

# **VÝZNAM BIOINDIKACE A EKOTOXIKOLOGIE PŘI HODNOCENÍ KONTAMINACE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE: MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**

**BRNO 2015**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem mým blízkým; mé rodině, která je mi velkou oporou v mém konání, zvláště rodičům, mému partnerovi Josefu Čáslavskému, který můj pesimismus mění na optimismus a takto mi dodává energii pro další práci. Můj nemalý dík patří také profesorce Miladě Vávrové, která mě směřuje v mém pracovním životě a nedovolí ztratit směr a provází mě tak dlouho, že k mým blízkým také patří. Neméně děkuji i všem kolegům našeho ústavu, kteří mě dokážou podpořit a rozesmát.

## **Abstrakt**

S rozvojem lidské populace se denně zvyšuje počet nově syntetizovaných chemických látek. Ačkoliv pouhý zlomek z nich nachází své uplatnění, je naše životní prostředí těmito látkami kontaminováno. Nejčastěji a nejdéle diskutovanými polutanty byly bezesporu polychlorované bifenyly, které jako perzistentní organické sloučeniny jsou dosud detekovány téměř ve všech složkách životního prostředí.

Předložená práce je zaměřena na využití a posouzení vhodnosti bioindikátorových organismů pro odhad kontaminace právě těmito polutanty 20. Století, a to v akvatickém a terestrickém prostředí. Další část práce se zabývá principy a využitím ekotoxikologických testů v hodnocení účinků tzv. „nových“ polutantů zejména ze skupiny musk sloučenin a léčiv a možnostmi posouzení rizik, která jejich přítomnost v životním prostředí představuje.

### **Klíčová slova:**

ekotoxicita, ekotoxikologické testy, polychlorované bifenyly, syntetické vonné látky, léčiva

## **Abstract**

With the development of the human population the number of newly synthesized chemical substances is increasing. Although only a fraction of them find their application, our environment is contaminated by these substances. The most commonly discussed group of pollutants for longest time were undoubtedly polychlorinated biphenyls, which as persistent organic compounds have been detected in virtually all environmental compartments.

The presented work focuses on the use and assessment of the suitability of bioindicator organisms to estimate the contamination by these pollutants of the 20th century in the aquatic and terrestrial environment. The next part deals with the principles and application of ecotoxicological tests in the assessment of the effects of so-called "new" pollutants mainly from the group of musk compounds and drugs, and with possibilities of risk assessment aroused by their presence in the environment.

### **Keywords:**

ecotoxicity, ecotoxicological tests, polychlorinated biphenyls, synthetic fragrances, pharmaceuticals

# OBSAH

1 ÚVOD .....	5
2 EKOTOXIKOLOGIE A JEJÍ VÝZNAM PRO OCHRANU ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ.....	7
2.1 Ekotoxikologické biotesty.....	7
2.2 Chemické látky a matrice kontaminující ekosystém z hlediska ekotoxikologie.....	9
2.2.1 Chemické látky.....	9
2.2.2 „Nové“ environmentální polutanty.....	9
2.2.3 Syntetické vonné látky.....	10
2.2.3.1 Ekotoxicita musk sloučenin.....	14
2.2.4 Farmaka v životním prostředí.....	15
2.2.4.1 Antibiotika.....	16
2.2.4.1.1 Ekotoxicita antibiotik.....	19
2.2.4.2 Nesteroidní protizánětlivé látky.....	19
2.2.4.2.1 Ekotoxicita vybraných NSAIDs.....	21
2.2.5 Hasební prostředky na bázi tenzidů.....	23
2.2.6 Hasební prostředky a jejich dopad na životní prostředí.....	24
3 VÝZNAM BIOINDIKACE V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	29
3.1 Vymezení pojmu bioindikátor, bioindikace.....	29
3.2 Vlastnosti bioindikátorů.....	30
3.3 Polychlorované bifenyly a jejich stanovení.....	32
3.4 Vybrané Bioindikátorové organismy.....	35
3.4.1 Ryby jako bioindikátory.....	35
3.4.2 Volně žijící živočichové (lovná zvěř a drobní zemní savci) jako bioindikátory.....	37
3.4.3 Terestrické rostliny jako bioindikátory.....	40
3.4.4 Krev jako matrice pro indikaci zátěže persistentními polutanty.....	43
4 ZÁVĚR.....	46
5 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....	47
6 SEZNAM PŘÍLOH .....	54
7 PŘÍLOHY.....	55

# 1 ÚVOD

Předkládaná habilitační práce je zaměřena na význam bioindikace při hodnocení úrovně znečištění životního prostředí. Pro toto hodnocení je rovněž nezbytná ekotoxikologie, a to jako významná odvozená vědní disciplína, která rovněž přispívá ke správnému hodnocení úrovně znečištění všech složek životního prostředí.

Práce obsahuje nejen veškeré odborné aktivity předkladatelky habilitace, ale také její úvahy, poznatky a postřehy, které se týkají sledování kontaminace životního prostředí a rovněž možností jeho ochrany před působením nejen nebezpečných chemických látek a chemických prostředků, ale také kontaminovaných matric. Publikace, které tvoří základní část předložené habilitační práce, vznikly na dvou pracovištích, na nichž měla předkladatelka habilitace možnost tuto oblast vědeckého zájmu řešit.

Prvním pracovištěm byl Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (FVHE VFU Brno), kde hlavním předmětem zájmu uchazečky byla problematika související s monitoringem stavu životního prostředí, který probíhal v letech 1992 až 2000 pod záštitou Ministerstva životního prostředí v bývalém Československu. Pracovníci FVHE VFU Brno byli v rámci tohoto celostátního monitoringu pověřeni vzorkováním biotických matric na území Čech a Moravy, a to především těch, které mohou být následně využity jako bioindikátory při hodnocení kontaminace životního prostředí.

