

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ekotoxikologické testování na příkladu hodnocení barviva

Patricie Černá

Bakalářská práce

2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Patricie Černá**  
Osobní číslo: **C14018**  
Studijní program: **B2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Ekotoxikologické testování na příkladu hodnocení barviva**  
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

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

1. Zpracujte literární rešerši týkající se ekotoxikologického testování.
2. Popište metody ekotoxikologického testování podle směrnic OECD.
3. Zpracujte data vybraného barviva z pohledu testování na dafniích a řasách.
4. Bakalářskou 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:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant bakalářské práce:

**Mgr. Monika Roupcová**

Výzkumný ústav organických syntéz, a.s .

Datum zadání bakalářské práce:

**30. ledna 2017**

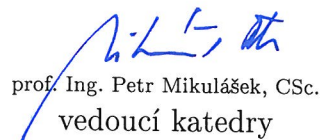
Termín odevzdání bakalářské práce:

**7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 30. ledna 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 7. 7. 2017

Patricie Černá

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za odbornou pomoc a rady při zpracování bakalářské práce. Poděkování patří i Mgr. Monice Roupkové za pomoc a rady při zpracovávání experimentální části práce.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá ekotoxikologií, její legislativou a testováním ekotoxicity barviva Reactive Yellow 85. V práci jsou popsány základní vlastnosti testovaného barviva, principy ekotoxikologických testů na dafniích a řasách a zhodnocení výsledků toxicity barviva.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

ekotoxikologie, ekotoxikologické testy, dafnie, řasy, Reactive Yellow 85

## **TITLE**

Ecotoxicological testing on an example of a dye

## **ANNOTATION**

The thesis deals with ecotoxicology, its legislation and the ecotoxicity test of Reactive Yellow 85. The thesis describes the basic properties of the tested color, the principles of ecotoxicological tests on daphnia and algae and the evaluation of the toxicity of dye toxicity.

## **KEYWORDS**

ecotoxicology, ecotoxicological tests, daphnia, algae, Reactive Yellow 85

# OBSAH

0	ÚVOD.....	14
1	Legislativa týkající se ekotoxicity a jejího testování .....	15
1.1	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) .....	15
1.1.1	Vznik, cíle a funkce .....	15
1.1.2	Členské státy .....	15
1.1.3	Česká republika a OECD .....	15
1.2	REACH .....	16
1.2.1	Cíle.....	16
1.2.2	Princip, postup .....	16
1.2.3	Důsledky nařízení REACH.....	17
2	Ekotoxikologie.....	18
2.1	Význam ekotoxikologie .....	18
2.2	Rozdělení ekotoxikologie.....	18
3	Toxicita a ekotoxikologické biotesty .....	19
3.1	Klasifikace toxických látek .....	19
3.1.1	Směrnice pro nebezpečné chemické látky a přípravky – DSD a DPD.....	19
3.1.2	Klasifikace, označování a balení látek a směsí – CLP .....	20
3.2	Toxikologické indexy.....	21
3.2.1	Letální indexy .....	21
3.2.2	Efektivní indexy.....	21
3.2.3	Další toxikologické indexy .....	22
3.3	Rozdělení ekotoxikologických testů .....	22
3.3.1	Rozdělení podle doby expozice .....	22
3.3.2	Rozdělení podle prostředí .....	24
3.4	Obecný postup při testování.....	25
4	Reaktivní azobarviva .....	28

5	Testovaná látka – Reactive Yellow 85 .....	29
6	Validace testovací metody .....	31
7	Zkouška akutní imobilizace dafnií.....	33
7.1	Před testem .....	33
7.1.1	Referenční látky .....	33
7.1.2	Kritéria jakosti .....	33
7.2	Vybavení .....	34
7.2.1	Aparatura .....	34
7.2.2	Zkušební organismy.....	34
7.2.3	Hrotnatka velká <i>Daphnia magna</i> Straus.....	36
7.2.4	Zásobní voda a zřed'ovací voda .....	37
7.2.5	Zkoušené roztoky – roztoky obsahující testovanou látku.....	39
7.3	Popis metody.....	40
7.3.1	Kontrola deionizované vody .....	41
7.3.2	Kontrola zřed'ovací vody .....	41
7.3.3	Inkubační podmínky .....	42
7.4	Vyhodnocení .....	42
7.4.1	Zkušební protokol .....	43
7.4.2	Výsledky .....	43
8	Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic .....	44
8.1	Před testem .....	45
8.1.1	Referenční látka .....	45
8.2	Aparatura.....	45
8.3	Testovací organismy .....	46
8.3.1	<i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	46
8.4	Příprava roztoků a kultury řas .....	47
8.4.1	Růstové médium .....	47



8.4.2	Počáteční koncentrace biomasy .....	48
8.4.3	Koncentrace zkoušené látky .....	48
8.4.4	Příprava očkovací kultury .....	48
8.4.5	Příprava zkušebních roztoků.....	49
8.5	Průběh zkoušky .....	49
8.5.1	Podmínky inkubace.....	49
8.5.2	Měření biomasy .....	51
8.5.3	Kontrola koncentrace .....	51
8.6	Získaná data .....	51
8.6.1	Růstové křivky.....	51
8.6.2	Proměnné odezvy.....	52
8.6.3	Průměrná růstová rychlost .....	53
8.6.4	Výtěžek .....	54
8.6.5	Stimulace a netoxická inhibice růstu .....	54
8.7	Vyhodnocení .....	55
9	Výsledek testování Reactive Yellow 85 .....	56
9.1	Výsledek testů toxicity na dafniích .....	56
9.2	Výsledek testů toxicity na řasách.....	59
9.2.1	Předběžný test .....	59
9.2.2	Limitní test.....	63
10	ZÁVĚR .....	67
11	POUŽITÁ LITERATURA .....	68

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Piktogramy podle směrnic DSD a DPD [13] .....	19
Obrázek 2 – Výstražné symboly podle CLP [15] .....	20
Obrázek 3 – Závislost LD <sub>50</sub> na účinku [16] .....	22
Obrázek 4 – Závislost účinku na dávce [16] .....	23
Obrázek 5 – Doporučený sled ekotoxikologických testů [10] .....	25
Obrázek 6 – Způsob volby testovaných koncentrací v intervalu OC <sub>0</sub> až OC <sub>100</sub> [20] .....	27
Obrázek 7 – Strukturní vzorec Reactive Yellow 85 [25] .....	30
Obrázek 8 – Vialky do kapalinového chromatografu [26] .....	31
Obrázek 9 – Koncentrační řada a standardy k validaci [26] .....	32
Obrázek 10 – Kyslíková sonda a pH metr [26] .....	34
Obrázek 11 - Porovnání dospělé dafnie a dafnie použité k testování [26] .....	35
Obrázek 12 – Chov dafnií [26] .....	36
Obrázek 13 – Anatomické schéma dafnie [28] .....	37
Obrázek 14 – Aklimatizace dafnií [26] .....	40
Obrázek 15 – Koncentrační řada [26] .....	41
Obrázek 16 – Zkušební nádoby [26] .....	42
Obrázek 17 – <i>Desmodesmus subspicatus</i> [30] .....	46
Obrázek 18 – Řasová kultura [26] .....	50

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Výběr z přehledu tříd a kategorií nebezpečnosti a piktogramů [14] .....	20
Tabulka 2 – Klasifikace látek dle akutní orální toxicity [16] .....	21
Tabulka 3 – Vybrané charakteristiky Reactive Yellow 85 [24] .....	29
Tabulka 4 – Některé chemické charakteristiky přijatelné zředovací vody [27] .....	38
Tabulka 5 – Př. vhodné rekonstituované zkušební vody – Zkušební voda ISO [27] .....	38
Tabulka 6 – Složení růstových médií [27] .....	48
Tabulka 7 – Imobilizace dafnií – předběžný test .....	56
Tabulka 8 – Koncentrace rozp. kyslíku a teplota testované vody – předběžný test.....	57
Tabulka 9 – Hodnoty pH testovacích roztoků .....	57
Tabulka 10 – Určené koncentrace a jejich změna v testovaném roztoku .....	57
Tabulka 11 – Individuální hustota buněk – předběžný test.....	59
Tabulka 12 – Hodnoty růstové rychlosti ( $\mu$ ) a výtěžku (Y) – předběžný test .....	60
Tabulka 13 - Hodnoty pH testovaných roztoků .....	61
Tabulka 14 – Průměrná hustota buněk – předběžný test .....	61
Tabulka 15 – Procentuální snížení průměrné růstové rychlosti a inhibice v procentech ..	61
Tabulka 16 – Analyticky určené konc. roztoků na počátku a na konci předběž. testu .....	62
Tabulka 17 – Hustoty buněk – limitní test .....	63
Tabulka 18 – Růstová rychlost ( $\mu$ ), a výtěžek (Y) – limitní test .....	64
Tabulka 19 – Hodnoty pH testovaných roztoků – limitní test .....	64
Tabulka 20 – Průměrná hustota buněk – limitní test .....	65
Tabulka 21 – Procent. snížení rychlosti růstu a procen. inhibice výtěžku – limitní test ...	65
Tabulka 22 – Analyticky určené konc. roztoků na počátku a na konci limitního testu .....	65

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Růstová křivka řas [32] .....	52
Graf 2 – Imobilizace dafnií.....	58
Graf 3 – Růstové křivky – předběžný test .....	62
Graf 4 – Růstové křivky – limitní test .....	66

## **SEZNAM ZKRATEK**

OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj

NATO – Severoatlantická aliance

REACH – registrace, evaluace a autorizace chemických látek

EU – Evropská unie

ECHA – Evropská agentura pro chemické látky

DSD – Dangerous Substances Directive, Směrnice o nebezpečných látkách

DPD – Dangerous Preparation Directive, Směrnice pro nebezpečné přípravky

CLP – klasifikace, označování a balení látek a směsí

LD<sub>50</sub> – letální (smrtná) dávka pro 50 % testovacích organismů

LC<sub>50</sub> – letální (smrtná) koncentrace pro 50 % testovacích organismů

ED<sub>50</sub> – dávka, která vyvolá účinek o velikosti 50 % maximálního účinku

EC<sub>50</sub> – koncentrace, která vyvolá účinek o velikosti 50 % maximálního účinku

NOAEL – nejvyšší dávka, při které ještě nebyl pozorován toxický účinek

LOAEL – nejnižší dávka, při které už byl pozorován toxický účinek

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TOC – celkové množství organického uhlíku

CHSK – chemická spotřeba kyslíku

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

## 0 ÚVOD

Do životního prostředí se dostává nebo uvolňuje ohromné množství různých znečišťujících a toxických látek. V menší míře to mohou být produkty přirozených procesů, avšak v drtivé většině případů se jedná o látky pocházející z oblastí lidské činnosti. Dostávají se tak do okolního prostředí látky, které jsou ať už svým původem, množstvím či místem vzniku škodlivé pro životní prostředí.

Na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jsou transportovány do jednotlivých složek prostředí (vzduch, voda, půda, horniny, sedimenty), kde se účastní biogeochemických cyklů. Voda a vzduch mohou transportovat látky velmi rychle, zato půda, ve které je transport látek pomalejší, může tyto látky akumulovat. Díky propojení a návaznosti biochemických procesů se látka dostane i do jiného prostředí, než které původně kontaminovala. Do organismů se dostávají potravou, dýcháním, ale i jinými cestami a poté dochází k jejich přeměně buď na neškodné metabolity, nebo se vytvoří škodlivé produkty.

Xenobiotika mohou mít na organismy různý vliv, letální či subletální účinky a u některých dochází k biotransformaci, bioakumulaci a také k přenosu potravním řetězcem na další organismy. Tento proces vyvolá následně odezvu v postižené populaci, společenstvu a ekosystému. Může tak dojít k postupné kontaminaci všech složek životního prostředí a tím pádem ke zničení celého ekosystému. Proto je důležité znát účinky produktů lidské činnosti na životní prostředí. Těmito účinky se zabývá ekotoxikologie a ekotoxikologické biotesty.

Cílem bakalářské práce je zjištění toxicity reaktivního azobarviva Ostazinové žluti. Toxicita bude testována pomocí ekotoxikologických biotestů vycházejících z metod OECD.

# 1 LEGISLATIVA TÝKAJÍCÍ SE EKOTOXICITY A JEJÍHO TESTOVÁNÍ

## 1.1 Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD)

### 1.1.1 Vznik, cíle a funkce

Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj je mezinárodní vládní organizace se sídlem v Paříži. Vznikla v roce 1961 zakládajícím dokumentem s názvem „Konvekce o OECD“ jako nástupce Organizace pro hospodářskou spolupráci v Evropě, která se zabývala poválečným hospodářstvím a jeho obnovou. Byla vytvořena jako ekonomický protějšek NATO [1].

Jejím hlavním cílem je koordinace politiky jednotlivých států za účelem ekonomického rozvoje členských i nečlenských států. Ačkoliv jsou v této organizaci zastoupeny nejvýznamnější země světa a tím pádem i většina zboží i služeb, tak má významný vliv i na mezinárodní ekonomiku a obchod.

OECD se ale nezabývá jen politikou a ekonomikou. Nejvyspělejší státy zde porovnávají své činnosti i v řadě jiných oblastí jako je například vzdělávání, věda, zemědělství a životní prostředí.

Nejvyšším orgánem této organizace je Rada OECD. Tato rada je složena z velvyslanců členských států a zástupce Evropské komise. Dále má spoustu výborů, kde se schází odborníci z členských zemí a diskutují postupy [2].

### 1.1.2 Členské státy

OECD byla založena 20 státy. K počátku roku 2017 má 35 členských států. Jedná se o přijetí dalších dvou – Ruské federace a Kolumbie.

Tato organizace spolupracuje s Evropskou komisí a i státy, které nejsou členy, jako například Brazílie, Indie či Čínská lidová republika [2].

### 1.1.3 Česká republika a OECD

Česká republika se stala členem organizace 21. 12. 1995, podepsáním přístupové listiny ke Konvekci o OECD. Podpisem se zavazuje k plnění požadavků a snaze dosáhnout cílů organizace [1].

Předtím než se Česká republika stala členem OECD s touto organizací dlouhou dobu spolupracovala, a to už za dob Československa.

## 1.2 REACH

REACH je zkratka několika anglických slov – Registration, evaluation and authorisation of chemicals, což v překladu znamená registrace, hodnocení a autorizace chemikálií.

Jedná se o Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky. Vešlo v platnost 1. 7. 2007 [3].

