

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**Toxicita vybraných organických polutantů
u různých věkových/velikostních
skupin slávičky mnohotvárné**

Bakalářská práce

Kateřina Štachová

Chemie-biologie

Vedoucí práce: RNDr. Vladimír Uvíra, Dr.

Obsah

Seznam tabulek	iii
Seznam obrázků	iii
1 Úvod.....	1
2 Bioakumulační schopnost	2
3 Perzistentní organické polutanty (POPs).....	6
3.1 DDT a jeho metabolity	8
3.1.1 Vlastnosti, toxicita, použití.....	8
3.1.2 Účinky DDT na vodní organismy a na člověka	9
3.1.3 Účinky DDT na slávičku.....	10
3.2 Polychlorované bifenyly (PCB).....	12
3.2.1 Vlastnosti, toxicita, použití.....	12
3.2.2 Účinky PCB na vodní organismy a na člověka.....	13
3.2.3 Účinek a schopnost bioakumulace PCB.....	13
3.3 Atrazin	15
3.3.1 Vlastnosti, toxicita, použití.....	15
3.3.2 Účinky atrazinu na vodní organismy a na člověka.....	15
3.3.3 Účinky atrazinu na slávičku	16
3.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU, PAHs)	18
3.4.1 Vlastnosti, toxicita, použití.....	19
3.4.2 Účinky PAU na vodní organismy a na člověka.....	20
3.4.3 Účinky PAU na slávičku	20
3.5 Účinky dalších vybraných POPs	22
4 Pesticidy	23
5 Léčiva.....	24
6 Metodika diplomové práce.....	27
7 Závěr	28
Seznam literatury	29
Seznam elektronických zdrojů	36

Seznam tabulek

Tabulka 1 - PAU podle US EPA se strukturními vzorci a některými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (převzato z Manoli & Samara 1999, upraveno Štachová 2013)	19
--	----

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Graf celkové koncentrace PCB naměřených ve slávičce mnohotvárné a v sedmi vybraných taxonech ryb (převzato z Binelli & Provini 2003a, upraveno Štachová 2013)	3
Obrázek 2 - Zvyšující koncentrace Lindanu v závislosti na čase a velikosti slávičky (převzato z Berny et al. 2002, upraveno Štachová 2013)	4
Obrázek 3 - Strukturní vzorce zleva p,p'-DDT, p,p'-DDD a p,p'-DDE [2].	8
Obrázek 4 - Histologické snímky vaječníku slávičky (Bacchetta & Mantecca 2009)	10
Obrázek 5 - Obecná struktura molekuly PCB [5]	12
Obrázek 6 - Strukturní vzorec atrazinu [6].....	15
Obrázek 7 - Histologické snímky hepatopankreatu slávičky (Zupan & Kalafatic 2003, upraveno Štachová 2013).....	16
Obrázek 8 - Účinek atrazinu na varlatech slávičky (Zupan & Kalafatic 2003, upraveno Štachová 2013)	17
Obrázek 9 - Časový průběh aplikace serotoninu na zrání oocytů (Fong et al. 1994b, upraveno Štachová 2013).....	25

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Vladimíra Uvíry, Dr. a jen s použitím citovaných literárních a elektronických zdrojů.

V Olomouci, dne

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Vladimíru Uvírovi, Dr. a Mgr. Aleně Vláčilové za odborné rady a konzultace, za poskytnutí studijních materiálů a za celkovou spolupráci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Kateřina Štachová
Název práce:	Toxicita vybraných organických polutantů u různých věkových/velikostních skupin slávičky mnohotvárné
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra zoologie a ornitologická laboratoř, PřF UP Olomouc
Vedoucí práce:	RNDr. Vladimír Uvíra, Dr.
Rok obhajoby práce:	2013

Abstrakt

V současnosti řeší ekologie a ekotoxikologie problémy související s hromaděním toxických látek v životním prostředí. Mezi velkou skupinu kumulačních látek patří perzistentní organické polutanty (POPs). Tyto karcinogenní a reprotoxické látky jsou nebezpečné kromě své toxicity tím, že se kumulují v životním prostředí a v živých organismech. Mají dlouhé poločasy rozpadu, a proto se z něho nesnadno odstraňují. Za vhodný indikátor POPs se považuje sladkovodní mlž slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) kvůli svým fyziologickým vlastnostem a schopnosti bioakumulace. Tato bakalářská práce je pojata jako literární rešerše a shrnuje mnou vybrané POPs, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, použití a toxicitu. Zaměřuje se převážně na účinky na člověka, vodní organismy a slávičku mnohotvárnou. Vysvětluje, proč je slávička vhodný bioindikátor toxických látek a její bioakumulační schopnost.

Klíčová slova

bioakumulace, toxicita, *Dreissena polymorpha*, perzistentní organické polutanty, DDT, PCB, atrazin, PAHs, TBT, léčiva, pesticidy

Počet stran:	44
Počet příloh:	10
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Autor's name:	Kateřina Štachová
Title:	Toxicity of selected organic pollutants in different age/size zebra mussel groups
Type of thesis:	Bachelor Thesis
Department:	Department of Zoology and Laboratory of Ornithology, PřF UP Olomouc
Supervisor:	RNDr. Vladimír Uvíra, Dr.
The year of presentation:	2013

Abstract

The problems associated with the accumulation of toxic chemicals in the environment are the subject of today's research in the field of ecology and the ecotoxicology. Persistent organic pollutants (POPs) belong to the larger group of cumulative chemicals. These carcinogenic and reprotoxic substances which are, in addition to their toxicity, also hazardous due to their accumulation in the environment and organisms. They have a long half-life so that it is difficult to dispose them. As a suitable indicator of POPs is considered freshwater bivalve zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) because of its physiological properties and competence to bioaccumulate. This bachelor thesis is targeted as the literature research which summarizes selected POPs, their physical-chemical properties, usage and toxicity. It focuses mainly on the effects on humans, aquatic organisms and zebra mussel. It explains, why zebra mussel is a suitable bioindicator of toxic chemicals and its competence to bioaccumulation.

Keywords

bioaccumulation, toxicity, *Dreissena polymorpha*, persistent organic pollutants, DDT, PCB, atrazine, PAHs, TBT, pharmaceuticals, pesticides

Number of pages:	44
Number of appendices:	10
Language:	Czech

1 Úvod

Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) patří mezi sladkovodní invazivní mlže (Bivalvia, Eulamellibranchia) s oblastí původu v povodí Kaspického a Černého moře. Odtud se za posledních 200 let dostala do vodních ploch východní a západní Evropy a díky ekologickým a ekonomickým vlivům i do USA a Kanady. Invaze byla ovlivňována zejména lodní dopravou, komerčním rybolovem a budováním kanálů evropských řek (Karatayev et al. 1997).

V České republice se vyskytuje nebo vyskytovala v povodí řek Vltavy, Labe, Moravy a Dyje. Kromě vodních nádrží, řek a potoků ji můžeme najít i v zatopených pískovnách (Sedlák 2002).

Tento živočich je jedním z mála mlžů, který je dobře přizpůsobený k životu ve sladké i brakické vodě (Karatayev et al. 1998). Žije přisedle na jakémkoliv přirozeném či umělém pevném substrátu, který se vyskytuje ve vodní nádrži. Na něm drží pomocí byssových vláken. Při jeho oddělení od substrátu má tendenci se znovu byssovými vlákny připojit. Musí přitom prodloužit nohu a vystavit tak své měkké tělo vnějšímu prostředí a toxickým sloučeninám, které se v něm nacházejí (Rajagopal et al. 2005).

Často ohrožuje i jiné mlže, především zástupce z čeledi Unionidae, které využívá jako substrát. Slávička může na jejich lasturách vytvářet těžké kolonie (drúzy) a tím omezovat jejich pohyb, blokovat sifa a znemožňovat dýchání. K úmrtnosti těchto velkých mlžů dochází nejčastěji právě udušením (Sousa et al. 2011).

Přítomnost a početnost mlžů ovlivňují faktory biotické (konkurence a predace) a také abiotické např. salinita, teplota, množství kyslíku a další trofické podmínky (Karatayev et al. 1998).

Slávička se často používá jako bioindikátor chemických látek ve vodních ekosystémech. Tenhle fakt je dán dlouhodobým životem slávičky (2–19 let) (Karatayev et al. 2006), schopnosti bioakumulace a vysoké invazivní schopnosti (Binelli et al. 2004a). Navíc má vysokou fertilitu a velmi rychlý životní cyklus (Faria et al. 2010).

2 Bioakumulační schopnost

Existuje celá řada důvodů, proč je slávička mnohotvárná vhodným bioindikátorem vodních ekosystémů. Tento drobný, dlouhověký mlž je velmi hojný, dokáže se rozšířit v relativně krátkém čase. Má rychlý životní cyklus a vstupuje brzo do období reprodukce (Faria et al. 2010). Má vysokou schopnost bioakumulace, a proto je vhodným kandidátem k vyhodnocování kontaminace sladkých vod (Berny et al. 2002).

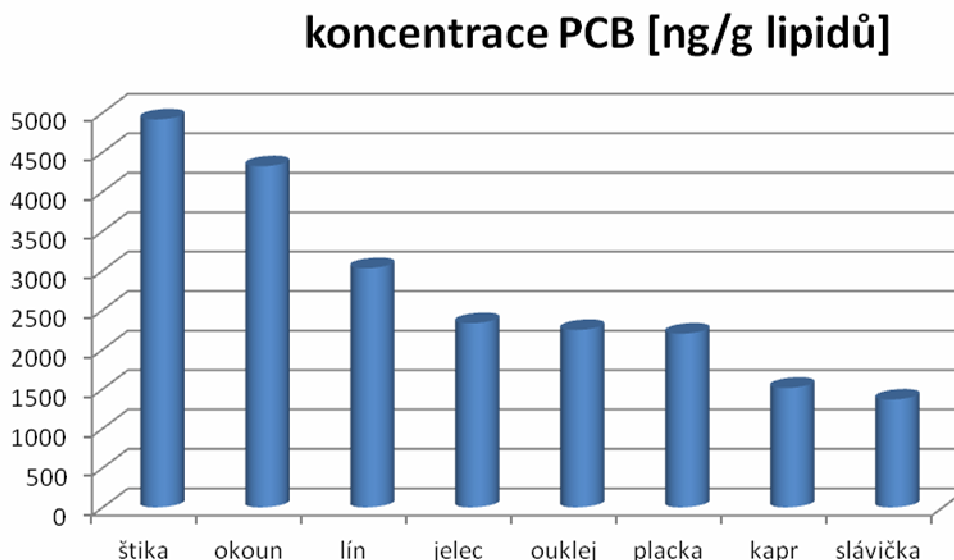
Obecně jsou mlži včetně sláviček převážně odděleného pohlaví (gonochoristé), hermafrodité jen výjimečně. Slávičky mají vysokou fertilitu a schopnost se rozšiřovat. Z hlediska času je životní cyklus sláviček poměrně krátký, ale rychlý. Ovšem než se z embrya stane dospělec, musí jedinec projít několika larválními stádii (Faria et al. 2010; Sedlák 2002).