Nutno si uvědomit, že vzorkování je jedním z klíčových momentů pro získání objektivních, tzn. reprezentativních výsledků, které jsou nezbytné pro správné posouzení kontaminace daného ekosystému. Problematika vzorkování stojí často v pozadí zájmu analytika, který bývá soustředěn na finální analýzy prováděné na vysoce sofistikované instrumentaci; nicméně však pro správnou a přesnou analýzu je nezbytné, aby všechny postupy vedoucí k přesnému a správnému analytickému výsledku byly vypracovány na stejné úrovni, tj. aby jejich příspěvek k celkové nejistotě byl podobný a pokud možno co nejmenší. Tento požadavek platí nejvíce pro vzorkování, kde chyba provedená v tomto kroku může negativně i pozitivně ovlivnit konečný výsledek analýzy. V literatuře se prezentuje, že podle typu matrice se vzorkování na celkové nejistotě může podílet 40 až 90 % [1].

Pro účely vzorkování biotických matric v rámci tohoto monitoringu a tím i pro získání reprezentativních vzorků participovala předkladatelka habilitace na zpracování Standardních operačních postupů (SOP) pro vzorkování, a to především biotických matric živočišného původu, v rámci tohoto monitoringu Kontaminace životního prostředí ČR, který garantovalo, jak již bylo řečeno, Ministerstvo životního prostředí ČR. Dalšími jejími hlavními aktivitami na tomto pracovišti byla rovněž participace na analýzách některých vybraných kontaminantů ve vzorkovaných matricích. Podílela se zejména na provádění preanalytických postupů a následně také analýz založených vesměs na chromatografických separačních metodách, zejména na plynové chromatografii s detekcí elektronového záchytu, neboť na zmíněném pracovišti byla zjišťována zejména kontaminace persistentními organohalogenovanými polutanty typu polychlorovaných bifenyly a organochlorových pesticidů (DDT a jeho metabolity, hexachlorcyklohexan a jeho izomery, hexachlorbenzen, heptachlorepoxid, endrin, dieldrin, aldrin aj.).

Biotické matrice představují hlavní bioindikátory kontaminace daného ekosystému; poskytují informaci o jejich podílu, který je pro rostlinné nebo živočišné organismy biodostupný, tzn. o frakci, která je schopna překročit bariéry daného organismu. Princip bioindikace je v podstatě nejen součástí environmentální chemie, ale rovněž součástí ekotoxikologie; zde představuje jeden ze způsobů hodnocení expozice, které jsou zaměřeny na sledování hladin a rozšíření sledovaného toxikantu ve složkách životního prostředí. Do této skupiny hodnocení úrovně kontaminace patří analýzy organismů, které jsou ve svých tkáních schopny specificky kumulovat sledované

polutanty. Ze živočišných organismů se jedná především o volně žijící zvěř, drobné zemní savce, ptáky, ryby aj. Právě využití bioindikátorů, případně biotických matric pro indikaci kontaminace ekosystému bylo také oblastí odborného zájmu uchazečky na výše uvedeném pracovišti.

Další zaměření jejích odborných aktivit již souviselo s nástupem předkladatelky habilitace na Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně. Zde byl již vyučován předmět Ekotoxikologie, avšak pouze formou přednášek, bez přímé návaznosti na praktická cvičení, která by měla být zaměřená především na provedení a osvojení si praktických dovedností tohoto předmětu. Seznámení studentů s prováděním ekotoxikologických testů se uskutečňovalo převážně formou exkurzí na Krajské hygienické stanici v Brně.

Po svém nástupu na pracoviště, a to ve spolupráci s garantem předmětu Ekotoxikologie, se jmenovaná začala zabývat problematikou praktického zavádění a využití ekotoxikologických testů jako nástroje hodnocení úrovně kontaminace životního prostředí. V současnosti se zaměřuje na hodnocení ekotoxicity nejen různých xenobiotik, pro která jsou na našem ústavu optimalizovány preanalytické a analytické postupy, ale rovněž i kontaminovaných matric, které se úmyslně nebo neúmyslně, mohou dostávat do ekosystému. Jedná se zejména o kaly z čistíren odpadních vod, sedimenty, odpadní vody apod. Veškeré tyto matrice jsou současně analyzovány a je u nich zjišťován obsah nejen prioritních polutantů, ale také léčiv, syntetických vonných látek, tenzidů apod.

V následujících kapitolách popisujících výše specifikované okruhy je prezentován obecný úvod se stručným komentářem již zveřejněných publikací, tématicky se vztahujících k řešené problematice. Další část předložené habilitační práce potom tvoří kopie již zveřejněných publikací.

Životní prostředí, zejména jeho kvalita, je v poslední době poměrně často diskutováno. Z tohoto důvodu je nutné zopakovat, co vlastně pojem životní prostředí představuje. Podle definice organizace UNESCO je to ta část světa, se kterou je jedinec (organismus) ve vzájemné interakci. Znamená to, že se jedná o tu část, kterou jedinec používá, ovlivňuje a přizpůsobuje se jí. Obecně se jedná o soubor všech vnějších podmínek, které obklopují jedince, populaci nebo živý systém, a poskytují mu všechny nezbytnosti k životu, přičemž toto působení je obousměrné. Každý druh organismu však vyžaduje jiné životní podmínky, které jsou mu vlastní a jsou pro něho nezbytné.

