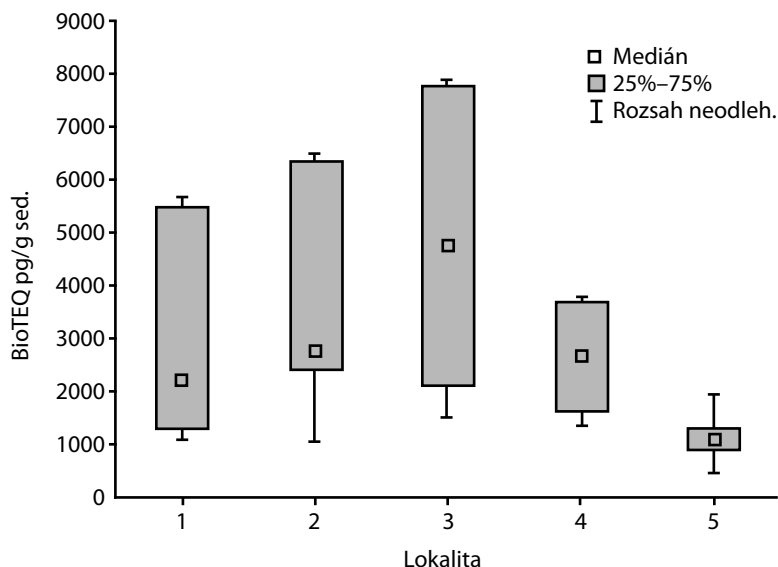
PAH	REP	PAH	REP
naftalen	-	benz(a)antracen	$7,04 * 10^{-6}$
acenaftylen	-	chrysen	$1,01 * 10^{-4}$
acenaften	-	benzo(b)fluoranten	$3,35 * 10^{-5}$
fluoren	-	benzo(k)fluoranten	$1,64 * 10^{-3}$
fenantren	-	benzo(a)pyren	$9,01 * 10^{-5}$
antracen	-	indeno(123-cd)pyren	$2,96 * 10^{-4}$
fluoranten	$2,27 * 10^{-8}$	dibenz(ah)antracen	$1,17 * 10^{-3}$
pyren	$1,78 * 10^{-6}$	benzo(ghi)perylen	-

VÝSLEDKY

AhR-zprostředkovaná aktivita byla detekována ve všech vzorcích sedimentů. Hodnoty BioTEQ se pohybovaly v rozmezí 456 až 7 884 pg.g⁻¹ suché váhy sedimentu. V grafu 1 je zřetelně vidět odlišnost lokality Čerták (slepé rameno) od ostatních. Dioxinová toxicita sedimentů zde byla nižší než na ostatních lokalitách a v průběhu odběrových kampaní také velmi stabilní, což dokazuje malý rozptyl hodnot. Na ostatních lokalitách byl rozptyl hodnot větší, celkově nejvyšší AhR-zprostředkovaná aktivita byla sledována na lokalitě Spytihněv.

Graf 1. AhR-zprostředkovaná aktivita extraktů sedimentů na jednotlivých lokalitách (červen až listopad 2007). Lokality: 1. Malenovice, 2. Bělov, 3. Spytihněv, 4. U Čertáku, 5. Čerták (slepé rameno).

Graph 1. AhR-mediated activity of sediments' extracts on each sampling site (from June to November 2007). Sampling sites: 1. Malenovice, 2. Below, 3. Spytihnev, 4. U Certaku, 5. Certak (oxbow lake).



Ve všech vzorcích sedimentů byly detekovány sledované analyty ze skupiny PAH, celková koncentrace PAH byla v řádech jednotek či desítek $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché váhy sedimentu. PAH-TEQ determinované na základě chemických analýz extraktů sedimentů se pohybovaly v jednotkách $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro většinu vzorků byly nižší než hodnoty BioTEQ. Podíl PAH-TEQ na BioTEQ byl 5 až 49 %, mezi lokalitami se nevyskytly výrazné odlišnosti (tab. 2). Pouze u jednoho vzorku byla hodnota PAH-TEQ vyšší než odpovídající hodnota BioTEQ.

Tab. 2. Hodnoty PAH-TEQ extraktů sedimentů a jejich procentuální podíl na BioTEQ.

Table 2. PAH-TEQ values of sediments' extracts and their percentage on BioTEQ.

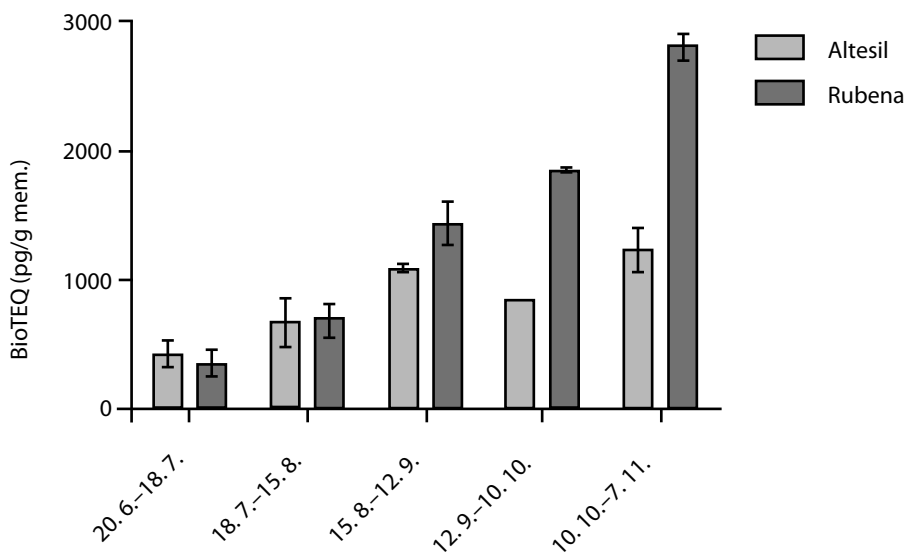
Lokalita	Suma PAH-TEQ (pg/g sedimentu)		Podíl PAH-TEQ na sledované BioTEQ (%)	
	Rozsah hodnot	Medián	Rozsah hodnot	Medián
Malenovice (Dřevnice)	69–1103	530	5–52	16
Bělov (Morava)	66–1138	698	6–39	15
Spytihněv (Morava)	667–1906	1164	15–36 (108)	22
U Čertáku (Morava)	427–797	566	13–49	22
Čerták (slepé rameno)	194–850	235	17–44	27

Pro zjištění, zda je možné změřit AhR-zprostředkovanou aktivitu extraktů SM, byly nejprve exponovány blanky membrán výrobců Altesil a Rubena. S blanky se zacházelo stejným způsobem jako s membránami exponovanými v terénu (proces předčištění, extrakce), pouze nebyly exponovány říční vodě. V *in vitro* testech s H4IIE.luc blanky nevykazovaly významné pozadové aktivity ani cytotoxicitu. Pro *in vitro* testování byly vybrány pouze SM z lokality Spytihněv z prvních pěti kampaní, jejichž sada byla kompletní.

Silikonové membrány vzorkují hydrofobní organické polutanty, které jsou často označovány za původce AhR-zprostředkované aktivity. Ve všech testovaných extraktech SM byla pozorována dioxinová aktivita. Průměrné hodnoty BioTEQ ze dvou opakování byly v rozmezí 430 až 1 223 pg.g⁻¹ membrány Altesil, resp. 350 až 2 797 pg.g⁻¹ membrány Rubena, přičemž mezi hodnotami v opakováních byly malé odchylky (graf 2).

Graf 2. AhR-zprostředkovaná aktivita extraktů SM z lokality Spytihněv.

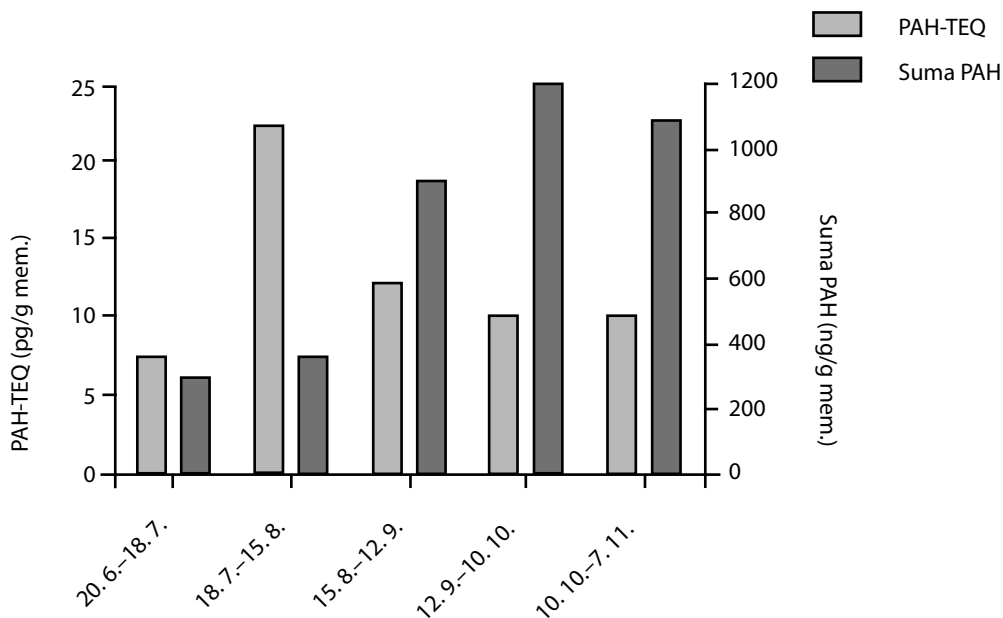
Graph 2. AhR-mediated activity of extracts of silicone rubber from sampling site Spytihnev.



Hodnoty BioTEQ měly od června do listopadu vzrůstající tendenci. Zejména během podzimních kampaní je vidět, že SM Rubena v sobě zachytila více dioxinové aktivních látek. Příčinou může být to, že membrána Rubena je přibližně 2× tenčí než membrána Altesil (tloušťka Rubeny je cca 0,25 mm, zatímco tloušťka Altesilu 0,5 mm). Růst dioxinové aktivity extraktů SM od června do podzimu částečně koresponduje s růstem koncentrací PAH naměřených v extraktech SM (graf 3). PAH-TEQ determinované na základě chemických analýz jsou řádově tisíckrát nižší než BioTEQ stanovené v biotestech a nelze u nich pozorovat stejný trend (graf 3). Je proto pravděpodobné, že AhR-zprostředkovanou aktivitu způsobily především jiné látky než PAH zachycené SM Altesil. Nárůst koncentrace PAH v podzimních měsících lze sledovat rovněž v sedimentech z lokality Spytihněv, zatímco koncentrace PAH ve vodách byla velice proměnlivá (graf 4).

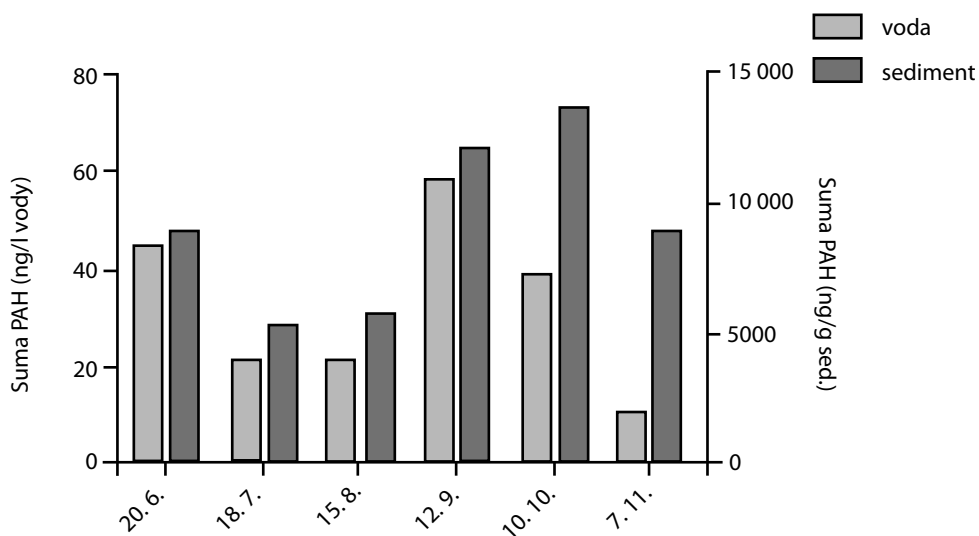
Graf 3. Celková koncentrace PAH a hodnoty PAH-TEQ stanovené v extraktech SM Altesil z lokality Spytihněv.

Graph 3. Sum of PAHs' concentrations and PAH-TEQ values determined in extracts of silicone rubber Altesil from sampling site Spytihnev.



Graf 4. Celková koncentrace PAH v extraktech sedimentů a vod z lokality Spytihněv.

Graph 4. Sum of PAHs' concentrations in extracts of sediment and water samples from sampling site Spytihnev.



DISKUSE

Oblast Zlínska se objevila již v několika studiích zaměřených na sledování dynamiky dioxinově aktivních látek ve vodním prostředí i dalších parametřů říčního toku a jeho okolí (Hilscherova a kol., 2010). AhR-zprostředkovaná aktivita extraktů sedimentů v této studii byla v rozmezí 0,4–7,9 ng BioTEQ/g suché váhy sedimentů, což je v souladu s dřívějšími studiemi, kde byla dioxinová toxicita zlínských sedimentů 5,9–48,2 ng BioTEQ/g sed. (Vondracek a kol., 2001), 2–23 ng BioTEQ/g sed. (Hilscherova a kol., 2001) a 1–8,7 ng BioTEQ/g sed. (Hilscherova a kol., 2010). Nejvyšší dioxinová aktivita byla pozorována na lokalitě Spytihněv, jež se nachází pod soutokem řek Moravy a Dřevnice a integruje v sobě znečištění z obou toků. U extraktů sedimentů ze slepého ramene Čerták byla pozorována velmi nízká variabilita výsledků v rámci jednotlivých vzorkovacích kampaní. V porovnání s hodnotami detekovanými v sedimentech z řeky Moravy v těsné blízkosti slepého ramena (lokalita U Čertáku) byla aktivita nejen stabilnější, ale také celkově nižší. To potvrzuje předpoklad, že slepé rameno není ovlivňováno krátkodobými změnami v řece.

Celkový potenciál vzorků sedimentů působit AhR-zprostředkovanou aktivitu stanovený v *in vitro* testech byl u všech vzorků s výjimkou jednoho vyšší než potenciál stanovený pomocí chemických analýz (vyjádřený jako PAH-TEQ). Pro tento jev existují dvě vysvětlení: (i) ve směsi jsou přítomny kontaminanty, které mohou působit stejným účinkem jako analyzované látky, ale nemohly být chemickou analýzou detekovány a/nebo (ii) látky v komplexní směsi nemají pouze aditivní, ale také synergistický účinek. Polycyklické aromatické uhlovodíky v sedimentech ze Zlínska způsobovaly přibližně 15–27 % AhR-zprostředkované aktivity. To je poněkud v rozporu s předchozí studií provedenou na Zlínsku, kdy byly PAH označeny za hlavní příčinu dioxinové aktivity (Hilscherova a kol., 2001). Důvodem může být použití rozdílných hodnot relativních potenciálů k výpočtu PAH-TEQ, které se nevztahovaly přímo k testu s danou buněčnou linií. Ve světě byly pozorovány obvykle nižší příspěvky PAH k celkové dioxinové aktivitě, např. 6 %, (Hollert a kol., 2002); méně než 20 %, (Koh a kol., 2004); méně než 4 %, (Louiz a kol., 2008).

Stanovování AhR-zprostředkované aktivity extraktů silikonových membrán jakožto pasivních vzorkovačů polutantů z vody nebylo v literatuře dosud popsáno. Zvýšení dioxinové toxicity ve vzorcích z podzimních měsíců bylo možno sledovat jak u extraktů SM, tak u extraktů sedimentů z lokality Spytihněv (data neuvedena). S růstem dioxinové aktivity korespondovalo také zvýšení koncentrace PAH v extraktech SM i sedimentů, u jednorázových vzorků vod však uvedený trend pozorován nebyl. To potvrzuje stále diskutovanější skutečnost, že jednorázové odběry nemusí být vždy reprezentativní a techniky pasivního vzorkování je třeba dále uplatňovat a rozvíjet.

SOUHRN

Vhodným postupem pro hodnocení kontaminace vodního prostředí AhR-aktivními látkami je spojení *in vitro* testování v kombinaci s chemickou analýzou známých polutantů. V této práci byly uvedeným způsobem hodnoceny extrakty říčních sedimentů a silikonových membrán, jež byly použity jako pasivní vzorkovače látek rozpuštěných ve vodě. AhR-zprostředkovaná aktivita extraktů sedimentů se pohybovala v rozmezí 0,4 až 7,8 ng TCDD ekv./g suché váhy sed. Přibližně 15 až 27 % této aktivity může být vysvětleno přítomností PAH ve vzorku, většinu sledované aktivity však způsobily neznámé AhR-aktivní látky přítomné ve vzorcích. AhR-zprostředkovaná toxicita extraktů SM byla vyšší ve vzorcích z podzimních kampaní, stejně jako koncentrace PAH extraktech SM i sedimentů. Silikonové membrány se jeví jako užitečný nástroj pro vzorkování dioxinově aktivních polutantů z vod.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla financována projekty CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001), ENVISCREEN (NPVII 2B08036) a INCHEMBIOL (MŠM 0021622412).

LITERATURA

- Babek, O., Hilscherova, K., Nehyba, S., Zeman, J., Famera, M., Francu, J., Holoubek, I., Machat, J., Klanova, J., 2008. Contamination history of suspended river sediments accumulated in oxbow lakes over the last 25 years. *Journal of Soils and Sediments*, 8(3): 165–176.
- Hilscherova, K., Dusek, L., Kubik, V., Cupr, P., Hofman, J., Klanova, J., Holoubek, I., 2007. Redistribution of organic pollutants in river sediments and alluvial soils related to major floods. *Journal of Soils and Sediments*, 7(3): 167–177.
- Hilscherova, K., Dusek, L., Sidlova, T., Jalova, V., Cupr, P., Giesy, J. P., Nehyba, S., Jarkovsky, J., Klanova, J., Holoubek, I., 2010. Seasonally and regionally determined indication potential of bioassays in contaminated river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3): 522–534.
- Hilscherova, K., Kannan, K., Kang, Y. S., Holoubek, I., Machala, M., Masunaga, S., Nakanishi, J., Giesy, J. P., 2001. Characterization of dioxin-like activity of sediments from a Czech river basin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12): 2768–2777.
- Hollert, H., Durr, M., Olsman, H., Halldin, K., Van Bavel, B., Brack, W., Tysklind, M., Engwall, M., Braunbeck, T., 2002. Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the River Neckar. *Ecotoxicology*, 11(5): 323–336.
- Janosek, J., Hilscherova, K., Blaha, L., Holoubek, I., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors – interactions, effects and *in vitro* assessment. *Toxicology in Vitro*, 20(1): 18–37.
- Koh, C. H., Khim, J. S., Kannan, K., Villeneuve, D. L., Senthilkumar, K., Giesy, J. P., 2004. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea. *Environmental Pollution*, 132(3): 489–501.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M. E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J. M., Ben-Hassine, O. K., Ait-Aissa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of *in vitro* cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the Total Environment*, 402(2-3): 318–329.
- Macíková, P., 2009. Specifické mechanismy toxicity u různých typů vzorků vodního prostředí. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno, 84 pp.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using *in vitro* reporter gene assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497(1–2): 49–62.
- Murk, A. J., Legler, J., Denison, M. S., Giesy, J. P., vandeGuchte, C., Brouwer, A., 1996. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel *in vitro* bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33(1): 149–160.