První larvální stádium, označované jako trochophora, je velmi krátké. Velikostně se pohybuje mezi 57–121 μm . S rostoucím pláštěm se z larvy trochophora stává veliger, která má D-tvar a velikost asi 70–160 μm . Poslední volně plovoucí larvální fází je veliconcha. S dalším růstem, rozvojem nohy a vznikem byssových vláken vzniká larva pediveliger, která je zhruba 167–300 μm velká. Dokáže se už pomocí nohy přemístit na vhodné místo a byssovými vlákny se k substrátu připevnit. Po připevnění se mění na stádium plantigrade a z něho na dospělého mlže. Zvýšený růst a vývoj vede u sláviček k pohlavní dospělosti, která může nastat už při velikosti lastury 5 mm. Tento fakt byl potvrzen v červenci v roce 1990 panem Ackermanem, který si všiml bělavého sekretu spermií u takto malých jedinců (Ackerman 1995). Obvyklá délka lastury pohlavně dospělého jedince bývá spíše kolem 8 až 10 mm a nastává asi v druhém roce života (Mackie & Schloesser 1996). Maximální zjištěná velikost dospělého mlže byla kolem 5 cm (Ackerman 1995).

Obecně platí, čím je slávička mladší, tím je méně odolná vůči toxickým látkám. Nejvíce citlivá je tedy embryonální fáze. Druhé larvální stádium veliger (s největší přirozenou úmrtností) bývá o dost citlivější na toxické látky než dospělí jedinci. Larva pediveliger už má byssova vlákna a může se jimi připevnit k pevnému podkladu, aby ji proud vody neodnesl. Kvůli tomu se toto stádium může jevit jako nejlepší v ochraně proti znečišťujícím látkám. Nevýhodou ale je, že ještě nemá vytvořenou pevnou schránku (lasturu) a tak se do něj dostávají biocidy více než do dospělců. U sladkovodních mlžů existuje krátké larvální stádium nazvané glochidium, které

parazituje na rybách a je méně citlivé než embryonální fáze slávičky a to až 50krát (Faria et al. 2010; Verween et al. 2009).

Kromě hromadění chemických látek v těle mlže je také v potravním řetězci důležitá biomagnifikace, při které dochází ke zvyšování koncentrace polutantů se zvyšující se úrovní trofického řetězce (Gobas et al. 1999). Slávička bývá častým potravním zdrojem pro některé ptáky a ryby, ve kterých se pak polutanty hromadí a jejich koncentrace mohou být až 5krát vyšší než v slávičce [Obrázek 1].



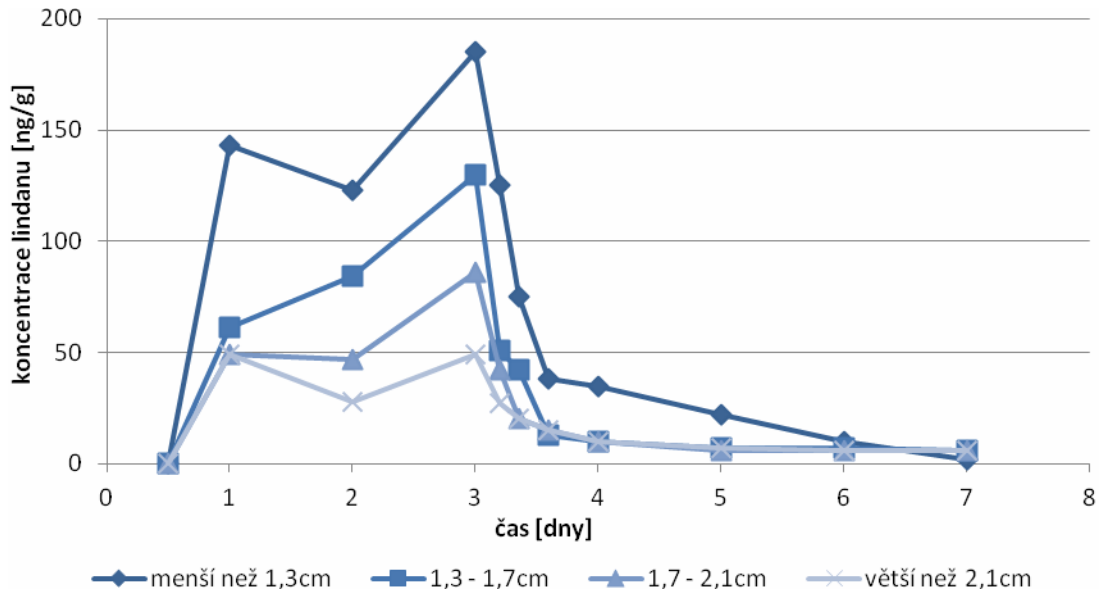
Obrázek 1 - Graf celkové koncentrace PCB naměřených ve slávičce mnohotvárné a v sedmi vybraných taxonech ryb (převzato z Binelli & Provini 2003a, upraveno Štachová 2013)

Schopnost bioakumulace napříč trofickým řetězcem má slávička také kvůli svým fyziologickým vlastnostem, kvůli velikosti populace, která se příliš nemění s časem (stejně jako je to u řas a zooplanktonu), ale také proto, že toxické látky se do slávičky dostávají výhradně z vody žaberním dýcháním (filtrací) (Binelli & Provini 2003a).

Schopnost bioakumulace slávičky může být různá u různě velkých/starých jedinců. Stáří vzorků vylovených z vody je velmi obtížné určit a nikdy není zcela přesné. Ke stanovení růstu a stáří mlžů se používají různé metody (např. počítání přírůstkových rýh, studium velikostní frekvence). Rychlost růstu závisí především na teplotě vody, ročním období, dostupnosti potravy a kyslíku a dalších abiotických faktorech (Karatayev et al. 2006).

Studie prováděná Berny et al. (2002) na pesticidu HCH (hexachlorcyklohexan též Lindan) uvádí největší koncentraci tohoto polutantu u sláviček menších než 1,3 cm.

S rostoucí velikostí pak koncentrace klesala [Obrázek 2]. K obdobným výsledkům nezávisle na sobě došla ještě dříve studie Fent & Hunnt (1991). Ta došla k závěru, že v menších jedincích sláviček je vyšší koncentrace látky obsažené v protihnilobných barvách TBT (tributylcín) než u těch větších.



Obrázek 2 - Zvyšující koncentrace Lindanu v závislosti na čase a velikosti slávičky (převzato z Berny et al. 2002, upraveno Štachová 2013)

Nicméně pro zjištění koncentrace organického polutantu (schopnost bioakumulace slávičky) se používají dospělí jedinci o velikosti většinou více než 1,5 cm, často kolem 1,8–2,2 cm (Binelli et al. 2004b). Hlavním důvodem proč se pro stanovení nepoužívají menší slávičky, v kterých byla zjištěna nejvyšší koncentrace je, že takto malé jedince je velmi náročné pitvat (Johns 2012). Vyhodnocování koncentrace polutantu se provádí v měkkých tkáních slávičky, které jsou bohaté na lipidy. Je to proto, že většina organických polutantů má lipofilní vlastnosti, hromadí se v tucích a ve vodě jsou téměř nerozpustné (Jones & Voogt 1999).

Množství kontaminujících látek v těle slávičky je ovlivňováno jejím reprodukčním stavem a také obsahem tuků v měkké tkáni. Obsah lipidů bývá nejvyšší po prvním rozmnožovacím období a poté začne klesat (Roe & MacIsaac 1998). Nebyl však nalezen žádný důkaz o tom, že by se příjem chemických látek slávičkou měnil v průběhu sezóny kvůli teplotě vody, což bylo pozorováno v rozmezí teplot od 4 do 24 °C. Je však možné, že v zimních měsících, kdy je teplota vody na dně 4 °C nebo

nižší, ztratily slávičky schopnost filtrování vody v důsledku snížení metabolismu, a proto v některých z nich byly menší koncentrace organických polutantů (Gossiaux et al. 1996).

3 Perzistentní organické polutanty (POPs)

V současnosti existuje tisíce chemických látek, které můžeme označit za perzistentní organické polutanty. Slovo perzistentní znamená stálý, trvalý. Perzistentní látky jsou tedy velmi stálé v životním prostředí a jen těžko se z něho odstraňují (Jones & Voogt 1999). Většina z těchto chemikálií je pro životní prostředí velmi nebezpečná a jejich výroba a použití se řídí podle Stockholmské úmluvy z roku 2001 (Binelli et. al. 2008c).

První dvanáctku nejnebezpečnějších polutantů tvoří látky, používané jako pesticidy. Jedná se o aldrin, chlordan, dichlordifenyltrichlorethan (DDT), dieldrin, eldrin, heptachlor, mirex, hexachlorbenzen (HCB) a toxafen. Patří sem i průmyslové chemikálie jako jsou polychlorované bifenyly (PCB) a vedlejší produkty polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDDs) a polychlorované dibenzofurany (PCDFs) (Binelli et al. 2008b; Binelli & Provini 2003b).

Problémem je, že tyto polutanty mají dlouhé poločasy rozpadu, zůstávají a hromadí se v půdě, v ovzduší, v sedimentech nebo v biotě. Kvůli své vysoké toxicitě jsou nebezpečné převážně pro vodní organismy, ale také pro lidi. Velká část z nich je karcinogenních (způsobují rakovinu), reprotoxických (ohrožují rozmnožování a plodnost) a teratogenních (negativně ovlivňují vývoj plodu, způsobují jeho mutace a deformace) (Jones & Voogt 1999).

Jsou nerozpustné ve vodě (hydrofóbní) a dobře rozpustné v tucích (lipofilní). Ve vodních systémech a v půdě silně rozkládají pevné látky, zejména organickou hmotu nebo také lipidy. Je důležité, že POPs snadno přechází do plynné fáze. Mohou tčkat z půd, vegetace a vody do atmosféry. Cyklus odpařování a depozice může být mnohokrát opakován. Následkem toho se POPs mohou hromadit v oblastech daleko od místa, kde byly použity nebo vyrobeny. V atmosféře se mohou POPs dělit na částice a aerosoly v závislosti na teplotě okolí a fyzikálně chemických vlastnostech látky (Jones & Voogt 1999).