Člověk je v podstatě součástí přirozených i umělých ekosystémů a nemůže bez nich existovat. Na ochranu životního prostředí je proto zapotřebí pohlížet jako na nezbytnou každodenní součást našeho života. V tomto směru je ochrana životního prostředí rovněž dána Zákonem o životním prostředí č.17/1992 Sb. [2], který vychází z principu trvale udržitelného rozvoje. Tento zákon definuje životní prostředí jako vše, co vytváří přirozené podmínky existence organismů včetně člověka a je předpokladem jejich dalšího vývoje. Jeho složkami jsou zejména ovzduší, voda, horniny, půda, organismy, ekosystémy a energie. V tomto zákonu je rovněž definován pojem „Únosné zatížení území“, které představuje takové zatížení území lidskou činností, při kterém nedochází k poškozování životního prostředí, zejména jeho jednotlivých složek, funkcí ekosystémů nebo ekologické stability.

Tento obecný úvod definoval životní prostředí a nastínil osobní zodpovědnost každého z nás za kvalitu životního prostředí. Nicméně ve vědecké rovině existuje mnoho možností, jak přispět k ochraně, popř. ke zlepšení již poškozeného životního prostředí. Jedna z významných poměrně mladých disciplín, která k tomu nemalou měrou přispívá, je právě ekotoxikologie.

## **2 EKOTOXIKOLOGIE A JEJÍ VÝZNAM PRO OCHRANU ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

Ekotoxikologii jako vědu poprvé definoval francouzský vědec René Truhaut v roce 1969. Charakterizoval ji jako odvětví toxikologie zabývající se studiem toxického efektu přírodních nebo syntetických látek na složky ekosystému, živočichy (včetně člověka), rostliny a mikroorganismy v integrálním kontextu, což znamená, že se zabývá studiem toxického působení látek přírodního nebo antropogenního původu na živé organismy, na jejich společenstva a populace [3]. Ekotoxikologie je poměrná mladá interdisciplinární věda; na rozdíl od toxikologie studuje efekty látek v jejich přirozeném prostředí. Znamená to, že do interakce mezi organismem a toxikantem vstupuje prostředí, které velkou měrou rozhoduje o tom, zda látka bude pro organismus biodostupná a zda následně dosáhne místa účinku, kde se projeví toxicky. Toto objasnění lze považovat za zásadní rozdíl mezi toxikologií a ekotoxikologií [4]. Z výše uvedených aspektů rovněž vyplývá podstata ekotoxikologie; jedná se o studium toxických účinků chemických látek na biotu a příslušný ekosystém. Toxické účinky jsou studovány zejména v závislosti na osudu chemických látek v životním prostředí, popisovaném prostřednictvím chemie životního prostředí, a úzce souvisí především s jejich biodostupností. Kromě toho se ekotoxikologie zabývá studiem toxického působení látek přírodního nebo antropogenního původu nejen na živé organismy, ale rovněž na jejich společenstva a populace, přičemž tyto účinky jsou sledovány na různých úrovních organizace živé hmoty. Kromě toho se tato věda zabývá i jejich monitoringem v životním prostředí. V tomto směru navazuje na environmentální chemii, jejíž podstatou je sledování osudu chemických látek ve složkách životního prostředí, a také na analytickou chemii životního prostředí.

Vzhledem k tomu, že chemické látky přírodního i antropogenního původu jsou nezbytnou součástí našeho života, směřují v posledních letech veškeré snahy k tomu, aby tyto látky nepředstavovaly vážné riziko pro člověka i pro životní prostředí. Při řešení výše specifikovaných ekotoxikologických otázek využívá ekotoxikologie dva základní přístupy. Prvním z nich je retrospektivní ekotoxikologie, která studuje a hodnotí efekty chemických látek, případně kontaminovaných matric, které se již v ekosystémech nacházejí, a to jako důsledek negativní činnosti člověka. V podstatě můžeme konstatovat, že retrospektivní ekotoxikologie je formou „environmentální epidemiologie“. Tyto přístupy jsou vhodné zejména pro hodnocení starých zátěží, kdy se posuzuje toxicita různých kontaminovaných matric (zemina, voda aj.), případně efekty látek, které se již do životního prostředí uvolnily, aniž by kdy před tím byla posouzena jejich ekotoxicita. Druhý přístup, tzv. prospektivní ekotoxikologie, využívá naopak různé postupy a metody s cílem zjistit případné dopady chemických látek nebo kontaminovaných matric na ekosystém. Prospektivní ekotoxikologie testuje nové chemické látky a přípravky, například pesticidy ještě před uvedením na trh, a rovněž slouží k hodnocení míry jejich ekologického rizika. Podstatou tohoto ekotoxikologického přístupu je také prevence proti vstupu takových látek do životního prostředí, které by mohly negativně ovlivňovat nejen jedince, ale následně i celý ekosystém [5]. Hlavními metodami retrospektivní ekotoxikologie jsou terénní studie a dlouhodobý monitoring, zatímco základní metodou prospektivní ekotoxikologie jsou ekotoxikologické testy.

### **2.1 EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY**

Ekotoxikologické biotesty představují v ekotoxikologii klíčový nástroj pro hodnocení účinků látek, případně jejich směsí nebo kontaminovaných matric, které mohou do ekosystému vstupovat záměrně nebo zcela náhodně. Slouží k určení druhu a míry nepříznivého působení látek na testovací organismy. Informace, získané z testů ekotoxicity, jsou následně používány pro hodnocení rizik spojených s výskytem testovaných látek v životním prostředí. Ke sledování

účinků, které toxická látka v biosystému po expozici vyvolá, využívají biotesty biosystémů jakékoliv úrovně organizace živé hmoty, tj. od buňky, jedinců, populace, biocenózy až po komplexní ekosystémy. Nutno však upozornit na to, že přímé účinky v daném testovacím organismu vyvolá pouze látka, která je v daných podmínkách expozice biodostupná, což znamená, že po vstupu do organismu dosáhne místa účinku a vyvolá reakci. Podstatou biotestu je expozice testovacího systému různým koncentracím testované substance za přesně definovaných podmínek.

