



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

## ZPRACOVÁNÍ A HODNOCENÍ EKOTOXIKOLOGICKÝCH MIKROBIOTESTŮ

ECOTOXICOLOGICAL MICROBIOASSAYS: PROCESSING AND EVALUATION

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Tereza Bystřická**

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Ing. Eliška Maršálková, Ph.D.**

**BRNO 2025**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2002/2024 Akademický rok: 2024/25  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany  
životního prostředí  
Studentka: **Tereza Bystřická**  
Studijní program: Aplikovaná analytická,  
environmentální a forenzní chemie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Eliška Maršálková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Zpracování a hodnocení ekotoxikologických mikrobiotestů

### Zadání bakalářské práce:

- Vypracovat literární rešerši na téma ekotoxikologické biotesty využívané ve vodním hospodářství.
- Testování ekotoxicity s  $K_2Cr_2O_7$  na *Lemna minor* a *Thamnocephalus platyurus*
- Testování ekotoxicity na reálných vzorcích
- Zpracování a vyhodnocení naměřených výsledků se standardní látkou a reálných vzorků
- Porovnání a diskuze naměřených dat s vědeckou literaturou

### Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Tereza Bystřická  
studentka

Ing. Eliška Maršálková, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Jozef Krajčovič, Ph.D.  
vedoucí ústavu  
-----

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce bylo použití ekotoxikologických biotestů při posuzování odpadních vod s obsahem farmak. U těch není v současné době legislativou nařízena kontrola testy akutní ekotoxicity. Provádí se pouze chemická analýza stanovených parametrů vypouštěných vod. Farmakologické sloučeniny nejsou sledovány vůbec.

Biotesty byly prováděny formou toxkitů od společnosti MicroBioTests Inc. a to na organismech *Thamnocephalus platyurus* a *Spirodela polyrhiza*. Zkoumány byly vzorky reálných vod z odtoků z ČOV Modřice, jeden vzorek přítoku na ČOV Modřice. Dále byl zkoumán vzorek léčivého přípravku Ibalgin® a účinek dichromanu draselného.

Ukázalo se, že ekotoxicita odtoků z ČOV je ve většině případů minimální, pokud je vůbec patrná. Naopak přítok byl značně toxický pro oba organismy. Ibalgin® pak vykazoval toxicitu pouze pro *Spirodela p.* Dichroman draselný byl toxičtější pro *Thamnocephalus p.* *Spirodela p.* se celkově ukázal jako citlivější, a tedy vhodnější pro případné monitorování. Je nutné podotknout, že akutní testy pravděpodobně nevystihují reálný účinek vypouštěných vod. Další studie by se měla zaměřit na toxicitu chronickou a komplexnější testy zahrnující všechny trofické úrovně, tedy producenty, konzumenty i destruenty.

## ABSTRACT

The subject of this bachelor thesis was the use of ecotoxicological bioassays for evaluating wastewater containing pharmaceuticals. Current legislation does not mandate any acute ecotoxicity testing of effluents. Only chemical analysis of choice parameters is required. Pharmaceuticals are not monitored.

Bioassays were performed in the form of toxkits using *Thamnocephalus platyurus* and *Spirodela polyrhiza*. The toxkits were provided by MicroBioTests Inc. Evaluated samples were taken from the Modřice wastewater treatment plant outflow and, in one case, inflow. Furthermore, the effects of the medication Ibalgin® and potassium dichromate were assessed.

The ecotoxicity of effluent samples proved to be minimal, if present at all. Untreated wastewater was, in turn, highly toxic for both organisms used. Ibalgin® proved to be toxic only to *Spirodela polyrhiza*. Potassium dichromate was more toxic for *Thamnocephalus p.* *Spirodela p.* has proven itself to be more sensitive out of the two organisms and therefore potentially more appropriate for monitoring. As performed tests focused on acute toxicity, they most likely do not describe the full extent of the effect effluents have. Therefore, further testing is needed, focusing on chronic toxicity and more complex bioassays containing all the trophic levels – producers, consumers and decomposers.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Ekotoxikologie, *Thamnocephalus platyurus*, *Spirodela polyrhiza*, čištění odpadních vod, akutní toxicita, biotest, mikrobiotest

## KEYWORDS

Ecotoxicology, *Thamnocephalus platyurus*, *Spirodela polyrhiza*, wastewater treatment, acute toxicity, biotest, microbiotest

BYSTRICKÁ, Tereza. *Zpracování a hodnocení ekotoxikologických mikrobiotestů*. Bakalářská práce. Eliška MARŠÁLKOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce Ing. Elišce Maršákové, Ph.D. za její odborné vedení i milý přístup. Také děkuji Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie Botanického ústavu AV ČR za poskytnutí laboratorního zázemí pro všechna měření. Zvláštní dík pak patří Technologické agentuře ČR za její finanční podporu a zajištění odběru vzorků v rámci programu TAČR Prostředí pro život č. SS07010182 – Vyhodnocení významnosti vlivu zdravotnických zařízení na zatížení komunálních čistíren odpadních vod mikropolutanty.

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
	2.1 Ekotoxikologické biotesty.....	8
	2.1.1 Rozdělení biotestů .....	8
	2.1.2 Struktura testů a hodnocení výsledků.....	9
	2.1.3 Výběr organismů .....	10
	2.1.4 Běžně používané organismy .....	11
	2.1.5 Použití v praxi a legislativní základy.....	14
	2.2 Léčiva a jejich metabolity v odpadních vodách na odtocích z ČOV .....	15
	2.2.1 Léčiva přicházející na ČOV .....	15
	2.2.2 Legislativa vypouštění z ČOV.....	16
	2.2.3 Účinnost ČOV .....	17
	2.3 Znečištění povrchových vod .....	17
	2.3.1 Osud polutantů v povrchových vodách .....	17
	2.3.2 Vliv polutantů, zejména léčiv, na povrchové vody.....	20
3	Experimentální část.....	22
	3.1 Materiály a metody .....	22
	3.1.1 MicroBioTests toxkity .....	22
	3.2 Testované látky .....	24
	3.2.1 Vzorke vody .....	24
	3.2.2 Toxicita léčiv .....	25
	3.2.3 Dichroman draselný.....	26
4	Výsledky a diskuze .....	27
	4.1 Standardizace .....	27
	4.2 Vzorke vody.....	27
	4.2.1 12_01_O .....	27
	4.2.2 26_01_O .....	28
	4.2.3 03_02_O; 04_02_O .....	29
	4.2.4 23_03_O_1; 23_03_O_2; 23_03_P .....	29
	4.2.5 Zhodnocení toxicity vody.....	30
	4.3 Toxicita léčiv.....	31
	4.4 Dichroman draselný .....	34
	4.5 Zhodnocení metodiky .....	35
5	Závěr .....	38
6	Zdroje .....	39
7	Seznam zkratk .....	44

8	Seznam příloh.....	45
9	Přílohy.....	46

# 1 ÚVOD

Veškerá lidská činnost s sebou nutně nese tvorbu odpadů. Snaze zmenšit nepřehledné množství hmatatelných odpadů všeho druhu je věnována velká pozornost, a to jak ve vědeckých kruzích, tak mezi širší veřejností. Nelze ale zapomenout, že vedle použitých předmětů, které je nutno recyklovat, skladovat nebo spalovat, také produkuje odpadní vodu.

Technologie čištění odpadních vod jsou v dnešní době velmi pokročilé a stále se zlepšují. Rozhodně ale nelze říct, že by byly schopny odstranit všechny polutanty. A tak voda, která odchází z čistírny odpadních vod do vod povrchových není tak kvalitní a čistá, jako byla, než se stala odpadem.

Její stav je do jisté míry sledován. Děje se tak v souladu s českou legislativou i evropskými směrnici a na základě nich vypracovaných provozních řádů. Přihlíží se k vodnatosti recipientu. Vzhledem k objemu vod, které protékají čistírnami, a k náročnosti podrobných analýz však testujeme při vypouštění jen vybrané parametry, a to pouze v intervalech nebo souhrnným vzorkováním.

Jestliže ale nedovedeme vody vyčistit zcela a nesledujeme přesně jejich složení, lze předpokládat, že se do vod dostávají kontaminanty. Pak lze uvažovat o vlivu, který takový děj bude mít na vodní organismy, celý ekosystém a v konečném důsledku na člověka. Pitná voda je totiž absolutně nenahraditelným a k životu potřebným médiem v životním prostředí a zdrojem pro člověka. Jestliže dojde k její přílišné kontaminaci, bude lidstvo čelit velmi vážnému problému.

Proto je důležité zkoumat vliv již na vodních organismech. Nástrojů takového bádání je mnoho, neboť i ekotoxikologie prochází neustálým vývojem. Volba té nejlepší techniky pro konkrétní aplikaci už je poněkud složitější.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Ekotoxikologické biotesty

Cílem obvyklých analytických metod je určení kvality nebo kvantity zkoumané látky. Mohou tedy určit polutanty, které se v prostředí vyskytují, spolu s jejich koncentracemi. Ekotoxikologie se však zabývá vlivem látek na životní prostředí, takže pouze tyto informace nejsou dostačující. Výskyt látky jako takové nemusí mít žádný účinek, ale pokud jej má, běžná analytická metoda nám o něm není schopná dát vypovídající informace. Z hlediska ekotoxikologie je tedy nutno určit, jak budou látky či polutanty o určitých koncentracích interagovat s prostředím a organismy v něm[1].

K tomu slouží právě biotesty. Jejich základním principem je vystavení testovacích organismů testovanému prostředí a sledování jejich následné odezvy. Organismus je tu tedy nástrojem, ne předmětem zkoumání[2].

Biotesty lze použít pro vzorky známých látek o známých koncentracích za účelem posouzení jejich vlivu na ekosystém. Získané informace pak mohou být základem pro legislativní opatření co se používání nebo rozšiřování těchto látek týče.

Dále slouží jako rozšíření běžných technik monitoringu stavu životního prostředí[2].

#### 2.1.1 Rozdělení biotestů

Ideální biotest by zahrnoval veškeré složky životního prostředí v co největším časovém rozsahu.

Reálné biotopy však sestávají z mnoha složek a jejich komplexita není dosažitelná v laboratorních podmínkách. Vzhledem k množství proměnných, biologických, fyzických i chemických, by bylo nemožné dosáhnout přesných výsledků. Navíc by bylo nutné přidávat látky s potenciálně negativním vlivem do životního prostředí a tím tedy zhoršovat celkový stav situace. Proto testy na reálných biotopech mají spíše podobu sledování průběhu předchozí, neúmyslné kontaminace[1].

Myšlenka testovaného systému, který zahrnuje veškeré součásti ekosystému, je tedy nepřevaditelná do praxe. Proto se testy zpravidla omezují jen na jeden druh matrice. Tou je typicky voda, vzduch nebo půda, případně lze odlišovat i specifitější případy, jako je sediment nebo odpad[1].

Využívaná matrice ovlivňuje v první řadě výběr organismů, které se biotestu účastní. Má ale i vliv na transport a chování sledovaných látek. Vzhledem k předmětu zkoumání ekotoxikologie se totiž látka přidává právě do matrice, ne přímo do těla organismu.

Případně je možné nastavit testy tak, aby zahrnovaly více matic. Taková soustava se většinou používá v případech, kdy sledujeme transport látky mezi systémy. Například přesun látek z půdy do vody, kdy testovanou látku přidáme do půdy, ale testovací organismus je vodní[1].

Dalším kritériem biotestů je počet druhů použitých organismů, respektive výběr složení baterie testů.

Jednodruhové testy jsou jednodušší co do provedení a zhodnocení výsledků. Dávají ovšem informace o odpovědi pouze daného druhu, ne komplexní informaci o celkovém osudu látky a jejím vlivu na ekosystém. Jejich užitečnost je tedy značně omezená, přesto jsou stále hojně používané[3].

Vícedruhové systémy se blíží reálnému ekosystému a umožňují zhodnocení mnoha vztahů a dějů, které nejsou při jednom druhu patrné. Zároveň ale dochází ke sjednocení odpovědí veškerých druhů a může být až nemožné určit přesný osud látky. Specifické vlastnosti jedinců a vzniklé struktury mezi nimi navíc snižují opakovatelnost experimentů[3].

Na pomezí těchto dvou možností jsou baterie testů. To jsou testy prováděné na více organismech odděleně, ale na stejném vzorku[1]. Tím získáme více informací, než při jednodruhových testech

a vyřešíme překrývající se odpovědi. Ztrácíme ale do velké míry možnost pohlédnout podrobněji na osud látky při pohybu napříč ekosystémem.

Posledním z hlavních kritérií je délka samotného biotestu a tím i sledované vlastnosti.

Akutní testy se zabývají vlivem vysokých dávek po jednorázové expozici. Trvají poměrně krátkou dobu – do 96 hodin, většinou ale minimálně 24. Chronické testy probíhají alespoň tři měsíce a zkoumají dávky o několik řádů nižší než při akutních testech. Mohou zahrnovat i doplňování hladiny testované látky[1].

Podmínky chronických testů mnohem více odpovídají reálnému vlivu polutantů na ekosystém při dlouhodobém působení kontaminantů, neboť látky v prostředí zůstávají delší dobu. Například léčiva, jimiž se tato práce zabývá.

Chronickou toxicitu látky je navíc složitější odhalit, jestliže k ní dochází mimo laboratorní podmínky. Pokud dojde v životním prostředí k expozici, která vyvolá závažnou akutní toxicitu, lze mnohem jednodušeji odhalit, jaká látka je zodpovědná a jak se do prostředí dostala. To jsou nutné informace, pokud má dojít k nápravě nebo prevenci. Ve chvíli, kdy se projeví chronická toxicita, je většinou těžší hledat příčiny[1].

Navíc některé dopady na organismus nebo populaci nemohou být při krátkodobém testu patrné, i kdyby je látka v dané koncentraci způsobovala. Jedná se zvláště o vývojovou a reprodukční toxicitu. Pro jejich projev je potřeba testu dostatečně dlouhotrvajícího, aby mohlo dojít ke vzniku a vývoji další generace.

Chronické testy mají tedy větší výpovědní hodnotu. Akutní testy jsou ovšem rychlejší a zdají se být hojněji využívané v praxi, například při haváriích. Nachází využití pro screeningové testy nebo jako první krok při zkoumání komplexních ekotoxikologických vlastností látky[3].

Další důležitou vlastností je charakter samotného vzorku, který testujeme. Můžeme využít vzorky připravené ze standardů známé látky se známou koncentrací. Tím získáme přibližné informace o jejím vlivu na životní prostředí. Standardní látky také používáme pro standardizaci biotestů. Popřípadě můžeme použít i směs známých látek, například pokud chceme posuzovat, jak se navzájem ovlivňují.

Často ale chceme zjišťovat toxicitu reálného vzorku odebraného z životního prostředí. Pokud se podoba vzorku shoduje s matricí testu, který chceme provádět, můžeme provést přímý test. Typické je to pro testy akvatické toxicity.

V případě, že matrice neodpovídá té požadované, musíme vzorek upravit vhodným způsobem. Akvatické testy jsou na provedení nejjednodušší co se podání látky týče, typicky se tedy snažíme látky převést do rozpouštědla (převážně vody). Častou úpravou je tedy příprava půdních výluhů, kde z půdy nebo pevného odpadu extrahujeme látky do rozpouštědla. Při zacházení se vzorkem ale hrozí ztráta informací. Předpokládáme, že se v pevném vzorku vyskytují látky, které by pro půdní organismus mohly být biodostupné a nebezpečné. Není zaručeno, že všechny tyto látky zároveň přejdou do prostředí rozpouštědla v plné míře[4].

V neposlední řadě pak hraje roli samotný způsob vyhodnocování testu. Vždy je nutné dopředu určit, jakou změnu v organismu budeme sledovat. Ta se označuje jako endpoint[4] a může se jednat o více či méně viditelné události. Od letálních efektů přes očividné fylogenetické změny (nekróza, inhibice růstu, ...) či změny v pohybu a chování až po děje na mikroskopické úrovni, změny enzymatické aktivity či poškozování membrán[2].

### **2.1.2 Struktura testů a hodnocení výsledků**

Jestliže má být stanovena ekotoxicita dané látky nebo vzorku, je nutné zvolit vhodný postup při výběru koncentrací, pro které se test bude provádět. Hlavním cílem je určit, kde se nachází hodnota EC<sub>50</sub> pro

zvolený způsob testování.  $EC_{50}$  se běžně se používá jako měřítko ekotoxicity (nižší hodnota znamená větší toxicitu). Pokud sledujeme inhibici, používáme  $IC_{50}$ , u mortality  $LC_{50}$ [1].

Jestliže nemáme žádné podklady, ze kterých bychom  $EC_{50}$  mohli odhadnout, začínáme limitním testem. V něm je používána koncentrace 100 mg/l, případně méně, pokud vzhledem k rozpustnosti nelze připravit tak vysokou koncentraci. Jestliže testujeme vzorek z prostředí, použijeme ho nezředěný[5].

Pokud se projeví toxické účinky, je potřeba přiblížit se koncentracemi k  $EC_{50}$ . Toho dosáhneme testem orientačním (či předběžným). Při něm se snažíme najít krajní hodnoty působnosti. Tedy nejvyšší hodnotu nezpůsobující žádný efekt a nejnižší hodnotu, která způsobuje efekt 100%. Pro tyto účely se tyto koncentrace označují jako OC0 a OC100. Koncentrace volíme na základě limitního testu. Každý test je většinou koncipován na 5 až 7 koncentrací, do tohoto čísla nepočítáme případné kontroly[5].

Jestliže byl limitní test negativní, provádíme ještě test ověřovací. Jedná se o opakování testu limitního, ale s vícerym paralelním stanovením. Tím se vyloučí možnost, že původní negativní výsledek byl pouze náhodný. Pokud i zde je dosaženo negativního výsledku (mortalita pod 10 %), látku považujeme za netoxickou. Pokud je mortalita mezi 10 a 50 %, látka je ekotoxická, ale není nutné provádět další testy. V posledním případě, tedy při více než 50% mortalitě, se také přistupuje k orientačnímu testu[5].

V rozmezí koncentrací OC0 a OC100 se pak snažíme přesně určit  $EC_{50}$  základním (či definitivním) testem. Mezi OC0 a OC100 je ideální mít 5 dalších koncentrací: jednu co nejbližze předpokládané  $EC_{50}$ , dvě nižší a dvě vyšší, rozložené rovnoměrně[5].

Na základě získaných hodnot pak vykreslujeme křivku dávka-odpověď. Jedná se o grafické znázornění vlivu koncentrace toxikantu na míru jeho účinku. Většinou s dávkou stoupá i odpověď. Výjimkou je jev hormese, kdy se toxická látka v malých koncentracích látka jeví mít pozitivní vliv na organismus. To může být způsobeno skutečným pozitivním efektem (zejména u látek, které slouží i jako živiny). Dále ale může být příčinou snaha organismu přežít již pociťovaný negativní efekt, tedy stresová odpověď[1; 5].

Jak už bylo řečeno,  $EC_{50}$  se používá k určení míry toxicity, tento přístup ovšem není zcela přesný. Křivka dávka-odpověď může být různě strmá. Dvě látky se stejnou  $EC_{50}$  mohou být v ostatních koncentracích jinak toxické. Ta s méně strmou křivkou totiž začíná mít znatelný vliv při mnohem menších koncentracích, kdy druhá látka je ještě bezpečná[1; 5].

Proto se stanovují NOEL a LOEL, případně NOAEL a LOAEL. Ty nám určují, při jakých koncentracích již začíná být patrný nějaký účinek látky (LOEL, LOAEL), případně kde jej ještě nepozorujeme (NOEL, NOAEL)[1].

### 2.1.3 Výběr organismů

Výběru organismů, na nichž testy provádět, byla v oblasti výzkumu věnována velká pozornost. Vlastností, které posuzují vhodnost organismu pro biotesty, je mnoho. Jednoznačnou je příslušnost organismu do daného prostředí, dále se však požadavky liší. Není organismus, který by splňoval všechny tyto požadavky dokonale, proto se pro různé testy využívají jiné organismy[1].