- Prokes, R., Vrana, B., Klanova, J., Kupec, J., 2010. Calibration of Three Passive Samplers of Hydrophobic Organic Compounds in Water: Assessment of Critical Issues in Experimental Design, Data Interpretation and Field Application. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(12): 2812–2822.
- Valentová, E., 2008. Distribuce a mobilita perzistentních organických látek v akvatickém prostředí Zlínského regionu. Rigorózní práce, Masarykova univerzita, Brno, 107 pp.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(7): 1499–1506.
- Vrana, B., Mills, G. A., Allan, I. J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., Greenwood, R., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24(10): 845–868.

AKUTNÍ TOXICITA SULFAMETHOXAZOLU PRO DANIO PRUHOVANÉ (*DANIO RERIO*)

*The acute toxicity of sulfamethoxazole for zebrafish (*Danio rerio*)*

E. PRÁŠKOVÁ, E. VOŠLÁŘOVÁ, Z. SVOBODOVÁ

Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, epraskova@vfu.cz, voslarovae@vfu.cz, svobodovaz@vfu.cz

ABSTRACT

The consumption of pharmaceuticals is increasing as well as their occurrence in surface waters worldwide. One of the most often detected pharmaceutical in surface waters in the Czech Republic is an antibacterial sulfonamide sulfamethoxazole. The aim of this study was to determine the acute toxicity of sulfamethoxazole to embryonic and juvenile stages of zebrafish (*Danio rerio*). It follows from our results that 96hLC50 values of sulfamethoxazole in both embryonic and juvenile stages of zebrafish (*Danio rerio*) exceed 1000 mg.l⁻¹.

Klíčová slova: léčiva, embrya, juvenilní ryby, LC50

Keywords: pharmaceuticals, embryos, juvenile fish, LC50

ÚVOD

Léčivo sulfamethoxazol, CAS 723-46-6 (SMX), patří do skupiny antibiotik, konkrétně sulfonamidů. Mechanismem účinku sulfamethoxazolu je inhibice tvorby kyseliny dihydrolistové, která je důležitá pro syntézu DNA, čímž narušuje životní pochody bakterií (Isidori a kol., 2005). Sulfamethoxazol je účinnou látkou léčiva biseptolu, které se používá k léčbě bakteriálních onemocnění, zejména při infekcích ledvin a močových cest a infekcích plic a dýchacích cest.

Vzhledem k rozšířenému používání a nedostatečnému zachytu na čistírnách odpadních vod se SMX dostává do povrchových vod (Kotyza a kol., 2009) a patří k nejčastěji detekovaným antibiotikům (Kolpin a kol., 2002; Velicu a Suri, 2009; Garcia-Galan, a kol., 2011). Výskyt sulfamethoxazolu v těchto vodách v ng.l⁻¹ byl zaznamenán ve všech z 5 sledovaných lokalit v České republice (in litt). Sulfamethoxazol byl v koncentracích v µg.l⁻¹ detekován i v povrchových vodách dalších států např. USA (Lindsey a kol., 2001), Velké Británie (Nikolaou a kol., 2007) nebo Německa (Hirsch a kol., 1999; Park, 2005).

O vlivu tohoto léčiva na necílové organismy (zejména na vodní živočichy, kteří jsou jeho působení nejvíce vystaveni) není v současnosti mnoho informací, proto bylo cílem této práce zjistit akutní toxicitu sulfamethoxazolu pro ryby danio pruhované (*Danio rerio*) jako modelového organismu, a to zvlášť pro embryonální a juvenilní stadium.

MATERIÁL A METODIKA

Byl proveden test akutní toxicity podle metodiky OECD č. 203 a test toxicity OECD č. 212 na embryích ryb.

Test akutní toxicity na 2–3 měsíčních rybách *D. rerio* probíhal semistaticky s výměnou roztoků po 48 hodinách. Pro testování byly zvoleny následující koncentrace sulfamethoxazolu: 100, 250, 500, 750, 1000 mg.l⁻¹. Do každé koncentrace a kontroly bylo použito 10 kusů ryb. Základní fyzikální a chemické parametry ředicí vody použité v testech byly následující: KNK_{4,5} 4,2 mmol.l⁻¹; CHSKMn 2,8 mg.l⁻¹; BSK 0,72 mg.l⁻¹; celkový amoniak pod mezí stanovitelnosti; NO₃⁻ 23,48 mg.l⁻¹; NO₂⁻ pod mezí stanovitelnosti; Cl⁻ 18,11 mg.l⁻¹; ΣCa²⁺ + Mg²⁺ 3,06 mmol.l⁻¹. Teplota lázně se pohybovala na úrovni 22 ± 1 °C. Koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 % (80–95 %), pH bylo v rozmezí od 6,10 do 7,92.

V embryonálním testu je testovací organismus vystaven testované látce v období od oplodnění do ukončení embryonálního stádia (tj. do ukončení endogenní výživy ze žloutkového vajíčku). Testování probíhalo semistaticky po dobu 144 hodin s výměnou roztoků po 24 hodinách. Pro vlastní test byl zvolen stejný rozsah koncentrací sulfamethoxazolu. Základní fyzikální a chemické parametry ředicí vody byly shodné jako u testu akutní toxicity na juvenilních rybách. Teplota lázně se pohybovala na úrovni 24 ± 0,5 °C. Do každé koncentrace a kontroly bylo nasazeno 20 jiker. Aby bylo možné výsledky testů statisticky vyhodnotit a porovnat, byly oba testy provedené v šesti opakováních.

V průběhu pokusu byl u obou testů zaznamenáván počet uhynulých jedinců. Na základě zjištěné mortality se vypočítávají probitovou analýzou pomocí počítačového programu EKO-TOX 5.2 hodnoty 96hLC50 pro test akutní toxicity na rybách a 144hLC50 pro embryonální test. V naší práci však tyto hodnoty nebylo možno vypočítat, neboť ani v nejvyšších testovaných koncentracích nebylo dosaženo 50 % úhynu ryb.

VÝSLEDKY

V průběhu testu akutní toxicity sulfamethoxazolu na juvenilních rybách došlo k úhynu pouze v nejvyšší koncentraci (1000 mg.l⁻¹), kde mortalita dosáhla 30 %. U skupiny ryb vystavené nejvyšší koncentraci byly pozorovány změny chování, a to jejich pohyb převážně u dna nádoby, zatímco v ostatních koncentracích se ryby pohybovaly po celém objemu nádoby.

Histopatologické vyšetření testovaných juvenilních ryb neukázalo žádné abnormální změny tkání.

V embryonálním testu toxicity nedocházelo v žádných koncentracích k úhynům přesahujícím 50 %. Výsledky průměrné mortality u těchto testů jsou uvedeny v tab. 1. U embryí vystavených koncentracím od 750 mg.l⁻¹ byl zaznamenán opožděný vývoj oproti kontrole. U jedinců vystavených nejvyšší koncentraci byla pozorována nižší pohyblivost. Výsledná hodnota 96hLC50 sulfamethoxazolu pro juvenilní ryby a 144hLC50 pro embrya ryb *D. rerio* je tedy vyšší než 1000 mg.l⁻¹.

Tab. 1. Embryonální test toxicity – Průměrný počet uhynulých embryí z 20 nasazených v 6 opakováních.**Fig. 1.** Embryonic toxicity test – Average number of dead embryos out of 20 in each concentration in 6 repetitions.

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Mortalita					
	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	120 hod	144 hod
100	1	0	0	1	0	0
250	1	0	3	0	0	0
500	1	0	1	2	0	1
750	0	1	1	3	2	0
1000	0	1	3	3	2	0

DISKUSE

Naše práce odpovídá výsledkům Isidori a kol. (2005), kteří také prováděli testy akutní toxicity SMX na stejném druhu ryb, ale s použitím metodiky ISO 7346-1:1996. Jejich studie ukazuje, že ryby druhu *D. rerio* vykazují poměrnou odolnost vůči krátkodobému působení SMX. Studie Ferrariho a kol. (2003) ukázala, že nejvyšší koncentrace SMX bez pozorovaného účinku (10dNOEC) u embryí *D. rerio* je vyšší než 8 mg.l⁻¹. Kim a kol. (2007) zkoumali toxicitu sulfamethoxazolu také pro ryby druhu halančík rýžovištní (*Oryzias latipes*), a určili hodnotu 96hLC50 pro tento druh více než 100 mg.l⁻¹.

Při porovnání citlivosti ryb s dalšími vodními organismy k působení sulfamethoxazolu se jeví nejcitlivěji zástupci planktonu (*Daphnia magna* 96hEC50 = 25,20 mg.l⁻¹ a *Ceriodaphnia dubia* 96hEC50 = 15,51 mg.l⁻¹) a vířníků (*Brachionus calyciflorus* 96hEC50 = 26,27 mg.l⁻¹) (Isidori a kol., 2005). Naopak Kim a kol. (2007) stanovili hodnotu 96hEC50 SMX pro *D. magna* 177,3 mg.l⁻¹.

Po zhodnocení našich výsledků, tj. vyhodnocení mortality u testovaných ryb a embryí, lze usuzovat, že embrya ryb *D. rerio* jsou díky vyšší mortalitě od koncentrací 500 mg.l⁻¹ k působení sulfamethoxazolu citlivější než juvenilní ryby.

SOUHRN

Hodnota LC50 sulfamethoxazolu pro jikry a juvenilní ryby druhu danio pruhované je vyšší než 1000 mg.l⁻¹. Koncentrace sulfamethoxazolu v povrchových vodách se pohybuje řádově v ng.l⁻¹, a proto akutní toxicita tohoto léčiva pro ryby nepředstavuje větší riziko. Pokud bude ryba dlouhodobě vystavena účinkům sulfamethoxazolu, nelze vyloučit negativní dopad tohoto působení, proto je vhodné další testování, zejména chronické testy na raných vývojových stádiích.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla s podporou grantů IGA VFU 68/2010/FVHE a MSM 6215712402.

LITERATURA

- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters, study of carbamazepine, clofbric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 55: 359–370.
- Garcia-Galan, M. J., Diaz-Cruz, M.S., Barcelo, D., 2011. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environ. Int.*, 37: 462–473.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., 1999. Occurrence of antibiotic in the aquatic environment. *Sci. Total. Environ.*, 225: 109–18.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotic on non-target organisms. *Sci. Total. Environ.*, 346: 87–98.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33: 370–375.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 1202–11.
- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T., 2009. Léčiva – „Nový“ environmentální polutant. *Chem. Listy*, 109: 540–547.
- Lindsey, M. E., Meyer, M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73: 4640–6.
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 1225–1234.
- OECD, 1992a. Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 1998. Guideline 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Park, J., 2005. Pharmaceuticals in the environment and management approaches in Korea. RE-12. Seoul, Korea: Korea Environment Institute.
- Velicu, M., Suri, R., 2009. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ. Monit. Assess.*, 154: 349–359.

EPIGENETICKÁ TOXICITA KOMPLEXNÍCH VZORKŮ CYANOBAKTERIÍ – VLIV OZONIZACE A CHLORACE

Epigenetic toxicity of cyanobacterial extracts: effects of ozonation and chlorination

I. SOVADINOVÁ^{1,4}, P. BABICA^{2,4}, O. ADAMOVSKÝ^{1,4}, A. ALPATOVA³, B. UPHAM⁴

¹Masarykova univerzita, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, ČR, email: sovadinova@recetox.muni.cz, adamovsky@recetox.muni.cz

²Botanický ústav, Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Lidická 25/27, 602 00 Brno, ČR, email: pavel.babica@centrum.cz

³Civil and Environmental Engineering, A132 Engineering Research Complex, Michigan State University, 488 24 East Lansing, MI, USA, email: alpatova@msu.edu

⁴Pediatrics and Human Development, 251 FSTC, Michigan State University, 488 24 East Lansing, MI, USA, email: upham@msu.edu

ABSTRACT

Cyanobacteria form toxic blooms in drinking water reservoirs worldwide. We investigated a tumor promoting activity and cytotoxicity of extract of *Microcystis* sp. water bloom by using two established in vitro biomarkers of tumor promotion, gap junctional intercellular communication (GJIC) and mitogen-activated protein kinases (MAPK). The extract inhibited GJIC and activated MAPKs ERK1/2 and p38 in rat liver stem-like cells WB-F344 within 30 min of exposure at non-cytotoxic doses (determined by Neutral Red-uptake assay). Cytotoxicity was observed only at the highest dose after a longer exposure (24 hrs). The inhibition of GJIC, activation of ERK1/2 and p38, as well as cytotoxic effects were completely eliminated when the extract was treated with ozone for 30 min. Chlorination with sodium hypochlorite had any significant effect neither on tumor promoting activity nor cytotoxicity, even when the extract was chlorinated for 24 hrs (7–1000 mg.l⁻¹ of free chlorine). A known tumor promoter, microcystin-LR, was detected in the extract by HPLC-DAD, but this cyanotoxin has been shown not to affect GJIC/MAPK in this in vitro model, thus the effects observed in our study were most likely caused by not-yet-identified chemicals of cyanobacterial origin. Although chemical identity of the responsible agents remains to be elucidated, the information on rapid elimination of the tumor promoting activity and cytotoxicity of cyanobacteria by ozone might have a particular importance for selection of the best technology for drinking water treatment from cyanobacteria-contaminated reservoirs.

Klíčová slova: cyanobakteriální extrakt, sinicové toxiny, inhibice mezibuněčné komunikace mezerovými spoji, epigenetická toxicita, ozonizace, chlorace

Keywords: cyanobacterial extract, cyanotoxins, inhibition of gap junctional intercellular communication, epigenetic toxicity, ozonation, chlorination

ÚVOD

Masivní rozvoje sinic, ke kterým dochází ve zvýšené míře ve vodních nádržích po celém světě, patří mezi významné environmentální problémy současnosti. Sinice produkují a uvolňují do prostředí celou řadu toxických metabolitů, které mohou negativně ovlivňovat lidské zdraví. Zřejmě nejzávažnější zdravotní rizika souvisejí s dlouhodobou konzumací pitné vody kontaminované sinicovými toxiny, která je spojována se zvýšeným výskytem rakoviny jater a tlustého střeva (Fleming a kol., 2002; Zhou a kol., 2002; Svircev a kol., 2009). Jedny z nejprozkoumanějších sinicových toxinů, microcystiny, jsou známy jako promotory rakoviny jater (Nishiwaki-Matsushima a kol., 1992) a microcystin-LR je klasifikován jako možný lidský karcinogen (IARC2B) (Grosse a kol., 2006). Další hepatotoxin, cylindrospermopsin, vykazuje genotoxické účinky a diskutována je i jeho karcinogenita (Zegura a kol., 2011). Nádorově promoční a karcinogenní účinky však mohou být způsobeny i dalšími bioaktivními metabolity sinic a jejich směsmi. Nedávno bylo zjištěno, že zatím neznámé sinicové metabolity mohou mít nádorově promoční vlastnosti, jelikož inhibují mezibuněčnou komunikaci mezerovými spoji (GJIC; „gap junctional intercellular communication“) a aktivují mitogenem aktivovanou proteinkinázu (MAPK) ERK1/2 (Bláha a kol., 2010).

Inhibice GJIC a aktivace MAPK, zejména MAPK-ERK 1 a 2, jsou dávány do spojitosti s epigenetickými mechanismy promoční fáze karcinogeneze (Trosko a Ruch, 2002; Trosko a kol., 2004). Funkční mezerové spoje jsou nezbytné pro správnou regulaci, vývoj a diferenciaci buněk a inhibice buněčné komunikace prostřednictvím těchto spojů je významným ukazatelem promoční fáze karcinogeneze (Chipman a kol., 2003). Většina nádorových buněk má nefunkční mezerové spoje, onkogeny a nádorové promotory inhibují GJIC, zatímco chemopreventivní látky a nádorově supresorové geny GJIC stimulují (Trosko a Ruch, 2002; Trosko a kol., 2004). Inhibice GJIC je známým mechanismem nádorové promoce, který byl popsán u řady environmentálních polutantů, jako jsou např. polyaromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenylly (PCB) (Kang a kol., 1996; Madhukar a kol., 1996; Bláha a kol., 2002). Signální enzymy MAPK jsou součástí klíčových intracelulárních signálních drah regulujících procesy hrající kritickou roli v nádorové promoci: buněčnou proliferaci, diferenciaci, životaschopnost a adhezi (Denhardt, 1996). Členové signální kaskády MAPK-ERK1/2, Ras a Raf jsou známými onkogeny a zvýšená aktivita MAPK je často detekována v nádorech (Roberts a Der, 2007). Také proteinkinázová dráha MAPK-p38 hraje důležitou roli v karcinogenezi (Wagner a Nebreda, 2009).

Prvním cílem této studie bylo prozkoumat vliv extraktu sinicového vodního květu s dominující *Microcystis* sp. na ukazatele promoční fáze karcinogeneze a epigenetické toxicity, jmenovitě prostudovat jeho účinky na inhibici GJIC a aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkináz MAPK-ERK1/2 a MAPK-p38. Druhým cílem bylo zjistit účinek chlorace a ozonizace na nádorově promoční aktivitu extraktu. V našich experimentech byla využita nenádorová pluripotentní buněčná linie WB-F344 izolovaná z jater potkana, která je hojně používána ke studiu chemických karcinogenů.

MATERIÁL A METODIKA

EXTRAKCE VZORKU

Vodní květ byl odebrán pomocí planktonní sítě (20 μ m) ve vodní nádrži v areálu Michigan State University (East Lansing, MI, USA) v září v roce 2008. Biomasa byla lyofilizována a 2 g suché biomasy byly extrahovány pomocí 30 ml 50% metanolu (66,7 g DW.l⁻¹) za působení

ultrazvukové sondy (2 min). Po sonikaci byl extrakt centrifugován (31 000 × g) a supernatant byl odpařen do sucha za pomoci vakuové odparky. Odparek byl rozpuštěn v ultračisté vodě (MilliQ) v koncentraci ekvivalentní 800 g suché váhy původní biomasy na 1 l (g DW.l⁻¹).

CHLORACE A OZONIZACE VZORKU

Extrakt byl rozpíjetován po 4 ml a následně chlorován nebo ozonizován. Podmínky ozonizace a chlorace jsou shrnuty v tab. 1.

Chlorace: pH extraktu bylo upraveno fosfátovým pufrům (pH = 7), následně byl vzorek inkubován s roztokem NaOCl o různých výsledných koncentracích volného chloru (7, 70, 500 a 1000 mg.l⁻¹). Reakce byla po zvolené době (30 nebo 100 min nebo 24 h) ukončena přidávkem 10% NaHSO₃.

Ozonizace: extrakt byl ozonizován v ozonizátoru po dobu 30 min vzdušným ozonem (5 g.m³) probubláváním rychlostí 1 l.min⁻¹.

Tab. 1. Chlorace a ozonizace sinicového extraktu.

Fig. 1. Chlorination and ozonation of cyanobacterial extract.

Zkratka	Úprava	Koncentrace chloru nebo ozonu	Doba působení
NT	bez úpravy	–	–
Cl(7-30)	chlorace	7 mg.l ⁻¹	30 min
Cl(70-100)	chlorace	70 mg.l ⁻¹	100 min
Cl(500-100)	chlorace	500 mg.l ⁻¹	100 min
Cl(1000-24)	chlorace	1000 mg.l ⁻¹	24 hod
O ₃	ozonizace	5 mg.l ⁻¹	30 min

STANOVENÍ MICROCYSTINŮ

Koncentrace microcystinu v biomase byla stanovena pomocí HPLC-DAD dle optimalizované metody (Babica a kol., 2006). Microcystiny byly identifikovány na základě shody retenčního času a UV absorpčního spektra se standardy (microcystin-RR, -YR, -LR, -LW, -LF, nodularin).