Ekotoxikologické testy umožňují posoudit vztah mezi dávkou a odpovědí biosystému. Požadavky kladené na tyto testy jsou následující: měly by být standardizované, snadno proveditelné a měly by být ekologicky relevantní.

Standardizace znamená jednoznačně definovaný postup jednotlivých metodik, podle kterých je ekotoxikita testována, což je předpokladem reprodukovatelnosti a porovnatelnosti výsledků různých laboratoří, které pro hodnocení ekotoxikity aplikují stejné testy ekotoxikity. Jednoduchost a snadná proveditelnost testů přispívá k možnosti otestovat celou řadu chemických látek, a to za přijatelných ekonomických nákladů. Protože vstoupilo v platnost nařízení REACH, splnění těchto výše specifikovaných požadavků umožňuje posoudit, otestovat a registrovat celou řadu nových látek v přijatelných časových horizontech. Dalším požadavkem pro ekotoxikologické testy je, že musí být relevantní. Tento požadavek se poněkud odlišuje. Ekologická relevantnost znamená, že testovací podmínky se budou co nejvíce blížit podmínkám, které se vyskytují v reálných ekosystémech; znamená to, že výsledky takto provedených testů budou co nejvíce odpovídat reálným situacím. Nutno si však uvědomit, že testy v mikrokosmech, mesokosmech, případně ekologické terénní studie jsou ekonomicky velmi náročné a zajištění reprodukovatelnosti podmínek při tomto uspořádání testovacího biosystému je téměř nereálné. Vždy je zapotřebí dopředu zvážit, k jakému účelu bude prováděná studie sloužit [4, 5], jaké testy, případně jakou baterii testů musíme zvolit; rovněž nelze zapomenout na to, že je vždy nezbytné interpretovat výsledky s ohledem na to, jak byly získány [6]. Důležité je také to, že vždy musíme respektovat prostředí, do kterého se uvažované látky mohou dostat. V souvislosti s tím došlo k rozdělení ekotoxikologie na akvatickou, která byla rozpracována jako první, a terestrickou, která je zaměřena především na testování látek a matric v kontaktním uspořádání, tj. s využitím kontaktních testů ekotoxikity s organismy půdních ekosystémů, případně organismů, které jsou v akvatických ekosystémech vázány na prostředí sedimentu.

I v této souvislosti je nutné upozornit na to, že i když jsou biotesty jedinou cestou, kterou můžeme získat informace o ekotoxikologických charakteristikách chemikálií, nebezpečných odpadů apod., je stanovení stopových množství kontaminantů metodami chemické analýzy při hodnocení environmentálních rizik stejně významné. Zatímco analytické postupy umožňují kontaminující látky identifikovat a kvantifikovat, ekotoxikologická hodnocení umožňují posoudit případné negativní dopady environmentálně relevantních koncentrací těchto látek na biotickou složku ekosystému. Aplikované biotesty poskytují také informace o interakcích mezi chemickými látkami (adice, synergismus, antagonismus), dále o toxických efektech těchto látek po jejich případné degradaci a transformaci, o biodostupnosti určité chemické látky, při kterém hraje zásadní roli prostředí, tj. akvatický nebo terestrický ekosystém [4].

Rozvoj aplikace biotestů byl velmi dynamický, takže v současnosti již rozlišujeme čtyři generace biotestů. Do testů I. generace zařazujeme tzv. testy standardní, testy II. generace, označované jako alternativní, představují miniaturizované varianty testů standardních, a testy III. generace posuzují efekty, které určité polutanty vyvolávají; znamená to, že jsou založeny na principu indikace biochemické změny v organismu, kdy se používají tzv. biomarkery k průkazu přítomnosti polutantu a jeho negativního efektu. Mezi testy IV. generace patří tzv. alertní systémy, využívající k identifikaci změny v chování organismů (*Daphnia magna*, *Danio rerio* – zástupci bezobratlých a ryb, kteří se nacházejí v pozorovacích jednotkách, monitorování prostřednictvím



čidel), statistického vyhodnocení těchto změn a určení přítomnosti chemických látek v blízkosti testovacích organismů.