Hlavním kritériem je citlivost organismu na koncentrace stanovované látky. Obecně čím je organismus citlivější, tím lépe, neboť chceme většinou zjistit i koncentrace, kde nebude ovlivněn ani nejslabší článek řetězce, tedy nejcitlivější organismus[1]. Některé organismy jsou celkově citlivější než jiné, což z nich dělá dobré organismy pro běžné testy. Citlivost se ovšem může značně lišit pro různé látky nebo organismy. Pokud je tedy prováděna komplexnější studie, je vhodné ověřit, který z běžně používaných organismů je nejvhodnější.

Zvláště pro testy zaměřené na vývojovou a reprodukční toxicitu je pak důležitým kritériem délka života a rozmnožovacího cyklu. Čím jsou kratší, tím rychleji je možné získat výsledky.

Dále je nutno zohlednit náročnost chovu. Organismy vyžadující nepřetržitou péči, náročné na prostředí nebo živiny jsou ekonomicky nevýhodné. Proto jsou preferovány ty, které lze chovat s co nejmenšími výdaji.

Jestliže se využívá organismů více, zpravidla je snaha o zastoupení veškerých úrovní, které daná matrice podporuje. Významné je taxonomické zařazení, ale i nika, kterou daný organismus v životním prostředí obývá. Největší vliv je přisuzován trofickým úrovním, jelikož mají na osud látky v ekosystému nejvýznamnější a lehce pozorovatelný účinek. Všeobecně uznávané je tedy použití uspořádání producent/konzument/destruent. Kromě trofické pyramidy je dobré zohlednit i jiné potravní vztahy, jako je predace, parazitismus nebo kooperace[1; 2; 33].

Výběr jednotlivých organismů, které zastoupí trofické úrovně, se liší. Například pro akvatickou toxicitu bývá využit zástupce řas, korýšů a ryb. Takový přístup se zdá být nejrealističtější, co se poměru proveditelnosti a výpovědnosti týče. Umožňuje posoudit osud látky relativně komplexně, aniž by vznikl systém příliš složitý na provedení a údržbu[2; 3].

Váha, která je přikládána různým kritériím, závisí hlavně na účelu testu. Výběru vhodných organismů pro dané prostředí či látku jsou mnohdy věnovány celé studie.

Nutno podotknout, že provedení biotestu s jistotou určuje pouze vliv na použité organismy. Vzhledem k metabolickým rozdílům je možné, že jiné organismy budou reagovat zcela odlišně. Tomu se částečně lze vyhnout výše zmíněnými vícedruhovými testy nebo bateriemi testů. Ani to však nezaručuje, že nebude odezva v reálném prostředí odlišná[2].

#### **2.1.4 Běžně používané organismy**

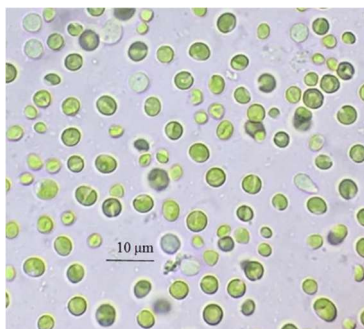
Následující kapitola se bude zabývat stručným popisem vybraných organismů využívaných v akvatické ekotoxikologii či při hodnocení výluhů. Zdaleka se nejedná o kompletní výčet; organismů vhodných pro účely biotestu je mnoho. Vybrané jsou ty nejznámější a nejrozšířenější. A to tak, aby pokryly, pokud možno, celé spektrum trofických i vývojových úrovní. Dále budou představeny i organismy, které byly využity v této práci.

##### **2.1.4.1 *Vibrio fisheri***

Tato mořská bakterie, někdy nazývaná *Aliivibrio fisheri*, je charakteristická svou modrou bioluminiscencí. Její produkce je navázaná na dobrý stav organismu, takže rychle pohasíná, pokud je organismus vystaven nepříznivému prostředí. Známa je hlavně díky systémům Microtox<sup>®</sup>, které zahrnují reagenty i zařízení pro fotometrické stanovení intenzity vydávaného světla[1; 7].

##### **2.1.4.2 *Chlorella vulgaris***

Převážně sladkovodní jednobuněčná zelená řasa. Rychlý růst a přizpůsobivost rozmanitým kultivačním podmínkám z ní dělá snadno studovatelný organismus. Využívá se ale i jako doplněk stravy, v kosmetice a v lékařství. Měříme, stejně jako u ostatních testů s řasami, růstovou křivku různými metodami[1; 8; 9; 9].

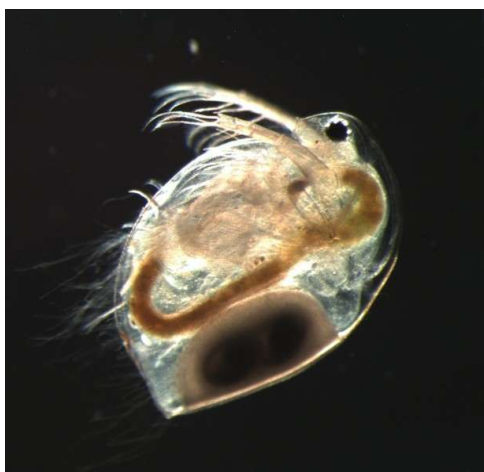


Obrázek 1: Chlorella vulgaris[8]

#### 2.1.4.3 *Daphnia magna*

Jedná se o malého korýše z rodu perloočky, českým názvem hrotnatka velká. Patří k těm nejznámějším organismům používaným v ekotoxikologii. V přírodě se živí mikroorganismy (převážně řasy) a sama je potravou zejména pro malé ryby. Jsou hojně rozšířené a velmi citlivé pro působení toxických látek. Zdraví jejích populací je dobrým indikátorem stavu daného ekosystému[10; 11].

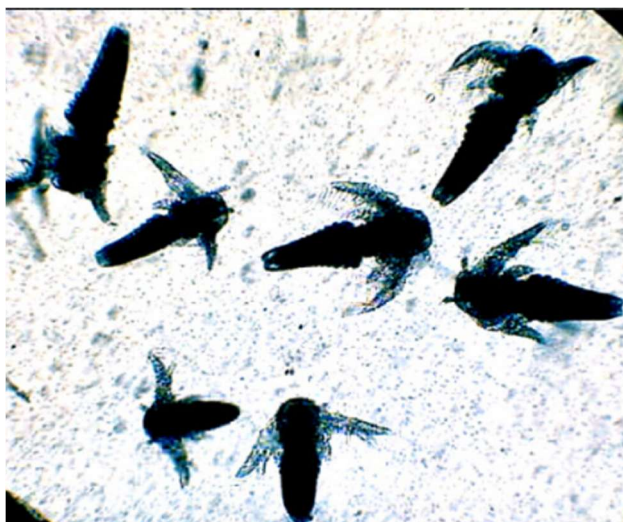
V dobrých podmínkách se rozmnožují nepohlavně; k pohlavnímu rozmnožování dochází zejména v nepříznivých podmínkách. Nepohlavní rozmnožování umožňuje studie na organismech se stejnými geny. Průhledné tělo navíc usnadňuje sledování vnitřních pochodů[11].



Obrázek 2: Daphnia magna (z archivu Botanického ústavu AV ČR)

#### 2.1.4.4 *Thamnocephalus platyurus*

Jedná se o drobného korýše z řádu žábřonožek (Anostraca). Citlivost jeho odpovědí na toxikanty je srovnatelná s *Daphnia m.* Testy se provádí na mladých organismech po vylíhnutí z cyst, kteří jsou menší, než *Daphnia m.* a zabírají tedy méně prostoru[12].



Obrázek 3: Thamnocephalus platyurus[13]

#### 2.1.4.5 *Lemna minor*

Jedná se o drobnou jednoděložnou rostlinu z čeledi *Araceae*, českým názvem okřehek menší. Je plovoucí, jako stanoviště preferuje stojatou či velmi pomalu tekoucí vodu a často tvoří povlaky na velké ploše hladiny. Rozšířená téměř kosmopolitně; v ČR se nachází hojně, vyjma vysokohorských biotopů. Zdánlivé „listy“ jsou ve skutečnosti stélkou, ačkoliv jsou pro svůj vzhled označovány jako listy ve většině vědecké literatury. Kořen má každá stélka jeden. Kvete jen velmi vzácně, převažuje u ní vegetativní rozmnožování. K tomu dochází v dobrých podmínkách velmi rychle, množení a chov jsou velmi nenáročné. Množení stélek je jeho nejčastěji sledovaným úkazem, ať už se sleduje přímo počet nebo biomasa či plocha. Dále je ale možné sledovat i fotosyntetickou aktivitu. Rychlý růst a relativně velká hustota živin z ní dělají možný zdroj krmiva pro zvěř, ale vzrůstají i pokusy zavést jej jako doplněk stravy pro člověka [14; 15].

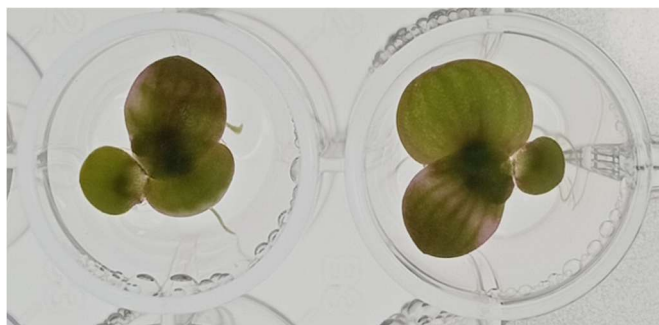


Obrázek 4: Lemna minor (vlastní fotografie)

#### 2.1.4.6 *Spirodela polyrhiza*

Českým názvem závitka mnohokořenná. Jedná se také o rostlinu z čeledi *Araceae*, okřešku je velmi podobná. Stanoviště preferují stejná, ačkoliv závitka preferuje i více prosluněná místa. Jejich využití v ekotoxikologii je též obdobné. Hlavním rozdílem, jak název napovídá, je vyšší počet kořenů připadajících na jednu stélku; tvar stélek je odlišný. Spirodela se navíc vyznačuje ještě vyšší růstovou rychlostí[14; 15].

Krom rychlosti růstu je výhodná i její schopnost tvoření turionů – dormantních stádií určených k přezimování. „Lístky“, které z turionů po klíčení vyrazí, označujeme jako frondy[16].



Obrázek 5: Spirodela polyrhiza (vlastní fotografie)

#### 2.1.4.7 *Danio rerio*

Případně také *Brachydanio rerio*, česky dánío pruhované. Jedná se o drobnou sladkovodní rybu. Využívá se jako model embryonálního vývoje obratlovců a pro studium vývojové genetiky. Hlavní výhodou je průhlednost embryí, která usnadňuje pozorování vnitřních pochodů. Dále je podstatná vysoká fekundita, rychlé dospívání a relativně jednoduchý chov[17; 18].



Obrázek 6: Danio rerio[19]

#### 2.1.5 Použití v praxi a legislativní základy

Zákon v určitých případech stanovuje, jestli a jaké testy se mají provádět, a určuje jejich povolené výsledky. Například pro odpady, které se mají využít pro zasypávání, je určena baterie testů: *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna Straus*, *Desmodesmus suspicatus* a *Lactuca sativa*. Dále určuje normu, podle níž má být připraven výluh odpadu (na kterém jsou prováděny všechny testy krom *Lactuca sativa*)[32].

Dále se o biotesty zajímá REACH (nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, evaluaci a autorizaci chemických látek). REACH definuje, jaké informace o látce je třeba prokázat pro její registraci. Součástí těchto informací je i výčet testů ekotoxicity, které musí být provedeny (a jejich výsledky uvedeny). Jejich rozpis se nachází v přílohách VII až X, požadavky se postupně navyšují spolu s množstvím látky, které se uvádí na trh. Každá látka, případně směs látek, by tedy měla být před svým využíváním testována[21].

Jednotlivé biotesty, tedy jejich metodika, jsou upravovány normami, prováděcími předpisy a metodikami od příslušných orgánů. V České republice se jedná o ČSN. Existují také mezinárodní normy ISO a evropské normy EN. Tyto další normy se často přejímají do soustavy ČSN. Vznikají normy s označením ČSN EN ISO, ČSN ISO a ČSN EN[22].

Dále se využívají metodiky od OECD přijímané ze strany EU. Jiné země pak mají také vlastní orgány, které vydávají své normy. Jednotlivé normy z různých zdrojů se velmi často překrývají, co se použitého organismu týče a liší se jen ve specifikách provedení, jako jsou metody stanovení nebo přesné složení používaných látek[2].

Za zmínku stojí i odvětvové technické normy v působnosti příslušných ministerstev, zejména TNV (vodní hospodářství) a TNO (odpadové hospodářství)[22].

## **2.2 Léčiva a jejich metabolity v odpadních vodách na odtocích z ČOV**

### **2.2.1 Léčiva přicházející na ČOV**

Zákon definuje léčivé přípravky jako

„a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo

b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy“[23].

Ve farmakochemii se pak využívá termínů léčivá látka a léčivý přípravek; oba spadají pod pojem léčiva. Léčivou látkou se myslí látky s „farmakochemickým, imunologickým účinkem nebo látky ovlivňující metabolismus“[25]. Používá se též zkratka API. Léčivý přípravek je pak směs léčivé látky (popř. látek) s látkami pomocnými – ty slouží převážně pro usnadnění nakládání s léčivou látkou, popřípadě podporují její vlastnosti[25].

Vzhledem k pokročilosti současné farmakochemie je soubor známých látek, které pod tento obor spadají, neskutečně široký. Některá literatura navíc k léčivům přidává i produkty osobní hygieny a dermokosmetiku[26]. Jedná se v mnoha případech o podobné látky, někdy i identické. Hranice mezi léčivem a dermokosmetikou je poměrně tenká.

Znečištění vod léčivy je tedy souhrnným znečištěním mnoha různými látkami. Soubor zkoumaných látek je ještě rozšířen o metabolity, které vznikají v lidském těle po použití léčiva.

Snadno dostupná léčiva cílená na časté zdravotní obtíže jsou vyráběna a používána ve velkém množství. Jejich koncentrace ve vodách, jak odpadních, tak povrchových, tedy do jisté míry odpovídá jejich spotřebě. Lze například nalézt vysoké koncentrace běžně využívaných léků dostupných bez předpisu, zejména nesteroidních analgetik, jako je ibuprofen nebo diclofenac[27; 28].

Nelze ovšem zanedbat jiná léčiva, včetně těch na předpis nebo méně využívaných. Z těch bývá pozornost věnována zejména antibiotikům, ale také cytostatikům nebo hormonálně aktivním látkám[1].

Je jasné, že využívaná léčiva se dostávají do odpadních vod, a to mnoha způsoby. Svůj podíl má farmakologický průmysl, ačkoliv ten je zatížen nadstandardními nároky na vypouštěné vody[29]. Velká část léčiv ve vodách tedy pochází od jejich spotřebitelů, a to odpadní splaškovou vodou z domácností nebo nemocnic. Také ze zemědělského průmyslu, kde jsou zvířatům podávány některé léky.

Jedná se jak o léčiva po jejich průchodu organismem a po nastalých změnách struktury způsobených metabolismem, tak léčiva v původní formě. To je typické pro zevně používaná léčiva ve formě mastí nebo sprejů. Dochází k oplachu, jak ošetřovaného místa, tak rukou či nástrojů, kterými jsou aplikovány, takže se tyto léčiva dostávají do kanalizace téměř přímo. Obdobně jsou na tom detergenty a hygienické přípravky[26]. Samozřejmě i vnitřně užitá léčiva se mohou dostat do vod, ať už oplachem (rukou, úst, předmětů používaných k manipulaci) nebo po průchodu metabolismem, aniž by byla pozměněna.

Metabolity léčiv jsou velmi rozmanité, z jednoho léčiva jich zpravidla vzniká hned několik. Mohou být více či méně toxické než původní látka. Jejich množství a relativní nepředvídatelnost z nich činí nebezpečný aspekt toxicity léčiv, neboť navyšují počet látek, které je nutné zkoumat[30; 31].

## 2.2.2 Legislativa vypouštění z ČOV

Při vypouštění odpadních vod z komunálních čistíren odpadních vod jsou stanoveny emisní standardy pouze pro některé ukazatele. Jedná se o chemickou i biologickou spotřebu kyslíku a nerozpustné látky. Dále jsou stanoveny emisní limity pro amonné ionty, celkový dusík a celkový fosfor, ovšem pouze pro některé kategorie ČOV. Hodnoty se také liší dle kategorie (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Emisní standardy: přípustné hodnoty (p), maximální hodnoty (m) a hodnoty průměru koncentrace ukazatelů znečištění vypouštěných odpadních vod v mg/l dle NV 401/2015 příloha č. 1 Tab. 1a [28]

Kategorie ČOV (ekvivalentní obyvatelé nebo velikost aglomerace)	CHSK <sub>Cr</sub>		BSK <sub>5</sub>		NL		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		N <sub>celk</sub>		P <sub>celk</sub>	
	p	m	p	m	p	m	Průměr	m	Průměr	m	Průměr	m
<500	150	220	40	80	50	80	-	-	-	-	-	-
500–2000	125	180	30	60	40	70	20	40	-	-	-	-
2001–10000	120	170	25	50	30	60	15	30	-	-	3	8
10001–100000	90	130	20	40	25	50	-	-	15	30	2	6
>100000	75	125	15	30	20	40	-	-	10	20	1	3

Pro farmaceutický průmysl pak existují specifitější emisní limity (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Emisní standardy: přípustné hodnoty znečištění pro odpadní vody vypouštěné z výroby základních farmaceutických výrobků a farmaceutických přípravků, převzato z NV 401/2015 příloha č. 1 Tab. 2 [29]

Ukazatel	Přípustná hodnota p [mg/l]
CHSK <sub>Cr</sub>	250
BSK <sub>5</sub>	40
RAS	350
AOX	0,5
PAU	0,01

V obou případech se jedná o skupinové ukazatele. Při těchto podmínkách tedy zákonitě dochází k vypouštění mnoha různých látek, ač jen v takové míře, aby společně nepřevyšovaly limity. Lze tedy předpokládat, že léčiva mají pouze malý podíl na jejich hodnotě.

Metoda stanovení BSK je navíc náchylná na vliv toxických látek. Oxidace je prováděna přítomnými mikroorganismy. Pokud je tedy ve vzorku přítomna látka s nepříznivým vlivem na mikroorganismy, dojde ke snížení jejich schopnosti oxidace. Tím může BSK vyjít nižší, než kdyby se daná látka ve vzorku nevyškytovala[1].

Určení jednotlivých látek, které se vypouštějí, však není legislativně vyžadováno. Průběžné zkoumání takových detailů by bylo značnou ekonomickou zátěží, proto není realistické toto požadovat. Výjimkou by mohlo být požadování specifitějších kontrol přímo u farmaceutických výrobců. Ty by byly omezené na látky ve výrobě používané nebo vznikající, čímž by byla usnadněna identifikace jednotlivých látek.

Nakládání s odpadem z nemocnic a míst poskytování veterinární péče je upravováno vyhláškou 273/2021 Sb[32]. Ta ukládá, kromě nároků na skladování a nakládání s odpadem, povinnost dekontaminovat infekční odpad. Zamýšleným účinkem těchto procedur je však inaktivace škodlivých

mikroorganismů, ne přímo rozklad přítomných reziduí léčiv; požadavky na účinnost těchto procedur tedy nekontrolují žádné z výše uvedených ukazatelů.

### 2.2.3 Účinnost ČOV

První stupeň čištění představuje mechanické odstranění nerozpustných látek. Nerozpuštěná léčiva jsou typicky malé velikosti, proto nestačí využití česlí či prostého usazování gravitací. Léčiva jsou podporována k dalšímu srážení, buďto chemickou cestou nebo v sekundárním čištění vlivem mikroorganismů v aktivovaném kalu[26].

