

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Testování ekotoxicity vybraných mikropolutantů

Bc. Petra Bencová

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Bencová**
Osobní číslo: **C15610**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Testování ekotoxicity vybraných mikropolutantů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikropolutantů ve vodném prostředí s důrazem na léčiva. V rešerši se dále zaměřte na testy ekotoxicity těchto mikropolutantů a na metody, kterými je možné tyto látky z vod odstranit.
2. Proveďte testy ekotoxicity vytipovaných léčiv, výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Zuzana Blažková

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Ostatní konzultanti:

Ing. Vojtěch Trousil

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

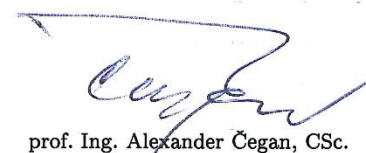
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Bc. Petra Bencová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D., Mgr. Zuzaně Blažkové a Ing. Vojtěchovi Trousilovi za vedení diplomové práce, jejich čas, cenné rady a připomínky, které mi poskytli při zpracování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat především svým blízkým, hlavně rodině, za jejich psychickou a finanční podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na ekotoxikologické účinky vybraných léčiv. Testovanými léčivy byly diklofenak, naproxen, kofein a kyselina klofibrová. Uvedená léčiva se vyskytují převážně ve vodní složce životního prostředí, proto byly použity testy ekotoxicity na vodních organismech. Testovanými organismy byly *Pseudomonas putida*, *Parachlorella kessleri*, *Sinapis alba* a *Lemna minor*. Na základě testů byly vyhodnoceny účinky těchto léčiv a byla posouzena jejich ekotoxicita. Jako nejtoxičtější bylo ve všech testech vyhodnoceno léčivo diklofenak. Nejnižší efekt byl pozorován u kofeinu a naproxenu. V případě experimentů se směsí testovaných léčiv se jejich synergický efekt neprojevil.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikropolutanty, léčiva, ekotoxicita, čištění odpadních vod, biodegradace

TITTLE

Testing of ecotoxicity of selected micropollutants

ANNOTATION

This thesis is focused on the ecotoxicological effects of selected pharmaceuticals. Diclofenac, naproxen, caffeine and clofibric acid were tested. The pharmaceuticals are found mainly in the aquatic environment, therefore testing of ecotoxicity were used on the aquatic organisms. The tested organisms were *Pseudomonas putida*, *Parachlorella kessleri*, *Sinapis alba* and *Lemna minor*. On the basis this tests were determined the effects of pharmaceuticals and their ecotoxicity was assessed. Diclofenac was the most toxic in all tested pharmaceuticals. The lowest effect was observed with caffeine and naproxen. In the case of experiments with a mixture of pharmaceuticals, the synergistic effect did not show up.

KEYWORDS

micropollutants, pharmaceuticals, ecotoxicity, wastewater treatment, biodegradation

Obsah

Úvod.....	10
Teoretická část	11
1 Mikropolutanty ve vodním prostředí	11
1.1 Pesticidy.....	12
1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky	13
1.3 Nanočástice.....	14
1.4 Léčiva	14
2 Charakteristika vybraných léčiv	16
2.1 Diklofenak	16
2.2 Naproxen	18
2.3 Kyselina klofibrová	19
2.4 Kofein	20
3 Testy ekotoxicity.....	21
3.1 Rozdělení testů	21
3.1.1 Podle typu	21
3.1.2 Podle doby expozice	22
3.1.3 Podle pokročilosti testovacího systému	22
3.1.4 Podle testovaného organismu	23
3.1.5 Podle testovaného vzorku	23
3.2 Test na bakteriích.....	23
3.3 Test na sladkovodních řasách	25
3.4 Test na semenech vyšších rostlin.....	26
3.5 Test inhibice růstu okřehku	27
3.6 Test na korýších.....	28
3.7 Test na sladkovodních rybách	29
4 Ekotoxicita vybraných léčiv	30

4.1	Diklofenak	30
4.2	Naproxen	31
4.3	Kyselina klofibrová	31
4.4	Kofein	32
5	Metody odstraňování mikropolutantů	32
5.1	Moderní technologie	33
5.1.1	Pokročilé oxidační procesy	33
5.1.2	Membránové procesy	35
6	Biologická degradace	36
6.1	Aktivovaný kal	36
6.1.1	Růst mikroorganismů v aktivovaném kalu	36
6.1.2	Aktivační proces	37
6.2	Základní biochemické procesy probíhající během biologického čištění	38
6.2.1	Aerobní biologické pochody	38
6.2.2	Anaerobní biologické pochody	39
6.2.3	Biologické odstraňování nutrientů	39
6.3	Membránový bioreaktor	41
7	Stanovení účinnosti degradace	42
7.1	Biologická spotřeba kyslíku	42
7.2	Chemická spotřeba kyslíku	43
7.3	Stanovení dusíku	43
7.4	Fosfor	44
	Cíl práce	45
	Experimentální část	46
8	Materiál	46
8.1	Testované organismy	46
8.2	Pomůcky	46

8.3	Chemikálie a reagencie	46
8.4	Přístroje.....	48
9	Pracovní postup.....	48
9.1	Určení vlnové délky absorpčního maxima léčiv	48
9.2	Proměření kalibračních řad léčiv	50
9.3	Test inhibice růstu na bakterii <i>Pseudomonas putida</i>	53
9.4	Test inhibice růstové rychlosti řas <i>Parachlorella kessleri</i>	56
9.5	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	57
9.6	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	59
10	Výsledky a diskuze	61
10.1	Test inhibice růstu na bakterii <i>Pseudomonas putida</i>	61
10.2	Test inhibice růstové rychlosti řas <i>Parachlorella kessleri</i>	69
10.3	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	75
10.4	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	78
11	Závěr	82
12	Seznam použitých zdrojů.....	84

Seznam zkratek

A	absorbance
AMP	adenosinmonofosfát
AOP's	advanced oxidation proceses – pokročilé oxidační procesy
ATP	adenosintrifosfát
BSK	biochemická spotřeba kyslíku
ČOV	čistírna odpadních vod
D, N, K, kK	diklofenak, naproxen, kofein, kyselina klofibrová
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	efektivní koncentrace
HDL	high-density lipoprotein
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
I	inhibice
IC	inhibiční koncentrace
LC	letální koncentrace
LDL	low-density lipoprotein
LOEC	lowest observed effect concentration
MBR	membránový bioreaktor
NOEC	no observed effect concentration
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug
P	probity
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PPAR	peroxysome proliferator activated receptor
UZ	ultrazvuk
VLDL	very low-density lipoprotein
ZF	formazinová jednotka zákalu
ZR	zásobní roztok

Úvod

V dnešní době se kolem nás nachází nespočetné množství chemických látek, ať už se jedná o čisticí prostředky, produkty každodenní lidské péče, léčiva, potravinová aditiva nebo látky využívané v zemědělském průmyslu. U některých z nich jsou známy dopady na životní prostředí a lidské zdraví založených na mnohaletých studiích. U většiny z nich jsou však jejich účinky a následky předmětem výzkumu s mnohdy nejasnými výsledky.

Tato práce je zaměřena na léčiva, kterých se ročně vyrobí několik tisíc tun (cca 200 tun ibuprofenu) a jsou využívána nejen v lidské, ale i veterinární praxi. Spotřeba farmak každoročně vzrůstá, a proto je důležité věnovat tomuto tématu pozornost. Je zapotřebí zaměřit se na jejich likvidaci a usilovat o snížení přítomnosti v životním prostředí, která souvisí s nepříznivými účinky. Záchyt některých farmak na čistírnách odpadních vod je velmi nízký, a proto dochází k jejich akumulaci v přírodě. Každý z nás by si měl uvědomit, co se s léčivem v našem těle děje, jak je z organismu vylučováno a jaký je jeho další osud. Mnoho lidí nespotřebované léčivo vyhazují do odpadu a neuvědomují si pozdější následky.

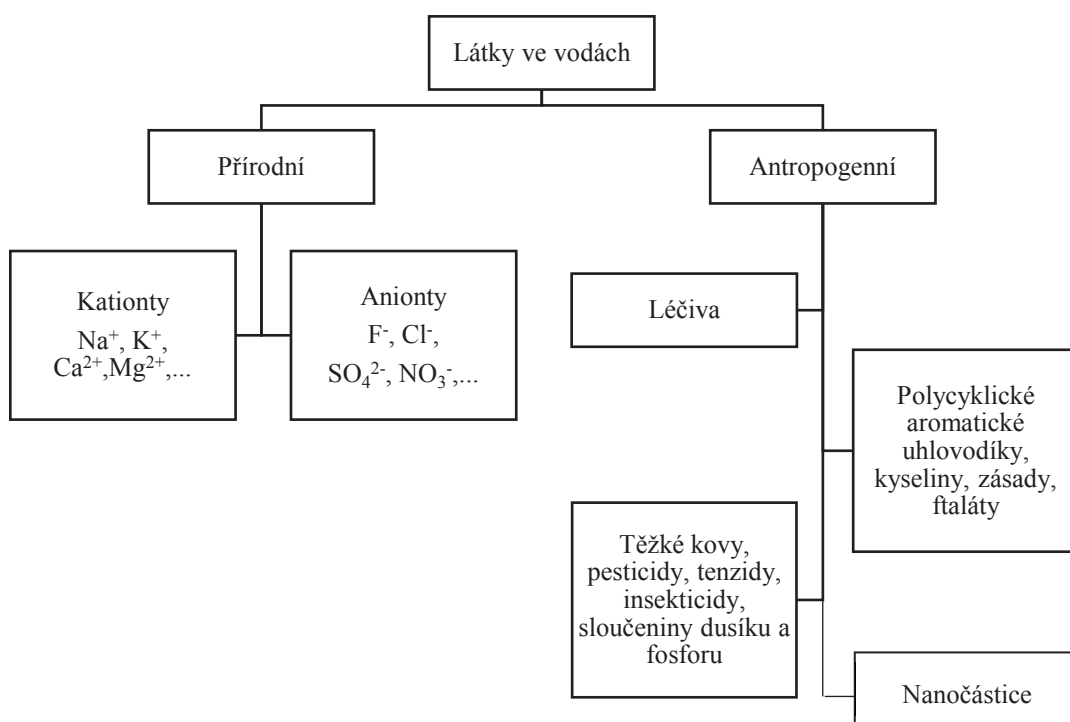
Tato diplomová práce je zaměřená na čtyři vybraná léčiva – diklofenak, naproxen, kyselinu klofibrovou, kofein a jejich vzájemné směsi. Jsou zde shrnuty jejich základní vlastnosti, testování ekotoxicity a metody jejich odstraňování. Cílem praktické části této diplomové práce bylo zjištění vlivů těchto léčiv na organismy životního prostředí pomocí testů ekotoxicity.

Teoretická část

1 Mikropolutanty ve vodním prostředí

Voda obsahuje kromě látek nacházejících se v ní zcela přirozeně i ty, které vznikají následkem lidské činnosti. Mezi přirozené složky vody patří například ionty hořčíku, sodíku, chloridy a dusičnany. Nežádoucí antropogenní vliv se projevuje také obsahem tzv. mikropolutantů, jejich koncentrace se pohybují řádově v ng/l – µg/l. Tyto látky jsou považovány za potenciální nebezpečí v životním prostředí, kde vlivem transformačních procesů dochází k jejich degradaci v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech. Metabolity těchto látek mívají obvykle jiné vlastnosti než původní látky a mohou být i toxičtější. Často mají nepříznivé účinky na vodní organismy, jako jsou akutní a chronická toxicita, bioakumulace či endokrinní poruchy. Mezi mikropolutanty jsou řazeny např. polyaromatické uhlovodíky, bifenyly, pesticidy a v současné době také léčiva a nanočástice (Obr. 1) [1, 2]. Mikropolutanty lze rozdělit z několika hledisek:

- dle původu:
 - biologické (mikrobiální)
 - fyzikální (zápach, barva, radioaktivita)
 - chemické (organické a anorganické sloučeniny)
- dle fyzikálně-chemických vlastností:
 - polární × nepolární
 - těkavé × netěkavé
 - rozpustné × nerozpustné
- dle zdroje znečištění:
 - farmacie (syntéza, užívání léčiv, likvidace)
 - zemědělství (pesticidy)
 - ostatní výrobní průmysl (potravinářský, chemický apod.)
 - těžba atd. [1, 3, 4]

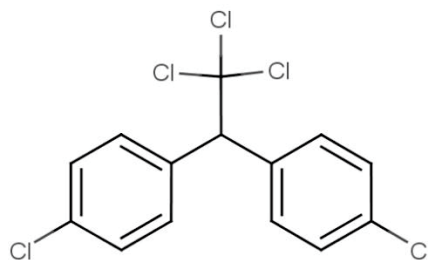


Obr. 1 Schématické znázornění možných látek přítomných ve vodách [4]

V dalších kapitolách budou uvedeny pouze některé vybrané mikropolutanty – pesticidy a polycyklické aromatické uhlovodíky, nanočástice, které jsou v současné době velmi hojně využívány a jejich výskyt v životním prostředí se stále zvyšuje a může se stát závažným problémem, a v neposlední řadě bude pozornost věnována léčivům, na které je tato diplomová práce převážně zaměřena.

1.1 Pesticidy

Jedná se o organické látky (např. herbicidy, insekticidy nebo fungicidy) používané k zneškodnění nežádoucích organismů. Liší se nejen svým chemickým složením, ale i cílovými skupinami organismů, proti kterým jsou namířeny. Pesticidy fungují na principu ovlivnění mechanismů, které jsou pro daný organismus životně důležité. Nejširší využití mají v zemědělství. Jedním z negativních důsledků jejich používání je však kontaminace povrchových i podzemních vod. Jeden z nejznámějších insekticidů je 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT), strukturální vzorec viz obrázek (Obr. 2), jehož užívání bylo ve většině zemí již zakázáno [5, 6, 7].

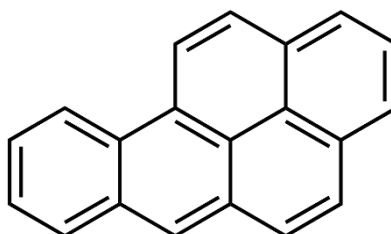


Obr. 2 Strukturální vzorec DDT [5]

Obdobně jako u spousty dalších látek, vznikají při koloběhu pesticidů v přírodě degradační produkty, které mohou být toxičtější než původní látka. Mají omezenou biodegradabilitu, jejich rezidua přetrvávají v životním prostředí dlouhodobě a vstupují do potravních řetězců. Díky afinitě k tkáním bohatým na lipidy dochází k jejich kumulaci v organismech a jejich toxicita je zejména pro vodní organismy velmi vysoká. Prostřednictvím konzumace vodních organismů, pitné vody a zemědělských plodin se tyto sloučeniny dostávají do těl živočichů. Zde mohou narušovat hormonální a nervový systém. Také mohou přispívat ke vzniku nádorových onemocnění [3, 6].

1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou skupinou organických látek dlouhodobě perzistujících v životním prostředí, do kterého vstupují především důsledkem špatného spalování organických materiálů, z průmyslových (výroba tepla, elektrické energie) i neprůmyslových procesů (požáry, doprava) nebo přepalováním vznikajícím během přípravy potravin (grilování). Tyto látky jsou téměř všudypřítomné, dochází ke kontaminaci jak ovzduší, tak vody i půdy a k jejich bioakumulaci. Jsou lipofilní, což má za následek jejich snazší přenos v živých organismech. Za nejsilnější a nejvíce prozkoumávaný karcinogen je považován benzo(a)pyren (Obr. 3) [8, 9, 10].



Obr. 3 Strukturální vzorec benzo(a)pyrenu [9]

Škodlivý účinek PAU na zdraví lidí není většinou okamžitý, poškození se projeví až po několika letech. Jejich toxicita je pro vodní živočichy střední až vysoká. Byly zjištěny

negativní účinky těchto látek na ledviny a játra. Studie s živočichy prokázaly vliv na snížení plodnosti a vývojové vady potomků [6, 9, 11, 12].

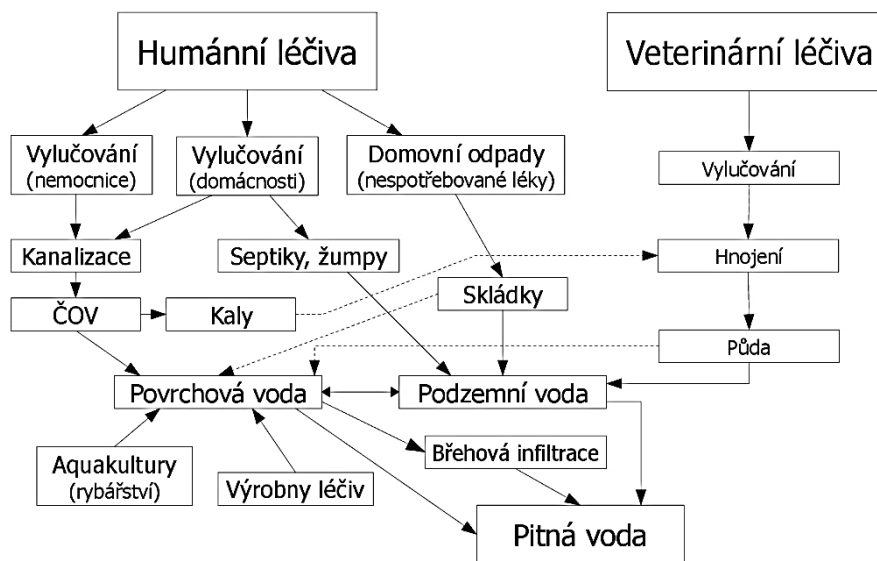
1.3 Nanočástice

Nanočástice je všeobecné označení objektů různých tvarů a chemického složení majících alespoň jeden rozměr menší než 100 nanometrů. Používání nanočástic se v současné době zvyšuje, jejich užití je uplatňováno v řadě odvětví včetně farmakologie a biomedicíny, potravinářství, kosmetiky, elektroniky či dekontaminace životního prostředí. K velmi často používaným materiálům se řadí nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2), oxidu měďnatého (CuO), stříbra (Ag) nebo uhlíkových nanotub. Látky ve formě nanočástic však mívají často odlišné vlastnosti v porovnání s jejich makroskopickou formou. Nanočástice mohou být přírodního původu (složky v prachu, pyl, vzniklé sopečnou činností), antropogenního původu (např. automobilová doprava) nebo uměle připravené pro danou aplikaci [13, 14].

Nanočástice vyskytující se v ovzduší a ve vodě mohou mít nepříznivý vliv na lidské zdraví i na životní prostředí [15]. Jejich osud v organismu závisí především na velikosti a chemických vlastnostech. Menší částice pronikají snadněji a ve vyšším počtu do tkání a mohou vyvolávat toxický efekt v organismu. Jejich vylučování je však rychlejší než u částic větších rozměrů [13, 16]. Velmi velký povrch nanočástic může mít za následek tvorbu škodlivých oxyradikálů, které mohou způsobit poškození buněk poškozením funkce DNA, proteinů nebo membrán v biologických systémech [17]. Další ekotoxikologické studie poukazují na toxicitu pro vodní organismy (bakterie, dafnie nebo ryby), ale pouze při vysokých koncentracích [18]. Rovněž byla vypracována řada studií prokazujících jejich negativní vliv na kardiovaskulární a respirační systém člověka [14,16].

1.4 Léčiva

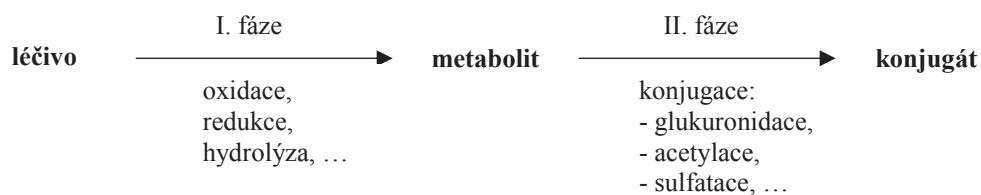
Léčiva jsou farmaceuticky aktivní látky, které se používají k ovlivnění fyziologických vlastností lidí či zvířat. Jejich koncentrace v životním prostředí koreluje s jejich zvýšeným užíváním [19]. První zmínka o výskytu léčiv ve vodním ekosystému byla v roce 1976 [20]. Farmaka se do prostředí dostávají z humánní i veterinární lékařské praxe, při jejich exkreci a z odpadů (Obr. 4). Nejčastějšími zástupci léčiv jsou nesteroidní protizánětlivé léky (např. ibuprofen, diklofenak), antibiotika (jako třeba penicilin, tetracyklin), hormonální antikoncepce nebo antiepileptika (např. karbamazepin) [3, 21].



Obr. 4 Cesta léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí [22]

Farmaceutika nemusí být v těle zcela metabolizována, jsou pak vylučována jako metabolity nebo v nezměněné podobě. Osud léčiv v organismu závisí na způsobu jejich aplikace (zejména orálně či intravenózně), farmakokinetice a dalších faktorech – absorpci, distribuci, biotransformaci a eliminaci.

Absorpce léčiva z místa podání závisí na jeho fyzikálně-chemické povaze, distribuce je jeho transport tělním oběhem do tkání. K odpovědi organismu na přítomnost léčiva v systému může dojít již během absorpce (např. u žilního podání). Biotransformace probíhá ve dvou fázích. Zahrnuje biochemické přeměny léčiva, především v játrech a vede k inaktivaci léčiva, nebo naopak k tvorbě aktivní až toxické formy. Během I. fáze dochází k přeměně nepolární sloučeniny na polární vnesením nebo odkrytím funkčních skupin (-COOH, -SH, -OH). Druhá fáze pak zajišťuje konjugaci substrátu k vytvořenému produktu z I. fáze, aby mohlo dojít k jeho vyloučení. Mezi nejčastější konjugační činidla patří kyselina glukuronová, acetát, sulfát nebo glutathion (Obr. 5). Na závěr dochází k eliminaci léčiva např. stolicí, močí, dechem atd. [3, 21, 23, 24].



Obr. 5 Biotransformace léčiv [23]

Standardní technologie (aktivace, kořenové čistírny) používané na klasických čistírnách odpadních vod (ČOV) neumožňují odstranit z vod veškeré zbytky léčiv, proto jsou k nim přiřazovány speciální technologie popsané níže (ozonizace atd.). Rovněž neexistuje univerzální čistírenský proces, který by mohl být použit pro všechna léčiva a některá z nich mohou být i rezistentní (karbamazepin). Neodstraněná rezidua léčiv se pak mohou vyskytovat nejen v tělech vodních živočichů a rostlin, kde dochází k jejich kumulaci, ale i v povrchové a pitné vodě [25]. Ačkoliv je většina léčiv navržena k působení v lidském organismu, je pravděpodobné, že necílové organismy vyskytující se v ekosystému budou také těmito látkami ovlivněny [26].

Je známa řada nežádoucích účinnů léčiv v životním prostředí. Například produkce estrogenních hormonů v rámci EU je v řádu stovek kilogramů ročně. V životním prostředí ovlivňují endokrinní mechanismy ryb a ostatních vodních organismů [19, 26]. Zároveň uvolňování antibiotik a jejich metabolitů do životního prostředí zvyšuje riziko vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotikům ve vodních ekosystémech [27].

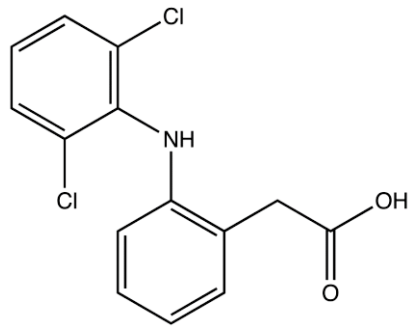
Stopy léčiv v pitné vodě jsou přítomny jen ve velmi malém množství, a to o několik řádů nižší, než je jejich nejnižší terapeutická dávka, a je tedy velmi nepravděpodobný škodlivý vliv na lidské zdraví způsobený konzumací pitné vody [28]. Nejvíce testů je ovšem zaměřeno na akutní účinky léčiv, zatímco údaje o chronických efektech chybí. Je zapotřebí cílených ekotoxikologických studií, které by umožnily lepší a komplexnější hodnocení rizik léčiv v budoucnosti [26]. Některé ekotoxikologické údaje vybraných léčiv jsou uvedeny v kapitole 4 *Ekotoxicita vybraných léčiv*.

2 Charakteristika vybraných léčiv

2.1 Diklofenak

Základní vlastnosti

Diklofenak (Obr. 6) je derivát kyseliny fenyloctové, bílý prášek bez zápachu vyskytující se ve formě sodné i draselné soli. Patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých látek (NSAID), kam se řadí mimo jiné i ibuprofen či níže uvedený naproxen [29, 30].



Obr. 6 Strukturální vzorek diklofenaku [31]

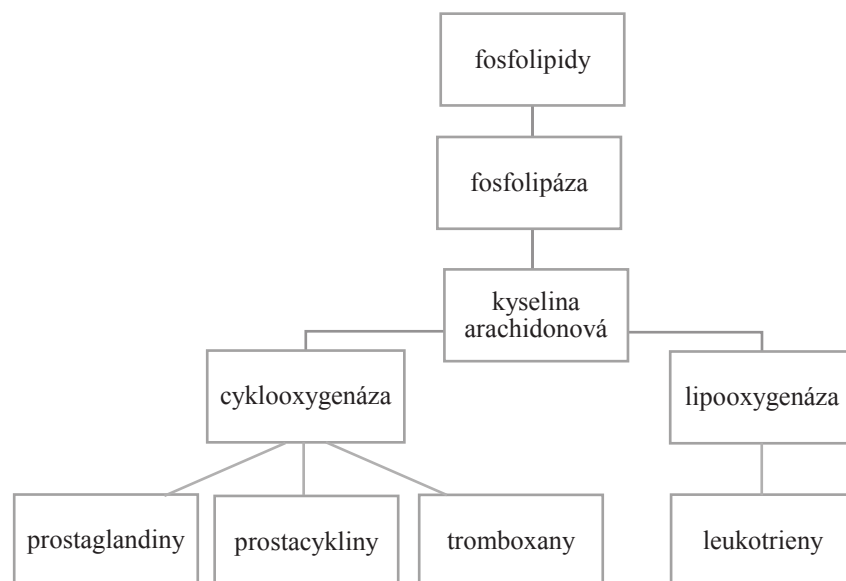
Využití

Diklofenak nachází využití jako antirevmatikum při léčbě artritid a revmatických onemocnění. Má protizánětlivé, antipyretické (snižující teplotu) a analgetické (tlumící bolest) účinky a je vydáván bez lékařského předpisu. Na trhu je k dostání ve formě různých tablet, kapslí, mastí a jeho spotřeba v České republice je cca 20 tun/rok [25, 32].

Princip působení

Absorpce z trávicího traktu probíhá rychle a zcela a je vylučován močí a žlučí [2, 31]. Metabolismus probíhá v játrech, kde za katalýzy enzymu CYP2C9 vzniká procesem hydroxylace 4- hydroxydiklofenak a 5- hydroxydiklofenak. Dále dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou [33].

Působení všech nesteroidních antirevmatik je v principu stejné a spočívá v inhibici funkce enzymu cyklooxygenázy, čímž dochází k zásahu do tvorby prostaglandinů vznikajících z kyseliny arachidonové (Obr. 7). Prostaglandiny zastávají celou řadu fyziologických funkcí (ochrana sliznice žaludku, regulace trombocytů) i funkcí patologických (vyvolávají bolest a projevy zánětu v místě poškození). Vlivem NSAID tedy dochází ke snížení funkce prostaglandinů a k potlačení jejich nežádoucích, ale i žádoucích účinků [30, 34].

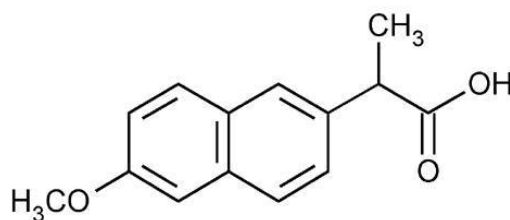


Obr. 7 Metabolismus kyseliny arachidonové [30]

2.2 Naproxen

Základní vlastnosti

Naproxen (Obr. 8) je derivátem kyseliny propionové vyskytující se převážně jako jeho sodná sůl ve formě krystalické látky bílé barvy [30, 35].



Obr. 8 Strukturální vzorec naproxenu [36]

Využití

Má širokospektré využití v oblasti léčby bolestí a zánětů, jako je dna, artritida či menstruační bolesti. Lék je určen k ústnímu podání, a to ve formě tablet, kapalných suspenzí či kapek s dlouhodobým uvolňováním [35, 37].

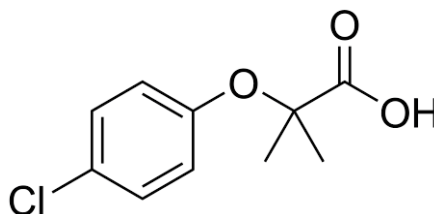
Princip působení

Stejně jako diklofenak je řazen mezi nesteroidní protizánětlivé léky způsobující inhibici syntézy prostaglandinů (Obr. 7). Naproxen je metabolizován konjugací s kyselinou glukuronovou za vzniku naproxen – glukuronidu a přeměn na neúčinný 6-desmethylnaproxen. Eliminace léčiva probíhá močí a stolicí [38].

2.3 Kyselina klofibrová

Základní vlastnosti

Kyselina klofibrová (Obr. 9) je krystalická látka béžové barvy. Jedná se o derivát fenoxymásečné kyseliny [39]. V povrchové vodě byla objevena náhodou v roce 1992, když vědci testovali jezerní vodu na přítomnost herbicidů [20].



Obr. 9 Strukturální vzorec kyseliny klofibrové [40]

Využití

Jedná se o základní metabolit fibrátů, používaných ke kontrole hladiny krevních lipoproteinů majících vliv na ukládání cholesterolu v cévním řečišti a na krevní tlak [19]. Spotřeba fibrátů v České republice je kolem 10 tun/rok [25].