### 1.2.1 Cíle

Cílem nařízení REACH je:

- zabezpečit ochranu životního prostředí a zdraví
- aby producenti a dovozci nesli odpovědnost za pochopení a řízení rizik s užíváním chemických látek
- povolit volný pohyb chemikálií na trhu EU
- využívat alternativní metody posuzování nebezpečných vlastností látek (omezení používání pokusných zvířat) [4]

Obecně platí pro všechny chemikálie, ale některé jsou z tohoto nařízení vyjmuty. Jedná se například o odpady, radioaktivní látky, léčiva, účinné látky biocidů nebo nebezpečné látky obsažené v některých přípravcích [5].

Toto nařízení pomáhá i v konkurenceschopnosti podniků, protože kontroluje látky a jejich výrobu a podporuje inovace ve výrobě.

Aktuálně je na seznamu látek podléhajících povolení 31 položek, mezi které patří například kyselina trihydrogenarseničná. Ta se používá jako přísada do rodenticidů a jiných pesticidů [6].

### 1.2.2 Princip, postup

Nařízením jsou stanoveny podmínky, povinnosti a pravomoci dotčených osob, což jsou výrobci a dovozci, v procesu registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Následný uživatel je od toho osvobozen.



Povinnost se týká zjišťování a poskytování údajů o látkách vyráběných nebo dovážených v množství nad 1 t/rok. I pomocí těchto údajů jsou hodnoceny nebezpečné vlastnosti látek a to, zda registrační dokumentace souhlasí s požadavky nařízení. Toto má na starosti agentura ECHA [3].

ECHA – Evropská agentura pro chemické látky je hlavním orgánem při uplatňování právních předpisů EU o chemických látkách. Pomáhá podnikům tyto předpisy dodržovat, poskytuje o nich informace a může je i zakázat [6].

### 1.2.3 Důsledky nařízení REACH

Pro společnosti to má spíše negativní důsledky, spojené s větší administrativou a finančními náklady, a to dokonce i pro ty, u kterých by se souvislost s chemickými látkami nepředpokládala.

Ale díky správné identifikaci látky můžeme sdílet informace, a tím například zamezit zbytečným testům na zvířatech. Identifikace látky je proces, kde je stanovena identita látky, což je její chemický název, číslo, chemické složení [6].

## 2 EKOTOXIKOLOGIE

Ekotoxikologie je věda, která se zabývá negativním působením toxikantů na biosystémy. Tento pojem vznikl složením ekologie a toxikologie [7]. Ekologie je věda zabývající se vzájemnými vztahy mezi živými organismy navzájem a prostředím v němž žijí [8]. Toxikologie je obor, který se věnuje škodlivému působení látek na organismus [9]. Pojem ekotoxikologie byl poprvé použit v roce 1969 členem francouzské vědecké akademie René Truhautem. Kromě toho, že studuje účinky látek, tak se také zabývá monitoringem.

Ekotoxikologie ale také využívá poznatky z jiných vědních oborů, jako je např. chemie, matematické modelování, fyzika, geologie, klimatologie a mnoha dalších [7].

### 2.1 Význam ekotoxikologie

Hlavním cílem ekotoxikologie je studium a rozšiřování poznatků o působení chemických látek přítomných v prostředí na živé systémy od buňky až po biosféru. Z praktického hlediska jsou tu dva hlavní cílové objekty:

- Ekosystémy – přírodní i antropogenní
- Člověk – jako jedinec i jako celá společnost

Testování různých látek má význam nejen v ochraně životního prostředí, díky toxickým účinkům mohou mít látky i hospodářský dopad. Jejich působením se může omezit schopnost plnit pro člověka důležité funkce, jako například poskytování kvalitní pitné vody či zemědělských produktů [10].

Rovnováha v biosystémech ale nemusí být narušena jen v rámci vody nebo půdy. Například toxický stres predátorů vede ke snížení jejich aktivity, což znamená přemnožení jejich kořisti. Ve výsledku to může ovlivňovat i člověka a jeho zemědělskou činnost [10].

### 2.2 Rozdělení ekotoxikologie

Ekotoxikologické problémy můžeme rozdělit podle toho, zda se zabývají minulostí či budoucností, do dvou skupin.

- Retrospektivní ekotoxikologie** hodnotí látky již používané nebo činnosti provozované v minulosti. Patří sem i hodnocení starých ekologických zátěží.
- Prospektivní ekotoxikologie** se zabývá prevencí, tzn. testováním nových produktů před začátkem používání [7].

### 3 TOXICITA A EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

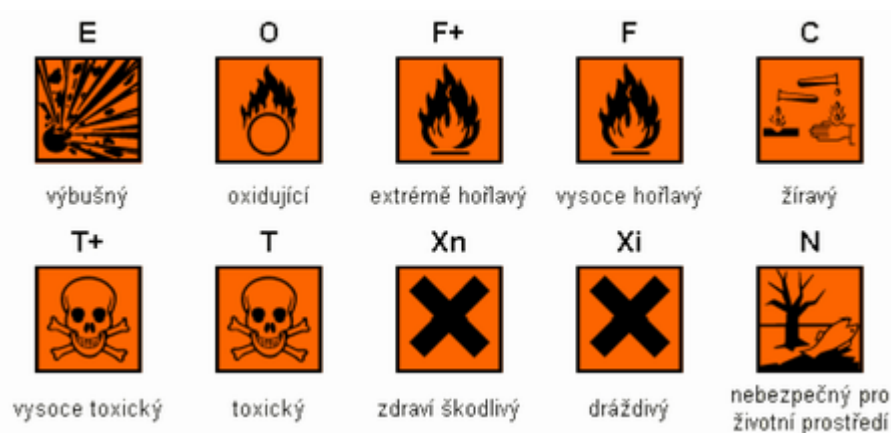
Pomocí chemické analýzy látek, přípravků či například vod sice zjistíme informace o jejich nebezpečnosti, ale nemůžeme podle nich zjistit nic o toxicitě jednotlivých látek. Z tohoto důvodu se používají testy ekotoxicity neboli ekotoxikologické biotesty. Pomocí biotestu stanovíme množství látky v prostředí na základě reakce živého organismu. Sledujeme jeho reakce na působení prostředí a poté vyvodíme riziko pro organismy žijící v přirozeném prostředí. Výhodou ekotoxikologických biotestů je schopnost vypovídat o vlivu znečištění komplexně, v celém jeho objemu, se všemi vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty. Hlavní význam je v tom, že zjistíme souhrn účinků všech látek, a to i látek, které chemická analýza neprokázala. Testy prováděné na vodních organismech jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů ze skládky, havárií průniku odpadních vod do povrchových či podzemních vod apod. [11].

#### 3.1 Klasifikace toxických látek

Klasifikace je zhodnocení nebezpečných vlastností látky nebo směsi. Jejím výsledkem je přidělení piktogramu a číselného či písmenného označení (Obrázek 1).

##### 3.1.1 Směrnice pro nebezpečné chemické látky a přípravky – DSD a DPD

Směrnice pro nebezpečné chemické látky (DSD – Dangerous Substance Directive) a směrnice pro nebezpečné chemické přípravky (nyní nebezpečné směsi) (DPD – Dangerous preparation Directive) obsahují značení pomocí písmenného symbolu a dále seznam R-vět (pro označení je to výstražný symbol) a S-vět. Postupně byly tyto směrnice nahrazovány nařízením CLP [12].



Obrázek 1 – Piktogramy podle směrnic DSD a DPD [13]

### 3.1.2 Klasifikace, označování a balení látek a směsí – CLP

Nařízení EU se zkratkou CLP (Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures) vstoupilo v platnost v lednu 2009. Zkratka CLP v překladu znamená klasifikaci, balení a označování. Jeho obsahem je seznam standardních vět o nebezpečnosti (H-vět), seznam pokynů pro bezpečné zacházení (P-vět), výstražné symboly (obrázek 2) a třídy a kategorie nebezpečnosti (tabulka 1) [4].

**Tabulka 1** – Výběr z přehledu tříd nebezpečnosti a kategorií nebezpečnosti a piktogramů [14]

Třída nebezpečnosti	Kód třídy a kategorie nebezpečnosti	Kód grafického symbolu	Signální slovo
Toxicita pro specifické cílové orgány – jednorázová expozice	STOT SE 1	GHS08	Nebezpečí
	STOT SE 2	GHS08	Nebezpečí
	STOT SE 3	GHS07	Varování
Toxicita pro specifické cílové orgány – opakovaná expozice	STOT RE 1	GHS08	Nebezpečí
	STOT RE 2	GHS08	Varování



**Obrázek 2** – Výstražné symboly podle CLP [15]

## 3.2 Toxikologické indexy

Účinek toxicity je možné charakterizovat kvantitativně i kvalitativně. Kvalitativně hodnotíme to, jak působí na organismus. Kvantitativní účinek charakterizujeme pomocí indexu toxicity. Čím je látka toxičtější, tím je nižší hodnota indexu toxicity. U těchto indexů musí být uvedeny podmínky jejich stanovení – typ organismu, doba expozice a způsob vstupu do organismu. Aby se vyloučil vliv velikosti organismu, tak se toxické dávky vztahují na 1 kg [16].

### 3.2.1 Letální indexy

Jsou to indexy akutní toxicity, které vyjadřují letální neboli smrtelnou dávku či koncentraci. Slouží ke klasifikaci látek na zdraví škodlivé, netoxické, toxické a vysoce toxické.

**LD<sub>50</sub>** – střední smrtící (letální) dávka; dávka, při které se očekává 50% mortalita, vyjadřuje se v mg.kg<sup>-1</sup>, což je hmotnost toxické látky ku hmotnosti organismu (tabulka 2).

**LC<sub>50</sub>** – střední smrtící (letální) koncentrace; koncentrace, při které se očekává 50% mortalita, vyjadřuje se v mg.m<sup>-3</sup> nebo ppm [16].

**Tabulka 2** – Klasifikace látek dle akutní orální toxicity [16]

<b>Toxická látka</b>	<b>LD<sub>50</sub> (per os - požití)</b>	<b>Přibližně odpovídající smrtelná dávka pro člověka</b>
supertoxická	5 mg.kg <sup>-1</sup> a méně	špetka (cca 0,1 g) <i>nikotin, botulotoxin, strychnin</i>
extrémně toxická	5 - 50 mg.kg <sup>-1</sup>	7 kapek až čajová lžička (4 ml) <i>kyanid draselný, fenol</i>
silně toxická	50 - 500 mg.kg <sup>-1</sup>	polévková lžice (30 g) <i>methanol, morfin, paracetamol</i>
mírně toxická	0,5 - 5 g.kg <sup>-1</sup>	šálek (250 g) <i>ethylenglykol, chlorid sodný</i>
málo toxická	5 - 15 g.kg <sup>-1</sup>	0,5 až 1 litr <i>ethanol, aceton</i>
prakticky netoxická	15 g.kg <sup>-1</sup> a více	více jak litry nebo kilogramy <i>glycerol, síran barnatý</i>

### 3.2.2 Efektivní indexy

Tyto indexy vyjadřují efektivní dávku (effective dose) či koncentraci (effective concentration), při které reaguje daný počet jedinců (polovina, všichni nebo žádný jedinec) na nějaký obecný, předem sledovaný účinek (hepatotoxický, inhibiční, smrtelný atd.).

**ED<sub>50</sub>** – střední účinná dávka neboli dávka, při které se účinek projeví na 50 % sledované populace, vyjadřuje se v mg.kg<sup>-1</sup>.

**EC<sub>50</sub>** – střední účinná (efektivní) koncentrace neboli koncentrace, při které se sledovaný účinek projeví u 50 % sledované populace; vyjadřuje se v mg.m<sup>-3</sup> [16].

### 3.2.3 Další toxikologické indexy

**NOAEL** – (No Observable Adverse Effect Level) neboli nejvyšší dávka, při které nebyl pozorován toxický účinek na testovaný organismus.

**LOAEL** – (Lowest Observable Adverse Effect Level) neboli nejnižší dávka, při které byl pozorován toxický účinek na testovaný organismus [16].

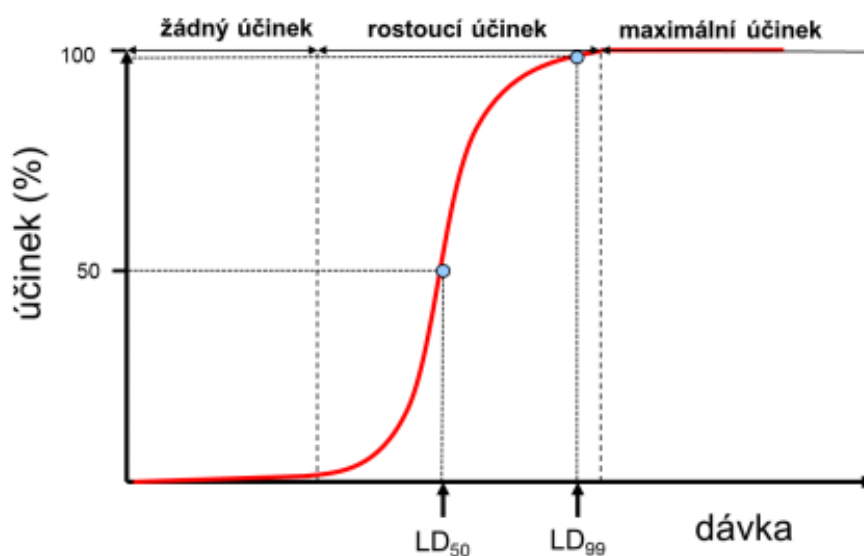
## 3.3 Rozdělení ekotoxikologických testů

Ekotoxikologické testy můžeme rozdělit podle různých kritérií, například podle doby expozice dané látky, podle prostředí, ve kterém působí nebo podle úrovně testovaného systému [10].

### 3.3.1 Rozdělení podle doby expozice

#### Akutní testy

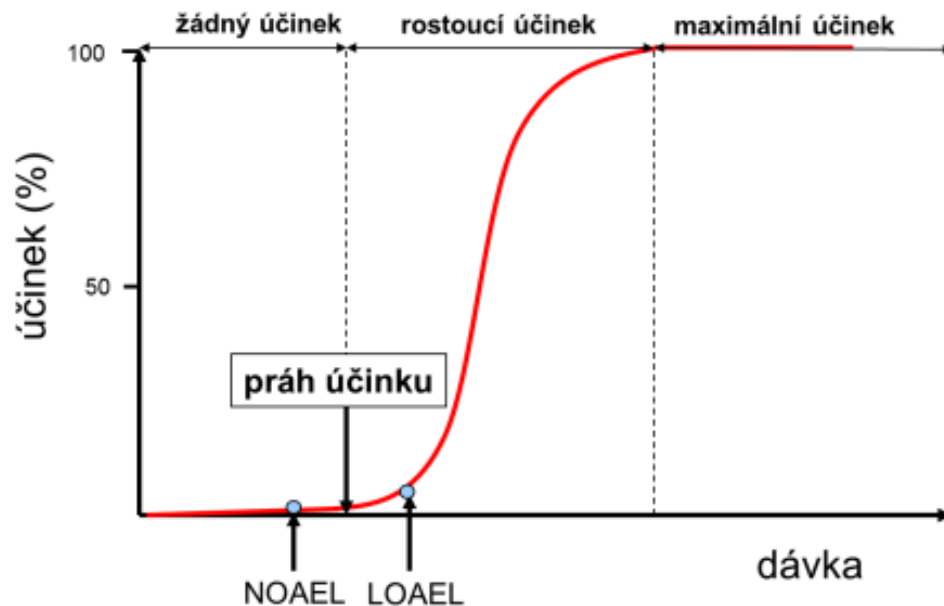
Akutní testy toxicity jsou krátkodobé testy, které popisují účinky látky během krátké doby. Tyto testy se vyhodnocují po 24-72 hodinách nebo až po 96 hodinách od expozice. Pomocí akutního testu toxicity se nejčastěji stanovuje mortalita (úmrtnost), která se vyjadřuje v hodnotách LC<sub>50</sub> (obrázek 3) nebo LD<sub>50</sub> [17], [18].