Pro odstranění léčiv se ukazují efektivními pokročilé oxidační procesy. Těch se používá běžně i pro dezinfekci, ovšem v dávkách, které nejsou schopné plně oxidovat léčiva. Na takové čištění je nutná intenzivnější oxidace. Vhodné je použít kombinaci různých procesů, ať už se jedná o různá chemická oxidační činidla, nebo kombinaci chemických činidel s oxidací UV zářením. Zvláště efektivní je oxidace ozonem[26].

Ne všechny látky ale podléhají oxidaci. Například pro cyklofosamid (cytostatikum) nebo DEET (pesticid, insekticid, častá složka repelentů na komáry) se oxidace nezdá být efektivní. Další úskalí této metody je fakt, že některé látky zoxidují jen částečně. Vznikající meziprodukty nejsou zcela zdokumentované, a proto je dost dobře možné, že budou pro životní prostředí při svém dalším posunu ještě toxičtější než původní látka[26].

Další možností je reverzní osmóza. Její účinnost pro jednotlivé látky je ovšem závislá na mnoha různých vlastnostech látek. Pro dostatečné vyčištění vod je potřeba výkonné zařízení se značnými pořizovacími i provozními náklady[26].

Pro látky nepolární, nenabitě, hydrofobní, nerozpustné a s nízkou molekulární hmotností se uplatňuje adsorpce na aktivní uhlí. Tyto vlastnosti dovolují látkám lépe pronikat do pórů v AU, čímž se více zadržují[26].

## 2.3 Znečištění povrchových vod

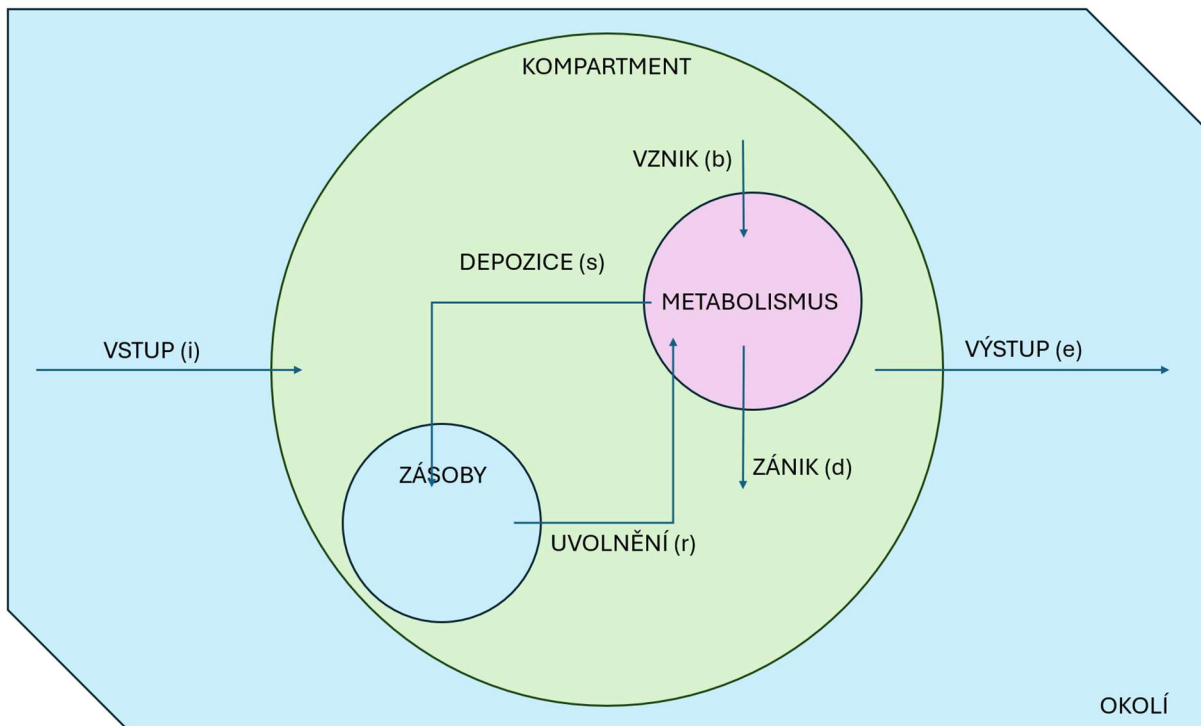
### 2.3.1 Osud polutantů v povrchových vodách

Pro usnadnění popisu pohybu a osudu látek v životním prostředí zavádíme koncept kompartmentů (složek, oddělení). Pomyslně rozdělujeme životní prostředí na menší části, což usnadňuje popis jejich vlastností, jako je hmotnost, objem, nebo koncentrace přítomných toxikantů. Obsažnost kompartmentu závisí čistě na účelu, pro který jej vymezujeme. Jako o kompartmentu můžeme uvažovat o jednotlivé buňce, ale i o celém společenstvu v dané lokalitě; o specifické části vodního toku ale i o toku celém[1].

Ačkoliv kompartment vymezujeme proti jeho prostředí, nemůžeme ho zcela vyjmout ze vztahů s okolím. Základním atributem kompartmentu je rozhraní, které jej odděluje od okolí. Důležité je podotknout, že se může jednat jak o rozhraní na úrovni skutečných fyzikálně-chemických ohraničení, jako jsou biomembrány, hladina vody nebo jiná fázová rozhraní, ale i o rozhraní více pomyslná, například rozhraní mezi společenstvy. Tam nenajdeme fyzickou bariéru jako takovou, ale dochází ke značnému omezení přestupu látek[1].

U rozhraní uvažujeme o jeho rezistenci či permeabilitě. Tyto hodnoty jsou samozřejmě určeny jak prostředím, tak zkoumanou látkou. Závisí také na podmínkách[1].

Jestliže máme vymezený kompartment, který chceme studovat či popisovat, můžeme se zaměřit na tok látek. To je množství látky(látek), které za danou časovou jednotku přejde přes uvažované rozhraní. U většiny látek však nejde omezit celkovou bilanci na pouhé dovnitř a ven, jelikož dochází k dalším procesům.



Obrázek 7: Grafické znázornění bilanční rovnice, převzato[1]

Toto lze vyjádřit i formou bilanční rovnice:

$$\Delta m = m_i + m_b - m_e - m_d \quad (1)$$

Základní složkou látkové bilance je tedy příchod ( $m_i$ ) a odchod ( $m_e$ ); pro většinu látek tvoří největší část celkového množství. Člen  $m_b$  představuje množství látky, které posuzovaný biosystém sám vyrábí. Příkladem účinku tohoto členu je autointoxikace ryb amoniakem. Rybí metabolismus amoniak produkuje jako vedlejší látku a organismus je v dobrých podmínkách schopen sám se s jeho účinkem vyrovnat. Pokud je ale pod dalším stresem, zaostává v odstraňování amoniaku a dochází k otravě. Protičlenem je pak  $m_d$ , tedy množství látky přeměněné na jinou[1].

Pokud dojde k přeměně látky X na látku Y,  $m_d$  pro X se stává  $m_b$  pro Y. Pokud je látka Y toxičtější než M, dochází tím k sekundární toxicitě. Proto pouhý pokles koncentrace zkoumaného toxikantu v kompartmentu nemusí být dobrým znamením.

Celková hodnota (resp. znaménko)  $\Delta m$  tedy určuje, zda dochází ke kumulaci ( $\Delta m > 0$ ), nebo vymývání ( $\Delta m < 0$ ) látky ven. Pro škodlivé látky je z hlediska zdraví kompartmentu výhodnější vymývání, ať už degradací nebo vyloučením; u živin je to naopak. Samozřejmě vše, co opustí kompartment, se pouze přesouvá do jiného[1].

Důsledkem kumulace v živých organismech jsou procesy biokoncentrace, bioakumulace a biomagnifikace. Pokud jde příjem do těla přímo, tedy ne potravou, zejména v akvatické toxikologii[1] používáme termínu biokoncentrace. Definice bioakumulace se již v různých zdrojích mírně liší. Zahrnuje buďto příjem pouze potravou[1] nebo kombinací potravy a přímého vstupu[33], případně neznámým mechanismem[4]. Biomagnifikace je pak zvýšení koncentrace škodlivé látky s rostoucí úrovní v potravním řetězci skrz jednu nebo několik trofických úrovní[33].

Speciálním příkladem je pak mezicyklus deponování ( $m_s$ ) a uvolňování ( $m_r$ ) ze zásob. Látka se na nějakou dobu uloží mimo hlavní metabolismus, kde nezpůsobuje velkou újmu na zdraví kompartmentu.

Pak se ale, většinou změnou podmínek, začne uvolňovat zpět. Jedná se tedy jen o přechodné oddálení její toxicity[1].

Zásobárna, ve které se látka ukládá, se liší dle kompartmentu. Pro organismy se typicky jedná o tukovou tkáň, kam se ukládají lipofilní látky[33]. Zde dochází k uvolnění jako následek stresu, typicky hladu, který způsobí využití tukové zásoby a tím uvolnění látky zpět do metabolismu.

Pro kompartmenty zahrnující i biotop je typické ukládání do půdy; zvláště do dnových sedimentů. U nich dochází k uvolnění, pokud se změní fyzikálně-chemické vlastnosti okolní vody. Změna pH, oxidačně-redukčního potenciálu, ale i jednotlivé látky ve vodě se vyskytující, způsobují odvázení toxikantu od půdy a jeho vstup zpět do vody.

Kterému z těchto osudů bude látka nejvíce podléhat a jakým specifickým mechanismem záleží na mnoha faktorech; důležité jsou jak vlastnosti okolí, tak látky.

Za jednu z nejdůležitějších vlastností látky se dá považovat rozpustnost ve vodě. Je nasnadě, že látky s větší rozpustností budou schopné se ve vodě pohybovat mnohem snáz, stejně tak jejich koncentrace může být vyšší. Rozpustnost samotná ovšem nemusí znamenat vše. Látky ve vodě nerozpustné nebo hydrofobní se mohou sorbovat na jiné nerozpustné částice a být přenášeny s nimi. Dále může samovolně dojít ke konsolvaci. To je proces, kdy se látka nejprve rozpustí v dalším rozpouštědle, které je pro ni vhodné; pro léčiva organického původu se typicky jedná o organická rozpouštědla. Rozpouštědlo pak musí být mísitelné s vodou, čímž dojde k přimísení dané látky do vodního toku[34].

Hlavně v rychleji tekoucích vodách má velký vliv proud a jím způsobené promíchání vody. V pomalu tekoucích nebo stojatých vodách dochází mnohem snáze k poklesu látek ke břehu, kde zůstávají a neputují dále s proudem. V rychlejších vodách tomu proud brání, a dokonce vyzvedává ze dna sediment, který se posouvá dále.

Krom usazování nerozpuštěných látek dochází i k sorpci na sediment. I zde má velký vliv rychlost proudu. Krom doby, kterou látka stráví na daném místě, totiž ovlivňuje i charakter sedimentu. V pomalejších tocích, popřípadě ve vnitřních částech říčních meandrů, se nachází hrubší částice. Naopak rychlé toky a vnější strany meandrů si podrží i jemné částice; navíc mají vyšší podíl organické hmoty[1].

Zrnitost sedimentu je důležitá pro jeho sorpční vlastnosti. Hlavně jílovité materiály mají vysoké sorpční vlastnosti. Dále dochází k sorpci na organickou hmotu přítomnou v sedimentech, zejména zde interagují těžké kovy nebo lipofilní organické látky. Pokud měříme sorbci na organickou hmotu, převádíme její obsah většinou na TOC[1].

Sorpce na organický uhlík je významnou částí samočisticí schopnosti vodního ekosystému[1]. Umělou obdobou tohoto procesu je adsorpce na aktivní uhlí. Ta se ukazuje jako jedna z dobře využitelných metod čištění odpadních vod. Zejména pro léčiva se zdá mít dobré výsledky[26].

Ve vodě je také prominentní vliv hydroxidů železa a hliníku. Ty koagulují s těžkými kovy a organickými látkami[1]. I zde lze najít napojení na čištění odpadních vod podporou této koagulace[34].

Dalším úkazem typickým pro vody je volatilizace. Z kapalných látek se stávají plynné, opouští tedy vodní tok a přechází do ovzduší[1]. Látky, které tomuto jevu podléhají snadno, nazýváme volatilní; z velké většiny se jedná o organické materiály, typicky rozpouštědla.

Volatilizace a depozice (její protijev) jsou závislé na tlaku páry nad kapalinou. Z toho důvodu se do nich promítá krom vlastností látky i teplota prostředí. A to tak, že volatilizace preferuje vyšší teploty, naopak v nižších teplotách dochází k depozici. To dodává těmto procesům sezónní charakter. Navíc dochází ke vzniku takzvaných „teplotních pastí“. V teplejších oblastech se do ovzduší dostanou polutanty. Vzdušnými proudy jsou pak přeneseny na chladnější místa, kde díky poklesu teploty dochází k depozici.

Tím se zvyšuje koncentrace polutantů, a to mnohdy i na místech velmi vzdálených oblastem, kde znečištění vzniklo. Tento jev má významný vliv na polární oblasti, ale dochází k němu i v menším měřítku[1].

U povrchových vod vystavených slunečnímu záření dochází k fotolýze mnoha látek. Míra fotolýzy je do velké části závislá na prosluněnosti vody; probíhá tím výrazněji, čím blíže k hladině ji sledujeme. Velký vliv má tedy zákal – díky němu neprojde sluneční záření tak hluboko. Dále přispívá vegetace, ať už rostliny samotného vodního toku, nebo okolní vegetace na břehu, která zastíňuje vodní tok[1].

Fotolýza je jak důležitou součástí samočisticí schopnosti vod[1], tak prominentní technologií k odstranění polutantů[26]. Degradace některých látek je dokonce patrná i během průběhu testování akutní ekotoxicity[31].

Jelikož jsou povrchové vody obohaceny o mnoho dalších sloučenin, můžou látky procházet mnoha chemickými přeměnami. Častá je hydrolýza nebo různé oxidačně-redukční reakce. O jaké reakce se jedná a jaká bude rovnováha mezi nimi záleží na pH, redoxním potenciálu vody a všech přítomných látkách[1].

Mnoho přeměn nebo posunů látek v životním prostředí je řízeno organismy a účinky jejich metabolismu. Pokud je organismus schopen změnit přijímaný polutant, dochází k jeho biodegradaci. Snaha změnit strukturu látky je jednou ze strategií, jak se vyrovnat s přítomností škodlivé látky v těle. Ve vodě je prominentnější biodegradace anaerobními metabolickými drahami, aerobní biodegradace ale probíhá taktéž a pro některé látky může být nutná[1].

### **2.3.2 Vliv polutantů, zejména léčiv, na povrchové vody**

Účinek polutantů nejrůznějších druhů můžeme ve vodách dělit na přímý a nepřímý. Přímý znamená toxické účinky, které jsou důsledkem interakce polutantu s daným organismem, ať už pozřením nebo pouhým kontaktem. Nepřímé vlivy jsou pak změny vlastností vody, ve které se organismus nachází. Na organismus samotný pak má vliv až tato změna. Může se jednat změny různého charakteru, typicky jde o pH, světelný nebo kyslíkový režim a trofii. Například znečištění živinami, jako jsou dusík nebo fosfor, vede k eutrofizaci. Pouze vyšší koncentrace živin nemusí být toxická pro celou řadu organismů. Je však velmi příznivá pro celou řadu mikroorganismů a vede k jejich přemnožení, což má pak negativní vliv na ekosystém[34].

Vzhledem k současným opatřením a emisním limitům se nezdá, že by léčiva způsobovala závažné akutní toxické účinky. Odtoky z čistíren vod se navíc vypouštějí do vodních toků o větším průtoku, takže dochází poměrně rychle ke zředění na úroveň, které nejsou schopné vyvolat akutní toxicitu.

Posouzení chronického vlivu většiny farmakologických sloučenin na životní prostředí a na člověka je značně komplikované. Samozřejmě je možné změřit různé hodnoty, jako je LOEL, NOEL nebo EC<sub>50</sub> po delší dobu.

Tyto výpočty ovšem problémy neřeší zcela. Doba, po kterou je efekt studován, bude nutně relativně krátká, alespoň oproti délce existence ekosystému. Je tedy možné, že i výskyt koncentrace pod NOEL stanovenou experimentálně po dobu celých měsíců bude nakonec mít negativní účinky na životní prostředí v řádu let.

U některých látek, zejména těch s mutagenním či teratogenním účinkem (typicky cytostatika) předpokládáme bezprahový účinek. Narážíme tedy na stejný problém.

Co se samotných mechanismů vlivu na vodní organismy týče, lze pravděpodobně najít látky způsobující všechny představitelné druhy toxicity.

Léčiva jsou, co do účinků, poměrně specifická. Jelikož se jedná o látky využívané právě pro jejich účinek na lidský metabolismus, mnoho z nich se v životním prostředí chová analogicky jejich terapeutickým účinkům. Vzhledem k odlišným dávkám a specifickým vlastnostem druhů se ale většinou jedná pouze o vliv na stejnou orgánovou soustavu.

Gunnarsson et al. [35] porovnali dostupné NOEC pro různé API na různých taxonomických úrovních. Jmenovitě se jednalo o *Danio reio* (ryba), *Daphnia pulex* (korýš) a *Chlamydomonas reinhardtii* (zelená řasa). Co se látek s účinkem specifických pro taxon týče, nejvíce bylo ovlivněno *D. reio*, *C. reinhardtii* pak nejméně. Příčinou je patrně fakt, že *D. reio* má až přes 90 % znaků ortologických těm, na které zkoumané API cílí u člověka. Pro *D. pulex* se jedná o 64 %, pro *C. reinhardtii* pouze 34 %. V případě látek, pro které měly příslušné ortologické znaky všechny tři organismy, se citlivost zdála porovnatelná.

Vynikajícím příkladem je dobře zdokumentovaný vliv hormonálních antikoncepcí, jako je syntetický hormon 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2). Mechanismus jeho působení (ať už jako léčiva nebo polutantu) leží v zastupování 17 $\beta$ -estradiolu (E2)[36]. Pokud je přítomen v prostředí, přidává se v organismu k estrogeneru produkovanému zdravou soustavou a způsobuje jeho zdánlivou nadměrnou hladinu.

Organismus ale musí mít hormonální soustavu, kde existuje látka, kterou může EE2 nahrazovat. Většina studií zabývajících se akvatickou ekotoxicitou EE2 tedy využívá ryby [37; 38]. Drasticky méně zastoupené jsou jiné fylogenetické skupiny, ale lze najít studie ukazující na endokrinní disrupci i u obojživelníků[39] nebo mlžů[40]. Obdobná situace nastává u gestodenu (GES), což je progestin využívaný podobně jako, nebo často i zároveň s, EE2[41].

Cytostatika také způsobují toxicitu analogickou jejich využití při léčbě rakoviny. V lékařství se používají pro léčbu rakoviny tím, že napadají rakovinové buňky zásahem do jejich dělení a funkcí jejich DNA[42]. Ačkoliv je vyvíjena snaha vytvářet cytostatika s účinkem specifickým pro člověka (resp. rakovinové buňky v něm), není toho prozatím dosaženo. Procesy replikace a exprese DNA jsou základem živých soustav a jsou pro všechny společné, proto většina cytostatik vykazuje genotoxicitu i pro další organismy[42; 31]. Účinek je tedy mnohem méně druhově specifický než u výše zmíněných hormonálně aktivních látek.

Například ibuprofen pak má jiný vliv na bezobratlé než na člověka. Principem jeho terapeutického účinku je inhibice enzymů (dva druhy cyklooxygenáz), které se podílejí na tvorbě prostaglandinů. Tyto lipidy jsou u obratlovců důležité pro řízení zánětů a bolesti, snížení jejich produkce tedy omezuje tyto procesy[28; 43].