BUNĚČNÁ LINIE

Buňky WB-F344 jsou epiteliální pluripotentní diploidní potkaní buňky izolované z jater vykazující charakteristické znaky tzv. oválných buněk (Ruch a Trosko, 1999). Oválné buňky hrají s velkou pravděpodobností důležitou roli při vzniku nádoru jater, neboť jejich intenzivní proliferace je pozorována v raných stádiích onemocnění vedoucích k rakovině (Sell, 1993). Buňky WB-F344 byly kultivovány v D-médiu s 5% objemem bovinního séra v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% syčení CO₂. Buňky narostlé do 100% konfluency v 35 mm Petriho miskách byly exponovány přímým přidáním extraktu nebo příslušného rozpouštědla (vody nebo pufru chlorovaného/ozonizovaného stejným způsobem jako sinicový extrakt) do kultivačního média po dobu 30 min. Experimentální koncentrace extraktu byla vyjádřena jako originální váha suché biomasy použité pro přípravu extraktu (g DW.l⁻¹). Experimentální extrakty o koncentracích 2, 4, 8, 12, 16 a 24 g DW.l⁻¹ obsahovaly microcystiny v celkové koncentraci 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 9,5; 12,7 a 19,1 mg.l⁻¹.

TEST VIABILITY BUNĚK

Životaschopnost buněk exponovaných 30 min extraktům sinic (před a po ozonizaci nebo chloraci) byla stanovena metodou příjmu neutrální červeně podle postupu popsaného ve studii Upham a kol. (1996). Tato metoda je založena na schopnosti životaschopných buněk přijímat barvu neutrální červeně a ukládat ji v lysozomech (Borenfreund a Puerna, 1985). Viabilita buněk byla vyjádřena jako poměr příjmu neutrální červeně v příslušné experimentální variantě k příjmu neutrální červeně v kontrolní variantě, kterou bylo příslušné rozpouštědlo (frakce kontroly, FOC = „fraction of vehicle control“).

MĚŘENÍ MEZIBUNĚČNÉ KOMUNIKACE (GJIC TEST)

Úroveň GJIC byla měřena metodou SL/DT („scrape loading/dye transfer“) (Upham a kol., 1996) a inhibice GJIC byla vyjádřena jako podíl mezibuněčné komunikace v příslušné experimentální variantě k mezibuněčné komunikaci v kontrolní variantě, kterou bylo příslušné rozpouštědlo (FOC).

WESTERN BLOT

Aktivita proteinkináz MAPK ERK1/2 a p38 byla stanovena pomocí metody Western blot s využitím komerčně dostupných protilátek specifických pro aktivovanou, tj. fosforylovanou, formu těchto kináz.

ZPRACOVÁNÍ DAT A STATISTIKA

Průměry \pm směrodatné odchylky z nejméně tří nezávislých experimentů byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (neparametrická Kruskal-Wallisova jednocestná ANOVA) s následným Dunnovým mnohočetným srovnávacím testem. Hodnoty P menší než 0,05 byly považovány jako statisticky významné. Hodnoty IC_{50} (koncentrace, při které dochází k 50% inhibičnímu účinku) a jejich 95% konfidenční intervaly byly vypočítány pomocí nelineární regrese.

VÝSLEDKY

V biomase vodního květu použitého pro přípravu extraktu dominovaly sinice *Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* a *M. flos-aquae* (určeno mikroskopicky). Výchozí biomasa obsahovala microcystiny v koncentraci $795 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW s microcystinem-LR jako dominantní strukturální variantou ($625 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, 79%). Zbývající množství microcystinů tvořily microcystin-RR (2%), microcystin-LW (2%), microcystin-LF (2%) a dvě neidentifikované strukturální varianty microcystinů (15%). Odhadnutá koncentrace všech variant microcystinů v extraktu o koncentraci 800 g suché biomasy na 1 l je tedy $636 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, z toho nejvíce je zastoupen kongener microcystin-LR a to v koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

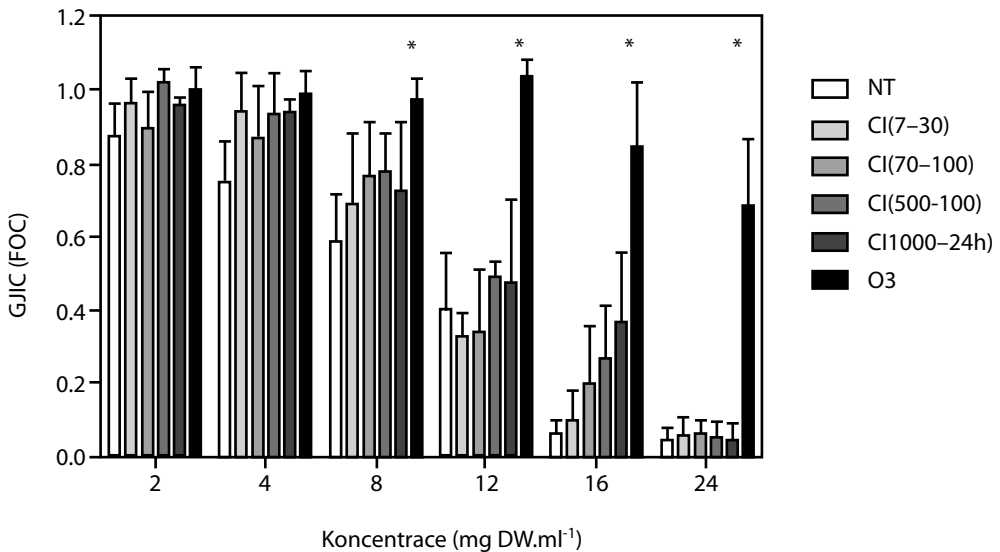
Účinky neupraveného nechlorovaného i neozonovaného sinicového extraktu (extrakt NT) na GJIC v buňkách WB-F344 jsou zobrazeny na Obr. 1. Po 30min expozici došlo ke statisticky významnému snížení mezibuněčné komunikace. Účinek rostl se zvyšující se koncentrací sinicového extraktu s hodnotou $IC_{50} = 8 \pm 1 \text{ g DW}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky stanovení viability buněk ukázaly, že použité koncentrace extraktu nebyly cytotoxické (data nejsou prezentována). Vedle inhibice GJIC indukoval neupravený sinicový extrakt NT v buňkách WB F-344 po 30min expozici

také fosforylaci proteinkináz MAPK-ERK 1/2 a p38 (obr. 2). Aktivace těchto proteinkináz vzrůstala se zvyšující se koncentrací sinicového extraktu s nejvyšším účinkem v nejvyšší testované koncentraci (24 g DW.l⁻¹). Proteinkinázy MAPK- ERK 1/2 a p38 byly významně aktivovány ve srovnání s kontrolou již v koncentraci 4 g DW/l.

Cílem této studie bylo zjistit vliv ozonizace a chlorace na nádorově promoční aktivitu výchozího sinicového extraktu. Jak lze vidět na obr. 1, působení ozonu ve zvolené koncentraci a ve zvoleném čase statisticky významně snižovalo inhibiční účinek neupraveného extraktu NT. Nejvyšší testovaná koncentrace ozonizovaného sinicového extraktu (24 g DW.l⁻¹) způsobila inhibici GJIC pouze o 30 %, takže hodnotu IC₅₀ nebylo možné stanovit. Naproti tomu chlorace neměla významný vliv na inhibiční účinek neupraveného extraktu na GJIC, a to ani v případě extraktu chlorovaného nejvyšší koncentrací chloru (1000 mg.l⁻¹) po dobu 24 h, kdy došlo pouze ke zvýšení IC₅₀ z 8±1 g DW.l⁻¹ na 12±2 g DW.l⁻¹.

Obr. 1. Vliv ozonizace a chlorace testovaného sinicového extraktu NT (2 – 24 g DW.l⁻¹) na inhibici mezibuněčné komunikace mezerynými spoji (GJIC) v buňkách WB-F344 po 30min expozici. Data jsou vyjádřena jako průměr±směrodatná odchylka nezávislých opakování experimentu (n ≥ 3). Signifikantrní rozdíl v porovnání s extraktem NT je v grafu označen hvězdičkou * (Kruskal-Wallis ANOVA, P < 0,05, Dunnův *post hoc* test). NT – výchozí neupravený extrakt, Cl – chlorované extrakty, O3 – ozonizovaný extrakt.

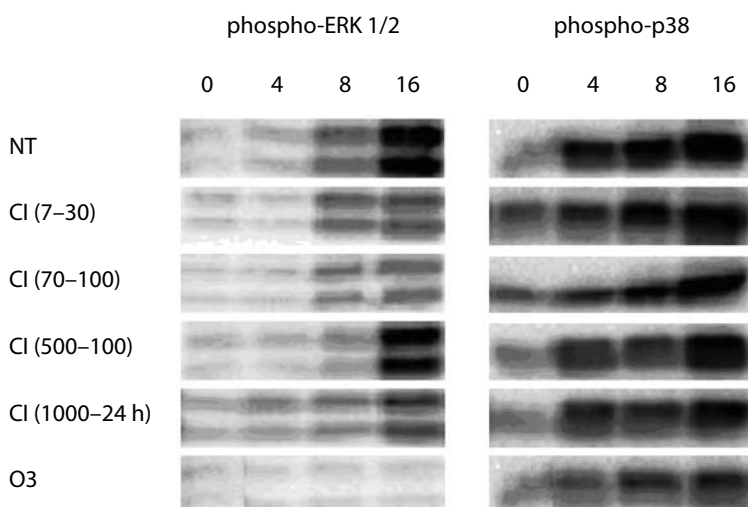
Obr. 1. Effects ozonation and chlorination of the tested cyanobacterial extract NT (2 – 24 mg DW.ml⁻¹) on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in WB-F344 cells after 30 min exposure. Data are means ± standard deviations of independent repetitions of the experiment (n ≥ 3). Significant differences from the NT extract are indicated by asterisks (Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc* test, P < 0.05). NT – original non-treated extract, Cl – chlorinated extracts, O3 – ozonized extract.



Ozonizace i chlorace významně snižovaly aktivaci MAPK ERK 1/2 indukovanou neupraveným extraktem (obr. 2). Ozonizace se opět ukázala účinnější než chlorace, jelikož snížila aktivitu této proteinkinázy ve všech testovaných koncentracích (4, 8 a 16 g.l⁻¹) na úroveň kontroly. Chlorace se ukázala být efektivnější se zvyšující se koncentrací aplikovaného chloru a s prodloužením doby jeho působení. Vliv chlorace a ozonizace na aktivitu MAPK-p38 byl však menší ve srovnání s MAPK ERK 1/2 (obr. 2). Ozonizace sice viditelně snížila aktivaci MAPK-p38, ovšem ani v nejnižší testované koncentraci (4 g DW.l⁻¹) nepoklesla aktivita na úroveň kontroly.

Obr. 2. Aktivace mitogenem aktivovaných proteinkináz MAPK, extracelulární receptorové kinázy 1 a 2 (ERK1/2) a p38, testovanými vzorky v koncentracích 4, 8 a 16 g DW.l⁻¹ detekovaná metodou Western blot. NT – výchozí neupravený extrakt, Cl – chlorované extrakty, O3 – ozonizovaný extrakt.

Obr.2. Activation mitogen-activated protein kinases (MAPKs) – extracellular receptor kinases 1 and 2 (ERK1/2) and p38 by tested samples at the concentrations of 4, 8 and 16 mg DW.ml⁻¹ as determined by Western blotting. NT – original non-treated extract, Cl – chlorinated extracts, O3 – ozonized extract.



DISKUSE

Negativní vliv sinic a jejich toxinů na zdraví člověka je v současné době velmi diskutovaným tématem. Sinice jsou totiž známy jako producenti toxických látek, které jsou spojovány s nádorovou promoci a chemickou karcinogenezí (Bláha a kol., 2009). Nedávné studie ukázaly, že extrakty z toxických druhů sinic kultivovaných v laboratoři i ze vzorků přírodních vodních květů sinic inhibují GJIC a aktivují MAPK-ERK 1/2 (Bláha a kol., 2010; Nováková a kol., 2011). Tyto dva sledované parametry patří mezi důležité ukazatele nádorové promoce, jejichž ovlivnění bylo pozorováno po expozici mnoha známým nádorovým promoterům a epigenetickým toxikantům, jako jsou např. forbol estery (např. TPA) (Madhukar a kol., 1996), organochlorované pesticidy (Trosko a kol., 1987), PCB (Kang a kol., 1996), nízkomolekulární PAH (Bláha a kol., 2002) nebo organické peroxidy (Upham a kol., 2007). Ačkoliv je známo, že microcystiny i cylindrospermopsin mohou být zapojeny do karcinogenních procesů (Nishiwaki-Matsushima a kol., 1992; Falconer a Humpage, 2005), samotný microcystin ani cylindrospermopsin neměly přímý vliv na inhibici GJIC ani na aktivaci MAPK ERK 1/2 (Bláha a kol., 2010). Nebyla také nalezena žádná souvislost mezi obsahem těchto toxinů v extraktech sinic a schopností

extraktů potlačovat GJIC (Bláha a kol., 2010; Nováková a kol., 2011). Tyto výsledky tedy ukazují na přítomnost dalších dosud neidentifikovaných metabolitů sinic s nádorově promočními a epigenetickými účinky v sinicové biomase.

V této studii byla testována epigenetická toxicita a nádorově promoční aktivita extraktu sinicového květu odebraného ve vodní nádrži v Michiganu, USA, s dominujícími sinicemi rodu *Microcystis* sp. V extraktu byly detekovány microcystiny s převahou microcystinu-LR, který tvořil 79 % celkového obsahu microcystinů. Tento extrakt inhiboval GJIC a aktivoval mitogenem aktivované proteinkinázy MAPK-ERK1/2 a p38. Intenzita inhibice GJIC a naměřená efektivní koncentrace ($IC_{50} = 8 \text{ g DW.l}^{-1}$) byla řádově podobná jako u dříve publikovaných údajů pro extrakty *Microcystis* sp. ($IC_{50} = 4$ nebo 6 g DW.l^{-1}) (Bláha a kol., 2010; Nováková a kol., 2011). Podobně jako bylo zjištěno ve studii Bláha a kol. (2010), přírodní extrakt obsahující *Microcystis* sp. aktivoval MAPK-ERK 1/2 již v koncentraci okolo 4 g DW.l^{-1} . V naší studii byl však poprvé pozorován vliv sinicového extraktu také na aktivaci MAPK-p38.

Dalším cílem této studie bylo sledovat vliv dvou oxidačních procesů využívaných v technologiích výroby pitné vody, ozonizace a chlorace, na epigenetickou toxicitu sinicového extraktu. Konvenční metody (flokulace, koagulace, sedimentace a filtrace, chlorace) mohou způsobovat uvolňování toxinů z buněk sinic, jsou obvykle málo účinné v odstranění sinicových toxinů rozpuštěných ve vodné fázi, nebo při nich vznikají toxické meziprodukty (Hoeger a kol., 2002, Daly a kol., 2007). Naproti tomu ozonizace má dostatek oxidační kapacity rozbít buňky i toxiny sinic, vytvářejí se při ní méně toxické meziprodukty ve srovnání s chlorací a zdá se být velice efektivní metodou pro odstranění microcystinů a nodularinů (Hoeger a kol., 2002; Al Momani a Jarrah, 2010). Také v naší studii se ukázal být ozon účinnější než chlor při odstranění nádorově promoční aktivity a epigenetické toxicity sinicového extraktu. Po chloraci došlo pouze k částečnému snížení epigenetické toxicity testovaného sinicového extraktu, naproti tomu ozonizace jeho toxické účinky prakticky úplně odstranila. Tyto výsledky naznačují možné využití ozonu jakožto efektivní technologie pro eliminaci sinicových nádorových promoterů a karcinogenů při výrobě pitné vody z nádrží kontaminovaných toxickými sinicemi.

SOUHRN

Masivní rozvoj sinic ve vodách má řadu negativních dopadů včetně produkce toxicých látek. Ačkoli se dosavadní výzkum soustředil převážně na sinicové toxiny microcystin a cylindrospermopsin, nejnovější studie ukazují, že i další bioaktivní metabolity sinic a jejich směsi mohou ovlivňovat procesy nádorové promoce a epigenetické toxicity a představovat tak nebezpečí pro ekosystém a zdraví člověka. Extrakt vodního květu obsahující *Microcystis* sp. způsobil rychlou inhibici GJIC a aktivaci proteinkináz MAPK-ERK 1/2 a p38. Oba tyto buněčné procesy hrají důležitou roli v nádorové promoci. Účinky byly pozorovány v necytotoxických koncentracích a byly indukovány zatím blíže neidentifikovanými metabolity sinic. Nádorově promoční aktivita sinicového extraktu byla pouze částečně eliminována chlorací, avšak úplně odstraněna ozonizací, což přináší důležité informace pro hledání účinných strategií pro eliminaci sinicových nádorových promoterů při přípravě pitné vody.

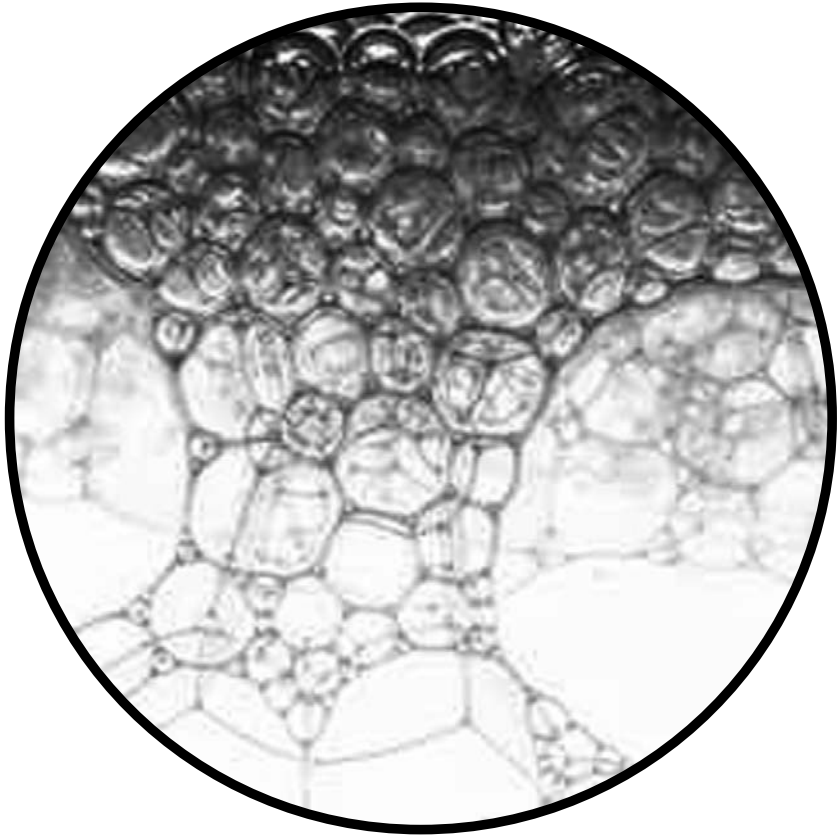
PODĚKOVÁNÍ

Výzkum je podporován projekty CETOCOEN (CZ.1.05/2.1.00/01.0001) a projektem 2SGA2858 programu SoMoPro (financováno příspěvkem Evropského společenství v rámci FP/2007-2013 dle Grantové dohody č. 229603 a spolufinancováno Jihomoravským krajem).