Obrázek 3 – Závislost LD<sub>50</sub> na účinku [16]

## Subchronické (subakutní) testy

Při subchronických testech se látka podává testovanému zvířeti po dobu 10 % délky jeho života, což je u laboratorních hlodavců po dobu tří až pěti měsíců. Pokud se látka podává kratší dobu, tak tyto testy nazýváme subakutní. Subakutní testy toxicity trvají 28-90 dní. U obou typů jsou zvířata opakovaně vystavována působení testované látky. Používají se mnohem nižší koncentrace látek než u testování akutní toxicity. Výsledkem subchronických testů jsou hodnoty LOAEL a NOAEL. Výsledky subchronických testů se používají pro navrhování testů chronických. Závislost účinku na dávce s hodnotami NOAEL a LOAEL je znázorněna na obrázku 4 [10], [16], [17].



Obrázek 4 – Závislost účinku na dávce [16]

## **Chronické testy**

Při chronických testech jsou zvířata testované látky vystavena dlouhou dobu. Musí to být alespoň 3 měsíce, ale často jsou vystavena po celou dobu svého dospělého života. Látka se zvířatům podává pravidelně a sledují se změny na zvířatech, jako například úbytek hmotnosti, vypadávání srsti, snížení porodnosti a samozřejmě jejich mortalita. Zjišťují se informace o dlouhodobém působení látek na organismus. Výsledkem jsou, stejně jako u subchronických testů, hodnoty LOAEL a NOAEL [17], [18], [19].

### 3.3.2 Rozdělení podle prostředí

#### **Akvatické testy**

Tyto testy se používají pro hodnocení vlivu testované látky ve vodním prostředí. Jsou to nejrozšířenější testy ekotoxicity, používají se pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů ze skládky či povrchových a podzemních vod. Akvatické biotesty byly první testy, které byly použity pro hodnocení ekotoxicity. Akvatické testy můžeme dále rozdělit například podle uspořádání na statické, statické s obměnou média neboli semistatické, necirkulační a průtočné.

Při statických akvatických testech nedochází k výměně roztoků, a proto jsou zde možné změny koncentrací a kyslíku. Při statických testech s obměnou média se tato obměna provádí v definovaných časech, například jednou za 24 hodin [10], [11].

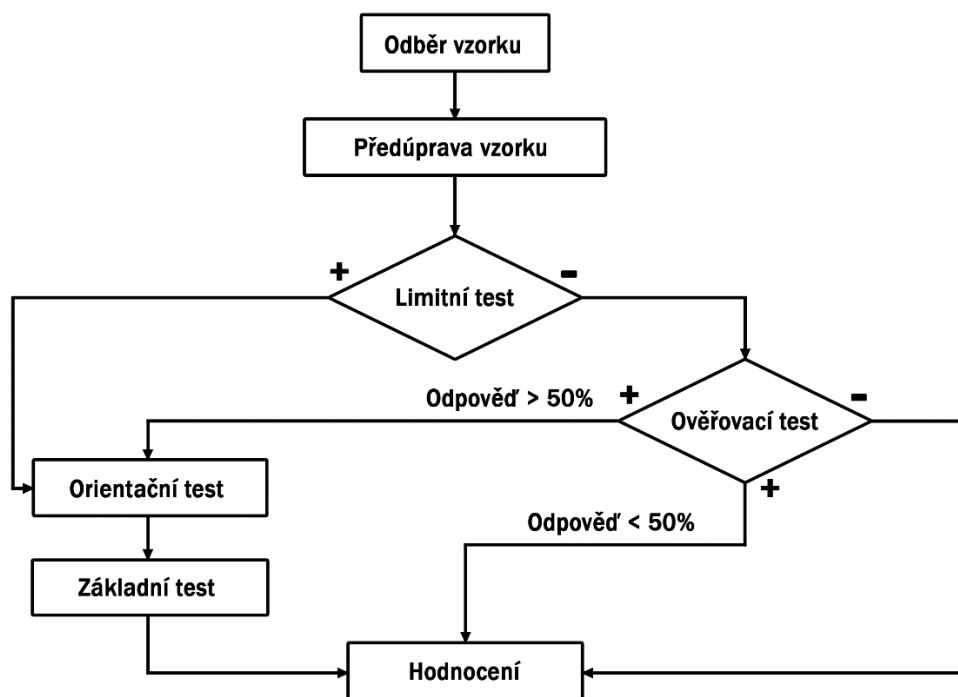
#### **Terestrické testy**

Tyto testy hodnotí škodlivé vlivy látek na suchozemské organismy. Tyto testy se mohou aplikovat v půdách či sedimentech, působením ze vzduchu či dávkováním do potravy. Jsou vhodné i pro látky které jsou hydrofobní nebo se ve vodě špatně rozpouští [10], [11].



### 3.4 Obecný postup při testování

Doporučený postup při ekotoxikologickém testování je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 5 – Doporučený sled ekotoxikologických testů [10]

#### Odběr vzorku

Pokud se vzorek odebírá z prostředí, tak musí odběr proběhnout podle postupů popsanych v normách ČSN.

#### Předúprava vzorku

Vzorek se upravuje proto, aby byl biotest snadněji proveditelný. Způsob předúpravy se volí s ohledem na stanovovanou látku, protože tím můžeme ovlivnit výsledek testu. Používá se například tepelná úprava, změna pH nebo probublávání vzduchem, čímž se odstraňuje přebytečný chlór a zabezpečuje dostatečný obsah kyslíku.

#### Limitní (předběžný) test

V tomto testu máme vzorek o neznámé toxicitě, který podrobíme první zkoušce s testovacími organismy. Test se provádí při koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Používají se dvě paralelní nasazení se dvěma kontrolami. Zjišťujeme reakci testovacích organismů, zda látka vykazuje toxické účinky. Pokud ne, tedy pokud nedojdu k úhynu žádného organismu, test hodnotíme jako negativní a zahájíme ověřovací test. Ale když k úhynu dojde, tak provedeme předběžný test.

### **Ověřovací test**

Po negativním výsledku předběžného testu následuje test ověřovací, pomocí kterého ověříme negativní výsledek. Ověřuje se v 6 paralelních nasazeních. Nebude-li úhyn větší než 10 % oproti kontrole, je výsledek hodnocen jako negativní a další testování se neprovádí. V opačném případě je výsledek pozitivní. Další postup záleží na tom, zda byl úhyn větší či menší než 50 %. Pokud byla mortalita nižší než 50 %, tak se výsledek zaznamená do protokolu a další testy se neprovádí. Je-li úhyn vyšší než 50 %, pokračujeme orientačním testem.

### **Orientační (předběžný) test**

Účelem tohoto testu je určení rozmezí koncentrací, ve kterém lze očekávat hodnotu  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $LC_{50}$ ) testované látky. Používá se zde zpravidla 10 koncentrací vodného výluhu, volených v širokém rozpětí, ale s malým počtem testovacích organismů v každé koncentraci. Dalším cílem je zjištění hodnot NOAEL a LOAEL. Na základě výsledku se volí koncentrace pro test základní.

### **Základní test**

Tento test slouží k vlastnímu určení hodnoty  $EC_{50}$  ( $LC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ). Test se skládá zpravidla ze sedmi různých koncentrací v rozmezí stanoveném orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2-3 paralelní stanovení. Po 24, 48 nebo 72 hodinách se odečítá počet uhynulých nebo imobilizovaných organismů. Ze zjištěných údajů se potom vypočítá hodnota  $EC_{50}$ . Na počátku i konci testu se zapisuje teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnota pH v každé testované koncentraci.

### Volba ředící řady

Kvalitní výsledek ekotoxikologického biotestu záleží na správné volbě koncentrační řady (obrázek 6). Ze statistického hlediska je třeba, aby se dodržely určité zásady přípravy ředící koncentrační řady. Jde o to, aby byla získaná data přijatelná pro výpočet toxikologických indexů. Testované koncentrace by měly zahrnovat letální i takovou koncentraci, při které nejsou viditelné žádné toxické účinky. Ideální koncentrační řada by měla mít jednu koncentraci blízkou  $EC_{50}$  a ostatní koncentrace symetricky rozmístěné kolem této hodnoty. Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěná orientačním testem. Obvykle se testuje alespoň pět koncentrací. Pokud použijeme méně, je třeba toto rozhodnutí odůvodnit.

Ředící řada by měla být geometrická, zpravidla s koeficientem ředění od 10 do 2. Každá koncentrace by měla být  $k$ -krát větší než ta předchozí. Koeficient  $k$  se vypočítá pomocí vzorce 1,

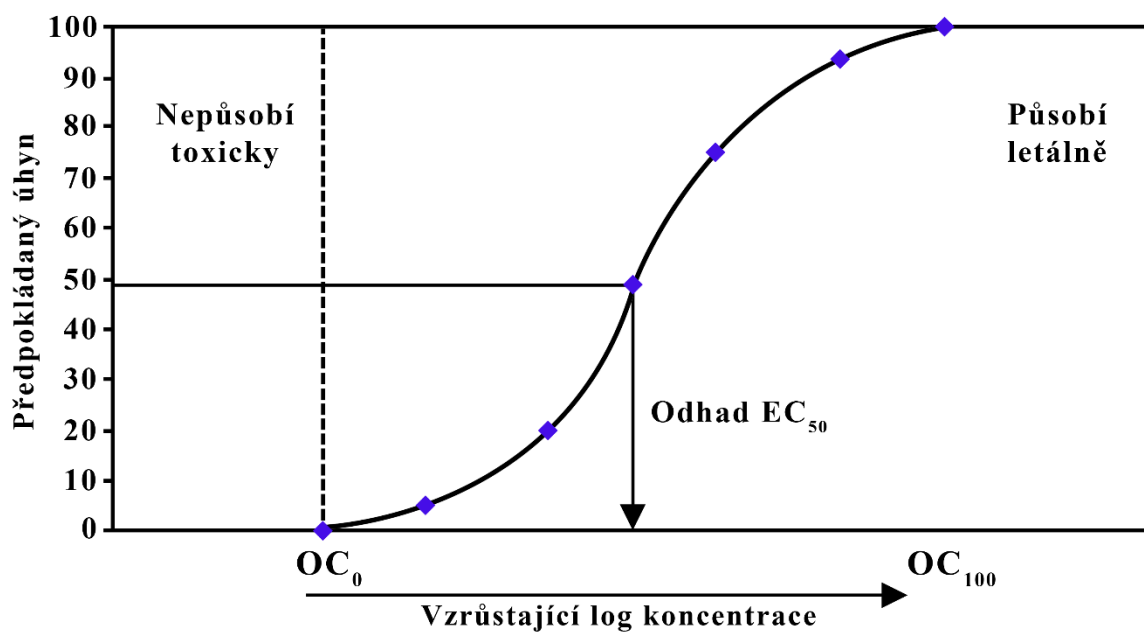
$$\log k = \frac{\log \frac{OC_0}{OC_{100}}}{n-1} \quad (1)$$

kde:

$n$  – počet měření

$OC_0$  – nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů

$OC_{100}$  – nejnižší koncentrace, která již působí letálně [10], [20], [21]



**Obrázek 6** – Způsob volby testovaných koncentrací v intervalu  $OC_0$  až  $OC_{100}$  [20]

## 4 REAKTIVNÍ AZOBARVIVA

Azobarviva jsou organické sloučeniny, jejichž charakteristickým znakem je přítomnost jedné a více azoskupin ( $-N=N-$ ), které jsou většinou navázány na benzenové jádro. Azosloučeniny jsou syntetické látky, tudíž se v přírodě nevyskytují. Reaktivní azobarviva se nazývají reaktivními proto, že chemicky reagují s vláknem a mezi chromoforem (částicí odpovědnou za absorpci záření, tedy způsobující barevnost) a vláknem vznikne kovalentní vazba. Tato vazba je velmi pevná, proto jsou tato barviva velmi stálá a odolná. V současné době se těší čím dál, tím větší oblibě, a to nejen díky nízké ceně. Vrací se zpět na trh z ekologických a zdravotních důvodů, protože kovokomplexní barviva obsahující  $Co^{2+}$  a  $Cr^{3+}$  jsou postupně zakazována z důvodů své toxicity [22], [23].

## 5 TESTOVANÁ LÁTKA – REACTIVE YELLOW 85

Testovanou látkou je Ostazinová žluť (Reactive Yellow 85), která je zařazena do chemické třídy reaktivních azobarviv (tabulka 3).