Perzistentní organické polutanty se vyskytují všude na naší planetě, v ovzduší, v půdě, ve vodě i v sedimentech. V České republice se provádí už od roku 1988 pravidelný monitoring těchto polutantů. Pomocí různých analýz se kontroluje jejich koncentrace v životním prostředí a dohlíží se na zabezpečení a kvalitu chemických výrobků, které tyto látky obsahují nebo se při jejich výrobě používají [1]. V dnešní době se v České republice kontrolují v ovzduší hlavně polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU nebo též PAHs), DDT a jeho metabolity, hexachlorcyklohexan (HCH),

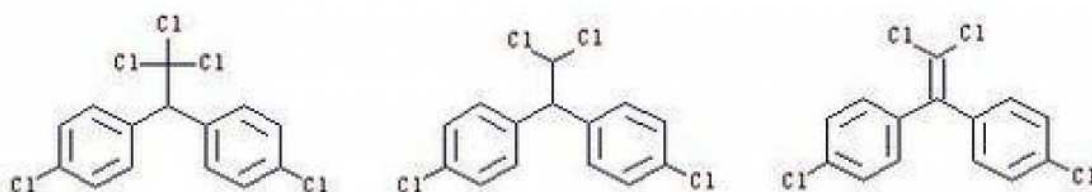
hexachlorbenzen (HCB), sloučeniny chlordanu (CHLs) a v půdě a vodě ještě i PCB a PCDDs/Fs [1].

V hydrosféře České republiky se POPs nacházejí v povrchové a podpovrchové vodě, v říčních a jezerních sedimentech a kumulují se ve vodních organismech. V České republice jsou to hlavně organochlorované pesticidy. Z analýz se zjistilo, že nejvyšší koncentrace DDT a jeho metabolitů (několik desítek ng/l) a PCB je v řece Moravě společně s některými jejími přítoky a v řece Bílině poblíž chemického průmyslového závodu Spolchemie Ústí nad Labem (<http://www.recetox.muni.cz>).

3.1 DDT a jeho metabolity

Zkratka DDT označuje organickou sloučeninu dichlordifenyltrichloretan (chemicky 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorfenyl)ethan), která se v České republice používala jako velmi účinný insekticid. V současné době se kvůli své nebezpečnosti v Evropě i USA nepoužívá.

Nebezpečné jsou i jeho metabolity, tzv. rodina DDT, mezi které patří zejména pp'-dichlordifenyldichloroethen (pp'-DDE), dichlorodifenyltrichloroethan (pp'-DDT) a pp'-dichlordifenyldichlorethan (pp'-DDD). Vyobrazení strukturních vzorců lze vidět na obrázku [Obrázek 3].



Obrázek 3 - Strukturní vzorce zleva p,p'-DDT, p,p'-DDD a p,p'-DDE [2].

3.1.1 Vlastnosti, toxicita, použití

Technický DDT je bílá voskovitá látka se sladkým zápachem. Jedná se o směs tří forem p,p'-DDT (85 %), o,p'-DDT (15 %) a o,o'-DDT (minimální množství) (Binelli et. al. 2008c). Naproti tomu čistý DDT je bílá krystalická látka, bez zápachu. Společně se svými metabolity je dosti stálá, málo těkavá a absorbuje se na povrchy pevných částic. DDT je rozpustný v nepolárních organických rozpouštědlech. Jeho rozpustnost ve vodě je velmi malá, udává se kolem $5,5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Teplota varu i tání jsou o dost vyšší než u vody, teplota varu je $185 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota tání $109 \text{ }^\circ\text{C}$. [3]

Stejně jako všechny ostatní POPs má DDT a jeho metabolity dlouhé poločasy rozpadu. Zůstávají dlouho v životním prostředí a pronikají tak do potravních řetězců a hromadí se v živých organismech. DDT a jeho metabolity se můžou odpařit z vodního sloupce, poté se dostat do atmosférického vzduchu a opět klesat do okolního povodí s deštěm a sněhem. Takhle se může dostat i do vzdálenosti více než 6500 km^2 od původního zdroje (Binelli et al. 2008b).

Do roku 1970 byl DDT jeden z nejužívanějších pesticidů v zemědělství na celém světě (kromě metabolitu p,p'-DDE, který pesticidní vlastnosti postrádá) (Binelli et al 2008c). Kvůli své vysoké toxicitě však byla od této doby jeho výroba a použití v mnoha zemích zakázána (Binelli & Provini 2003b; Binelli et al. 2008a). V USA a Evropě je to

značně omezené kvůli nebezpečným vlastnostem DDT, v rozvojových zemích se používá zejména v zemědělství, ale také společně s chlorochinem jako účinný lék proti malárii. Díky těmto chemickým látkám a Artemisininové terapii (ACT) došlo k výraznému poklesu případů malárie v rozvojových zemích po celém světě z 9.85×10^5 v roce 2000 na 7.81×10^5 v roce 2009. Např. v Surinamu v jižní Americe klesl počet registrovaných případů malárie z 14 403 v roce 2003 na 1371 případů v roce 2009 (Breeveld et al. 2012).

V západních zemích je povoleno jeho použití pouze v květinářství a pro některé zootechnické aplikace (Binelli et al. 2004a).

3.1.2 Účinky DDT na vodní organismy a na člověka

DDT je vysoce toxické pro vodní organismy i pro člověka. Do něj se může dostat konzumací ryb nikoliv však koupáním, protože DDT se kůže vstřebává velmi špatně. V mnoha oblastech, kde byla zjištěna vyšší koncentrace DDT a jiných perzistentních polutantů byl zakázán lov a konzumace některých ryb např. v Itálii placky skvrnitá (*Alosa fallax lacustris*), síha (*Coregonus sp.*), perlína ostrobřichého (*Scardinius erythrophthalmus*) a oukleje obecné (*Alburnus alburnus alborella*). Naproti tomu ve Švýcarsku pouze perlína ostrobřichého (*Scardinius erythrophthalmus*) a sivena alpského (*Salvelinus alpinus*), protože jsou tam povoleny vyšší limity koncentrace POPs (Binelli et al. 2004b).

Jedná se pravděpodobně o karcinogenní a teratogenní látku. Karcinogenita byla prokázána zatím jen u metabolitu p,p'-DDT (Binelli et al. 2008c). DDT poškozují centrální a periferní nervovou soustavu a endokrinní systém (Binelli et al. 2008b). Podle R vět, které označují rizikovost chemické látky, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí, kde se vstřebává do živých vodních organismů a hromadí se v nich. Je toxický při požívání [3].

DDT a p,p'-DDE, p,p'-DDT také poškozují reprodukční systém vodních organismů a člověka. Například u dravých ptáků může ovlivňovat tloušťku vaječné skořápky. Snížení schopnosti rozmnožování bylo zjištěno i u větších živočichů jako jsou tuleni a velryby (Jones & Voogt 1999; Binelli et al. 2008c).

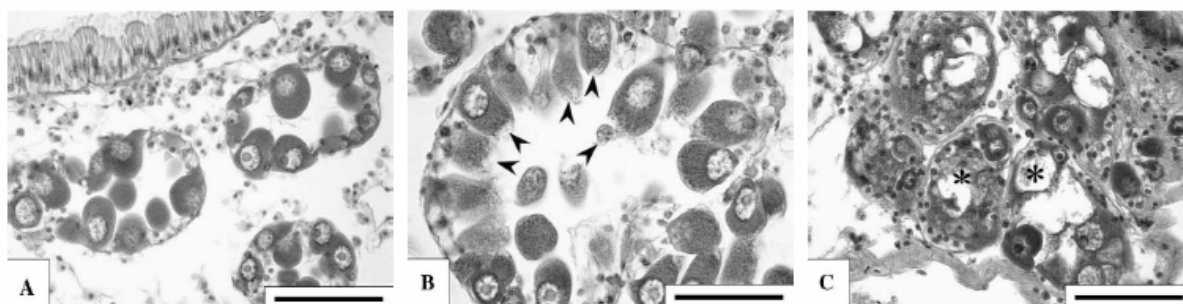
3.1.3 Účinky DDT na slávičku

Od roku 1978 je v Itálii v zemědělství zakázáno používání DDT a jeho metabolitů.

Postupem času byly uzavřeny všechny chemické průmyslové závody, které se specializovaly na výrobu této nebezpečné látky (Binelli & Provini 2003b).

V roce 1996 došlo v severní Itálii k povodním, které způsobily znečištění jezera Maggiore DDT a jeho metabolity. Jejich koncentrace se zvýšila až na hodnoty kolem 4–5 $\mu\text{g} / \text{g}$ lipidů, která je až o 3 řády vyšší než je běžně povolené v průmyslových zemích. Důvodem znečištění bylo, že voda transportovala DDT spolu s jeho metabolity v sedimentech znečištěné řeky až k jezeru. Za znečištění DDT mohl průmyslový chemický podnik nacházející se podél proudu Marmazza, přítok řeky Toca, která je jedním z hlavních přítoků jezera Maggiore (Binelli & Provini 2003b; Binelli et al. 2004b). Kromě tohoto velkého subalpínského jezera byly zvýšené koncentrace polutantů naměřeny i v jiných italských jezerech. Byla to jezera Lago di Garda, Como, Iseo a Lugano (Binelli et al. 2008b).

Italští ekologové a biologové prováděli analýzy a zjišťovali, jak zvýšení koncentrace DDT zapůsobilo na vodní organismy, které v jezerech žijí. Ve slávičce v jezeře Maggiore se studuje hlavně metabolit pp'-DDD, který tam tvoří 30–55 % z celkových DDT a jeho metabolitů (Binelli et al. 2008b). Histologické analýzy prováděné na slávičkách z jezer Maggiore a Iseo zjistily, že zvýšení ovlivnilo hlavně rozmnožování, průběh oplození a vyvíjení pohlavních žláz sláviček. Ve vaječnicích samic mlžů docházelo ke zpoždění zrání oocytů a k degeneraci vajíček [Obrázek 4].