U bezobratlých však prostaglandiny regulují zcela jiné procesy. Jedná se především o regulaci tělesné teploty, toku iontů, reprodukci a shlukování buněk, dále i interakce mezi parazity a hostitelskými organismy[44]. Ačkoliv je tedy počátek mechanismu (inhibice cyklooxygenáz) podobný, výsledné jevy a jejich mechanismy se od těch terapeutických značně liší. Ačkoliv se v ČOV těžko odstraňuje, je vysoce biodegradabilní a vykazuje velkou schopnost přecházet do biomasy rostlin[45].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiály a metody

#### 3.1.1 MicroBioTests toxkity

Pro samotné provedení testů byly zvoleny toxkity od společnosti MicroBioTests. Jedná se o sady zahrnující téměř vše potřebné k provedení testů, tedy většiny vybavení a chemikálií, včetně instrukcí. Při dodržení instrukcí pak všechny testy provedené pomocí toxkitů splňují ISO normy příslušné pro daný druh testu[46; 47].

Součástí je také „specification sheet“, kde je vedle data spotřeby a sériových čísel látek i organismů uvedena i referenční hodnota pro standardizaci na látku uváděné metodikou.

Velkou výhodou je jednoduchost jejich provedení. S výjimkou chemikálií potřebných k standardizaci a základního vybavení, jako jsou kádinky nebo odměrné baňky, je vše obsaženo v jednom balíčku. To snižuje nároky na vybavení pracoviště, vyškolenost pracovníků a logistickou zátěž přípravy testu. Vyžadují mnohem méně příprav než klasické testy a jsou tedy časově výhodnějšími.

Chemikálie potřebné k přípravě živných médií jsou také součástí balíčku; kvalita je dostačující pro naplnění podmínek ISO norem.

Další velkou výhodou je, že s použitím toxkitů odpadá nutnost vlastního chovu testovaných organismů. Pokud laboratoř nevyužívá dané organismy pravidelně, často a v dostatečném množství, stává se nutná údržba chovu velkou zátěží v poměru k testům, které jsou provedeny. Zvláště u organismů vyžadujících každodenní péči.

V toxkitech jsou však organismy obsaženy v potřebném množství a uchovány v dormantních stádiích. Lze je tedy přechovávat po poměrně dlouhou dobu – přesná trvanlivost se liší dle organismu. Péče o organismy je vyžadována jen pro jejich inkubaci, která je také velmi nenáročná. Její délka se liší dle druhu, ale jedná se o nanejvýš pár dní. Je tedy možné je jednoduše použít pro občasně testy s menší nutnou dobou přípravy než zavedení nového chovu. Výrobce navíc zaručuje stabilnější kulturu, takže je konečný výsledek méně ovlivněn individualitou chovu[46][47].

##### 3.1.1.1 Duckweed toxkit F

Tento alternativní test využívá namísto tradičního organismu *Lemna minor* rostlinu *Spirodela polyrhiza*. Její citlivost pro tento druh testu (akutní akvatická toxicita) je na úrovni citlivosti *Lemna minor* (při testu provedeném dle ISO 20079[48]), splňuje normu ISO 20227[49]. Test samotný ale trvá pouze tři dny namísto sedmi[47].

Popisovaný postup byl založený na brožurách přiložených k toxkitům[16].

Růstové medium používané v tomto testu bylo analogické Steinbergovu médiu používaném v testech podle ISO 20079[48]. Bylo připraveno z koncentrovaných roztoků dodávaných v toxkitu jejich smícháním v daném poměru a následným zředěním destilovanou vodou na správnou koncentraci. Medium lze uchovávat v chladu pouze po dobu několika týdnů[16].

Turiony dodávané v toxkitu byly opláchnuty na mikrosítku destilovanou vodou, poté byly Steinbergovým médiem spláchnuty na Petriho misku tak, aby v ní bylo obsaženo 30 ml média. Následně byly inkubovány po tři dny při 25 °C a 6 000 lux[16].

Následně byla přiložená testovací destička naplněna příslušnými roztoky vzestupné koncentrace po 1 ml v každé jamce. Jedna řada byla vždy obsazena stejnou koncentrací. Jamky byly poté každá osazena jedním turionem. Bylo důležité zabránit selektivnímu vybírání největších turionů a zajistit rovnoměrné

rozložení jejich velikostí mezi koncentracemi. Pro vyhodnocení dat byla pořízena digitální fotografie celé destičky s co největším přiblížením, aniž by docházelo ke zkreslení jejího tvaru[16].

Konečná inkubace byla prováděna také tři dny za stejných podmínek (25 °C, 6 000 lux). Po jejím ukončení byla destička znovu fotografována[16].

Výsledky byly vyhodnoceny z fotografií s pomocí počítačového programu ImageJ. Jeho použitím byla na fotografii změřena plocha největšího listu (přepočtena z pixelů na skutečné měřítko v mm<sup>2</sup>). Z porovnání velikosti listu před (t<sub>0</sub>) a po (t<sub>72</sub>) testu byla získána EC<sub>50</sub> pomocí SW Excel; samotná tabulka s předlohou veškerých výpočtů byla dodána výrobcem MicroBioTests Inc. na požádání.

Výpočet byl proveden stanovením rozdílu mezi t<sub>72</sub> a t<sub>0</sub> pro každou jamku. Jestliže byla zjištěná plocha v t<sub>72</sub> menší než v t<sub>0</sub>, byla tato hodnota považována za chybu v stanovení ploch a případná záporná hodnota byla nahrazena nulou. Tyto rozdíly byly poté pro každou koncentraci zprůměrovány a jejich porovnáním s nárůstem kontroly dle rovnice

$$EC_i = \frac{S_{kontrola} - S_i}{S_{kontrola} \cdot 100} \quad (2)$$

byla stanovena procentuální inhibice[16]. Dále byla pomocí regrese vypočtena 72h EC<sub>50</sub>, včetně limitů 95% jistoty[16].

Standardizace byla provedena roztokem KCl (PENTA s. r. o.; číslo šarže 2901050124) o koncentracích mezi 1 800 a 18 000 mg/l. Pro testy toxicity vzorku vody byl nejprve připraven roztok testovaného média obohacený o živiny. Byly použity stejné chemikálie ve stejném poměru, jako pro přípravu Steinbergova média. Tím byla tedy nejvyšší možná použitá koncentrace 93,80 %, ne 100 %. Poté byla připravena ředící řada vždy dvojnásobným ředěním Steinbergovým médiem, a to na rozsah koncentrací 93,80–5,68 %[16].

Test na chemické látky byl dle metody prováděn ve dvou provedeních. V počátečním (orientačním) testu byla zahrnuta příprava koncentrační řady látky v Steinbergově médiu o koncentracích 0,01–100 mg/l. Po vyhodnocení výsledků byl proveden definitivní test s koncentrační řadou vycházející z orientačního testu. Ideální byl rozsah mezi koncentracemi způsobujícími 10% a 100% účinek, pokud bylo těchto hodnot dosaženo, případně v rovnoměrném rozložení kolem předpokládané EC<sub>50</sub>[16].

### 3.1.1.2 *Thamnotoxkit F*

Toxkit je prováděn na žábřonožce *Thamnocephalus platyurus* a je upravován normou ISO 14380[12].

Pro přípravu ředící řady i pro líhnutí cyst bylo použito standardní medium. Ta bylo připraveno z lahvíček příslušných chemikálií, které byly přiložené k toxkitu, jejich smícháním a doplněním po rysku v jednolitrové odměrné baňce destilovanou vodou. Standardní medium bylo skladováno ve tmě a chladu. Před použitím bylo nutné je 15 minut probublávat vzduchem, aby se zajistil dostatečný obsah kyslíku[50].

Cysty byly líhnuty hydratací ve standardním médiu zředěném v poměru 1:8 destilovanou vodou. Zkumavka s cystami byla naplněna tímto roztokem a po 30 minut byla průběžně protřepávána. Následně byl obsah zkumavky přidán k 10 ml líhnoucího média na Petriho misce a byl inkubován při 25 °C a 3 000–4 000 lux po dobu 20 až 22 hodin[50].

Testovací destička byla po sloupcích naplněna příslušnými koncentracemi testovaných látek. Aby se zamezilo ředění testované látky při přenášení larev, byla jedna z jamek použita jako promývací. Bylo do ní přeneseno zhruba 50 larev. Následně bylo vždy 10 odebráno do každé z dalších jamek příslušné koncentrace. Při manipulaci byla nutná obezřetnost a citlivé nakládání s organismy, dále bylo třeba přenášet co nejméně roztoků[50].

Destička byla zakryta parafínovou fólií a víkem; inkubována byla po 24 hodin ve tmě a při 25 °C. Pro vyhodnocení byly spočítány mrtvé larvy v každé jamce, tedy larvy nevykazující žádný pohyb ani po 10 sekundách pozorování. Test byl považován za validní, pokud v kontrole nebyla přesažena 10% mortalita[50].

Standardizace byla provedena na roztoku K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (PENTA s. r. o.; číslo šarže 2904290424) o rozpětí koncentrací mezi 0,032 a 0,32 mg/l. Přímá toxicita byla stanovována se sérií dvojnásobných ředění testovaného média (100 % až 6,25 %). Testy na chemických látkách byly provedeny dle metodiky ve dvou stupních: předběžný test a definitivní test. V rámci této práce byl ale využit jen předběžný test, který má zkoumat rozsah koncentrací 0,01 až 100 mg/l[50].

### 3.2 Testované látky

Největší část vzorků zkoumaných v této práci představovaly vzorky reálných vod.

Dále byly provedeny i testy na chemických látkách, aby bylo možné porovnat spolehlivost výsledků takového testu s výsledky přímé toxicity. Pro tento účel byl zvolen dichroman draselný a dále zástupce léčiv jakožto polutantů v dnešní době hojně zkoumané.

#### 3.2.1 Vzorky vod

Přímá toxicita vod byla stanovována na několika odlišných vzorcích.

Práce s přítokem na ČOV byla zatížena značnými riziky, neboť se jedná o komunální odpadní vody nesoucí s sebou značné riziko infekcí a nakažlivých chorob. Tato práce se navíc zabývá vodami povrchovými, ne odpadními. Proto byl zkoumán pouze jeden vzorek odpadních vod, a to za účelem posouzení vlivu čistíren na toxicitu vod. Při práci bylo dbáno vyšší opatrnosti a byly použity rukavice a respirátor jako bezpečnostní pomůcky pro zabránění přenosu infekce.

V ostatních případech se jednalo o odtoky z ČOV.

V prvních testech se ukázalo, že většina vzorků vykazuje velmi nízkou toxicitu pro oba organismy. Jelikož se dala předpokládat podobná odezva, u některých dalších vzorků bylo z důvodu šetření materiálem upuštěno od koncentrační řady předepsané metodikou. Testy pak byly prováděny na 100% vzorku, případně na 100% a 50%.

##### 3.2.1.1 Popis vzorků

Pro rozlišení vzorků bylo každému přiřazeno označení ve formátu DD\_MM („O“ pokud se jednalo o odtok, „P“ pokud se jednalo pro přítok)\_pořadové číslo či jiné další upřesnění.

Tabulka 3: Označení vzorků včetně datumů odběru a nasazení

Označení vzorku	Datum odběru	Datum nasazení	Způsob odběru	Místo odběru
12_01_O	12. 1.	13. 1.	J	ČOV Modřice
26_01_O	26. 1.	28. 1.	J	ČOV Modřice
03_02_O	3. 2.	5. 2.	J	ČOV Modřice
04_02_O	4. 2.	5. 2.	J	ČOV Modřice
23_03_O_1	23. 3.	24. 3.	P	ČOV Modřice
23_03_O_2	23. 3.	24. 3.	P	ČOV Modřice
23_03_P	23. 3.	24. 3.	P	ČOV Modřice

V tabulce 3 „J“ značí jednorázově odebrané vzorky; ty byly odebírány do plastových vzorkovnic. Vzorky „P“ byly sestaveny z dílčích vzorků odebíraných po 30 minutách v průběhu 24 hodin. Průtok

byl zanedbán, objemy dílčích vzorků byly vždy stejné. Tím se liší od všech tří typů směsných vzorků stanovovaných v NV č. 401/2015 Sb. Příloha 4[29]. Pro odběr byl použit vzorkovač ISCO 6712[51].

Vzorky odebírané u ČOV Modřice byly odebrány v bezprostřední blízkosti výustního objektu (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Místo odběrů u výustního objektu ČOV Modřice

### 3.2.2 Toxicita léčiv

Při výběru léčiva, jehož toxicitu bude tato práce mimo jiné zkoumat, bylo zohledněno několik faktorů.

Nejprve se muselo jednat o léčivo běžně dostupné bez lékařského předpisu, aby jej bylo možné získat a pracovat s ním. Proto byla zahrnuta některá další léčiva, jako jsou cytostatika nebo hormonální steroidy, ačkoliv obecně vykazují vysokou toxicitu a jsou v současnosti velmi zkoumaná. Dále bylo vybíráno léčivo, jehož přítomnost ve vodě je prokázána a pro jehož akvatickou toxicitu existují podpůrné prameny. Proto byl vybrán ibuprofen, přesněji ve formě Ibalginu<sup>®</sup> coby jeho neznámější a nejdostupnější formy na českém trhu. Použity byly tablety Ibalgin<sup>®</sup> (400 mg).

Dle příbalové informace je v přípravku nadála obsažena „mikrokrystalická celulóza, kukuřičný škrob, sodná sůl kroskarmelosy, magnesium-stearát, koloidní hydratovaný oxid křemičitý, v potahové vrstvě: hypromelosa 2910/3, makrogol 6000, mastek, oxid titaničitý (E 171), sodná sůl erythrosinu (E 127), simetikonová emulze SE 4“. Výrobce udávaný obsah účinné látky je 400 mg v tabletě. Váha tablety přípravku Ibalgin<sup>®</sup> byla zprůměrováním váhy 10 tablet stanovena jako 0,617 g. Pro získání 1 g ibuprofenu bylo tedy nutno použít 1,54 g rozdrcených tablet.

Za těchto předpokladů byla připravena navážka s obsahem ibuprofenu odpovídající metodice daného toxkitu. Rozpustnost ibuprofenu v čistě vodním prostředí se ukázala být mnohem menší, než vyžadovala metodika pro oba využívané testy. Hledání vhodného ředidla pro konsolvaci by představovalo přílišnou komplikaci, proto byla zvolena alternativa přípravy ředící řady.

Původní roztok byl připraven dle návodu uvedeném v dané metodice pro test na chemické látce. Následně byl přefiltrován, než byl podroben dalšímu ředění, a to filtrací na nuči s fritou a přes filtrační papír (porozita 0,4  $\mu\text{m}$ ). Jelikož nerozpuštěná část klesala ke dnu, lze říct, že by její přítomnost neměla na organismy na hladině či volně se pohybující ve vodním sloupci přílišný vliv, alespoň při používaném rozložení testu. Tímto přístupem byly značně zkresleny koncentrace, které se v testu ve skutečnosti nachází. Proto byla pro popis koncentrací použita procenta, stejně jako u testech na vzorcích vod. Za 100% považujeme roztok, který by v případě ideální rozpustnosti měl požadovaných 100 mg/l.

### **3.2.3 Dichroman draselný**

Dichroman draselný je vysoce toxickou látkou používanou v mnohých biotestech jako standardní látka. Jeho toxicitou se zabývá značná část vědeckých prací a pro většinu běžně využívaných organismů lze najít údaje o jeho toxicitě. Proto byl zvolen jako látka, na níž bude posouzena citlivost obou biotestů.

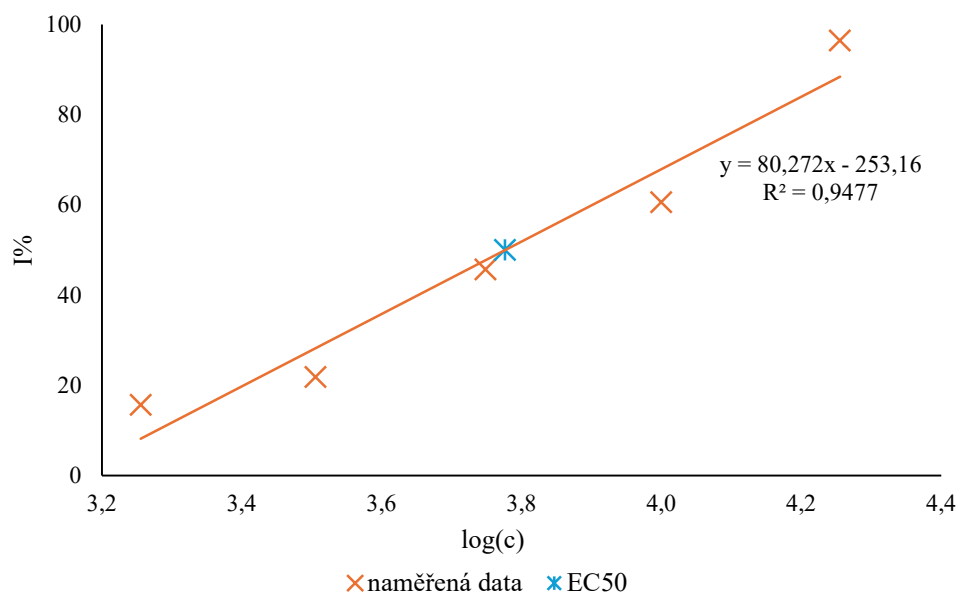
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Standardizace

Pro *Spirodela p.* byla provedena standardizace na KCl v rozmezí koncentrací 1 800–18 000 mg/l. Provedení standardizace bylo důležité převážně z důvodu vlivu podmínek, zejména intenzity osvětlení, na růst listů.

Tabulka 4: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro standardizaci na KCl

c [mg/l]	k	1 800	3 200	5 600	10 000	18 000
t72-t0 [mm <sup>2</sup> ]	9,780	7,250	7,038	4,613	3,213	0,513
inhibice [%]		25,87	28,04	52,84	67,15	94,76



Obrázek 9: Graf závislosti  $I\% = f(\log(c))$  a odhadovaná  $EC_{50}$  pro standardizaci

Z výpočtů byla stanovena  $EC_{50}$  jako 5 978,85 mg/l s rozmezím 95% jistoty 2 614,17–13 674,18 mg/l. Výrobce toxkitu udává referenční hodnotu  $EC_{50}$  jako 5 514 mg/l, rozmezí 95% jistoty je 4 635–6 267 mg/l. Stanovená  $EC_{50}$  byla v rámci 95% jistoty přijatelná, proto byla standardizace považována za úspěšnou.

Využití Thamnotoxkitu bylo již v laboratoři zavedeno, proto bylo od standardizace upuštěno v rámci šetření materiálu a času.

### 4.2 Vzorky vod

#### 4.2.1 12\_01\_O

Na tomto vzorku byl sledován pouze vliv na *Spirodela p.*

Tabulka 5: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro vzorek 12\_01\_O

c [%]	k	5,86	11,72	23,45	46,90	93,80
t72-t0 [mm <sup>2</sup> ]	20,040	22,769	20,582	17,933	18,678	19,561
inhibice [%]		-13,62	-2,70	10,51	6,80	2,39

Dle výpočtů by 72h EC<sub>50</sub> bylo dosaženo s 88 548,95% koncentrátem vzorku, rozmezí 95% jistoty je 0,67 %–11 765 155 148,64 %. Taková šíře 95% jistoty je neslučitelná s výpovědní hodnotou výsledku.

Rozdíly mezi nárůsty listů jsou také zcela minimální a ve dvou z pěti koncentrací listy dokonce narostly více než v kontrole. Vzhledem k blízkosti získaných hodnot je však tato odchylka velmi nevýznamná a spíše, než o hormesi se jedná o odchylku způsobenou individuálními vlastnosti organismů. To podporuje i velké rozpětí 95% jistoty EC<sub>50</sub> získané výpočtem.