Jedná se o žlutý prášek se složením:

- Reactive Yellow ..... 90,0 % (w/w)
- NaCl ..... 10,0 % (w/w)

### Český název

Ostazinová žluť H-8G

### Jméno dle IUPAC (v původním jazyce)

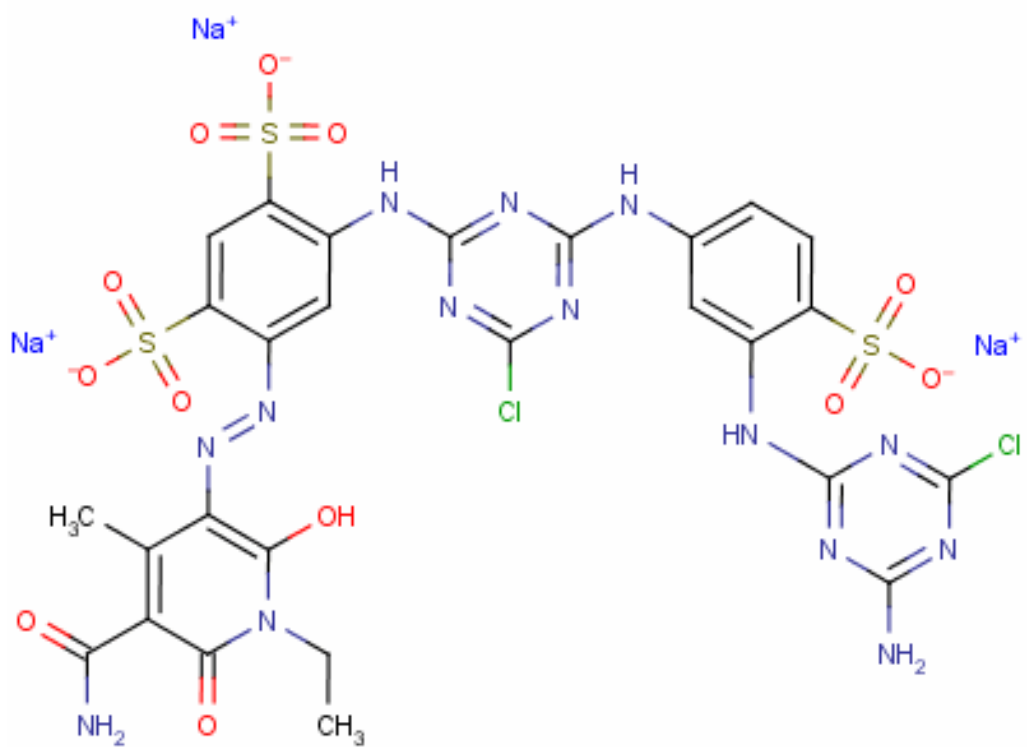
Trisodium 4-{{4-({3-[(4-amino-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-4-sulfonatophenyl}amino)-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-6-[(5-carbamoyl-1-ethyl-2-hydroxy-4-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridin-3-yl)diazenyl]benzene-1,3-disulfonate

### Jméno dle CAS:

1,3-Benzenedisulfonic acid, 4-[[5-(aminocarbonyl)-1-ethyl-1,6-dihydro-2-hydroxy-4-methyl-6-oxo-3-pyridinyl]azo]-6-[[4-[[3-[(4-amino-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-4-sulfophenyl]amino]-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-trisodium salt [24].

Tabulka 3 – Vybrané charakteristiky Reactive Yellow 85 [24]

<b>Sumární vzorec</b>	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>14</sub> O <sub>12</sub> S <sub>3</sub> ·3Na
<b>Číslo CAS</b>	68110-27-0
<b>Číslo EC</b>	268-516-0
<b>Molekulová hmotnost</b>	969,623 g/mol



**Obrázek 7** – Strukturní vzorec Reactive Yellow 85 [25]

## 6 VALIDACE TESTOVACÍ METODY

Podle definice je validace získání důkazu ve formě dokumentace, který poskytuje vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci neboli proces při kterém se určuje vhodnost použití daného systému pro získání relevantních dat. Validací zvyšujeme správnost výsledků.

Pro účely ekotoxikologického testování zjistíme, zda množství látky, které jsme rozpustili odpovídá koncentraci, kterou požadujeme. To zjistíme analýzou na HPLC (obrázek 8) neboli kapalinovém chromatografu porovnáním se standardy. Standardy jsou látky, které mají přesně danou koncentraci. Před samotným zahájením testování se připraví zkušební médium či voda s rozpuštěnou látkou (obrázek 9). Zjišťuje se, zda je látka stálá a nemění svou koncentraci v roztocích. To by totiž ovlivnilo výslednou toxicitu.



**Obrázek 8** – Vialky do kapalinového chromatografu [26]



**Obrázek 9** – Koncentrační řada a standardy k validaci [26]

Na závěr se vypracuje validační protokol, do kterého se zaznamenávají nejen zjištěné hodnoty validačních parametrů, ale také základní údaje o analytické metodě, seznam použitých chemikálií, vzorků a standardů a seznam přístrojů. Validační protokol by měl obsahovat požadavky na vyhovující rozmezí výsledných hodnot, výsledné hodnoty získané při měření a shrnutí, zda výsledek vyhovuje či nevyhovuje. Na základě tohoto protokolu se zahájí ekotoxikologické testování.



## 7 ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNÍ

Zkušební metoda nařízení komise ES č. 440/2008 je ekvivalentní testu OECD č. 202 „*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test“ z roku 2004. Je v ní popsána zkouška akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na dafnie. Cílem je stanovit hodnotu  $EC_{50}$  po 48 hodinách.

Důležitými definicemi v této zkoušce jsou  $EC_{50}$  a imobilizace:

**$EC_{50}$**  – koncentrace odhadnutá pro imobilizaci 50 % dafnií během stanovené expoziční doby

**Imobilizace** – dafnie neschopné plavat do 15 sekund po mírném zamíchání zkušební nádoby jsou pokládány za imobilizované (a to, i když stále ještě mohou hýbat tykadly).

Před začátkem testu musíme znát rozpustnost ve vodě a tenzi par zkoušené látky. Dále pak spolehlivou analytickou metodu ke stanovení koncentrace dotyčné látky ve zkoušeném roztoku. Tím se zabývá validace.

### 7.1 Před testem

#### 7.1.1 Referenční látky

Jako referenční látky se používají doporučené toxické látky, běžně používané v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách. Testujeme tím, zda jsou zkušební podmínky spolehlivé. K porovnávání se používá hodnota  $EC_{50}$ . Jako referenční látka se používá například dichroman draselný  $K_2Cr_2O_7$ , u kterého udává norma ISO 6341 hodnotu  $EC_{50}$  – 24 hodin v rozmezí 0,6 mg/l až 1,7 mg/l.

#### 7.1.2 Kritéria jakosti

Platnost testu je podmíněna splněním následujících kritérií:

- při kontrolách, včetně kontroly se solubilizačním činidlem, nesmí být imobilizováno (vykazovat známky stresu jako například odbarvení nebo neobvyklé chování) více než 10 % dafnií
- koncentrace rozpuštěného kyslíku po ukončení testu musí být  $\geq 3$  mg/l v kontrolní i ve zkušební nádobě.

## 7.2 Vybavení

### 7.2.1 Aparatura

Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkoušenými roztoky, by měla být zhotovena ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Jako zkušební nádoby se používají běžně dostupné skleněné zkumavky či kádinky. Zkušební nádoby se překrývají, aby se snížily ztráty vody odparem a kvůli předcházení vnikání prachu do roztoků. Dalšími použitými zařízeními jsou kyslíková sonda, pH-metr (obrázek 10), termostat, vybavení pro stanovení koncentrace celkového organického uhlíku (TOC), vybavení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK), vybavení pro stanovení tvrdosti atd.



Obrázek 10 – Kyslíková sonda a pH metr [26]

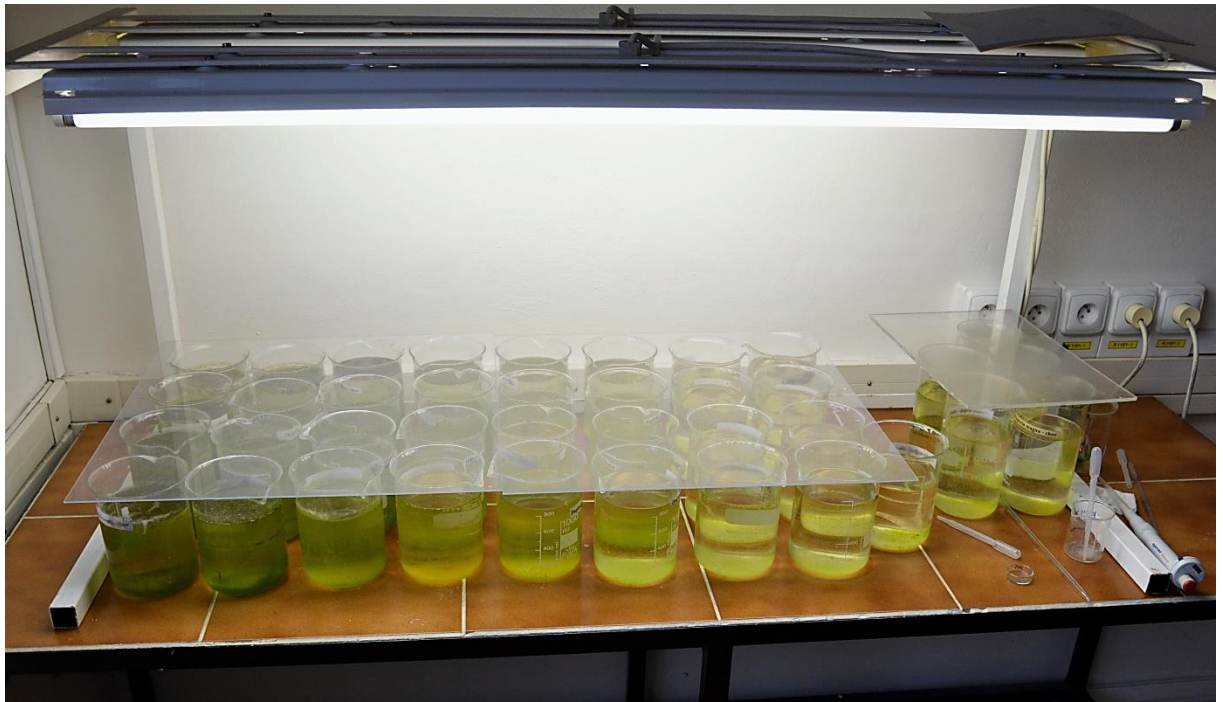
### 7.2.2 Zkušební organismy

Preferovaným zkušebním druhem je *Daphnia magna Straus* (obrázek 11). Na začátku zkoušky by dafnie měly být méně než 24 hodin staré a ke snížení rozptylu je silně doporučeno nepoužívat první generaci potomků. Dafnie by měly pocházet ze zdravého matečného rodu (tj. bez příznaků stresu, jako jsou například vysoká úmrtnost či přítomnost samců). Všechny organismy použité konkrétní zkoušky by měly pocházet z kultur vypěstovaných ze stejného matečného rodu

(obrázek 12). Tento rod dafnií musí být chován v kultivačních podmínkách (světlo, teplota, médium) podobných podmínkám v použité zkoušce. Má-li být kultivační médium dafnií použité ve zkoušce odlišné od rutinního kultivačního média dafnií, je správnou praxí zařadit předzkouškové aklimatizační období. K tomuto účelu by generace dafnií měla být chována ve zřed'ovací vodě při teplotě zkoušky, a to nejméně 48 hodin před začátkem zkoušky [27].



**Obrázek 11** - Porovnání dospělé dafnie a dafnie použité k testování [26]



Obrázek 12 – Chov dafnií [26]

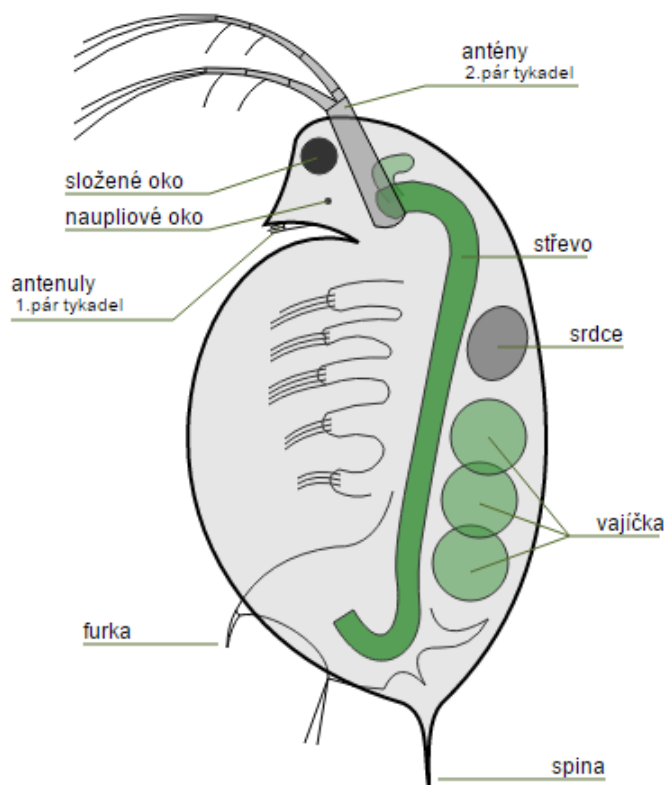
### 7.2.3 Hrotnatka velká *Daphnia magna* Straus

<b>Říše</b>	živočichové ( <i>Animalia</i> )
<b>Kmen</b>	členovci ( <i>Arthropoda</i> )
<b>Podkmen</b>	korýši ( <i>Crustacea</i> )
<b>Třída</b>	lupenonožci ( <i>Branchiopoda</i> )
<b>Podtřída</b>	<i>Phyllopoda</i>
<b>Nadřád</b>	<i>Diplostraca</i>
<b>Řád</b>	perloočky ( <i>Cladocera</i> )

Dafnie jsou druhem vodních korýšů, který žije ve sladkých a brakických (do 8 ppt salinity) vodách. Ideální teplota je v mezi 18-22 °C. U nás jsou jejím typickým stanovištěm silně eutrofní rybníky.

Velikost dafnií se pohybuje v rozmezí 2 až 5 mm a tvarem připomínají ledviny (obrázek 13). Tělo mají chráněno chitinovým krunýřem. Krunýř je průsvitný a díky tomu se „zbarvuje“ podle druhu potravy. Mají dva páry rozvětvených tykadel, menší z nich slouží jako smyslový orgán a větší k pohybu. Dále mají šest párů hrudních nohou, které slouží k filtrování potravy. Na hlavě mají jedno velké složené oko z 22 omatidií (jednotlivá, navzájem si podobná očka, která

samostatně vnímají obraz), které se jeví jako černá skvrna a dále jedno menší oko. Dýchají celým tělem. Cévní soustavu tvoří jednoduché srdce s kruhovitou svalovinou (tep 200-250 x/min) v čelistním článku hřbetní části těla. Hemolymfa je bezbarvá, cévní soustava otevřená. Samci jsou menší než samice, ale mají delší tykadla a hákovité nohy, které používají při páření.



**Obrázek 13** – Anatomické schéma dafnie [28]

U dafnií se střídá pohlavní rozmnožování a partenogeneze (nepohlavní rozmnožování). Toto střídání se nazývá heterogonie. Za příznivých podmínek (v létě) se samice množí jen partenogenezí a tvoří také jen samice. Na podzim se z neoplozených vajíček líhnou i samci, kteří brzy oplodní mladé samice. V zimě se líhnou zimní vajíčka, uzavřená v párech v sedélku (schránce z chitinu). Ehippia jsou typem trvalých vajíček. Vydrží sucho i mráz. Vývoj je přímý. Samice dafnií jsou pohlavně zralé po 6-10 dnech [29].