LITERATURA

- Al Momani, F. A., Jarrah, N., 2010. Treatment and kinetic study of cyanobacterial toxin by ozone. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(6): 719–731.
- Babica, P., Kohoutek, J., Bláha, L., Adamovský, O., Maršálek, B., 2006. Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 285(8): 1545–1551.
- Bláha, L., Babica, P., Hilscherová, K., Upham, B. L., 2010. Inhibition of gap-junctional intercellular communication and activation of mitogen-activated protein kinases by cyanobacterial extracts – Indications of novel tumor-promoting cyanotoxins? *Toxicol*, 55(1): 126–134.
- Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B., 2009. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2): 36–41.
- Bláha, L., Kapplová, P., Vondráček, J., Upham, B., Machala, M., 2002. Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological Sciences*, 65(1): 43–51.
- Borenfreund, E., Puerna, J. A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2–3): 119–124.
- Daly, R. I., Ho, L., Brookes, J. D., 2007. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation. *Environmental Science & Technology*, 41(12): 4447–4453.
- Denhardt, D. T., 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: The potential for multiplex signalling. *Biochemical Journal*, 318: 729–747.
- Falconer, I. R., Humpage, A. R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1): 43–50.
- Fleming, L. E., Rivero, C., Burns, J., Williams, C., Bean, J. A., Shea, K. A., Stinn, J., 2002. Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae*, 1(2): 157–168.
- Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Cogliano, V., 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology*, 7(8): 628–629.
- Hoeger, S. J., Dietrich, D. R., Hitzfeld, B. C., 2002. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environmental Health Perspectives*, 110(11): 1127–1132.
- Chipman, J. K., Mally, A., Edwards, G. O., 2003. Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicological Sciences*, 71(2): 146–153.
- Kang, K. S., Wilson, M. R., Hayashi, T., Chang, C. C., Trosko, J. E., 1996. Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures. *Environmental Health Perspectives*, 104(2): 192–200.
- Madhukar, B. V., de-Feijter-Rupp, H. L., Trosko, J. E., 1996. Pulse treatment with the tumor promoter TPA delays the onset of desensitization response and prolongs the inhibitory effect on gap junctional intercellular communication of a rat liver epithelial cell line WB F-344. *Cancer Letters*, 106(1): 117–123.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W., Fujiki, H., 1992. Liver-tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin Microcystin-LR. *J Clinical Cancer Research*, 118(6): 420–424.

- Nováková, K., Babica, P., Adamovský, O., Bláha, L., 2011. Modulation of gap-junctional intercellular communication by a series of cyanobacterial samples from nature and laboratory cultures. *Toxicon*, 58(1): 76–84.
- Roberts, P. J., Der, C. J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26: 3291–3310.
- Ruch, R. J., Trosko, J. E., 1999. The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis. *Anticancer Research*, 19(6A): 4831–4838.
- Sell, S., 1993. The role of determined stem-cells in the cellular lineage of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Developmental Biology*, 37(1): 189–201.
- Svircev, Z., Krstic, S., Miladinov-Mikov, M., Baltic, V., Vidovic, M., 2009. Freshwater Cyanobacterial Blooms and Primary Liver Cancer Epidemiological Studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27(1): 36–55.
- Trosko, J. E., Jone, C., Chang, C. C., 1987. Inhibition of Gap Junctional-Mediated Intercellular Communication in-Vitro by Aldrin Dieldrin and Toxaphene a Possible Cellular Mechanism for Their Tumor-Promoting and Neurotoxic Effects. *Molecular Toxicology*, 1(1): 83–94.
- Trosko, J. E., Ruch, R. J., 2002. Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Current Drug Targets*, 3(6): 465–482.
- Trosko, J. E., Chang, C. C., Upham, B. L., Tai, M. H., 2004. Ignored hallmarks of carcinogenesis: Stem cells and cell-cell communication. *Signal Trans. Commun. Cancer Cells*, 1028: 192–201.
- Upham, B. L., Guzvic, M., Scott, J., Carbone, J. M., Blaha, L., Coe, C., Li, L. L., Rummel, A. M., Trosko, J. E., 2007. Inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of mitogen-activated protein kinase by tumor-promoting organic Peroxides and protection by resveratrol. *Nutrition and Cancer*, 57(1): 38–47.
- Upham, B. L., Weis, L. M., Rummel, A. M., Masten, S. J., Trosko, J. E., 1996. The effects of anthracene and methylated anthracenes on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Fundamental and Applied Toxicology*, 34(2): 260–264.
- Wagner, E. F., Nebreda, A. R., 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8): 537–549.
- Zegura, B., Straser, A., Filipic, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research*, 727(1–2): 16–41.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences*, 15(2): 166–171.



VLIV CHRONICKÉ EXPOZICE SIMAZINU NA BIOMARKERY OXIDAČNÍHO STRESU A ANTIOXIDAČNÍ BIOMARKERY JATERNÍ TKÁNĚ KAPRA OBEČNÉHO (*CYPRINUS CARPIO* L.)

THE EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE OF SIMAZINE ON OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND ANTIOXIDANT BIOMARKERS IN LIVER OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio* L.)

A. STARÁ, J. MÁCHOVÁ, J. VELÍŠEK

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, staraa01@frov.jcu.cz, jmachova@frov.jcu.cz, velisek@frov.jcu.cz

ABSTRACT

We investigated the chronic effect of simazine, an s-triazine herbicide commonly present in aquatic environments, on the antioxidant system and oxidative stress indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish were exposed to sub-lethal concentrations of 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (environmental concentration in Czech rivers), 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, and 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for 14, 28 and 60 days. Indices of oxidative stress [reactive oxygen species (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)], and antioxidant parameters [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and reduced glutathione (GSH)] were measured in fish liver. Chronic exposure to simazine showed the negative impact of the increased production of ROS leading to oxidative damage to lipids, proteins, and inhibition of antioxidant capacity in liver of the common carp. Activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx and GSH in groups with two highest concentrations (2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) were statistically significantly higher ($p < 0.01$) at all exposure times as compared with the control group.

Klíčová slova: triaziny, ryby, kataláza, glutation peroxidáza, redukovaný glutathion

Keywords: triazine, fish, catalase, glutathione reductase, reduced glutathione

ÚVOD

Růst spotřeby pesticidů v moderním světě budí stále větší obavy z důsledků znečišťování prostředí, k němuž jejich používáním dochází. Pesticidy v minulosti zaujímaly významné místo v pořadí příčin havarijních úhynů ryb (Nemcsok a kol., 1999). V rámci studia vlivu pesticidů na vodní organismy bylo realizováno mnoho toxikologických studií, byly však prováděny na druzích, které se v našich podmínkách nevyskytují. K dispozici jsou dále převážně výsledky krátkodobých studií (např. testů akutní toxicity), které hodnotí vliv krátkodobé expozice vysokým koncentracím testovaných látek. Tyto typy testů jsou technicky, časově i finančně méně náročné v porovnání s dlouhodobými testy hodnotícími účinky nižších (subletálních) koncentrací pesticidů na exponované organismy (např. chronické testy). Právě dlouhodobé testy však

poskytují objektivnější informace o účincích pesticidů z pohledu jejich reálného výskytu v životním prostředí.

Jednou z nejčastěji používaných skupin pesticidů jsou triaziny. Triazinové herbicidy jsou stabilní látky (rezidua přetrvávají ve vodě až jeden rok), nebezpečné pro vodní živočichy. Přestože bylo používání většiny z nich v nedávné době zakázáno, stále se ve formě reziduí vyskytují v povrchových a podzemních vodách (ČHMÚ, 2010). Simazin, 6-chlor-N₂,N₄-diethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin patří do skupiny selektivních triazinových herbicidů, které se používali pro pre a post-emergentní kontrolu plevelů. Simazin byl také používán k ničení ponořené vodní vegetace a řas v rybnících a pomalu tekoucích vodách (U.S. EPA, 1994; Oropesa a kol., 2009; Turner, 2003). Simazin je zjišťován v pitné vodě (Oropesa a kol., 2008). V povrchových vodách České republiky dosáhla nejvyšší koncentrace simazinu 0,06 µg.l⁻¹ (ČHMÚ, 2011). V současnosti je simazin považován za nebezpečný pro životní prostředí. V laboratorních experimentech byly zjištěny estrogenní účinky simazinu na buněčné linie, a proto se stal předmětem intenzivní kontroly a výzkumu (Sanderson a kol., 2001; Zorrilla a kol., 2010). Z toho důvodu je simazin zahrnut na listině prioritních látek pro testování v EU (European commission, 1999) a USA (U.S. EPA, 1994).

Jedním z mechanismů působení simazinu na vodní organismy, převážně ryby, je oxidační stres. Oxidační stres vyvolává mnoho polutantů včetně pesticidů, tyto polutanty ovlivňují reaktivní formy kyslíku a způsobují změny v antioxidačních systémech (Monteiro a kol., 2006; Slaninova a kol., 2009). Oxidační poškození lipidů v počátku vede k degeneraci buněk a následně může vést až k jejich nekróze. K oxidačnímu poškození dochází hlavně v buněčné membráně. Lipoperoxidace představuje jednu z nejčastějších reakcí vyplývajících z účinků volných radikálů na biologické struktury (Tagliari a kol., 2004). Vznik oxidačního stresu v organismu ryb je ovlivněn produkty biologického rozkladu pesticidů. Oxidační stres je výsledkem nerovnováhy produkce a eliminace volných radikálů ve prospěch jejich produkce. Volné radikály (ROS – reaktivní kyslíkové radikály) jsou do jisté míry v organismu užitečné, ale rovněž mají význam v řadě degenerativních procesů (Toro & Rodrigo, 2009).

Toxicita pesticidů a jejich rizika pro ryby jsou klíčovým prvkem vodní toxikologie (Kreutz a kol., 2008). Mezi velmi často pozorované negativní účinky pesticidů na ryby patří vznik oxidačního stresu. V této studii byly hodnoceny biomarkery oxidačního stresu a antioxidační biomarkery v jaterní tkáni kapra obecného po dlouhodobém působení simazinu v subletálních koncentracích. Stanovení jednotlivých biomarkerů ve vzorcích získaných z dlouhodobého testu toxicity simazinu na kaprovi poskytne cenné informace o působení simazinu v subletálních koncentracích na rybí organismus.

MATERIÁL A METODY

Ke sledování dlouhodobého účinku simazinu byl použit kapr obecný (*Cyprinus carpio*) z odchovného zařízení Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech. Sto dvacet osm kaprů (standardní délka těla 21,31 ± 2,05 cm, hmotnost 282,05 ± 38,08 g) bylo umístěno do osmi 200litrových akvárií po 16 kusech. Kapři byli vystaveni po dobu 60 dnů simazinu (Sigma Aldrich, Česká republika, chemická čistota 99,5 %) v koncentracích: 0,06 µg.l⁻¹ (environmentální koncentrace nalézáná v českých řekách – skupina 1), 2 mg.l⁻¹ (skupina 2) a 4 mg.l⁻¹ (skupina 3). Současně byla nasazena kontrolní skupina ryb bez simazinu. Test probíhal ve dvou opakováních. 48 hodinová letální koncentrace pro kapra obecného je 40 mg.l⁻¹ simazinu (Hashimoto & Nishiuchi, 1981). Koncentrace simazinu 2 mg.l⁻¹ a 4 mg.l⁻¹ odpovídají

5% 48hLC₅₀ a 10% 48hLC₅₀ pro kapra obecného. Jaterní tkáň kaprů pro stanovení biomarkerů oxidačního stresu byly odebrány 14., 28. a 60. den expozice. Ryby byly během experimentu krmeny jednou denně komerčním krmivem pro ryby v dávce 1 % hmotnosti obsádky. Během pokusu byly měřeny tyto fyzikálně-chemické parametry vody: teplota vody ($19,1 \pm 1,3$ °C), pH ($7,5 \pm 0,4$) a nasycení vody kyslíkem (90–95 %). V průběhu experimentu byla ve všech akváriích sledována koncentrace simazinu. Koncentrace simazinu ve vodě byla stanovena LC/MS/MS podle metodiky Katsuma a kol. (2005). Naměřené koncentrace simazinu se nelišily o více než 2 % oproti nominálním koncentracím.

PŘÍPRAVA VZORKŮ TKÁNÍ A POST-MITOCHONDRIÁLNÍHO SUPERNATANTU

Po 14, 28 a 60 dnech expozice byly z každé skupiny náhodně vybrány čtyři ryby, kterým byla po usmrčení odebrána jaterní tkáň, odebrané vzorky byly zmrazeny a uchovány při -80 °C až do doby provedení analýz. Vzorky jater byly zváženy a homogenizovány (1:10 w/v) pomocí Ultra Turrax homogenizátoru (Ika, Německo) za použití 50 mM fosfátového pufru (pH 7, obsahující 0,5 mM EDTA). Homogenát byl rozdělen na dvě části, první pro stanovení biomarkerů oxidačního stresu a druhá pro stanovení antioxidantních biomarkerů.

BIOMARKERY OXIDAČNÍHO STRESU

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) byly měřeny pomocí 2,7-dichlorofluorescein diacetátu (DCFH-DA) podle metodiky Driver a kol. (2000) s drobnými modifikacemi podle Zhang a kol. (2008). Látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) byly stanoveny metodou podle Lushchak a kol. (2005), která byla použita i k vyhodnocení lipidní peroxidace (LPO).

ANTIOXIDAČNÍ BIOMARKERY

Celková aktivita superoxid dismutázy (SOD; ES 1.15.1.1) byla stanovena spektrofotometricky při 420 nm (Marklund & Marklund, 1974). Aktivita katalázy (CAT, 1.11.1.6 ES) byla měřena spektrofotometricky při 240 nm podle metody Beers & Sizer (1952). Aktivita glutathion peroxidázy (GPx, 1.11.1.9 ES) byla testována jako rychlost oxidace NADPH při 340 nm, byla stanovena pomocí extinkčního koeficientu 6,22 mm/cm (Lawrence & Burk, 1976). Aktivita glutathion reduktázy (GR, ES 1.6.4.2) byla stanovena spektrofotometricky, měřením oxidace nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu (NADPH) při 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1975). Množství redukovaného glutathionu (GSH) bylo zjištěno pomocí metody Ferrari a kol. (2007).

STANOVENÍ KONCENTRACE CELKOVÝCH PROTEINŮ

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky, metodou podle Bradforda (1976) s použitím hovězího sérového albuminu jako standardu.

STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechny hodnoty byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka a analyzovány pomocí statistického softwaru STATISTICA program (verze 8.0 pro Windows, StatSoft). Pro hodnocení rozdílu mezi sledovanými skupinami a kontrolní skupinou byla použita analýza variace (ANOVA) – Tukeyův test.

VÝSLEDKY

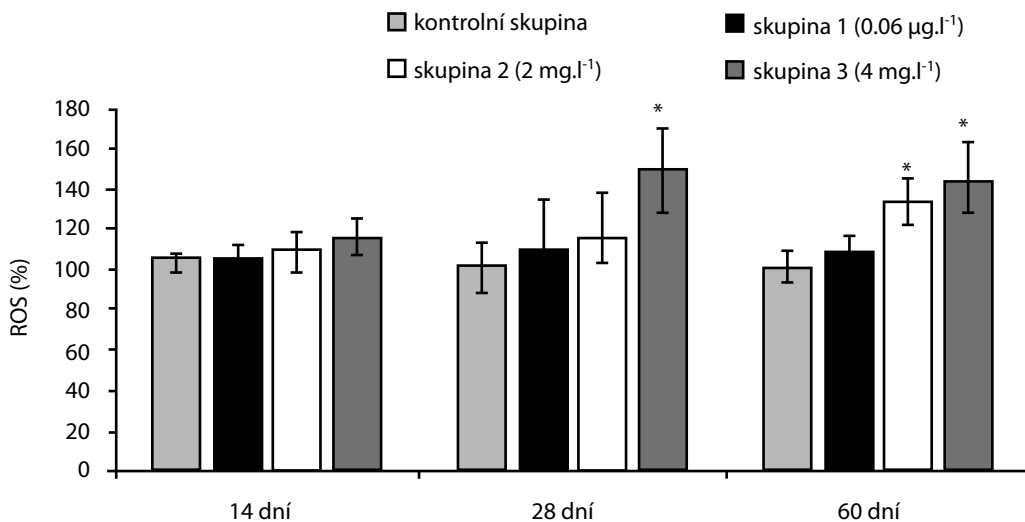
V průběhu experimentu bylo sledováno chování ryb. Ryby vystavené experimentálním koncentracím simazinu nejevily změny chování (příjem krmiva, dýchání, pohybová aktivita). Během testu nebyla zjištěna žádná mortalita.

BIOMARKERY OXIDAČNÍHO STRESU

Účinky chronické expozice simazinu na hladinu ROS v játrech kapra obecného jsou uvedeny v grafu 1. Statisticky významné ($p < 0,01$) zvýšení hladiny ROS v játrech kaprů bylo zjištěno ve skupině 2 po 60denní expozici simazinem a ve skupině 3 po 28 a 60denní expozici simazinem ve srovnání s kontrolní skupinou.

Graf 1. *Reaktivní kyslíkové radikály v játrech kapra obecného po expozici simazinem.*

Graph 1. *Reactive oxygen species values in common carp liver after simazine exposure.*



*Data are means \pm S.D., N = 8. Significant differences compared with control values, * $< 0,01$.*

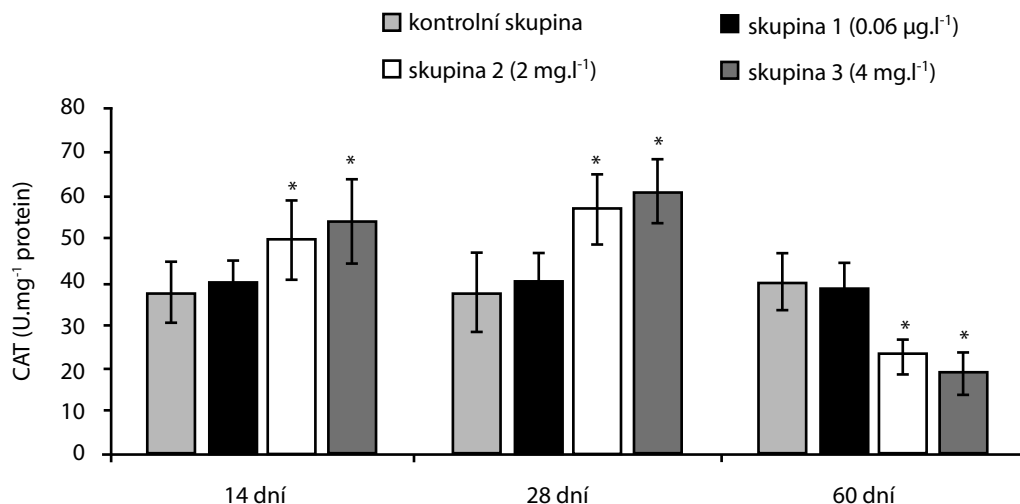
Dlouhodobá expozice simazinu neměla vliv na lipidní peroxidaci v játrech kapra obecného (data neuvedena).

ANTIOXIDAČNÍ BIOMARKERY

Aktivita CAT v játrech kapra obecného po dlouhodobém působení simazinu je uvedena v grafu č. 2. Byly zjištěny staticky významné ($p < 0,01$) změny aktivity CAT ve skupině 2 a 3. V těchto skupinách došlo po 14 a 28 dnech expozice k nárůstu aktivity CAT, po 60 dnech expozice byla aktivita CAT v porovnání s kontrolní skupinou významně nižší.