## **2.2 CHEMICKÉ LÁTKY A MATRICE KONTAMINUJÍCÍ EKOSYSTÉM Z HLEDISKA EKOTOXIKOLOGIE**

### **2.2.1 Chemické látky**

V registru chemických látek Chemical Abstract Service (CAS) bylo ke dni 14. 10. 2015 zapsáno 102 166 895 známých přírodních a člověkem syntetizovaných chemických látek [7]. Odhaduje se, že člověk komerčně využívá ve větším množství cca 100 000 látek, ze kterých lze připravit cca 2 miliony chemických směsí (výrobků). Pouze malá část těchto látek a výrobků je dostatečně prozkoumána z hlediska jejich negativních účinků na zdraví člověka a ještě méně jich bylo sledováno z hlediska jejich vlivu na životní prostředí. V minulosti byly chemické látky používány, aniž by bylo objektivně zhodnoceno jejich environmentální chování a negativní dopady používání těchto látek pro životní prostředí. Příkladem mohou být často diskutované PCBs, freony, organochlorové pesticidy (např. DDT, HCH, HCB) aj. V současnosti je již doporučována a deklarována nezbytnost uvážlivého zacházení člověka s novými chemickými látkami. Na podkladě tohoto principu vzniklo i nařízení evropské unie REACH (Registrace, Evaluace a Autorizace Chemických látek); cílem tohoto systému je vylepšit v Evropě zastaralý legislativní systém pro chemické látky. Důslednou realizací REACH by mělo být do roku 2020 dosaženo toho, že v EU budou vyráběny, používány a také dováženy pouze chemické látky se známými vlastnostmi, jejichž bezpečnost bude předem prověřena [8]. Pro hodnocení vlivu chemických látek a přípravků na životní prostředí se rovněž používají již definované testy prospektivní ekotoxikologie. Na podkladě výsledků těchto testů je možno klasifikovat chemické látky a přípravky a zařadit je do příslušných skupin nebezpečnosti, případně mohou výsledky těchto testů sloužit jako podklad pro hodnocení ekologických rizik v procesu EcoRa (Ecological Risk Assessment) nebo ERA (Environmental Risk Assessment). Výsledky všech těchto deklarovaných testů nám umožňují komplexně posoudit vliv testovaných látek na životní prostředí a následně navrhnout taková opatření, aby tyto látky nemohly mít negativní účinky na životní prostředí, včetně člověka [6]. V současnosti platí, že tzv. "nové" chemikálie musely být před uvedením na trh testovány, avšak pro již tzv. "existující" chemikálie žádná taková ustanovení neplatila, přestože nebyly k dispozici veřejně dostupné informace pro účely efektivního posouzení a kontroly těchto látek. Tzv. "existující" a "nové" chemikálie rozlišuje nařízení (ES) 793/93; z tohoto nařízení vyplývá, že všechny chemikálie, které se na trhu Evropského společenství vyskytovaly v období od 1. ledna 1971 do 18. září 1981 [uvedeno na Evropském seznamu existujících obchodovaných chemických látek (EINECS)], se nazývají "existující" chemikálie. Jejich počet se odhaduje na 100 000 a "nových" je pouze něco přes 3800.

### **2.2.2 „Nové“ environmentální polutanty**

Termín „nové environmentální polutanty“ (též emergentní polutanty; v angličtině Contaminants of Emerging Concern – CEC) zahrnuje především antropogenní kontaminanty, které se do složek životního prostředí dostaly za posledních několik desetiletí. Tato skupina látek zahrnuje zejména persistentní organické polutanty (POPs), tj. polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, organochlorové pesticidy (DDT a jeho metabolity), retardéry hoření na bázi polybromovaných sloučenin a detergenty.

V poslední době se výzkum v této oblasti zabývá novou skupinou organických znečišťujících látek, které se již delší dobu nacházely zejména ve vodním prostředí, avšak až v nedávné minulosti byly posouzeny jako potenciálně nebezpečné pro životní prostředí. Jedná se především o léčiva a

látky používané v produktech pro osobní péči (PPCP – Pharmaceuticals and Personal Care Products); PPCP tvoří velmi různorodou skupinu látek, která je obsažena v produktech osobní péče, jako jsou mýdla, sprchové gely, šampony, parfémy, kosmetika, čistící, prací a opalovací prostředky. Do této skupiny patří rovněž dezinfekční prostředky, vonné látky přírodního i syntetického původu, repelenty proti hmyzu, konzervanty, UV filtry a léčiva. Farmaka a prostředky osobní péče vytvářejí skupinu organických mikropolutantů, která má stále větší význam v environmentální chemii. Hlavním důvodem je nejen jejich velké množství a možnost úniku do prostředí, ale především to, že již byly detekovány v povrchové, podzemní a dokonce i v pitné vodě. O jejich toxicitě existuje v literatuře jen velmi málo údajů [9]. S výjimkou léčiv jsou určeny k vnějšímu použití a tudíž nejsou vystaveny metabolickým změnám, takže do životního prostředí se dostávají nezměněny. Jejich vstup do recipientu je závislý na tom, zda je technologie aplikovaná v čistírnách odpadních vod (ČOV) schopna tyto látky efektivně z vody odstranit [10, 11]. Vzhledem k množství výše deklarovaných chemických přípravků, které je každoročně používáno, a také z důvodu jejich perzistence spolu s biologickou aktivitou ve smyslu prokázané endokrinní disrupce jsou tyto látky považovány za potenciálně nebezpečné sloučeniny [12]. Velké množství léčiv podléhá po podání degradaci; znamená to, že se mohou stát inaktivní, případně, pokud nejsou zcela absorbovány, mohou opouštět organismus příjemce v původní formě nebo být transformovány nebo konjugovány s endogenními substráty na polární látky [13]. Tyto konjugáty mohou být v rámci čistícího procesu v čistírnách odpadních vod snadno odštěpeny a v aktivní formě se opět mohou jako farmaceuticky aktivní látky (PhACs – pharmaceutically active compounds) dostávat do recipientu [14]. Konečným příjemcem pro mnohé z těchto kontaminantů je akvatický ekosystém, a to buď v důsledku přímého vypouštění odpadních vod nebo probíhajících hydrologických a atmosférických procesů.

V poslední době bylo publikováno, že mnohé z těchto látek jsou perzistentní v životním prostředí, ovlivňují různými způsoby necílové organismy, přičemž zejména závažná je skupina tzv. endokrinních disruptorů (hormonální nebo environmentální endokrinní disruptory, EDC – endocrine disrupting chemicals). Do této skupiny jsou zařazovány zejména syntetické vonné látky, také nazývané „musk“ sloučeniny, které jsou obsaženy v prostředcích osobní péče. Vyznačují se především tím, že mají schopnost působit podobně jako hormony v endokrinním systému a takto ovlivňovat komunikaci mezi buňkami cílového organismu; tím narušují celou řadu fyziologických funkcí a mohou způsobit i navození abnormalit reprodukčního systému [15, 16].