#### 7.2.4 Zásobní voda a zředovací voda

Jako zásobní a zředovací vodu můžeme použít přírodní vodu (povrchovou nebo podzemní), rekonstituovanou vodu či odchlorovanou vodovodní vodu, pokud v ní dafnie přežijí po dobu kultivace, aklimatizace a zkoušení bez známek stresu. Jako zkušební vodu musíme použít

takovou vodu, která vyhovuje chemickým vlastnostem přijatelných zředovacích vod uvedených v tabulce 4.

**Tabulka 4** – Některé chemické charakteristiky přijatelné zředovací vody [27]

Látka	Koncentrace
Hmotné částice (prach)	<20 mg/l
Celkový organický uhlík	<2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	<1 µg/l
Zbytkový chlor	<10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	<50 ng/l
Celkové organické chlorované pesticidy a polychlorované bifenyly	<50 ng/l
Celkový organicky vázaný chlor	<25 ng/l

Zředovací voda by měla mít stálou jakost po celou dobu testu. Rekonstituovaná voda může být připravena tak, že přidáme látky o uznané analytické čistotě k deionizované nebo destilované vodě. Příklady rekonstituované vody jsou uvedeny v tabulce 5 nebo je můžeme nalézt v metodě OECD č. 211. Důležité je, aby média obsahující známá chelatační činidla byla vyloučena ze zkoušení látek obsahujících kovy.

Hodnota pH vody by měla být v rozmezí 6 až 9 a doporučenou tvrdost vody mezi 140 a 250 mg/l. Zředovací voda může být před zkouškou provzdušňována tak, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku dosáhla koncentrace nasycení.

**Tabulka 5** – Příklady vhodné rekonstituované zkušební vody – Zkušební voda ISO [27]

Zásobní roztok (jednotlivé látky)		Objem zásobního roztoku přidaného k 1 litru vody
Látka	Navážka přidaná k 1 litru vody	
Chlorid vápenatý $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,76 g	25 ml
Síran hořečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,93 g	25 ml
Hydrogenuhličitan sodný $\text{NaHCO}_3$	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

Při použití přírodní vody se parametry jakosti měří alespoň dvakrát ročně a stanovuje se obsah těžkých kovů. Použijeme-li odchlorovanou vodovodní vodu, je žádoucí každodenní analýza chloru. Pochází-li zředovací voda ze zdrojů povrchových nebo podzemních vod, měla by být stanovena vodivost a celkový organický uhlík (TOC) nebo chemická spotřeba kyslíku (CHSK).

Používá se voda vhodné čistoty, např. deionizovaná, destilovaná nebo čištěná reverzní osmózou s vodivostí nepřesahující  $10 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ .

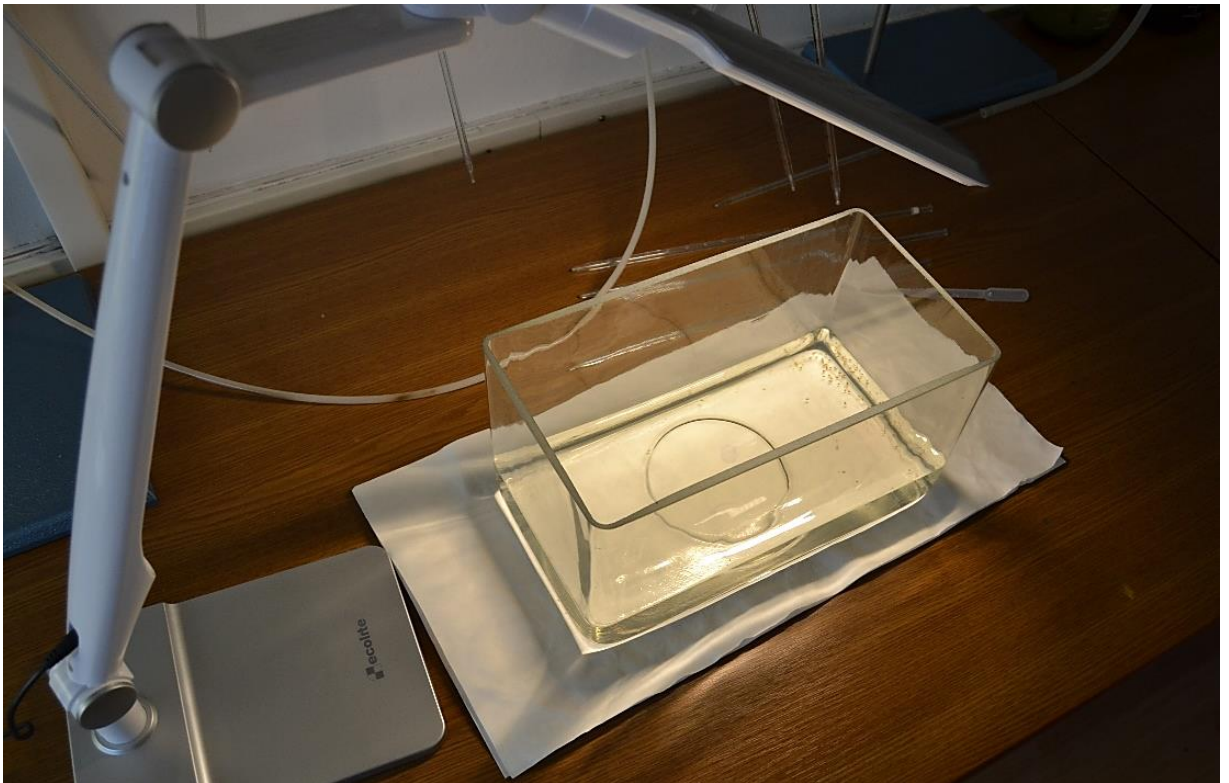
#### 7.2.5 Zkoušené roztoky – roztoky obsahující testovanou látku

Zkoušené roztoky jsou připraveny ředěním zásobního roztoku podle předem určené koncentrační řady. Zásobní roztoky by měly být připraveny rozpuštěním zkoušené látky ve zředovací vodě. Použití rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel by mělo být vyloučeno, ale v některých případech jsou tato činidla nutná. V žádném případě by koncentrace zkoušené látky ve zkoušených roztocích neměla překročit rozpustnost ve zředovací vodě.

Zkouška by měla být provedena bez úpravy pH. Nezůstane-li pH v rozmezí 6–9, lze provést druhou zkoušku s upraveným pH zásobního roztoku na hodnotu pH zředovací vody před přidáním zkoušené látky. Hodnota pH zásobního roztoku by měla být upravena tak, aby se koncentrace zásobního roztoku významně nezměnila a aby nedošlo k žádné chemické reakci se zkoušenou látkou nebo k jejímu vysrážení. Upřednostněny jsou HCl a NaOH.

### 7.3 Popis metody

Dafnie s vajíčky jsou přeloveny 48 hodin před začátkem testování do deionizované vody kvůli aklimatizaci (obrázek 14). Po uplynutí této doby jsou zkušební nádoby naplněny vhodným objemem zředovací vody a roztoku zkoušené látky. Poté jsou do zkušební nádoby vneseny dafnie. Pro každou zkoušenou koncentraci a pro kontrolu by mělo být použito minimálně 20 organismů. Podmínkou je, aby vycházelo 2 ml zkoušeného roztoku pro každou dafnii, což znamená pro 20 organismů minimálně 40 ml zkoušeného roztoku.



**Obrázek 14** – Aklimatizace dafnií [26]

Používá se minimálně pět zkušebních koncentrací. Ty by měly tvořit geometrickou řadu s dělicím faktorem nepřesahujícím 2,2 (obrázek 15). Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla přednostně vést ke 100 % imobilizaci, a nejnižší zkoušená koncentrace by neměla mít žádné pozorovatelné účinky.

Doba trvání zkoušky je 48 hodin. V každé zkušební nádobě by měl být zkontrolován počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách po zahájení zkoušky. Kromě imobilizace by mělo být uvedeno jakékoli nestandardní chování nebo vzhled.





Obrázek 15 – Koncentrační řada [26]

### 7.3.1 Kontrola deionizované vody

V této vodě měří konduktivita, teplota a pH. Zjištěné údaje se zaznamenávají do protokolu. Z deionizované vody se připravuje voda zředovací.

### 7.3.2 Kontrola zředovací vody

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH se měří na začátku a konci zkoušky. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v kontrolách by měla odpovídat kritériím jakosti. Hodnota pH by se neměla v žádné zkoušce změnit o více než 1,5 jednotky. Teplota je obvykle měřena v kontrolních nádobách nebo v okolním ovzduší a měla by být zaznamenávána po celou dobu zkoušky.

Dále se v této vodě měří obsah Ca a Mg pomocí titrace  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Koncentrace zkoušené látky by se měla měřit alespoň při nejvyšší a nejnižší zkoušené koncentraci na počátku zkoušky a při jejím ukončení. Pokud lze dokázat, že se koncentrace látky nezmění o  $\pm 20\%$  ze jmenovité či počáteční naměřené koncentrace, lze na nich zakládat výsledky.

### 7.3.3 Inkubační podmínky

Teplota by měla být v rozmezí 18 °C až 22 °C a měla by být konstantní, tolerovaný výkyv je  $\pm 1$  °C. Doporučuje se cyklus s 16 hodinami světla a 8 hodinami temna. Úplná tma je rovněž přijatelná, zejména pro zkoušené látky, které jsou nestabilní na světle.

Zkušební nádoby (obrázek 16) se nesmí během testu provzdušňovat a nesmí se upravovat pH. Během zkoušky se dafnie nekrmí.



Obrázek 16 – Zkušební nádoby [26]

## 7.4 Vyhodnocení

Údaje by měly být shrnuty v tabulkách, uvádějících pro každou exponovanou skupinu a kontrolu počet použitých a z toho imobilizovaných dafnií pro všechna pozorování. Procentní podíl imobilizovaných dafnií za 24 hodin a za 48 hodin je vyneseno proti zkoušeným koncentracím. Údaje jsou analyzovány vhodnými statistickými metodami (např. probit analýzou atd.), k výpočtu směrnice dotyčné křivky dávka – odezva a hodnot  $EC_{50}$  s 95 % intervalem spolehlivosti ( $p = 0,05$ ).

Nelze-li ze získaných údajů vypočítat EC<sub>50</sub> standardními metodami, měla by být hodnota EC<sub>50</sub> aproximována jako geometrická střední hodnota z nejvyšší koncentrace nezpůsobující žádnou imobilizaci a nejnižší koncentrace způsobující 100 % imobilitu.

#### 7.4.1 Zkušební protokol

Zkušební protokol obsahuje:

- údaje o zkoušené látce, její fyzikálně-chemické vlastnosti, chemické identifikační údaje
- typ a zdroj zkušebního organismu
- popis zkušebních podmínek, typ nádoby, objem roztoku, počty dafnií v nádobě
- metodu přípravy zásobních a zkoušených roztoků a jejich koncentrace včetně rozpouštědel a dispergačních činidel
- podrobné údaje o zřed'ovací vodě, zdroj a charakteristiky jakosti
- popis inkubačních podmínek, teplotu, intenzitu a periodicitu světla, koncentraci rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH

#### 7.4.2 Výsledky

Výsledkem zkoušky je počet a procentní podíl imobilizovaných dafnií nebo dafnií vykazujících nepříznivé účinky (včetně nestandardního chování) v kontrolách a v každé exponované skupině, v každém pozorovacím čase a popis povahy pozorovaných účinků [27].

## 8 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC

Zkušební metoda nařízení komise ES č. 440/2008 je ekvivalentní testu OECD č. 201 „Freshwater *Alga* and *Cyanobacteria*, Growth Inhibition Test“ z roku 2006. Je v ní popsána zkouška akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na řasy a sinice. Tento test trvá 72 hodin. Pokud se splní kritéria validity, může trvat i kratší dobu. Navzdory relativně krátké době trvání zkoušky lze posoudit účinky na několik generací. Cílem je zjistit odezvu řasové kultury na účinek testované látky, která se projeví jako inhibice, tedy snížení růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním kulturám rostoucím za stejných podmínek.

Tato zkušební metoda je nejlépe použitelná pro látky rozpustné ve vodě, které se za podmínek zkoušky nemění. Pokud bude zkoušená látka například těkavá, špatně rozpustná či silně adsorbující, tak je možné provést úpravy postupu zkoušení (např. uzavřený systém, klimatizace zkušebních nádob).

Důležité definice v rámci této zkoušky:

**Biomasa** – suchá hmotnost živé hmoty přítomné v populaci vyjádřená ve vztahu k danému objemu.

Obvykle se definuje jako hmota, ale v rámci této zkoušky se toto označení používá pro hmotu vztahenou na objem. V této zkoušce se obvykle měří náhrada biomasy, jako například počet buněk či fluorescence a používání termínu „biomasa“ tedy odkazuje na tyto náhradní míry.

**Variační koeficient** – bezrozměrná veličina proměnlivosti parametru, definovaná jako poměr směrodatné odchylky a střední hodnoty; lze vyjádřit i procenty.

**EC<sub>x</sub>** – koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x% snížení růstu testovacího organismu.

**Růstové médium** – úplné syntetické kultivační médium, v němž rostou zkušební řasy při expozici zkoušené látce, která je v médiu rozpuštěna.

**Růstová rychlost** (průměrná specifická růstová rychlost) – logaritmické zvýšení biomasy během období expozice.

**Proměnná odezvy** – proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených parametrů, jež popisují biomasu různými metodami výpočtu.

U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují přímo z měření biomasy nebo jakékoliv z uvedených náhrad.

**Specifická růstová rychlost** – proměnná odezvy definovaná jako kvocient rozdílu přirozených logaritmů sledovaného parametru (v této zkušební metodě je jím biomasa) a příslušného časového období.

**Výtěžek** – hodnota proměnné měření na konci expoziční doby minus hodnota proměnné měření na počátku expoziční doby pro vyjádření nárůstu biomasy během zkoušky.

## 8.1 Před testem

Měli bychom znát například strukturní vzorec zkoušené látky, její čistotu, stálost na světle, pK, rozpustnost, tenzi par či rozdělovací koeficient oktanol/voda  $P_{O/V}$ .

### 8.1.1 Referenční látka

Jako kontrolu zkušebního postupu lze testovat referenční látku. Používá se například 3,5-dichlorfenol či  $K_2Cr_2O_7$ , který se hodí jako referenční látka pro zelené řasy. Je třeba referenční látky testovat alespoň dvakrát ročně.

## 8.2 Aparatura

Zkušební nádoby a jiné přístroje a pomůcky jsou celoskleněné nebo z chemicky inertního materiálu. Jsou vyčištěné tak, aby zbytky jak anorganických, tak organických nečistot nerušily růst řas a kvalitu média. Zkušebními nádobami jsou skleněné baňky vhodných rozměrů, které umožňují přenos  $CO_2$  z atmosféry.