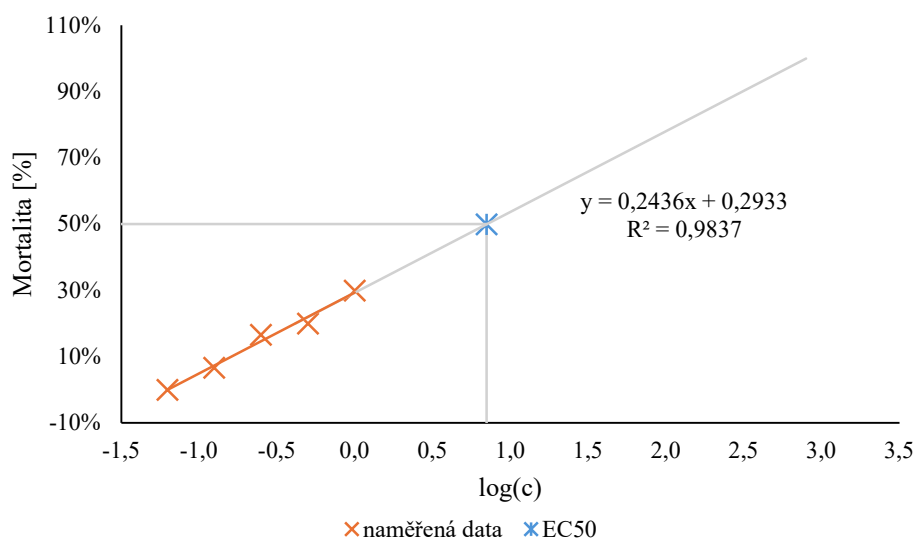
Lze tedy usoudit, že vzorek nezpůsobil žádnou měřitelnou akutní přímou toxicitu.

#### 4.2.2 26\_01\_O

Na tomto vzorku byla provedena pouze analýza pomocí Thamnotoxkit F.

Tabulka 6: Mortalita [%] pro vzorek 26\_01\_O

c [%]	k	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
mortalita [%]	3,33	0,00	6,67	16,67	20,00	30,00



Obrázek 10: Graf závislosti mortalita[%]=f(log(c))

Proložení závislosti procent mortality na logaritmu koncentrace lineární křivkou byla získána rovnice

$$y = 0,2436x + 0,2933 \quad (3)$$

Pro získání 24h LC<sub>50</sub> bylo dosazeno za y 50 % (respektive 0,5) a výsledné číslo bylo převedeno zpět na lineární formát:

$$y = \frac{0,5 - 0,2933}{0,2436} = 0,8484 \quad (4)$$

$$LC_{50} = 10^{0,8484} = 705,27 \% \quad (5)$$

Nutno podotknout, že LC<sub>50</sub> je velmi vzdálená od reálně naměřených hodnot, proto je nespíš poměrně nepřesná. Jedná se spíše o odhad.

Vzorek vykazuje pro *Thamnocephalus p* velmi zřetelně toxicitu. Jedná se však o slabý efekt – 24h LC<sub>50</sub> by vyžadovala 705,27% koncentraci vzorku a samotný vzorek při 100% koncentraci způsobil jen 30% mortalitu.

#### 4.2.3 03\_02\_O; 04\_02\_O

Na obou vzorcích byla provedena zkouška pouze na *Thamnocephalus p.*

Tabulka 7: Mortalita [%] pro vzorek 03\_02\_O

c [%]	k	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
mortalita [%]	0	0	0	13	3	3

Tabulka 8: Mortalita [%] pro vzorek 04\_02\_O

c [%]	k	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
mortalita [%]	0	7	0	0	10	7

Jak je z tabulek patrné, mortalita u obou vzorků nevykazuje žádný dobře pozorovatelný trend. Navíc mortalita pod 10 % (tedy 3 z 30) je přípustná i v kontrole, aniž by tím byla narušena validita testu. Tuto hodnotu přesahuje pouze 25% roztok 03\_02\_O s 13% mortalitou (4 z 30).

Výsledky tedy naznačují, že ani jeden ze vzorků nevykazuje akutní toxicitu pro *Thamnocephalus p.* Úmrtnost organismů byla pravděpodobně způsobena podmínkami testu nebo neopatrným zacházením při přenášení larev.

#### 4.2.4 23\_03\_O\_1; 23\_03\_O\_2; 23\_03\_P

U všech těchto vzorků, odebraných ve stejný den, byla provedena analýza na obou organismech (*Thamnocephalus p.*, *Spirodela p.*). Vzhledem k předchozím testům, kde se odtoky z ČOV neukázaly jako velmi toxické, bylo předpokládáno, že i zde bude toxicita patrná nanejvýš ve vysokých koncentracích. V zájmu ušetření materiálu byla tedy metodika upravena tak, že byly nižší koncentrace zcela vynechány z testování.

Tabulka 9: Mortalita [%] pro vzorky 23\_03\_O\_1 a 23\_03\_O\_2

c [%]	k	(23_03_O_1) 25	(23_03_O_1) 50	(23_03_O_1) 100	(23_03_O_2) 50	(23_03_O_2) 100
mortalita [%]	0	0	0	0	0	0

Tabulka 10: Mortalita [%] pro vzorek 23\_03\_P

c [%]	k	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
mortalita [%]	0	0	0	0	0	100

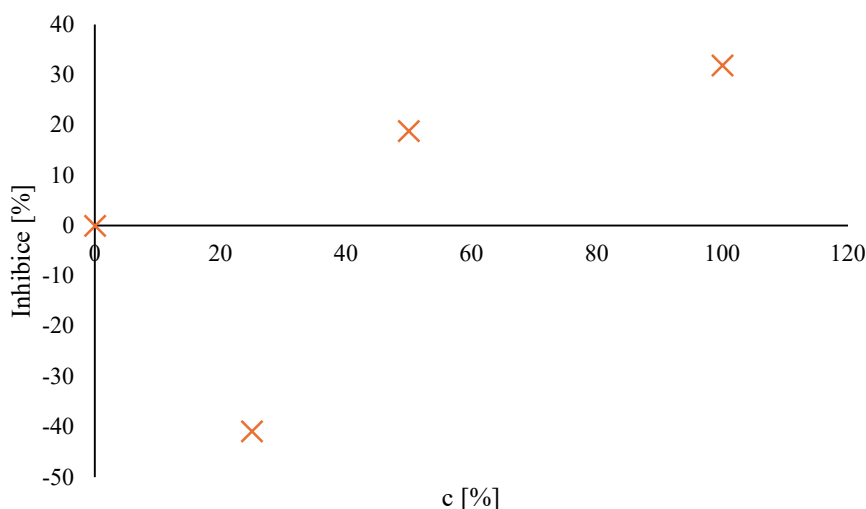
Tabulka 11: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro vzorky 23\_03\_O\_1, 23\_03\_O\_2 a 23\_03\_P

c [%]	k	(23_03_O_1) 100	(23_03_O_2) 100	(23_03_P) 25	(23_03_P) 50	(23_03_P) 100
t72-t0	11,553	9,754	11,038	16,280	9,377	7,869
%inhibice		15,57	4,46	-40,91	18,84	31,89

Pro oba vzorky odtoku nedošlo k žádné úmrtnosti *Thamnocephalus p.*, ani ve zcela nezředěné formě. Oba tedy pro tento organismus nevykazují akutní toxicitu.

Jejich vliv na *Spirodela p.* už je patrnější. Ovšem v případě 23\_03\_2 je prakticky zanedbatelný: průměr ploch listů se od kontroly liší o pouhých 0,515 mm<sup>2</sup>, tedy inhibice o 4,46 %, což je odchylka zcela statisticky nevýznamná, jestliže byl obsah listů měřen lidskou rukou. Pro 23\_03\_1 je už rozdíl průměrů 1,799 mm<sup>2</sup>, což stanovuje procento inhibice jako 15,57 %. Takovou hodnotu už lze považovat za průkaznou.

Přítok na ČOV způsobil vyšší odezvy. V nižších koncentracích (do 50 %) neměl na *Thamnocephalus p.* žádný účinek, 100% koncentrace však vyvolala 100% úmrtnost. Jelikož je nutné vzorek zpracovat do 24 h po odběru a test samotný trvá 24 h, nemohl být proveden další test pro bližší určení LC<sub>50</sub>, aniž by hrozilo, že by se do výsledků promítly změny vzorku způsobené prodlevou. Lze tedy jen říct, že leží někde mezi 50% a 100% koncentrací vzorku odpadní vody. Zároveň lze říct, že již po zředění povrchovou vodou v poměru 1:1 se pro *Thamnocephalus p.* ztrácí veškerá akutní toxicita.



Obrázek 11: Graf závislosti  $I\% = f(c)$  pro 23\_03\_P

Pro *Spirodela p.* dochází u vzorku 23\_03\_P k velmi silné hormesi. Při 25% koncentraci vykazovaly rostliny až 40% stimulaci růstu. Pro koncentrace 50 a 100 % už nastává inhibice, nanejvýš ale 31,89 %. Stimulační efekt lze pravděpodobně vysvětlit vysokým množstvím živin přítomných v odpadní vodě, jakkoliv obsahuje i látky škodlivé.

#### 4.2.5 Zhodnocení toxicity vod

Většina vzorků odtoku z ČOV vykazovala toxicitu minimální, v několika případech dokonce žádnou. Jedině 26\_01\_O způsobil 30% mortalitu *Thamnocephalus p.*, předpokládaná LC<sub>50</sub> se ale pohybuje kolem 705,27 %, tedy sedminásobně koncentrovanější, než byl vzorek. Vzorek 23\_03\_O\_2 způsobil 15,57% inhibici.

Pro přítok komunální odpadní vody se podařilo prokázat zřetelný toxický účinek. V nezředěné formě způsobil 100% mortalitu pro *Thamnocephalus p.* a pro *Spirodela p.* 31,89 % inhibici růstu.

Jelikož by tento vzorek během 24 hodin usmrtil celou populaci *Thamnocephalus p.*, pravděpodobně by měl zásadní negativní dopad i na ostatní bezobratlé vyskytující se ve vodách.

Oproti tomu se inhibice 31,89 % nemusí zdát významná, vezmeme-li v potaz, že je možná inhibice až 100%. Stále se však jedná o hodnotu dvojnásobně vyšší než nejvyšší naměřená inhibice pro odtoky z ČOV.

Z tohoto rozdílu lze vyvodit, že procesy čištění odpadních vod jsou relativně účinné a do velké míry snižují toxicitu vod, které čistírnami procházejí. Navíc nesmíme zapomenout na poměrně rychlé a velké zředění, ke kterému dochází přimícháváním odtoku do recipientu.

Výsledky získané v této práci se ale zabývají pouze akutní toxicitou. Pro ni jsou zjevně opatření přijímaná současnou legislativou dostatečná. I nízké akutní toxické účinky vypouštěných vod naznačují, že se nejedná o vodu zcela čistou. To znamená, že jsou do povrchových vod neustále vypouštěny škodlivé látky, ačkoliv v malých koncentracích. Jejich vliv na vodní organismy a ekosystém jako takový již spadá pod toxicitu chronickou a vyžaduje další testování.

### 4.3 Toxicita léčiv

Jak již bylo zmíněno při popisu metodiky, není známo, které látky z tablety a jak se přesně rozpustili při přípravě roztoku. Dále, jelikož nebyl využit čistý ibuprofen, ale léčivý přípravek Ibalgin<sup>®</sup>, nelze s jistotou určit, která látka vyvolala toxický účinek.

Následující výsledky tedy hodnotí přípravek jako směs těchto látek.

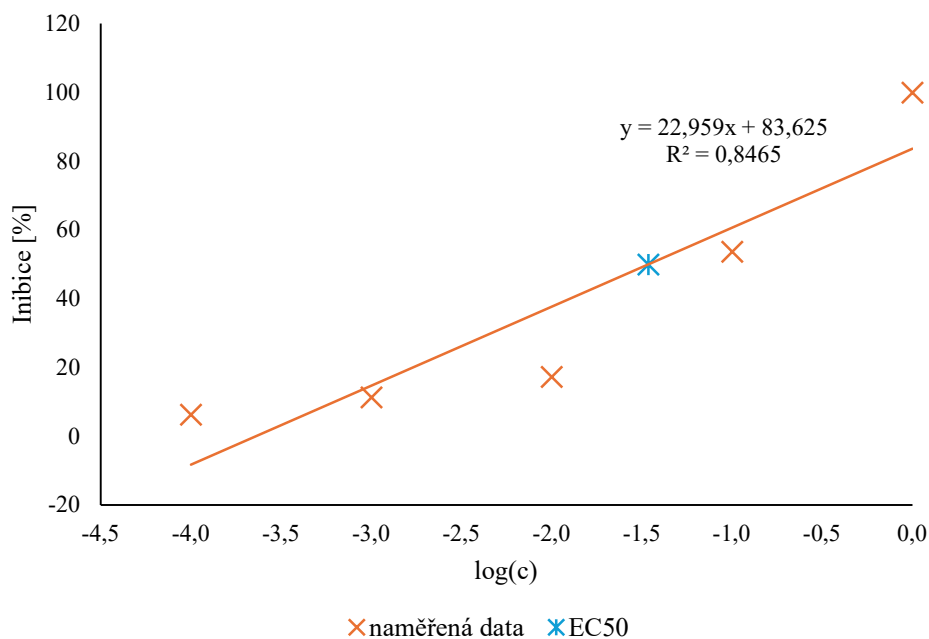
Tabulka 12: Mortalita pro předběžný test na Ibalginu<sup>®</sup>

c [%]	0	1.10 <sup>-1</sup>	1.10 <sup>-1</sup>	1	10	100
mortalita [%]	7	0	0	3	3	0

Pro *Thamnocephalus p.* byla mortalita ve všech koncentracích pod 10 % povolenými i pro kontrolu. LOEC pro Ibalgin<sup>®</sup> na *Thamnocephalus p.* je tedy vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace. Jelikož nebylo možné připravit koncentrovanější roztok bez použití organických rozpouštědel, bylo upuštěno od provádění dalších testů.

Tabulka 13: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro předběžný test na Ibalginu<sup>®</sup>

c [%]	0	1.10 <sup>-1</sup>	1.10 <sup>-1</sup>	1	10	100
t72-t0	24,837	23,267	22,024	20,550	11,504	0,015
%inhibice	0	6,32	11,33	17,26	53,68	99,94



Obrázek 12: Graf závislosti  $I\% = f(\log(c))$  a odhadovaná  $EC_{50}$  pro předběžný test na Ibalginu®

Předběžný test na *Spirodela p.* už ale při nejvyšší použité koncentraci vykazoval 99,94% inhibici.

Z výpočtu provedeného SW Excel vychází přibližná  $EC_{50}$  jako 3,43 % použitého roztoku s rozmezím 95% jistoty 0,15–74,6 %. Toto rozmezí je velmi široké a z grafu je patrné, že hodnota není zcela přesná.

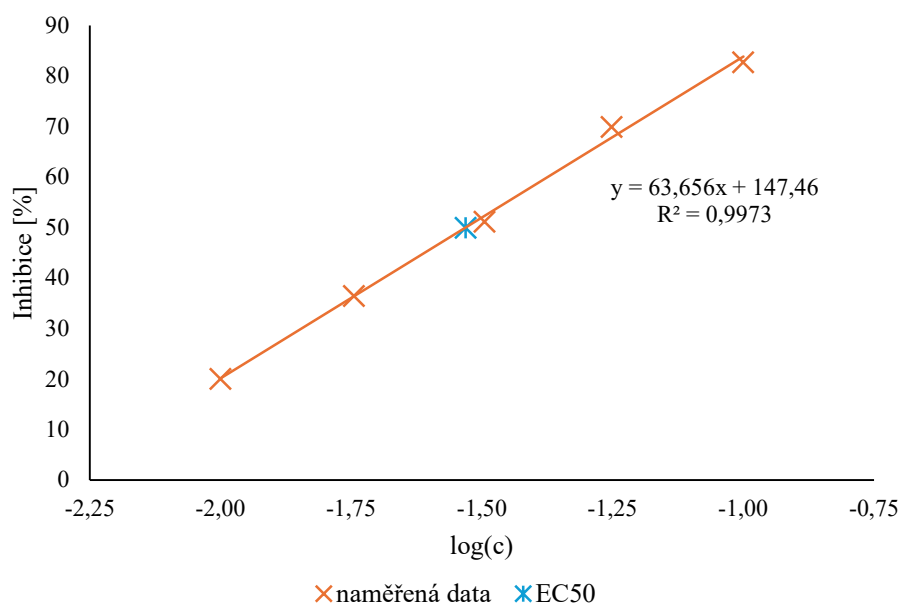
V logaritmickém měřítku očekáváme, alespoň kolem  $EC_{50}$ , lineární závislost. Z grafu je však patrné, že data leží spíše na exponenciální křivce. Je možné, že tyto odchylky způsobila chyba při přípravě ředící řady. Jelikož se ale jedná pouze o předběžný test, nebyl opakován.

Všechny rostliny v nejvyšší koncentraci vykazovaly značnou míru chlorózy.

Následně byl tedy proveden definitivní test v užším rozmezí koncentrací.

Tabulka 14: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro definitivní test na Ibalginu®

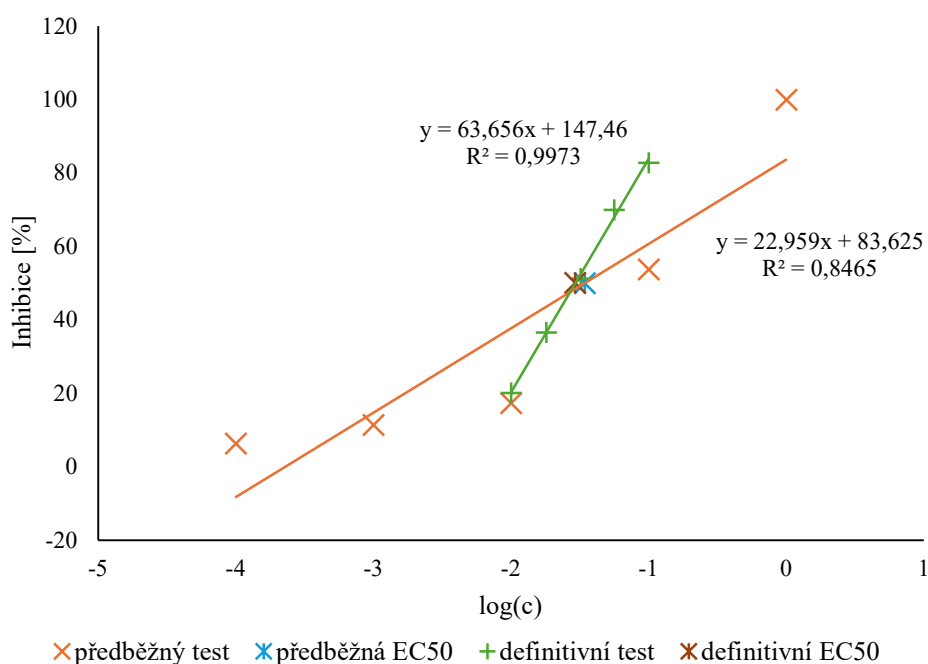
c [%]	0	1	1,8	3,2	5,6	10
t72-t0	17,167	13,721	10,900	8,376	5,166	2,964
%inhibice	0	20,08	36,51	51,21	69,91	82,74



Obrázek 13: Graf závislosti  $I\% = f(\log(c))$  a odhadovaná  $EC_{50}$  pro definitivní test na Ibalginu®

Zde byla stanovena  $EC_{50}$  jako 2,94 % s rozmezím 95% jistoty 1,01–8,62 %. Od předběžné  $EC_{50}$  se příliš neliší, ale rozmezí jistoty je již mnohem užší a přijatelnější.

Jestliže bychom zanedbali problémy s rozpustností a počítali, že 100% roztok má 100 mg/l, dostali bychom  $EC_{50}$  2,94 mg/l. Skutečná  $EC_{50}$  pro Ibalgin® tedy leží někde pod touto hodnotou.



Obrázek 14: Graf závislosti  $I\% = f(\log(c))$  pro předběžný i definitivní test na Ibalginu® včetně obou  $EC_{50}$

Pohled na graf s hodnotami obou testů ukazuje, že ačkoliv si jednotlivé  $EC_{50}$  jsou velmi podobné, zbytek dat se již liší. Pro koncentraci 1 % (-2 v logaritickém měřítku) jsou si obě naměřené hodnoty ještě blízké. Ale v 10 % (-1 v logaritickém měřítku) už je rozdíl velký. I zde je pravděpodobně příčinou špatná příprava koncentrační řady. Je dokonce možné, že si připravené 100% roztoky zcela neodpovídaly. To by ovšem nevysvětlovalo, proč jsou si  $EC_{50}$  tak blízké.