Obrázek 4 - Histologické snímky vaječníku slávičky (A. normální vyvíjející oocyty; B. degenerující oocyty; C. zdegenerované oocyty, pozůstatky buněk v lumenu) (Bacchetta & Mantecca 2009)

Slávičky byly po vylovení z jezera asi týden fixovány v bouinově kapalině a poté náhodně vybrány ke konkrétním studiím. K analýzám byli použiti dospělí jedinci s délkou lastury větší nebo rovno 18 mm. Byly provedeny řezy viscerální hmoty a

obarvené hematoxylinem a eosinem byly pozorovány pod mikroskopem. Vyhodnocení samic probíhalo tak, že jednotlivé řezy byly rozděleny do skupin podle degenerace vajíček a celkového stavu vaječníku. Na výše uvedeném obrázku jsou vyfotografovány tři typy možných následků akumulace DDT a jeho metabolitů. Na obrázku A nebyly pozorovány žádné změny či degenerace, cytologický stav vaječníku byl dobrý. Na obrázku B lze vidět již degenerující oocyty, které mají tendenci prodlužovat vrcholy buněk a hromadit obsah v lumenu. Obrázek C ukazuje zdegenerované oocyty jako pozůstatky buněk, které se hromadí v lumenu (Binelli et al. 2004b; Bacchetta & Mantecca 2009).

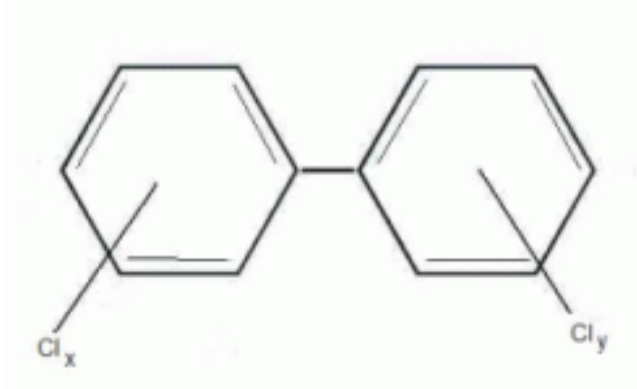
U samců došlo k uvolnění první samčí gamety o 1–2 měsíce později než samičí, což neumožnilo setkání samčí a samičí gamety a nemohlo dojít k oplození (spawning) (Binelli et al. 2004b; Bacchetta & Mantecca 2009).

Bylo prokázáno, že všechny tři metabolity DDT způsobují poškození DNA slávičky. Převážně p,p'-DDE, který způsobil až dvojnásobné poškození oproti p,p'-DDD a p,p'-DDT. Tyto analýzy byly prováděny na červených krvinkách a měkkých tkání dospělých sláviček za použití gelové elektroforézy jednotlivých buněk (SCGE) a mikronukleového testu (MN test) (Binelli et al. 2008a; Binelli et al. 2008c).

Ve studiích měly slávičky velikost většinou kolem 1,5–2,2 cm (10–14 g celkové hmotnosti, zhruba 1,5 g měkké tkáně) (Binelli & Provini 2003a; Binelli et al. 2004b).

3.2 Polychlorované bifenyly (PCB)

Polychlorované bifenyly (PCB) patří rovněž jako DDT mezi první dvanáctku nejnebezpečnějších perzistentních organických polutantů. Jsou tvořeny dvěma fenolovými zbytky (bifenyly) a na jejich aromatické jádro je místo vodíku navázán různý počet molekul chlóru (max. 10) [Obrázek 5] [4].



Obrázek 5 - Obecná struktura molekuly PCB [5]

Existuje teoreticky 209 izomerních látek PCB (konvergerů) lišící se od sebe úrovní chlorace a pozicí substituentů. Tyto chemikálie patří mezi látky antropogenní, v životním prostředí se přirozeně nevyskytují. Dostaly se tam díky průmyslovým výrobám, při které vznikají jako vedlejší produkty (Jones & Voogt 1999).

3.2.1 Vlastnosti, toxicita, použití

Bifenyly jsou vysoce toxické aromatické sloučeniny. Stejně jako ostatní POPs mají schopnost kumulovat se v tělech vodních organismů a dostávat se potravou i do člověka. Všech 209 konvergerů se od sebe liší svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi např. hustotou, rozpustností nebo toxicitou. Jednotlivé izomery jsou bezbarvé krystalické látky, bez zápachu, přičemž izomery, běžně používané v průmyslu jsou kapaliny. Jsou velmi stálé a nekorozivní. Všechny mají vyšší hustotu než voda a jsou v ní málo rozpustné. Dobře rozpustné jsou v organických rozpouštědlech a tucích [5].

Jsou vyráběny od roku 1929 hlavně pro použití v průmyslu. Používaly se jako dielektrické kapaliny v transformátorech a kondenzátorech, jako přísada do organických ředidel, změkčovadel, lepidel a také jako zpomalovače hoření. Výroba a použití PCB bylo zakázáno nebo omezeno v mnoha zemích od konce 70. let kvůli jejich nepříznivým

účinkům na lidské zdraví (Yang et al. 2008). V Československu je jejich výroba zakázána od roku 1984.

Bohužel i v současné době je můžeme stále nalézt v transformátorech a kondenzátorech nebo jako vedlejší produkty vznikající např. při spalování odpadů, v hutnictví, v chemickém průmyslu nebo ve spalovacích motorech [4].

3.2.2 Účinky PCB na vodní organismy a na člověka

PCB patří mezi karcinogenní a teratogenní látky. Bylo prokázáno, že způsobují rakovinu tlustého střeva, poškozují hormonální systém a nepříznivě ovlivňují rozmnožování a těhotenství. Jsou toxické pro lidi, vodní organismy i živočichy, kteří se slávičkou živí např. rybožraví ptáci. Přes trofický řetězec se tak PCB dostane z biakumulativní slávičky do menší sladkovodní ryby např. *Neogobius melanostromus* a z té až do těla ptáka. Často to bývá rybák obecný (*Sterna hirundo*), jehož potravou mohou být kromě ryb i slávičky. V rybákovi pak bude koncentrace PCB nejvyšší a může ohrozit jeho reprodukční biologii (Ward et al. 2010).

V 1978–1979 došlo v Taiwanu k hromadné otravě asi 2000 lidí olejem na vaření kontaminovaným PCB a PCDF. Tento incident byl nazván Yucheng (Olejová nemoc). Otravy požitím způsobovaly u lidí například chlorakné, hyperkeratózu, hyperpigmentaci, nebo zánět Meibomovy žlázy. Také byly prováděny analýzy zkoumající vliv této otravy na reprodukční systém postižených žen. Z výzkumů byla zjištěna snížená plodnost, byly časté porody mrtvých dětí, nepravidelné menstruační cykly, kratší průměrná doba krvácení nebo zvýšení sérové hladiny estradiolu u žen vystavených PCB (Yang et al. 2008).

3.2.3 Účinek a schopnost bioakumulace PCB

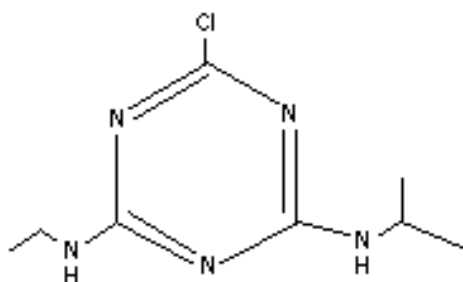
Stejně jako u jiných vodních organismů PCB nepříznivě ovlivňuje u sláviček hlavně schopnost reprodukce. K určení stavu reprodukce se slávičky pitvají, z jejich rozmnožovacích orgánů se udělají řezy a ty se vhodně nabarvené odeberou k mikroskopickému pozorování (Binelli et al. 2004b). Poměr pohlaví u sláviček bývá spíše v prospěch samiček, kolem 61,1–65,6 % z celkové populace (Roe & MacIsaac 1998).

Analýzy zaměřené přímo na účinek PCB na slávičky zatím nebyly provedeny nebo publikovány. Studie se více zabývaly akumulací PCB v slávičkách, jeho množstvím a faktory, které akumulaci ovlivňují. Příkladem může být Binelli et al. (2003a), který se

zabýval bioakumulací PCB přes trofický řetězec. Potvrdil fakt, že schopnost živočichů hromadit v těle PCB a jiné toxické látky se zvyšuje s vyšší úrovní potravního řetězce.

3.3 Atrazin

Atrazin nebo též S-triazin (chemicky 2-chlor-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-s-triazin) patří mezi nejvíce používané organochlorované pesticidy na světě (Zupan & Kalafatic 2003; Choung et al. 2013). Molekula atrazinu je tvořena jedním benzenovým jádrem s třemi navázanými atomu dusíku (1,3,5-triazin) a jedním chlórem. Obsahuje také dva aminy a to ethylamin a isopropylamin [Obrázek 6]. Patří rovněž mezi POPs, je stálý a nebezpečný pro životní prostředí a živé organismy.



Obrázek 6 - Strukturní vzorec atrazinu [6]

3.3.1 Vlastnosti, toxicita, použití

Tento pesticid je bezbarvá, krystalická látka, uměle vyrobená. Bod tání má kolem 176 °C, má malou rozpustnost ve vodě. Hustota při 20 °C se uvádí 1,187 g·cm⁻³ [6].

Je mírně toxický pro savce, více pro vodní organismy a pro člověka. Živočich i člověk se může nakazit pitím vody nebo dýcháním vzduchu v místech, kde byl atrazin použit [7].

V dnešní době se atrazin používá jako účinný herbicid pro potírání plevelů u kukuřice, čiroku, cukrové třtiny a dalších hospodářsky významných plodin (Zupan & Kalafatic 2003; Xing et al. 2013). Používá se i ve směsi s jinými pesticidy například s insekticidem terbufosem (Choung et al. 2013). Kvůli častému použití se v současnosti nachází v povrchových i podpovrchových vodách v Evropě a severní Americe, především v tekoucích vodách v zemědělských oblastech (Zupan & Kalafatic 2003).

3.3.2 Účinky atrazinu na vodní organismy a na člověka

Atrazin patří mezi látky reprotoxické a teratogenní. Poškozuje také ledviny, srdce a játra (Zupan & Kalafatic 2003).