Dále je třeba mít k dispozici kultivační zařízení, což je místnost nebo komora, kde lze udržovat zvolenou inkubační teplotu na  $\pm 2$  °C.

Samozřejmě je potřebný přístroj na měření světla, protože metoda měření a typ snímače ovlivňuje naměřenou hodnotu. Je doporučen kulový ( $4\pi$ ) snímač (reaguje na přímé a odražené světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření), nebo  $2\pi$  snímač (reaguje na světlo ze všech úhlů nad rovinou měření).

Poslední potřebnou věcí je zařízení pro stanovení biomasy řas. Používá se elektronický počítač částic, mikroskop s počítačací komůrkou či průtokový cytometr. Pomocí těchto zařízení se měří

počet buněk, jako náhradní parametr pro biomasu čas. Další náhrady biomasy lze měřit také pomocí fluorimetru, spektrofotometru či kolorimetru [27].

### 8.3 Testovací organismy

Na základě uvedeného postupu lze použít několik druhů nevázaných mikrořas a sinic. Vhodné kmeny zelených řas jsou například *Pseudokirchneriella subcapitata* či *Desmodesmus subspicatus* (obrázek 17) a ze sinic *Anabaena flos-aquae* nebo *Synechococcus leopoliensis*.

V našem případě byla jako testovací organismus použita zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* Brinkmann 1953/SAG 86.8 ze sbírky autotrofních organismů CCALA Třeboň.

#### 8.3.1 *Desmodesmus subspicatus*

<b>Říše</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Kmen</b>	Plantae
<b>Oddělení</b>	Chlorophyta (Zelené řasy)
<b>Třída</b>	Chlorophyceae
<b>Řád</b>	Chlorococcales (Zelenivkovité)
<b>Čeleď</b>	Scenedesmaceae
<b>Rod</b>	<i>Desmodesmus subspicatus</i>



Obrázek 17 – *Desmodesmus subspicatus* [30]

Je to velice variabilní, kosmopolitní rod, žijící v nejrůznějších vodních biotopech, zvláště ve vodách saprofobních. Je důležitým zdrojem potravy pro zooplankton a ryby, a právě proto je *Desmodesmus* užitečným bioindikátorem vodních ploch [31].

## 8.4 Příprava roztoků a kultury řas

### 8.4.1 Růstové médium

Pro tento test lze použít dvě alternativní růstová média, médium OECD a EPA AAP.

Složení těchto médií je uvedeno v tabulce 6. Při přípravě médií je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu. Je třeba dát pozor na to, že počáteční hodnota pH a kapacita pufru (regulující zvýšení pH) těchto dvou médií jsou odlišné. Proto mohou být výsledky zkoušek odlišné v závislosti na použitém médiu, zejména při zkoušení ionizujících látek. Pro některé látky se může složení změnit, například když se testují kovy či chelatotvorná činidla. Všechny úpravy musí být zapsány a zdůvodněny.

Pro výpočet pH média je třeba znát parciální tlak  $\text{CO}_2$  a molární koncentraci hydrogenuhličitanu, protože pH se vypočítá z rovnováhy uhličitanového systému a parciálního tlaku  $\text{CO}_2$  (vzorec 2). Přibližný vztah mezi pH při 25 °C a molární koncentrací hydrogenuhličitanu je vyjádřen:

$$pH_{rovn} = 11,30 + \log(\text{HCO}_3) \quad (2)$$

**Tabulka 6** – Složení růstových médií [27]

Složka	EPA	OECD
	[mg/l]	[mg/l]
NaHCO <sub>3</sub>	15	50
NaNO <sub>3</sub>	25,5	---
NH <sub>4</sub> Cl	---	15
MgCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	12,16	12
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,41	18
MgSO <sub>4</sub>	14,6	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,044	---
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	---	1,6
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,16	0,0640
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0,3	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186	1,185
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,415	0,415
ZnCl <sub>2</sub>	0,00327	0,003
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,0143	0,0150
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0726	0,007
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,000012	0,00001
pH	7,5	8,1

#### 8.4.2 Počáteční koncentrace biomasy

Počáteční koncentrace biomasy musí být dostatečně nízká, aby umožňovala exponenciální růst po celou inkubační dobu bez rizika vyčerpání živin a stejná ve všech kulturách. Počáteční koncentrace biomasy by neměla překročit 0,5 mg/l hmotnosti v suchém stavu.

#### 8.4.3 Koncentrace zkoušené látky

Rozpětí koncentrací lze určit na základě výsledků orientačních zkoušek. Pro závěrečnou definitivní zkoušku je zapotřebí vybrat alespoň pět koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2. U některých lze použít faktor vyšší. Koncentrační řada by měla nejlépe pokrýt rozmezí způsobující 5-75% inhibici růstové rychlosti řas.

#### 8.4.4 Příprava očkovací kultury

K přizpůsobení řas na podmínky zkoušky a zajištění toho, aby byly v exponenciální růstové fázi, když se použijí pro naočkování zkušebních roztoků, se očkovací kultura připravuje ve



zkušebnímu médiu 2 až 4 dny před zahájením zkoušky. Je třeba jejich biomasu upravit tak, aby v očkovací kultuře převážil po zahájení zkoušky exponenciální růst. Očkovací kultura se musí inkubovat za stejných podmínek jako zkušební kultury. Nárůst biomasy se měří, aby bylo zajištěno, že je růst v rámci normálního rozmezí.

#### 8.4.5 Příprava zkušebních roztoků

Všechny zkušební roztoky musí obsahovat stejné koncentrace růstového média a počáteční biomasy zkušebních řas. Zkušební roztoky zvolených koncentrací se obvykle připravují smísením zásobního roztoku zkoušené látky s růstovým médiem a očkovací kulturou. Zásobní roztoky se připravují rozpuštěním látky ve zkušebním médiu.

Jako nosiče pro přidávání látek o nízké rozpustnosti ve vodě do zkušebního média mohou být použita rozpouštědla, např. aceton, 2-methylpropan-2-ol či dimethylformamid. Koncentrace rozpouštědla by neměla překročit 100  $\mu\text{l/l}$  a do všech kultur (včetně kontrol) ve zkušební řadě by měla být přidána stejná koncentrace rozpouštědla.

### 8.5 Průběh zkoušky

Kromě měření biomasy je třeba ověřování normálního a zdravého vzhledu očkovací kultury a sledování jakéhokoliv abnormálního vzhledu řas.

#### 8.5.1 Podmínky inkubace

Zkušební nádoby se zakryjí zátkami, které propouští vzduch (obrázek 18). Protřepou se a umístí do kultivačního zařízení. Během zkoušky je nezbytné udržovat řasy v suspenzi nepřetržitým třepáním či mícháním a tím umožnit přenos  $\text{CO}_2$ . Kultury se udržují při teplotě 21-24  $^{\circ}\text{C}$  s přesností na  $\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ . Doporučuje se umísťovat baňky náhodně a denně je v inkubátoru přemísťovat. Hodnota pH kontrolního média by neměla vzrůst o více než 1,5.

#### **Světelné podmínky**

Povrch, kde jsou kultury inkubovány, by měl být trvale osvětlen jednotným fluorescenčním světlem, např. „chladným bílým“ nebo „denním“ světlem. Jednotlivé kmeny řas a sinic mají různé požadavky na osvětlení. Intenzita světla by měla být zvolena tak, aby vyhovovala použitému testovacímu organismu. Pro doporučené druhy zelených řas se intenzita světla na úrovni zkušebních roztoků volí v rozmezí 60-120  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  neboli 4440-8880 luxů pro chladné

bílé světlo, přičemž se měří ve fotosynteticky efektivním rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm pomocí vhodného snímače.

Výjimky tvoří druhy, které rostou při nižších intenzitách osvětlení a ty vyšší je mohou poškodit. Další výjimkou jsou intenzivně zbarvené látky, pro které lze použít i intenzitu vyšší než  $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . U nich se i snižuje objem roztoků a zvyšuje intenzita míchání, aby se zkrátila dráha světla a kultury byly dostatečně ozářeny.

Intenzita světla se nesmí lišit o více než  $\pm 15\%$  od průměrné intenzity světla nad plochou inkubace.



**Obrázek 18** – Řasová kultura [26]

## 8.5.2 Měření biomasy

Biomasa řas se během testování určuje minimálně jednou denně v každé baňce. Aby mohlo být testování považováno za platné, musí být splněna kritéria reprodukční schopnosti. Biomasa by se měla v kontrolních kulturách během 72hodinové zkušební doby zvýšit exponenciálně, a to nejméně šestnáctkrát. Měření biomasy se provádí ručním počítáním buněk pod mikroskopem nebo pomocí elektronického počítače částic (počty buněk a/nebo biologický objem).

## 8.5.3 Kontrola koncentrace

Analýza koncentrace zkoušené látky na počátku a konci zkoušky při nízké a vysoké zkušební koncentraci a koncentrace okolo očekávané  $EC_{50}$  jsou dostačující, pokud se během zkoušky expoziční koncentrace nebude lišit o více než 20 % od počátečních hodnot. Toto se zjistí v rámci validace metody před samotným zahájením zkoušky. Pokud máme specificky připravená zkušební média k analýze, musí být exponována stejným způsobem jako zkušební média použitá ke zkoušení, tj. měla by být naočkována řasami a inkubována za stejných podmínek. Jestliže se požaduje analýza koncentrace rozpuštěné zkušební látky, je nezbytné oddělit řasy od média. Oddělení by se mělo provádět odstředováním při nízké síle g dostatečné pro usazení řas.

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací. Jestliže není požadována hodnota NOEC, lze plán zkoušky změnit.

Pro analytická stanovení koncentrací zkušební látky lze připravit samostatnou sadu zkušebních roztoků. Pokud se pro rozpouštění látky používá rozpouštědlo, musí být zahrnuta i jeho kontrola.

## 8.6 Získaná data

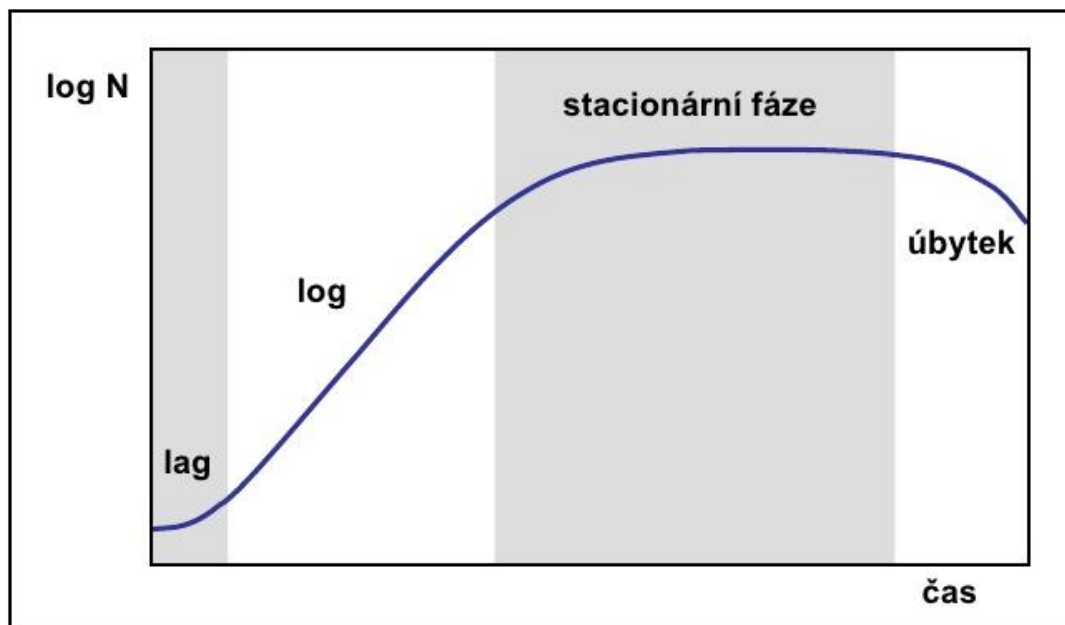
### 8.6.1 Růstové křivky

Biomasa ve zkušebních nádobách může být vyjádřena v jednotkách náhradního parametru použitého pro měření (např. počet buněk, fluorescence).

Růstové křivky se vynesou do grafu a sestaví se tabulka odhadovaných koncentrací biomasy ve zkušebních kulturách a kontrolách společně s koncentracemi zkušebního materiálu a časy měření zaznamenanými v rozlišení nejméně na celé hodiny. Ověří se, zda rostou kontrolní kultury exponenciálně očekávanou rychlostí po celou dobu zkoušky. Poté je třeba zhodnotit

body na křivce, pokud je některý bod vzdálen od křivky, označí se jako odlehlý, nezahrnuje se do statistiky a hledá se příčina. Důvod musí být uveden v protokolu.

Graf 1 znázorňuje růstovou křivku řas za ideálních podmínek.



**Graf 1** – Růstová křivka řas [32]

### 8.6.2 Proměnné odezvy

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené látky na růst řas. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

- Průměrná specifická růstová rychlost – výpočet na základě logaritmického zvýšení biomasy během zkušebního období a vyjádří se na den.
- Výtěžek – biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa.

Hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty založené na růstové rychlosti budou vyšší než ty na základě výtěžků. Není to způsobeno citlivostí metody, ale jiným matematickým postupem. V rámci Evropské unie se výpočet zakládá na průměrné specifické růstové rychlosti.

### 8.6.3 Průměrná růstová rychlost

Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení biomasy ze vzorce 3 pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \times \text{den}^{-1} \quad (3)$$

kde:

$\mu_{i-j}$  – průměrná specifická růstová rychlost od doby i do doby j

$X_i$  – je biomasa v době i

$X_j$  – biomasa v době j

Procentuální inhibice růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky se určí dle vzorce (4):

$$\% Ir = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \quad (4)$$

kde:

$\% Ir$  – procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti

$\mu_C$  – střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti ( $\mu$ ) v kontrolní skupině

$\mu_T$  – průměrná specifická růstová rychlost u opakování s exponovaným vzorkem

Jestliže se k přípravě zkušebních roztoků používají rozpouštědla, pro výpočet procentuální inhibice by se měly namísto kontrol bez rozpouštědel používat kontroly s rozpouštědly.