Kyselina klofibrová je často používána k posouzení toxicity z důvodu její vyšší perzistence v životním prostředí, protože je díky svým vlastnostem vůči čistírenským procesům velmi odolná [2].

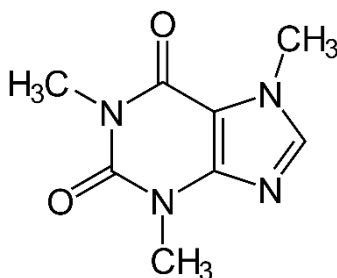
Princip působení

Hlavním mechanismem účinku je stimulace aktivity lipoproteinové lipázy mající za následek urychlení katabolismu VLDL (very low density lipoprotein) bohatých na triacylglyceroly, čímž snižují jejich hladinu a zároveň mírně zvyšují koncentraci HDL (high density lipoprotein) cholesterolu. Fibráty snižují i syntézu VLDL v játrech a současně se snižuje jaterní syntéza apolipoproteinu B (významný zejména u LDL lipoproteinů o nízké hustotě). Dále inhibují syntézu mastných kyselin a zvyšují jejich katabolismus procesem beta-oxidace. Tyto účinky jsou zprostředkovány tím, že ovlivňují aktivitu jaderných receptorů PPAR (peroxysome proliferator activated receptor). V současnosti jsou známy 3 druhy PPAR, z nichž podskupina α a β mají vliv právě na katabolismus a skladování mastných kyselin. Kyselina klofibrová je vylučována jako konjugát kyseliny glukuronové močí a velmi málo ve formě volné kyseliny [2, 26, 40].

2.4 Kofein

Základní vlastnosti

Kofein (Obr. 10) je derivát xantinu, vyskytuje ve formě bílého prášku slabě nahořklé chuti a bez zápachu. Jeho účinky jsou známy již po staletí, lidé žvýkali listy nebo semena rostlin doprovázené pocitem zlepšení nálady [41, 42].



Obr. 10 Strukturální vzorec kofeinu [37]

Využití

Kofein je látka s psychostimulačními účinky a je používán ve velkém množství léčiv, a to především jako pomocná látka. Vyskytuje se v listech, semenech a plodech kávovníku, ale i v čajovníku, kakaovníku a dalších. Nachází se ve spoustě potravin, nápojů (čokoláda, coca-cola, energetické nápoje) nebo doplňků stravy (přípravky na hubnutí) [41].

Princip působení

Stimuluje centrální nervovou soustavu a to především mozkovou kůru. Podporuje produkci katecholaminů a reninu v krevním oběhu. Udržuje organismus ve stavu bdělosti, zvyšuje psychickou a fyzickou aktivitu. Má močopudné účinky. Z trávicího traktu se rychle a kompletně resorbuje, metabolizuje se demetylací a oxidací na deriváty kyseliny močové (1-metylmočovou) [37, 43].

3 Testy ekotoxicity

Jedná se o experimentální metody, které se používají k vyhodnocení, zda testovaná chemická látka (léčivo) bude mít za přesně definovaných podmínek vliv na testované organismy, jak velký bude její vliv a také pomáhají odhadnout možné dopady na životní prostředí. Testovacím prvkem nejčastěji bývá tkáň, živý organismus nebo populace organismů. Toxická látka může způsobovat smrt organismu, ovlivňovat metabolické pochody, inhibici růstu, či naopak zapříčiňuje jeho nežádoucí nadměrný růst. Testy se vždy provádí zároveň s kontrolními organismy, které nejsou vystaveny vlivu toxické látky [44, 45, 46]. Charakteristiky nejběžněji používaných testů jsou uvedeny v kapitolách 3.2–3.7.

Výsledky testů mohou být charakterizovány dle následujících hodnot:

- LC_{50} letální koncentrace pro 50 % testovacích organismů,
- IC_{50} inhibiční koncentrace způsobující 50% inhibici růstu testovacích organismů,
- EC_{50} efektivní koncentrace vyvolávající 50% úhyn nebo imobilizaci testovacích organismů,
- NOEC nejvyšší koncentrace, u které ještě nedošlo k vyvolání viditelného efektu,
- LOEC nejnižší koncentrace, ve které dochází k viditelnému efektu [26, 28].

3.1 Rozdělení testů

3.1.1 Podle typu

– Standardní

Validované testy řízené dle norem, mají jednotné principy s přesnými postupy, seznamy použitých přístrojů a materiálů. Patří sem testy na sladkovodních řasách, perloočkách, rybách a semenech vyšších rostlin [26, 47].

– Alternativní

Hlavními vlastnostmi alternativních testů je miniaturizace a používání komerčně dostupných organismů (jako jsou například vajíčka nebo cysty). Jejich nespornou výhodou je úspora chemikálií a času věnovaného pěstování organismů. Testy jsou dodávány ve formě kitu (např. Daphtoxkit s korýšem *Daphnia magna*), který obsahuje laboratorní materiál, chemikálie a testovaný organismus [45, 47].

– Akvatické

Jedná se o testy na vodních organismech, jejichž cílem je zjistit, jak bude testovaná látka působit na organismy vodního ekosystému. Jsou vhodné pro vodní výluhy nebo látky

rozpustné ve vodě. Testovacími organismy jsou bakterie, řasy, vodních rostliny a ryby [47].

- **Kontaktní**

Kontaktní neboli terestrické testy se provádí pro zjištění účinků toxicity látek na půdní ekosystém. Využívají se především pro látky méně rozpustné ve vodě, pevné odpady, sedimenty a podobné materiály. Provádí se na půdních organismech, jako jsou žížaly, roupice, chvostokoci a rostliny (např. salát *Lactuca sativa*) [44, 48].

3.1.2 Podle doby expozice

- **Akutní**

Akutní testy sledují účinky, které se projevují v krátké době, což znamená, že doba trvání je v rozmezí 24–96 hodin. Řadíme sem standardní akutní testy toxicity na rybách a perloočkách, test klíčivosti kořenů rostlin a inhibiční test na řasách [26, 49].

- **Subakutní**

Délka trvání se pohybuje v rámci týdnů až měsíců. Slouží ke studiu toxických změn při opakovaném vystavení dané látce, ale nemusí odhalit následky dlouhodobého působení. Do této skupiny můžeme zařadit růstový inhibiční test okřehku menšího nebo prodloužený inhibiční test na řasách [46, 49].

- **Chronické**

Využívají se k určení negativních účinků látek při jejich dlouhodobém působení na organismy. Testovaným organismům jsou v pravidelných intervalech aplikovány dávky toxické látky a dle přesně definovaných parametrů se sledují patologické změny, které jsou pozorovány většinou v dalších generacích (např. neplodnost, mutagenita, karcinogenita). Testovacím organismem mohou být ryby, perloočky apod. [26, 49].

3.1.3 Podle pokročilosti testovacího systému

- **Testy 1. generace**

Využívají metod klasických testů založených na akutních testech prováděných v laboratoři na chovaných testovacích organismech. Jejich nevýhodou je ekonomicky náročné provedení z důvodu dlouhodobějšího udržení kultury testovacích organismů, pro příklad korýš *Daphnia magna*, řasa *Scenedesmus subspicatus* atd. [47, 49].

– Testy 2. generace

Mikrobiotesty, stejně jako výše zmiňované alternativní testy, jsou nenahraditelné pro testování velkého počtu vzorků a existují rovněž v miniaturizované formě. Vůči klasickým testům 1. generace jsou tedy úsporné jak z hlediska ekonomické (nižší spotřeba chemikálií), tak časové náročnosti (zkrácení doby kultivace). Organismy se dlouhodobě udržují v lyofilizované formě či v klidovém stádiu (bakterie, řasy) [45, 47].

– Testy 3. generace

Biosondy a biosenzory, např. s imobilizovanými řasami [49, 50].

3.1.4 Podle testovaného organismu

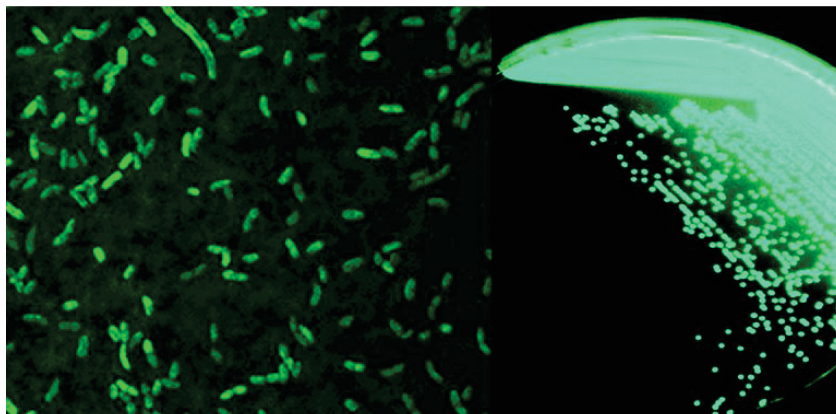
- Bakterie – *Vibrio fischeri*.
- Nižší rostliny – řasa *Desmodesmus subspicatus*.
- Vyšší rostliny – semena Hořčice bílé *Sinapis alba*.
- Bezobratlí živočichové – perloočka *Daphnia magna*.
- Obratlovci – živoročka duhová *Poecilia reticulata* [26, 47].

3.1.5 Podle testovaného vzorku

- Voda,
- půda,
- sediment apod. [49].

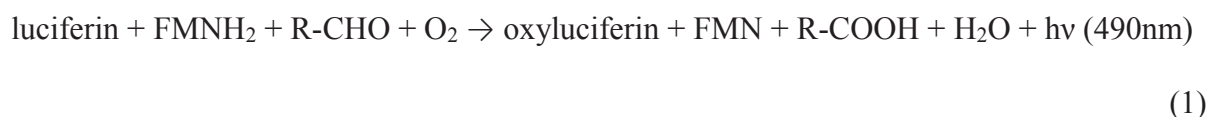
3.2 Test na bakteriích

Jedním z mikrobiálních indikátorů používaných pro provádění testů ekotoxicity je mořská bakterie *Vibrio fischeri*. Řadí se do skupiny gramnegativních bakterií. Tyto mikroorganismy jsou pohyblivé, k čemuž jim slouží bičík. Žijí převážně ve slané vodě v symbióze s mořskými živočichy, ale můžeme je najít i ve sladké vodě [51]. *V. fischeri* přirozeně emituje modrozelené světlo o vlnové délce 490 nm vznikající v organismu oxidací organických látek (viz Obr. 11). Bioluminiscence je řízena malým souborem genů známých jako *lux* operon [52].



Obr. 11 *Vibrio fischeri* [53]

Jedná se o děj, kde je živými organismy produkováno a emitováno světlo na principu chemické reakce luciferinu a enzymu luciferázy, kde enzym katalyzuje oxidaci luciferinu za přítomnosti redukovaného flavinmononukleotidu (FMN) dle rovnice č. 1 [52].



Doba trvání testu je 30 minut a jeho principem je změna bioluminiscence způsobená expozicí toxické látky a zjištění hodnoty relativní inhibice bioluminiscence H dle rovnice č. 2.

$$H = \left(\frac{I_K - I_c}{I_K} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

kde H je intenzita bioluminiscence v %, I_c je intenzita světla produkovaná bakteriemi o koncentraci c a I_K je intenzita světla kontroly.

Intenzita bioluminiscence je velmi citlivá na vnější podmínky a působení toxické látky se projeví jejím poklesem. Měření se provádí na luminometru [54]. Testy jsou také dodávány ve formě komerčních souprav pod různými názvy, např. MICROTOX [45]. Metoda je normována dle ČSN EN ISO 11348-1-3 [55].

Další testovanou bakterií bývá *Pseudomonas putida*, se kterou byly v této práci testy ekotoxicity prováděny. Jedná se o gramnegativní aerobní pohyblivé bakterie čeledi *Pseudomonadaceae*, mobilní tyčinky s bičíky, běžně se vyskytující ve vodě a půdě. Teplota pro optimální růst se pohybuje v rozmezí 25 až 30 °C. Metoda se zaměřuje na zkoumání inhibičního vlivu povrchových, podzemních a odpadních vod na růst buněk. Testuje se rozdíl růstu pod vlivem testované látky ve srovnání s růstem buněk v kontrole (bez zkoušené látky). Koncentrace buněk se stanovuje pomocí spektrofotometru jako absorbance při vlnové délce

436 nm po 16 h růstu. Metoda je normována dle ČSN EN ISO 10712. Vyhodnocení se provádí podle následující rovnice č. 3 [56, 57].

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_0} \cdot 100 \quad (3)$$

kde: I je inhibice rozmnožování buněk v %; B_c zákal v kontrole na konci zkušební doby; B_n zákal v testované koncentraci na konci zkušební doby a B_0 počáteční zákal v kontrole.

3.3 Test na sladkovodních řasách

Zelené řasy patří do skupiny necévnatých jednobuněčných vodních rostlin a poskytují potravu pro vodní živočichy ve formě planktonu. Nejčastěji využívanou skupinou pro tyto druhy testů jsou řasy rodu *Desmodesmus*. Některé rody vytvářejí tzv. coenobia tvořených ze dvou, čtyř, osmi a více buněk v řadě (viz Obr. 12) [47, 58].



Obr. 12 Řasa rodu *Desmodesmus* [59]

Test umožňuje sledovat nejen toxické efekty látek, ale i efekty stimulační. Díky rychlému růstu řas je možné pozorovat jak akutní působení látek, tak chronické. Klasické testy jsou prováděny v Erlenmayerových baňkách, což s sebou nese vysokou spotřebu kultivačních médií i času, proto se na místo baněk používají mikrotitrační destičky. Kultivace probíhá 72 hodin [47, 60].

Vyhodnocení se provádí pomocí mikroskopu v počítacích komůrkách, což patří mezi nejstarší a nejjednodušší metodu. Použitím této metody se dají rovněž odhalit změny v morfologii buněk a také přítomnost kontaminace (např. bakteriemi). Dále se využívá spektrofotometrického proměření absorbance při vlnové délce 680 nm odpovídající množství chlorofylu, či se měří zákal při 750 nm [47, 58, 60]. Při stanovení chlorofylu není výsledek zatížen nepřesností způsobenou přítomností bakterií a nerozpuštěných částic vyskytujících se u nesterilních vzorků z životního prostředí. Zákal přesněji popisuje množství buněk

v suspenzi, protože se koncentrace chlorofylu v buňce může měnit. Metody jsou opět normovány ČSN EN 8692 [47, 60, 61]. Výpočet růstové rychlosti řasové suspenze uvádí rovnici č. 4, výpočet inhibice růstové rychlosti řasové suspenze rovnice č. 5.

$$\mu_c = \frac{\ln_{N72} - \ln_{N0}}{t} \quad (4)$$

kde: μ_c růstová rychlost koncentrace c ; N_0 koncentrace buněk řas na začátku testu; N_{72} koncentrace buněk řas po době expozice; t doba expozice (72 hodin).

$$I_c = \left(\frac{\mu_c - \mu_K}{\mu_K} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

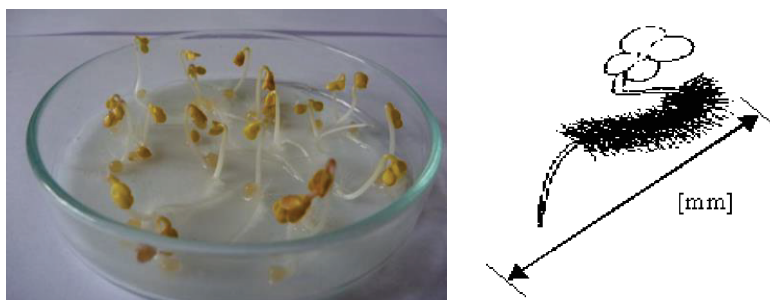
kde: I_c inhibice růstu v % pro koncentraci toxikantu c ; μ_K růstová rychlost v kontrole; μ_c růstová rychlost koncentrace c [60, 62].

3.4 Test na semenech vyšších rostlin

Mezi využívané testy na semenech vyšších rostlin patří test semichronické toxicity se semeny hořčice bílé *Sinapis alba* a byl vyvinut k testování nezávadnosti odpadních vod využívaných pro závlahu [63].

Hořčice bílá je jednoletá rostlina se žlutými květy, patří do čeledi brukvovitých a je významnou olejninou pěstovanou v Evropě. V posledních letech se pěstuje převážně pro semeno a využívá se nejen v potravinářském, ale i farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Řadí se rovněž mezi krmné plodiny [64].

Test je časově i finančně nenáročný a snadný na provedení [47, 63]. Testuje se vliv roztoku zkoumané látky na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé. Inkubace probíhá 72 hodin ve tmě. Principem je kultivace semen na filtračním papíře nasyceným roztokem zkoumané látky ve srovnání se semeny, která rostou pouze v ředící vodě. Výsledkem je odečet velikosti narostlého kořene, který je znázorněn na obrázku č. 13. Výpočet inhibice růstu kořene *Sinapis alba* uvádí rovnice č. 6. Tyto metody nejsou normovány [63, 65].



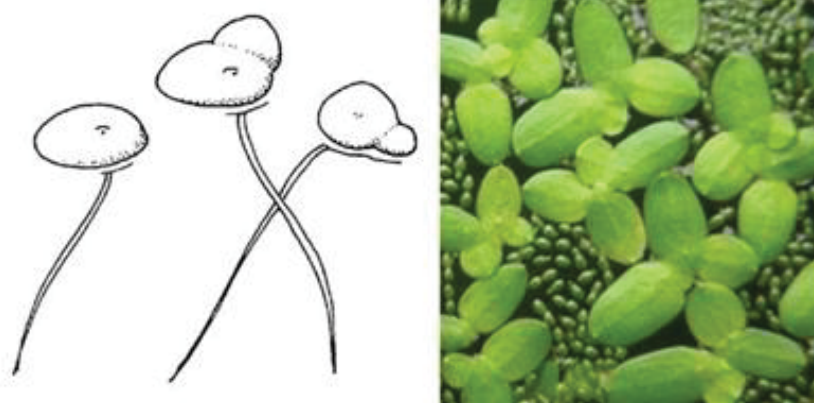
Obr. 13 Vykličené semeno *Sinapis alba* [66]

$$I = \left(\frac{D_K - D_c}{D_K} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

kde: I je inhibice růstu kořene v %; D_K průměrná délka kořene v kontrole v mm; D_c průměrná délka kořene v testované koncentraci v mm [63].

3.5 Test inhibice růstu okřehku

Pro testování toxicity látek na zástupcích vyšších vodních rostlin se využívá okřehek menší *Lemna minor*. Je řazen do skupiny krytosemenných jednoděložných rostlin čeledě *Lemnaceae* (okřehkovité). Nalezneme ho na povrchu stojatých vodních ploch, kde slouží jako potrava ryb a vodního ptactva. Jeho hustý porost brání pronikání světla pod hladinu a tím výrazně mění vlastnosti ekosystému a zhoršuje jakost vody. Stélka má tvar drobného lístku velikosti 3-6 mm s kořínkem (viz Obr. 14) [67, 68].



Obr. 14 *Lemna minor* [69]

Test je, stejně jako u řas, založen na inhibici růstu a délka expozice je 7 dní. Zjišťují se semichronické účinky látek, protože je zde zahrnut jak okamžitý účinek, tak i dlouhodobé působení. Rostliny okřehku menšího se nechají růst v různých koncentracích testované látky v živném roztoku současně s kontrolou bez testované látky. Po 24 hodinách se zaznamenává stav rostlin a počet stélek. Vyhodnocení účinku spočívá v měření jedné ze tří charakteristik – velikosti listové plochy, hmotnosti sušiny nebo obsahu chlorofylu. Postupy jsou normovány dle ISO 20079. Výpočet růstové rychlosti se provede pomocí rovnice č. 7 a inhibice růstu dle rovnice č. 8.

$$\mu_c = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (7)$$

kde: μ_c je růstová rychlost koncentrace c ; N_0 počet stélek na začátku testu; N_n počet stélek na konci testu; t doba expozice.

$$I_c = \left(\frac{H_K - H_c}{H_K} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

kde: I je inhibice měřeného znaku dané koncentrace v %; H_K měřený znak v kontrole; H_c měřený znak v testované koncentraci [45, 67, 68].

3.6 Test na koryších

Do seznamu standardních testů jsou řazeny také akutní testy toxicity na perloočkách *Daphnia magna* (Hrotnatka velká), patřících mezi planktonní organismy o velikosti cca 1,5-5 mm (Obr. 15). Perloočky jsou součástí potravního řetězce ryb a jsou tedy významnou složkou vodního ekosystému. Vedle akutních testů jsou ještě využívány testy zkoumající vliv látek na reprodukční aktivitu hrotnatek trvající 21 dní [47].



Obr. 15 *Daphnia magna* [50]

Před zahájením testu je třeba namnožit dostatečné množství perlooček, vhodné jsou organismy staré maximálně 24 hodin. Principem testu je vystavení dafnií jednotlivým koncentracím testované látky s dobou expozice 24 a 48 hodin. Během kultivace se pozoruje jejich stav a zaznamenávají se uhynulí a imobilizovaní jedinci ve srovnání s kontrolou [62, 70]. Výpočet procentuální imobilizace perlooček je popsán v rovnici č. 9. Výhodou hrotnatek je jejich krátká generační doba, snadná kultivace a velká rozšířenost druhu v přírodních podmínkách. Metoda je normována dle ČSN EN ISO 6341 [50, 71].

$$I_c = \left(\frac{N_c}{N_K} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

kde: I_c je imobilizace jedinců v dané koncentrace v %; N_K počet živých jedinců v kontrole; N_c počet imobilizovaných jedinců v testované koncentraci [70].

Kromě standardních testů řízených normami jsou v dnešní době čím dál častěji využívány alternativní testy, které jsou experimentálně, ať už z hlediska času, či spotřeby chemikálií, méně náročné. Mezi komerčně dodávané soupravy využívající jako testovací organismus dafnie patří např. Daphtoxkit [72].

3.7 Test na sladkovodních rybách

Vedle testů se pstruhem duhovým, zaměřených spíše na chronické účinky, se využívají i testy akutní toxicity na daniu pruhovaném (*Brachydanio rerio*) či živorodce duhové (*Poecilia reticulata*). Živorodka i danio dosahují velikosti 3-6 cm (Obr. 16) a jejich chov je snadný a nenáročný [47].



Obr. 16 *Brachydanio rerio* [73]

Testy jsou využívány k indikaci dlouhodobých změn kvality vody způsobených účinky cizorodých toxických látek. Nabývají na významnosti zejména proto, že ryby jsou důležitým článkem potravního řetězce vodního prostředí [47, 74].

Princip spočívá v pozorování ryb při různých koncentracích testované látky po dobu 96 hodin současně s kontrolou a zjišťuje se vliv látek na jejich chování a přežití. Stáří ryb je vhodné okolo 3-4 měsíců a celé testování probíhá bez provzdušňování a krmení. Metoda je dána normami ČSN EN ISO 7346-1-3 [62, 75].

Testy mohou probíhat za statických, semistatických nebo průtočných podmínek. Při statických se roztok neobnovuje a výhodou je, že nevyžaduje složité zařízení, ale zkoušené látky se mohou v průběhu rozložit a jakost vody se může zhoršit. V semistatických podmínkách jsou zkoušené roztoky obnovovány každých 24 nebo 48 hodin. U průtočných metod se nepřetržitě obnovuje zkoušený roztok, a proto je zapotřebí složitějšího zařízení [62, 76].

4 Ekotoxicita vybraných léčiv

Podle směrnice EU jsou látky klasifikovány v závislosti na jejich nejnižší naměřené hodnotě EC_{50} (IC_{50}):

- $EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$ velmi toxický pro vodní organismy
- $EC_{50} = 1-10 \text{ mg/l}$ toxický pro vodní organismy
- $EC_{50} = 11-100 \text{ mg/l}$ škodlivý pro vodní organismy
- $EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$ nejsou klasifikovány [77].

U většiny léčiv je jejich hodnota EC_{50} relativně nízká, a to v rozmezí 10-100 mg/l nebo více. Autor jedné ze studií testování ekotoxicity poukazuje na to, že testy, ve kterých je použita kombinace různých léčiv, vykazují silnější účinky, než u jednotlivých léčiv [70]. V níže popsaných kapitolách jsou uvedeny koncentrace léčiv, ve kterých je možné je nalézat v rozmanitých zdrojích vod a také jsou zde pro ukázkou uvedeny jejich toxické koncentrace pro organismy z vybraných studií.

4.1 Diklofenak

Jedná se o jedno z nejčastěji nalézáných léčiv v odpadních vodách, řekách, podzemních vodách, nemocničních odpadních vodách, dokonce i v pitné vodě (pouze řádově v ng/l). Ze skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv diklofenak prokazoval největší akutní toxicitu. Účinky byly pozorovány u koncentrací pod 100 mg/l. Výstupní koncentrace diklofenaku z čistíren odpadních vod ve Švýcarsku se pohybovala v rozmezí 1,42-2,4 µg/l [2]. V odpadních vodách byl nalezen v koncentracích okolo 0,81 µg/l, zatímco maximální koncentrace u povrchových vod byla 2 µg/l.

Hodnota LOEC u toxicity pro ryby byla v rozmezí koncentrací zjištěných u odpadních vod. Chronické studie prokázaly histopatologické účinky po 28 dnech expozice v ledvinách a játrech u pstruha duhového při koncentraci 5 µg/l a hyperplazii buněk ve střevě i při 1 µg/l. Nebyl pozorován účinek diklofenaku na vývoj embryí dáňá pruhovaného, kromě opožděného líhnutí u koncentrací 1-2 mg/l [26].

Při 30minutovém testu na bakterii *V. fischeri* byla nalezena hodnota EC_{50} 90 mg/l [21]. Inhibice průměrné rychlosti růstu řasy *D. subspicatus* byla EC_{50} 71.9 mg/l a u okřešku *L. minor* byla hodnota EC_{50} 7,5 mg/l. K imobilizaci perlooček *D. magna* došlo při koncentraci EC_{50} 68 mg/l [70, 77].

4.2 Naproxen

Naproxen byl nalezen ve výtoku z čistíren odpadních vod v koncentračním rozmezí 31 ng/l – 7,96 µg/l a v povrchových vodách, kde byla koncentrace 250 ng/l. Tato účinná látka byla také detekována v pitné vodě – ovšem pouze ve stopovém množství a pod mezí stanovitelnosti (<0,5 ng/l) [2, 78]. V čistírenských odpadních vodách ve Švýcarsku byl zjištěn naproxen v množství 2,6 µg/l [79]. Na výtoku kanadských čistíren odpadních vod byla zjištěna hodnota naproxenu 12,5 ng/l [26].

Zkoušky akutní toxicity provedené na vířnicích, perloočkách a žábřonozkách ukázaly, že naproxen má hodnoty LC₅₀ a EC₅₀ v rozsahu 1-100 mg/l. Produkty fotolýzy však byly výrazně toxičtější než původní látka. U testů na dafniích byla zjištěna koncentrace akutní toxicity 66,4 mg/l a chronické 0,33 mg/l [2, 26].

Při 30minutovém testu na bakterii *V. fischeri* byla nalezena hodnota EC₅₀ 600 mg/l [21]. Inhibice rychlosti růstu řasy *D. subspicatus* byla při hodnotě EC₅₀ 625,5 mg/l, u okřehku *L. minor* byla hodnota EC₅₀ 24,2 mg/l a k imobilizaci perlooček *D. magna* došlo při koncentraci EC₅₀ 174 mg/l [70, 77].

4.3 Kyselina klofibrová

Přítomnost kyseliny klofibrové byla zjištěna v mnoha odpadních, povrchových a mořských vodách, při poměrně vysokých koncentracích v podzemních vodách (4 µg/l) a v pitné vodě (0,07-0,27 µg/l). Výskyt byl poprvé zaznamenán v USA v odpadních vodách v rozmezí 0,8-2 µg/l a v povrchové vodě o koncentraci 0,55 µg/l [26]. V ČOV ve Švýcarsku byla koncentrace kyseliny klofibrové 0,06 µg/l [79]. V pitných vodách činil obsah kyseliny klofibrové až 165 ng/l (Německo) [80].

Při testech toxicity na bakterii *V. fischeri* byla nalezena hodnota EC₅₀ 100 mg/l [2]. Inhibice rychlosti růstu řasy *D. subspicatus* byla při hodnotě EC₅₀ 115 mg/l, u okřehku *L. minor* při EC₅₀ 12,5 mg/l. Imobilizace perlooček *D. magna* nastala při koncentraci EC₅₀ 72 mg/l [70]. Hodnoty LC₅₀ se nacházely v rozmezí od 7,7 do 39,7 mg/l, takže může být kyselina klofibrová klasifikována jako škodlivá pro vodní organismy [26]. Cytologické změny v žábrách pstruha duhového byly zaznamenány při vystavení koncentraci kyseliny klofibrové 5 µg/l [2].

Hodnota NOEC u sedmidenního testu perlooček *C. dubia* byla 640 µg/l a u desetidenního testu s dániem pruhovaným byla tato hodnota 70 mg/l [26]. Koncentrace ≤1000 µg/l

významně neovlivnila růst řas *D. tertiolecta*, přežití korýše *P. pugio* ani ryby *F. heteroclitus*. Naměřené koncentrace kyseliny klofibrové v životním prostředí nepřekročily 10 µg/l [80].

4.4 Kofein

Tato sloučenina může sloužit jako antropogenní marker ve vodních systémech z důvodu její časté detekce v povrchových, mořských a také podzemních vodách. Je obecně přítomen v čistírenských odpadních a povrchových vodách kontaminovaných léky, v amerických tocích byla změřena jeho maximální koncentrace 6 µg/l [26]. Ve Švýcarsku byla zjištěna koncentrace kofeinu na přítoku do ČOV 7-73 µg/l a odtoku 0,03-9,5 µg/l [81].

Při testech toxicity na bakterii *V. fischeri* byly významné změny v bioluminiscenci zjištěny až při koncentracích 200 – 18 000 mg/l [82]. Při akutním testu toxicity u *D. magna* byla stanovena hodnota LC₅₀ 445,3 mg/l [83]. Inhibice reprodukce u vířníků nastala u koncentrace EC₅₀ 104 mg/l [84]. Významná inhibice růstu byla pozorována u řas *I. galbana*, kde byla koncentrace kofeinu 100-500 mg/l a u *P. subcapitata* 500 mg/l [82].