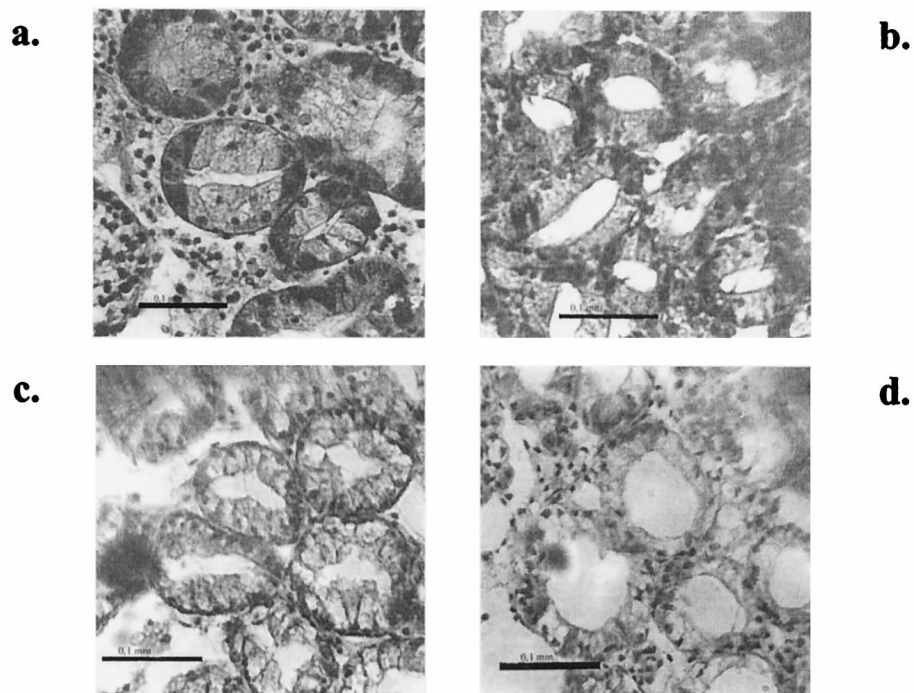
U ryb byly experimentálně zjištěny negativní účinky atrazinu na ledvinách, kde atrazin inhibuje enzym alkalickou fosfatázu, dále v játrech a žlázech. Analýzy dokázaly

poškození žaberního epitelu, vakuolizaci hepatocytů, fibrózu a nekrózu buněk okolních tkání a narušení rovnováhy ryb. V játrech došlo ke zvýšení vylučování sodíku, chloridu a proteinů (Xing et al. 2013; Zupan & Kalafatic 2003).

U sladkovodních mlžů (konkrétně u *Physa acuta*, *Lymnea palustris* a *Ancylus fluviatilis*) byly zaznamenány lýzy buněk ledvin. Vyšší koncentrace pesticidu měla negativní vliv na krmení, rozmnožování, růst a produkci vajíček. Stejný vliv byl zaznamenán také u perlooček a pijavic (Zupan & Kalafatic 2003).

3.3.3 Účinky atrazinu na slávičku

Histologické analýzy se zabývaly působením nižších koncentrací atrazinu (0,003, 0,05, 0,5 a 5 mg/l) na dospělých slávičkách. Výsledky analýz ukázaly, že nízké koncentrace atrazinu poškodili převážně hepatopankreas tohoto mlže [Obrázek 7].



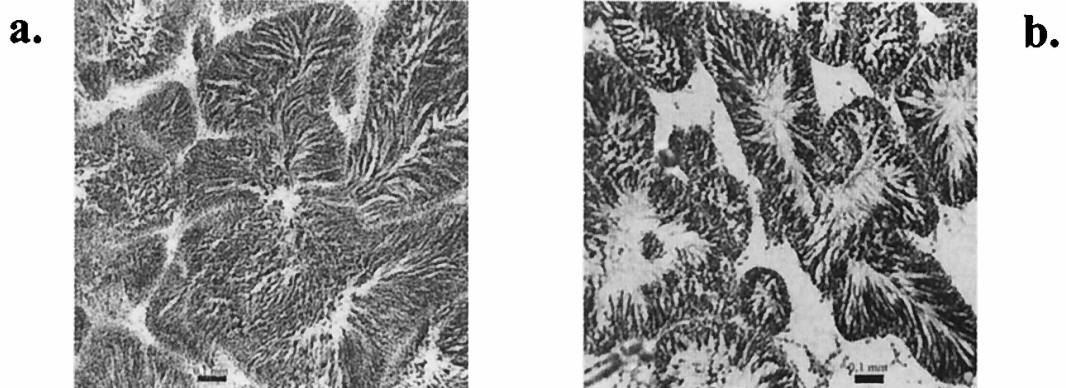
Obrázek 7 - Histologické snímky hepatopankreatu slávičky (a. bez zjevného poškození; b. mírné rozšíření lumenů a poškození intertubulární pojivové tkáně; c. rozšíření tubulárních lumenů, vakuolizace hepatocytů, částečná ztráta zažívání bočních buněk, poškození intertubulární pojivové tkáně; d. intenzivní poškození pojivové tkáně, postupné rozšiřování tubulárních lumenů, vakuolizace buněk a celková ztráta zažívání bočních buněk) (Zupan & Kalafatic 2003, upraveno Štachová 2013)

Tato slinivkojaterní žláza je orgán podobný játrům a slinivce břišní obratlovců, její funkce spočívá hlavně v trávení potravy, ale je také důležitá pro metabolismus bílkovin a detoxikační procesy. Bylo zjištěno, že intenzita poškození hepatopankreatu závisí na

koncentraci atrazinu a době expozice. Podle očekávání měla nejmírnější účinek nejnižší zkoumaná koncentrace tj. 0,003 mg/l. K analýzám byli používáni dospělí jedinci vylovení z chorvatské řeky Drava. Expozice trvala celkem 21 dnů. Slávičky byly kontrolovány po 7 dnech a mrtví mlži byli vždy ihned odstraněni. Před pozorováním v mikroskopu se dehydratované tkáně sláviček vložily do parafínu a nařezaly na 6–8 μm silné plátky. Poté se obarvily hematoxylinem a eosinem a byly vsazeny do kanadského balzámu.

Po 21 dnech expozice způsobila koncentrace 0,003 mg/l atrazinu jen mírné rozšíření tabulárních lumenů [obrázek 7b]. Naproti tomu stejné poškození způsobila koncentrace 0,05 mg/l už po 7 dnech expozice. Po 14 dnech způsobila rozšíření tubulárních lumenů, vakuolizaci hepatocytů, částečnou ztrátu zažívání bočních buněk a poškození intertubulární pojivové tkáně [obrázek 7c]. Největší poškození pojivové tkáně hepatopancreas bylo zaznamenáno po 21 dnech u koncentrace 0,5 mg/l (Zupan & Kalafatic 2003).

Atrazin také narušuje reprodukci savců a některých bezobratlých. Vyšší koncentrace atrazinu způsobily silné nekrózy pojivových tkání ve vaječnicích (ovarium) a varlatech (testes) slávičky mnohotvárné [Obrázek 8]. Nekrózy byly tak silné, že se od okrajů pohlavních žláz oddělovaly velké chomáče tkáně. Po 14 dnech expozice 5 mg/l atrazinu se objevilo poškození pojivové tkáně ve vaječnicích samic. U varlat samců bylo pozorováno poškození po 7 dnech vystavení koncentrace 0,5 mg/l. Byly také zaznamenány poruchy spermií (Zupan & Kalafatic 2003).



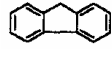

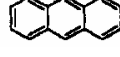

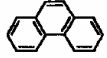
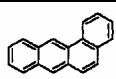

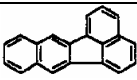
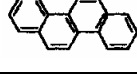




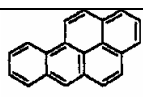
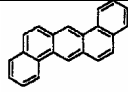
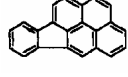
Obrázek 8 - Účinek atrazinu na varlatech slávičky (a. testes bez zjevného poškození. b. nekrotické změny pojivových) (Zupan & Kalafatic 2003, upraveno Štachová 2013)

3.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU, PAHs)

V současnosti se do látek označovaných jako polycyklické aromatické uhlovodíky zařazuje asi 100 chemických aromatických sloučenin. Všechny obsahují ve své molekule minimálně dva benzenové (aromatické) kruhy, které nenesou žádné heteroatomy ani substituenty [8]. Výsledná struktura molekuly je planární. To znamená, že všechny atomy uhlíku a vodíku leží v jedné rovině. Tyto sloučeniny se od sebe liší počtem a pozicí benzenových kruhů, fyzikálními a chemickými vlastnostmi (Manoli & Samara 1999). V půdách převládají spíše PAHs s menší molekulární hmotností než ty s větší (Cao et al. 2013).

Podle US EPA (Environmental Protection Agency) bylo označeno za prioritní znečišťující sloučeniny 16 PAHs, z nichž některé jsou v současnosti prokázány lidské karcinogeny. Patří tam například benzo(α)pyren, pyren, anthracen, dibenzo(α,h)anthracen, chrysen, fluoren, fenantren a naftalen (Manoli & Samara 1999; Cao et al. 2013). Všechny 16 aromatických sloučenin i se svými strukturami je zobrazeno v tabulce:

PAHs	struktura	tlak výparu [torr]	rozpustnost ve vodě [mg/l]
acenaften		10^{-3} - 10^{-2} (20 °C)	3,4 (25 °C)
acenaftylen		10^{-3} - 10^{-2}	3,93
fluoren		10^{-3} - 10^{-2}	1,9
naftalen		0,0492	32
anthracen		$2 \cdot 10^{-4}$	0,05-0,07
fluoranten		10^{-6} - 10^{-4}	0,26
fenantren		$6,8 \cdot 10^{-4}$	1-1,3
benzo[a]anthracen		$5 \cdot 10^{-9}$	0,01
benzo[b]fluoranten		10^{-11} - 10^{-6}	-
benzo[k]fluoranten		$9,6 \cdot 10^{-7}$	-
chrysen		10^{-11} - 10^{-6}	0,002

pyren		$6.9 \cdot 10^{-9}$	0,14
benzo[ghi]pyren		10^{-10}	0,00026
benzo[α]pyren		$5 \cdot 10^{-9}$	0,0038
dibenzo[α,h]anthracen		10^{-10}	0,0005
indeno[1,2,3-cd]pyren		10^{-10}	-

Tabulka 1 - PAU podle US EPA se strukturními vzorci a některými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (převzato z Manoli & Samara 1999, upraveno Štachová 2013)

3.4.1 Vlastnosti, toxicita, použití

PAHs patří mezi typické perzistentní organické polutanty. Také se hromadí v ovzduší, vodě, půdě a živých organismech a jsou v nich stálé (perzistentní). Z životního prostředí se dokážou transportovat jako plyny nebo aerosoly na dlouhé vzdálenosti od místa jejich výroby nebo použití (Jin et al. 2012; Manoli & Samara 1999). Faktory, které ovlivňují transport a distribuci jsou hlavně atmosférická depozice, teplota a obsah CO₂ (Jin et al. 2012).

Do životního prostředí se mohou dostat antropogenně (vlivem člověka) nebo přírodními procesy. Antropogenně vznikají například nedokonalým spalováním fosilních paliv, vypouštění komunálních a průmyslových odpadních vod, emisí z výfuku, úniků ropy a spalování odpadů, výrobou koksu, asfaltu nebo hliníku. Přírodním zdrojem PAHs je sopečná erupce a požáry (Jin et al. 2012; Manoli & Samara 1999; Cao et al. 2013).