#### 8.6.4 Výtěžek

Výtěžek  $I_y$  se vypočítá jako biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky. Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se určí střední hodnota výtěžku a odhady rozptylu. Procentuální inhibice výtěžku ( $\% I_y$ ) lze vypočítat pro každé opakování s exponovanými vzorky podle (5):

$$\% I_y = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100 \quad (5)$$

kde:

$\% I_y$  – procentuální inhibice výtěžku

$Y_C$  – střední hodnota výtěžku v kontrolní skupině

$Y_T$  – hodnota výtěžku u opakování s exponovaným vzorkem

#### 8.6.5 Stimulace a netoxická inhibice růstu

Při nízkých koncentracích bývá někdy pozorována stimulace růstu (negativní inhibice). To může být důsledkem buď hormese („toxická stimulace“), nebo přidáním stimulujících růstových faktorů se zkušebním materiálem k minimálnímu použitému médiu. Přidání anorganických živin by neměl mít žádný přímý účinek, protože ve zkušebním médiu by měl být po celou dobu zkoušky udržován přebytek živin, což při výpočtu  $EC_{50}$  lze zanedbat. Zkušební materiály absorbující světlo mohou způsobit snížení růstové rychlosti, protože stínění snižuje množství dostupného světla. Tyto účinky je nutné odlišit od toxických účinků, a to úpravou podmínek, které se uvedou do zkušebního protokolu.

## 8.7 Vyhodnocení

Součástí vyhodnocení je protokol o zkoušce s těmito údaji:

- fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené látky včetně meze rozpustnosti ve vodě a údaje o chemické identifikaci včetně čistoty
- kmen, dodavatel nebo zdroj testovacího organismu a použité podmínky kultivace
- popis zkušebních podmínek
- popis průběhu zkoušky se všemi odchylkami od použité metody
- zkušební koncentrace
- jakékoliv pozorované účinky, například na morfologii řas
- hodnoty pH na počátku a konci zkoušky u všech expozičních
- hodnotu biomasy pro každou baňku v každém měřicím bodě a metodu jejího určení
- růstové křivky (vynášení biomasy vůči času)
- grafické znázornění vztahu koncentrace a účinku
- odhady toxicity pro proměnné odezvy, například  $EC_{50}$  a související intervaly spolehlivosti, popřípadě hodnoty LOEC a NOEC a statistické metody použité k jejich stanovení [27].

## 9 VÝSLEDEK TESTOVÁNÍ REACTIVE YELLOW 85

### 9.1 Výsledek testů toxicity na dafniích

Předběžný test toxicity na dafniích probíhal ve dvou sadách testovacích roztoků s určenými nominálními koncentracemi a jedním roztokem s nulovou koncentrací testované látky, ten byl použit jako kontrola. V každé nádobě bylo 10 organismů.

V tabulce 7 je uveden počet pohybujících se organismů v určitých nominálních koncentracích a kontrolním vzorku po 24 a 48 hodinách. Dále je uvedena imobilizace organismů v procentech.

Tabulka 7 – Imobilizace dafnií – předběžný test

		Nominální koncentrace [mg/l]					
		100	50	10	5	1	Kontrola
Počet pohybujících se organismů	24 hodin / 1.sada	10	10	10	10	10	10
Počet pohybujících se organismů	24 hodin / 2.sada	10	10	10	10	10	10
Počet pohybujících se organismů	24 hodin/ celkem	20	20	20	20	20	20
Imobilizace %	24 hodin	0	0	0	0	0	0
Počet pohybujících se organismů	48 hodin / 1.sada	10	10	10	10	10	10
Počet pohybujících se organismů	48 hodin / 2.sada	10	10	10	10	10	10
Počet pohybujících se organismů	48 hodin / celkem	20	20	20	20	20	20
Imobilizace %	48 hodin	0	0	0	0	0	0

V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty rozpuštěného kyslíku a teplota testovaných roztoků. Množství kyslíku musí být po ukončení testu vyšší než 0,3 mg/l ve všech nádobách. U teploty je tolerance  $\pm 2$  °C. Obě tyto podmínky byly splněny.



**Tabulka 8** – Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota testované vody – předběžný test

		Nominální koncentrace [mg/l]					kontrola	t (°C)
		100	50	10	5	1		
O <sub>2</sub> (mg/l)	0 hodin	8,5	8,6	8,7	8,7	8,8	8,5	20,4
O <sub>2</sub> (mg/l)	48 hodin	8,3	8,3	8,2	8,1	8,2	8,2	19,6

V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty pH testovaných roztoků. Hodnota pH musí být v rozmezí 6-9 a nesmí se příliš lišit od počáteční hodnoty,  $\text{pH} \pm 1,5$ . Podmínky byly splněny.

**Tabulka 9** – Hodnoty pH testovacích roztoků

Nominální koncentrace [mg/l]	pH (0 h)	pH (48 h)
1	7,7	7,7
5	7,8	7,8
10	7,8	7,8
50	7,8	7,8
100	7,8	7,8
Kontrola	7,9	7,7

V tabulce 10 jsou uvedeny zjištěné koncentrace v testovaných roztocích a jejich změny v čase.

**Tabulka 10** – Určené koncentrace a jejich změna v testovaném roztoku

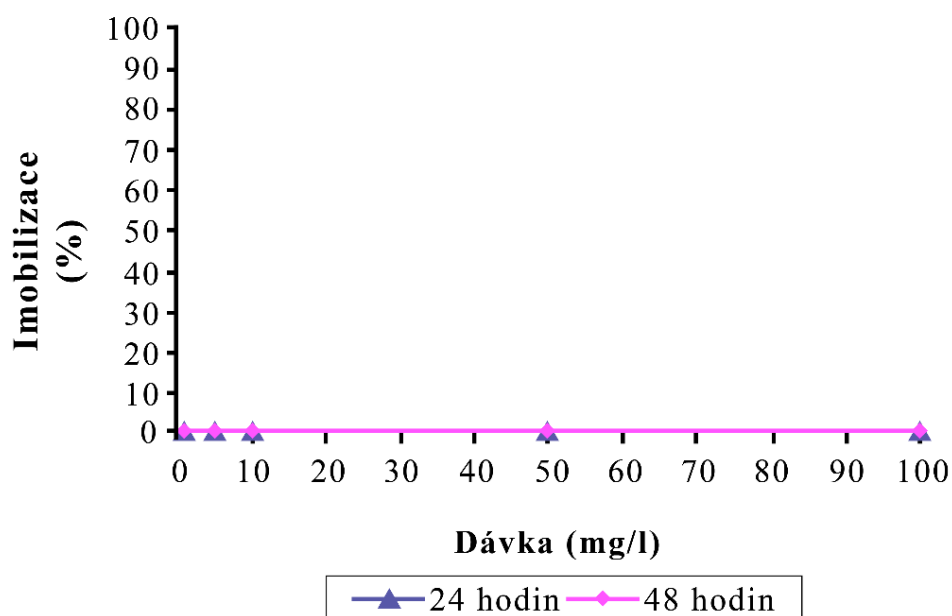
Nominální koncentrace [mg/l]	Zjištěná koncentrace 0 hodin [mg/l]	Zjištěná koncentrace 48 hodin [mg/l]	Změna koncentrace testovaného roztoku v intervalu 0-48 hodin
1	0,88	0,98	+ 11,4 %
100	95,6	99,3	+ 3,9 %

V grafu 2 je znázorněna imobilizace organismů v procencích v testovaných roztocích o určených koncentracích. Na základě toho vidíme, že nebyly imobilizovány žádné organismy.

Výsledkem testu jsou tedy hodnoty:

**24 hodin – EC<sub>50</sub> > 100 mg/l**  
**48 hodin – EC<sub>50</sub> > 100 mg/l**

Podle nařízení CLP 286/2011 – část 4 nebezpečnost pro životní prostředí, se tedy toto barvivo nezařazuje do žádné kategorie nebezpečnosti pro vodní prostředí.



**Graf 2** – Imobilizace dafnií

## 9.2 Výsledek testů toxicity na řasách

Pro zjištění akutní toxicity u zelených řas byl použit předběžný a limitní test.

### 9.2.1 Předběžný test

Předběžný test probíhal ve třech opakováních, tzn. na třech řasových kulturách. V tabulce 11 je uvedena hustota buněk řas v určitém čase.

**Tabulka 11** – Individuální hustota buněk – předběžný test

Nominální koncentrace [mg/l]	Opakování	Hustota buněk v 1 ml			
		0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
<b>100</b>	1	5000	18750	37500	75000
	2	5000	12500	37500	87500
	3	5000	12500	50000	87500
<b>50</b>	1	5000	18750	43750	87500
	2	5000	25000	50000	75000
	3	5000	18750	37500	87500
<b>10</b>	1	5000	18750	31250	93750
	2	5000	18750	43750	81250
	3	5000	12500	37500	93750
<b>5</b>	1	5000	12500	37500	87500
	2	5000	25000	43750	81250
	3	5000	18750	37500	87500
<b>1</b>	1	5000	18750	50000	100000
	2	5000	25000	37500	87500
	3	5000	18750	43750	100000
<b>Kontrola</b>	1	5000	25000	56250	143750
	2	5000	25000	56250	137500
	3	5000	18750	43750	112500

**Biomasa** v kontrolní kultuře se zvýšila více než **26x** v průběhu testu (72 hodin).

**Tabulka 12** – Hodnoty růstové rychlosti ( $\mu$ ) a výtěžku (Y) – předběžný test

Nominální koncentrace [mg/l]	Opakování	Růstová rychlost za časový interval ( $\mu$ )			Růstová rychlost ( $\mu$ ) 0-72 h	Výtěžek (Y)
		0-24 h	24-48 h	48-72 h		
<b>100</b>	1	1,32	0,69	0,69	0,90	70000
	2	0,92	1,10	0,85	0,95	82500
	3	0,92	1,39	0,56	0,95	82500
<b>50</b>	1	1,32	0,85	0,69	0,95	82500
	2	1,61	0,69	0,41	0,90	70000
	3	1,32	0,69	0,85	0,95	82500
<b>10</b>	1	1,32	0,51	1,10	0,98	88750
	2	1,32	0,85	0,62	0,93	76250
	3	0,92	1,10	0,92	0,98	88750
<b>5</b>	1	0,92	1,10	0,85	0,95	82500
	2	1,61	0,56	0,62	0,93	76250
	3	1,32	0,69	0,85	0,95	82500
<b>1</b>	1	1,32	0,98	0,69	1,00	95000
	2	1,61	0,41	0,85	0,95	82500
	3	1,32	0,85	0,83	1,00	95000
<b>Kontrola</b>	1	1,61	0,81	0,94	1,12	138750
	2	1,61	0,81	0,89	1,10	132500
	3	1,32	0,85	0,94	1,04	107500

**Průměrný variační koeficient** pro specifické rychlosti růstu podle jednotlivých časových úseků v kontrolních kulturách je **34,1 %**.

( $CV_{0-24h} = 38,3 \%$ ,  $CV_{24-48h} = 39,7 \%$  a  $CV_{48-72h} = 24,1 \%$ ).

**Koeficient variace průměrných specifických rychlostí růstu** v průběhu celého zkušebního období v opakovaných kontrolních kulturách je **4,0 %**.

**Tabulka 13** - Hodnoty pH testovaných roztoků

Nominální koncentrace [mg/l]	pH (0 h)	pH (72 h)
<b>1</b>	7,5	7,6
<b>5</b>	7,5	7,6
<b>10</b>	7,5	7,6
<b>50</b>	7,5	7,6
<b>100</b>	7,5	7,6
<b>Kontrola</b>	7,6	7,7

**Tabulka 14** – Průměrná hustota buněk – předběžný test

Nominální koncentrace [mg/l]	Průměrná hustota buněk v 1 ml			
	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
<b>100</b>	5000	14583	41667	83333
<b>50</b>	5000	20833	43750	83333
<b>10</b>	5000	16667	37500	89583
<b>5</b>	5000	18750	39583	85417
<b>1</b>	5000	20833	43750	95833
<b>Kontrola</b>	5000	22917	52083	131250

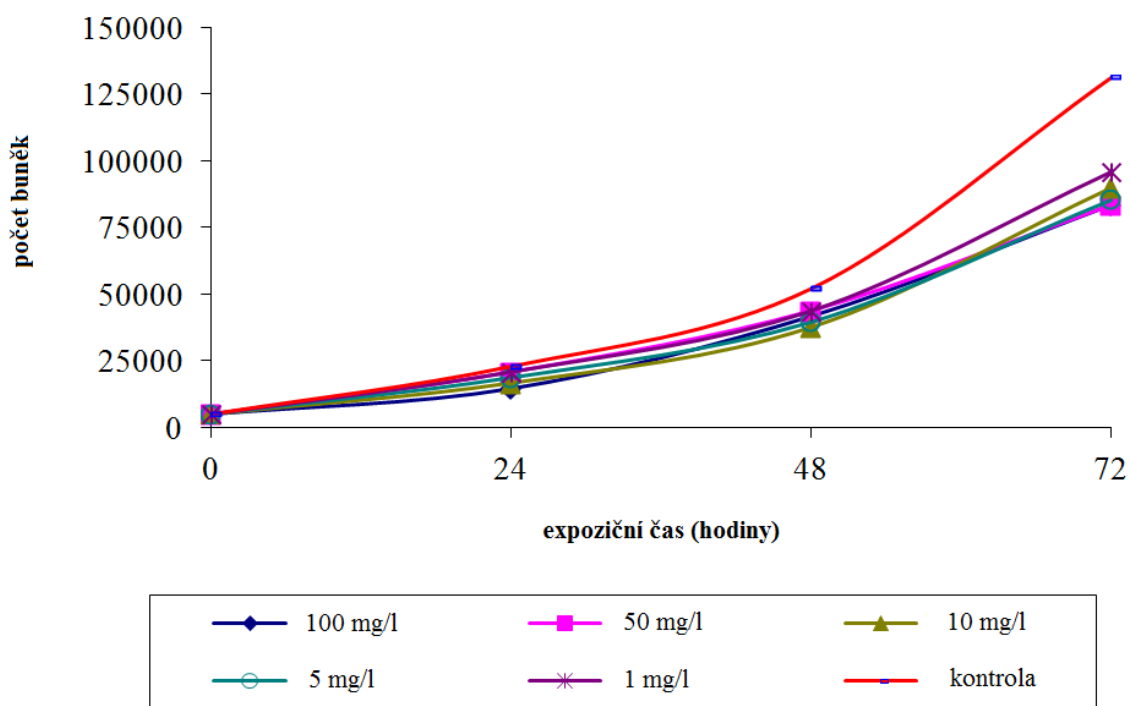
**Tabulka 15** – Procentuální snížení průměrné růstové rychlosti a inhibice v procentech

Nominální koncentrace [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná $\mu$	Snížení %	Průměrný Y	Inhibice %
<b>100</b>	0,94	13,9	78333	38,0
<b>50</b>	0,94	13,9	78333	38,0
<b>10</b>	0,96	11,7	84583	33,0
<b>5</b>	0,95	13,1	80417	36,3
<b>1</b>	0,98	9,6	90833	28,1
<b>Kontrola</b>	1,09	-	126250	-

**Tabulka 16** – Analyticky určené koncentrace roztoků na počátku a na konci předběžného testu

Nominální koncentrace [mg/l]	Koncentrace 0 hodin [mg/l]	Koncentrace 72 hodin [mg/l]	Změna koncentrace testovaného roztoku 0-72 hodin
<b>1</b>	0,97	0,96	- 1,0 %
<b>100</b>	96,0	97,6	+ 1,7 %
<b>100 w.a.</b>	96,9	98,6	+ 1,8 %

w.a. = bez řas (without algae)



**Graf 3** – Růstové křivky – předběžný test

## 9.2.2 Limitní test

Pro limitní test bylo použito šest opakování neboli šest řasových kultur a šest kontrolních roztoků, které neobsahovaly testovanou látku.