Z krátkého úvodu vyplývá, že problematika léčiv a prostředků osobní péče není z hlediska environmentální chemie v ekosystémech zanedbatelná. Na našem ústavu byly vypracovány analytické postupy pro stanovení léčiv a syntetických vonných látek a tyto kontaminanty jsou již téměř 10 let zjišťovány především ve vodním prostředí, v posledních letech i v některých matricích odebraných v terestrických ekosystémech. V důsledku toho byl získán přehled o jejich koncentracích v odpadních vodách i v povrchových vodách Jihomoravského kraje; proto bylo po zavedení testů ekotoxicity přistoupeno i k ekotoxikologickému hodnocení vybraných látek. Prvními z nich byly syntetické vonné látky ze skupiny nitro-, polycyklických a lineárních.

### 2.2.3 Syntetické vonné látky

Termín „Musk“ je pojem, který je všeobecně používán pro soubor vonných dojmů z tinktur přírodního pižma. Tento pojem se začal používat v roce 1888, kdy německý chemik Albert Baur ve snaze připravit výbušninu s větší brizancí než trinitrotoluen syntetizoval první syntetickou vonnou látku, nazvanou po něm jako „Musk Baur“ neboli Baurovo pižmo [17]. Musk sloučeniny nebo také syntetické vonné látky jsou substance příjemné vůně, které jsou součástí produktů osobní péče (parfémy, mýdla, šampony) čistících prostředků, desinfekčních prostředků apod. Tyto sloučeniny byly uvedeny na trh začátkem 20. století a jejich průmyslová výroba se výrazně zvýšila zejména v posledních 50 letech [18]. Lze je rozdělit do čtyř hlavních skupin: nitromusk

sloučeniny, polycyklické, makrocyklické a alicyklické neboli lineární musk sloučeniny. Nitromusk sloučeniny byly syntetizovány jako první látky tohoto typu. Mezi nejvýznamnější zástupce patří musk xylen (MX), musk keton (MK) a musk ambrette (MA). Ve vodě jsou tyto chemické sloučeniny pouze omezeně rozpustné (0,15 mg.l<sup>-1</sup> pro MX; 0,46 mg.l<sup>-1</sup> pro MK), avšak jejich relativně vysoký distribuční koeficient oktanol - voda (log Kow = 4,4 pro MX, 3,8 pro MK a 4.0 pro MA) indikuje vysoký bioakumulační potenciál. Rovněž se předpokládá, že jejich degradační produkty jsou potenciálně vysoce toxické [19]. Vzhledem k těmto prokázaným negativním vlastnostem jsou postupně nahrazovány a celosvětová produkce MX a MK v roce 2000 poklesla na 200 tun a má dále klesající tendenci [20].

Z důvodu nestability nitromusk sloučenin v alkalickém prostředí a jejich fotochemické reaktivitě byly hledány nové alternativy těchto sloučenin. Jako první z těchto alternativ byl v roce 1952 uveden na trh phantolid. Jednalo se o první musk sloučeninu bez nitroskupiny uvedenou na trh; v té době nebyla ještě detailně známa jeho struktura, která byla objasněna až o čtyři roky později (6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethylindan; AHDI). Tato látka se stala základem pro vývoj dalších vonných substancí ze skupiny polycyklických musk sloučenin. Phantolid vykazuje dobrou stabilitu a hydrofobicitu; těchto jeho vlastností se využívalo v pracích prostředcích. Dalšími polycyklickými musk sloučeninami byly traseolid (ATII), celestolid (ADBI) a galaxolid [21]. Celosvětová spotřeba polycyklických musk sloučenin byla v roce 2000 přibližně 4000 tun [20].

Nejvýznamnějšími zástupci polycyklických musk sloučenin jsou galaxolid (HHCB), tonalid (AHTN), celestolid (ADBI), phantolid (AHMI) a traesolid (ATII) [22]. V porovnání s nitromusk sloučeninami jsou tyto chemické sloučeniny odolnější vůči světlu a alkáliím, což je hlavní důvod, proč jsou častěji obsaženy v kosmetických produktech a detergentech. Z tohoto poznatku však současně vyplývá, že snižující se produkce nitromusk sloučenin vyústila do zvýšené produkce polycyklických sloučenin. HHCB a AHTN vykazují toxicitu pro bezobratlé vodní organismy v koncentračních hladinách od ppb až po jednotky ppm [23]. Výše specifikované polycyklické musk sloučeniny jsou kvantifikovány v odpadních vodách na vstupu i na výstupu z ČOV, dále také v povrchové vodě a v sedimentech odebraných z vodních toků v různých oblastech Evropy. Bylo prokázáno, že úroveň kontaminace vodních toků je velmi závislá na vzdálenosti od ČOV. Kromě jejich nálezů ve vodních ekosystémech byly také detekovány v biotě [22].

Vývoj makrocyklických musk sloučenin byl zahájen již v roce 1926 rakouským chemikem L. Ruzickou [23], který charakterizoval jako hlavní aktivní složku přírodního pižma cibetky civeton; spolu se svými spolupracovníky navrhl postup pro syntézu této sloučeniny [24]. Jedná se o cyklické sloučeniny s 10 až 15 atomy uhlíku v cyklu. Přestože tyto sloučeniny vykazují výborné vlastnosti z hlediska jejich aplikace, jejich problematická syntéza a zejména vysoká cena jsou prozatím hlavním důvodem jejich omezené produkce [25].