5 Metody odstraňování mikropolutantů

Pokud se léčivo dostane do odpadních vod, jeho osud závisí jak na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, odolnosti vůči přirozeným rozkladným procesům, tak na tom, jestli prochází přes čistírnu odpadních vod (ČOV). Zde se v závislosti na typu použité technologie může odbourávat. Některá léčiva jsou ovšem díky své stabilní struktuře odbouratelná jen velmi obtížně (např. karbamazepin či kyselina klofibrová) [22, 25]. V tabulce č. 1 jsou uvedeny koncentrace a účinnost odstraňování některých léčiv na ČOV [3].

Tabulka 1 Koncentrace a účinnost odstranění léčiv na ČOV

Léčivo	Koncentrace na přítoku (µg/l)	Účinnost odstranění (%)
Naproxen	0,6 – 1,3	15 – 78
Diklofenak	0,035 – 3,02	69 – 98
Kyselina klofibrová	0,46 – 1,2	0 – 15
Kofein	230	99,9

Proces čištění odpadních vod v klasické ČOV se skládá ze dvou částí – mechanické a biologické. V mechanické fázi dochází k odstranění pevných makroskopických částic obsažených v odpadní vodě pomocí česlí, sít a lapáků. Drobnější částice jsou zachytávány v lapačích písku, které pracují na principu sedimentace. Účelem je odstranění pevných částic,

kteře by mohly poškodit zařízení ČOV. Degradace látek rozpuštěných v odpadní vodě a také zbytků léčiv je v mechanické části téměř nulová a na výstupu z mechanické části ČOV je lze detekovat v množství $\mu\text{g/l}$.

Nejdůležitější fází čištění odpadních vod je biologická část, při které dochází k odstranění velkého množství organických látek, podrobně viz níže v kapitole 6 *Biologická degradace*. Základním principem všech biologických čistírenských procesů jsou biochemické oxidačně-redukční reakce. Ty probíhají buď za přístupu (aerobně) nebo nepřístupu kyslíku (anaerobně) [25, 85, 86]. Klasický systém ČOV většinou není schopen odstranit léčiva a je třeba jiných metod, do kterých patří například metody níže popsané [87].

5.1 Moderní technologie

5.1.1 Pokročilé oxidační procesy

Všechny fotochemické procesy a příbuzné technologie jsou souhrnně označovány jako pokročilé oxidační procesy (AOP's – Advanced Oxidation Processes). Do této skupiny se vedle fotochemických, fotokatalytických a elektrochemických procesů řadí i γ -radiolýza, rentgenové záření či sonolýza (O_3/UZ). Reakčním činidlem jsou vysoce reaktivní hydroxylové radikály $\cdot\text{OH}$. Tyto radikály mají krátkou dobu života a elektrofilní charakter, jedná se o silné oxidační a neselektivní činidlo a velmi snadno se produkují. Hydroxylové radikály reagují s jakoukoliv sloučeninou schopnou oxidace, přičemž následuje sled oxidačních reakcí. Nejvíce jsou využívány techniky Fentonovy oxidace, fotolýzy peroxidu vodíku UV zářením a procesy využívající ozon [4, 88].

5.1.1.1 Fotolýza

Fotolýzou dochází k samovolnému rozpadu farmak v povrchových tocích a vodních plochách. Rozlišují se dva mechanismy – přímá fotolýza a radikálový rozpad. Během přímé fotolýzy dochází k absorpci slunečního záření molekulou léčiva a jejímu rozkladu na jednodušší látky (ionty, radikály). Účinnost tedy závisí na absorpčním spektru molekuly, intenzitě slunečního záření, přítomnosti ostatních látek schopných absorpce a v jaké hloubce vody se molekula léčiva nachází [26, 87].

Fotolýza za přítomnosti peroxidu vodíku (H_2O_2) představuje vysoce účinný oxidační proces, při kterém se homolyticky štěpí peroxidové vazby a vznikají dva molární ekvivalenty $\cdot\text{OH}$ prostřednictvím UV záření. Děj je popsán následující rovnicí č. 10 [3].



$\cdot\text{OH}$ radikály zanikají reakcí další molekuly H_2O_2 za vzniku superoxidového radikálu $\text{HO}_2\cdot$. Tento proces probíhá za splnění několika podmínek - organické polutanty jsou rozpustné ve vodě, koncentrace peroxidu vodíku je $> 0,1 \%$ a je použit zdroj UV záření s $\lambda < 280 \text{ nm}$. Rychlost fotolýzy H_2O_2 může být urychlena v přítomnosti OH^- iontů, přičemž vznikají peroxidové aniony HO_2^- . Účinnost UV/ H_2O_2 degradace závisí na vlastnostech a struktuře látky, prostředí (zákal, jiné látky schopné absorbce záření), pH či teplotě [3, 88].

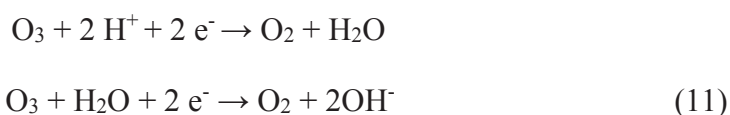
Laboratorní experimenty poukazují na to, že je fotolýza důležitým procesem odstraňování léčiv, zvláště pak diklofenaku, kde se jedná o hlavní degradační proces. U naproxenu bylo potvrzeno, že jsou jeho fotolytické produkty mnohem toxičtější než léčivo samotné [2, 26].

5.1.1.2 Ozonizace

Ozonizace je další možnost pro účinné odstraňování léčiv z odpadních vod a to i přes svou selektivitu proti některým funkčním skupinám (thioly, dvojně vazby) [26, 87].

V posledních letech pokročily technologie výroby ozonu a tím i jeho využití. Ozon je vyráběn z plynů obsahujících kyslík (nejčastěji však přímo ze vzduchu) v generátorech ozonu. Z důvodu jeho chemické nestability nemůže být skladován a je vyráběn přímo na místě spotřeby. Mechanismus ozonizace může probíhat buď přímou oxidací v přítomnosti ozonu, nebo nepřímou oxidací $\cdot\text{OH}$ radikály, které vznikají rozkladem ozónu v alkalických podmínkách [3, 4].

Existují různé modifikace ozonizace se současným použitím H_2O_2 nebo UV zářením používané za účelem rychlé oxidace se spoluúčastí $\cdot\text{OH}$ radikálu. Systémy využívající $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ nebo $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ potřebují pro uspokojivou účinnost alkalické prostředí. Rozklad ozonu doprovází vznik $\cdot\text{OH}$, kde je iniciátorem řetězové radikálové reakce OH^- (rovnice č. 11) [88].



Ve studii autorů Hollender a kol. z roku 2009 bylo zjištěno, že využití ČOV s ozonizací přispívá ke snížení koncentrace léčiv na výstupu ze sekundární nádrže a to o 40-50 % u naproxenu a více než 80 % u diklofenaku ve srovnání s koncentrací v přitékající vodě (v řádech $\text{ng/l} - \mu\text{g/l}$). Samozřejmě je zde i závislost na použití dávky ozonu [89].

5.1.1.3 Fentonova reakce

Nejstarší proces v rámci AOP's je právě Fentonova reakce. Její výhodou je malá ekonomická a technologická náročnost a univerzálnost použití. Principem je oxidace činidlem obsahujícím ionty Fe^{2+} (katalyzátor) za přítomnosti peroxidu vodíku dle rovnice č. 12 [88, 90, 91].



Existují různé modifikace této metody, využívající kupříkladu jako katalyzátor železo v jiném oxidačním stupni, jiné kovy nebo různé foto a elektro modifikace [88]. Právě modifikace Fentonovy reakce s použitím UV záření (foto-Fentonova reakce) zvyšuje možnost degradace mnoha obtížně rozložitelných organické mikropolutantů [89, 91].

5.1.2 Membránové procesy

5.1.2.1 Mikrofiltrace a ultrafiltrace

Tyto procesy využívají pro oddělení sloučenin polopropustné nebo porézní membrány, a to na základě jejich velikosti. Mohou probíhat za zvýšeného nebo normálního tlaku, kde je velikost póru v rozmezí od 0,001-0,1 μm (ultrafiltrace) do 0,1 - 10 μm (mikrofiltrace). Stejně jako u jiných metod existují různé modifikace, kupříkladu membránový bioreaktor, který spojuje ultra(mikro)filtraci s biologickou složkou (aktivovaný kal). Biologická část je zodpovědná za biodegradaci odpadních látek, zatímco membrána separuje pevné látky od kapaliny. Využitím bioreaktoru byla zjištěna účinnost odstranění až 98 % ibuprofenu a 84 % naproxenu [3, 89, 92]. Více viz kapitola 6.3 *Membránový bioreaktor*.

Metody využívající membrány poskytují velmi dobré výsledky v oblasti odstraňování xenobiotik nacházejících se v oblasti nízkých koncentrací. Obzvláště vhodné jsou pro zachycení estrogenů díky jejich silné sorpci na membránový materiál [87].

5.1.2.2 Reverzní osmóza a nanofiltrace

Vzhledem k jejich vysoké účinnosti odstraňování kontaminantů jsou metody nanofiltrace a reverzní osmózy považovány za nejvhodnější pro odstraňování farmaceutik [87, 89]. Reverzní osmóza je jev, kde molekuly vody pronikají z komory s vysoce koncentrovaným roztokem přes polopropustnou membránu ve směru nízko koncentrovaného roztoku a voda je do nádoby přiváděna pod vysokým tlakem. Velikost pórů je v rozmezí 0,001 - 0,003 μm u nanofiltrace a 0,0001 - 0,0005 μm u reverzní osmózy. Tradiční reverzní osmóza je ovšem velice energeticky náročná z důvodu požadavků na vysoký tlak, proto vědci vyvinuli alternativní metodu využívající nižších tlaků – nanofiltaci. [3, 90, 92].

6 Biologická degradace

Pomocí biodegradace dochází buď k úplnému rozložení léčiv, nebo k jejich částečné přeměně na degradační rezidua prostřednictvím mikrobiální aktivity aktivovaného kalu. Jejich velmi nízká koncentrace v odpadních vodách má za následek, že na ČOV dochází pouze k jejich částečnému odstranění. Mezi parametry ovlivňující účinnost odstranění léčiv patří především dostupnost farmak v matrici, stáří aktivovaného kalu, aerobní či anaerobní podmínky, sorpce, pH, teplota a celková technologie systému [3, 87, 90]. Například u diklofenaku bylo prokázáno, že se jeho hladina výrazně sníží pouze tehdy, když je doba zadržení v kalu alespoň 8 dní [26].

6.1 Aktivovaný kal

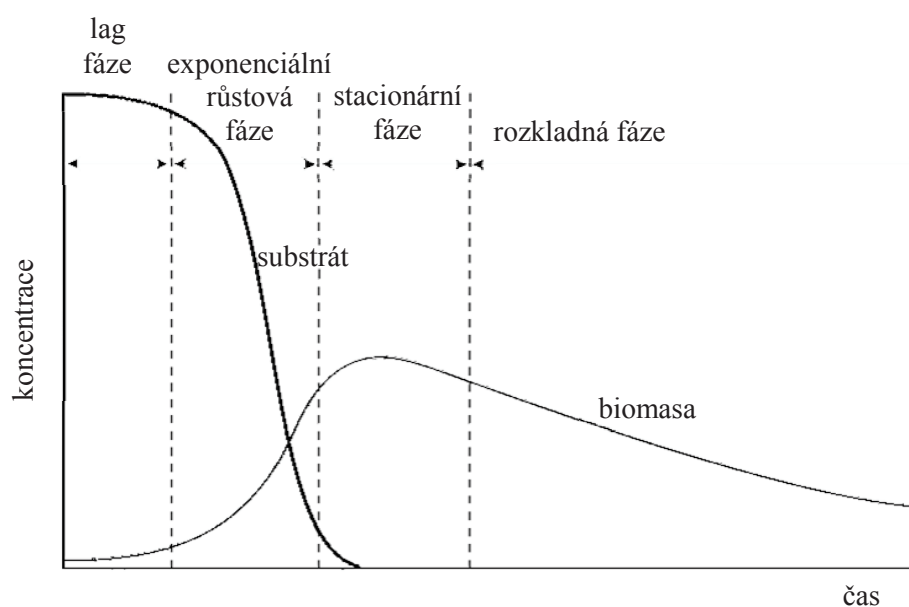
Aktivovaný kal je směsná kultura mikroorganismů – volně suspendované organismy a jejich vločky, převážně bakterie, která vzniká při biologickém čištění odpadních vod. Je tvořen vločkami, které jsou obalené polysacharidovým obalem a vytváří tzv. zooglea. Přítomné organismy mají vliv na velikost vloček, jejich tvar, strukturu a sedimentační vlastnosti. Z bakterií se nejčastěji vyskytují rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, dále pak nitrifikační bakterie *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*, plísňe, kvasinky, vláknité mikroorganismy, vířníci, hlístice apod. Vločky se dělí v závislosti na jejich velikosti do 5 skupin: mikrovločky (do 50 μm), drobné vločky (50 μm - 250 μm), střední vločky (250 μm - 500 μm), velké vločky (500 μm – 1 mm) a obrovské vločky, které jsou velké i přes 1 mm. [85, 86, 93, 94].

Od čistých kultur se aktivovaný kal liší například schopností oddělit se od kapalně fáze sedimentací. Špatná separace aktivovaného kalu, který vyplouvá v dosazovací nádrži k hladině, může být zapříčiněna přítomností vláknitých organismů, zvýšenou tvorbou plynů denitrifikací či provzdušněním [93, 94, 95]. Látky odstraněné během procesu biologického čištění se částečně usazují v kalu, ve kterém je koncentrováno až 50-80 % původního znečištění [86].

6.1.1 Růst mikroorganismů v aktivovaném kalu

Růst buněk je charakterizována čtyřmi fázemi, během kterých se vyvíjí koncentrace substrátu a biomasy. Jednotlivé fáze růstu mikroorganismů v aktivovaném kalu jsou znázorněny na Obr. 17.

1. Lag fáze, během které je malý nárůst biomasy a malý úbytek substrátu – buňky se aklimatizují na nové prostředí.
2. Exponenciální fáze růstu, během níž biomasa roste v maximální míře a je zde rovněž vysoká spotřeba substrátu, který je ještě k dispozici.
3. Stacionární fáze, ve které je k dispozici již omezené množství vnějšího substrátu a koncentrace biomasy zůstává relativně konstantní.
4. Rozkladná fáze, která je spojena s rozpadem biomasy v důsledku konzumace vlastního substrátu a energetických rezerv pro své potřeby pro přežití [96].



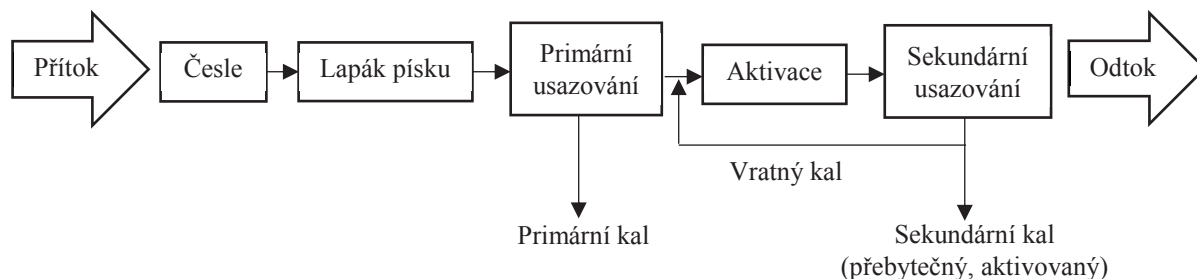
Obr. 17 Růst mikroorganismů v aktivovaném kalu [96]

6.1.2 Aktivační proces

Po mechanickém vyčištění přitéká odpadní voda do aktivační nádrže, kde se mísí s vratným kalem. V aktivačních nádržích rozkládají mikroorganismy biologické znečištění a je zde nutné provzdušňování a intenzivní míchání pro vhodné životní podmínky těchto organismů. Existuje několik typů aktivací v závislosti na uspořádání systému (nitrifikace a denitrifikace). Aktivovaný kal se separuje od vyčištěné vody v dosazovací nádrži a vyčištěná voda odtéká pryč. Zahuštěný aktivovaný kal se recirkuluje zpět na začátek aktivační nádrže, kde se mísí s přitékající odpadní vodou za dostatečného provzdušňování [86, 95, 97].

Během čištění dochází k nárůstu kalu, proto se část odvádí pryč k dalšímu zpracování. Odvodněný kal se odváží většinou na skládky nebo je dále zpracováván za účelem snížení jeho nepříznivých dopadů na životní prostředí, protože může obsahovat škodlivé složky.

K dispozici je mnoho technologií zpracování kalů – spalování, zplynování, využití jako paliva či organického hnojiva v zemědělství [85, 86, 98]. Proces vzniku kalu je schematicky shrnut na Obr. 18 [86].



Obr. 18 Schéma vzniku kalu [86]

6.2 Základní biochemické procesy probíhající během biologického čištění

- **Aerobní**, kde je přítomen kyslík – konečný akceptor elektronů, probíhají zde oxidace organických látek a nitrifikace.
- **Anoxický**, kde kyslík není přítomen, jako konečný akceptor elektronů zde vystupují dusitanový a dusičnanový dusík, probíhá zde denitrifikace.
- **Anaerobní**, kde není přítomen ani kyslík, ani oxidované dusíkaté sloučeniny, konečným akceptorem elektronů je vlastní organická látka, část molekuly se může oxidovat a část redukovat, probíhá zde anaerobní acidogeneze, methanogeneze depolymerace polyfosfátů (při biologickém odstraňování fosforu) [85, 96].

6.2.1 Aerobní biologické pochody

V aerobních podmínkách se uplatňují biochemické procesy, které rozkládají organické látky za přítomnosti molekulárního kyslíku. Biologická kultura mikroorganismů v rámci svých životních procesů tyto látky využívá jako stavební materiál (zejména zdroj uhlíku) a zdroj energie. Využití organického materiálu mikroorganismy je označováno jako metabolismus. Pokud dochází k rozkladným reakcím, při kterých se uvolňuje energie, jedná se o katabolismus. Syntéza nových složek je pak doprovázena spotřebou energie a jedná se o anabolismus. Konečnými produkty tohoto procesu jsou většinou oxid uhličitý a voda, pokud byl v substrátu přítomen dusík, tak také amoniak. Hlavním procesem je mineralizace, tedy odbourání organických látek na anorganické (CO_2 , H_2O) a přírůstek biomasy v podobě přebytečného kalu, který je třeba odstranit a dále zpracovat. [85, 89, 92, 99].

6.2.2 Anaerobní biologické pochody

Při mikrobiálním rozkladu organické hmoty za anaerobních podmínek je konečným produktem metan (CH_4) a oxid uhličitý (CO_2). Jedná se soubor několika na sebe navazujících procesů, na kterých se podílí více druhů anaerobních mikroorganismů. Rozklad vyžaduje jejich koordinovanou metabolickou součinnost, protože produkt jedné skupiny mikroorganismů bývá substrátem pro skupinu druhou. Anaerobní mikroorganismy mají metabolické dráhy, které za aerobních podmínek neprobíhají, a díky tomu mohou rozkládat látky aerobně těžko rozložitelné [85, 94, 97]. Jednotlivé procesy probíhající za anaerobních podmínek jsou:

- 1) hydrolýza – rozklad makromolekulárních organických látek (proteiny, lipidy, polysacharidy) na nízkomolekulární pomocí hydrolytických mikroorganismů
- 2) acidogeneze – rozklad nízkomolekulárních látek na jednodušší organické látky (kyseliny, alkoholy) zajišťující fermentační mikroorganismy
- 3) acetogeneze – oxidace těchto látek na H_2 , CO_2 , CH_3COOH (kys. octová)
- 4) methanogeneze – rozklad pomocí methanogenních mikroorganismů (CO_2 , CH_4) [96, 99].

6.2.3 Biologické odstraňování nutrientů

Zvýšená přítomnost některých látek vyvolává nežádoucí účinky, jako například amoniak, který je toxický pro vodní organismy a jeho přítomností se rovněž zvyšují i náklady na úpravu pitné vody. Využívá se skutečnosti, že fosforečnany (PO_4^{3-}) a amonné soli (NH_4^+) jsou živinami pro škálu mikroorganismů, které jsou do vody přidávány prostřednictvím aktivovaného kalu – mikroorganismy se ve vodě množí, rostou, a přitom spotřebovávají ke své výživě tyto látky [85, 100].

6.2.3.1 Odstraňování dusíku

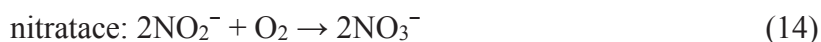
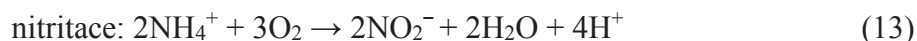
Ve vodě se vyskytuje několik forem dusíku, jsou to převážně anorganické formy (dusičnany, dusitany, amoniový dusík) a organické formy dusíku. Jeho sloučeniny jsou nežádoucí převážně z těchto důvodů:

- umožňují růst zelených organismů, což vede k nadměrné eutrofizaci povrchových vod,
- amoniakální dusík má vysokou spotřebu kyslíku,
- vyšší koncentrace dusičnanů v pitné vodě vedou ke zvýšené koncentraci dusitanů a jsou nebezpečné zejména pro děti kojeneckého věku, ale také pro dospělého člověka

- dusitany oxidují hemoglobin na methemoglobin (methemoglobinémie) a v trávicí soustavě mohou reagovat s aminokyselinami z potravy za vzniku nitrosaminů, známých karcinogenů [85, 101].

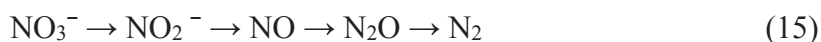
Nitrifikace

Nitrifikace je děj, při kterém dochází k oxidaci amoniaku, resp. amonných iontů (NH_3 , resp. NH_4^+) přes dusitany až na dusičnany. Proces probíhá ve dvou stupních a celý je aerobní. Činností nitrifikačních bakterií (z rodu *Nitrosococcus* nebo *Nitrospira*) se amonné ionty oxidují nejprve na dusitany dle rovnice č. 13 (nitritace), které se následně oxidují na dusičnany dle rovnice č. 14 (nitratice) činností dalších bakterií (rod *Nitrobacter*). Nitrifikační bakterie patří mezi pomalu rostoucí organismy, striktně aerobní. Nicméně se uvádí, že jsou schopny v aktivačních systémech přežít i za nepřístupu kyslíku několik hodin – akceptorem elektronů je zřejmě dusičnanový dusík [85, 102, 103]. Mezi faktory ovlivňující nitrifikaci patří pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, staří a zatížení kalu [96, 104].



Denitrifikace

Pomocí mikroorganismů jsou postupně redukovány dusičnany přes dusitany na oxidy dusíku a dále až na plynný dusík (rovnice č. 15), který uniká do ovzduší. Mezi denitrifikační bakterie se řadí například bakterie rodu *Paracoccus*, Proces probíhá za anoxických podmínek a měl by navazovat na nitrifikaci, aby došlo k odbourání jejího konečného produktu (dusičnanů). Pokud by byla do systému zařazena jenom nitrifikace, došlo by pouze ke změně formy dusíku, ale koncentrace celkového dusíku na odtoku a přítoku by byla téměř stejná [85, 102, 103]. Faktory ovlivňující denitrifikaci jsou především přítomnost organického substrátu, pH, teplota, molekulární kyslík, koncentrace aktivovaného kalu a obsah živin [96, 104].



6.2.3.2 Odstraňování fosforu

Přítomnost fosforu v povrchových vodách je rovněž nežádoucí jako u dusíku, neboť vede k nežádoucí eutrofizaci vod. K jeho odstraňování se využívá metod biologických či fyzikálně-chemických. Biologické odstraňování fosforu může probíhat pomocí bakterií poly-P (polyfosfát kumulující), které jsou schopné zvýšené akumulace fosforu do buněk (např. rod *Acinetobacter*). Fosfor není v buňkách poly-P bakterií vázán dostatečně pevně, lehce se z nich

uvolňuje a je nutné zabránit příliš dlouhému pobytu aktivovaného kalu v dosazovací nádrži, kde by se mohl zpětně uvolňovat. V klasické aktivaci bývá fosfor využit mikroorganismy jako přenašeč energie v systému AMP→ATP a energie je přenášena pomocí polyfosfátové kinázy do polyfosfátů, které mohou sloužit jako rezerva energie pro aktivní membránový transport uhlikatých sloučenin do buněk [85, 100, 103].

Při chemickém odstraňování fosforu se využívá principu srážení a dochází k přeměně rozpustné formy anorganického fosforu na málo rozpustnou formu fosforečnanu. Obvykle se ke srážení používají soli železnaté, železité nebo hlinité dle rovnice č. 16. Vzniklé sráženiny sedimentují v usazovací nádrži a jsou odstraňovány společně s primárním kalem [85, 100].



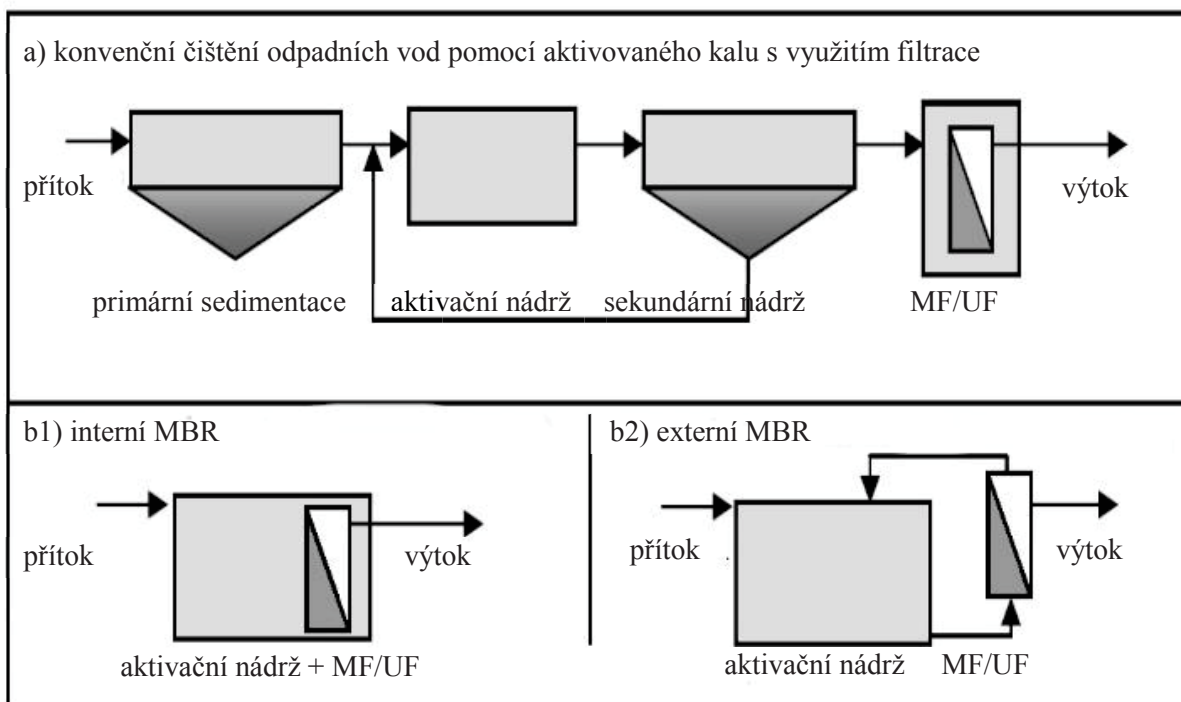
6.3 Membránový bioreaktor

Jak již bylo uvedeno, membránový bioreaktor (MBR) je alternativou membránových technologií spojených s biologickou složkou – aktivovaným kalem, který rozkládá znečišťující látky a membránová jednotka (mikro či ultrafiltrace) z roztoku odděluje čistou vodu [89, 92, 105].

Existují dva typy nejpoužívanějších materiálů pro výrobu membrán – polymery a keramika. Membrána je obvykle složena ze silnějšího porézního nosiče a z tenké vrstvy na povrchu, která poskytuje požadovanou permselektivitu (podíl náboje přeneseného protionty z celkově přeneseného náboje). Polymerní membrány musí mít vysokou povrchovou poréznost. Běžně se používá polyvinyliden difluorid (PVDF), polyetylsulfon (PES), polyethylen (PE) a polypropylen (PP) [92, 106].

Po biologickém odstranění v bioreaktoru, který musí být provzdušňován, je tekutina přečerpávána na membránovou jednotku pod tlakem, kde se oddělí pevná a kapalná část, vypustí se čistá voda a zakoncentrovaná směsná kapalina se přečerpává zpět do bioreaktoru. Oproti tradičnímu čištění odpadních vod má MBR jisté výhody – malé rozměry a omezené nároky na prostor, možnost flexibilního a postupného rozšiřování stávajících ČOV, vysoká účinnost čištění, odolnost a flexibilita, vyšší provozní koncentrace aktivovaného kalu, vyšší stáří kalu – doba zdržení biomasy a snížená produkce přebytečného kalu [89, 92, 106].

Podle umístění membránové jednotky se může MBR dělit na externí, kde je membrána pro filtraci umístěna na bočním proudu, nebo interní, tam je membrána ponořená přímo v aktivační nádrži) viz obrázek č. 19 [107].



Obr. 19 Srovnání konvenčního čištění odpadních vod pomocí aktivovaného kalu a) a obou typů konfigurací b1) interní a b2) externí [107].

7 Stanovení účinnosti degradace

Při kontrole účinnosti a stanovení kvality vody na čistírnách odpadních vod se sleduje několik parametrů. Nejčastěji se stanovují hodnoty biochemické a chemické spotřeby kyslíku a obsah sloučenin dusíku a fosforu.