Graf 2. Aktivita katalázy v játrech kapra obecného po expozici simazinem.

Graph 2. Activity of catalase in common carp liver after simazine exposure.

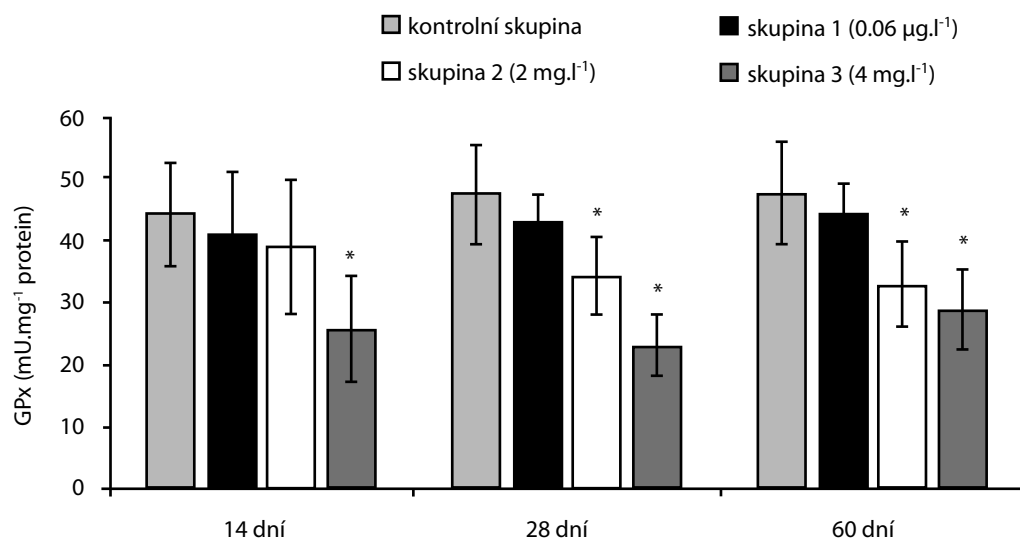


Data are means \pm S.D., N = 8. Significant differences compared with control value, * < 0,01.

V grafu č. 3. je znázorněná enzymatická aktivita GPx po dlouhodobém působení simazinu v játrech kapra obecného. Signifikantně ($p < 0,01$) snížená aktivita GPx byla ve skupině 2 a 3 po 28 a 60 dnech expozice ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve třetí skupině byla zjištěna snížená aktivita GPx i po 14 dnech expozice.

Graf 3. Aktivita glutathion peroxidázy v játrech kapra obecného po expozici simazinem.

Graph 3. Activity of glutathion peroxidase in common carp liver after simazine exposure.

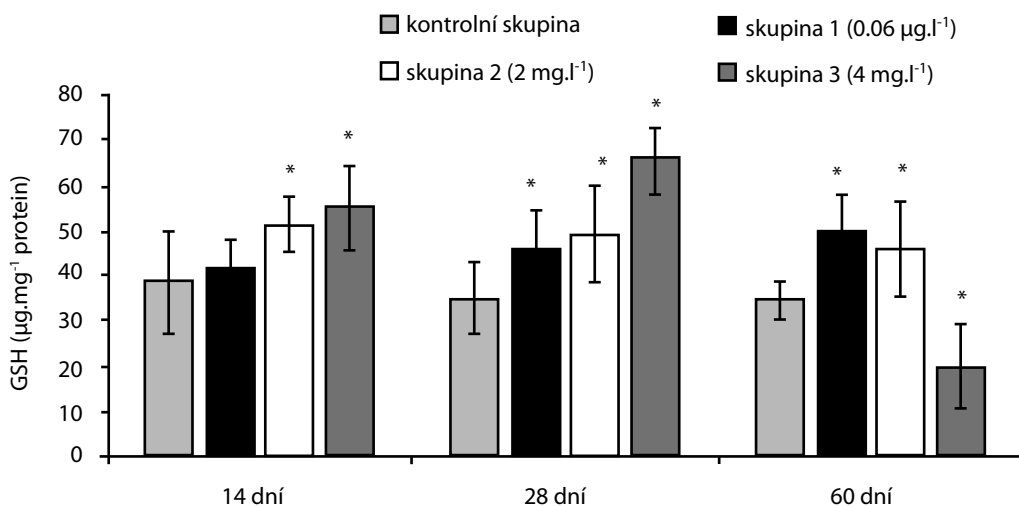


Data are means \pm S.D., N = 8. Significant differences compared with control values, * < 0,01.

Koncentrace redukovaného glutathionu v játrech kapra obecného po dlouhodobém působení simazinu jsou uvedené v grafu č. 4. Statisticky ($p < 0,01$) významné změny koncentrace GSH byly nalezeny v játrech ve všech testovaných skupinách vystavených simazinu ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině 1 a 2 byla zjištěna signifikantně zvýšená hladina GSH ve vzorcích jater odebraných 28. a 60. den expozice. Ve skupině 2 bylo GSH zvýšeno i 14 den expozice. Ve skupině 3 byla zjištěna zvýšená hladina GSH ve vzorcích odebraných 14. a 28. den, ale 60. den expozice bylo zjištěno snížení koncentrace GSH ve srovnání s kontrolní skupinou.

Graf 4. Hladina redukovaného glutathionu v játrech kapra obecného po expozici simazinem.

Graph 4. Level of reduced glutathione in common carp liver after simazine exposure.



Data are means \pm S.D., $N = 8$. Significant differences compared with control values, * $< 0,01$.

Dlouhodobá expozice simazinem nezpůsobila statisticky významné změny aktivity SOD v jaterní tkáni kapra obecného (data neuvedena).

Po dlouhodobé expozici simazinem nebyly zjištěny statisticky významné změny aktivity GR v jaterní tkáni kaprů (data neuvedena).

DISKUSE

Tato studie hodnotila vliv chronické expozice simazinu na vznik oxidačního stresu a úroveň antioxidantní aktivity v játrech kapra obecného. Dlouhodobá expozice ryb simazinu prokázala zvýšenou tvorbu ROS v játrech po vystavení ryb simazinu ve vyšších koncentracích (2 a 4 mg.l⁻¹). Dynamická rovnováha buňky může být narušena zvýšením tvorby ROS a snížením koncentrace antioxidantů, což vede ke vzniku oxidačního stresu (Tamagno a kol., 1998; Lushchak, 2011). Za normálních podmínek v buňce minimalizují poruchy způsobené ROS antioxidantní systémy (Mates, 2000), zahrnující antioxidantní enzymy (SOD, CAT, GPX, GR) a neenzymatické antioxidanty (GSH), které brání oxidačnímu poškození buněk (Modesto & Martinez, 2010). V testu se neprojevil vliv dlouhodobého působení simazinu na lipidní peroxidaci v játrech kapra obecného. Toni a kol. (2011) zjistil významný nárůst hladiny TBARS v játrech kapra obecného vystaveného fungicidu tebuconazolu v koncentraci 31,95 µg.l⁻¹. Miron a kol. (2008)

popsali pokles hladiny TBARS v játrech *Leporinus obtusidens* po expozici herbicidu clomazonu v koncentraci 0,5 mg.l⁻¹.

CAT je první enzym, který indikuje oxidační poškození (Jin a kol., 2010). Ve vzorcích odebraných 14. a 28. den expozice u ryb vystavených vyšším koncentracím simazinu (2 a 4 mg.l⁻¹) jsme zjistili nárůst aktivity CAT, 60. den došlo v těchto skupinách k poklesu aktivity CAT v játrech oproti kontrolní skupině. Inhibice a indukce činnosti CAT v rybách vyvolaná pesticidy byla zaznamenána v mnoha studiích (Bainy a kol., 1996; Ahmad a kol., 2004; Oruc & Usta, 2007; Ballesteros a kol., 2009; Mores a kol., 2009). Změna aktivity CAT v průběhu experimentu byla vyvolána nadměrnou produkcí nebo nedostatkem O₂, která byla způsobena oxidačním stresem vyvolaným dlouhodobou expozicí simazinem.

V jaterní tkáni jsme zjistili snížení aktivity GPx ve skupině 2 a 3 oproti kontrolní skupině. Snížení aktivity GPx souvisí s produkcí O₂ způsobenou dlouhodobou expozicí simazinu na syntézu enzymů (GSH a jeho oxidovanou formu). Ballesteros a kol. (2009) pozorovali snížení aktivity GPx v játrech *Jenynsia multidentata* vystavené endosulfanu v koncentraci 1,4 µg.l⁻¹.

Zvýšená koncentrace GSH v játrech tvoří adaptivní a ochrannou roli před oxidačním stresem vyvolaným xenobiotiky (Zhang a kol., 2004). V našem testu došlo ke zvýšení hladiny GSH v játrech kapra obecného ve všech testovaných skupinách (s výjimkou nejdelší expozice u nejvyšší koncentrace) vystavených simazinu v porovnání s kontrolní skupinou. Elia a kol. (2002) popsali zvýšení koncentrace GSH a snížení aktivity GPx v játrech slunečnice velkoploutvé (*Lepomis macrochirus*) vystavené atrazinu v koncentracích 6 a 9 mg.l⁻¹. Tyto výsledky podporují hypotézu, že triaziny způsobují oxidační stres v jaterní tkáni ryb.

V prezentovaném experimentu nedošlo ke statisticky významné změně v aktivitě enzymů SOD a GR v játrech kapra obecného po dlouhodobém působení simazinu. SOD je důležitý antioxidantní enzym inhibující reaktivní kyslíkové radikály (Zhang a kol., 2004). GR katalyzuje přeměnu oxidované formy glutathionu na GSH za účasti NADPH, čímž udržuje rovnováhu mezi jeho formami (Van der Oost a kol., 2003; Elia a kol., 2006). Při snížení aktivity GR dochází i ke snížení až k vyčerpání hladiny GSH (Zhang a kol., 2004). Je velmi obtížné předvídat antioxidantní účinky, protože aktivitu antioxidantních enzymů mohou ovlivňovat další různé faktory (množství toxické látky ve vodě, doba působení, prostředí, složení potravy, citlivost vystavených druhů) (Van der Oost a kol., 2003; Ahmad a kol., 2004; Ballesteros a kol., 2009).

SOUHRN

Studie hodnotí dlouhodobý vliv herbicidu simazinu, který je běžně zjišťován ve vodním prostředí, na biomarkery oxidačního stresu a antioxidantní biomarkery v jaterní tkáni kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Ryby byly vystaveny subletálními koncentracemi simazinu: 0,06 mg.l⁻¹ (nejvyšší koncentrace zjištěná v českých řekách), 2 mg.l⁻¹ a 4 mg.l⁻¹, po dobu 60 dní. Indexy oxidačního stresu [reaktivní kyslíkové radikály (ROS), látky reaktivní s kyselinou thio-barbiturovou (TBARS)] a antioxidantní parametry [superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion reductáza (GR), redukovaný glutathion (GSH)] byly měřeny v játrech kapra obecného, které byly odebrány z usmrcených ryb 14., 28. a 60. den experimentu. Dlouhodobá expozice ryb simazinu vedla ke zvýšené produkci ROS, která způsobila oxidační poškození lipidů, proteinů a inhibici antioxidantních systémů v játrech kapra obecného. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) byly také zjištěny v aktivitě antioxidantních biomarkerů (CAT, GPx, GSH) ve skupinách s nejvyššími koncentracemi (2 mg.l⁻¹; 4 mg.l⁻¹) po celou dobu expozice ve srovnání s kontrolní skupinou.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného centra CENAKVA č. CZ.1.05/2.1.00/01.0024, projektu USB (GAJU) č.047/2010/Z, projektu GAČR č. 525/09/P218, projektu NAZV QH82117 a projektu CZ.1.07/2.3.00/09.0203, MODUL 6.

LITERATURA

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M. A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following *in situ* harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57: 290–302.
- Bainy, A. C. D., Saito, E., Carvalho, P. S. M., Junqueira, V. B. C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, 34: 151–162.
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 199–205.
- Beers, R. F., Sizer, I. W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195: 133–140.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 250: 5475–5480.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2010. Koncentrace pesticidů v podzemních a povrchových vodách. Projekt: Výskyt a transport pesticidů v hydrosféře a nové metody optimalizace monitoringu pesticidů v hydrosféře ČR.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav) – Pasport látky simazin hydroxyl. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/oj/>, (cit. 2. 2. 2011).
- Driver, A. S., Kodavanti, P. R. S., Mundy, W. R., 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol. Teratol.*, 22: 175–181.
- Elia, A. C., Waller, W. T., Norton, S. J., 2002. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68: 809–816.
- Elia, A. C., Anastasi, V., Dorr, A. J. M., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. *Chemosphere*, 64: 1633–1641.
- European Commission, 1999. Study on the prioritisation of substances dangerous to the aquatic environment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Ferrari, A., Venturino, A., de D'Angelo, A. M. P., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88: 134–142.
- Hashimoto, Y., Nishiuchi, Y., 1981. Establishment of bioassay methods for the evaluation of acute toxicity of pesticides to aquatic organisms. *J. Pestic. Sci.*, 6, 257–264.
- Jin, Y. X., Zhang, X. X., Shu, L. J., Chen, L. F., Sun, L. W., Qian, H. F., Liu, W. P., Fu, Z. W., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78: 846–852.

- Kreutz L. C., Barcellos L. J. G., Silva T. O., Anzilierol D., Martins D., Lorenson M., Marteninghe A., da Silva L. B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciencia Rural*, 38: 1050–1055.
- Lawrence, R. A., Burk, R. F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 952–958.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, O. V., Storey, K. B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37: 1670–1680.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101: 13–30.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469–474.
- Mates, J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.*, 153: 83–104.
- Miron, D. D., Presto, A., Crestani, M., Gluszcak, L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., Morsch, V. M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, 74: 1–5.
- Modesto, K. A., Martinez, C.B.R., 2010. Effect of Roundup transorb on fish: Hematology, antioxidant defense and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781–787.
- Monteiro, D. A., de Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (*methyl parathion*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 143: 141–149.
- Moraes, B. S., Loro, V. L., Pretto, A., da Fonseca, M. B., Menezes, C., Marchesan, E., Reimche, G. B., de Avila, L. A., 2009. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pest. Biochem. Physiol.*, 95: 57–62.
- Nemcsok J., Balint T., Fazakas J., 1999. The contribution of a pyrethroid insecticide to the massive eel (*Anquilla anquilla*) devastation, Lake Balaton. *Acta Biolog. Hung.*, 50: 161–173.
- Oropesa, A. L., Cambero, J. P. G., Soler, F., 2008. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol.*, 23: 285–293.
- Oropesa, A. L., Garcia-Cambero, J. P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 27, 30–38.
- Oruc, E. O., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23: 48–55.
- Sanderson, J. T., Letcher, R. J., Heneweer, M., Giesy, J. P., van den Berg, M., 2001. Effect of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.*, 109: 1027–1031.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.*, 30: 2–12.
- Tagliari, K. C., Ferrao Vargas, V. M., Zimiani, K., Cecchini, R., 2004. Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 17: 149–157.

- Tamagno, E., Aragno, M., Boccuzzi, G., Gallo, M., Parola, S., Fubini, B., Poli, G., Danni, O., 1998. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem. Funct.*, 16: 57–63.
- Toni, C., Loro, V. L., Santi, A., de Menezes, C. C., Cattaneo, R., Clasen, B. E., Zanella, R., 2011. Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 153: 128–132.
- Toro J., Rodrigo R., 2009. Oxidative stress: Basic Overview. In: Rodrigo R, editor. *Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease*. New York: Nova Science Publishers, Inc. p. 1–24.
- Turner, L., 2003. Simazine analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. Environmental Field Branch, Office of Pesticide Programs, 31 pp.
- U.S. EPA – (Environmental protection agency), 1994. Atrazine, simazine and cyanazine: notice of initiation of special review., 59: 30–60.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57–149.
- Zhang, J. F., Shen, H., Wang, X. R., Wu, J. C., Xue, Y. Q., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55: 167–174.
- Zhang, X., Yang, F., Zhang, X., Xu, Y., Liao, T., Song, S., Wang, H., 2008. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquat. Toxicol.*, 86: 4–11.
- Zorrilla, L. M., Gibson, E. K., Stoker, T. E., 2010. The effects of simazine, a chlorotriazine herbicide, on pubertal development in the female Wistar rat. *Reprod. Toxicol.*, 29: 393–400.

ANALÝZA PŘÍČIN HAVARIJNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH VOD A NÁSLEDNÝCH ÚHYNŮ RYB V ČESKÉ REPUBLICE V OBDOBÍ 1989–2010

ANALYSIS OF SURFACE WATER ACCIDENTAL POLLUTION AND FISH KILLS IN THE CZECH REPUBLIC IN THE PERIOD 1989–2010

Z. SVOBODOVÁ¹, P. SEHONOVÁ¹, J. KAUT¹, M. PAZOUROVÁ²

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Palackého 1/3, 612 42 Brno; svobodovaz@vfu.cz

²Česká inspekce životního prostředí, Odbor ochrany vod, Na Břehu 267/1a, 190 00 Praha 9; pazourova@cizp.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to collect available data on the causes of water contamination and following fish poisoning for the period 1989–2010 and to assess the percentage of individual cases, including unexplained cases of fish poisoning. Data have been obtained from the Czech Environmental Inspectorate. In monitored period 1989–2010, 5 745 accidents happened, 977 accidents (i.e. 17 %) were associated with fish kills. Oil products were found the most common cause of accidents, their incidence in individual years ranged from 38.6 % to 55.8 % of the cases. The most common cause of fish kill were chemicals (16 %), industrial waste waters (13.23 %) and agricultural waste (12.3 %). Number of accidents in which the cause of fish kills wasn't found (348 accidents) was 35.6 %. The present study gives an overview of the status of water contamination in the years 1989–2010 with a reference to the period 1960–1988.

Klíčová slova: Ropné látky, chemické látky, průmyslové odpadní vody, zemědělské odpady, pesticidy
Keywords: Oil, chemicals, industrial waste waters, agricultural wastes, pesticides

ÚVOD

Problémy životního prostředí, jeho ochrany a tvorby se stále naléhavěji dostávají do popředí zájmu celé společnosti. Voda a organismy v ní žijící tvoří jeden ze základních komponentů životního prostředí. Havarijní znečištění povrchových vod a následný havarijní úhyn ryb patřil a dosud patří mezi nejfrekventovanější případy otrav. Největší počet případů se týká ropných havárií, při kterých většinou nedochází k úhynu ale k senzorickým změnám svaloviny ryb. Příčina havárií a následného znečištění povrchových vod je ve většině případů způsobena selháním lidského nebo technického faktoru či náhlými změnami přírodních podmínek.

V současné době provádí evidenci havárií na povrchových vodách Česká inspekce životního prostředí, na jejichž výsledcích je založena předložená práce.