V tabulce 17 jsou uvedeny hustoty buněk v roztoku v závislosti na čase.

**Tabulka 17 – Hustoty buněk – limitní test**

Nominální koncentrace [mg/l]	Opakování	Hustota buněk v 1 ml			
		0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
<b>100</b>	1	5000	18750	43750	93750
	2	5000	18750	31250	68750
	3	5000	18750	37500	81250
	4	5000	12500	25000	93750
	5	5000	18750	37500	87500
	6	5000	12500	31250	75000
<b>Kontrola</b>	1	5000	25000	56250	131250
	2	5000	18750	37500	125000
	3	5000	12500	43750	100000
	4	5000	25000	56250	143750
	5	5000	18750	37500	87500
	6	5000	25000	56250	131250

**Biomasa** v kontrole vzrostla **23x** v průběhu testu (72 hodin).

**Tabulka 18** – Růstová rychlost ( $\mu$ ), a výtěžek (Y) – limitní test

Nominální koncentrace [mg/l]	Opakování	Růstová rychlost za časový interval ( $\mu$ )			Růstová rychlost ( $\mu$ )	Výtěžek (Y)
		0-24 h	24-48 h	48-72 h	0-72 h	
<b>100</b>	1	1,32	0,85	0,76	0,98	88750
	2	1,32	0,51	0,79	0,87	63750
	3	1,32	0,69	0,77	0,93	76250
	4	0,92	0,69	1,32	0,98	88750
	5	1,32	0,69	0,85	0,95	82500
	6	0,92	0,92	0,88	0,90	70000
<b>Kontrola</b>	1	1,61	0,81	0,85	1,09	126250
	2	1,32	0,69	1,20	1,07	120000
	3	0,92	1,25	0,83	1,00	95000
	4	1,61	0,81	0,94	1,12	138750
	5	1,32	0,69	0,85	0,95	82500
	6	1,61	0,81	0,85	1,09	126250

**Průměrný variační koeficient** specifických rychlostí růstu u jednotlivých sekcí v kontrolních kulturách je **34,8 %**.

( $CV_{K1} = 41,4 \%$ ,  $CV_{K2} = 31,1 \%$ ,  $CV_{K3} = 22,5 \%$ ,  $CV_{K4} = 38,3 \%$ ,  $CV_{K5} = 34,3 \%$ ,  $CV_{K6} = 41,4 \%$ )

**Koeficient variace průměrných růstových rychlostí** v průběhu celého zkušební období v opakovaných kontrolních kulturách je **6,0 %**.

**Tabulka 19** – Hodnoty pH testovaných roztoků – limitní test

Nominální koncentrace [mg/l]	pH (0 h)	pH (72 h)
100	7,6	7,7
Kontrola	7,6	7,7



**Tabulka 20** – Průměrná hustota buněk – limitní test

Nominální koncentrace [mg/l]	Průměrná hustota v 1 ml			
	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
<b>100</b>	5000	16667	34375	83333
<b>Kontrola</b>	5000	20833	47917	119792

**Tabulka 21** – Procentuální snížení rychlosti růstu a procentuální inhibice výtěžku – limitní test

Nominální koncentrace [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná $\mu$	Snížení %	Průměrný Y	Inhibice %
<b>100</b>	0,94	11,4	78333	31,8
<b>Kontrola</b>	1,06	-	114792	-

**Tabulka 22** – Analyticky určené koncentrace roztoků na počátku a na konci limitního testu

Nominální koncentrace [mg/l]	Koncentrace 0 hodin [mg/l]	Koncentrace 72 hodin [mg/l]	Změna koncentrace testovaného roztoku 0-72 hodin [%]
<b>100</b>	95,4	96,6	+ 1,3
<b>100 w.a.</b>	96,4	97,7	+ 1,3

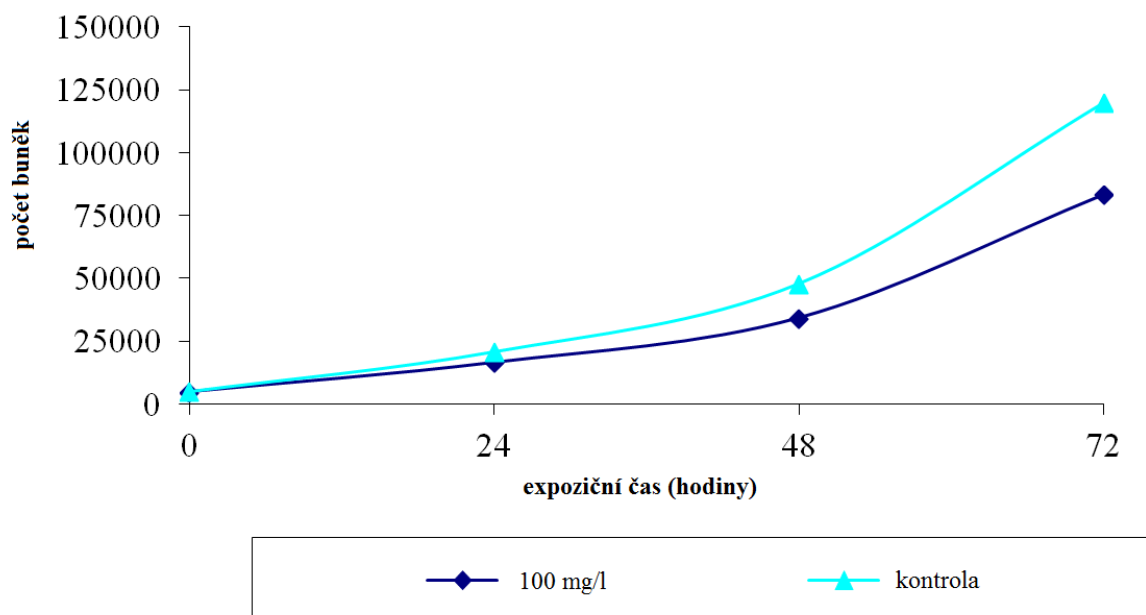
w.a. = bez řas (without algae)

V grafu 4 je znázorněna růstová křivka řas. Na základě porovnání s kontrolou není zřetelný výrazný rozdíl v počtu buněk řas.

Výsledkem testu je tedy hodnota:

**72 hodin –  $E_rC_{50} > 100 \text{ mg/l}$**

Podle nařízení CLP 286/2011 – část 4 nebezpečnost pro životní prostředí, se tedy toto barvivo nezařazuje do žádné kategorie nebezpečnosti pro vodní prostředí.



**Graf 4** – Růstové křivky – limitní test

## 10 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci byly shrnuty informace o ekotoxikologii, ekotoxikologických biotestech a legislativě týkající se toxicity. Cílem této bakalářské práce bylo zjištění ekotoxicity barviva Reactive Yellow 85 na dafniích a řasách v testech podle metodiky OECD. Toto barvivo se využívá k barvení pogumovaných potisků na textil. Testování probíhalo ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Rybitví. V testu s dafniemi byla zjištěna hodnota  $EC_{50} > 100$  mg/l. U tohoto testu jsem byla přítomna. V testu s použitím řas byla zjištěna hodnota  $E_rC_{50} > 100$  mg/l. Z těchto hodnot tedy vyplývá, že testované barvivo nespadá do žádné kategorie klasifikace toxicity podle nařízení CLP. To znamená, že barvivo není toxické a může se používat bez ohrožení životního prostředí či zdraví lidí.

## 11 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ORGANIZACE PRO HOSPODÁŘSKOU SPOLUPRÁCI A ROZVOJ. *OECD* [online]. b.r. [cit. 2017]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/czech/czech-republic-and-oecd.htm>
- [2] MINISTERSTVO ZAHRANIČNÍCH VĚCÍ. *Stálá mise České republiky při OECD v Paříži* [online]. b.r. [cit. 2017]. Dostupné z: [http://www.mzv.cz/oecd.paris/cz/zakladni\\_informace\\_o\\_oecd/index.html](http://www.mzv.cz/oecd.paris/cz/zakladni_informace_o_oecd/index.html)
- [3] ČESKÁ INFORMAČNÍ AGENTURA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *CENIA* [online]. b.r. [cit. 2017]. Dostupné z: <http://www1.cenia.cz/www/reach/o-reach>
- [4] Zavádění systému REACH. *Ekotoxikologické centrum CZ s.r.o.* [online]. b.r. [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://cz.ekotox.eu/reach-mainmenu-242/zavadni-systemu-reach>
- [5] ČESKÉ EKOLOGICKÉ MANAŽERSKÉ CENTRUM, Z.S. (CEMC). *Třetí ruka* [online]. 2013 [cit. 2017]. Dostupné z: <http://www.tretiruka.cz/chlp/narizeni-reach/>
- [6] AGENTURA ECHA. ECHA. *Agentura Evropské unie* [online]. 2017 [cit. 2017]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach>
- [7] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia s.r.o., 2011.
- [8] ENVIWEB S.R.O. *Enviweb* [online]. b.r. [cit. 2017]. Dostupné z: <http://www.enviweb.cz/eslovník/50>
- [9] HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. VŠCHT Praha, 2004.
- [10] KOČÍ, Vladimír a Klára MOČOVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT Praha, 2009.
- [11] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-726-2301-X.

- [12] NOVÁK, Ladislav a Karel VENTURA. Globální harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických výrobků a povinnosti výrobců, dovozců a distributorů, které z něj plynou. *Chemické listy* [online]. 2011, **2011**(105), 616-621 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_08\\_616-621.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_616-621.pdf)
- [13] Piktogramy podle směrnic DSD a DPD. In: *SDH Albrechtice* [online]. 2009 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://sdh.albrechtice.webnode.cz/news/nebezpecne-latky-v-nasem-okoli/>
- [14] *Přehled tříd nebezpečnosti a kategorií nebezpečnosti a piktogramů* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: [http://www.rect.muni.cz/nso/Chemicke\\_latky/soubory/priloha1.pdf](http://www.rect.muni.cz/nso/Chemicke_latky/soubory/priloha1.pdf)
- [15] *Výstražné symboly dle CLP* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://files.8-c6.webnode.cz/200000009-d47cad4c40/tuv2.jpg>
- [16] HON, Zdeněk. *Základy toxikologie pro obor vodního hospodářství* [online]. České Budějovice: Vysoká škola evropských a regionálních studií, 2013 [cit. 2017-05-07]. ISBN 978-80-87472-56-9. Dostupné z: [http://www.vyzkumnecentrum-vsers.cz/wp-content/uploads/2014/04/ZAKLADY\\_TOXIKOLOGIE\\_PRO\\_OBOR\\_VODNIHO\\_HOSPODARSTVI.pdf](http://www.vyzkumnecentrum-vsers.cz/wp-content/uploads/2014/04/ZAKLADY_TOXIKOLOGIE_PRO_OBOR_VODNIHO_HOSPODARSTVI.pdf)
- [17] BALOG, Karol. *Základy toxikologie*. 1. vyd. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 1998. ISBN 80-861-1129-6.
- [18] HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0548-X.
- [19] PALEČEK, Jaroslav, Igor LINHART a Josef HORÁK. *Toxikologie a bezpečnost práce v chemii*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 80-708-0266-9.
- [20] KOČÍ, Vladimír, Tomáš RAKOVICKÝ a Andrej ŠVAGR. *Testy akutní a semichronické toxicity* [online]. In: . Praha: VŠCHT Praha, 2001 [cit. 2017-05-11].

- [21] KAŠPAR, Otakar. *Ekotoxikologické hodnocení polymerů a biologicky aktivních látek v akvatickém prostředí* [online]. Brno, 2016 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp\\_id=89743&aid\\_redir=1](https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=89743&aid_redir=1). Dizertační práce. VUT Brno. Vedoucí práce Milada Vávrová.
- [22] OLEXOVÁ, Barbora. *Rozklad organických barviv metodami AOP* [online]. Brno, 2011 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=37138](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=37138). Diplomová práce. VUT Brno. Vedoucí práce Zdenka Kozáková.
- [23] Reaktivní azobarviva. In: *Organická barviva - učební text* [online]. b.r. [cit. 2017-05-11].
- [24] *Determination of Reactive Yellow 85 concentration by HPLC method in the samples from Daphnia magna, Acute Immobilisation Test: Study No.: 393/16/22*. Výzkumný ústav organických syntéz a.s., 2017.
- [25] *Strukturní vzorec Reactive Yellow 85* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://www.guidechem.com/dictionary/en/68110-27-0.html>
- [26] ČERNÁ, Patricie. *Vlastní foto*. 2017.
- [27] *Nariženi komise (ES) č. 440/2008*. In: . b.r., ročník 2008, číslo 440.
- [28] KOSEK, Jakub. Anatomické schéma perloočky. In: *Perloočky - svět drobných koryšů* [online]. 2016 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://perloocky.jkoweb.cz>
- [29] ELENBAAS, Molly. *Daphnia magna. Animal diversity web* [online]. b.r. [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: [http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/)
- [30] *Desmodesmus subspicatus*. In: *Algae base* [online]. b.r. [cit. 2017-06-04]. Dostupné z: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=42443](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443)
- [31] HORÁKOVÁ, Veronika. *Vliv diklofenaku na autotrofní organismy* [online]. Hradec Králové, 2013 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: [file:///C:/Users/Mojea/Downloads/RPTX\\_2012\\_1\\_11160\\_0\\_368826\\_0\\_133835.pdf](file:///C:/Users/Mojea/Downloads/RPTX_2012_1_11160_0_368826_0_133835.pdf). Rigorózní práce. Univerzita Karlova. Vedoucí práce Jitka Vytlačilová.

[32] Růstová křivka. In: *Slideshare.net* [online]. b.r. [cit. 2017-06-13]. Dostupné z: <https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjTzJ2a6rjUAhULAxoKHUbrCnwQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fpt.slideshare.net%2Fmedik.cz%2Fbiologie-pro-bakale-praktikum-2%3Fnomobile%3Dtrue&psig=AFQjCNHZv3BnK8ygLL-Bdy2jF7jDnd0EXA&ust=1497374165747746>