7.1 Biologická spotřeba kyslíku

Pro posuzování kvality odpadních vod se nejvíce používá parametr biologické spotřeby kyslíku (BSK). Podává informaci o obsahu biologicky rozložitelných organických látek. Hodnota BSK se rovná množství rozpuštěného molekulárního kyslíku, který je spotřebován v určitém časovém intervalu mikroorganismy při biologické oxidaci dané látky. Výsledky se vyjadřují v miligramech kyslíku spotřebovaného na oxidaci organických látek v 1 litru vody (mg / l). Stanovení se provádí jednou denně, a to v intervalu pěti dní, proto bývá označován BSK₅. Metody biologické spotřeby kyslíku jsou oproti chemické spotřebě pomalejší a obtížnější.

Pokud není v odpadní vodě dostatečné množství mikroorganismů, musejí být přidány před začátkem testu společně s ostatními látkami. Zatímco stanovení CHSK trvá přibližně dvě hodiny, stanovení BSK trvá několik dní. Vzorek se naředí a inkubuje s dostatečnou

koncentrací rozpuštěného kyslíku, jehož koncentrace se stanoví před a po inkubaci nejčastěji pomocí kyslíkové elektrody [62, 85, 99].

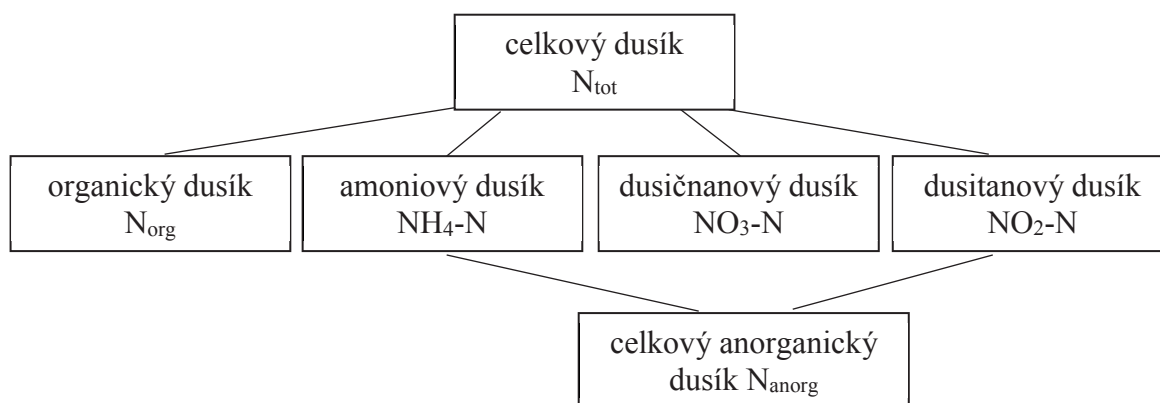
7.2 Chemická spotřeba kyslíku

Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK) slouží k informaci o celkové koncentraci organických látek schopných chemické oxidace. Výsledek stanovení se udává v množství kyslíku, které je ekvivalentní spotřebě použitého oxidačního činidla a vyjadřuje se v miligramech kyslíku spotřebovaného na oxidaci organických látek v 1 litru vody (mg / l). Při standardní zkoušce se běžně používá roztok dichromanu draselného (silný anorganický oxidant). Metody chemické spotřeby kyslíku jsou oproti stanovení BSK rychlejší. Po cca dvou hodinách jsou měřeny výsledky pomocí titrace či spektrofotometrického stanovení kationtů chromu Cr^{3+} [62, 96, 99].

Poměr CHSK/BSK je využíván pro vyjádření stupně biologické rozložitelnosti organických látek. Pokud je hodnota poměru CHSK/BSK nízká (< 2), znamená to přítomnost snadno rozložitelných látek. Z toho vyplývá, že pokud jsou hodnoty tohoto poměru vysoké, jsou přítomny látky rozložitelné obtížně. Vysoký poměr CHSK/BSK může rovněž znamenat přítomnost látek inhibujících bakteriální činnost [85].

7.3 Stanovení dusíku

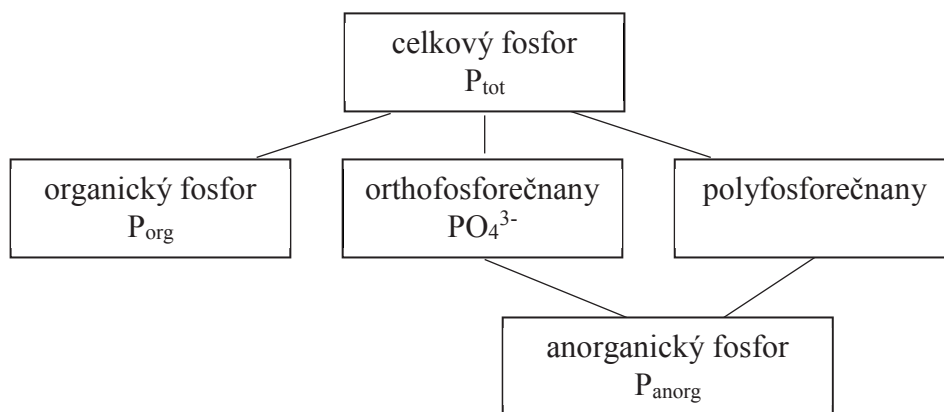
Celkový dusík je dán součtem všech nejčastěji se vyskytujících forem dusíku, jak je zobrazeno na obr. č. 20. Pro každou formu jsou v literatuře popsány desítky metod stanovení a rutinní metody jsou součástí norem. Amoniový dusík, dusitany a dusičnany se nejčastěji stanovují potenciometricky pomocí elektrod nebo spektrofotometricky. Obsah celkového dusíku je důležitou hodnotou při stanovení dusíkové bilance povrchových vod a biologických zařízeních ČOV [99, 108].



Obr. 20 Formy výskytu dusíku

7.4 Fosfor

Celkový fosfor je součet jeho forem vyskytujících se jako anorganické orthofosforečnany (PO_4^{3-}), polyfosforečnany a organicky vázaný fosfor (Obr. 21). Většinou jsou jednotlivé formy fosforu převedeny na orthofosforečnany vhodnou předúpravou (kyselá hydrolyza, oxidační činidla) a stanoveny spektrofotometricky [99, 109].



Obr. 21 Formy výskytu fosforu

Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na výskyt mikropolutantů ve vodném prostředí s důrazem na léčiva diklofenak, naproxen, kofein a kyselinu klofibrovou. Další částí literární rešerše bylo zaměřit se na testy ekotoxicity těchto mikropolutantů a na metody, kterými je možné tyto látky z vod odstranit. Cílem experimentální části bylo provést vybrané testy ekotoxicity daných léčiv a získané výsledky experimentů vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

Experimentální část

8 Materiál

8.1 Testované organismy

Pro testy ekotoxicity na bakteriích byl použit referenční kmen *Pseudomonas putida* CCM 4297 z České sbírky mikroorganismů, Ostrava. Pro dlouhodobé uchování byl kmen umístěn v mrazicím boxu při -20 °C v kryozkumavkách.

Ekotoxické testy na řasách byly prováděny na zelených řasách rodu *Parachlorella*, druhu *Parachlorella kessleri*, CCALA 253 ze Sbírký kultur autotrofních organismů Třeboň, číslo kmene LARG 1.

Zástupcem jednoděložných rostlin byl pro testování vybrán okřehek menší (*Lemna minor*), získán z přírodního vodního zdroje v Hamrech nad Sázavou. Semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) byla zvolena zástupcem třídy dvouděložných rostlin, výrobce OSEVA UNI, a.s.

8.2 Pomůcky

Laboratorní sklo – odměrné válce, odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky, odměrné kádinky různých objemů, nálevky, stříčky, gumové a skleněné zátky, skleněné zkumavky, centrifugační zkumavky (50 ml), mikropipety, špičky, jednorázové očkovací klíčky (1 a 10 µl), plastové a skleněné Petriho misky, plynový kahan, pinzeta, kyvety, Bürkerova komůrka, krycí sklička, pravítko, filtrační papír.

8.3 Chemikálie a reagentie

V tabulce 2 je uveden seznam vybraných léčiv pro testování ekotoxicity v této diplomové práci.

Tabulka 2 Seznam testovaných léčiv

Název	Vzorec	Výrobce
Diklofenak sodný	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	Sigma-Aldrich
Kofein	$C_8H_{10}N_4O_2$	Sigma-Aldrich
Kyselina klofibrová	$ClC_6H_4OC(CH_3)_2CO_2H$	Sigma-Aldrich
Naproxen sodný	$C_{14}H_{13}NaO_3$	Sigma-Aldrich

V tabulce 3 je uveden seznam všech chemikálií a reagensů používaných pro přípravu roztoků a kultivačních medií, které byly během testování využity.

Tabulka 3 Seznam použitých chemikálií

Název, čistota	Vzorec	Výrobce
Agarový prášek		HiMedia
Destilovaná voda	H ₂ O	UPa
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.*	KH ₂ PO ₄	Lach-Ner
Disodná sůl kyseliny ethylen-diamintetraoctové dihydrát, p.a.	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	Lach-Ner
Dusičnan draselný, p.a.	KNO ₃	Lachema
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát, p.a.	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	Lachema
Dusičnan sodný, p.a.	NaNO ₃	Lach-Ner
Dusičnan vápenatý tetrahydrát, p.a.	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	Lach-Ner
Ethanol denaturovaný	C ₂ H ₅ OH	Penta
Glukóza monohydrát, p.a.	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	Lachema
Hydrogenfosforečnan draselný, p.a.	K ₂ HPO ₄	Lachema
Hydrogenuhlíčitan sodný, p.a.	NaHCO ₃	Penta
Hydroxid draselný, p.a.	KOH	Penta
Chlorid draselný, p.a.	KCl	Lach-Ner
Chlorid manganatý tetrahydrát, p.a.	MnCl ₂ · 4H ₂ O	Merck
Chlorid sodný, p.a.	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý hexahydrát, p.a.	CaCl ₂ · 6H ₂ O	Lach-Ner
Chlorid železitý hexahydrát, čistý	FeCl ₃ · 6H ₂ O	Penta
Kvasničný extrakt, Typ 1		HiMedia
Kyselina boritá, p.a.	H ₃ BO ₃	Lach-Ner
Kyselina citronová monohydrát, p.a.	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	Lach-Ner
Kyselina sírová 96%, p.a.	H ₂ SO ₄	Penta
Methanol 65%, p.a.	CH ₃ OH	Penta
Molybdenan sodný dihydrát, p.a.	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Lach-Ner
Síran hořečnatý heptahydrát, p.a.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Lachema
Síran měďnatý pentahydrát, p.a.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	Lachema
Síran zinečnatý heptahydrát, p.a.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Penta
Síran železitý monohydrát, čistý	Fe ₂ (SO ₄) ₃ · H ₂ O	Lach-Ner
Síran železnatý heptahydrát, p.a.	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Lach-Ner

*p.a. – čistota chemikálií „pro analýzu“

8.4 Přístroje

V tabulce 4 je uveden seznam všech přístrojů a jejich výrobců využitých během testování.

Tabulka 4 Seznam přístrojů

Název	Výrobce	Název	Výrobce
Analytické váhy	Kern ABJ	Termostat	Memmert
Předvážky	Kern 440-49N	Vortex	IKA lab dancer
UV-VIS spektrofotometr	HACH LANGE DR 6000	Ultrazvuková lázeň	Bandelin- <i>Sonorex</i>
Horkovzdušný sterilizátor	Memmert	Mikroskop	Nikon Eclipse 80i s dig. kamerou DSFI-1
Autokláv	System VX-40	Třepačka	Heidolph Rotamax 120
Chladnička s mrazákem	Electrolux, Gorenje		

9 Pracovní postup

9.1 Určení vlnové délky absorpčního maxima léčiv

Hodnota vlnové délky absorpčního maxima každého z léčiv byla měřena na spektrofotometru DR 6000 a to v rozsahu vlnových délek 200–850 nm. Z důvodu měření také v UV oblasti byla použita křemenná kyveta. Nejdříve byly připraveny roztoky jednotlivých čtyř léčiv o koncentraci 100 mg/l, navážením 25 mg léčiva do 250 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou. Spektrofotometr byl vynulován proti destilované vodě a byly proměřeny absorpční spektra léčiv s cílem určení vlnových délek absorpčních maxim, při kterých byly dále proměřovány kalibrační řady. Do grafů byla vynesena závislost absorbance na vlnové délce.

Absorpční spektrum naproxenu

Absorpční spektrum naproxenu je znázorněno na grafu 1, ze kterého plyne, že roztok vykazuje dvě významná absorpční maxima při 260 nm a 330 nm. Vlnová délka pro měření kalibrační řady byla zvolena 260 nm. Tyto výsledky se shodují s literaturou, ve které je uváděno absorpční maximum naproxenu 260-263 nm a 330 nm [110, 111].

Absorpční spektrum diklofenaku

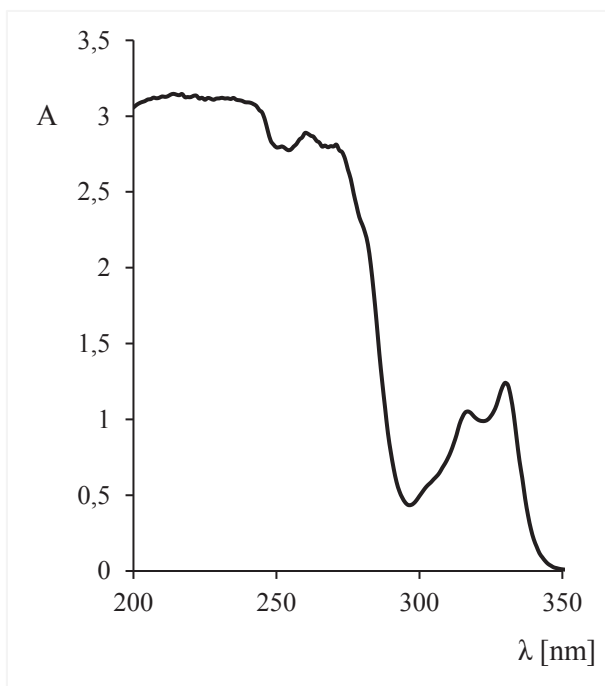
Z grafu 2 plyne, že roztok diklofenaku vykazuje dvě absorpční maxima, a to při 216 nm a 278 nm. V literatuře se uvádí absorpční maximum diklofenaku 276 nm - 277 nm [112, 113], proto byla vlnová délka 278 nm použita při proměřování kalibračního rozmezí.

Absorpční spektrum kofeinu

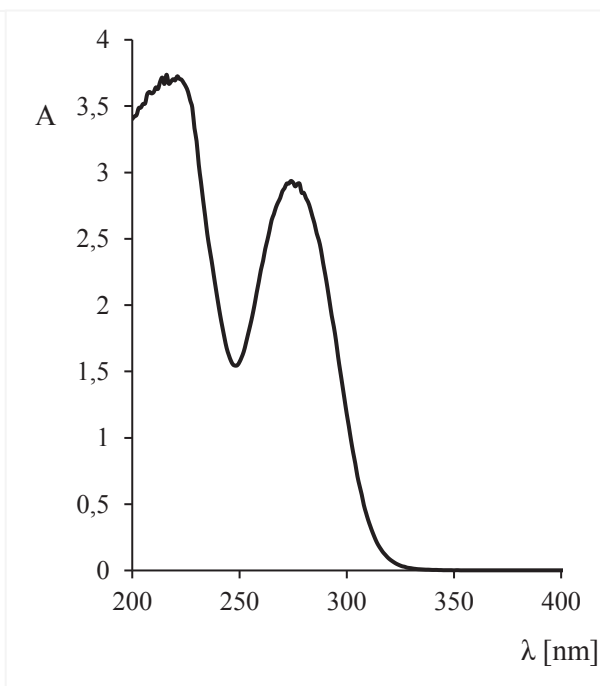
Proměření absorpčního spektra kofeinu byla nalezena dvě absorpční maxima, při 215 a 273 nm (graf 3). V porovnání s dostupnou literaturou, kde je uváděno absorpční maximum kofeinu při 273 nm, byla pro měření kalibrační řady zvolena vlnová délka 273 nm [114, 115].

Absorpční spektrum kyseliny klofibrové

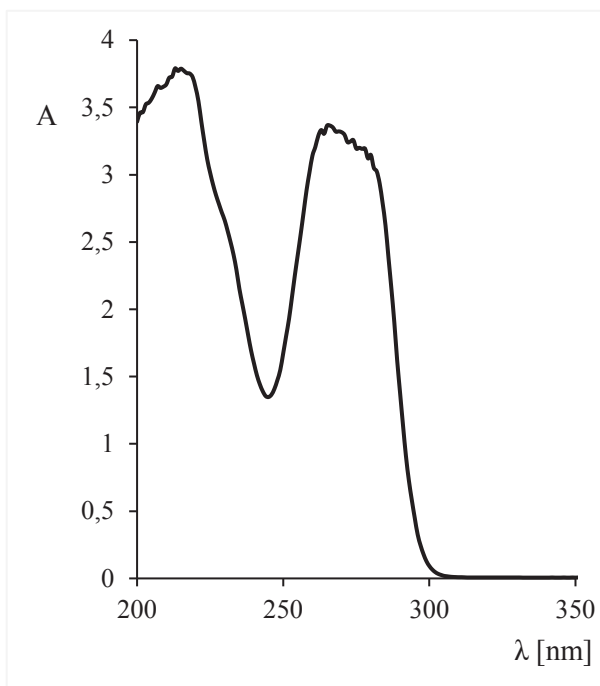
Absorpční spektrum kyseliny klofibrové (graf 4) vykazuje dvě absorpční maxima, při 224 nm a 278 nm. Vlnová délka pro měření kalibrační řady byla zvolena 278 nm. Tyto výsledky se shodují s literaturou, ve které je uváděno absorpční maximum v rozmezí 275 nm – 278 nm [116].



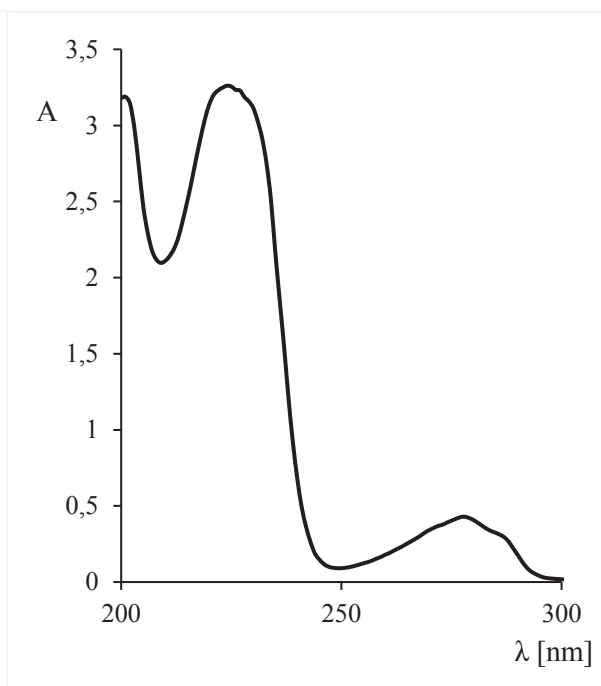
Graf 1 Absorpční spektrum naproxenu



Graf 2 Absorpční spektrum diklofenaku



Graf 3 Absorpční spektrum kofeinu



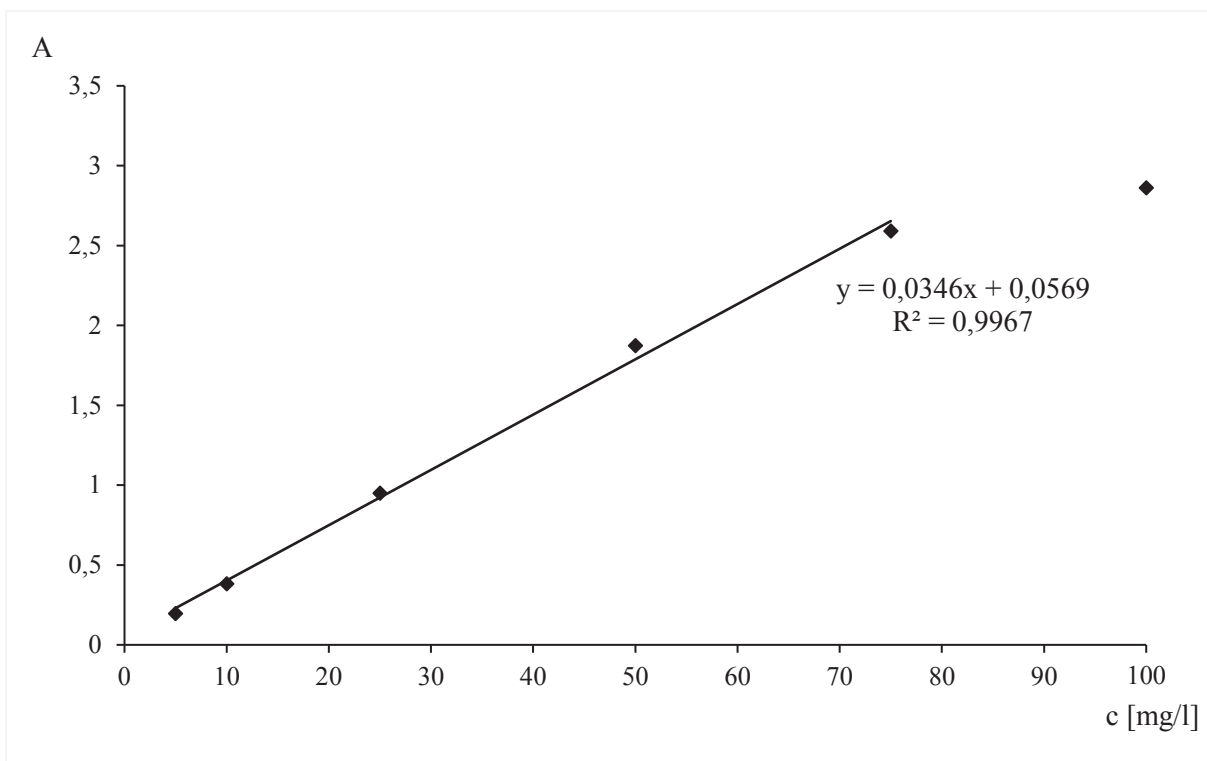
Graf 4 Absorpční spektrum kyseliny klofibrové

9.2 Proměření kalibračních řad léčiv

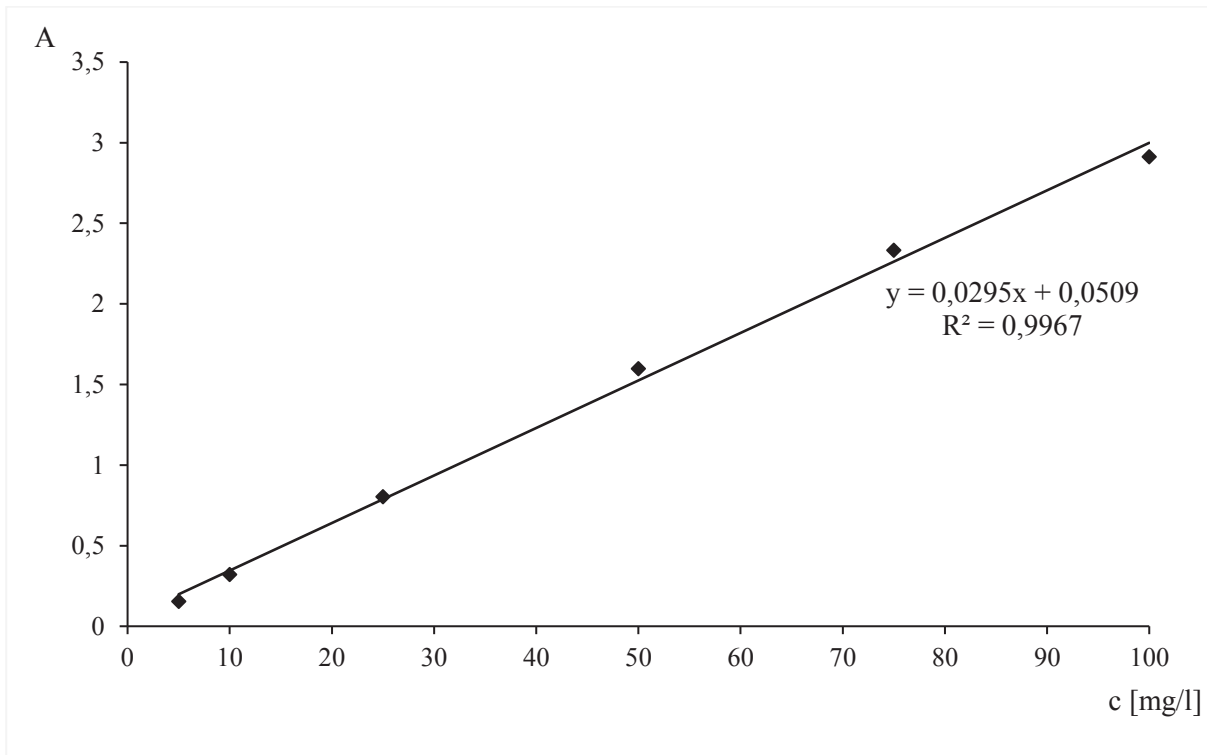
Po určení vlnových délek absorpčních maxim byly proměřeny kalibrační řady jednotlivých léčiv. Připravené zásobní roztoky léčiv o koncentraci 100 mg/l byly využity pro přípravu koncentračních rozmezí dle tabulky 5. Pro každý roztok byla změřena absorbance (tab. č. 5) v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm při vlnové délce absorpčního maxima daného léčiva proti blanku (destilovaná voda). Do grafů byla vynášena závislost absorbance na koncentraci léčiv za účelem zjištění lineární oblasti této závislosti (graf 5, 6, 7 a 8). Body ležící mimo lineární rozsah při vysokých koncentracích, nebyly do rovnice regrese zahrnuty (graf 5 a 7).

Tabulka 5 Ředění léčiv a naměřené hodnoty absorbance

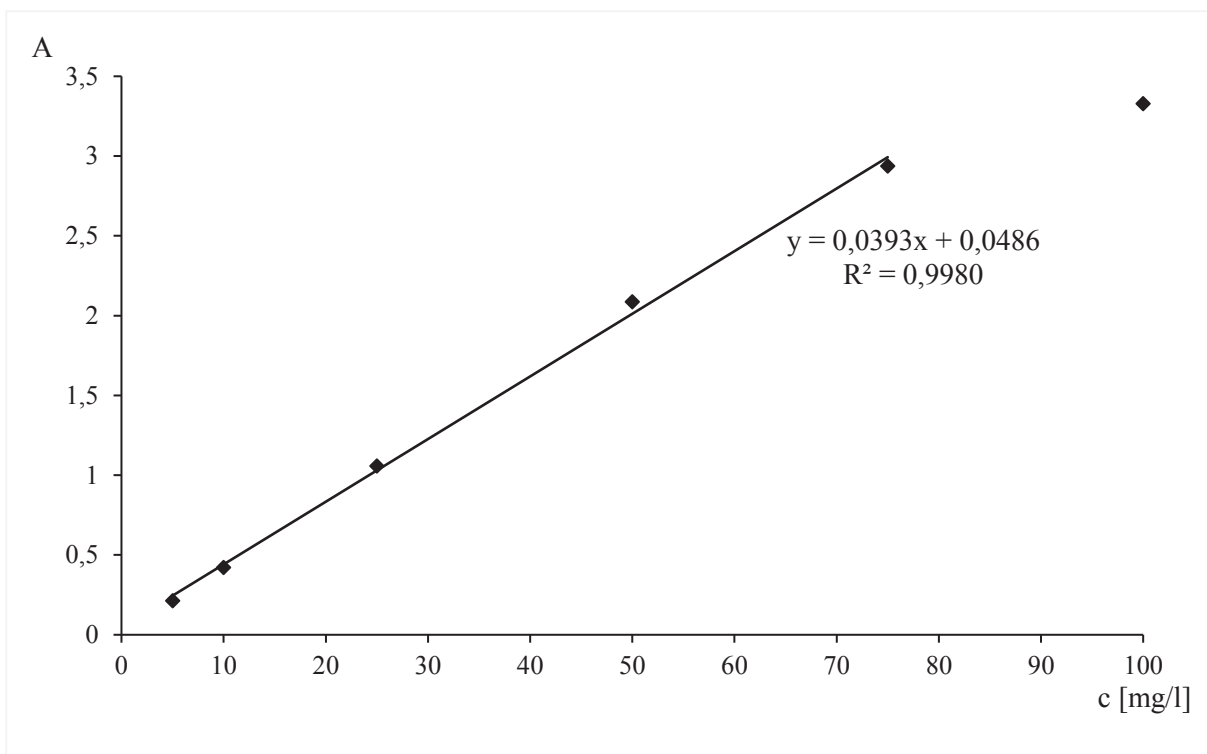
c [mg/l]	Ředění		Absorbance			
	V léčiva [ml]	V dest. voda [ml]	Naproxen $\lambda = 260 \text{ nm}$	Diklofenak $\lambda = 278 \text{ nm}$	Kofein $\lambda = 265 \text{ nm}$	Kys. klofibrová $\lambda = 278 \text{ nm}$
100	20	30	2,862	2,911	3,329	0,465
75	15	35	2,591	2,333	2,938	0,352
50	10	45	1,874	1,597	2,087	0,235
25	5	45	0,950	0,802	1,058	0,124
10	2	48	0,384	0,321	0,423	0,052
5	1	49	0,197	0,154	0,215	0,031



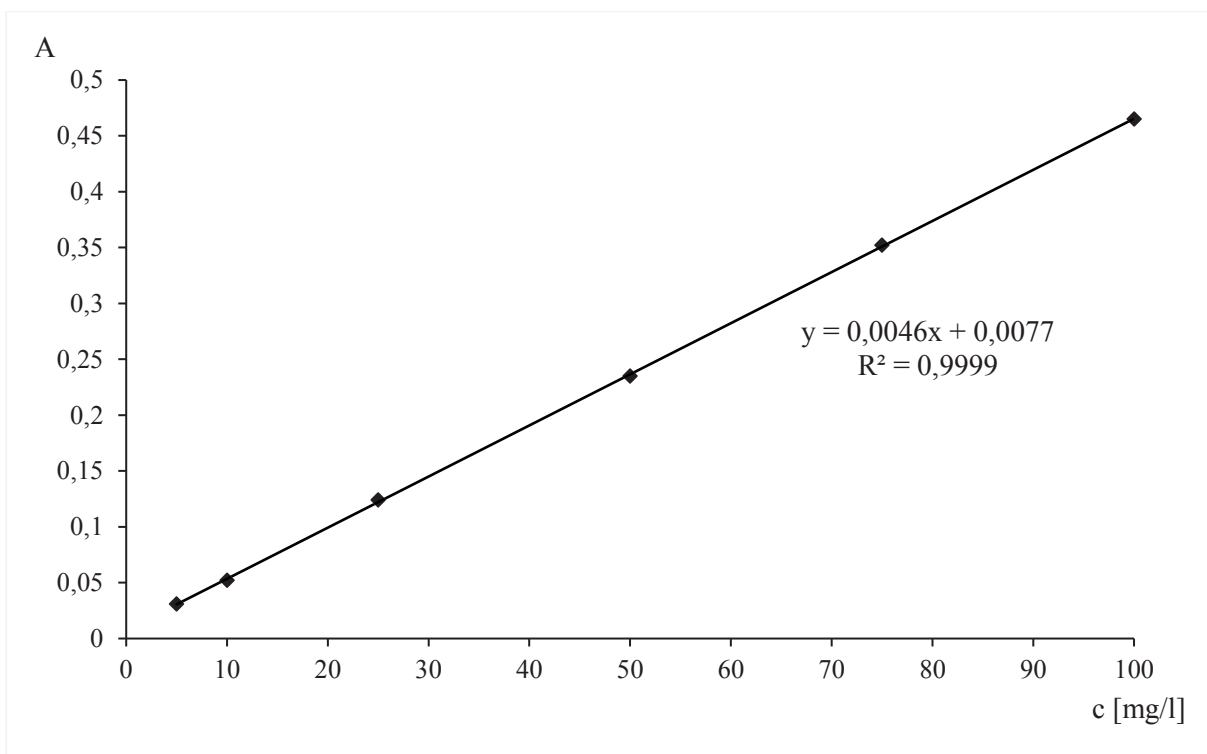
Graf 5 Kalibrační graf naproxenu



Graf 6 Kalibrační graf diklofenaku



Graf 7 Kalibrační graf kofeinu



Graf 8 Kalibrační graf kyseliny klofibrové

Z grafů 5, 6, 7 a 8 plyne, že v případě naproxenu a kofeinu se nachází lineární oblast pod koncentrací 75 mg/l, u diklofenaku a kyseliny klofibrové je závislost lineární v celém rozsahu měřených koncentrací, tj. do 100 mg/l.