Cílem předkládané práce bylo shromáždit a analyzovat dostupné údaje o počtu a příčinách havarijní kontaminace povrchových vod a následných otrav ryb za období 1989–2010.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

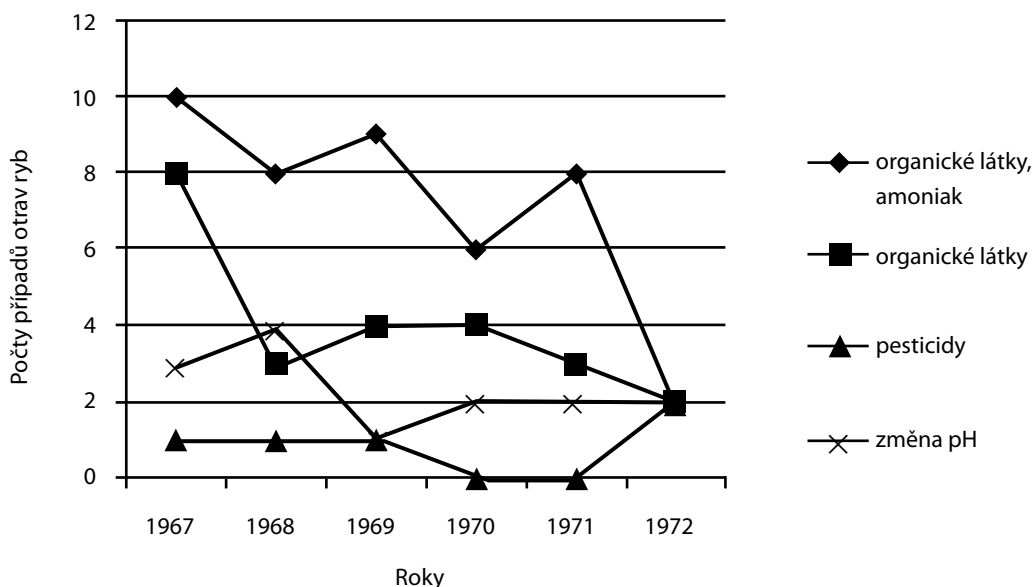
V období před rokem 1989 bylo rovněž prováděno sledování počtu havarijních znečištění povrchových vod, a to hlavně se zaměřením na příčiny úhynů ryb. Diagnostiku otrav ryb prováděl Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický (VÚRH) ve Vodňanech a na svých pracovištích v Praze, Ostravě, Hodoníně a v Bratislavě.

Od roku 1972 byly do diagnostiky otrav zapojeny Státní veterinární ústavy (SVÚ), a to především SVÚ v Českých Budějovicích, který byl specializován na diagnostiku nemocí a otrav ryb. Pracovníci VÚRH Vodňany a SVÚ České Budějovice analyzovali případy úhynů ryb v období 1960–1984. Vejvoda a Winkler (1964) uvádějí, že na území Jihočeského kraje byly v letech 1960–1962 otravy ryb způsobeny ve většině případů močůvkou nebo silážními šťávami, pesticidními postřiky a potravinářským průmyslem.

V letech 1967–1972 bylo zaznamenáno celkem 126 případů otrav ryb. Nejvíce otrav bylo způsobeno organickými látkami a amoniakem s podílem 34 %. Samostatné organické látky způsobily úhyn ryb v 19,05 %. Změna pH vody způsobila úhyn v 11 % otrav a pesticidy v 3,97 % (obr. 1). V 6,35 % případů byl úhyn ryb způsoben volným chlórem a v 3,97 % případů ropnými látkami (obr. 1). V období 1967–1972 byly zaznamenány i otravy kyanidy a fenoly (Svobodová a Kocová, 1973).

Obr. 1. Příčiny otrav ryb v letech 1967–1972 (Svobodová a Kocová, 1973).

Fig. 1. Causes of fish poisoning in 1967–1972 (Svobodová a Kocová, 1973).



V období 1972–1978 bylo diagnostikováno 267 otrav. Nejčastější příčinou otrav, jak je patrné z tab. 1, byla močůvka (36,33 %), následují silážní šťávy (14,23 %), pesticidní látky (19,48 %), ropné látky (16,10 %), odpadní vody (11,61 %) a saponáty (2,28 %) (Červinka a Freundová, 1979).

Tab. 1. Počty a příčiny otrav ryb v letech 1972–1978 (ČERVINKA a FREUNDOVÁ, 1979).

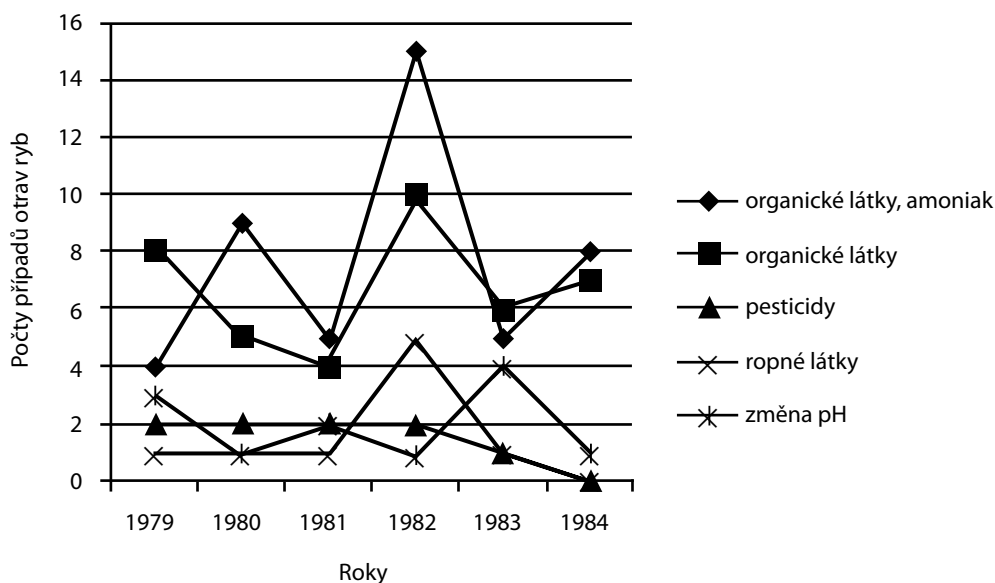
Tab. 1. The numbers and causes of fish poisoning in 1972–1978 (ČERVINKA a FREUNDOVÁ, 1979).

	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978
Močůvka a fekálie	10	4	40	12	11	3	17
Odpadní vody	3	3	7	5	5	2	6
Pesticidy	5	6	28	8	4	1	-
Ropné látky	6	1	4	15	4	3	10
Saponáty	-	-	-	6	-	-	-
Silážní šťávy	-	1	2	8	18	3	6

Z údajů za roky 1979–1984, uvedených v obr. 2, vyplývá, že nejčastější příčinou havarijního úhynu ryb byly organické látky měřené společně s amoniakem s počtem 48 případů, což představuje 30,77 % otrav, častým problémem byly i samotné organické látky s počtem 40 případů (25,64 %), změna pH s počtem 12 případů (7,7 %) a pesticidní látky s počtem 9 případů (5,8 %). V uvedeném období byly zaznamenány i otravy ropnými látkami (5,8 %) a kyanidy (SVOBODOVÁ a kol., 1985).

Obr. 2. Počty a příčiny otrav v letech 1979–1984 (SVOBODOVÁ a kol., 1985).

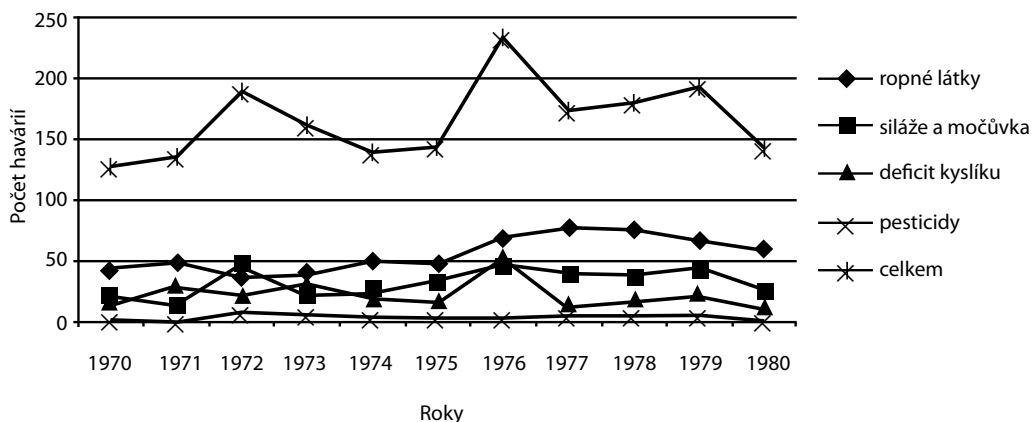
Fig. 2. The numbers and causes of fish poisoning in 1979–1984 (SVOBODOVÁ a kol., 1985).



Podle údajů Státní vodohospodářské inspekce (VUČKA a kol., 1984) došlo v průběhu let 1970–1980 k 1 820 případům havarijního znečištění povrchových vod, z čehož 840 havárií bylo doprovázeno úhynem ryb. V obr. 3 je uveden rozbor jednotlivých znečišťujících látek. Z obrázku vyplývá výrazná převaha havárií způsobených ropou a ropnými látkami. Za nimi v četnosti následují zemědělské odpady a organické hnilobné látky způsobující deficit kyslíku.

Obr. 3. Rozdělení havárií na povrchových vodách 1970–1980 (VUČKA a kol., 1984).

Fig. 3. The distribution of accidents in surface waters 1970–1980 (VUČKA a kol., 1984).



V roce 1985 došlo celkem k 168 haváriím na povrchových vodách, z toho bylo 64 % ropných havárií, 38 % bylo zapříčiněno zemědělskou výrobní činností (Výroční zpráva ČVI, 1985). V roce 1986 došlo k 166 haváriím na povrchových vodách, nejpočetnější skupinou z hlediska znečišťujících látek byly ropné látky 63 %. Ze zemědělské výrobní činnosti došlo v tomto roce k 21 % případům havarijního znečištění vod (Výroční zpráva ČVI, 1986).

V roce 1987 bylo evidováno 500 případů havarijního znečištění. Náhlé zvýšení počtu evidovaných havárií nebylo způsobeno vyšším počtem havárií, došlo především ke zdokonalení protihavarijní služby, tím došlo k reálnějšímu zaznamenání počtu nehod než v minulých letech. Bilance roku 1987 zobrazuje věrohodněji skutečný stav havarijního znečištění vod než v minulých letech. Nejpočetnější skupinou z hlediska znečišťujících látek byla ropa a ropné produkty, které zapříčinily 49 % havárií. Zemědělství způsobilo 24 % havárií na povrchových vodách (Výroční zpráva ČVI, 1987). V roce 1988 bylo na povrchových vodách evidováno 481 havárií. Nejvyšší podíl havárií z hlediska znečišťujících látek byl stejně jako v minulých letech zastoupen ropnými látkami (66 %), následují chemické látky (18 %), zemědělské odpady (12 %), odpadní vody průmyslové (10 %). Příčina havárie nebyla zjištěna v 9 % případů (Výroční zpráva ČVI, 1988).

MATERIÁL A METODIKA

Údaje o příčinách a počtu havárií na povrchových vodách spojené s úhynem ryb za období 1989–2010 byly získány z materiálů České inspekce životního prostředí.

Informace o kontaminaci povrchových vod a následného úhynu ryb zapříčiněného pesticidy byly získány na Ministerstvu zemědělství ČR. Jedná se o údaje za období 1999–2010.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Příčiny a počty havarijních znečištění povrchových vod v České republice za období 1989–2010 jsou uvedeny v tab. 2a, 2b a na obr. 4. Celkem za toto 22leté období zaznamenala Česká inspekce životního prostředí 5 745 havárií. K největšímu počtu havarijní kontaminace povrchových vod došlo v roce 1989 (654 havárií). Poté následoval postupný, ale velmi výrazný pokles počtu havárií, nejnižší počet případů byl registrován v roce 1999 (82 havárií). Tento výrazný pokles celkového počtu havárií nastal poklesem především ropných havárií. V období 1989–1993 došlo k ukončení činnosti řady průmyslových podniků a také podniků zemědělské velkovýroby. V období let 2002–2003 došlo ke zvýšení počtu havarijních případů pravděpodobně v důsledku rozsáhlých záplav v roce 2002. Tento nárůst vrcholil v roce 2003, kdy došlo k 316 haváriím. Od tohoto roku dochází k postupnému snížení počtu havárií tak, že v posledním sledovaném roce 2010 bylo zaznamenáno pouze 92 havarijních případů na povrchových vodách.

Pokud jde o příčiny havárií na povrchových vodách ČR, tak po celé sledované období 1989–2010 jsou na prvním místě ropné látky. Ropné látky zapříčínují zhruba 50 % havárií na povrchových vodách, procentuální zastoupení se pohybuje od 38,6 % v roce 2000 až 55,8 % v roce 2007. Přehled celkového počtu havárií a podíl havárií zapříčiněných ropnými látkami je na obr. 5. Další v pořadí příčin jsou chemické látky, které způsobují zhruba 13,5 % havárií na povrchových vodách (4,5 % v roce 2009 – 20 % v roce 1991). Následují odpadní vody průmyslové (zhruba 10 %) a zemědělské odpady (zhruba 6,3 %).

Mezi zemědělské odpady patří např. silážní šťávy, močůvka, splachy průmyslových hnojiv z pozemků. Chemické složení průmyslových odpadních vod je závislé na druhu a technologii výroby a na možnosti jejich čištění. Odpadní vody obsahují různé toxické anorganické nebo organické látky, které buď z výroby unikly, nebo jsou vedlejšími produkty příslušné výroby (SVOBODOVÁ a kol., 1987).

Příčina havarijního znečištění povrchových vod nebyla zjištěna zhruba u 10 % případů. Nejvíce nezjištěných případů bylo v období po rozsáhlých záplavách tj. 2003 (17,4 % případů) a 2004 (19,9 % případů).

Příčiny a počty havárií na povrchových vodách spojených s úhynem ryb za období 1989–2010 jsou uvedeny v tab. 3a, 3b a na obr. 4. Z celkového počtu 5 745 havarijního znečištění povrchových vod ČR za období 1989–2010 bylo 977 havárií doprovázeno úhynem ryb, což představuje zhruba 17 %. Znázorněný průběh počtu havárií spojených s úhynem ryb v podstatě kopíruje průběh počtu havarijních kontaminací na povrchových vodách. To znamená, že nejvyšší počet případů úhynů ryb byl zaznamenán v letech 1989 (111 případů) a 1990 (116 případů), nejnižší počet případů úhynů ryb byl registrován v roce 1999 (16 případů) a 2010 (14 případů). Rovněž v roce 2003, tj. v období po rozsáhlých záplavách, byl zjištěn zvýšený počet případů úhynů ryb (78 případů), naproti tomu při vyšetřování havárií spojených s úhynem ryb nebyla zjištěna příčina úhynu v daleko větším počtu případů (35,6 %) ve srovnání s nezjištěnými příčinami u havarijního znečištění (10 %). Příčinou tak vysokého počtu neobjasněných případů úhynů ryb je pozdní a neodborný odběr vzorků.

Poměr celkových případů úhynů ryb a případů s nezjištěnou příčinou za období 1989–2010 je znázorněn na obr. 6.

Pokud jde o příčiny havarijních úhynů ryb za období 1989–2010, jsou to na prvním místě chemické látky vyjma ropných (16 %). Další významnou příčinou jsou průmyslové odpadní vody, které způsobily úhyn ryb v 13,3 % případů, zemědělské odpadní vody ve 12,3 % případů. Počty případů úhynů ryb v důsledku kontaminace průmyslovými odpadními vodami a zemědělskými odpady a jejich porovnání s celkovými počty případů úhynů v průběhu

sledovaného období jsou uvedeny na obr. 7. Ropné látky se v průběhu 1989–2010 podílely na úhynu ryb zhruba 4,3 %. Nejvyšší zastoupení ropných látek jako příčiny úhynu ryb bylo v roce 1993, kdy z celkového počtu úhynů (28 případů) bylo 14,3 % zapříčiněno ropou. Vyšší podíl ropných látek na úhynech ryb byl zaznamenán i v roce 2003 (7,7 %), tj. v období po rozsáhlých povodních. Naopak v roce 1990, 1998, 1999 a 2002 nebyly ropné látky příčinou úhynu ryb. Ropné látky jsou častou příčinou kontaminace vodního prostředí, ale nejsou obvyklým důvodem úhynu ryb. Ryby však poškozují senzorycky (Svobodová a kol., 2008).

Mimořádná pozornost byla a stále je věnována problematice kontaminace vod pesticidy. Od roku 1999 provádí Ministerstvo zemědělství ČR sledování negativních vlivů pesticidů na necílové organismy a zhodnocení příčin úhynu těchto organismů při porušení § 51 odst. 3 zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a změně některých souvisejících zákonů. Mezi necílové organismy jsou zařazeny i ryby. Každoročně jsou zpracovány údaje zjištěné v dotazníku vyplněném Státními veterinárními ústavu v Českých Budějovicích, Hradci Králové, Jihlavě, Olomouci, Praze a Výzkumným ústavem rybářským a hydrobiologickým, nyní Fakulta rybářství a ochrany vod JU ve Vodňanech. V celém sledovaném období (1999–2010) nebyl diagnostikován ani jeden případ náhlého úhynu ryb v důsledku působení pesticidů. Pro srovnání uvádíme, že nejvyšší počet případů akutních úhynů ryb v důsledku otrav pesticidy byl diagnostikován v období let 1972–1984. Nejčastější příčinou diagnostikovaných otrav byly insekticidy (Červinka a Freundová, 1979; Svobodová a kol., 1985). I když v posledním období nejsou zaznamenávány případy havarijního úhynu ryb v důsledku kontaminace povrchových vod pesticidy, problematika pesticidů ve vodním prostředí je stále aktuální. Celá řada účinných látek pesticidů totiž dlouhodobě přetrvává v povrchových a podzemních vodách. I když koncentrace jednotlivých látek nedosahují nebezpečných hodnot (Kodeš a kol., 2010), je zde možnost a riziko synergistických účinků.

Tab. 2a. Příčiny a počty havárií na povrchových vodách v letech 1989–1999.**Tab. 2a.** The numbers and causes of accidents in surface waters in 1989–1999.

	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Chemické látky	94	92	100	78	35	42	38	31	32	28	13
Chlor. uhlovodíky	0	0	0	0	15	9	8	4	5	5	2
Kyslíkový deficit	14	16	6	18	1	3	3	0	0	1	1
Kaly	4	1	2	0	15	8	13	12	9	5	0
Nezjištěna	46	38	22	20	19	15	12	19	17	19	9
Odpadní vody prům.	80	72	48	28	13	13	13	15	14	26	5
Ostatní látky	12	14	7	10	6	7	0	1	3	6	1
Potravinářství	12	10	7	4	8	6	4	5	0	1	2
Ropné látky	312	311	260	243	127	104	134	110	76	96	45
Zemědělské odpady	80	44	48	14	19	12	18	28	5	17	4
Celkem	654	598	500	415	258	219	243	225	161	204	82

Tab. 2b. Příčiny a počty havárií na povrchových vodách v letech 2000–2010.**Tab. 2b.** The numbers and causes of accidents in surface waters in 2000–2010.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Chemické látky	32	21	22	27	31	25	29	14	16	5	7
Chlor. uhlovodíky	10	4	3	1	2	3	0	1	1	1	0
Kyslíkový deficit	1	2	5	5	3	2	2	0	1	3	0
Kaly	12	8	14	14	9	11	7	6	4	6	3
Nezjištěna	9	19	36	55	61	43	21	25	23	17	13
Odpadní vody prům.	21	17	21	40	33	33	20	18	18	23	13
Ostatní látky	1	9	7	10	10	3	10	6	1	2	4
Potravinářství	1	6	3	11	9	6	1	4	1	3	1
Ropné látky	64	67	121	138	140	135	101	101	63	46	45
Zemědělské odpady	15	10	14	15	8	3	14	6	8	5	6
Celkem	166	163	246	316	306	264	205	181	136	111	92

Tab. 3a. Příčiny a počty havárií na povrchových vodách spojených s úhynem ryb v letech 1989–1999.**Tab. 3a.** The numbers and causes of accidents in surface waters associated with fish kills in 1989–1999.