Toxicita Ibalginu® není překvapivá[28; 30]. Nebyla nalezena žádná data týkající se *Spirodela p.*, většina studií se zabývá rybami nebo korýši, ne rostlinami. Di Baccio et al[45] však pozorovali vliv ibuprofenu na *Lemna gibba*. Ačkoliv se jedná o odlišnou rostlinu, rody *Lemna* a *Spirodela* jsou si velmi podobné[15], proto se k těmto výsledkům dá přihlížet. Test na *Spirodela p.* ovšem trvá pouze 3 dny (dle ISO 20227[49]) oproti 7 dnům na *Lemna minor* (dle ISO 20079 [48]) a ve studii na *Lemna g.* použitých 10 dnům[45], časový rámec projevu odpovědi si tedy nejspíš neodpovídá.

V této studii byly použity hodnoty 1, 0,20 a 0,02 mg/l). K nekróze či chloróze nedošlo vůbec po celých 10 dní testu. V nárustech listů se neodrazily až do osmého dne od nasazení, ovšem vliv na plochy listů byl stimulační. Jiné měřené endpointy (fluorescence chlorofylu a množství fotosyntetických pigmentů) nevykazovaly žádnou změnu oproti kontrole[45].

Tento stimulační efekt ibuprofenu si protičečí s výsledky získanými v této práci. Pro lepší posouzení by byla nutná bližší analýza s přesněji známými koncentracemi.

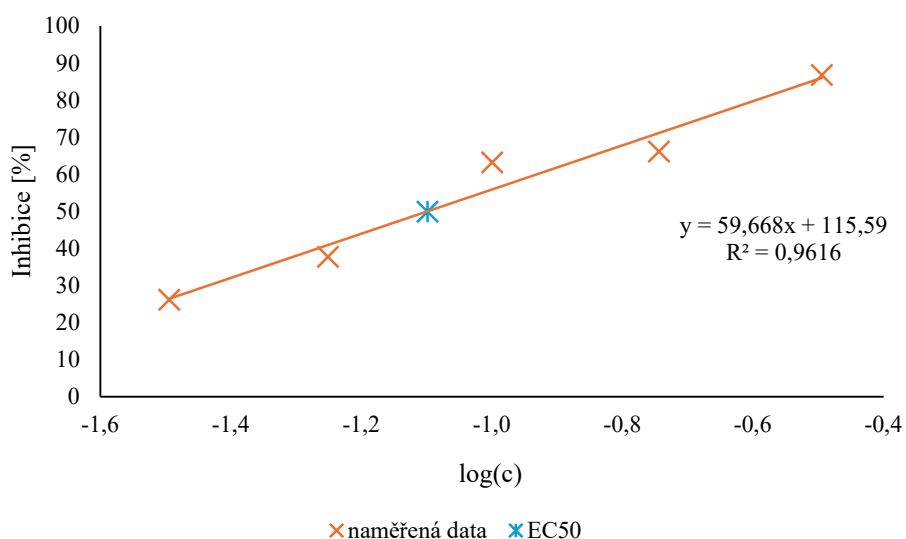
#### 4.4 Dichroman draselný

Test na *Thamnocephalus p.* nebyl proveden z důvodů zmíněných výše. Výrobce však uvádí referenční hodnotu LC<sub>50</sub> pro standardizaci jako 0,065 mg/l (přijatelné je rozmezí 0,052–0,148 mg/l[12]).

Jelikož účelem provádění testu na *Spirodela p.* bylo porovnání reakce obou organismů, byla místo metodikou předepsaného předběžného testu na chemické látky použita stejná koncentrační řada, jako předepisuje standardizace pro Thamnotoxkit.

Tabulka 15: Nárůsty listů a příslušná procenta inhibice růstu pro dichroman draselný

c [mg/l]	k	0,032	0,056	0,1	0,18	0,32
t72-t0 [mm <sup>2</sup> ]	10,341	7,628	6,433	3,795	3,496	1,358
inhibice [%]	0	26,24	37,80	63,30	66,20	86,87



Obrázek 15: Graf závislosti I% = f(log(c)) a odhadovaná EC<sub>50</sub> pro dichroman draselný

Výsledná EC<sub>50</sub> je 0,08 mg/l (rozmezí 95% jistoty 0,02–0,29 mg/l).

EC<sub>50</sub> pro *Spirodela p.* je tedy lehce vyšší, než LC<sub>50</sub> pro *Thamnocephalus p.* Porovnání EC<sub>50</sub> a LC<sub>50</sub> běžně nemá vysokou výpovědní hodnotu. Zde je ale LC<sub>50</sub> na *Thamnocephalus p.* nižší, než EC<sub>50</sub> na *Spirodela*

*p.* Tedy při 0,065 mg/l by zemřela polovina populace *Thamnocephalus p.*, ale *Spirodela p.* by vykazovala menší než 50% inhibici růstu. *Thamnocephalus p.* je tedy na dichroman draselný citlivější.

#### 4.5 Zhodnocení metodiky

Z porovnání výsledků pro vzorky testované na obou organismech je patrné, že test na *Spirodela p.* je ze dvou používaných testů ten citlivější. Důkazem toho je 0% mortalita pro 50% koncentraci 23\_03\_P při testu na *Thamnocephalus p.*, zatímco *Spirodela p.* při stejné koncentraci již vykazovala měřitelnou inhibici.

Do jisté míry je to způsobeno i sledovanými endpointy: test na korýších sleduje jen mortalitu, což je nejkrajnější důsledek otravy. Jelikož se jedná o čistě binární odpověď (živý/neživý), může být organismus vážně poškozen toxickou látkou, ale stále přežít a tím nedávat žádnou měřitelnou negativní odpověď na toxikant. Naopak při měření růstu listů lze změny na organismu pozorovat, i pokud jsou malé, a zachytit je tak i v menších koncentracích.

Jak je ale patrné z testů prováděných na dichromanu draselném, ne vždy je *Spirodela p.* tím citlivějším organismem. Rozdíl v citlivosti je zde způsoben specifiky metabolismu rozdílných organismů. Tyto výsledky potvrzují nutnost zařazení více odlišných organismů.

Na citlivost endpointu se dá nahlížet dvěma způsoby. První vychází převážně z hodnoty EC<sub>50</sub> nebo posuzujeme, při jak malé koncentraci se projeví. Dalším pohledem, poněkud hůře kvantifikovaným, je jeho statistická významnost, míra, jakou je schopen převyšovat šum běžných odchylek v jeho hodnotách i bez přítomnosti toxické látky[4].

Tato nerovnost by tedy mohla být napravena využitím jiných, citlivějších endpointů. Adameczuk et al.[52] využili pro analýzu cyanotoxinů takových endpointů hned několik. Vedle mortality byl testován příjem potravy, spotřeba kyslíku, pohyb a degradace F-aktinu. Získané 24h EC<sub>50</sub> pro tyto metody byly řádově odlišné[52]. Modifikací, respektive obohacením metody stanovení toxicity na *Thamnocephalus p.* o citlivější endpoint by mohlo být dosaženo jasnějších výsledků.

Do měření ploch listů se v důsledku způsobu získávání konečných hodnot promítá nezanedbatelná chyba. Jak bylo zmíněno v kapitole zabývající se metodikou těchto testů, pokud se blížíme ke 100% inhibici růstu, dochází k případům, kdy je list po skončení testu vyhodnocen jako menší (aniž by došlo ke skutečnému zmenšení listu). Vyhodnocení je totiž poměrně závislé na kvalitě fotografie destičky, a to jejího rozlišení a případného náklonu, který způsobuje zkreslení. Dále se odvíjí od přesnosti obkreslení samotných listů, a to jedním tahem. Zde se tedy zákonitě projeví lidská chyba, neboť nakreslená hranice nikdy nebude přesně odpovídat jednotlivým pixelům fotografie.

Navíc se sleduje nárůst jen jednoho listu, a to i v případě, že se stélky rozmnoží. Nárůst biomasy je pak mnohem větší, ale většina se nepromítne do výsledků.

Metodu by bylo vhodné upravit způsobem, který nevyžaduje toto manuální obkreslování listů, v zájmu přesnosti i rychlosti vyhodnocení. Nápomocný by byl software umožňující přesnější obkreslení, které nevyžaduje provedení jedním tahem; případně software schopný samostatného vyhodnocení bez zásahu člověka.

Případně lze navrhnout měření inhibice zcela jiným způsobem, například sledováním fotosyntetické aktivity či vážením celkové biomasy.

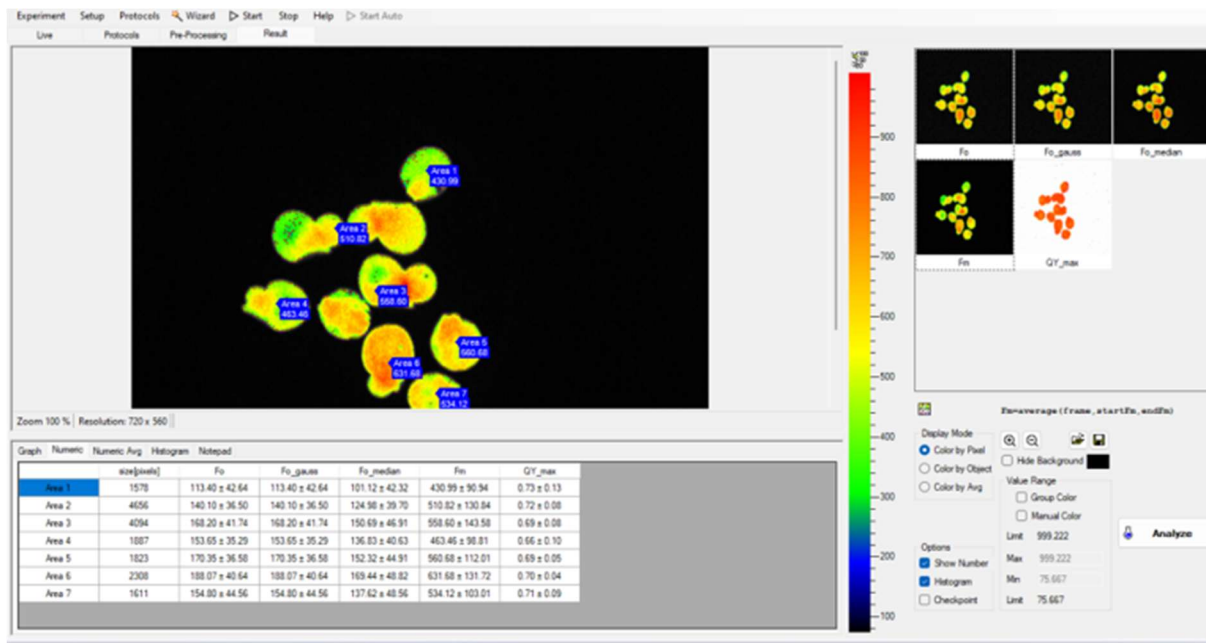
Pro zkoušku sledování fotosyntetické aktivity byla použita Handy GFP Cam FC 1000-H/GFP. Ta umožňuje měření GFP (green fluorescent protein) i fluorescence chlorofylu. Ta měří kvantový výtěžek Q<sub>y</sub>, tedy poměr mezi kvanty emitovanými a absorbovanými fluoroforem za sekundu. Fluorescenční signál je převeden na falešně barvenou škálu, aby jej bylo možné vizuálně posoudit[53].



Obrázek 16: Handy GFP Cam FC 1000-H/GFP

Umožňuje tedy stanovit fotosyntetickou aktivitu. Schopnost pohlcovat světelnou energii je nutností pro růst a život rostliny a zároveň se v ní odráží případný stres, pod kterým se nachází. Ne vždy se ale toxický efekt projeví změnou na fotosyntetických pigmentech[53; 45].

Program navíc stanovuje i plochu listů. Bohužel nelze dobře izolovat jednotlivé frondy, proto nešlo využít kameru pro stanovení ploch, aby se předešlo problémům popsáním výše.



Obrázek 17: Dialogové okno při práci s Handy GFP Cam FC 1000-H/GFP

Pro posouzení málo rozpustných látek, jako je Ibalgin® (respektive ibuprofen) by bylo vhodné nalézt rozpouštědlo, které lze použít, aniž by docházelo k ovlivnění výsledků testu jeho přítomností. Takový přístup ke zkoumání látek je v ekotoxikologii již zavedený; nejvhodnější rozpouštědlo pro stanovený test (dle metody, testovacího organismu i testované látky) je ale nutné stanovit experimentálně[54]. Druhou možností je použití jen tak nízkých koncentrací, že není konsolvace třeba[45]. V obou případech by pak bylo účelné zajistit chemickou analýzu připraveného roztoku pro ověření koncentrace ibuprofenu v tabletách.

## 5 ZÁVĚR

Základním předpokladem, který vedl k tématu této práce a k výběru vzorků, byla uvažovaná toxicita vod vypouštěných z ČOV. A to zejména toxicita způsobená obsaženými léčivými. Tato hypotéza ale nebyla potvrzena. Z testovaných vzorků odtoku vykazovaly vliv hodný pozornosti pouze dva, a to 26\_01\_O s 30% mortalitou a 23\_03\_O\_2 s 15,57% inhibicí růstu pro 100% koncentrace obou vzorků.

Porovnání těchto hodnot s výsledky pro 23\_03\_P (100% mortalita a 31,89% inhibice růstu pro plně koncentrovaný vzorek) ukazuje, že současné metody čištění odpadních vod snižují její ekotoxicitu o polovinu až třetinu.

Okamžitý vliv na životní prostředí je tedy pro vypouštěné vody velmi malý, zvláště po jejich zředění vodou recipientu. Jelikož ale v koncentrované podobě nějaký negativní účinek způsobují, lze předpokládat, že mají i chronické účinky. Ty tato práce nemohla odhalit, je nutné tedy vybrat nebo vytvořit metodiku pro její zkoumání.

Toxikity využívající *Spirodela p.* se ukázaly jako citlivější pro větší zředění vzorků vod, a tedy i vhodnější pro sledování tak nenápadné toxicity, jakou očekáváme v životním prostředí. Test s dichromanem draselným ale potvrdil nutnost zařazení více trofických úrovní, neboť při něm byl *Thamnocephalus p.* citlivější.

Pokusy na vzorcích přípravku Ibalgin® dokazují, že je schopný vyvolat negativní odezvu, alespoň co se *Spirodela p. týče*. Zde i při zředění nasyceného roztoku o čtyři řády došlo k projevu akutní toxicity.

Léčiva ve vodách jsou a budou i nadále velkým problémem, který vyžaduje dalšího zkoumání. Narozdíl od mnoha jiných zdrojů znečištění nelze mnoho léčiv příliš omezit, neboť jsou pro část lidské populace nezbytnou podmínkou kvalitního života.

## 6 ZDROJE

- [1] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [2] MARŠÁLEK, Blahoslav. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. In: HALOUSKOVÁ, Olga a Vladimír KOČÍ. *Ekotoxikologické biotesty I* [online]. Seč u Chrudimi: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, s. 1-16 [cit. 2025-05-21]. ISBN 80-238-9260-6. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi5620/um/5135634/1.Prehled\\_a\\_rozdeleni\\_EB\\_text.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi5620/um/5135634/1.Prehled_a_rozdeleni_EB_text.pdf)
- [3] LYUBENOVA, Mariyana a Silvena BOTEVA. Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems. In: L. LARRAMENDY, Marcelo a Sonia SOLONESKI. *Toxicology – New Aspects to This Scientific Conundrum* [online]. InTech, 2016, 2016-10-26, s. 148-177 [cit. 2025-05-24]. ISBN 978-953-51-2716-1. Dostupné z: doi:10.5772/64776
- [4] SCHÜÜRMAN, Gerrit a Bernd MARKERT, ed. *Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects*. New York: John Wiley and Sons, 1998, 900 s. ISBN 0-471-17644-3.
- [5] ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, Helena. Testování toxicity – principy, podstata testu. In: *Moodle.vut.cz* [online]. 2025 [cit. 2025-05-23]. Dostupné z: [https://moodle.vut.cz/pluginfile.php/1111383/mod\\_resource/content/1/ekotoxikologie%20V%20-%202024.pdf](https://moodle.vut.cz/pluginfile.php/1111383/mod_resource/content/1/ekotoxikologie%20V%20-%202024.pdf)
- [7] DOMÍNGUEZ, Carmen M., Paula VENTURA, Alicia CHECA-FERNÁNDEZ a Aurora SANTOS. Comprehensive study of acute toxicity using Microtox® bioassay in soils contaminated by lindane wastes. *The Science of the total environment* [online]. Elsevier B.V, 2023, **856**(159146) [cit. 2025-05-21]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.159146
- [8] RAMARAJ, Rameshprabu, Yuwalee UNAPAPROM a Natthawud DUSSADEE. Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. *International Journal of New Technology and Research* [online]. 2016, **2**(3), 117-122 [cit. 2025-05-23]. ISSN 2454-4116. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/300505269\\_Cultivation\\_of\\_Green\\_Microalga\\_Chlorella\\_vulgaris\\_for\\_Biogas\\_Purification](https://www.researchgate.net/publication/300505269_Cultivation_of_Green_Microalga_Chlorella_vulgaris_for_Biogas_Purification)
- [9] LUKYANOV, Vyacheslav, Svetlana GORBUNOVA a Anna AVSIYAN. Biotechnological and economic assessment of the productivity of *Chlorella vulgaris* IBSS-19 microalgae under different cultivation regimes. *Bioresource technology reports* [online]. Elsevier, 2024, **27** [cit. 2025-05-23]. ISSN 2589-014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2024.101907
- [10] BERGMAN, Jordanna N., Joseph R. BENNETT, Allison D. BINLEY, et al. Scaling from individual physiological measures to population-level demographic change: Case studies and future directions for conservation management. *Biological conservation* [online]. OXFORD: Elsevier, 2019, **238** [cit. 2025-05-23]. ISSN 0006-3207. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocon.2019.108242

- [11] EBERT, Dieter. Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo* [online]. London: BioMed Central, 2022, **13**(1) [cit. 2025-05-23]. ISSN 2041-9139. Dostupné z: doi:10.1186/s13227-022-00199-0
- [12] ISO 14380. *Water quality — Determination of the acute toxicity to Thamnocephalus platyurus (Crustacea, Anostraca)*. 2011, 23 s.
- [13] Thamnotoxkit F test procedure slide show. In: *MicroBioTests.com* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-23]. Dostupné z: <https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/04/Microbiotests-Thamnotoxkit-F-test-procedure-slide-show-thamnocephalus-toxicity-test.pdf>
- [14] UJONG, Anim, Joncer NAIBAHO, Soudabeh GHALAMARA, Brijesh K. TIWARI, Shay HANON a Uma TIWARI. Duckweed: exploring its farm-to-fork potential for food production and biorefineries. *Sustainable Food Technology* [online]. 2025, **3**(1), 54-80 [cit. 2025-05-21]. ISSN 2753-8095. Dostupné z: doi:10.1039/D4FB00288A
- [15] KUČEROVÁ, Andrea, Kateřina ŠUMBEROVÁ, Jana NAVRÁTILOVÁ, et al. *Vodní a mokřadní rostliny České republiky*. 2025. ISBN 978-80-200-3488-5.
- [16] Duckweed Toxkit F: Standard operating procedure. In: *MicroBioTests.com* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-18]. Dostupné z: [https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/duckweed-toxicity-test\\_duckweed-toxkit-f\\_standard-operating-procedure.pdf](https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/duckweed-toxicity-test_duckweed-toxkit-f_standard-operating-procedure.pdf)
- [17] ZHAO, Cheng, Sijin WANG, Yuxi LIU, Peng CHU, Bing HAN, Xianhui NING, Tao WANG a Shaowu YIN. Acute cold stress leads to zebrafish ovarian dysfunction by regulating miRNA and mRNA. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* [online]. 2023, **48** [cit. 2025-05-23]. ISSN 1744-117X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbd.2023.101139
- [18] ESMAIL, Michael Y., Keith M. ASTROFSKY a Christian LAWRENCE. Chapter 20 - The Biology and Management of the Zebrafish. In: ANDERSON, Lynn C., Glen M. OTTO a Mark T. WHARY, FOX, James G., ed. *Laboratory Animal Medicine*. 3. Academic Press, 2015, s. 1015-1062. ISBN 978-0-12-409527-4. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00020-1>
- [19] PICARD – CHALLET HÉRAULT, J. Danio rerio, zebra danio. In: *Fishi-pedia.com* [online]. ©2024 [cit. 2025-05-23]. Dostupné z: <https://www.fishi-pedia.com/fishes/danio-rerio>
- [21] Požadavky na informace. *ECHA* [online]. Dostupné také z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach/registration/information-requirements>
- [22] HILSCHEROVÁ, Klára. *Legislativní rámec ekotoxikologických biotestů* [online]. 2017. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi5620/um/Legislativa2017.pdf>
- [23] Zákon č. 378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). In: *Zákony pro lidi* [online]. [cit. 2025-03-01]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>
- [25] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015, 639 s. ISBN 978-80-7080-875-7.