9.3 Test inhibice růstu na bakterii *Pseudomonas putida*

Příprava živného roztoku

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky ZR I-IV dle tabulky 6 a poté byly sterilizovány při 121 °C po dobu 15 min a uchovány v chladničce při teplotě 5 °C. Všechny potřebné laboratorní pomůcky byly před použitím rovněž sterilizovány.

Tabulka 6 Zásobní roztoky pro přípravu živného média

Zásobní roztok (ZR)	Chemikálie	Koncentrace v ZR [g/500 ml]
ZR I	NaNO ₃	10
	K ₂ HPO ₄	2,4
	KH ₂ PO ₄	1,2
	Kvasničný extrakt	1,0
ZR II	NaNO ₃	10
	K ₂ HPO ₄	2,4
	KH ₂ PO ₄	1,2
ZR III	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	40
ZR IV	MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 g/l
	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	0,01 g/l
	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O	0,01 g/l

Příprava živného média pro zásobní kulturu

Zahřátím v destilované vodě bylo rozpuštěno 18 g agarů, do tohoto roztoku bylo přidáno 50 ml roztoku ZR I, 125 ml roztoku ZR III, 100 ml roztoku ZR IV a doplněno destilovanou vodou na 1000 ml. Připravené médium bylo sterilizováno při 121 °C po dobu 15 minut a bylo nalito do sterilních Petriho misek v tloušťce pohybující se mezi 3-4 mm. Takto připravené půdy byly uchovávány v chladničce při teplotě 5 °C. Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury *Pseudomonas putida* v kryozkumavkách a byla inkubována 24 h při 30 °C, poté byla přeočkována na nové médium a opět inkubována 24 h při 30 °C. Po inkubaci byly kultury uloženy do chladničky při teplotě 5 °C pro pozdější manipulaci.

Příprava předkultivačního média

Byly připraveny dva litry předkultivačního média smícháním 50 ml každého z roztoků ZR I a ZR III a 100 ml roztoku ZR IV a doplněno 1800 ml sterilní vody. Za sterilních podmínek bylo médium rozděleno do kultivačních lahví (po 500 ml).

Příprava inokula pro předkultivaci, inkubace

Buňky z Petriho misky byly přeneseny do předkultivačního média, aby bylo dosaženo zákalu 100 ZF (formazinové jednotky). Zákal byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 610 nm, kde absorbance $A_{610} = 0,2$ odpovídá zákalu 100 ZF. Poté byla buněčná suspenze naředěna tak, aby bylo dosaženo zákalu 10 ZF – původní roztok byl naředěn 10krát (absorbance $A_{610} = 0,02$ odpovídá zákalu 10 ZF). Poté bylo předkultivační médium s inokulem inkubováno 5 h při 23 °C v temnu a třepáním udržováno v suspenzi, aby nedocházelo k nárůstům na stěnách lahví. Po skončení inkubace byla suspenze naředěna předkultivačním médiem na zákal 50 ZF (absorbance $A_{610} = 0,1$ odpovídá zákalu 50 ZF).

Příprava koncentračního rozmezí testovaných látek

Byly připraveny zásobní roztoky léčiv o koncentraci 250 mg/l, navážením 250 mg léčiva a rozpuštěním v 1 l zředovací vody. Dále byly připraveny směsi léčiv do 100ml odměrných baněk dle tabulky 7. Tyto poměry byly zvoleny na základě nejčastějšího výskytu těchto látek v reálných vodách. Z takto připravených roztoků byla vytvořena koncentrační řada dle tabulky 8 obohacená zásobními roztoky ZR I-III s konečným objemem 50 ml. Do každého vzorku bylo přidáno 5 ml inokula o zákalu 50 ZF, aby bylo dosaženo konečného zákalu 5 ZF. Současně byla připravena i kontrola neobsahující testované léčivo. Test byl proveden ve dvou opakováních. Inkubace probíhala 16 h v temnu při 23 °C za současného třepání.

Tabulka 7 Směsi léčiv

Směs	Poměr	V [ml]	Směs	Poměr	V [ml]
N:D*	3:1	75:25	N:D:K	3:1:0,6	65,2:21,7:13,1
D:K	1:0,6	62,5:37,5	N:D:kK	3:1:0,4	68,2:22,7:9,1
D:kK	1:0,4	71,4:28,6	D:K:kK	1:0,6:0,4	50:30:20
N:K	3:0,6	83,3:16,7	N:K:kK	3:0,6:0,4	75:15:10
N:kK	3:0,4	88,2:11,8	N:D:K:kK	3:1:0,6:0,4	60:10:12:8
K:kK	0,6:0,4	60:40			

* N-naproxen; D-diklofenak; K-kofein; kK-kyselina klofibrová

Tabulka 8 Koncentrační řada léčiv

c [mg/l]	V _{zřed.} vody [ml]	V _{léčiva} [ml]	V _{ZR I} [ml]	II [ml]	III [ml]	V _{inokula} [ml]
100	20	20	1,25	1,25	2,5	5
75	25	15	1,25	1,25	2,5	5
50	30	10	1,25	1,25	2,5	5
10	38	2	1,25	1,25	2,5	5

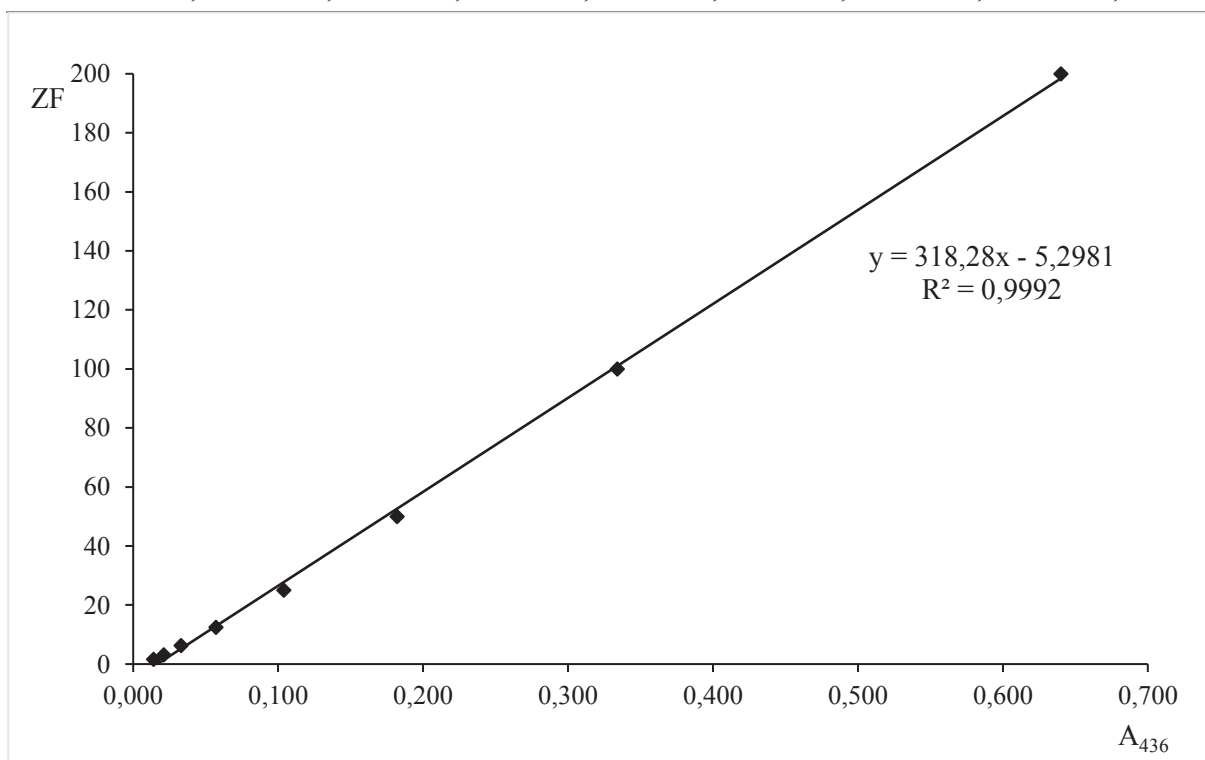
c [mg/l]	V _{zřed. vody} [ml]	V _{léčiva} [ml]	V _{ZR I} [ml]	II [ml]	III [ml]	V _{inokula} [ml]
5	39	1	1,25	1,25	2,5	5
1	39,8	0,2	1,25	1,25	2,5	5
0,1	39,98	0,02	1,25	1,25	2,5	5
kontrola	40	0	1,25	1,25	2,5	5

Vyhodnocení

Inhibiční účinek vzorků byl stanoven měřením růstu buněk *Pseudomonas putida* v daných koncentracích ve srovnání s kontrolou. Koncentrace buněk byla stanovena jako absorbance při vlnové délce 436 nm po 16 h růstu. Hodnoty absorbance byly převedeny na hodnoty ZF pomocí rovnice regrese, která byla získána z kalibračního grafu (graf 9) závislosti ZF na absorbanci. V rovnici regrese byla za x dosažena absorbance daného vzorku a vyjádřené y odpovídá zákalu v jednotkách ZF. Nejdříve byl připraven zákal 200 ZF při $\lambda=610$ nm (při této vlnové délce je kalibrován) a pomocí dvojkového ředění byla připravena ředící řada viz tabulka 9, která byla proměřena i při 436 nm – při této vlnové délce se test dále vyhodnocuje.

Tabulka 9 Naměřené hodnoty absorbance pro přepočet na ZF

ZF	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625
610 nm	0,403	0,212	0,112	0,059	0,032	0,018	0,011	0,007
436 nm	0,640	0,334	0,182	0,104	0,057	0,033	0,021	0,014



Graf 9 Kalibrační graf závislosti ZF na absorbanci

Podle následující rovnice č. 3, popsaná již v kapitole 3.2, byla vypočtena průměrná procentuální inhibice pro každou testovanou koncentraci.

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_0} \cdot 100 \quad (3)$$

9.4 Test inhibice růstové rychlosti řas *Parachlorella kessleri*

Příprava živného roztoku pro řasy

Zásobní roztoky pro přípravu živného roztoku byly připraveny dle tabulky 10 a sterilizovány při 121 °C po dobu 15 minut. Živný roztok byl připraven smícháním 10 ml ze zásobního roztoku ZR I a po 1 ml ze zásobních roztoků ZR II-V a doplněn destilovanou vodou na 1 l.

Tabulka 10 Zásobní roztoky solí pro přípravu živného roztoku pro řasy

Zásobní roztok (ZR)	Chemikálie	Koncentrace v ZR [g/500ml]
ZR I	NaNO ₃	12,5
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	1,85
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,75
	K ₂ HPO ₄	3,75
	NaCl	1,25
	KH ₂ PO ₄	8,75
ZR II	EDTA + KOH	25 + 15,5
ZR III	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,49
	+ H ₂ SO ₄	0,5 ml
ZR IV	H ₃ BO ₃	5,71
ZR V	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,4
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,72
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,8

Zásobní kultura řas

Bylo připraveno 500 ml zásobní kultury řasy v živném roztoku. Pomocí mikroskopu byla určena koncentrace buněk v zásobní kultuře řas. V 80 čtvercích Bürkerovy komůrky byl spočítán počet buněk a přepočten na koncentraci řas v 1 ml dle rovnice 17.

$$\text{počet řas (v 1 ml)} = \frac{\text{součet řas}}{\text{počet čtverců}} \cdot 250 \cdot 1000 \quad (17)$$

Příprava koncentračního rozmezí testovaných látek

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých léčiv o koncentraci 250 mg/l, tedy navážením 250 mg léčiva a rozpuštěním v 1 l živného roztoku. Dále byly připraveny směsi léčiv do 100ml odměrných baněk, stejně jako v předchozím testu na bakteriích (tabulka 7). Z takto připravených zásobních roztoků byla následně vytvořena koncentrační řada léčiv dle tabulky 11. Do každé ze zkumavek (50 ml) bylo pipetováno 10 ml zásobní kultury řas, kultura byla tedy naředěna 5krát a o tento objem bylo množství živného média zmenšeno. Vedle zkoušených vzorků byla připravena i kontrola (pouze živné médium).

Tabulka 11 Koncentrační řada léčiv

c [mg/l]	V _{léčiva} [ml]	V _{živ. média} [ml]	V _{řasy} [ml]	c [mg/l]	V _{léčiva} [ml]	V _{živ. média} [ml]	V _{řasy} [ml]
100	20	20	10	5	1	39	10
75	15	25	10	1	0,2	39,8	10
50	10	30	10	0,1	0,02	39,98	10
10	2	38	10	kontrola	0	40	10

Vyhodnocení

Po 72 h inkubaci při 27 ± 2 °C, probíhající za stálého osvětlení, byl pipetou po dokonalé homogenizaci odebrán vzorek řasové kultury a pomocí mikroskopu ve 20 čtvercích byla určena koncentrace řasové suspenze jednotlivých ředění včetně kontrol. Poté byla vypočtena růstová rychlost řasové kultury a z ní procentuální inhibice růstu buněk dle rovnic 4 a 5 popsaných již v kapitole 3.3.

$$\mu = \frac{\ln_{N72} - \ln_{N0}}{t} \quad I_c = \left(\frac{\mu_c - \mu_K}{\mu_K} \right) \cdot 100 \quad (4, 5)$$

9.5 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé

Příprava kultivačního média (zřed'ovací vody)

Podle tabulky 12 byly připraveny zásobní roztoky solí potřebných k přípravě kultivačního média. Z každého zásobního roztoku těchto solí bylo pipetováno 5 ml na 1 l zřed'ovací vody a roztok byl sterilizován při 121 °C 15 minut. K přípravě všech zásobních roztoků solí a zřed'ovací vody byla použita destilovaná voda.

Tabulka 12 Zásobní roztoky solí pro přípravu zředovací vody

Zásobní roztok (ZR)	Chemikálie	Koncentrace v ZR [g/250 ml]
ZR 1	CaCl ₂ ·6H ₂ O	29,4
ZR 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,325
ZR 3	NaHCO ₃	6,475
ZR 4	KCl	0,575

Příprava koncentračního rozmezí testovaných látek

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých léčiv o koncentraci 100 mg/l (100 mg léčiva do 1 l zředovací vody) a následně směs všech čtyř léčiv v poměru 3:1:0,4:0,6 obdobně jako v přechozích testech ekotoxicity. Z takto připravených zásobních roztoků léčiv byla následně vytvořena koncentrační řada dle tabulky 13, do každé Petriho misky byl pipetován celkový 5 ml.

Tabulka 13 Koncentrační řada léčiv

c [mg/l]	V _{léčiva} [ml]	V _{zřed. vody} [ml]	c [μg/l]	V _{léčiva} [μl]	V _{zřed. vody} [ml]
100	5	0	750	37,5	4,9625
75	3,75	1,25	500	25	4,975
50	2,5	2,5	250	12,5	4,9875
25	1,25	3,75	100	5	4,995
10	0,5	4,5	50	2,5	4,9975
5	0,25	4,75	1	zásobní roztok byl naředěn 100x a ten poté 1000x	
1	0,05	4,95	kontrola	0	5

Provedení testu

Do Petriho misek byly pipetovány roztoky dle požadované koncentrace, poté byl vložen filtrační papír a pomocí pinzety bylo do každé misky aplikováno 15 přebraných semen hořčice bílé. Misky byly přikryty víčkem a inkubovány při teplotě 20 ± 1 °C bez přístupu světla. Po 72 hodinách byla v každé misce změřena délka kořene u všech vyklíčených semen s přesností na 1 mm. Stanovení každého ředění a kontroly bylo provedeno ve třech opakováních.

Vyhodnocení

Pro každé ředění byl vypočítán aritmetický průměr délky kořenu ze všech tří paralelních stanovení. Byla vypočítána inhibice růstu kořene v jednotlivých koncentracích ve srovnání s kontrolou dle rovnice 6 popsané výše v kapitole 3.4.

$$I = \left(\frac{D_K - D_c}{D_K} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

9.6 Test inhibice růstu okřehku menšího

Příprava kultivačního média dle Steinberga

Podle tabulky 14 byly připraveny zásobní roztoky pro přípravu kultivačního média. Voda byla používána destilovaná a roztoky ZR I-VIII byly sterilizovány při 121 °C 15 min a uchovávány v chladničce. Na 1 litr média bylo přidáno 20 ml zásobního roztoku ZR I-III, 1 ml z roztoků ZR IV-VIII a doplněno destilovanou vodou. Tento roztok byl používán na přípravu zásobních roztoků léčiv a jako ředící voda pro koncentrační rozmezí.

Tabulka 14 Složení zásobních roztoků pro kultivaci okřehku

Zásobní roztok (ZR)	Chemikálie	Koncentrace v ZR [g/l]
ZR I	KNO ₃	17,5
	K ₂ HPO ₄ a KH ₂ PO ₄	0,63 a 4,5
ZR II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
ZR III	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75
ZR IV	H ₃ BO ₃	120
ZR V	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180
ZR VI	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44
ZR VII	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
ZR VIII	FeCl ₃ ·6H ₂ O	760
	Na-EDTA·2H ₂ O	1 500

Příprava koncentračního rozmezí testovaných látek

Dále byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých léčiv o koncentraci 250 mg/l a směs léčiv v poměru 3:1:0,4:0,6 stejně jako v předchozích testech. Z takto připravených zásobních roztoků byla následně vytvořena koncentrační řada dle tabulky 15. Do každé zkumavky bylo pipetováno celkem 50 ml. Test byl proveden ve třech opakováních.

Tabulka 15 Koncentrační řada léčiv

c [mg/l]	V _{léčiva} [ml]	V _{živ. média} [ml]	c [mg/l]	V _{léčiva} [ml]	V _{živ. média} [ml]
100	20	30	5	1	49
75	15	35	1	0,2	49,8
50	10	40	0,1	0,02	49,98
10	2	48	kontrola	0	50

Provedení testu

Po přípravě koncentračního rozmezí byly do každé ze zkumavek pomocí pinzety vloženy 3 stélky okřehku menšího a zkumavky byly inkubovány za stálého osvětlení. Po 7denní expozici byly stélky pinzetou přeneseny do 10 ml skleněných zkumavek, přelity 5 ml methanolu pro extrakci chlorofylu a uloženy do chladničky po dobu 2 dní. Po této době byla extrakce ukončena a u všech vzorků byla změřena absorbance pro zjištění obsahu celkového chlorofylu, chlorofylu *a* a chlorofylu *b* při vlnových délkách 666 nm a 653 nm.

Vyhodnocení

Ze změřené absorbance byla podle následujících rovnic 18, 19 a 20 vypočítána koncentrace pigmentů v 1 ml rozpouštědla u všech vzorků a byl vypočítán aritmetický průměr.

$$c_{\text{Chl } a} = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653} \quad (18)$$

$$c_{\text{Chl } b} = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666} \quad (19)$$

$$c_{\text{Chl celk}} = c_{\text{Chl } a} + c_{\text{Chl } b} \quad (20)$$

kde: $c_{\text{Chl } a}$ je koncentrace chlorofylu *a*, $c_{\text{Chl } b}$ je koncentrace chlorofylu *b*, $c_{\text{Chl celk}}$ je koncentrace celkového chlorofylu vše v $\mu\text{g/ml}$.

Dále bylo přepočteno množství obsahu pigmentů v závislosti na použitém objemu rozpouštědla (5 ml) podle rovnice 21.

$$M_{\text{Chl}} = V \cdot c_{\text{Chl}} \quad (21)$$

kde: M_{Chl} je obsah chlorofylu v μg , V obsah rozpouštědla v ml a c_{Chl} koncentrace chlorofylu v $\mu\text{g/ml}$.

Nakonec byla vypočítána inhibice růstu v % dle rovnice 8 popsané v kapitole 3.5.

$$I_c = \left(\frac{H_K - H_c}{H_K} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

10 Výsledky a diskuze

V této části diplomové práce jsou prezentovány většinou formou tabulek a grafů výsledky jednotlivých testů ekotoxicity pro sledovaná léčiva a jejich vzájemné směsi. Výsledky jsou zde také diskutovány.

10.1 Test inhibice růstu na bakterii *Pseudomonas putida*

U kontrol byla průměrná hodnota absorbance při $\lambda=436$ nm naměřena 0,321 a po převodu na jednotky zákalu byla hodnota rovna 96,870 ZF. V tabulce 16 je seznam všech naměřených a průměrných hodnot absorbancí, které byly poté převedeny na jednotky ZF a z těchto hodnot byly vypočítány inhibice a dále probity¹, které jsou v tabulce rovněž uvedeny. Hodnoty jsou uvedeny jak pro jednotlivá léčiva, tak pro jejich vzájemné směsi. Ze získaných hodnot byly vytvořeny grafy (grafy 10, 11, 12), na kterých je znázorněn průběh závislosti inhibic všech vzorků na jednotlivých koncentracích. Graf 10 znázorňuje závislost jednotlivých léčiv a jejich celkové směsi. Na grafu 11 je popsána závislost směsi tří léčiv a na grafu 12 je popsána závislost směsí dvou léčiv.

Tabulka 16 Průměrné hodnoty absorbancí, zákalu, inhibic a probit u jednotlivých léčiv a jejich směsí

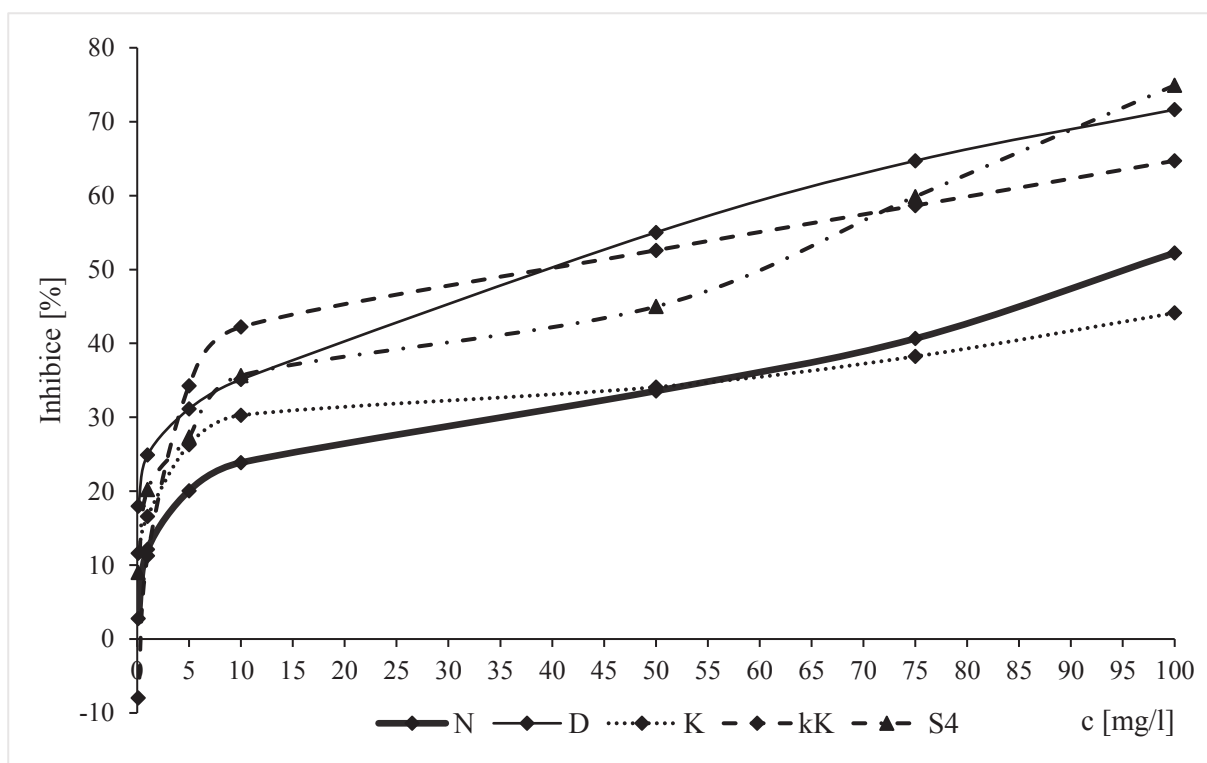
c [mg/l]	Naproxen				Diklofenak			
	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,170	48,810	52,25	5,05	0,114	30,986	71,63	5,58
75	0,204	59,472	40,66	4,77	0,134	37,351	64,71	5,39
50	0,224	65,997	33,56	4,59	0,162	46,263	55,02	5,13
10	0,252	74,908	23,88	4,29	0,220	64,564	35,12	4,16
5	0,263	78,410	20,07	4,16	0,231	68,225	31,14	4,50
1	0,286	85,730	12,11	3,82	0,249	73,954	24,91	4,33
0,1	0,313	94,323	2,768	3,12	0,269	80,319	17,99	4,08
c [mg/l]	Kofein				K. klofibrová			
	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,194	56,289	44,12	4,85	0,134	37,351	64,71	5,39
75	0,211	61,700	38,24	4,69	0,152	42,921	58,65	5,23
50	0,223	65,519	34,08	4,59	0,169	48,491	52,60	5,08
10	0,234	69,020	30,28	4,48	0,199	58,040	42,21	4,80
5	0,245	72,681	26,30	4,36	0,222	65,360	34,26	4,59
1	0,273	81,592	16,61	4,05	0,289	86,526	11,25	3,77
0,1	0,288	86,207	11,59	3,82	0,344	104,190	-7,96	-

¹ Probity jsou vypočítány z inhibic v % pomocí probitové tabulky a jsou využity pro srovnání s klasickou metodou, viz níže.