	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Chemické látky	12	16	20	16	5	5	2	4	7	10	3
Chlor. uhlovodíky	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Kyslíkový deficit	13	16	6	18	0	3	1	0	0	1	1
Kaly	4	1	1	0	0	2	3	3	1	1	0
Nezjištěna	40	33	19	19	11	3	5	15	12	15	9
Odpadní vody prům.	19	23	15	14	1	4	0	4	3	10	1
Ostatní látky	3	5	2	1	2	1	0	0	2	5	1
Potravinářství	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ropné látky	1	0	2	1	4	3	1	2	1	0	0
Zemědělské odpady	19	21	12	1	4	4	4	6	2	6	1
Celkem	111	116	77	70	28	25	17	34	28	48	16

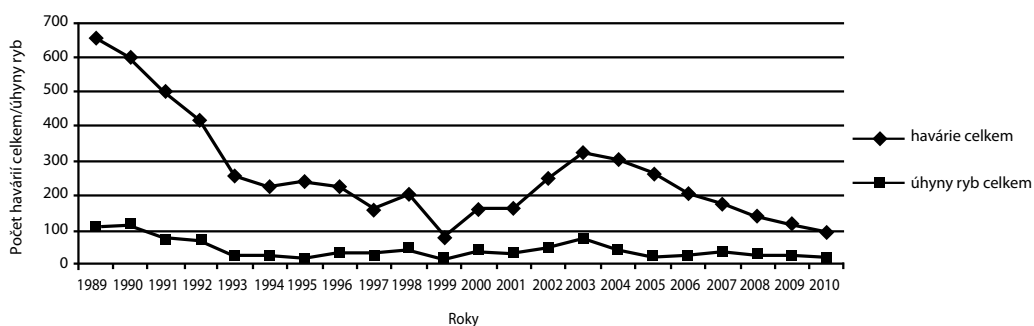
Tab. 3b. Příčiny a počty havárií na povrchových vodách spojených s úhynem ryb v letech 2000–2010.

Tab. 3b. The numbers and causes of accidents in surface waters associated with fish kills in 2000–2010.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Chemické látky	10	4	8	7	3	6	5	6	7	1	1
Chlor. uhlovodíky	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Kyslíkový deficit	1	2	5	5	1	2	2	0	1	3	0
Kaly	5	3	7	6	1	0	0	1	1	3	0
Nezjištěna	8	14	21	31	24	12	11	17	11	11	7
Odpadní vody prům.	7	3	5	14	5	1	3	4	6	6	2
Ostatní látky	0	3	0	3	0	0	3	1	0	0	1
Potravinářství	0	0	0	2	1	1	0	0	0	1	0
Ropné látky	2	1	0	6	2	1	1	2	1	1	1
Zemědělské odpady	5	3	3	4	4	2	4	6	4	4	2
Celkem	39	33	49	78	41	25	29	37	32	30	14

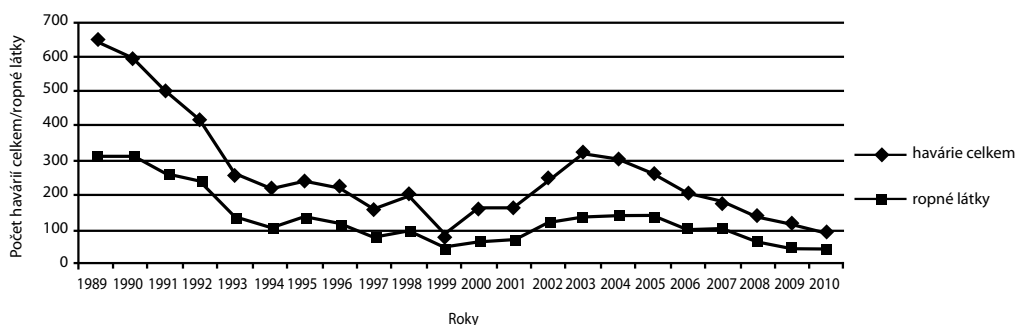
Obr. 4. Celkový počet havárií na povrchových vodách a havárií spojených s úhynem ryb v letech 1989–2010.

Fig. 4. Total numbers of accidents in surface waters and accidents associated with fish kills in 1989–2010.



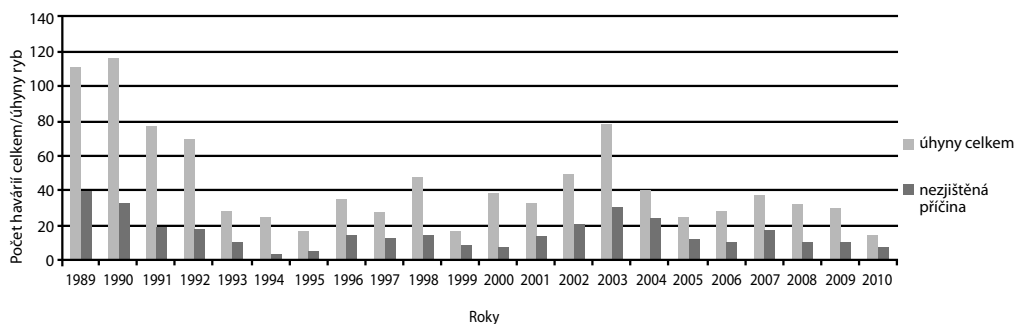
Obr. 5. Počet havárií celkem a havárie zapříčiněné ropnými látkami (1989–2010).

Fig. 5. Total numbers of accidents and accidents caused by oil products (1989–2010).



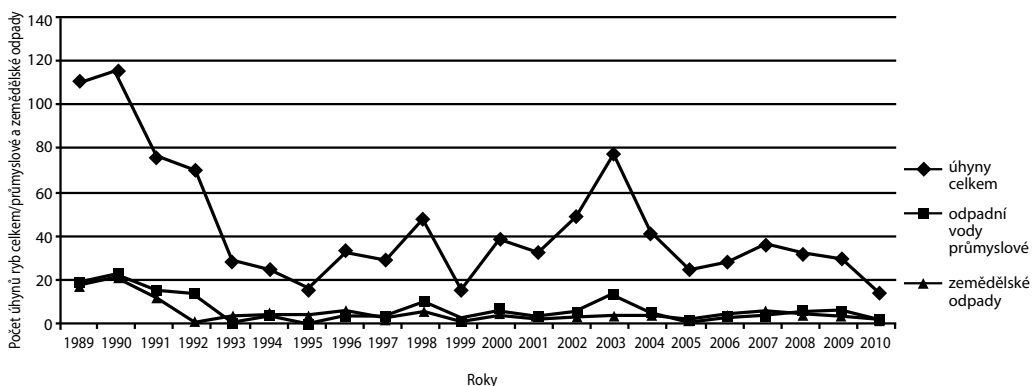
Obr. 6. Poměr celkového počtu úhynů ryb a úhynů s nezjištěnými příčinami (1989–2010).

Fig. 6. The ratio of the total numbers of fish kills and kills with unidentified causes (1989–2010).



Obr. 7. Počet případů úhynů ryb celkem a úhyny ryb zapříčiněné průmyslovými odpadními vodami, úhyny zapříčiněné zemědělskými odpady (1989–2010).

Fig. 7. The numbers of causes connected with fish mortality and fish mortality caused by industrial waste waters, kills caused by agricultural waste (1989–2010).



SOUHRN

Z analýzy příčin havarijního úhynu ryb vyplývá, že za období let 1989–2010 byl nejkritičtější rok 1989, kdy došlo k 654 haváriím z celkového počtu 5 745 havárií, v posledním roce přehledu, roce 2010 se stalo 92 havárií. Nejnižší počet havárií za sledované období se stal v roce 1999, kdy došlo k 82 haváriím.

Z celkového počtu 5745 havárií bylo 977 havárií doprovázeno úhynem ryb, což je 17 %. Počet havárií, kdy nebyla zjištěna příčina úhynu ryb (348 havárií), představuje 35,62 %.

Ropné látky jsou častou příčinou kontaminace vodního prostředí, ale nejsou frekventovanou příčinou úhynů ryb, dochází hlavně ke změně sensorických vlastností svaloviny. Procentuální zastoupení havárií způsobených ropnými látkami se v jednotlivých letech 1989–2010 pohybovalo od 38,6 % až do 55,8 %, ale pouze ve 3,4 % případů došlo k úhynu ryb.

Významnou příčinou havarijních úhynů ryb za období 1989–2010 byly chemické látky (16 %), dále průmyslové odpadní vody (13,3 %), zemědělské odpady (12,3 %).

Mimořádná pozornost byla věnována pesticidům jako případně možným příčinám havarijního úhynu ryb. Podle údajů MZe ČR nebyl v období 1999–2010 diagnostikován náhlý úhyn ryb v důsledku působení pesticidů. Problematika pesticidů ve vodním prostředí je stále aktuální, neboť řada účinných látek dlouhodobě přetrvává v povrchových a podzemních vodách.

Při haváriích je ohroženo životní prostředí a následky úniku cizorodých látek do životního prostředí mohou způsobit přírodě škody na desítky let, při haváriích mohou být zasaženy i zdroje podzemní vody.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla s podporou výzkumného záměru MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

LITERATURA

- Červinka, S., Freundová, A., 1979. Diagnostika intoxikací ryb ve SVÚ v Českých Budějovicích v letech 1972–1978. Kvalita vody a rybářství. Vodňany, ČSVTS, 228–233.
- Kodeš, V., Vejvodová, J., Kollerová, M., 2010. Screening pesticidů v hydrosféře ČR. In: Hydrobiologické dny 2010, Voda v měnícím se prostředí. Český hydrometeorologický ústav, Hradec Králové: 193–198.
- Česká vodohospodářská inspekce, 1985. Výroční zpráva, Praha.
- Česká vodohospodářská inspekce, 1986. Výroční zpráva, Praha.
- Česká vodohospodářská inspekce, 1987. Výroční zpráva, Praha.
- Česká vodohospodářská inspekce, 1988. Výroční zpráva, Praha.
- Svobodová, Z., Kocová, A., 1973. Diagnostika intoxikací ryb ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech v letech 1967–1972. Bulletin VÚRH Vodňany, 9(4): 24–28.
- Svobodová, Z., Freundová, A., Kocová, A., 1985. Diagnostika intoxikací ryb ve VÚRH Vodňany a SVÚ České Budějovice v období 1979–1984. Bulletin VÚRH Vodňany, 9(4): 23–30.
- Svobodová, Z. a kol., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Praha, SZN, 231 s.
- Svobodová, Z. a kol., 2008. Veterinární toxikologie v klinické praxi. Praha, Profi Press, 253 s.
- Vejvoda, M., Winkler, O., 1964. Evidence zdrojů znečištění toků a přehled o otravách ryb v Jihočeském kraji (1960–1962). Práce VÚRH Vodňany, 4: 144–159.
- Vučka, V. a kol., 1984. Havarijní stavy v čistotě vod. Praha, SZN, 208 s.

JEDNODUCHÁ METODA STANOVENÍ SOUHRNU ORGANICKÝCH FOREM RTUTI V SEDIMENTECH

SIMPLE METHOD FOR DETERMINATION OF TOTAL ORGANIC FORMS OF MERCURY IN SEDIMENT

J. TUMOVÁ, J. ŠVEHLA

Katedra aplikované chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, České Budějovice 370 05, jitulele@seznam.cz, svehla@zfjcu.cz

ABSTRACT

In the paper have been tested two extraction techniques for isolation of organic forms of mercury from sediments (liquid-liquid extraction and extraction with use of special selective ionic exchange) followed by determination all organic forms of mercury by atomic absorption spectrometer AMA-254. It has been achieved great results during both methods of extraction. Reached percents of orgHg were in accordance with certified reference material for sediments CRM-580 and corresponded to $92,92 \pm 17,88 \%$, resp. $92,98 \pm 31,42 \%$. Due to a simple procedure, extraction speed and ease of determination of organic forms of mercury contain was method with use of selective ion exchanger applied to a number of real sediment samples collected from fishpond Jordan in Tabor city and reservoir Skalka on Ohre river at the town Cheb. It was approved that this method with selective ion exchanger has been presenting a suitable alternative for total organic mercury determination in soils and sediments to chromatographic or electro-migration methods.

Klíčová slova: rtuť, methylrtuť, sediment, ionex, extrakce, speciace, AMA-254

Keywords: mercury, methylmercury, sediment, ionex, extraction, speciation, AMA-254

ÚVOD

Stopové prvky hrají v živé hmotě významnou roli. Některé prvky jsou pro zajištění biologických funkcí organismu nepostradatelné, tedy esenciální, jiné mohou být pro různé druhy organismů toxické. Zda je prvek pro organismus přínosem nebo zátěží se značně odvíjí od jeho koncentrace a konkrétní chemické specie, ve které je prvek v systému přítomen. Proto je důležité pohlížet na prvek nejen jako na celek, ale jako na individuum tvořené několika různými speciemi. Pozornost je třeba také věnovat interakcím konkrétních prvků v různých typech prostředí, protože jednotlivé prvky mohou v reálných biologických matricích a v matricích půd a sedimentů reagovat s přítomnými anorganickými a organickými složkami a mohou přecházet v různé fyzikálně-chemické formy. V současné době dochází ke stále většímu rozvoji studia jednotlivých forem minerálních látek a stopových prvků v biologických materiálech a v materiálech nebiologických (půdách a sedimentech) tvořících nedílnou součást životního prostředí. Je zřejmé, že nestačí znát pouze celkový obsah přítomného prvku v matrici, ale je potřebné také znát zastoupení jeho jednotlivých forem a jejich koncentrace. Touto problematikou se hlouběji zabývá speciální analýza.

Zjištění, že v environmentálních a biologických vzorcích mohou být přítomny různé chemické specie prvků, které mohou vykazovat různý stupeň toxicity, bylo významným podnětem k rozvoji speciální analýzy prvků. Článek je zaměřen na problematiku specií rtuti v sedimentech a půdách, přičemž důraz je kladen na organické specie rtuti, které působí toxicky na všechny živé organismy.

Cíle článku spočívají v představení extrakční techniky využívající selektivní iontoměnič a v jejím porovnání s klasickým extrakčním postupem pro získání organických forem Hg ze sedimentů popsaným Maggim a kol. (2009). Klasickým extrakčním postupem rozumíme jednu z mnoha modifikací postupu pro získání organických forem Hg primárně navrženého Westööm (1966; 1967) v 60. letech 20. století.

K dosažení cílů byl navržen úsporný postup nepřímého stanovení specií rtuti, tj. stanovení celkové rtuti v původním vzorku a následně v selektivním extraktu, do kterého přejdou jen organické formy rtuti.

MATERIÁL A METODIKA

PŘÍSTROJE

Stanovení jak celkové rtuti (T-Hg), tak sumy organických forem rtuti (orgHg) bylo provedeno jednouúčelovým atomovým absorpčním spektrometrem AMA-254 (Altec, Praha, ČR). Zmražený vzorek byl nejprve podroben lyofilizaci v lyofilizátoru (ALPHA 1-4 LD, Christ, Osterode am Harz, Německo). V extrakčním kroku byla použita třepačka (LT2, Kavalier, Votice, ČR) a centrifuga (Sigma 2–5, typ 202/1, rotor 11030, ČR). Pro navážky vzorku byly použity analytické váhy (412–12, max. 120 g, KERN 770, Německo) s přesností vážení na čtyři desetinná místa.

CHEMIKÁLIE

Pro extrakci vzorků v systému kapalina-kapalina byly použity následující chemikálie: kyselina chlorovodíková (30%, ultrapur), toluen (p.a.) – obojí od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a 1% (v/w) roztok L-cysteinu, který byl připravován vždy čerstvý rozpuštěním 1 g monohydrátu chloridu L-cysteinu s 12,5 g bezvodého síranu sodného (suprapur) a s 0,775 g octanu sodného (suprapur), taktéž od firmy Merck (Darmstadt, Německo) ve 100 ml Milli-Q vody ze zařízení Millipore a s měrným odporem $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Pro extrakci vzorků za pomoci selektivního iontoměniče byla použita kyselina chlorovodíková (viz výše), Milli-Q voda a selektivní iontoměnič AMBERSEPTM GT 74 (Dov Chemical Company, Francie).

Pro ověření správnosti extrakčního postupu byl použit certifikovaný referenční materiál BCR RM-580 (sediment, dodavatel 2-Theta ASE, Český Těšín, ČR) s deklarovanými obsahy celkové rtuti (T-Hg) $132 \pm 3 \text{ mg.kg}^{-1}$ a methylrtuti (jako CH₃Hg⁺) $75,5 \pm 3,7 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$.

STANOVENÍ SUMY ORGANICKÝCH FOREM RTUTI

EXTRAKCE VZORKŮ V SYSTÉMU KAPALINA-KAPALINA (LLE)

Jedná se o klasický typ extrakce původně navržený Westööm (1966; 1967) pro extrakce organické Hg z biologických materiálů, který je v současné době používán v mnoha modifikacích (Maggi a kol., 2009; Nguyen a kol., 2009; Nevado a kol., 2008; Canário a kol., 2007; Rivaro a kol., 2007; Tomiyasu a kol., 2006; Gaona a Valiente, 2003; Bloom a kol., 1997; Vazquez a kol., 1997).

K extrakci byla použita modifikovaná metoda pro stanovení MeHg navržená Maggim a kol. (2009). Minimálně 3× byl navážen cca 1 g standardního referenčního materiálu CRM-580. Každý vzorek byl nasypan do 50 ml polypropylenové kyvety se šroubovacím uzávěrem a byl hydrolýzován 6 mol.l⁻¹ HCl o objemu 10 ml. Ke každým třem vzorkům bylo přiřazeno jedno slepé stanovení (blank). Vzorky včetně blanku byly ponechány 5 min. na třepačce a dále 10 min. centrifugovány v odstředivce při 2 400 rpm. Následně z nich byl oddělen supernatant dekantací a potom zfiltrován na GF/C filtru (Whatman, Velká Británie).

Do materiálu upraveného kyselým loužením bylo přidáno 20 ml toluenu a vzorky včetně blanku byly opět třepány (20 min) a centrifugovány (20 min při 2 400 rpm). Toluénová organická vrstva byla poté soustředěna do čisté 50 ml polyethylenové vzorkovnice. Procedura s extrakcí do toluenu byla následně ještě jednou zopakována, ale jen s 15 ml toluenu.

Spojené organické extrakty byly vystaveny dvojité zpětné extrakci s 6 ml 1% vodného roztoku L-cysteinu. Aby se zvýšil výtěžek orgHg, byl toluénový extrakt po první zpětné extrakci L-cysteinem znovu 20 minut třepán a 10 minut centrifugován při 2 400 rpm. Cysteinová fáze byla použita pro stanovení sumy orgHg atomovým absorpčním spektrometrem.

EXTRAKCE VZORKŮ S POUŽITÍM SELEKTIVNÍHO IONEXU

Pro stanovení sumy orgHg byl použit obdobný postup jaký použil Delgado a kol. (2007). Do polyethylenových vzorkovnic bylo naváženo po 1 g sedimentu (s přesností na 4 desetinná místa) CRM-580 a cca po 5 g aktivovaného iontoměniče. Na rozdíl od výše citovaného autora byl použit jiný typ iontoměniče, a to AMBERSEPTM GT 74, protože původní doporučený Dowex M-41 se již nevyrábí. Dále bylo do polyethylenových vzorkovnic přidáno po 10 ml 2 mol.l⁻¹ HCl. Ke každé sadě vzorků byl opět zhotoven jeden blank. Upravené vzorky včetně blanku byly 5 minut třepány na třepačce a poté 10 minut centrifugovány v odstředivce při 2 400 rpm. Nakonec byl extrakt zfiltrován a filtrát byl připraven ke změření na přístroji AMA-254.