- [26] CRITTENDEN, John C., R. Rhodes TRUSELL, David W. HAND, Kerry J HOWE a George TCHOBANOGLOUS. *MWH's water treatment: principles and design*. Third edition. Hoboken: John Wiley, 2012, 1901 s. ISBN 978-0-470-40539-0.
- [27] MUÑIZ-GONZÁLEZ, Ana-belén. Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*. *Environmental toxicology and pharmacology* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2021, **81**, 10 [cit. 2025-03-01]. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2020.103537
- [28] BATUCAN, Niña Sarah P., Louis A. TREMBLAY, Grant L. NORTHCOTT a Christoph D. MATTHAEI. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental advances* [online]. Elsevier, 2022, **7**, 1–14 [cit. 2025-03-01]. ISSN 2666-7657. Dostupné z: doi:10.1016/j.envadv.2021.100164
- [29] Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech – znění od 1. 1. 2022. In: *Zákony pro lidi* [online] [online]. AION CS, 2010-2015 [cit. 2025-02-26]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401>
- [30] CHOPRA, Sunil a Dharmender KUMAR. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon* [online]. Elsevier, 2020, **6**(6) [cit. 2025-05-22]. ISSN 2405-8440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04087
- [31] BIAŁK-BIELIŃSKA, Anna, Ewa MULKIEWICZ, Marcin STOKOWSKI, Stefan STOLTE a Piotr STEPNOWSKI. Acute aquatic toxicity assessment of six anti-cancer drugs and one metabolite using biotest battery – Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere (Oxford)* [online]. England: Elsevier, 2017, **189**, 689-698 [cit. 2025-03-01]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.174
- [32] Vyhláška č. 273/2021 Sb. Vyhláška o podrobnostech nakládání s odpady. In: *Zákony pro lidi* [online]. [cit. 2025-05-18]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-273>
- [33] SHAW, Ian C a John CHADWICK. *Principles of Environmental Toxicology*. London: Taylor and Francis, 1998, 216 s. ISBN 0-7484-0355-8.
- [34] LETCHER, T. M. (Trevor M.) a Daniel A VALLERO. *Waste: a handbook for management*. Second edition. Amsterdam: Academic Press, 2019, 775 s. ISBN 978-0-12-815060-3.
- [35] GUNNARSSON, Lina, Jason R. SNAPE, Bas VERBRUGGEN, et al. Pharmacology beyond the patient – The environmental risks of human drugs. *Environment international* [online]. OXFORD: Elsevier, 2019, **129**, 320-332 [cit. 2025-03-13]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.04.075
- [36] ARIS, Ahmad Zaharin, Aida Soraya SHAMSUDDIN a Sarva Mangala PRAVEENA. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international* [online]. OXFORD: Elsevier, 2014, **69**, 104-119 [cit. 2025-03-13]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2014.04.011
- [37] PETERSON, Drew R., Frauke SEEMANN, Miles T. WAN, et al. Multigenerational impacts of EE2 on reproductive fitness and immune competence of marine medaka. *Aquatic toxicology*

- [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2023, **260**(106584) [cit. 2025-03-13]. ISSN 0166-445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2023.106584
- [38] BLANC-LEGENDRE, M., L. GUILLOT, L. CHEVALIER, et al. Long-term impact of embryonic exposure to ethinylestradiol and clotrimazole on behavior and neuroplasticity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2025, **113**, 104592 [cit. 2025-03-14]. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2024.104592
- [39] HOGAN, Natacha S, Paula DUARTE, Michael G WADE, David R.S LEAN a Vance L TRUDEAU. Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): Identifying critically vulnerable periods of development. *General and comparative endocrinology* [online]. United States: Elsevier, 2008, **156**(3), 515-523 [cit. 2025-03-14]. ISSN 0016-6480. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygcen.2008.03.011
- [40] ISLAM, Rafiquel, Richard Man Kit YU, Wayne A. O'CONNOR, Xiao LIN, Keng Po LAI, Frederic D.L. LEUSCH a Geoff R. MACFARLANE. Intergenerational toxicity of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2): Effects of parental exposure on early larval development and transcriptomic profiles in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Journal of hazardous materials* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2024, **475**, 134876 [cit. 2025-03-14]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2024.134876
- [41] ZOU, Hong, Hongjun YU, Yunyi HUANG, Yanfang GUO, Meixin YE a Liping HOU. Chronic exposure to gestodene impairs reproductive system in adult female zebrafish (*Daniarerio*). *Chemosphere (Oxford)* [online]. England: Elsevier, 2024, **355**, 141876-141876 [cit. 2025-03-14]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2024.141876
- [42] JURECZKO, Marcelina a Joanna KALKA. Cytostatic pharmaceuticals as water contaminants. *European journal of pharmacology* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, **866**, 172816 [cit. 2025-03-14]. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2019.172816
- [43] BUSHRA, Rabia a Nousheen ASLAM. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman medical journal* [online]. Muscat - Oman: Oman Medical Specialty Board, 2010, **25**(3), 155-161 [cit. 2025-05-23]. ISSN 1999-768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2010.49
- [44] STANLEY-SAMUELSON, DW. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. *The Biological Bulletin* [online]. 1987, **173**(1), 90-109 [cit. 2025-05-23]. ISSN 0006-3185. Dostupné z: doi:10.2307/1541865
- [45] DI BACCIO, D., F. PIETRINI, P. BERTOLOTTI, S. PÉREZ, D. BARCELÒ, M. ZACCHINI a E. DONATI. Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. *The Science of the total environment* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2017, **584-585**, 363-373 [cit. 2025-05-22]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.191>
- [46] MICROBIOTESTS. Thamnotoxkit F. *MicroBioTests.com* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-18]. Dostupné z: <https://www.microbiotests.com/toxkit/freshwater-thamnocephalus-toxicity-test-with-thamnotoxkit-f/>

- [47] MICROBIOTESTS. Duckweed toxkit F. *MicroBioTests.com* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-18]. Dostupné z: <https://www.microbiotests.com/toxkit/duckweed-toxicity-test-with-duckweed-toxkit-f/>
- [48] ISO 20079. *Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (Lemna minor) — Duckweed growth inhibition test*. 2005, 23 s.
- [49] ISO 20227. *Water quality — Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed Spirodela polyrhiza — Method using a stock culture independent microbiotest*. 2017, 20 s.
- [50] Thamnotoxkit F: Standard operating procedure. In: *MicroBioTests.com* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-18]. Dostupné z: [https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/thamnocephalus-toxicity-test\\_thamnotoxkit-f\\_standard-operating-procedure.pdf](https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/thamnocephalus-toxicity-test_thamnotoxkit-f_standard-operating-procedure.pdf)
- [51] Isco 6712 Full-size Portable Sampler Datasheet. In: *Teledyne ISCO* [online]. ©2025 [cit. 2025-05-23]. Dostupné z: [https://www.teledyneisco.com/en-us/Water\\_/Sampler%20Documents/Datasheets/Isco%206712%20Full-size%20Portable%20Sampler%20Datasheet.pdf](https://www.teledyneisco.com/en-us/Water_/Sampler%20Documents/Datasheets/Isco%206712%20Full-size%20Portable%20Sampler%20Datasheet.pdf)
- [52] ADAMCZUK, Małgorzata, Adam BOWNIK a Barbara PAWLIK-SKOWROŃSKA. Single and mixture effect of cyanobacterial metabolites, cylindrospermopsin, anabaenopeptin-A, microginin-FR1 and aeruginosin 98-A, on behaviour, food uptake, oxygen consumption and muscular F-actin degradation of *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental toxicology and pharmacology* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2025, **115** [cit. 2025-05-17]. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2025.104677
- [53] Handy GFP Cam. *Photon System Instruments* [online]. ©2016 [cit. 2025-05-23]. Dostupné z: <https://fluorcams.psi.cz/products/handy-gfp-cam/#details>
- [54] FLIEDNER, Annette. Ecotoxicity of poorly water-soluble substances. *Chemosphere (Oxford)* [online]. Elsevier, 1997, **35**(1-2), 295-305 [cit. 2025-05-23]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(97)00156-2

## 7 SEZNAM ZKRATEK

<b>API</b>	léčivá látka, „active pharmaceutical ingredient“
<b>PPCP</b>	farmakologické sloučeniny a přípravky osobní péče, „pharmaceuticals and personal care products“
<b>LOEL</b>	nejnižší dávka či koncentrace, která vyvolala pozorovatelný účinek, „lowest observed effect level“
<b>LOAEL</b>	nejnižší dávka či koncentrace, která vyvolala negativní pozorovatelný účinek „lowest observed adverse effect level“
<b>NOEL</b>	nejvyšší dávka či koncentrace, která nevyvolala pozorovatelný účinek „no observed effect level“
<b>NOAEL</b>	nejvyšší dávka či koncentrace, která nevyvolala negativní pozorovatelný účinek „no observed adverse effect level“
<b>EC<sub>50</sub></b>	koncentrace vyvolávající 50% účinek, „effective concentration“
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentrace vyvolávající 50% inhibici, „inhibition concentration“
<b>LC<sub>50</sub></b>	koncentrace vyvolávající 50% mortalitu, „lethal concentration“
<b>REACH</b>	„registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals“
<b>ČSN</b>	česká technická norma
<b>ISO</b>	„International Organization for Standardization“

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Podmínky inkubace

Příloha 2: Fotografie testovacích destiček pro Duckweed toxkit F

Příloha 3: Kompletní výsledky Duckweed toxkit F

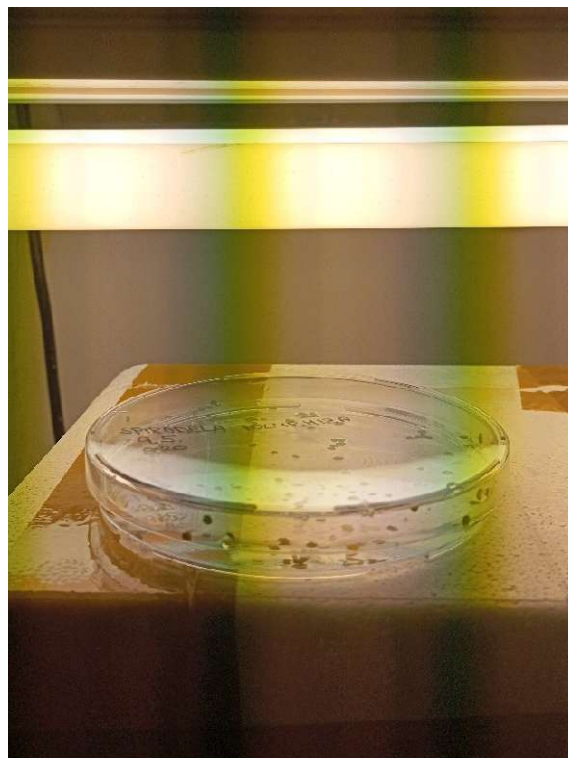
Příloha 4: Kompletní výsledky Thamnotoxkit F

## 9 PŘÍLOHY

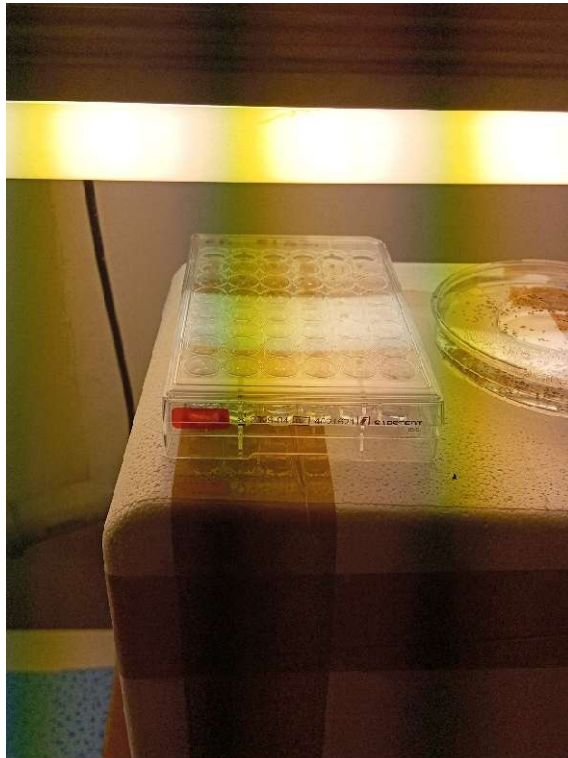
### Příloha 1: Podmínky inkubace



Obrázek 18: Umístění organismů při inkubaci pod světlem (pro *Spirodela p.* i *Thamnocephalus p.*) (vlastní fotografie)



Obrázek 19: *Spirodela p.* při prvotním klíčení z dormantního stádia (vlastní fotografie)



Obrázek 20: Spirodela p. při inkubaci testu (vlastní fotografie)



Obrázek 21: Inkubátor používaný pro Thamnocephalus p. při 24 hod inkubaci ve tmě (vlastní fotografie)

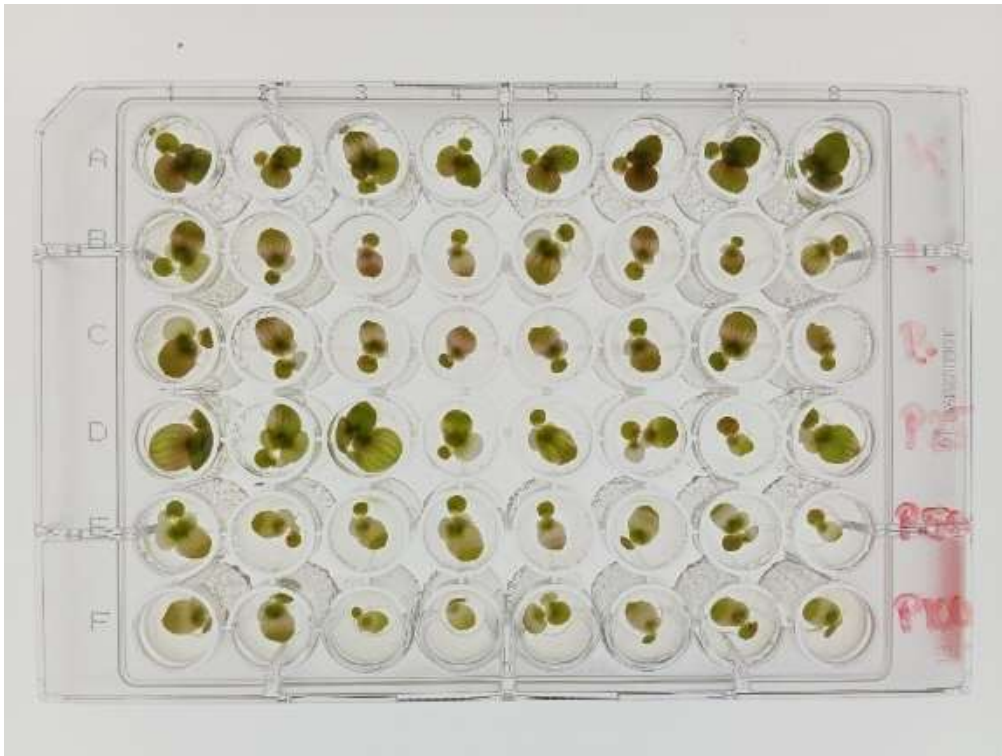
**Příloha 2: Fotografie testovacích destiček pro Duckweed toxkit F**



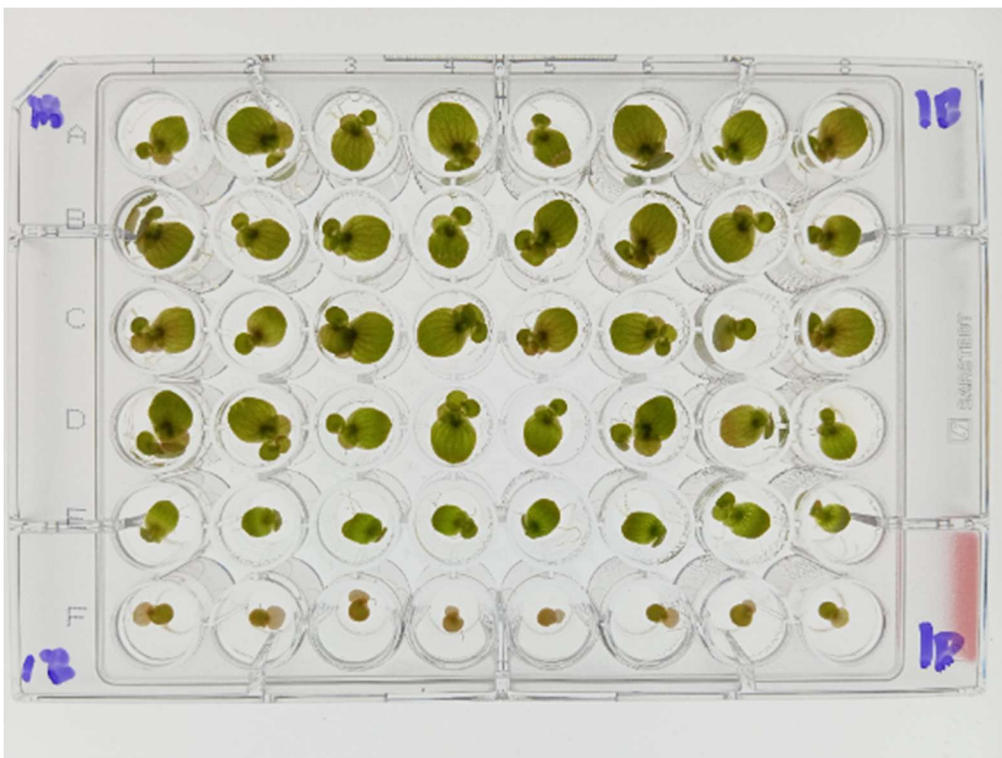
Obrázek 22: Testovací destička v čase t72 pro standardizaci (vlastní fotografie)



Obrázek 23: Testovací destička v čase t72 pro 12\_01\_O (vlastní fotografie)