Tyto sloučeniny se mezi sebou liší strukturou a fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Společné mají to, že čisté jsou krystalické, bílé až nažloutlé látky. Málo rozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v tucích [8].

Jsou označovány jako karcinogenní a mutagenní (způsobují mutace) (Jin et al. 2012).

3.4.2 Účinky PAU na vodní organismy a na člověka

U většiny PAU byly zjištěny genotoxické, mutagenní a karcinogenní vlastnosti (Binelli et al. 2008a; Jin et al. 2012). V současnosti jsou prokázány karcinogeny benzo(α)pyren, chrysen, inden(1,2,3 - c, d) pyren a benzo(b)fluoranten (Xia et al. 2013). PAHs také negativně ovlivňují endokrinní soustavu a rozmnožování (jsou reprotoxické) (Jones & Voogt 1999).

Do člověka se dostanou dýcháním (inhalací) znečištěného ovzduší při nedokonalém spalování uhlí, asfaltu, benzínu, nafty, tabáku a dalších (Xia et al. 2013). Tím mohou způsobit rakovinu plic, jater nebo močového měchýře. Při dermální expozici mohou vznikat kožní nádory a melanomy kůže. Bylo prokázáno, že způsobují i nádory prsu, vaječníků a krvetvorné tkáně (Siddens et al. 2012).

3.4.3 Účinky PAU na slávičku

Nejnámější prokázáný karcinogen je benzo(α)pyren. Binelli et al. (2008a) vyhodnocovali pomocí gelové elektroforézy jednotlivých buněk (SCGE) a mikronukleového testu (MN) genotoxické účinky benzo(α)pyrenu na červených krvinkách slávičky. Cílem vyhodnocování bylo tomuto genetickému a epigenetickému poškození v populacích předcházet a naučit se ho předvídat. Bylo zjištěno, že benzo(α)pyren poškozuje DNA slávičky, podle MN dokonce nevratně. Koncentrace, při které se začalo zvyšovat poškození DNA byla 0,8 nmol /g lipidů. Jedinci, na kterých se studie prováděla, byli asi 20 mm velcí a pocházeli ze subalpínských jezer v Itálii. Doba expozice byla u vyhodnocování SCGE testem 168 hodin a MN testem 96 hodin.

Podle Riva et al. (2011) docházelo u sláviček vlivem benzo(α)pyrenu také ke změnám v expresi proteinů. Exprese proteinů je součástí genové exprese, při níž se genetická informace z DNA přepisuje do mRNA a pak do struktury bílkovin (proteinů). Funkcí, strukturou, lokalizací a interakcí proteinů se zabývá proteomika [9]. Analýzy byly prováděny na dospělých jedincích o velikosti kolem 18–22 mm, vylovených z hloubky 3–6 m z jezera Lugano (severní Itálie). Nejvýznamnější proteiny, u kterých došlo ke změně exprese, byly proteiny fungující v oxidačním stresu, transdukci signálu, buněčných strukturách a metabolismu. Při analýze byla vyhodnocována obě pohlaví sláviček zvlášť. Výsledky ukázaly, že nižší koncentrace benzo(α)pyrenu vykazovaly u 71 % bílkovin vyšší tendenci k downregulaci, zatímco vyšší koncentrace u 91 % proteinů ukázala upregulaci (při upregulaci jsou buňky citlivější na podněty než při downregulaci [10]) (Riva et al. 2011).

Bourgeault et. al. (2010) zjišťoval vliv PAHs na fyziologický stav sláviček, včetně vlivu na trávicí a detoxikační enzymy a poškození DNA. Skupiny sláviček o velikosti 20–22 mm pocházely ze dvou různých míst. Z kanálu Meuse-Marne byly slávičky přeneseny do míst povodí řeky Orge (Francie) do Athos-Mons (downstream) a Villeconin (upstream). Po dvouměsíční expozici se fyziologický stav sláviček nezměnil, nebo dokonce zlepšil. Úmrtnost byla jen velmi malá (méně než 1 %) a všichni jedinci neustále rostli. Toto zlepšení fyziologického stavu mohlo být pravděpodobně zapříčiněno lepší kvalitou vody nebo větším množstvím potravy. Činnost dvou trávicích enzymů amylázy a celulózy se snížila. Aktivita detoxikačních enzymů GST (glutathion-S-transferáza) se snížila pouze na Athos-Mons. Až po 58 dnech bylo pozorováno poškození DNA v obou lokalitách. Vyhodnocování bylo provedeno pomocí MN testu a SCGE, větší poškození bylo v buňkách žaber než v červených krvinkách.

3.5 Účinky dalších vybraných POPs

Triclosan (TCS; chemicky 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol) je chemická látka s antibakteriálními účinky, rovněž patřící mez POPs. Je součástí mýdel, tělových mlék, zubních past, deodorantů a čisticích prostředků. Používá se také k výrobě hraček a textilu. Na krvinkách sláviček byly prováděny experimenty in vitro a in vivo a byly zjišťovány cytogenetické účinky triclosanu. Proteomická analýza dokázala, že TCS způsobuje zvýšení oxidačního stresu a změny v expresi proteinů v žábách. TCS ovlivňuje různé biologické procesy zejména ty, do kterých je zapojen vápník (Riva et al. 2012).

Trifenylcín (TPT) a tributylcín (TBT) patří mezi organické sloučeniny, vyskytující se v protihnilobných barvách. Zdrojem jsou odpadní vody (průmyslové a komunální), skládky a čistírny. Obě látky jsou vysoce toxické pro vodní organismy, TBT zejména pro měkkýše. U mořských měkkýšů způsobovaly deformace lastury (ulity) a negativně ovlivňovaly rozmnožování (způsobovali neplodnost samic) (Fent & Hunn 1991).

Ve slávičkách velkých asi 10–25 mm byly naměřeny ještě větší koncentrace těchto polutantů než u jiných měkkýšů. Na buněčné úrovni negativně ovlivňovaly u sláviček mitochondrie zahrnující oxidativní fosforylaci a inhibici enzymu ATP syntasy, jaterní proteiny a enzym oxygenasu (Fent & Hunn 1991). U embryí způsobily negativní změny a deformace, znesnadňovaly průběh embryogeneze (Faria et al. 2010).

U ryb (konkrétně *Phoxinus phoxinus*) vyvolaly degeneraci žloutkového vajíčku plůdku (Fent & Hunn 1991).

Do vodního prostředí se mohou také dostat hydrofilní polycyklické aromatické uhlovodíky obsahující ve své struktuře dusík (NPAH). Příkladem je sloučenina akridin (benzo[b]chinolin), která je odvozena od antracenu, ale je mnohem více rozpustná ve vodě. Molekula je tvořena třemi spojenými benzeny, prostřední benzenový kruh obsahuje dusík. Bylo zjištěno, že akridin má nepříznivé subletální účinky na rychlost filtrace sláviček. Experiment byl prováděn na dospělých slávičkách s délkou lastury 1,5–2 cm a rychlost filtrace byla měřena každých 48 hodin. Po 10 týdnech expozice se filtrační rychlost snížila na 75 % původní rychlosti a se zvyšující koncentrací polutantu se ještě více snižovala. Vyšší koncentrace a delší doba expozice měli za následek značný úhyn mlžů (Kraak et al 1997).

4 Pesticidy

V dnešní době se v zemědělských oblastech i doma běžně používají antropogenní pesticidy. Tyto chemické látky k hubení škůdců mají ve vyspělých zemích nízkou perzistenci, nehromadí se tak moc v živých organismech a v pobřežních oblastech bývají hodně zředěné. Jejich dělení je na základě druhu škůdců z řad rostlinných i živočišných. Sladkovodní druhy měkkýšů žijící v zemědělských oblastech jsou vystaveni mnohem vyšším koncentracím pesticidů než ty žijící u pobřeží (Damasio et al. 2010).

Pesticidy, které se používají k hubení škodlivých měkkýšů (mlžů a plžů) v zemědělství se nazývají molluskocidy. Mezi ně patří například metaldehyd, kofein, síran hlinitý, niklosamid, fosforečnan železitý, tributylcínoxid, modrá skalice a kyselina citónová [11].

Niklosamid je účinná chemická látka, prodává se jako molluskocid pod komerčním názvem bayluscide. Kromě hubení měkkýšů se bayluscide používá také jako lék proti tasemnicím [12]. Toxicita bayluscide a glyfosátového herbicidu roundup byla zkoumána průtokovou cytometrií u spermií slávičky mnohotvárné. Po expozici těchto dvou pesticidů se zhoršila životaschopnost spermií, která vedla až k snížení úspěchu spawning. Úspěch oplození ovlivňuje i fakt, že ne všechny spermie a vajíčka jsou k sobě kompatibilní, záleží hlavně na hustotě spermií, velikosti a kvalitě vajec. Tyto následky byly prokázány také u pesticidu methoxychlor, u kterého byly zaznamenány i vývojové vady spermií (Favret & Lynn 2010).

Mezi další pesticidy patří syntetický pyrethroidní insekticid cypermethrin. Tento půdní insekticid je celosvětově dosti používaný např. k hubení molů. Analýzy prováděné na *Mytilus galloprovincialis* zjistily, že cypermethrin má subletální účinky a to hlavně na činnost sifonů a byssových vláken měkkýšů. Navíc interaguje se sodnými kanály v nervových buňkách, které dávají povel k přenosu nervového signálu. Tyto kanály bývají normálně otevřené velmi krátkou dobu, několik milisekund. Při interakci s cypermethrinem zůstávají však otevřené déle v rámci až několika sekund. Následkem jsou opakující se impulsy ve smyslových orgánech a může to vést až k smrti živočicha (Ayad et al. 2011).