VÝSLEDKY

EXTRAKCE V SYSTÉMU KAPALINA-KAPALINA

Získaný cysteinový extrakt, který obsahoval pouze organické formy rtuti, byl změřen na přístroji AMA-254. Na lodičku se manuálně pipetou nanoslo 50 µl cysteinového extraktu a časy sušení, rozkladu a vypuzování vzorku byly nastaveny na 35, 120 a 45 s. Hodnoty Hg byly stanoveny i v ostatních frakcích a zároveň byly zvoleny optimální podmínky dávkovaného množství (10 µl pro HCl frakci, 30 µl pro toluénovou frakci a 50 µl pro cysteinovou frakci) a časů sušení, rozkladů a vypuzování vzorku pro jednotlivé frakce (vodné frakce – 35, 120 a 45 s, organická frakce 60, 150 a 45 s).

Největší problém představovala optimalizace času sušení, rozkladu a vypuzování vzorku pro toluénovou frakci. Tato frakce byla značně těkavá a při nesprávně zvolených časech by mohla vyvolat explozi uvnitř analyzátoru a tím poškodit spalovací trubici. Toto riziko bylo eliminováno prodloužením doby sušení a rozkladu na 150 s. Protože se toluénová fáze velice rychle odpařovala, před nadávkováním vzorku bylo třeba počkat, dokud lodička nevychladla na laboratorní teplotu. Také se osvědčilo použití zeolitu (lze použít i mořský písek), který byl schopný toluénovou frakci adsorbovat do sebe a tím ještě více zpomalit její odpařování na dostatečně dlouhou dobu. Další problém při použití toluenu spočíval v jeho relativně vysokém obsahu rtuti, a proto bylo nutné před vlastní analýzou provést jeho re-distilaci.

Problém se vyskytl i při analyzování cysteinové frakce. Na dně zkumavek se téměř okamžitě začala tvořit bílá sraženina, která musela být těsně před analýzou na AMA-254 rozpouštěna

v ultrazvukové vodní lázni. Sraženina byla zřejmě příčinou vysokého rozptylu naměřených hodnot. Díky nestabilitě cysteinového extraktu bylo vyžadováno okamžité stanovení orgHg v této frakci.

Správnost stanovení byla testována na certifikovaném referenčním materiálu pro sedimenty CRM-580 s certifikovanou hodnotou methylrtuti (jako CH_3Hg^+) $75,5 \pm 3,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Byly provedeny celkem tři opakování pro CRM-580. Návratnost orgHg se pohybovala kolem $69,7 \pm 13,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$, což odpovídá cca 92% shodě s CRM. Z hlediska shody je výsledek přijatelný, nebyla-li překročena hraniční hodnota diference 20 %. Hodnota z-skóre vypočítaná dle ASLAB odpovídala -2,72, což je považováno za výsledek sporný kvůli značnému rozptylu. Za nevyhovující výsledek je považován takový, který se nachází mimo interval od $< -3; +3 >$, vyhovující výsledek pak leží v intervalu $< -2; +2 >$ (Bučková a kol., 2007).

Detekční limit vypočítaný jako trojnásobek směrodatné odchylky všech blanků cysteinové fáze pro dávkování 50 μl , při použití časů sušení, rozkladu a vypuzování vzorku 35, 120 a 45 s, odpovídal hodnotě $15,59 \text{ ng.ml}^{-1}$, mez stanovení vypočítaná jako desetinásobek směrodatné odchylky všech blanků odpovídala hodnotě $51,97 \text{ ng.ml}^{-1}$.

Nakonec byla tato extrakční technika použita také pro stanovení organické rtuti v reálných vzorcích sedimentů odebraných z nádrže Skalka (Tumová, 2011).

EXTRAKCE S POUŽITÍM IONTOMĚNIČE

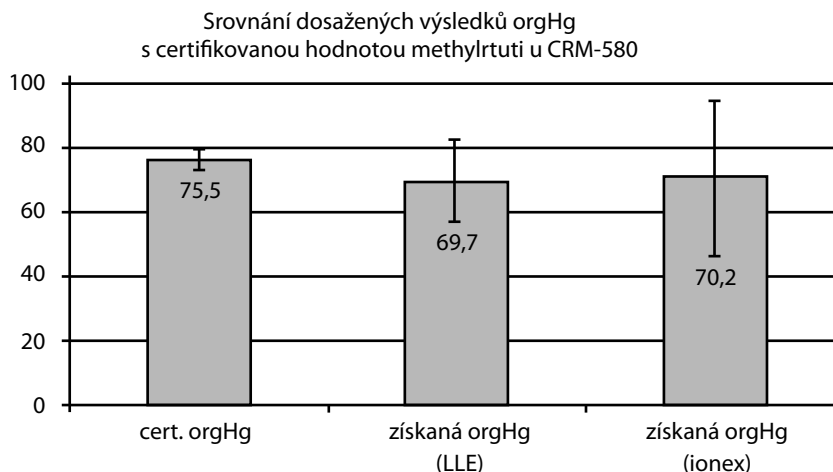
Extrakce s použitím iontoměniče byla testována na blanku se 3 opakováními pro certifikovaný sediment CRM-580 s certifikovanou hodnotou methylrtuti ve formě MeHg^+ $= 75,5 \pm 3,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Návratnost pro CRM-580 se pohybovala kolem $70,2 \pm 24,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, tedy kolem 93 %. Výsledek je vyhovující z hlediska % shody, ale hodnota Z-skóre vypočítaná dle ASLAB odpovídá -2,70, a dle toho je výsledek považován opět za sporný (Bučková a kol., 2007).

Detekční limit vypočítaný jako trojnásobek směrodatné odchylky všech blanků při použití časů sušení, rozkladu a vypuzování vzorku 60, 120 a 45 s, odpovídal hodnotě $2,98 \text{ ng.ml}^{-1}$, mez stanovení vypočítaná jako desetinásobek směrodatné odchylky všech blanků odpovídala hodnotě $9,94 \text{ ng.ml}^{-1}$. Tato metodika měla srovnatelnou výtěžnost s klasickým postupem extrakce kapalinou kapalinou. Její značná výhoda spočívala ve zkrácení doby analýzy až o několik hodin oproti klasické extrakci. Další výhody jsou v jednoduchosti postupu a tudíž v eliminaci rizik vnesení kontaminace během složitějšího vícekrokového extrakčního postupu, jaký představuje klasická extrakce. Také se zde už nevyskytují problémy spojené s nedostatečnou čistotou toluenu dostupného na trhu a ani problémy s vytvářením sraženiny v cysteinové frakci, což bylo patrně častou příčinou vysokých hodnot rozptylu výsledků u reálných vzorků.

Nevýhodou této metodiky je stále příliš kyselý extrakt $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$, který působí velmi agresivně na lodičku, koroduje ji, což vede k jejímu rychlému opotřebenému až rozpadnutí, a koroduje i další součásti přístroje.

Obr. 1. Srovnání dosažených výsledků obsahu organické rtuti extrakcí kapalinou kapalinou a ionexovou extrakční metodou s certifikovanou hodnotou methylrtuti u CRM-580.

Fig. 1. Comparison of achieved results of organic mercury by liquid-liquid extraction and ion exchange extraction methods with the certified value for methylmercury in sediment CRM-580.



POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ZMÍNĚNÝCH EXTRAKČNÍCH METODIK

Z výše uvedených výsledků u certifikovaného referenčního materiálu sedimentu CRM-580 vyplývá velmi dobrá shoda obou srovnávaných metod (viz obr. 1), která byla potvrzena párovým studentovým t-testem. Jak pro hladinu významnosti $p = 0,5$, tak pro hladinu významnosti $p = 0,1$ nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi oběma metodami ($n = 3$; $t = -0,974$; $sv = 2$). Pro vybrání vhodného způsobu extrakce k aplikaci na reálné vzorky sehrálo důležitou roli porovnání výhod a nevýhod klasické extrakční metody v systému kapalina-kapalina s iontoměničovou extrakční metodou. Metoda používající iontoměnič nabízí mnoho výhod, na rozdíl od klasické LLE, a byla proto aplikována na extrakce organické rtuti v reálných vzorcích sedimentů odebraných z vodních nádrží Jordán a Skalka (Miller, 2011; Tumová, 2011).

DISKUSE

Lze konstatovat, že byla ověřena původní metoda s ionexem podle Delgada a kol. (2007), která byla pro naše podmínky modifikována a zjednodušena tak, aby mohla být suma orgHg stanovena pomocí atomové absorpční spektrometrie a nikoliv chromatografickou cestou, jak uvádí autor. Autor dále uvádí, že iontoměničová pryskyřice není schopná zadržet část anorganických Hg^{2+} kationtů, které se nacházejí v extraktu v neutrální formě, např. $HgCl_2$. Tyto dílčí specie jsou obvykle zastoupeny méně než 0,25% z celkového množství rtuti obsaženého v reálných vzorcích půd a sedimentů. Bylo tedy prokázáno, že tato metoda představuje vhodnou alternativu k metodám chromatografickým, popř. metodám elektromigračním, kam patří zejména kapilární elektroforéza (Kubáň a kol., 2009), která je v současné době také hojně využívána ke stanovení organických forem rtuti.

Přestože dosažené výsledky se při použití obou metod liší jen nepatrně ($69,7 \pm 13,4 \mu g.kg^{-1}$ pro LLE, resp. $70,2 \pm 24,3 \mu g.kg^{-1}$ pro metodu s ionexem), metoda používající iontoměnič nabízí mnoho výhod (zkrácení doby analýzy až o několik hodin, jednoduchost postupu) na rozdíl od klasické LLE (časová náročnost, extrakce v několika krocích a s tím související vyšší

pravděpodobnost vnesení kontaminace, problémy s nedostatečnou čistotou použitých chemikálií, problémy se značnou těkavostí toluenu a se vznikem sraženiny v cysteinové frakci) a byla proto aplikována na extrakce organické rtuti v reálných vzorcích sedimentů odebraných z vodních nádrží Jordán a Skalka (Miller, 2011; Tumová, 2011). Navíc detekční limit pro extrakci s iontoměničem ($2,98 \text{ ng.ml}^{-1}$) byl cca $5\times$ nižší oproti detekčnímu limitu dosaženému při LLE ($15,59 \text{ ng.ml}^{-1}$).

Metoda s ionexem s sebou nese také mnohé výhody oproti chromatografickým a elektroforézním technikám, je časově nenáročná, vyžaduje menší finanční náklady a je jednoduchá na obsluhu přístroje AMA-254. Dále bylo Delgadem a kol. (2007) prokázáno, že přítomnost ionexu v suspenzi sedimentu v 2M HCl, zvolené pro naše experimenty, brání navíc i vzniku sekundární methylrtuti.

Kvůli časové tísní nebylo možné analýzu opakovat vícekrát. Málo opakování pak mělo do značné míry vliv na velké rozptyly dosažené u obou již zmiňovaných extrakčních metod. Rozptyly byly zřejmě také ovlivněny extrémně vysokým obsahem jak T-Hg, tak i naopak velmi nízkým obsahem MeHg^+ v CRM-580. Výhledově počítáme s provedením více analýz, které by námi dosažené výsledky potvrdily. Při aplikaci metody s ionexem na reálné vzorky sedimentů z nádrží Jordán a Skalka a při použití více opakování hodnoty RSD klesly pod přijatelných 10 % (Tumová, 2011).

SOUHRN

V rámci této studie byly porovnány dvě extrakční techniky k izolaci organických forem rtuti ze sedimentů (extrakce v systému kapalina-kapalina a extrakce s využitím selektivního iontoměniče) s následným stanovením souhrnu všech organických forem rtuti na atomovém absorpčním spektrometru AMA-254. Dobrých výsledků bylo dosaženo jak při extrakci v systému kapalina-kapalina, tak při extrakci s použitím iontoměniče, kdy dosažená procenta shody orgHg s certifikovaným referenčním materiálem pro sedimenty CRM-580 odpovídala $92,32 \pm 17,88 \%$, resp. $92,98 \pm 31,42 \%$. Díky jednoduchému postupu, rychlosti extrakce a snadnosti stanovení obsahu organických forem rtuti byla především nově ověřena modifikovaná metoda s použitím nového typu iontoměniče Ambersep GT74, jejíž princip a postup je velmi jednoduchý. Tato technika byla aplikována na množství reálných vzorků sedimentů odebraných z rybníku Jordán a údolní nádrže Skalka. Bylo prokázáno, že tato metoda představuje pro stanovení veškerých organických forem rtuti v sedimentech a půdách vhodnou alternativu k metodám chromatografickým, popř. elektro-migračním.

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří všem zaměstnancům katedry aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kteří se podíleli na přípravě vhodných podmínek potřebných pro realizaci této práce.

Tato práce byla součástí výzkumného záměru ZF JU: MSM: 6007665 806, „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním.“

LITERATURA

- Bloom N. S., Colman J. A., Barber L., 1997. Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 358: 371–377.
- Bučková M., Červinka Š., Dvořák R., Hejtmánek V., 2007. Výsledky mezilaboratorního porovnávání zkoušek OR-CH-3/07: Speciální anorganická a organická analýza. Praha, ASLAB Středisko pro posuzování způsobilosti laboratoří akreditované SNAS č. T-004, Výzkumný ústav vodohospodářský, 99 s.
- Canário J., Prego R., Vale C., Branco V., 2007. Distribution of mercury and monomethylmercury in sediments of Vigo Ria, NW Iberian Peninsula. *Water, Air, & Soil Pollution*, 182: 21–29.
- Delgado A., Prieto A., Zuloaga O., Diego A., Madariaga J. M., 2007. Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments: Use of ionic exchange in the sample treatment step to minimise the problem. *Analytica Chimica Acta*, 582: 109–115.
- Gaona X., Valiente M., 2003. Stability study on a Westöo-based methodology to determine organomercury compounds in polluted soil samples. *Analytica Chimica Acta*, 480: 219–230.
- Kubáň P., Pelcová P., Margetínová J., Kubáň V., 2009. Mercury speciation by CE: An update. *Electrophoresis*, 30: 92–99.
- Maggi C., Berducci M. T., Bianchi J., Giani M., Campanella L., 2009. Methylmercury determination in marine sediment and organism by direct mercury analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641: 32–36.
- Miller Z., 2011. Výskyt rtuti v nivních půdách horního toku řeky Ohře (Diplomová práce). České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, katedra aplikované chemie, 72 s.
- Návod na obsluhu přístroje AMA-254, 2002. Altec s.r.o., Praha, 25 s.
- Nevado J. J. B., Martín-Doimeadios R. C. R., Bernardo F. J. G., Moreno M. J., 2008. Determination of monomethylmercury in low- and high- polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 608: 30–37.
- Nguyen H. I., Braun M., Szaloki I., Baeyens W., Grieken R. V., Leermakers M., 2009. Tracing the metal pollution history of the Tisza river through the analysis of a sediment depth profile. *Water, Air, & Soil Pollution*, 200: 119–132.
- Rivaro P., Ianni C., Soggia F., Frache R., 2007. Mercury speciation in environmental samples by cold vapour atomic absorption spectrometry with *in situ* preconcentration on a gold trap. *Microchimica Acta*, 158: 345–352.
- Tomiyasu T., Matsuyama A., Eguchi T., Fuchigami Y., Oki K., Horvat M., Rajar R., Akagi H., 2006. Spatial variations of mercury in sediment of Minamata Bay, Japan. *Science of the Total Environment*, 368: 283–290.
- Tumová J., 2011. Nepřímé stanovení forem rtuti v půdách a sedimentech pomocí atomové absorpční spektrometrie (Diplomová práce). České Budějovice, Jihočeská univerzita, Pedagogická fakulta, katedra aplikované chemie, 129 s.
- Vazquez M. J., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R., 1997. Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analytical Chemistry*, 69: 221–225.
- Westöo G., 1966. Determination of methylmercury compounds in foodstuffs I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta Chemica Scandinavica*, 20: 2131–2137.
- Westöo G., 1967. Determination of methylmercury compounds in foodstuffs II. Determination of methylmercury in fish, egg, meat and liver. *Acta Chemica Scandinavica*, 21: 1790–1800.

Pokyny pro autory

ODBOBNÉ 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 jinak 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-

vidající 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 kdokoliv 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:

Flajshans, 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 Moskow, 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 NESPLŇUJÍ POŽADAVKY DLE POKYŇŮ PRO AUTORY, BUDOU PŘED POSOUZENÍM A VLASTNÍM LEKTOROVÁNÍM VRÁCENY ZPĚT K PŘEPRACOVÁNÍ.

VÝJIMEČNÉ SYMPOZIUM V PRAZE AQUA 2012 NABÍDNE DISKUSI O CHOVU RYB I CELOSVĚTOVOU VÝSTAVU

T. POLICAR

Jak chovat ryby, korýše, měkkýše či pěstovat řasy v různých klimatických pásech a na všech kontinentech? Nejen na tyto otázky bude odpovídat **mezinárodní konference AQUA 2012**. Výjimečné setkání celosvětového významu se uskuteční **od 1. 9. do 5. 9. 2012 v Kongresovém centru v Praze**. Pořadatelé očekávají až tři tisíce návštěvníků. Hlavním cílem sympozia je diskuse o tom, jak zajistit dostatek kvalitních produktů rybnářství včetně kultivace vodních živočichů a řas s využitím efektivních, moderních a k životnímu prostředí šetrných výrobních postupů. Konferenci pořádá Evropská (EAS) a Světová společnost pro akvakulturu (WAS) ve spolupráci s Fakultou rybnářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.



RYBÁŘSKÁ VÝSTAVA A SEMINÁŘ FRESHWATER FARMERS´ DAY

Symposium AQUA 2012 doplní i celosvětová rybářská výstava. Své výrobky a služby na ní představí přední světové organizace a podniky zabývající se chovem a kultivací vodních organismů, produkcí krmiv či léčiv, vývojem chovatelských technologií, vzděláním a vědou v oboru rybářství. České rybářství bude na výstavě AQUA 2012 zastupovat tzv. Pavilon českého rybářství, který připraví Ministerstvo zemědělství České republiky a Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Setkání nabídne také speciální seminář s praktickými rybářskými tématy nazvaný **Freshwater Farmers´ Day** (Den producentů sladkovodních ryb) **v úterý 4. září od 10:30 do 17:00**. Všechny přednášky budou simultánně tlumočeny do češtiny. Akce bude spojená s návštěvou výstavy a je určena především **českým i středoevropským chovatelům sladkovodních ryb a zájemcům o aplikovaný rybářský výzkum**.



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Seminář organizuje Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity ve spolupráci s belgickými, polskými a irskými kolegy. Díky sponzorství Ministerstva zemědělství České republiky je možné účastníkům Freshwater Farmers´ Day nabídnout výhodné vstupné, které činí 5 € na osobu. Kvůli organizaci semináře a zajištění dostatečného prostoru pro všechny účastníky je potřeba, aby se zájemci s předstihem zaregistrovali na emailové adrese: policar@frov.jcu.cz.

Více informací o celé akci je možné získat na www.was.org, www.easonline.org a na www.frov.jcu.cz.



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



Jihočeské výzkumné centrum
akvakultury a biodiverzity
hydrocenóz



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