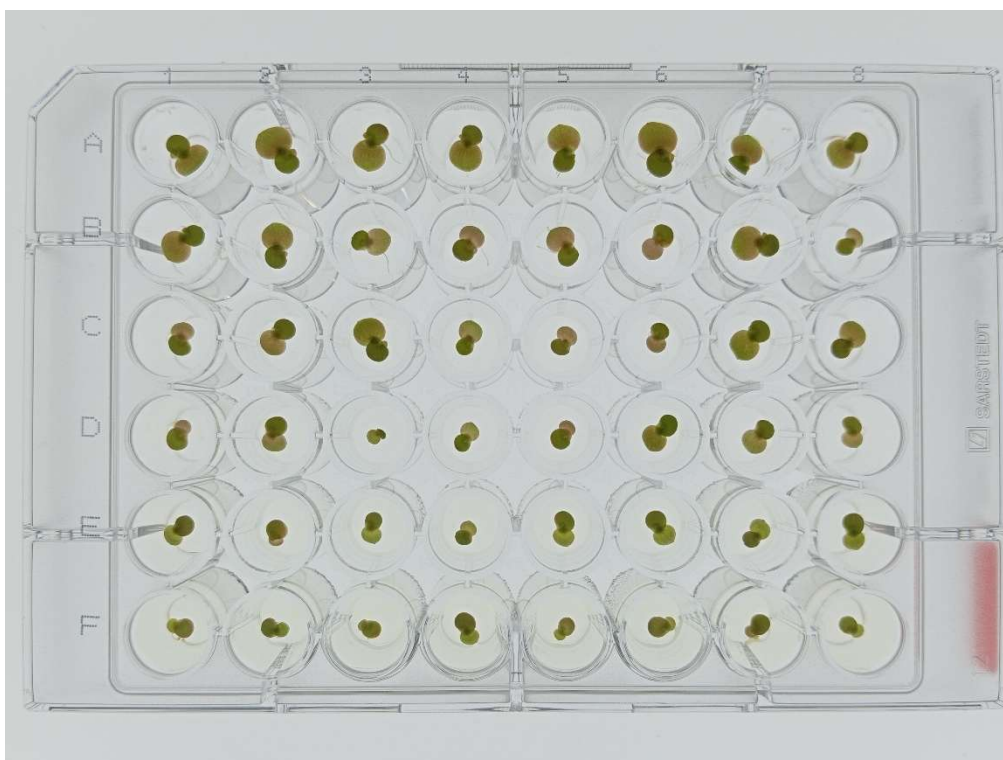
Obrázek 24: Testovací destička v t72 pro 23\_03\_O\_1, 23\_03\_O\_2 a 23\_03\_P (vlastní fotografie)



Obrázek 25: Testovací destička v t72 pro předběžný test na Ibalginu® (vlastní fotografie)



Obrázek 26: Testovací destička v t72 pro definitivní test na Ibalginu® (vlastní fotografie)



Obrázek 27: Testovací destička v čase t72 pro dichroman draselný (vlastní fotografie)

### Příloha 3: Kompletní výsledky Duckweed toxkit F

Tabulka 16: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při standardizaci na KCl před a po nasazení

t0						
c [mg/l]	0	1800	3200	5600	10000	18000
1	13,965	11,305	8,002	6,974	11,476	8,706
2	6,926	4,419	6,427	2,385	9,354	6,258
3	5,303	3,621	2,195	1,889	2,176	2,308
4	5,343	6,381	4,430	4,925	3,913	1,977
5	5,604	2,626	4,095	4,611	3,883	7,119
6	1,454	3,976	3,005	5,327	5,983	4,277
7	2,001	2,053	2,898	5,161	9,535	2,118
8	5,135	4,147	1,732	7,025	3,198	3,574
Průměr	5,716	4,816	4,098	4,787	6,190	4,542
σ	3,820	2,921	2,159	1,869	3,480	2,546
v <sub>x</sub>	66,82	60,65	52,68	39,03	56,22	56,05
t72						
c [mg/l]	0	1800	3200	5600	10000	18000
1	28,895	20,200	15,800	15,630	12,482	9,209
2	18,316	14,317	14,200	4,487	13,359	5,903
3	14,098	10,177	10,700	8,720	7,182	2,588
4	14,878	14,774	10,900	11,486	8,105	2,271
5	11,074	8,570	12,700	10,701	8,612	6,852
6	11,141	13,032	9,700	10,204	9,855	4,438
7	11,440	9,785	10,300	6,044	12,305	2,427
8	11,578	11,428	7,600	12,078	7,492	4,694
Průměr	15,178	12,785	11,488	9,919	9,924	4,798
σ	6,087	3,718	2,622	3,513	2,463	2,447
v <sub>x</sub>	40,10	29,08	22,82	35,42	24,82	51,01

Tabulka 17: Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] pro standardizaci na KCl

c [mg/l]	0	1800	3200	5600	10000	18000
1	14,930	8,895	7,798	8,656	1,006	0,503
2	11,390	9,898	7,773	2,102	4,005	0,000
3	8,795	6,556	8,505	6,831	5,006	0,280
4	9,535	8,393	6,470	6,561	4,192	0,294
5	5,470	5,944	8,605	6,090	4,729	0,000
6	9,687	9,056	6,695	4,877	3,872	0,161
7	9,439	7,732	7,402	0,883	2,770	0,309
8	6,443	7,281	5,868	5,053	4,294	1,120
Průměr	9,461	7,969	7,390	5,132	3,734	0,333
σ	2,907	1,340	0,977	2,552	1,287	0,359
v <sub>x</sub>	30,73	16,81	13,22	49,72	34,47	107,83
Inhibice [%]		15,77	21,90	45,76	60,53	96,48

Tabulka 18: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při testování vzorku 12\_01\_O před a po nasazení

t0						
c [%]	0	5,86	11,72	23,45	46,90	93,80
1	6,223	3,868	3,784	1,869	3,668	6,217
2	2,930	2,754	5,286	4,588	3,571	3,954
3	2,039	4,698	3,855	3,214	5,370	5,694
4	3,652	4,725	2,078	3,408	2,751	3,381
5	3,275	3,865	2,712	3,412	3,466	3,317
6	2,713	4,196	4,261	5,116	5,490	2,797
7	3,590	3,233	5,055	3,175	3,806	4,931
8	3,201	4,569	4,037	3,660	3,066	2,505
Průměr	3,453	3,989	3,884	3,555	3,899	4,100
σ	1,233	0,712	1,079	0,975	1,005	1,368
v <sub>x</sub>	35,72	17,86	27,78	27,44	25,77	33,38
t72						
c [%]	0	5,86	11,72	23,45	46,9	93,80
1	29,504	30,616	14,768	7,824	13,170	32,157
2	9,558	24,345	31,315	30,392	23,301	29,259
3	16,239	34,641	26,563	12,392	26,082	30,041
4	24,241	23,361	17,490	24,685	16,100	16,487
5	26,781	29,838	18,854	21,492	23,327	23,569
6	23,728	29,615	26,893	30,352	27,694	16,517
7	29,000	20,553	29,346	23,267	26,505	22,137
8	28,889	21,087	30,492	21,500	24,431	19,116
Průměr	23,493	26,757	24,465	21,488	22,576	23,660
σ	7,109	5,109	6,454	7,934	5,194	6,207
v <sub>x</sub>	30,26	19,09	26,38	36,92	23,01	26,24

Tabulka 19: Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] pro vzorek 12\_01\_O

c [%]	0	5,86	11,72	23,45	46,90	93,80
1	23,281	26,748	10,984	5,955	9,502	25,940
2	6,628	21,591	26,029	25,804	19,730	25,305
3	14,200	29,943	22,708	9,178	20,712	24,347
4	20,589	18,636	15,412	21,277	13,349	13,106
5	23,506	25,973	16,142	18,080	19,861	20,252
6	21,015	25,419	22,632	25,236	22,204	13,720
7	25,410	17,320	24,291	20,092	22,699	17,206
8	25,688	16,518	26,455	17,840	21,365	16,611
Průměr	20,040	22,769	20,582	17,933	18,678	19,561
σ	6,530	4,954	5,672	7,084	4,707	5,170
v <sub>x</sub>	32,59	21,76	27,56	39,50	25,20	26,43
Inhibice [%]		-13,62	-2,70	10,51	6,80	2,39

Tabulka 20: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při testování vzorků 23\_03\_O\_1, 23\_03\_O\_2 a 23\_03\_P před a po nasazení

t0						
c	0	O_1 100%	O_2 100%	P 25%	P 50%	P 100%
1	5,915	10,360	9,085	9,413	8,242	9,832
2	3,859	5,040	6,543	6,125	5,968	9,046
3	6,267	3,902	4,640	6,558	5,525	1,033
4	2,446	3,360	2,898	3,907	8,999	4,954
5	4,573	9,841	4,654	5,097	4,459	2,132
6	5,573	4,088	5,449	2,865	6,334	6,534
7	6,401	2,660	9,189	2,508	5,887	8,452
8	11,193	3,817	3,755	3,265	3,098	7,590
Průměr	5,778	5,384	5,777	4,967	6,064	6,197
σ	2,570	2,990	2,336	2,334	1,895	3,234
v <sub>x</sub>	44,48	55,55	40,45	46,99	31,25	52,19
t72						
c	0	O_1 100%	O_2 100%	P 25%	P 50%	P 100%
1	19,298	20,408	22,184	33,616	21,492	20,502
2	11,194	18,416	20,316	21,340	12,752	19,321
3	21,802	11,306	12,182	30,028	15,038	8,559
4	12,848	11,818	13,783	15,956	23,366	11,058
5	16,066	21,086	15,406	21,655	13,651	9,236
6	14,225	14,832	15,140	14,597	17,136	15,039
7	18,376	9,358	23,543	7,814	12,692	14,069
8	24,844	13,879	11,964	24,973	7,401	14,744
Průměr	17,332	15,138	16,815	21,247	15,441	14,066
σ	4,635	4,387	4,556	8,425	5,142	4,361
v <sub>x</sub>	26,74	28,98	27,10	39,65	33,30	31,01

Tabulka 21: Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] pro vzorky 23\_03\_O\_1, 23\_03\_O\_2 a 23\_03\_P

c	0	O_1 100%	O_2 100%	P 25%	P 50%	P 100%
1	13,383	10,048	13,099	24,203	13,250	10,670
2	7,335	13,376	13,773	15,215	6,784	10,275
3	15,535	7,404	7,542	23,470	9,513	7,526
4	10,402	8,458	10,885	12,049	14,367	6,104
5	11,493	11,245	10,752	16,558	9,192	7,104
6	8,652	10,744	9,691	11,732	10,802	8,505
7	11,975	6,698	14,354	5,306	6,805	5,617
8	13,651	10,062	8,209	21,708	4,303	7,154
Průměr	11,553	9,754	11,038	16,280	9,377	7,869
σ	2,708	2,173	2,532	6,592	3,403	1,830
v <sub>x</sub>	23,44	22,27	22,94	40,49	36,29	23,25
Inhibice [%]		15,57	4,46	-40,91	18,84	31,89

Tabulka 22: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity Ibalginu® – předběžný test, před a po

t0						
c [%]	0	1.10 <sup>-1</sup>	1.10 <sup>-1</sup>	1	10	100
1	3,634	7,824	4,140	9,098	3,999	6,696
2	6,651	3,337	2,846	5,521	2,918	6,599
3	3,341	2,803	6,561	4,071	3,314	4,696
4	4,537	4,402	4,530	4,980	2,981	2,200
5	4,185	4,667	2,681	3,526	4,215	2,157
6	5,975	3,791	4,287	5,906	4,156	4,311
7	3,120	3,872	3,490	4,005	4,235	2,366
8	3,848	3,105	3,945	2,481	3,274	4,721
Průměr	4,411	4,225	4,060	4,949	3,637	4,218
σ	1,268	1,584	1,210	2,008	0,570	1,854
v <sub>x</sub>	28,75	37,48	29,80	40,59	15,68	43,94
t72						
c [%]	0	1.10 <sup>-1</sup>	1.10 <sup>-1</sup>	1	10	100
1	18,902	32,897	26,988	27,687	15,607	6,243
2	32,750	24,581	21,039	30,216	12,755	6,118
3	26,528	31,366	32,758	25,233	14,368	3,646
4	35,846	22,914	33,611	29,504	13,348	1,989
5	19,108	28,129	26,086	21,680	16,095	2,279
6	38,127	31,364	24,278	26,284	16,681	4,233
7	30,385	27,811	11,290	24,570	19,770	2,219
8	32,344	20,873	32,622	18,812	12,496	4,476
Průměr	29,249	27,492	26,084	25,498	15,140	3,900
σ	7,199	4,358	7,487	3,853	2,433	1,691
v <sub>x</sub>	24,613	15,853	28,702	15,111	16,068	43,361

Tabulka 23: Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity Ibalginu® – předběžný test

c [%]	0	1.10 <sup>-1</sup>	1.10 <sup>-1</sup>	1	10	100
1	15,268	25,073	22,848	18,589	11,608	0,000
2	26,099	21,244	18,193	24,695	9,837	0,000
3	23,187	28,563	26,197	21,162	11,054	0,000
4	31,309	18,512	29,081	24,524	10,367	0,000
5	14,923	23,462	23,405	18,154	11,880	0,122
6	32,152	27,573	19,991	20,378	12,525	0,000
7	27,265	23,939	7,800	20,565	15,535	0,000
8	28,496	17,768	28,677	16,331	9,222	0,000
Průměr	24,837	23,267	22,024	20,550	11,504	0,015
σ	6,642	3,915	6,920	2,946	1,961	0,043
v <sub>x</sub>	26,743	16,826	31,420	14,337	17,049	282,843
Inhibice [%]		6,32	11,33	17,26	53,68	99,94

Tabulka 24: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity Ibalginu® – definitivní test, před a po

t0						
c [%]	0	1,0	1,8	3,2	5,6	10,0
1	3,616	4,954	8,032	4,134	2,217	4,910
2	3,210	3,372	1,999	2,209	2,903	2,245
3	1,857	2,776	1,393	1,375	4,631	1,417
4	4,567	3,931	6,326	1,437	1,672	1,866
5	4,356	3,078	2,328	3,007	3,004	1,648
6	3,367	5,087	6,207	1,345	2,510	2,334
7	7,201	2,171	2,537	1,482	1,655	1,943
8	3,844	2,988	1,975	2,534	2,016	1,621
Průměr	4,002	3,545	3,850	2,190	2,576	2,248
σ	1,535	1,039	2,569	1,001	0,973	1,120
v <sub>x</sub>	38,34	29,30	66,73	45,69	37,77	49,81
t72						
c [%]	0	1,0	1,8	3,2	5,6	10,0
1	22,624	23,443	19,505	16,886	7,850	7,023
2	17,985	17,181	12,233	14,898	9,410	4,029
3	18,172	14,908	8,000	12,813	14,161	6,953
4	20,399	18,857	21,800	6,243	4,505	5,619
5	20,127	14,790	14,056	8,811	10,008	2,943
6	23,341	21,628	21,276	5,495	6,764	4,943
7	23,225	11,045	8,242	6,623	5,187	5,693
8	23,484	16,272	12,882	12,762	4,048	4,489
Průměr	21,170	17,266	14,749	10,566	7,742	5,212
σ	2,306	3,984	5,518	4,336	3,396	1,407
v <sub>x</sub>	10,89	23,07	37,41	41,04	43,87	26,99

Tabulka 25: Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity Ibalginu® – definitivní test

c [%]	0	1,0	1,8	3,2	5,6	10,0
1	19,008	18,489	11,473	12,752	5,633	2,113
2	14,775	13,809	10,234	12,689	6,507	1,784
3	16,315	12,132	6,607	11,438	9,530	5,536
4	15,832	14,926	15,474	4,806	2,833	3,753
5	15,771	11,712	11,728	5,804	7,004	1,295
6	19,974	16,541	15,069	4,150	4,254	2,609
7	16,024	8,874	5,705	5,141	3,532	3,750
8	19,640	13,284	10,907	10,228	2,032	2,868
Průměr	17,167	13,721	10,900	8,376	5,166	2,964
σ	2,031	2,985	3,488	3,746	2,484	1,357
v <sub>x</sub>	11,83	21,76	32,00	44,73	48,09	45,80
Inhibice [%]		20,08	36,51	51,21	69,91	82,74

Tabulka 26: Plochy listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity dichromanu draselného, před a po

t0						
c [mg/l]	0	0,032	0,056	0,1	0,18	0,32
1	0,761	1,123	0,771	1,264	0,992	0,834
2	1,251	0,700	0,464	1,204	0,915	0,658
3	0,514	1,416	0,790	0,813	0,795	0,900
4	0,910	0,734	1,367	0,713	0,742	0,923
5	0,955	0,643	0,682	0,661	0,703	0,446
6	1,466	0,905	0,824	0,651	0,847	0,929
7	0,824	0,637	1,020	1,036	0,595	0,787
8	0,763	0,391	0,464	0,926	0,603	0,538
Průměr	0,931	0,819	0,798	0,909	0,774	0,752
σ	0,301	0,322	0,295	0,241	0,142	0,185
v <sub>x</sub>	32,29	39,31	37,04	26,48	18,31	24,56
t72						
c [mg/l]	0	0,032	0,056	0,1	0,18	0,32
1	11,935	11,234	4,938	2,867	4,519	2,111
2	12,835	10,626	7,786	5,698	2,282	2,446
3	10,767	8,06	10,727	2,439	4,234	1,17
4	10,821	6,923	6,248	3,915	2,835	3,645
5	10,201	8,348	4,439	2,918	4,868	1,547
6	14,702	5,783	4,363	7,736	5,46	2,022
7	9,934	12,86	10,656	7,179	4,818	1,937
8	8,98	3,738	8,686	4,877	5,142	1,999
Průměr	11,272	8,447	7,230	4,704	4,270	2,110
σ	1,824	3,018	2,636	2,023	1,128	0,729
v <sub>x</sub>	16,18	35,73	36,45	43,01	26,42	34,55

Tabulka 27 : Rozdíly ploch listů [mm<sup>2</sup>] při testování toxicity dichromanu draselného

c [mg/l]	0	0,032	0,056	0,1	0,18	0,32
1	11,174	10,111	4,167	1,603	3,527	1,277
2	11,584	9,926	7,322	4,494	1,367	1,788
3	10,253	6,644	9,937	1,626	3,439	0,270
4	9,911	6,189	4,881	3,202	2,093	2,722
5	9,246	7,705	3,757	2,257	4,165	1,101
6	13,236	4,878	3,539	7,085	4,613	1,093
7	9,110	12,223	9,636	6,143	4,223	1,150
8	8,217	3,347	8,222	3,951	4,539	1,461
Průměr	10,341	7,628	6,433	3,795	3,496	1,358
σ	1,605	2,964	2,662	2,038	1,184	0,700
v <sub>x</sub>	15,52	38,86	41,38	53,70	33,88	51,52
Inhibice [%]		26,24	37,80	63,30	66,20	86,87

Příloha 3: Kompletní výsledky Thamnotoxkit F

Tabulka 28: Mrtví jedinci a procenta mortality pro toxicitu Ibalginu®

c [%]	0	0,01	0,1	1	10	100
A	2	0	0	1	1	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
mortalita	7%	0%	0%	3%	3%	0%

Tabulka 29: Mrtví jedinci a procenta mortality pro vzorek 26\_01\_O

c [%]	0	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
A	1	0	0	1	2	3
B	0	0	2	2	2	3
C	0	0	0	2	2	3
mortalita	3,33%	0,00%	6,67%	16,67%	20,00%	30,00%

Tabulka 30: Mrtví jedinci a procenta mortality pro vzorek 03\_02\_O

c [%]	0	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
A	0	0	0	0	1	0
B	0	0	0	1	0	0
C	0	0	0	3	0	1
mortalita	0%	0%	0%	13%	3%	3%

Tabulka 31: Mrtví jedinci a procenta mortality pro vzorek 04\_02\_O

c [%]	0	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
A	0	0	0	0	2	2
B	0	0	0	0	1	0
C	0	2	0	0	0	0
mortalita	0%	7%	0%	0%	10%	7%

Tabulka 32: Mrtví jedinci a procenta mortality pro vzorky 23\_03\_O\_1 (O\_1) a 23\_03\_O\_2 (O\_2)

c [%]	0	(O_1) 25	(O_1) 50	(O_1) 100	(O_2) 50	(O_2) 100
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
mortalita	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabulka 33: Mrtví jedinci a procenta mortality pro vzorek 23\_03\_P

c [%]	0,00	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
A	0	0	0	0	0	10
B	0	0	0	0	0	10
C	0	0	0	0	0	10
mortalita	0%	0%	0%	0%	0%	100%