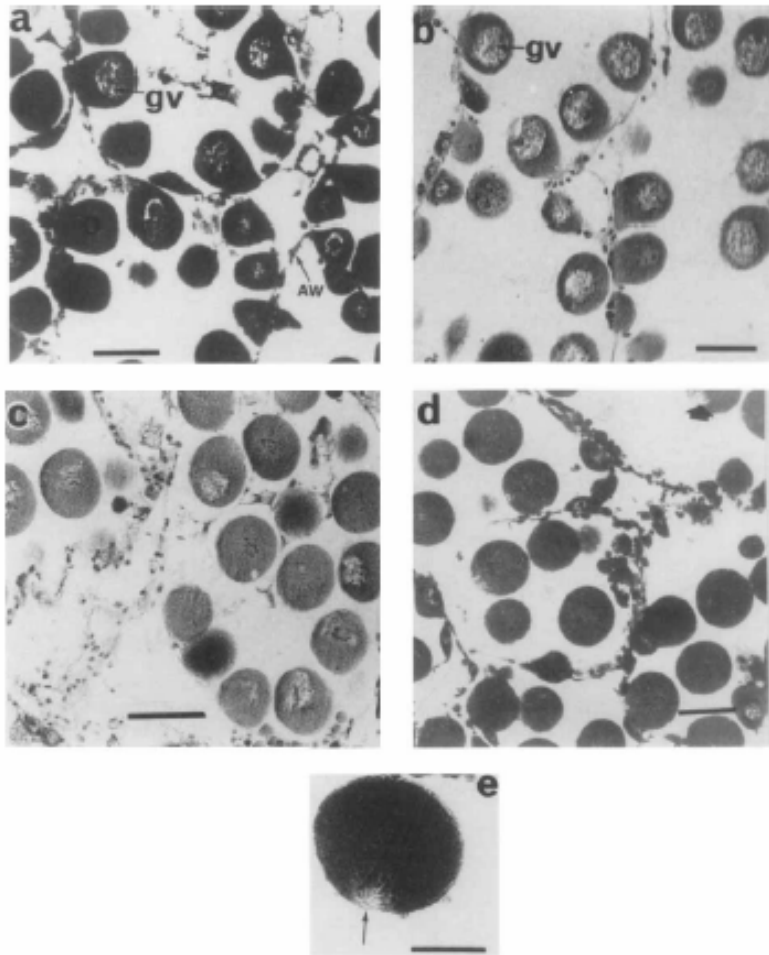
5 Léčiva

Během posledního desetiletí se k antropogenním perzistentním polutantům začaly řadit také farmaceutické sloučeniny. Kvůli jejich častému a širokému použití se dostávají kanalizací až do vodního prostředí, kde jsou nebezpečné pro živé organismy. Vyhodnocení toxicity farmaceutických sloučenin se provádí jen na jednotlivých izolovaných molekulách, přitom léčiva jsou směsi chemických látek. Důležité je, že toxicita směsi může mít větší účinek než účinek jednotlivých molekul (Parolini & Binelli 2012). Jak řekl alchymista Paracelsus, každá léčivá látka může být i jedem, všechno záleží na dávce, na množství.

Na slávičce mnohotvárné byly provedeny studie na toxicitu diklofenaku, ibuprofenu a paracetamolu tzv. NSAIDs (nesteroidní antirevmatika). Diklofenak (chemicky 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctová kyselina) a ibuprofen (2-(p-isobutylfenyl) propionová kyselina) léčí příznaky artritidy, revmatické poruchy, používají se jako analgetika proti potlačení bolesti a horečce. Paracetamol (N-(4-hydroxyfenyl)acetamid) se rovněž používá proti bolesti a vysoké teplotě, ale nemá protizánětlivé účinky. Tato léčiva působí stejně jako aspirin (kyselina acetylsalicylová) a to tak, že inhibují enzymy cyklooxygenázu (COX-1 a COX-2). Vyhodnocování cytotoxicity a genotoxicity bylo prováděno na červených krvinkách sláviček (délka lastury kolem 20 mm) pomocí MN testu, SCGE, DNA Diffusion testu a NRRA (Neutral Red Retention Assay). První nástup toxicity bývá často spojován s poruchami destabilizace membrán na lysozomech. Bylo zjištěno poškození DNA, zvýšení apoptických jader buněk a ovlivňování aktivity antioxidantních a detoxikačních enzymů (Parolini & Binelli 2012; Parolini et al. 2011a).

Dalším studovaným léčivem byl fluoxetin, který nepříznivě ovlivňuje endokrinní systém a reprodukci. Fluoxetin je selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (SSRI; 5-hydroxytryptamin; 5-HT). Serotonin je klíčovou látkou pro velké množství fyziologických procesů, reguluje zrání oocytů a průběh spawning a jeho inhibice způsobuje značné problémy (Bringolf et al. 2010). U samic je většina oocytů před uvolněním serotoninu v profázi I, po dozrání se dostanou do metafáze I, v které zůstanou až do spawning [Obrázek 9]. Serotonin uvolní dozrálé spermie a oocyty a tím umožní slávičkám se rozmnožovat (Fong et al. 1994a).

Mezi nejúčinnější inhibitory serotoninu patří látka methiothepin, která blokuje receptor 5-HT a tím i funkci serotoninu. Toto má za následek snížení spawning (oplození). Proti antagonistovi methiothepinu působí agonista metergolin. Metergolin patří mezi aktivátory serotoninu (aktivuje receptor) a umožňuje vypouštění především pohlavních buněk samců (spermii) (Fong et al. 1994a).



Obrázek 9 - Časový průběh aplikace serotoninu na zrání oocytů (a. bez aplikace 5-HT. Mnoho oocytů hruškovitého tvaru nesoucí germinální vesikly (gv), které jsou viditelně připojeny k acinárním stěnám (aw). b. Deset až dvacet minut po aplikaci 5-HT. Oocyty jsou kulatější, ale většina z nich má stále germinální vezikl (gv). c. Třicet minut po aplikaci 5-HT. Germinální vesikly se rozpadají (gvrđ), začínají dozrávat oocyty. Oocyty s gv mají neostře jaderné membrány a kondenzující chromozómy. d. Čtyřicet až padesát minut po aplikaci 5-HT. Oocyty jsou kompletní, šipka ukazuje dělicí vřeténk. e. oocyty v Metafazi I.) (Fong et al. 1994b, upraveno Štachová 2013)

Jiná studie se zabývala nežádoucími účinky léků atenolu, karbamazepinu, gemfibrozilu a opět diklofenaku. Atenol se používá při léčení kardiovaskulárních chorob, karbamazepin je antiepileptikum, kontroluje záchvaty. Diklofenak se používá ke snížení horečky a tlumení bolesti a poslední gemfibrozil působí na lipidy. Analýzy

byly prováděny na krvinkách, žábách a trávicích žlázách slávičky s délkou lastury 2,3–2,8 cm. Po expozici chemických látek došlo ke snížení životaschopnosti buněk každého typu, snížení činnosti trávicích žláz a mitochondrií v žaberních buňkách. Nejvíce toxickým byl shledán diklofenak (Parolini et al. 2011b).

6 Metodika diplomové práce

Po nastudování mnoha informací a postupů jsem se rozhodla, že bych ráda prováděla ve své diplomové práci histologické analýzy slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*) a zjišťovala jaké nepříznivé účinky na tkáně vyvolaly chemické polutanty. Slávička jako bioindikátor dokáže v sobě nahromadit různé chemické látky. Chemická látka, kterou si vyberu by měla být snadno dostupná, toxická, ale rozhodně by neměla být v České republice zakázaná. Jestli se bude jednat o léčivo, pesticid nebo jiný organický polutant zatím nevím, výběr bude ovlivněn dostupností látky.

Histologické analýzy studují tkáně a orgány. Z článků jsem vyčetla, jak se tyto analýzy provádí, jaké jsou obecné i konkrétnější postupy. Mnou přečtené studie byly prováděny na hepatopankreatu a rozmnožovací soustavě mlžů.

Vylovené dospělé slávičky o vhodné velikosti se vloží do akvária, do kterého se bude pravidelně přidávat určitá koncentrace toxické látky. Pro konkrétní analýzy se po době expozice očištění jedinci nechají stát asi týden v bouinově kapalině (kyselina pikrová, formol a kyselina octová). Vypreparuje se ten orgán, který chceme zkoumat (např. viscerální hmota). Tkáň se dehydratuje, vloží do parafínu a poté nastříhá na tenké řezy. Nabarví se hematoxilinem a eosinem (MERCK) a nechá se ztuhnout v kanadském balzámu nebo jiném konzervačním médiu. Histopatologické řezy se pozorují pod mikroskopem a zjišťují se případné deformace a změny.

7 Závěr

Problém chemických kumulačních látek je v současnosti stále hodně diskutované téma. Toxicita těchto látek může být různě velká v závislosti na její koncentraci, může ohrožovat život vodních živočichů i člověka. Nakládání, používání a výroba vysoce toxických látek, patřící mezi POPs, se řídí Stockholmskou úmluvou z roku 2001. Podle ní se musí, co nejdříve odstranit z výroby nebo značně omezit 12 látek. Patří mezi ně např. aldrin, chlordan, eldrin, dieldrin, heptachlor, mirex, toxafen, PCB a DDT.

Látky včetně všech POPs, pesticidů a farmaceutických sloučenin, které jsem v této práci zmínila, měly všechny negativní účinek na vodní živočichy. Často způsobovaly rakovinu, napadaly endokrinní a rozmnožovací systém, hepatopankreas, poškozovaly DNA, expresi proteinů, aktivitu enzymů apod. Mezi mé vybrané organické polutanty patřily DDT a jeho metabolity, PCB, PAU, atrazin, triclosan, tributylcín, trifenylicín a akridin. Jako příklad účinků farmaceutických sloučenin jsem vybrala ibuprofen, fluoxetin, atenol, karbamazepin, gemfibrozil, diklofenak a paracetamol. Pro posouzení toxicity jsem tu zařadila i pár pesticidů, bayluscide, cypermethrin, methoxychlor a roundup.

Bylo prokázáno, že se zvyšující úrovní trofického (potravinového) řetězce se zvyšuje koncentrace chemické látky v živočichovi. Proto byly nalezeny větší koncentrace u masožravých ryb a rybožravých ptáků než u slávičky. V rámci druhu *Dreissena polymorpha* byl pozorován trend, ve kterém nejmenší jedinci kumulovali v sobě nejvíce toxických polutantů oproti těm větším. Jenomže malí, drobní mlži menší než 1 cm by se špatně pitvali, a proto se používají ke zjišťování schopnosti bioakumulace o něco větší dospělí jedinci. Stáří u sláviček se nedá 100 % určit, lze jen odhadovat. Na velikosti tady nezáleží, i hodně malý jedinec už může být dospělý.

Cílem této bakalářské práce bylo získat, co nejvíce informací o problematice hromadění chemických látek v těle mlže slávičky mnohotvárné, o jejich toxicitě, vlastnostech a použití. Tyto poznatky využiji při psaní diplomové práce.

Seznam literatury

Ackerman, J.D. (1995): Zebra mussel Life History. Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada. 1-8.

Ayat, M.A., Fdill, M.A. & Mouabad, A. (2011): Effects of Cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and surfoval in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Archives of environmental contamination and toxicology 60: 463-470.

Bacchetta, R. & Mantecca P. (2009): DDT polluted meltwater affects reproduction in the mussel *Dreissena polymorpha*. Chemosphere 76: 1380-1385.

Berny, Ph., Lachaux, O., Buronfosse, T., Mazallon, M. & Gillet, C. (2002): Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as indicators of freshwater contamination with Lindane. Environmental Research Section A 90: 142-151.