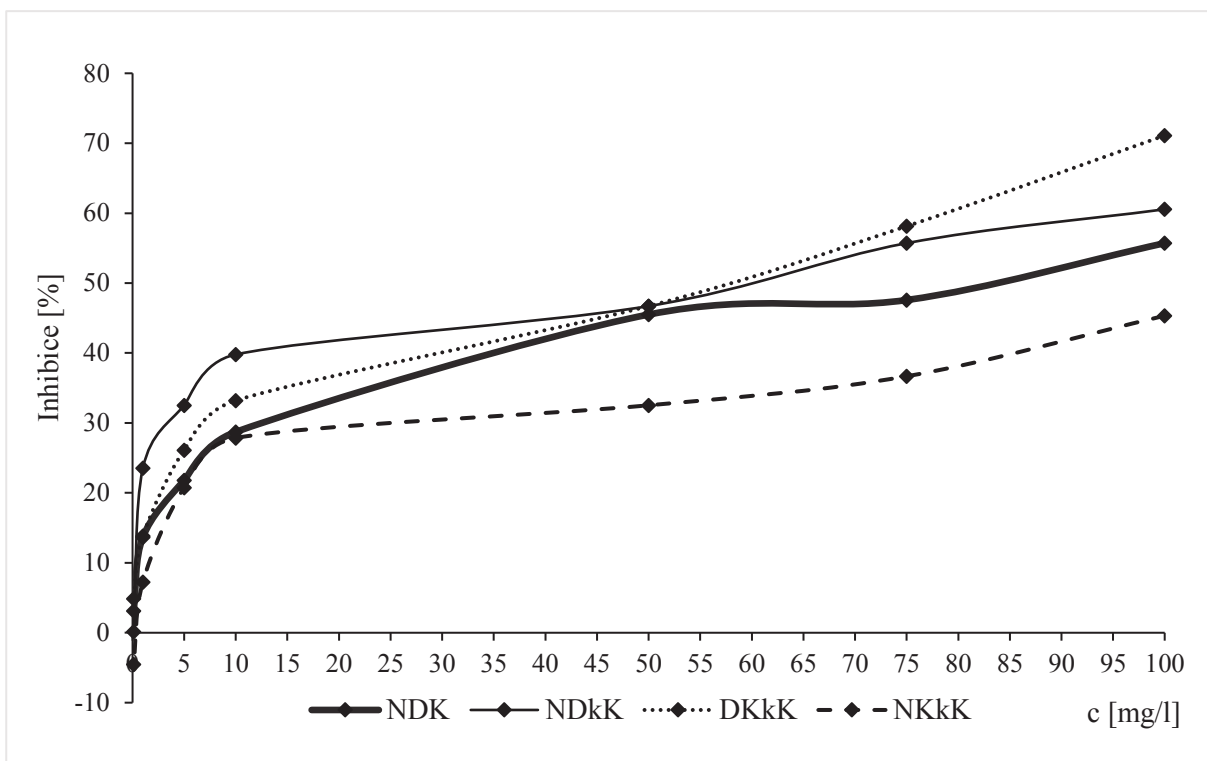
Směs					D:N:K			
c [mg/l]	A₄₃₆	ZF	I [%]	P	A₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,105	27,962	74,91	5,67	0,160	45,627	55,71	5,15
75	0,148	41,807	59,86	5,25	0,184	53,106	47,58	4,95
50	0,191	55,493	44,98	4,87	0,190	55,016	45,50	4,90
10	0,218	64,087	35,64	4,64	0,238	70,453	28,72	4,45
5	0,242	71,726	27,34	4,39	0,258	76,818	21,80	4,23
1	0,263	78,250	20,24	4,16	0,282	84,298	13,67	3,92
0,1	0,295	88,595	9,00	3,66	0,312	94,005	3,11	3,12
D:N:kK					N:K:kK			
c [mg/l]	A₄₃₆	ZF	I [%]	P	A₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,146	41,171	60,55	5,28	0,190	55,175	45,33	4,87
75	0,160	45,627	55,71	5,15	0,215	63,132	36,68	4,67
50	0,186	53,902	46,71	4,92	0,227	66,951	32,53	4,56
10	0,206	60,268	39,79	4,75	0,241	71,248	27,85	4,42
5	0,227	66,951	32,53	4,56	0,261	77,773	20,76	4,19
1	0,253	75,227	23,53	4,29	0,300	90,186	7,27	3,52
0,1	0,321	96,711	0,17	2,67	0,334	101,007	-4,50	-
D:K:kK					D:N			
c [mg/l]	A₄₃₆	ZF	I [%]	P	A₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,116	31,463	71,11	5,55	0,115	31,145	71,45	5,55
75	0,153	43,399	58,13	5,20	0,137	38,306	63,67	5,36
50	0,186	53,902	46,71	4,92	0,156	44,194	57,27	5,18
10	0,225	66,315	33,22	4,56	0,193	56,130	44,29	4,85
5	0,246	72,840	26,12	4,36	0,216	63,450	36,33	4,64
1	0,281	84,139	13,84	3,92	0,258	76,659	21,97	4,23
0,1	0,307	92,414	4,84	3,36	0,298	89,549	7,96	3,59
D:K					D:kK			
c [mg/l]	A₄₃₆	ZF	I [%]	P	A₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,131	36,397	65,74	5,41	0,099	26,212	76,82	5,74
75	0,142	39,898	61,94	5,31	0,122	33,373	69,03	5,50
50	0,164	46,900	54,33	5,10	0,164	46,900	54,33	5,10
10	0,198	57,562	42,73	4,82	0,196	57,085	43,25	4,82
5	0,211	61,859	38,06	4,69	0,220	64,724	34,95	4,61
1	0,236	69,816	29,41	4,45	0,246	72,999	25,95	4,36
0,1	0,268	80,001	18,34	4,08	0,284	85,093	12,80	3,87

N:K					N:kK			
c [mg/l]	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,183	52,788	47,92	4,95	0,127	34,964	67,30	5,44
75	0,198	57,562	42,73	4,82	0,153	43,240	58,30	5,20
50	0,214	62,814	37,02	4,67	0,177	51,037	49,83	5,00
10	0,240	71,089	28,03	4,42	0,232	68,543	30,80	4,50
5	0,256	76,182	22,49	4,23	0,235	69,498	29,76	4,48
1	0,269	80,319	17,99	4,08	0,268	80,001	18,34	4,08
0,1	0,302	90,822	6,57	3,52	0,297	89,231	8,30	3,59

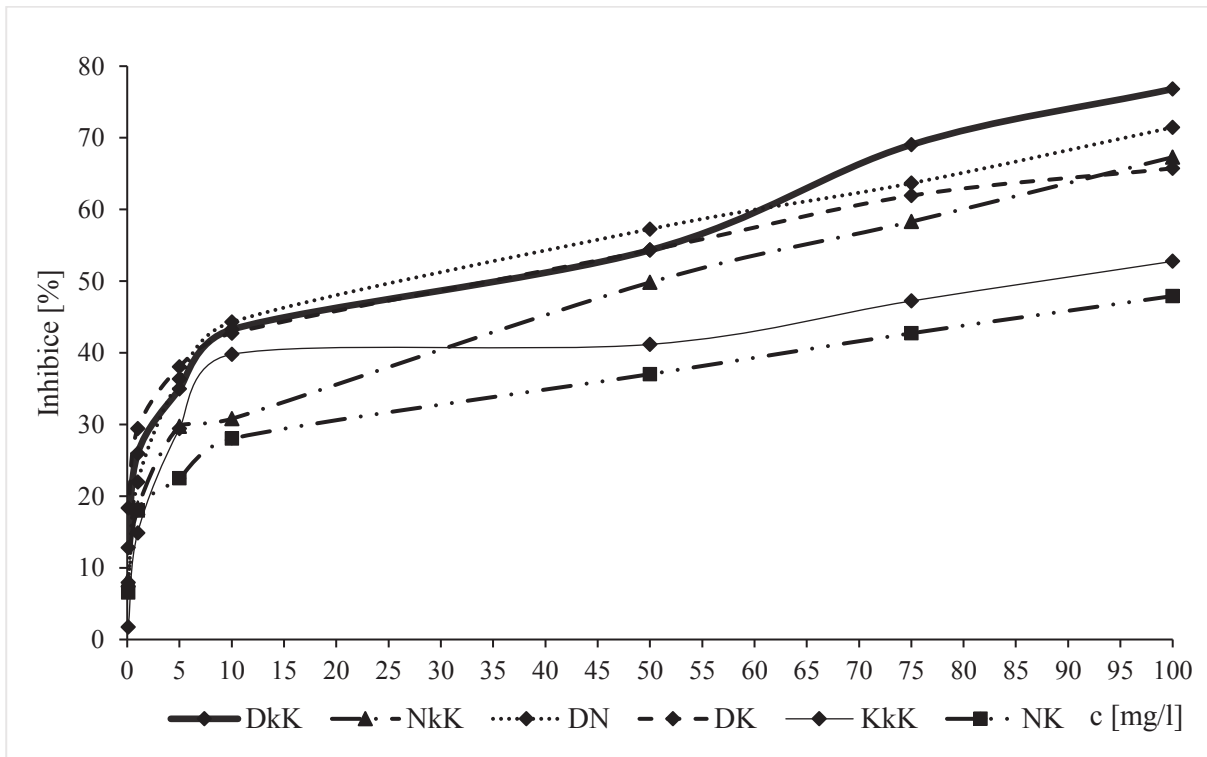
K:kK				
c [mg/l]	A ₄₃₆	ZF	I [%]	P
100	0,169	48,332	52,77	5,08
75	0,185	53,425	47,23	4,92
50	0,202	58,994	41,18	4,77
10	0,206	60,268	39,79	4,75
5	0,236	69,816	29,41	4,45
1	0,278	83,184	14,88	3,96
0,1	0,316	95,278	1,73	2,95



Graf 10 Inhibice jednotlivých léčiv a jejich směsí

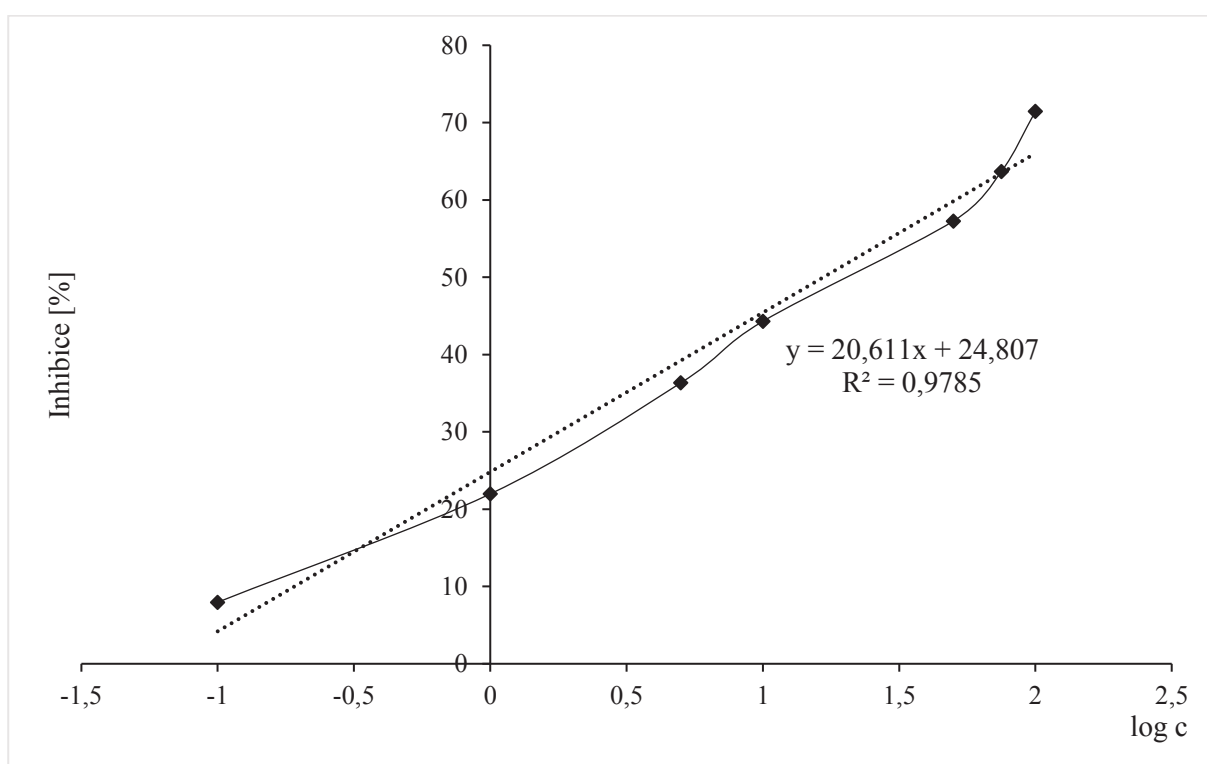


Graf 11 Inhibice směsí tří léčiv



Graf 12 Inhibice směsí dvou léčiv

Hodnoty inhibičních koncentrací IC_5 , IC_{20} a IC_{50} byly vypočítány z rovnice regrese, která byla získána pomocí grafu závislosti inhibice v % na dekadickém logaritmu koncentrace. Graf 13 znázorňuje vzorové vyhodnocení rovnice regrese u směsi diklofenaku s naproxenem, podle které jsou vypočítávány dané inhibiční koncentrace, a tento postup je použit u všech léčiv a testů v diplomové práci. Pro porovnání výsledků byl sestaven graf závislosti probit (P) na dekadickém logaritmu koncentrace té samé směsi (graf 14). Probity byly přepočítány pomocí tabulky 17 z hodnot inhibic v %. Jednotlivé rovnice regrese jsou shrnuty v tabulce 18 a 19. Seznam vypočítaných inhibičních koncentrací IC_{10} , IC_{20} , IC_{50} jednotlivých léčiv a směsí shrnuje tabulka 20 a 21.



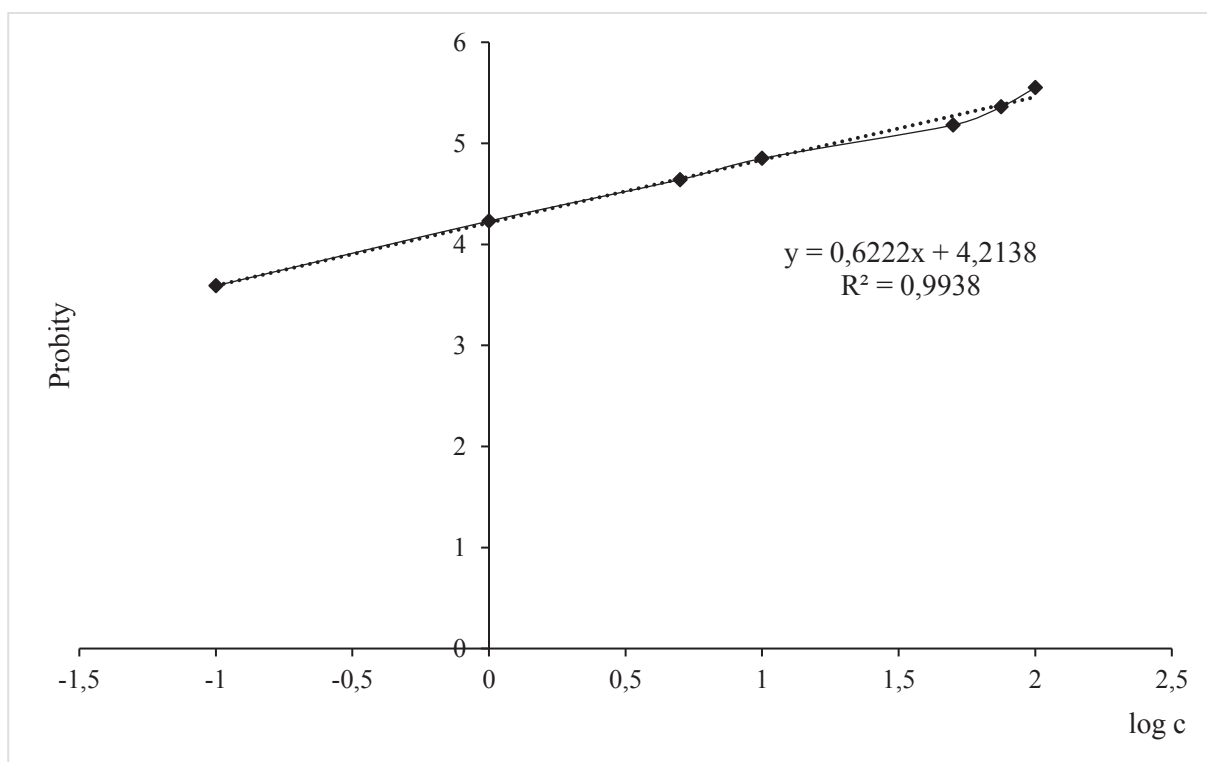
Graf 13 Graf závislosti inhibice na dekadickém logaritmu koncentrace

Příklad vypočítání IC_{50} z rovnice regrese u závislosti inhibice v % na dekadickém logaritmu koncentrace:

$y = 20,611x + 24,807$; za y bylo dosazeno číslo 50 (20; 10) $\Rightarrow x = 1,222$, číslo se odlogaritmuje $\Rightarrow x = IC_{50(20,10)} = 10^{1,222} = \mathbf{16,672 \text{ mg/l}}$.

Tabulka 17 Přepočítání inhibic v % na probity

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33



Graf 14 Graf závislosti probit na dekadickém logaritmu koncentrace

Příklad vypočítání IC_{50} z rovnice regrese u závislosti probit na dekadickém logaritmu koncentrace:

$y = 0,6222x + 4,2138$; za y bylo dosazeno číslo 5 (4,16; 3,72) $\Rightarrow x = 1,264$, číslo se odlogaritmuje $\Rightarrow x = IC_{50(20,10)} = 10^{1,222} = 18,348 \text{ mg/l}$.

Tabulka 18 Rovnice regrese léčiv a směsí v případě inhibic v %

Léčivo	Rovnice regrese	Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 14,698x + 13,299$	N:K:kK	$y = 15,527x + 9,7881$
Diklofenak	$y = 17,559x + 27,196$	D:kK	$y = 20,091x + 27,299$
Kofein	$y = 10,260x + 19,550$	N:K	$y = 12,978x + 17,337$
K. klofibrová	$y = 23,896x + 15,116$	N:D	$y = 20,611x + 24,807$
Směs	$y = 19,330x + 21,530$	D:K	$y = 15,492x + 30,481$
D:N:K	$y = 17,213x + 15,444$	K:kK	$y = 16,406x + 17,725$
D:N:kK	$y = 18,597x + 20,334$	N:kK	$y = 18,780x + 20,689$
D:K:kK	$y = 20,581x + 17,839$		

Tabulka 19 Rovnice regrese léčiv a směsí v případě probit

Léčivo	Rovnice regrese	Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 0,580x + 3,737$	N:K:kK	$y = 0,585x + 3,663$
Diklofenak	$y = 0,486x + 4,368$	D:kK	$y = 0,572x + 4,344$
Kofein	$y = 0,325x + 4,114$	N:K	$y = 0,444x + 3,987$
K. klofibrová	$y = 0,729x + 3,926$	N:D	$y = 0,622x + 4,214$
Směs	$y = 0,586x + 4,138$	D:K	$y = 0,429x + 4,453$
D:N:K	$y = 0,642x + 3,814$	K:kK	$y = 0,650x + 3,829$
D:N:kK	$y = 0,803x + 3,745$	N:kK	$y = 0,582x + 4,091$
D:K:kK	$y = 0,674x + 3,949$		

Tabulka 20 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě inhibic v %

[mg/l]	N	D	K	kK	směs	D:N:K	D:N:kK	N:K:kK
IC ₁₀	0,560	0,105	0,117	0,611	0,253	0,483	0,278	1,031
IC ₂₀	2,857	0,389	1,106	1,600	0,833	1,840	0,959	4,547
IC ₅₀	314,055	19,893	928,616	28,829	29,702	101,754	39,374	388,870
[mg/l]	D:K:kK	D:N	D:K	D:kK	N:K	N:kK	K:kK	
IC ₁₀	0,416	0,191	0,048	0,138	0,272	0,269	0,338	
IC ₂₀	1,274	0,584	0,211	0,433	1,604	0,919	1,376	
IC ₅₀	36,530	16,672	18,194	13,487	328,698	36,371	92,740	

Tabulka 21 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě probit

[mg/l]	N	D	K	kK	směs	D:N:K	D:N:kK	N:K:kK
IC ₁₀	0,933	0,046	0,061	0,522	0,193	0,714	0,698	1,251
IC ₂₀	5,354	0,373	1,381	2,093	1,090	3,466	2,659	7,082
IC ₅₀	150,479	20,052	530,790	29,692	29,653	70,674	36,576	193,756

[mg/l]	D:K:kK	D:N	D:K	D:kK	N:K	N:kK	K:kK
IC ₁₀	0,457	0,161	0,020	0,081	0,251	0,230	0,680
IC ₂₀	2,056	0,819	0,207	0,477	2,459	1,312	3,232
IC ₅₀	36,306	18,348	18,878	13,986	192,071	36,428	63,306

Z grafu 10 a z hodnot IC₅₀ vyplývá, že nejvyšší inhibiční efekt na růst *Pseudomonas putida* vykazovalo léčivo diklofenak, a naopak nejnižší efekt byl pozorován u kofeinu. Co se týče ostatních dvou léčiv, druhý nejvyšší inhibiční efekt na růst bakterie byl pozorován u kyseliny klofibrové a poté u naproxenu. V případě směsi všech léčiv se hodnota IC₅₀ přibližovala nejvíce k hodnotě IC₅₀ kyseliny klofibrové a diklofenaku, což jsou léčiva, která také v samostatných testech vykazovala vyšší hodnoty inhibice. Dle klasifikace látek (uvedené v kapitole 4) v závislosti na hodnotách IC₅₀ byly diklofenak, kyselina klofibrová a celková směs zařazeny mezi látky škodlivé pro *Pseudomonas putida*, jejich hodnoty IC₅₀ ležely mezi 11–100 mg/l. Naproxen a kofein byly zařazeny do skupiny látek mající hodnotu IC₅₀ vyšší než 100 mg/l a takové nejsou z hlediska toxicity na vodní organismy klasifikovány.

U směsi tří léčiv byl z grafu 11 a hodnot IC₅₀ pozorován nejvyšší inhibiční efekt u směsi léčiv s diklofenakem, k nejvyšší inhibici došlo u směsi diklofenaku s kofeinem a kyselinou klofibrovou, dále u směsi s naproxenem a kyselinou klofibrovou a u směsi naproxenu s kofeinem. U směsi naproxenu s kofeinem a kyselinou klofibrovou došlo k nejnižší inhibici. První dvě směsi byly vyhodnoceny z hlediska klasifikace jako škodlivé a druhé dvě spadají do skupiny, které nejsou klasifikovány. Dle vyhodnocení pomocí probit patří směs D:N:K místo do skupiny látek, které nejsou klasifikovány, do skupiny látek škodlivých. Je tedy patrné, že vliv na zařazení testované látky do příslušné skupiny dle škodlivosti má také samotné vyhodnocení experimentu.

V případě směsi dvou léčiv byl z grafu 12 a z hodnot IC₅₀ posouzen nejvyšší inhibiční efekt rovněž pro směsi s diklofenakem, a to v pořadí od nejvyššího inhibičního efektu pro směs diklofenaku s kyselinou klofibrovou, naproxenem a kofeinem. Dále následovala směs naproxenu s kyselinou klofibrovou a kofeinu s kyselinou klofibrovou. Nejnižší inhibiční efekt byl pozorován u směsi naproxenu s kofeinem. Všechny hodnoty IC₅₀ ležely v rozmezí 11–100 mg/l, a proto byly vyhodnoceny jako škodlivé, kromě směsi naproxenu s kofeinem, která ležela nad hranicí 100 mg/l.

V dostupné literatuře je většina testování ekotoxicity daných léčiv prováděna na bakterii *Vibrio fischeri* prostřednictvím měření úbytku bioluminiscence. Měření se provádí v různých

časových intervalech, např. po 5, 15 či 30 minutách. Ve své studii uvádí autor *Mehinto, A. C.* hodnotu EC₅₀ pro diklofenak při koncentraci 13,5 mg/l a pro naproxen při 42,1 mg/l, úbytek bioluminiscence hodnotil po 15 minutách [117]. V další studii je hodnota EC₅₀ pro diklofenak, která byla vyhodnocována po 30 minutách, uváděna pouhých 11,454 µg/l [2], na rozdíl od autora *Tang, J. a kol.*, který ve svém článku uvádějí hodnotu EC₅₀ po 30 minutách pro diklofenak při 90 mg/l a pro naproxen při 600 mg/l [21].

10.2 Test inhibice růstové rychlosti řas *Parachlorella kessleri*

Průměrné hodnoty spočítaných buněk řasy *Parachlorella kessleri* pomocí Bürkerovy komůrky a jejich přepočet na 1 ml je uveden v tabulce 22. Jsou zde rovněž uvedeny hodnoty pro původní zásobní roztok řas, z kterého bylo pipetováno 10 ml do 50 ml zkumavky, a hodnoty pro kontrolní vzorky, kde je uvedena růstová rychlost µ. Z důvodu velkého množství vzorků byl testy proveden na dvě části, proto jsou zde tyto hodnoty uvedeny dvakrát. Léčiva, popř. směsi označené v tabulce symbolem „*“ byly vypočítávány s použitím kontroly z 23. 3. 2017. Tabulka 23 shrnuje průměrné počty buněk a růstových rychlostí pro jednotlivá léčiva a jejich vzájemné směsi. Rovněž jsou zde uvedeny i vypočítané hodnoty inhibic a probit pro každý vzorek. Ze získaných hodnot byly vytvořeny grafy (grafy 15, 16, 17), na kterých je znázorněn průběh závislosti inhibic všech vzorků na jednotlivých koncentracích. Graf 15 vyobrazuje závislost jednotlivých léčiv a jejich celkové směsi. Na grafu 16 je uvedena závislost směsi tří léčiv a na grafu 17 je uvedena závislost směsi dvou léčiv.

Tabulka 22 Průměrné hodnoty počtu buněk řas v zásobním roztoku a růstové rychlosti u kontrol

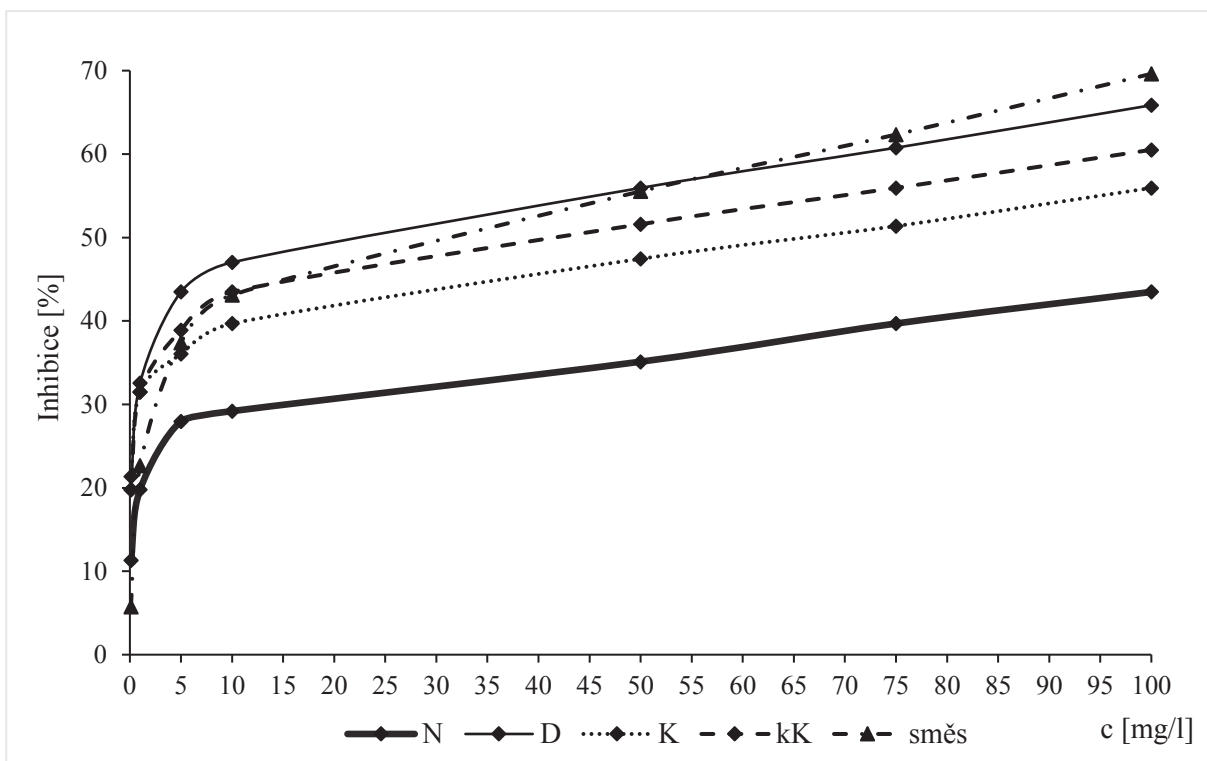
	v 1 ml · 10 ³	vzorky · 10 ³	Kontrola	v 1 ml · 10 ³	µ [h ⁻¹] · 10 ⁻³
ZR 1	690,6	138,1	K 1 20.3.17	358,3	13,163
ZR 2	762,5	152,5	K 2 23.3.17*	425,0	15,581

Tabulka 23 Průměrné hodnoty počtů buněk, růstových rychlostí, inhibic a probit u jednotlivých léčiv a směsí

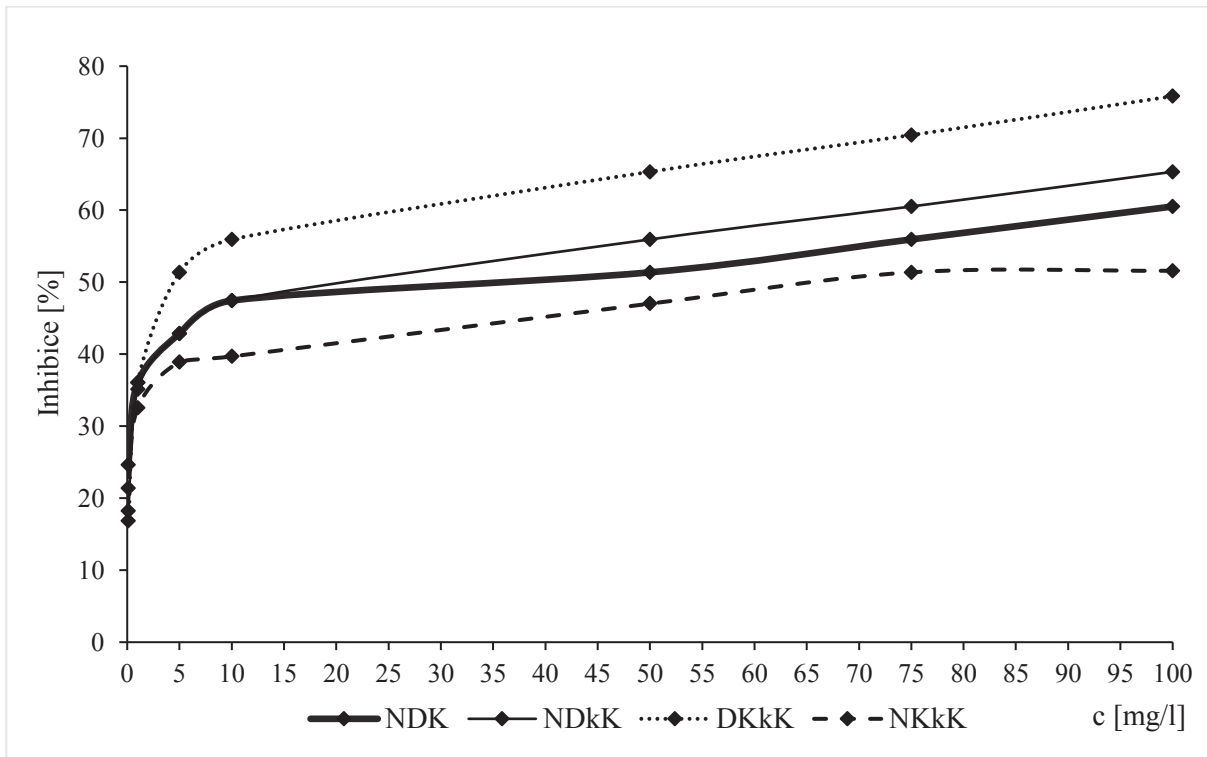
c [mg/l]	Naproxen*				Diklofenak*			
	v 1 ml · 10 ³	µ [h ⁻¹] · 10 ⁻³	I [%]	P	v 1 ml · 10 ³	µ [h ⁻¹] · 10 ⁻³	I [%]	P
100	287,5	8,806	43,48	4,82	223,7	5,320	65,85	5,41
75	300,0	9,397	39,69	4,75	236,8	6,114	60,76	5,28
50	315,8	10,110	35,12	4,61	250,0	6,865	55,94	5,15
10	337,5	11,033	29,19	4,45	276,3	8,255	47,02	4,92
5	342,1	11,222	27,98	4,42	287,5	8,806	43,48	4,82
1	375,0	12,497	19,80	4,16	325,0	10,509	32,55	4,56
0,1	412,5	13,820	11,30	3,77	375,0	12,497	19,80	4,16