Kromě toho se některá vědecká pracoviště zaměřila i na přípravu takových musk sloučenin, které by nevykazovaly negativní vlastnosti již známé u ostatních skupin těchto sloučenin. Bylo zjištěno, že těmto podmínkám vyhovují alicyklické neboli lineární musk sloučeniny. Základním požadavkem bylo syntetizovat takové chemické sloučeniny, které nebudou mít tendenci se bioakumulovat, budou biodegradabilní a finančně dostupné. Struktura lineárních musk sloučenin je odvozena z cykloalkylesteru. Prvním zástupcem této skupiny syntetických vonných látek byl cyclomusk, jehož struktura a vlastnosti byly publikovány v roce 1975 [26]. Do této skupiny musk sloučenin byl po 15 letech zařazen ještě helvetolid a v roce 2000 romandolid s méně ovocnou vůní [26, 27]. Protože se jedná o novou generaci musk sloučenin, nemáme o této skupině chemických látek ještě mnoho informací; proto je zapotřebí provádět další výzkum, který by měl být zaměřen zejména na sledování osudu, výskytu a účinku těchto látek na složky životního prostředí. Poměrně velké množství látek z této skupiny je produkováno českou společností AROMA Praha, a.s. Tato firma, která se zaměřuje především na vývoj a výrobu vonných a parfémových kompozic, nám poskytla standardy těchto syntetických vonných látek; v souvislosti s jejich studiem a sledováním

výskytu v ekosystémech byly na našem pracovišti vypracovány metody k jejich stanovení v odpadních a povrchových vodách a rovněž byly stanoveny jejich ekotoxikologické parametry v akvatickém prostředí.

Musk sloučeniny jsou lipofilní a persistentní chemické sloučeniny, které mají vysokou hodnotu distribučního koeficientu oktanol-voda, což predikuje jejich bioakumulační schopnosti. Tyto látky obsažené v produktech osobní hygieny se dostávají do odpadních vod a následně kanalizací do ČOV ve spádové oblasti. Ve studiích prováděných na našem pracovišti bylo již prokázáno, že v ČOV nedochází k jejich kompletní eliminaci, a proto se tyto vonné látky mohou dostávat do vodního ekosystému. Bylo již zjištěno, že při sledování koncentrace těchto látek ve vodním ekosystému závisí množství detekovaných látek na vzdálenosti od ČOV; se vzdáleností od ČOV klesá jejich koncentrace nejen v důsledku zředování, ale také v důsledku sorpce na sedimenty. Syntetické vonné látky byly rovněž detekovány ve vzorcích ovzduší a prachu odebíraných v uzavřených prostorách [28]. Několik již publikovaných studií dokumentuje také jejich výskyt ve tkáních akvatických organismů, dále v mateřském mléce, tuku a v krevní plasmě [29]. První zprávy o kontaminaci vodního prostředí nitromusk sloučeninami byly publikovány v Japonsku v roce 1981 [30]; v roce 1983 byla potom zveřejněna další studie [31], která se zabývala zejména zdroji těchto látek a rozsahem kontaminace odpadních vod, vod z recipientů a biotickými matricemi, tj. tkáněmi mušlí a ryb. Tyto studie potvrdily jednoznačně lipofilní charakter těchto látek a jejich tendenci k bioakumulaci v rybách a dalších vodních organismech [32]. Relativně vysoký rozdělovací koeficient oktanol/voda nitromusk sloučenin předurčuje jejich malou rozpustnost ve vodě, větší lipofilitu a s tím související tendenci k bioakumulaci v tukové tkáni a také k sorpci na sediment obsažený v recipientu; rovněž biologická rozložitelnost ověřovaná prostřednictvím standardních testů byla u těchto látek nízká. Vypočtený biokoncentrační faktor (BCF) pro musk keton byl 1380, pro musk xylen 1600.

V roce 1994 byla v Německu realizována studie, která byla zaměřená na sledování kontaminace bioty musk sloučeninami; v rámci této studie bylo analyzováno 145 vzorků ryb, garnátů a slávek, přičemž průměrné zastoupení musk xyleny bylo v rozmezí  $<0,01 - 1,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  lipidického podílu a musk ketonu v rozmezí  $<0,01 - 0,38 \text{ mg.kg}^{-1}$  lipidického podílu. Současně byl potvrzen ubikvitární výskyt těchto sloučenin a vysoký biokoncentrační potenciál [33]. V OSPAR reportu [34] jsou prezentovány výsledky Hajšlové a kol. [35] zaměřené na monitoring musk sloučenin ve tkáních ryb (viz Tabulka 1). Z prezentovaných dat vyplývá typické koncentrační spektrum jednotlivých musk sloučenin ve tkáních ryb: HHCB > AHTN >> MX > MK. Nitromusk sloučeniny (MX a MK) byly v rybách (jelec / cejn / parma / okoun / pstruh) běžně zjišťovány řádově v koncentracích desetin až setin  $\text{mg.kg}^{-1}$  tuku. Polycyklické musk sloučeniny galaxolid (HHCB) a tonalid (AHTN) se vyskytovaly řádově v desetinách až jednotkách  $\text{mg.kg}^{-1}$  tuku.

Z prezentovaných údajů vyplývá, že galaxolid a tonalid patří mezi nejvýznamnější zástupce polycyklických musk sloučenin; protože dosahují nejvyšších koncentrací ve vodním ekosystému, lze je rovněž použít jako organické indikátory pro indikaci přítomnosti odpadní vody ve vodním ekosystému [36]. Tyto musk sloučeniny rovněž nejeví ochotu biodegradace. Lze to zejména konstatovat na základě toho, že pro BCF galaxolidu byla v literatuře uvedena hodnota 600 a pro tonalid v poměrně širokém rozmezí 624-1584; jejich hodnoty  $\log K_{ow}$  jsou pro tonalid (AHTN) 5,7 a pro galaxolid (HHCB) 5,9 [34].