Binelli, A. & Provini, A. (2003a): The PCB pollution of Lake Iseo (N.Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. Chemosphere 53: 143-151.

Binelli, A. & Provini, A. (2003b): DDT is still problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. Chemosphere 52: 717-723.

Binelli, A., Ricciardi, F. & Provini, A. (2004a): Present status of POP contamination in Lake Maggiore (Italy). Chemosphere 57: 27-34.

Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A. & Vailati, G. (2004b): DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. Aquatic toxicology 69: 175-188.

Binelli, A., Riva, C., Cogni, D. & Provini, A. (2008a): Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutation research 649: 135-145.

Binelli, A., Riva, C. & Provini, A. (2008b): Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. Environmental Pollution 151: 652-662.

Binelli, A., Riva, C., Cogni, D. & Provini, A. (2008c): Genotoxic effects of p,p'-DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(chlorophenyl)ethane) and its metabolites in zebra mussel (*D. polymorpha*) by SCGE Assay and Micronucleus test. Environmental and molecular mutagenesis 49: 406-415.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Calais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S. & Tusseau-Vuillemin, M-H. (2010): Lessons from a transplantation of zebra mussels into a Small Urban River: An integrated ecotoxicological assessment. Environmental toxicology 25: 468-478.

Breeveld, F.J.V., Vreden, S.G.S. & Grobush, M.P. (2012): History of malaria research and its contribution to the malaria control success in Suriname: a review. Malaria journal 11.

Bringolf, R.B., Heltsley, R., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D. & Cope, W.G. (2010): Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. Environmental toxicology and chemistry 29: 1311-1318.

Cao, X.F., Liu, M., Song, Y.F. & Ackland, A.L. (2013): Composition, sources, and potential toxicology of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in Liaoning, People's Republic of China. Environmental Monitoring and Assessment 185: 2231-2241.

Choung, C.B., Hyne, R.V., Stevens, M.M. & Hose, G.C. (2013): The ecological effects of a herbicide-insecticide mixture on an experimental freshwater ecosystem. *Environmental pollution* 172: 264-274.

Damasio, J., Navarro-Ortega, A., Trauler, R., Lacorte, S., Barcelo, D., Soares, A.M.V.M., Lopez, M.A., Riva, M.C. & Barata, C. (2010): Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology* 19: 1084-1094.

Faria, M., López, M.A., Fernández-Sanjuan, M., Lacorte, S. & Barata, C. (2010): Comparative to toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of the total environment* 408: 2452-2458.

Favret, K.P. & Lynn, J.W. (2010): Flow-cytometric analyse of viability biomarkers in pesticide-exposed sperm of three aquatic invertebrates. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58: 973-984.

Fent, K. & Hunn, J. (1991): Phenyltins in water, sediment, and biota of freshwater marinas. *Environmental Science Technology*. 25: 956-963.

Fong, P.P., Duncan, J., Hardege, J.D. & Ram, J.L. (1994a): Birth control in zebra mussels: inhibition and sex-specific activation of spawning by high affinity serotonergic ligands. *Proceedings of the fourth international zebra mussel conference*. 61-71.

Fong, P.P., Kyojuka, K., Abdelghani, H., Hardege, J.D. & Ram, J.L. (1994b): In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *The journal of experimental zoology* 269: 467-474.

Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D. (1999): Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science Technology*. 33: 133-141.

- Gossiaux, D.C., Landrum, P.F. & Fischer, S.W. (1996): Effect of Temperature on the Accumulation Kinetics of PAHs and PCBs in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. Journal of Great Lakes Research. 22(2): 379-388.
- Jin, G., Cong, L., Fang, Y., Li, J., He, M. & Li, D. (2012): Polycyclic aromatic hydrocarbons in air particulates and its effect on the Tumen river area, Northeast China. Atmospheric environment 60: 298-304.
- Johns, C. (2012): Trends of total cadmium, copper and zinc in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) along the upper reach of the St. Lawrence River: 1994-2005. Environmental Monitoring and Assessment 184: 5371-5385.
- Jones, K.C. & Voogt, de P. (1999): Persistent organic pollutants (POPs): State of the science. Environmental Pollution 100: 209-221.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E. & Padilla, D.K. (1997): The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in Eastern Europe. Journal of Shellfish research 16: 187-203.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E. & Padilla, D.K. (1998): Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). Journal of Shellfish research 17.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E. & Padilla, D.K. (2006): Growth rate and longevity of *Dreissena polymorpha* (Pallas): A review and recommendations for future study. Journal of Shellfish research 25: 23-32.
- Kraak, M.H.S., Ainscough, C., Fernández, A, Vlaardingen, P.L.A, Voogt, P. & Admiraal, W.A. (1997): Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. Aquatic toxicology 37: 9-20.
- Mackie, G.L. & Schloesser, D.W. (1996): Comparative biology of zebra mussels in Europe and North America: An overview. American zoology 36: 244-258.

Manoli, E. & Samara, C. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural water: sources, occurrence and analysis. *Trends in analytical chemistry* 18: 417-428.

Parolini, M., Binelli, A. & Provini, A. (2011a): Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety* 74: 1586-1594.

Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A. & Provini, A. (2011b): Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84: 91-100.

Parolini, M. & Binelli, A. (2012): Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology* 21: 379-392.

Rajagopal, S., Velde, G., Gaag, M. & Jenner, H.A. (2005): Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Marine Pollution Bulletin* 50: 20-29.

Roe, S.L. & MacIsaac, H. (1998): Temporal variation of organochlorine contaminants in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Erie. *Aquatic Toxicology* 41: 125-140.

Riva, C., Binelli, A., Rusconi, F., Colombo, G., Pedriali, A., Zippel, R. & Provini, A. (2011): A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo(α)pyrene: The role of gender and exposure concentrations. *Aquatic toxicology* 104: 14-22.

Riva, C., Cristoni, S. & Binelli, A. (2012): Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: A proteomic investigation. *Aquatic toxicology* 118-119: 62-71.

Sedlák E. (2002): *Zoologie bezobratlých*. Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta. 62-65.

Siddens, L.K., Larkin, A., Krueger, S.K., Bradfield, C.A., Waters, K.M., Tilton, S.C., Pereira, C.B., Löhr, C.V., Arlt, V.M., Phillips, D.H., Williams, D.E. & Baier, W.M. (2012): Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: Comparison of benzo(α)pyrene, dibenzo(det,p)chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 264: 377-386.

Sousa, R., Pilotto, F. & Aldrige, D.C. (2011): Fouling of European freshwater bivalves (Unionidae) by the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Freshwater biology* 56: 867-876.

Verween, A., Vincx, M. & Degraer, S. (2009): Comparative toxicity of chlorine and peracetic acid in the biofouling control of *Mytilopsis leucophaeata* and *Dreissena polymorpha* embryo (Mollusca, Bivalvia). *International biodeterioration & biodegradation* 63: 523-528.

Ward, M.P., Jablonski, C., Semel, B. & Soucek, D. (2010): The biological pathway and effect of PCBs on common terns in Lake Michigan. *Ecotoxicology* 19: 1513-1522.

Xia, Z., Duan, X., Tao, S., Qiu, W., Liu, D., Wang, Y., Wei, S., Wang, B., Juany, Q., Lu, B., Song, Y. & Hu, X. (2013): Pollution level, inhalation exposure and lung cancer risk of ambient atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taiyuan, China. *Environmental pollution* 173: 150-156.

Xing, H., Li, S., Wang, X., Gao, X., Xu, S. & Wang, Xi. (2013): Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Chemosphere* 90: 910-916.

Yang, C.Y., Wang, Y.J., Chen, P.C., Tsai, S.J. & Guo, Y.L. (2008): Exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans resulted in a prolonged time to pregnancy in women. *Environmental health perspectives* 116: 599-604.

Zupan, I. & Kalafatic, M. (2003): Histological effects of low Atrazine concentration on zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 70: 688-695.

Seznam elektronických zdrojů

[1] Holoubek, I. a kol.: Národní implementační plán pro Implementaci Stockholmské úmluvy v České republice. Projekt GF/CEH/01/003: ENABLING ACTIVITIES TO FACILITATE EARLY ACTION ON THE IMPLEMENTATION OF THE STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) IN THE CZECH REPUBLIC. TOCOEN, s.r.o., Brno v zastoupení Konsorcia RECETOX - TOCOEN & Associates, TOCOEN REPORT No. 293, Brno, leden 2006, 99 s. + 11 příloh. Dostupné z <<http://www.recetox.muni.cz/index.php?pg=narodni-pops-centrum--narodni-implementacni-plan>>

[2] REPEŠ, Kamil. Dichlordifenyltrichlorethan (DDT) [online]. Arnika.org [cit. 2013-02-12]. Dostupné z <<http://arnika.org/dichlordifenyltrichlorethan-ddt>>.

[3] Látka: DDT [online]. Integrovaný registr znečišťování [cit. 2013-02-12]. Dostupné z <<http://www.irz.cz/node/27>>

[4] PETRLÍK, Jindřich. Polychlorované bifenyly (PCB) [online]. Arnika.org [cit. 2013-02-15]. Dostupné z <<http://arnika.org/polychlorovane-bifenyly-pcb>>

[5] Látka: Polychlorované bifenyly (PCB) [online]. Integrovaný registr znečišťování [cit. 2013-02-15]. Dostupné z <<http://www.irz.cz/node/87>>

[6] Látka: Atrazin [online]. Integrovaný registr znečišťování [cit. 2013-02-17]. Dostupné z <<http://www.irz.cz/node/14>>

[7] REPEŠ, Kamil. Atrazin [online]. Arnika.org [cit. 2013-02-17]. Dostupné z <<http://arnika.org/atrazin>>

[8] Látka: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) [online]. Integrovaný registr znečišťování [cit. 2013-02-15]. Dostupné z <<http://www.irz.cz/node/86>>

[9] Overview of protein expression [online]. Pierce protein biology products [cit. 2013-03-21]. Dostupné z <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F46A98FE-C7DD-4868-AB2C-2E3C71FC84D1>>

[10] What is Upregulation? [online]. Wisegeek.com [cit. 2013-03-05]. Dostupné z <<http://www.wisegeek.com/what-is-upregulation.htm>>

[11] FIALA, Vladimír. Na slimáky- a jak [online]. Fima-brno.cz [cit. 2013-03-10]. Dostupné z <<http://www.fima-brno.cz/cz/index.php/page/41.html>>

[12] Baylucid [online]. Idruginfo.com [cit. 2013-03-10]. Dostupné z <<http://www.idruginfo.com/?cat=drug&s=baylucid>>