Kofein*					K. klofibrová*			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	250,0	6,865	55,94	5,15	237,5	6,153	60,51	5,28
75	263,2	7,578	51,37	5,03	250	6,865	55,94	5,15
50	275,0	8,189	47,44	4,92	262,5	7,543	51,59	5,05
10	300,0	9,397	39,69	4,75	287,5	8,806	43,48	4,82
5	312,5	9,964	36,05	4,64	302,6	9,519	38,91	4,72
1	328,9	10,677	31,48	4,50	328,9	10,677	31,48	4,50
0,1	368,4	12,251	21,37	4,19	375	12,497	19,80	4,16
Směs					D:N:K*			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	184,2	3,999	69,62	5,52	237,5	6,153	60,51	5,28
75	197,4	4,957	62,34	5,31	250,0	6,865	55,94	5,15
50	210,5	5,853	55,53	5,15	263,2	7,578	51,37	5,03
10	236,8	7,489	43,10	4,82	275,0	8,189	47,44	4,92
5	250,0	8,240	37,40	4,67	289,5	8,901	42,87	4,82
1	287,5	10,181	22,65	4,39	312,5	9,964	36,05	4,64
0,1	337,5	12,408	5,73	3,45	355,3	11,746	24,62	4,33
D:N:kK*					N:K:kK*			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	225,0	5,402	65,33	5,39	262,5	7,543	51,59	5,05
75	237,5	6,153	60,51	5,28	263,2	7,578	51,37	5,03
50	250,0	6,865	55,94	5,15	276,3	8,255	47,02	4,92
10	275,0	8,189	47,44	4,92	300,0	9,397	39,69	4,75
5	289,5	8,901	42,87	4,82	302,6	9,519	38,91	4,72
1	315,8	10,110	35,12	4,61	325,0	10,509	32,55	4,56
0,1	381,6	12,738	18,25	4,08	368,4	12,251	21,37	4,19
D:K:kK*					D:N			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	200,0	3,766	75,83	5,71	187,5	4,245	67,75	5,47
75	212,5	4,608	70,43	5,52	212,5	5,983	54,55	5,13
50	225,0	5,402	65,33	5,39	223,7	6,696	49,13	4,97
10	250,0	6,865	55,94	5,15	250,0	8,240	37,40	4,67
5	263,2	7,578	51,37	5,03	263,9	8,991	31,69	4,53
1	312,5	9,964	36,05	4,64	302,6	10,894	17,24	4,05
0,1	387,5	12,952	16,87	4,05	342,1	12,597	4,30	3,25

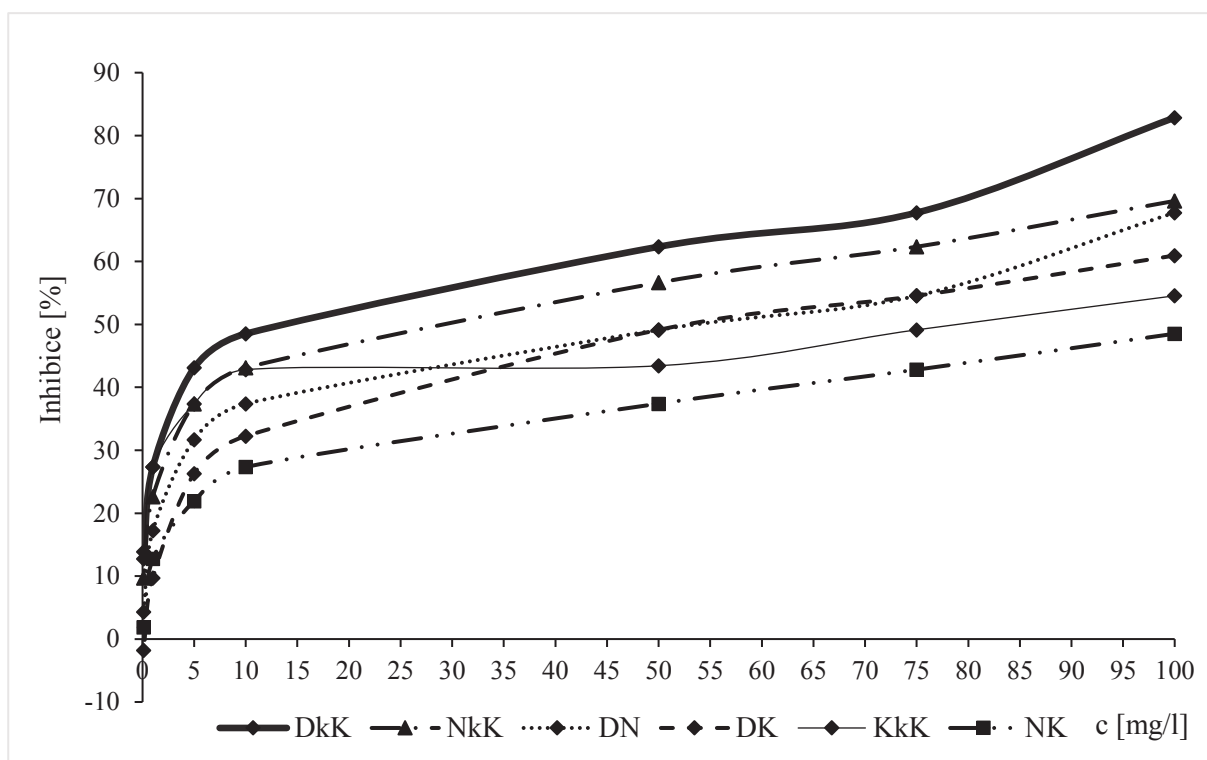
D:K					D:kK			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	200,0	5,141	60,94	5,28	162,5	2,257	82,85	5,95
75	212,5	5,983	54,55	5,13	187,5	4,245	67,75	5,47
50	223,7	6,696	49,13	4,97	197,4	4,957	62,34	5,31
10	262,5	8,918	32,25	4,53	225,0	6,777	48,51	4,97
5	277,8	9,704	26,28	4,36	236,8	7,489	43,10	4,82
1	325,0	11,884	9,71	3,72	275,0	9,564	27,34	4,39
0,1	362,5	13,401	-1,81	-	315,8	11,485	12,75	3,87
N:K					N:kK			
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P
100	225,0	6,777	48,51	4,97	184,2	3,999	69,62	5,52
75	237,5	7,528	42,81	4,82	197,4	4,957	62,34	5,31
50	250,0	8,240	37,40	4,67	208,3	5,708	56,63	5,18
10	275,0	9,564	27,34	4,39	236,8	7,489	43,10	4,82
5	289,5	10,276	21,93	4,23	250,0	8,240	37,40	4,67
1	315,8	11,485	12,75	4,08	287,5	10,181	22,65	4,26
0,1	350,0	12,914	1,89	2,95	325,0	11,884	9,71	3,72
K:kK								
c [mg/l]	v 1 ml ·10³	μ [h⁻¹] ·10⁻³	I [%]	P				
100	212,5	5,983	54,55	5,13				
75	223,7	6,696	49,13	4,97				
50	236,1	7,446	43,43	4,82				
10	237,5	7,528	42,81	4,80				
5	250,0	8,240	37,40	4,67				
1	275,0	9,564	27,34	4,39				
0,1	312,5	11,340	13,85	3,92				



Graf 15 Inhibice jednotlivých léčiv a jejich směsi



Graf 16 Inhibice směsí tří léčiv



Graf 17 Inhibice směsí dvou léčiv

V tabulkách 24 a 25 jsou shrnuty jednotlivé rovnice regrese, které byly získány pomocí grafů závislosti inhibic nebo probit na dekadickém logaritmu koncentrace, postup celého vyhodnocení byl již popsán v předešlé kapitole 10.1. Rovnice regrese byly poté využity pro stanovení inhibičních koncentrací IC_{10} , IC_{20} , IC_{50} , které shrnují tabulky 26 a 27.

Tabulka 24 Rovnice regrese léčiv a směsí v případě inhibic v %

Léčivo	Rovnice regrese	Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 10,095x + 20,461$	N:K:kK	$y = 9,8672x + 31,515$
Diklofenak	$y = 14,675x + 33,335$	D:kK	$y = 21,418x + 30,041$
Kofein	$y = 10,785x + 30,812$	N:K	$y = 14,992x + 14,083$
K. klofibrová	$y = 12,941x + 31,504$	N:D	$y = 19,488x + 19,973$
Směs	$y = 20,414x + 24,045$	D:K	$y = 21,048x + 14,145$
D:N:K	$y = 11,045x + 35,645$	K:kK	$y = 12,309x + 27,327$
D:N:kK	$y = 14,674x + 33,344$	N:kK	$y = 19,497x + 25,593$
D:K:kK	$y = 18,774x + 36,292$		

Tabulka 25 Rovnice regrese léčiv a směsí v případě probit

Léčivo	Rovnice regrese	Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 0,328x + 4,132$	N:K:kK	$y = 0,272x + 4,502$
Diklofenak	$y = 0,394x + 4,547$	D:kK	$y = 0,616x + 4,416$
Kofein	$y = 0,297x + 4,474$	N:K	$y = 0,595x + 3,768$
K. klofibrová	$y = 0,354x + 4,494$	N:D	$y = 0,667x + 3,984$
Směs	$y = 0,623x + 4,200$	D:K	$y = 0,739x + 3,769$
D:N:K	$y = 0,289x + 4,623$	K:kK	$y = 0,359x + 4,350$
D:N:kK	$y = 0,405x + 4,530$	N:kK	$y = 0,572x + 4,270$
D:K:kK	$y = 0,514x + 4,609$		

Tabulka 26 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě inhibic v %

[mg/l]	N	D	K	kK	směs	D:N:K	D:N:kK	N:K:kK
IC ₁₀	0,092	0,026	0,012	0,022	0,205	0,005	0,026	0,007
IC ₂₀	0,900	0,123	0,099	0,129	0,634	0,038	0,123	0,068
IC ₅₀	843,533	13,66	60,136	26,869	18,682	19,938	16,648	74,710
	D:K:kK	D:N	D:K	D:kK	N:K	N:kK	K:kK	
IC ₁₀	0,040	0,308	0,635	0,116	0,534	0,159	0,039	
IC ₂₀	0,136	1,003	1,897	0,340	2,481	0,517	0,254	
IC ₅₀	5,372	34,737	50,523	8,548	248,739	17,858	69,500	

Tabulka 27 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě probit

[mg/l]	N	D	K	kK	směs	D:N:K	D:N:kK	N:K:kK
IC ₁₀	0,056	0,008	0,003	0,007	0,170	0,001	0,010	0,001
IC ₂₀	1,220	0,104	0,088	0,114	0,862	0,025	0,122	0,056
IC ₅₀	442,535	14,130	59,037	26,842	19,210	20,262	14,467	67,603
	D:K:kK	D:N	D:K	D:kK	N:K	N:kK	K:kK	
IC ₁₀	0,019	0,403	0,857	0,074	0,83	0,109	0,018	
IC ₂₀	0,134	1,839	3,378	0,384	4,554	0,642	0,296	
IC ₅₀	5,756	33,383	46,286	8,853	117,464	18,865	64,844	

Z grafu 15 a z hodnot IC₅₀ plyne, že nejvyšší inhibiční efekt na růst *Parachlorella kessleri* byl pozorován u léčiva diklofenak, a naopak nejnižší efekt byl pozorován u naproxenu. Co se týče ostatních dvou léčiv, druhý nejvyšší inhibiční efekt na růst řas byl stanoven u kyseliny klofibrové a poté u kofeinu. V případě celkové směsi léčiv se hodnota IC₅₀ přibližovala nejvíce k hodnotě IC₅₀ diklofenaku oproti léčivům s nejnižším inhibičním efektem. Diklofenak, kyselina klofibrová, kofein a směs byly z hlediska klasifikace látek (viz kap. 4) v závislosti na hodnotách IC₅₀ zařazeny mezi látky škodlivé pro *Parachlorella kessleri*,

protože jejich hodnoty IC_{50} ležely mezi 11–100 mg/l. Naproxen byl zařazen do skupiny látek mající hodnotu IC_{50} vyšší než 100 mg/l a takové nejsou z hlediska toxicity na vodní organismy klasifikovány.

V případě směsí tří léčiv, jak plyne z grafu 16 a hodnot IC_{50} , byl nejvyšší efekt pozorován u směsí léčiv diklofenaku a nejvyšší inhibiční efekt byl pozorován u směsi diklofenaku s kofeinem a kyselinou klofibrovou, dále u směsi s naproxenem a kyselinou klofibrovou a u směsi naproxenu s kofeinem. Naopak k nejnižšímu inhibičnímu efektu došlo u směsi naproxenu s kofeinem a kyselinou klofibrovou. Směs D:K:kK s nejvyšším efektem byla zařazena do skupiny látek označovaných za toxické (< 10 mg/l) a další tři směsi byly vyhodnoceny z hlediska klasifikace jako škodlivé, jelikož se nacházeli v rozmezí 11-100 mg/l.

Co se týče směsí dvou léčiv byl z grafu 17 a hodnot IC_{50} pozorován nejvyšší inhibiční efekt u směsi diklofenaku s kyselinou klofibrovou a naproxenu s kyselinou klofibrovou. Dále k nejvyšší inhibici došlo u směsi diklofenaku s naproxenem, diklofenaku s kofeinem a směsi kofeinu s kyselinou klofibrovou. Nejnižší inhibiční efekt byl pozorován u směsi naproxenu s kofeinem. Směs diklofenaku s kyselinou klofibrovou spadala do skupiny látek toxických (< 10 mg/l) a směsi naproxenu s kofeinem, která ležela nad hranicí 100 mg/l, do skupiny látek neklasifikovatelných. Ostatní hodnoty IC_{50} ležely v rozmezí 11-100 mg/l, a proto byly vyhodnoceny jako škodlivé pro *Parachlorella kessleri*.

Pro srovnání s literaturou bych vybrala některé hodnoty IC_{50} , které jsou v rámci článků různé, především kvůli použití odlišných druhů řas během testování. Pro příklad uvedu vliv naproxenu, kterým se ve své studii zabýval *Cleuvers, M.*, a uvádí zde hodnotu IC_{50} vyšší než 320 mg/l [70] a v další studii je tato hodnota uváděna při koncentraci 625,5 mg/l [77]. V obou experimentech probíhalo testování na řase *Desmodesmus subspicatus*. V případě využití testovací řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* autoři studie *Isidori, M. a kol.* uvádí, že k hodnotě IC_{50} dochází při koncentraci 39,3 mg/l [118].

10.3 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé

Průměrné hodnoty naměřených délek kořínků (d) *Sinapis alba* v centimetrech u kontrol je uveden v tabulce 28. Z důvodu většího počtu vzorků byly testy prováděny na více etap, proto jsou vždy uváděny kontroly ke konkrétnímu léčivu či směsi. Tabulka 29 shrnuje délky kořínků pro jednotlivá léčiva a jejich směs. Rovněž jsou zde uvedeny i vypočítané hodnoty

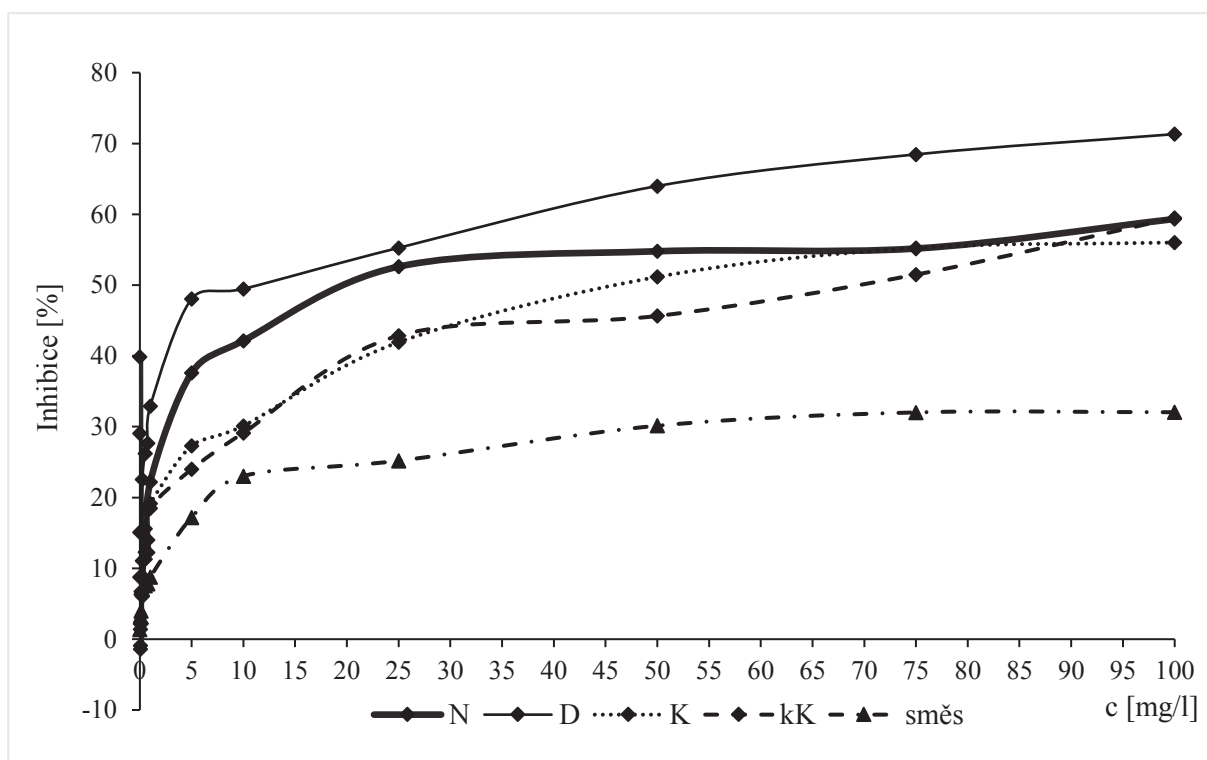
inhibic a probit pro každý vzorek a ředění. Ze získaných hodnot byl vytvořen graf (graf 18), na kterém je znázorněn průběh závislosti inhibic všech vzorků na jednotlivých koncentracích.

Tabulka 28 Průměrná délka kořínků v kontrolách

	kontrola pro N, D	kontrola pro K, kK	kontrola pro směs
Průměrná délka (d) [cm]	3,11	2,89	3,29

Tabulka 29 Průměrná délka kořínků, inhibic a probit u jednotlivých léčiv a jejich směsi

		Naproxen			Diklofenak			Kofein		
c [mg/l]	d [cm]	I [%]	P	d [cm]	I [%]	P	d [cm]	I [%]	P	
100	1,33	59,34	5,23	0,86	71,32	5,55	1,26	56,01	5,15	
75	1,38	55,16	5,13	0,97	68,46	5,47	1,38	55,23	5,13	
50	1,43	54,78	5,10	1,07	63,99	5,36	1,52	51,16	5,03	
25	1,54	52,61	5,08	1,45	55,26	5,13	1,74	41,93	4,80	
10	1,77	42,15	4,80	1,50	49,46	4,97	1,96	30,12	4,48	
5	1,94	37,60	4,69	1,51	48,05	4,95	2,10	27,31	4,39	
1	2,42	22,22	4,23	1,79	32,91	4,56	2,33	19,20	4,12	
0,75	2,70	12,24	3,82	1,93	27,66	4,42	2,22	18,21	4,08	
0,5	2,75	11,31	3,79	2,45	26,24	4,26	2,44	15,60	3,66	
0,25	2,76	11,09	3,77	2,06	22,58	3,52	2,63	8,93	2,95	
0,1	2,90	6,33	3,45	2,89	6,76	2,95	2,82	2,18	2,67	
0,05	3,15	-0,92	-	3,04	2,20	-	2,85	1,40	-	
0,001	1,83	39,87	-	2,20	29,06	-	2,64	8,77	-	
		K.klofibrová			Směs					
c [mg/l]	d [cm]	I [%]	P	d [cm]	I [%]	P				
100	1,14	59,49	5,23	2,23	32,05	4,54				
75	1,37	51,48	5,05	2,23	32,02	4,53				
50	1,59	45,64	4,87	2,30	30,14	4,48				
25	1,67	42,86	4,82	2,46	25,20	4,33				
10	2,01	29,13	4,45	2,53	23,04	4,26				
5	2,18	24,00	4,20	2,72	17,19	4,05				
1	2,33	18,48	4,08	3,00	8,76	3,66				
0,75	2,46	14,00	3,92	3,03	7,85	3,59				
0,5	2,52	12,32	3,82	3,04	7,58	3,56				
0,25	2,70	6,07	3,45	3,05	7,05	3,52				
0,1	2,81	2,28	2,95	3,15	4,01	3,25				
0,05	2,93	-1,38	-	3,18	3,25	3,12				
0,001	2,47	15,09	-	3,24	1,37	2,67				



Graf 18 Inhibice jednotlivých léčiv a jejich směsi

Tabulky 30 a 31 shrnují jednotlivé rovnice regrese, které byly získány pomocí grafů závislosti inhibic či probit na dekadickém logaritmu koncentrace, postup celého vyhodnocení byl již popsán v kapitole 10.1. Rovnice regrese byly poté využity pro stanovení inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀, které jsou uvedeny v tabulkách 32 a 33.

Tabulka 30 Rovnice regrese léčiv a směsi v případě inhibic v %

Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 19,031x + 21,854$
Diklofenak	$y = 20,099x + 30,627$
Kofein	$y = 16,973x + 19,718$
K. klofibrová	$y = 17,348x + 17,642$
Směs	$y = 9,685x + 12,200$

Tabulka 31 Rovnice regrese léčiv a směsi v případě probit

Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 0,614x + 4,092$
Diklofenak	$y = 0,732x + 4,207$
Kofein	$y = 0,762x + 3,764$
K. klofibrová	$y = 0,652x + 3,864$
Směs	$y = 0,408x + 3,739$

Tabulka 32 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě inhibic v %

	N	D	K	kK	směs
IC₁₀ [mg/l]	0,238	0,094	0,268	0,363	1,061
IC₂₀ [mg/l]	0,799	0,296	1,039	1,367	7,007
IC₅₀ [mg/l]	30,122	9,202	60,831	73,331	2,016 g/l

Tabulka 33 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě probit

	N	D	K	kK	směs
IC₁₀ [mg/l]	0,248	0,216	0,876	0,601	0,899
IC₂₀ [mg/l]	1,291	0,863	3,316	2,841	10,761
IC₅₀ [mg/l]	30,129	12,11	41,984	55,075	1,229 g/l

Z grafu 18 a z hodnot IC₅₀ plyne, že nejvyšší inhibiční efekt na klíčivost semen *Sinapis alba* vykazovalo léčivo diklofenak, a naopak nejnižší efekt byl pozorován u kyseliny klofibrové. Co se týče zbylých dvou léčiv, druhý nejvyšší efekt po diklofenaku byl pozorován u naproxenu a poté u kofeinu. V případě směsi léčiv byl inhibiční efekt posuzován z grafu 18 a byla stanovena hodnota IC₂₀, protože v testovaném koncentračním rozmezí nedošlo k 50% inhibici. Dle klasifikace látek (kap. 4) v závislosti na hodnotách IC₅₀ byly naproxen, kofein a kyselina klofibrová zařazeny mezi látky škodlivé pro *Sinapis alba*, jejich hodnoty IC₅₀ ležely mezi 11–100 mg/l. Diklofenak byl vyhodnocen jako toxický, hodnota IC₅₀ ležela v rozmezí 1–10 mg/l. Směs byla zařazena do skupiny látek mající hodnotu IC₅₀ vyšší než 100 mg/l a takové nejsou z hlediska toxicity na vodní organismy klasifikovány.

10.4 Test inhibice růstu okřehku menšího

Průměrné hodnoty naměřených absorbancí pro vlnovou délku 653 nm a 666 nm a z nich vypočteného celkového množství chlorofylu v kontrolách je uveden v tabulce 34. Tabulka 35 shrnuje hodnoty pro jednotlivá léčiva a jejich směs. Rovněž jsou zde uvedeny i vypočítané hodnoty inhibic pro každý vzorek a ředění. Ze získaných hodnot byl vytvořen graf (graf 19), na kterém je znázorněn průběh závislosti inhibic všech vzorků na jednotlivých koncentracích.

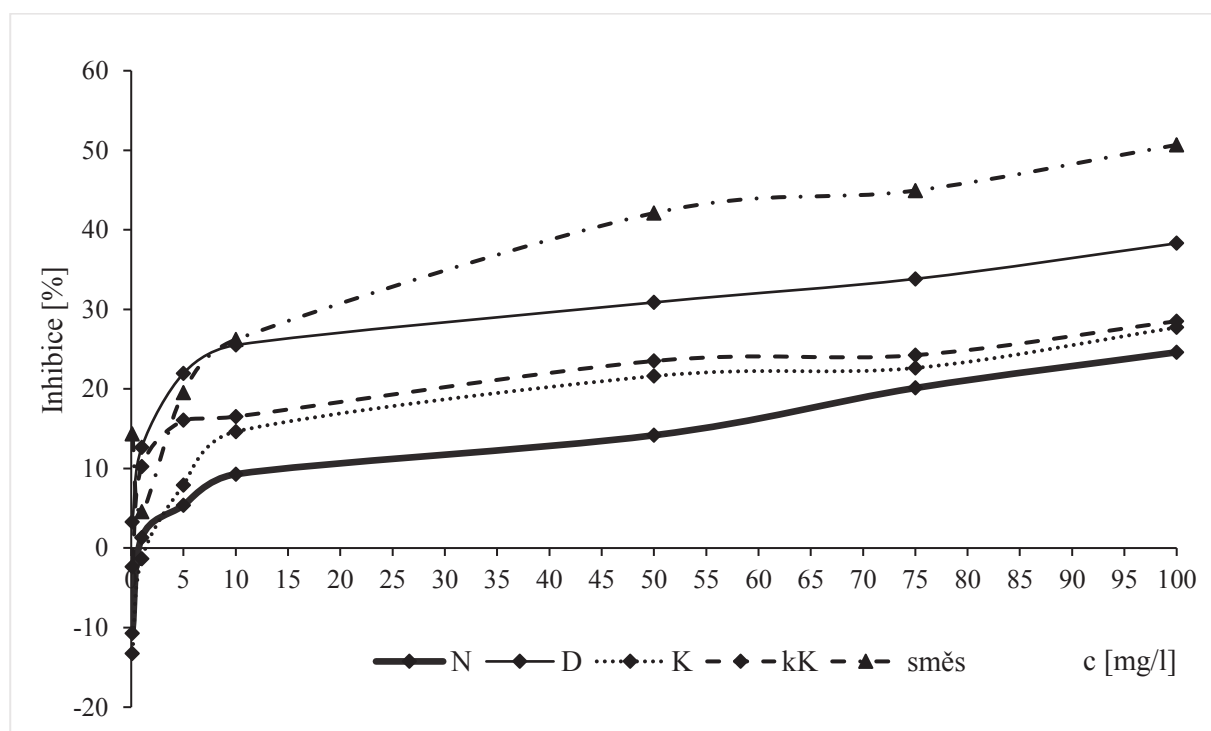
Tabulka 34 Průměrné hodnoty absorbancí a celkového chlorofylu u kontrol

	653 nm	666 nm	celkový chl. [µg/ml]	m [µg]
Kontrola pro N, D	0,064	0,115	1,765	8,824
Kontrola pro K, kK, směs	0,062	0,089	1,612	8,061

Tabulka 35 Průměrné hodnoty absorbancí, celkového chlorofylu, inhibic a probity u léčiv a jejich směsí

Naproxen	653 nm	666 nm	celkový chl. [µg/ml]	m [µg]	inhibice [%]	probity
100 [mg/l]	0,047	0,093	1,331	6,653	24,61	4,33
75	0,049	0,102	1,410	7,049	20,12	4,16
50	0,055	0,097	1,515	7,574	14,17	3,92
10	0,058	0,102	1,601	8,006	9,28	3,66
5	0,061	0,108	1,670	8,352	5,35	3,36
1	0,064	0,110	1,742	8,709	1,31	2,67
0,1	0,073	0,118	1,954	9,770	-10,71	-
Diklofenak	653 nm	666 nm	celkový chl. µg/ml]	m [µg]	inhibice [%]	probity
100 [mg/l]	0,040	0,068	1,089	5,444	38,31	4,69
75	0,041	0,081	1,168	5,839	33,84	4,59
50	0,044	0,082	1,220	6,100	30,87	4,50
10	0,047	0,090	1,315	6,573	25,51	4,36
5	0,049	0,093	1,377	6,886	21,97	4,23
1	0,057	0,096	1,542	7,708	12,65	3,87
0,1	0,063	0,107	1,707	8,535	3,28	3,12
Kofein	653 nm	666 nm	celkový chl. [µg/ml]	m [µg]	inhibice [%]	probity
100 [mg/l]	0,042	0,063	1,108	5,538	27,72	4,42
75	0,042	0,065	1,124	5,622	22,64	4,26
50	0,047	0,060	1,193	5,964	21,61	4,23
10	0,050	0,088	1,376	6,881	14,64	3,96
5	0,056	0,088	1,485	7,423	7,92	35,9
1	0,062	0,095	1,634	8,170	-1,35	-
0,1	0,069	0,105	1,826	9,131	-13,27	-
K. klofibrová	653 nm	666 nm	celkový chl. [µg/ml]	m [µg]	inhibice [%]	probity
100 [mg/l]	0,045	0,058	1,153	5,763	28,51	4,45
75	0,048	0,065	1,232	6,162	24,25	4,29
50	0,050	0,063	1,253	6,266	23,51	4,26
10	0,052	0,075	1,346	6,729	16,52	4,05
5	0,053	0,068	1,353	6,766	16,07	4,01
1	0,058	0,071	1,447	7,235	10,24	3,82
0,1	0,064	0,088	1,650	8,250	-2,34	-

Směs	653 nm	666 nm	celkový chl. [µg/ml]	m [µg]	inhibice [%]	probity
100 [mg/l]	0,032	0,054	0,870	4,352	50,68	5,03
75	0,035	0,064	0,972	4,859	44,94	4,87
50	0,039	0,057	1,022	5,109	42,11	4,80
10	0,048	0,083	1,303	6,513	26,20	4,36
5	0,052	0,089	1,420	7,100	19,54	4,16
1	0,060	0,112	1,684	8,421	4,57	3,36
0,1	0,056	0,093	1,512	7,558	14,35	-



Graf 19 Inhibice jednotlivých léčiv a jejich směsi

V tabulkách 36 a 37 jsou uvedeny rovnice regrese, které byly získány z grafů závislosti inhibic nebo probit na dekadickém logaritmu koncentrace, postup celého vyhodnocení byl již popsán v kapitole 10.1. Rovnice regrese byly poté využity pro stanovení inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀, které shrnuje tabulka 38 a 39.

Tabulka 36 Rovnice regrese léčiv a směsi v případě inhibic v %

Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 10,632x - 0,367$
Diklofenak	$y = 11,136x + 13,795$
Kofein	$y = 13,267x - 0,473$
K. klofibrová	$y = 9,338x + 8,314$
Směs	$y = 22,469x + 4,102$

Tabulka 37 Rovnice regrese léčiv a směsi v případě probit

Léčivo	Rovnice regrese
Naproxen	$y = 0,761x + 2,761$
Diklofenak	$y = 0,484x + 3,761$
Kofein	$y = 0,551x + 3,291$
K. klofibrová	$y = 0,285x + 3,801$
Směs	$y = 0,779x + 3,486$

Tabulka 38 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě inhibic

	N	D	K	kK	směs
IC ₁₀ [mg/l]	9,442	0,456	6,157	1,516	1,830
IC ₂₀ [mg/l]	82,346	3,607	34,925	17,842	5,099
IC ₅₀ [g/l]	54,614	1,783	6,373	29,105	0,110

Tabulka 39 Vypočítané hodnoty inhibičních koncentrací IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ v případě probit

	N	D	K	kK	směs
IC ₁₀ [mg/l]	18,210	0,824	6,018	0,518	1,998
IC ₂₀ [mg/l]	68,945	6,689	37,857	18,161	7,336
IC ₅₀ [g/l]	0,876	0,364	1,267	16,164	0,088

Z grafu 19 a z hodnot IC₅₀ plyne, že nejvyšší inhibiční efekt u *Lemna minor* vykazovala směs všech léčiv. Co se týče jednotlivých léčiv, byl inhibiční efekt posuzován podle grafu 19 a z hodnot IC₂₀, a to z toho důvodu, že v testovaném koncentračním rozmezí nedošlo k 50% inhibici. Hodnoty IC₅₀ byly vypočteny z rovnic regrese, které byly získány pouze z rozmezí koncentrací 0,1–100 mg/l. Nejvyšší efekt ze všech léčiv byl z hlediska celkového hodnocení stanoven pro diklofenak, poté následovala kyselina klofibrová, dále kofein, a naopak nejnižší efekt vykazoval naproxen. U *Lemna minor* došlo tedy k nevyššímu úbytku chlorofylu právě v případě směsi všech léčiv, kde byla inhibice nejvyšší.

Jak bylo zmíněno výše (kap. 4), látky mající hodnotu IC₅₀ > 100 mg/l, nejsou z hlediska toxicity na vodní organismy klasifikovány. V literatuře se nacházejí různé hodnoty inhibic týkající se vlivu léčiva na *Lemna minor*. Pro příklad uvedu vliv diklofenaku, který je nejvíce podrobován testům ekotoxicity v experimentálních studiích. *Cleuvers, M.* ve své studii uvádí hodnotu IC₅₀ na 7,5 mg/l [70], zatímco ve studii *Kaza, M. a kol.* uvádí tuto hodnotu na 148 mg/l [119] a v článku autor *Kertész, I. a kol.* uvádí, že při 25 mg/l dochází k 15% inhibici [120].

11 Závěr

Hlavním cílem experimentální části této diplomové práce bylo testování ekotoxikologických účinků vybraných čtyř léčiv (diklofenaku, kyseliny klofibrové, kofeinu a naproxenu) a jejich vzájemných směsí na vodní organismy. Z výsledků vyplývá, že léčivem s nejvyšším inhibičním efektem na růst vodních organismů je diklofenak, a to ve všech provedených testech. Léčivem s o něco nižším inhibičním efektem byla kyselina klofibrová a to ve všech testech kromě testu se semeny *Sinapis alba*, kde vykazovala nejmenší inhibiční efekt ze všech testovaných léčiv. Nejméně toxickými léčivy byly kofein s naproxenem.

U směsí léčiv nelze jednoznačně určit, zda byla toxičtější směs dvou, tří, či všech čtyř farmak. Jednoznačně se však prokázalo, že nejvyšší ekotoxicitu vykazovaly vždy směsi léčiv s diklofenakem, tedy toxicita směsí testovaných léčiv byla dána přítomností léčiva s nejvyšším inhibičním účinkem. Nejnižší ekotoxicitu vykazovaly směsi naproxenu s kofeinem. Toto stanovení je v souladu s inhibičními efekty jednotlivých léčiv. Ve všech testech prokazovala směs všech čtyř léčiv toxicitu nacházející se nejbližší k hodnotám diklofenaku. Výjimkou byly testy u *Sinapis alba*, toxicita této směsi byla ve srovnání se samostatnými léčivy nižší

Z pohledu testovaných zástupců byla nejvíce citlivým organismem na testované látky hořčice bílá (*Sinapis alba*). U řasy *Parachlorella kessleri* a bakterie *Pseudomonas putida* nelze jednoznačně určit, který organismus byl citlivější. Naopak nejméně citlivým systémem ze všech byl okřehek menší (*Lemna minor*).

Existuje řada způsobů posouzení ekotoxicity zkoumaných látek. Pro výpočet hodnot inhibiční koncentrací IC_x (EC_x) existuje několik způsobů, z nichž všechny mají jisté výhody i nevýhody. Závislost inhibice v % na koncentraci má tvar sigmoidní křivky, kterou nelze zjednodušeně popsat rovnicí, a proto se získaná data musí upravit. V této práci byly využity dva způsoby vyhodnocení pro srovnání výsledků. Klasickou a nejjednodušší metodou je sestavení závislosti inhibice v % na dekadickém logaritmu koncentrace a poté se výpočet hodnot provede prostřednictvím lineární regrese. Problémem je, že přímka lineární regrese nekopíruje zcela inhibiční křivku. Proto bylo použito ještě jedno vyhodnocení pro srovnání, a to pomocí probitové analýzy. Inhibice v % se převedou na probitové jednotky a poté jsou vyneseny v závislosti na dekadickém logaritmu koncentrace, která se přibližuje lineární závislosti.

Bohužel v dostupné literatuře nebývá mnohdy uváděno, jakým způsobem vyhodnocení byly výsledky získávány. Přitom se jedná o jeden z důležitých faktorů, který může spolurozhodovat o tom, do jaké skupiny dle toxicity bude látka zařazena. Tento poznatek byl také v práci v některých případech potvrzen.

12 Seznam použitých zdrojů

1. TERNES, Thomas A. a Adriano JOSS . *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The challenge for urban water management*. London: IWA Publishnig, 2006, 455 s. ISBN 9781843390930.
2. SANTOS, Lúcia H.M.L.M., A.N. ARAÚJO, A. FACHINI, A. PENA, C. DELERUE-MATOS a M.C.B.S.M. MONTENEGRO. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, **175**(1-3), s. 45-95. ISSN 03043894.
3. VIRKUTYTE, Jurate, Rajender S. VARMA a Veeriah JEGATHEESAN. *Treatment of micropollutants in water and wastewater*. London: IWA Publishing, 2010, 520 s. ISBN 1843393166.
4. OPPENLÄNDER, Thomas. *Photochemical purification of water and air*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 367 s. ISBN 3527305637.
5. PANG, Weihai, Naiyun GAO a Shengji XIA. Removal of DDT in drinking water using nanofiltration process. *Desalination*. 2010, **250**(2), s. 553-556. ISSN 00119164.
6. UTA, Miroslav. *Chemické látky v životním prostředí a zdraví*. 1. vyd. Brno: ZO ČSOP Veronica, 2008, 60 s. ISBN 978-80-87308-00-4.
7. ČESKO. Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou vodu a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. In: Sběrka zákonů České republiky. 2004. Dostupné z:
<https://portal.gov.cz/app/zakony/download?idBiblio=57875&nr=252~2F2004~20Sb.&ft=pdf>
8. BLAŠKOVÁ, Marta, Andrea HÁJKOVÁ a Vlastimil VYSKOČIL. Voltametrické stanovení anthracenu pomocí elektrody ze skelného uhlíku modifikované DNA. *Chemické listy 109*. Praha: Česká společnost chemická, 2015, s. 235-240. ISSN 1213-7103.
9. ŠEBÁKOVÁ, Helena a kol. Expozice PAU-zdravotní rizika. *Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje se sídlem v Ostravě* [online]. 2012, [cit. 2016-09-27]. Dostupné z: www.khsova.cz/01_aktuality/files/ovzdusi_20120402.pdf.
10. EOM, I. C., C. RAST, A. M. VEBER a P. VASSEUR. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007, **67**(2), s. 190-205. ISSN 01476513.

11. IGWE, J. C. a P. O. UKAOGO. Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Natural Sciences Research*. 2015, **5**(7), s. 117-131. ISSN 22250921.
12. ABDEL-SHAFY, Hussein I. a Mona S. M. MANSOUR. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016, **25**(1), s. 107-123. ISSN 11100621.
13. DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy 109*. Praha: Česká společnost chemická, 2015, s. 444-450. ISSN 1213-7103.
14. NOHAVICA, Dušan. Rizika nanomateriálů a nanotechnologií pro lidské zdraví a životní prostředí. *Československý časopis pro fyziku*. Praha: FZÚ AV ČR v. v. i., 2011, **61**(3-4), s. 220-227. ISSN 18048536
15. FARRÉ, Marinella, Krisztina GAJDA-SCHRANTZ, Lina KANTIANI a Damià BARCELÓ. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **393**(1), s. 81-95. ISSN 1618-2642.
16. TOPINKA, Jan. Je nutné studovat možná rizika nanomateriálů pro lidské zdraví? *Časopis Vesmír*, **90**(4), 2011, s. 212-213. ISSN 12144029.
17. MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*. 2006, **32**(8), s. 967-976. ISSN 01604120.
18. NOWACK, Bernd a Thomas D. BUCHELI. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*. 2007, **150**(1), s. 5-22. ISSN 02697491.
19. SVODOBA, Jan a kol. Léčiva a čistírny odpadních vod – možnosti odstraňování a reálná data. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 2009, **2**, s. 9-11. ISSN 03228916.
20. DITELLA, Katrie a Ann T. LEMLEY. Drugs in Drinking water. *Housing and Home Environment News*. 2000.
21. TANG, Janet Y.M., Shane MCCARTY, Eva GLENN, Peta A. NEALE, Michel St. J. WARNE a Beate I. ESCHER. Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Research*. 2013, **47**(10), s. 3300-3314. ISSN 00431354.

22. KOŽÍŠEK, František a Václav ČADEK. Léčiva v pitných vodách. *Sborník konference pitná voda 2008* W&ET Team: České Budějovice, 2008, s. 77-88. ISBN 03228916. ISBN 9788025420348.
23. KNEJZLÍK, Zdeněk, Jan KÁŠ a Tomáš RUML. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy 94*. Praha: Česká společnost chemická, 2000, s. 913-918. ISSN 1213-7103.
24. HOFFMANN, Michael F. a kol. The transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Research*. 2014, **42**, s. 1113-1117.
25. VÁŇA, Miroslav, Filip Wanner, Lenka Matoušová a Josef K. Fuksa. Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 2010, **52**(2), s. 1-3. ISSN 03228916.
26. FENT, K., A. WESTON a D. CAMINADA. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2006, **76**(2), 122-159 ISSN 0166445x.
27. COSTANZO, Simon D., John MURBY a John BATES. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2005, **51**(1-4), 218-223 ISSN 0025326x.
28. HESTER, R. E. a Roy M. HARRISON. *Pharmaceuticals in the environment*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016. Issues in environmental science and technology, 41. ISBN 9781523101931.
29. KRATOCHVÍL, František. Diclofenac sodium salt. *Im-Bio-Pharm Consult* [online]. [cit. 2016-10-16]. Dostupné z: www.epitesty.cz/pasports/D%20061%20A.pdf
30. PAVELKA, Karel a kol. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Grada Publishnig a.s, 2005, 436 s. ISBN 8024704598.
31. ČAPKA, Zdeněk a kol. Využití UV/VIS spektrofotometrie pro stanovení diklofenaku. *Chemické listy 107*. Praha: Česká společnost chemická, 2013, s. 550-554. ISSN 1213-7103.
32. GAN, Tong J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*. 2010, **26**(7), s. 1715-1731. ISSN 0300-7995.
33. VICKERS, Alison E.M. Tissue slices for the evaluation of metabolism-based toxicity with the example of diclofenac. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, **179**(1), s. 9-16. ISSN 00092797.

34. BÄCK, Magnus, Li YIN a Erik INGELSSON. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk in a nation-wide cohort study after the withdrawal of rofecoxib. *European Heart Journal*. 2012, **33**(15), 1928-1933. ISSN 0195-668x.
35. SETIAWATI, E. a kol. Bioequivalence Study with Two Naproxen Sodium Tablet Formulations in Healthy Subject. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*. 2009, **1**(1), s. 28-33. ISSN 09750851.
36. POMYČKOVÁ, Ivana a kol. Stanovení stopových množství léčiv v pitných vodách metodou GC-MS. *Chemické listy* 106. Praha: Česká společnost chemická, 2012, s143-148. ISSN 1213-7103.
37. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
38. BROZINSKI, Jenny-Maria, Marja LAHTI, Aimo OIKARI a Leif KRONBERG. Detection of naproxen and its metabolites in fish bile following intraperitoneal and aqueous exposure. *Environmental Science and Pollution Research*. 2011, **18**(5), s. 811-818. ISSN 0944-1344.
39. HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-495-5.
40. DAUGHTON Christian G. a Thomas A. TERNES. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environ Health Perspect*. 1999, **107**(6), s. 907-938.
41. HECKMAN, Melanie A., Jorge WEIL a Elvira Gonzalez DE MEJIA. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science*. 2010, **75**(3), s. 77-87. ISSN 00221147.
42. PRANCE, Ghilleen a Mark NESBITT. *Cultural History of Plants*. Hoboken: Taylor & Francis, 2005. ISBN 0203020901.
43. MAREK, Josef. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 9788024726397.
44. KOČÍ, Vladimír. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy* 100. Praha: Česká společnost chemická, 2006, (10), s. 882-888. ISSN 1213-7103-0009-2770.

45. BLAISE, Christian a Jean-François FÉRARD. *Small-scale freshwater toxicity investigations: Volume 1- Toxicity test methods.* Dordrecht: Springer, 2005, 551 s. ISBN 9781402035531.
46. RAND, Gary M. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.* Vyd. 2. London: CRC Press, 2003, 1130 s. ISBN 1-56032-091-5.
47. KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky.* Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
48. HOFMAN, Jakub. Půdní ekotoxikologie. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 3: sborník pracovní konference Brno 2003.* Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 7-33. ISBN 80-903203-6-8.
49. MARŠÁLEK, Blahoslav. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 1: sborník pracovní konference Seč 2002.* Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, s. 8-24. ISBN 80-238-9260-6.
50. KOLÁČEK, Tomáš. Využití hrotnatky *Daphnia magna* v ekotoxikologických biotestech. *Živa*. Nakladatelství Academia: SSČ AV ČR, v. v. i., 2015, **6**, s. 131-133. 2015.
51. MIYASHIRO, Tim a Edward G. RUBY. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*. 2012, **84**(5), s. 795-806. ISSN 0950382x.
52. ČUPR, Pavel, Michal ŠKAREK, Zuzana FLEGROVÁ a Tina VAN DYK. Využití luminiscenčních in vitro testů pro detekci genotoxického potenciálu. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 1: sborník pracovní konference Seč 2002.* Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, s. 115-128. ISBN 80-238-9260-6.
53. Curiosidades de la Microbiologia. *Sepias espaciales* [online]. 2011 [cit. 2016-10-05]. Dostupné z: <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.cz/2011/05/sepias-espaciales.html>.
54. KOČÍ, Vladimír. Bioluminiscenční solid-phase test na bakteriích *Vibrio fischeri*. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 3: sborník pracovní konference Brno 2003.* Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 86-89. ISBN 80-903203-6-8.
55. ČSN EN ISO 11348-1-3. *Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích).* Praha: Český normalizační institut, 2000. 24 s.

56. JUVONEN, Risto a kol. A Battery of Toxicity Tests as Indicators of Decontamination in Composting Oily Waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, **47**(2), s. 156-166. ISSN 01476513.
57. ČSN EN ISO 10712. *Jakost vod – Zkouška inhibice růstu na Pseudomonas putida*. Praha: Český normalizační institut, 1997. 16 s.
58. MARŠÁLEK, Blahoslav. Ekotoxikologické biotesty s producenty. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 2: sborník pracovní konference Praha 2003*. Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 77-79. ISBN 80-903203-0-9.
59. HEGEWALD, E. a A. SCHMIDT. *Desmodesmus subspicatus* [online]. 2002 [cit. 2016-10-12]. Dostupné z: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443
60. MARŠÁLEK, Blahoslav a Jaromír LUKAVSKÝ. Řasové testy trofie a toxicity. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 2: sborník pracovní konference Praha 2003*. Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 84-92. ISBN 80-903203-0-9.
61. ČSN EN ISO 8692. *Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Praha: Český normalizační institut, 2005. 20 s.
62. ČESKO. Vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí. In: Sběrka zákonů České republiky. 2004. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-222#prilohy>
63. AMBROŽOVÁ, Jana. Presentace výsledků krátkodobého a dlouhodobého testu na hořčici bílé *Sinapis alba*. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 2: sborník pracovní konference Praha 2003*. Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 113-115. ISBN 80-903203-0-9.
64. Plants for a future. *Sinapis alba* - L. [online]. 203 [cit. 2016-10-12]. Dostupné z: <http://www.pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Sinapis+alba>.
65. LEITGIB, Laura, Judit KÁLMÁN a Katalin GRUIZ. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*. 2007, **66**(3), s. 428-434. ISSN 00456535.
66. KOČÍ, Vladimír, Tomáš RAKOVICKÝ a Andrej ŠVAGR. *Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2001. ISBN 978-80-7080-699-9.

67. ŠVAGR, Andrej, Tomáš RAKOVICKÝ a Jonáš JIRKŮ. Možnosti testování ekotoxicity pŮd vyššími rostlinami. In: KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ, editor. *Ekotoxikologické biotesty 3: sborník pracovní konference Brno 2003*. Vyd. 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, s. 86-89. ISBN 80-903203-6-8.
68. ČSN EN ISO 20079. *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) - Zkouška inhibice růstu okřehek*. Praha: Český normalizační institut, 2007. 28 s.
69. Aquarium and pond plants of the world. *Lemna L.* [online]. 2007 [cit. 2016-10-12]. Dostupné z:
http://idtools.org/id/aquariumplants/Aquarium_%26_Pond_Plants_of_the_World/key/Aquarium_%26_Pond_Plants/Media/Html/Fact_sheets/lemna.html
70. CLEUVERS, Michael. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 2003, **142**(3), s. 185-194. ISSN 03784274.
71. ČSN EN ISO 6341. *Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity*. Praha: Český normalizační institut, 2013. 28 s.
72. DAPHTOXKIT F MAGNA. *Crustacean toxicity screening test for freshwater- standard operational procedure* [online]. [cit. 2016-10-18]. Dostupné z:
<http://www.microbiotests.be/SOPs/Daphtokit%20magna%20F%20SOP%20-%20A5.pdf>
73. UniProt. *Taxonomy Brachydanio rerio* [online]. [cit. 2016-10-21]. Dostupné z:
<http://www.uniprot.org/taxonomy/7955>
74. CAO, Fangjie, Xiaoshan LIU, Chengju WANG, Mingqi ZHENG, Xuefeng LI a Lihong QIU. Acute and short-term developmental toxicity of cyhalofop-butyl to zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, **23**(10), s. 10080-10089. ISSN 0944-1344.
75. PIŠTĚKOVÁ, V., E. VOŠLÁŘOVÁ a Z. SVOBODOVÁ. Nitrite Toxicity to *Danio rerio*: Effects of Chloride Concentrations during Acclimatization and in Toxicity Tests. *Acta Veterinaria Brno*. 2005, **74**, s. 435–440.
76. ČSN EN ISO 7346-1-3. *Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae))*. Praha: Český normalizační institut, 1999. 16 s.

77. CLEUVERS, Michael. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, **59**(3), s. 309-315. ISSN 01476513.
78. ČADEK, Václav a kol. Výskyt humánních léčiv v pitných vodách v České republice. Státní zdravotní ústav. [online]. 2011 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/Vyskyt_leciv_v_pitne_vode_CR_zprava_na_www_szu_verze_5.pdf
79. TIXIER, Céline, Heinz P. SINGER, Sjeff OELLERS a Stephan R. MÜLLER. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science & Technology*. 2003, **37**(6), s. 1061-1068. ISSN 0013-936x.
80. KHETAN, Sushil K. a Terrence J. COLLINS. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews*. 2007, **107**(6), s. 2319-2364. ISSN 0009-2665.
81. BUERGE, Ignaz J., Thomas POIGER, Markus D. MÜLLER a Hans-Rudolf BUSER. Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environmental Science & Technology*. 2003, **37**(4), s. 691-700. ISSN 0013-936x.
82. MARTÍNEZ, Aguirre G.V a kol. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere*. 2015, **120**, s. 75-85.
83. BANG, Seung Hyuck, Ji-Young AHN, Nam-Hui HONG, Simranjeet Singh SEKHON, Yang-Hoon KIM a Jiho MIN. Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna* exposed to pharmaceuticals. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2015, **11**(2), s. 153-160. ISSN 1738-642x.
84. ZARRELLI, Armando a kol. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. *Science of The Total Environment*. 2014, **470-471**, s. 453-458.
85. GRODA, Bořivoj a kol. Čištění odpadních vod jako nástroj k ochraně životního prostředí v zemědělské praxi a na venkově. *Ministerstvo zemědělství ČR*. Brno, 2007.
86. RACLAVSKÁ, Helena. *Technologie zpracování a využití kalů z ČOV*. Ostrava, 2007, 171 s. ISBN 978-80-248-1600-5.

87. KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK, Zdeněk KAFKA a Tomáš VANĚK. Léčiva – „nový“ enviromentální polutant. *Chemické listy 103*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, s. 540-547. ISSN 1213-7103-0009-2770.
88. DUŠEK, Libor. Čištění odpadních vod chemickou oxidací hydroxylovými radikály. *Chemické listy 104*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, s. 846-854. ISSN 1213-7103.
89. LUO, Yunlong a kol. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*. 2014, **473-474**, s. 619-641. ISSN 00489697.
90. BARBOSA, Marta O., Nuno F.F. MOREIRA, Ana R. RIBEIRO, Manuel F.R. PEREIRA a Adrián M.T. SILVA. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research* . 2016, **94**, s. 257-279. ISSN 00431354.
91. TRAPIDO, M., I. EPOLD, J. BOLOBAJEV a N. DULOVA. Emerging micropollutants in water/wastewater: growing demand on removal technologies. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, **21**, s. 12217-12222. ISSN 0944-1344.
92. ZHANG, Tian C a kol. *Membrane technology and environmental applications*. Reston, American Society of Civil Engineers, 2012, 742 s. ISBN 978-0-7844-7689-5.
93. Explaining the Activated Sludge Process. *Pipeline: Small Community Wastewater Issues Explained to the Public*. 2003, **14(2)**, s. 1-8.
94. AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2003, 226 s. ISBN 978-80-7080-521-3.
95. THEOBALD, Daniel. Microorganisms in activated sludge. *Wastewater processing*. [online]. 2014, [cit. 2016-11-27].
Dostupné z: <http://www.waterwaste.com/microorganisms-in-activated-sludge/>
96. HENZE, Mogens a kol. *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. Londýn: IWA Publishing, 2008. ISBN 9781843391883.
97. MITTAL, Arun. Biological Wastewater Treatment. *Water Today*. 2011, **8**, s. 32-44.
98. DAVIES, Spencer Peter. *The Biological Basis of Wastewater Treatment*. Strathkelvin Instruments Ltd, 2005, 20 s.
99. VAN HAANDEL, Adrianus a Jeroen VAN DER LUBBE. *Handbook of biological wastewater treatment*. 2. vyd. Londýn: IWA Publishing, 2012. ISBN 9781780400006.
100. *The Nutrient Roadmap*. Water Environment Federation, 2015. ISBN 9781572783140.

- 101.FOREJT, Martin. Dusičnany v potravinách. *Medicína pro praxi*. 2008, 5(9), s. 333–334.
- 102.KIM, Joong Kyun, Kyoung Joo PARK, Kyoung Sook CHO, Soo-Wan NAM, Tae-Joo PARK a Rakesh BAJPAI. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus strains*. *Bioresource Technology*. 2005, **96**, s. 1897-1906. ISSN 09608524.
- 103.WAGNER, Michael a Alexander LOY. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, **13**, s. 218-227. ISSN 09581669.
- 104.GERARDI, Michael H. *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. New York: Wiley-Interscience, 2002, 193 s. ISBN 0471065080.
- 105.GERNAEY, Krist V, Mark C. M VAN LOOSDRECHT, Mogens HENZE, Morten LIND a Sten B JØRGENSEN. Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art. *Environmental Modelling & Software*. 2004, **19**, s. 763-783. ISSN 13648152.
- 106.HLAVÍNEK, Petr. Aktivační čistírny odpadních vod se separací kalu ponořeným membránovým modulem. *Vodní hospodářství a vodní stavby*. Brno: Vutium, 2012, 31 s. ISSN 1213-418X.
- 107.MATOVIC, Darko. *Biomass - detection, production and usage*. Rijeka: InTech, 2011, 443 s. ISBN 9789533074924.
- 108.Celkový dusík. Integrovaný registr znečišťování: Ministerstvo životního prostředí České republiky [online]. [cit. 2017-02-09]
Dostupné z: http://www.irz.cz/irz/repository/latky/celkovy_dusik.pdf.
- 109.MIHALJOVIĆ, Randel a kol. Spectrophotometric method for the determination of phosphorus in natural waters using the bismuthphosphomolybdate complex. *Water SA*. 2007, **33**(4), s. 513-518. ISSN 0378-4738.
- 110.IDOWU, S. O. a kol. Colorimetric assay od naproxen tablets by derivatization. *East and Central African Journal od Pharmaceutical Sciences*. 2009, **12**, s. 8-14.
- 111.SABARA, Dagmara M. a kol. Spectroscopic studies of naproxen and tryptophan immobilized in polyvinyl alcohol. *Biotechnol Food Sciences*. 2011, **75**(1), s. 39-49.
- 112.GOUDA, Ayman A. a kol. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arabian Journal of Chemistry*. 2013, **6**(2), s. 145-163. ISSN 18785352.

113. NAVEED, Safila a Fatima Qamar. UV spectrophotometric assay of Diclofenac sodium available brands. *Journal of Innovation in Pharmaceuticals and Biological Sciences*. 2014, **1**(3), s. 92-96.
114. BHAWANI, Ahmand Showkat a kol. Spectrophotometric Analysis of Caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015, s. 1-7. ISSN 1687-8760.
115. FREY, Stefan. Caffeine Standards Kit. *Certificate of Analysis* [online]. 2015, [cit. 2017-02-27]. Dostupné z:
https://www.agilent.com/cs/library/certificateofanalysis/480243_HC994868.pdf
116. HAMADA, Y.Z. Competition of Fe³⁺ UV-Vis Absorption between Ascorbic and Clofibrac Acid. *Electronic Journal of Biology*. 2016, s 2-5. ISSN 1860-3122.
117. MEHINTO, A. C. Impacts of the human pharmaceutical diclofenac in the aquatic environment. 2009.
118. ISIDORI, M. a kol. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the total environment*. 2005, 348, s.93-101.
119. KAZA, M a kol. The toxicity of selected pharmaceuticals to the aquatic plant *Lemna minor*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2007, **16**(5), s. 524-531.
120. KERTÉSZ, I. F. a kol. Ecotoxicological methods for monitoring the effects of micropollutants in waters. *Environmental information*. [online]. 2013, [cit 2017-03-26] Dostupné z:
http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/2352paper_long_Fekete-Kertesz.pdf