Tabulka 1: Koncentrace musk sloučenin v rybách z řeky Labe, Česká republika [34]

Syntetická vonná látka	Druh ryby	Koncentrace (medián) [mg.kg <sup>-1</sup> tuku]
Musk xylen	jelec tloušť	0,03 – 0,53
	pstruh	0,08 – 1,74
Musk keton	jelec tloušť	0,03 – 0,23
	pstruh	0,06 – 0,22
Galaxolid AHTN	jelec tloušť	0,6 – 2,4
	pstruh	0,3 – 3,1
Tonalid HHCB	jelec tloušť	0,4 – 2,7
	pstruh	0,3 – 2,2

V rozsáhlém přehledu Rimkuse [36] byly sumarizovány veškeré dosud známé informace o musk sloučeninách přítomných v akvatickém ekosystému. Nejvyšší koncentrace HHCB a AHTN byly stanoveny na přítoku a na odtoku z ČOV a v čistírenských kalech. Ve vodě odebrané na přítoku do ČOV byly vypočtené průměrné hodnoty HHCB a ANTH 1,46 a 2,24  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , zatímco ve vodě na odtoku z ČOV 1,09  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a 1,4  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . V povrchové vodě odebrané z řek, kanálů a jezer v okolí Berlína byly tyto dvě polycyklické musk sloučeniny také zjišťovány: analyzováno bylo celkem 30 vzorků a jejich průměrná koncentrace byla pro obě látky následující; galaxolid 2,492 1,344  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a tonalid 1,344  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . U kalů dosahovala maximální koncentrace poměrně vysokých hodnot, a to pro HHCB 63  $\text{mg kg}^{-1}$  sušiny a AHTN 34  $\text{mg kg}^{-1}$  sušiny. Vysoké koncentrace obou sledovaných syntetických vonných látek byly zjištěny i ve tkáních ryb odlovených z recipientů ČOV, kde byly jejich maximální koncentrace 159  $\text{mg kg}^{-1}$  lipidického podílu pro HHCB a 58  $\text{mg kg}^{-1}$  lipidického podílu pro AHTN. Ve vzorcích mořské vody byly pro tyto látky stanoveny koncentrace v řádu  $\text{ng.l}^{-1}$ , což je pravděpodobně způsobeno především vlivem naředění. Velmi často byla téměř ve všech publikovaných studiích koncentrace polycyklických musk sloučenin ve vzorku vyšší než koncentrace nitromusk sloučenin [33, 34], což koresponduje i s výsledky uvedenými pro povrchové vody: MK 4,8 – 390  $\text{ng.l}^{-1}$ ; MX 1,1 – 180  $\text{ng.l}^{-1}$ ; galaxolid 64 – 12470  $\text{ng.l}^{-1}$ ; tonalid 52 – 6780  $\text{ng.l}^{-1}$ .

V publikaci AI (viz přílohy) je uveden způsob izolace a stanovení těchto polutantů z odpadních vod, které jsme na našem pracovišti monitorovali na přítoku a odtoku čistírny odpadních vod ČOV Brno Modřice s kapacitou 513 000 EO. Hladiny v  $\text{ng.l}^{-1}$  pro HHCB se na přítoku pohybovaly v rozmezí hodnot 739-996, pro AHTN 192-262, pro MX 961-1223, pro MK 56-60. Na odtoku byly tyto hodnoty následující: pro HHCB 504-858, pro AHTN 80-180, pro MX 558-1491 a pro MK 33-54.

Tyto analyty byly sledovány také ve tkáních ryb (jelec tloušť), které byly odloveny před a za ČOV v Brně – Modřicích. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi obsahem musk sloučenin ryb odlovených nad výpustí a pod výpustí ČOV. Zjištěný obsah v rybách v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  živé hmotnosti byl následující: galaxolid 25,61, phantolid 0,51, musk ambrete 0,89, traseolid 0,92, tonalid 6,17, musk xylen 1,06, musk mosken 0,25, musk tibeten 0,21 a musk keton 2,23 [37].

Účinnost odstranění těchto látek byla v roce 2010 sledována na deseti ČOV v jihokorejském městě Busan, které má více než 5 milionů obyvatel. Sledovány byly dvě polycyklické musk sloučeniny (HHCB a AHTN) a dvě nitromusk sloučeniny (MK a MX). Celková koncentrace musk sloučenin se na přítoku do ČOV pohybovala v rozmezí 3,69 – 7,33  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a na odtoku z ČOV v rozmezí 0,96 – 2,69  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že nejúčinnější byl biologický stupeň čištění, v porovnání s procesy filtrace, dezinfekce nebo chemického čištění. Nejvyšší hodnoty byly kvantifikovány u HHCB na přítoku; dále následovaly AHTN, MK a MX. Stejný trend byl

prokázán také u odpadní vody odebrané na odtoku z ČOV. Kromě MX, byly výše specifikované musk sloučeniny zjištěny na přítoku i na odtoku všech sledovaných čistíren. Průměrná účinnost eliminace musk sloučenin za použití standardního biologického stupně čištění byla následující: odstraněno bylo 53 % HHCB, 56 % AHTN a 53 % MK. Lze se domnívat, že dochází zejména k sorpci na čistírenský kal, který se po aplikaci na zemědělské půdy může stát hlavním zdrojem těchto látek pro půdní ekosystém [38]. Eliminace syntetických vonných látek byla posuzována rovněž na našem pracovišti. Pro látky ze skupiny polycyklických musk sloučenin se účinnost jejich eliminace na ČOV Brno Modřice pohybovala v rozmezí 36,70 – 53,26 % pro analyty ze skupiny nitromusk v rozmezí 34,44 – 85,42 % [37].

**Příložená publikace A2** prezentuje postup izolace, metody stanovení a koncentrace lineárních musk sloučenin ve vzorcích odpadní vody odebírané na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice. Koncentrace zde uvedené v  $\mu\text{g.l}^{-1}$  jsou průměrem deseti po sobě následujících odběrů a na přítoku pro linalool byly 55,72, na odtoku pak 0,046, pro aroacet na přítoku 2,361 a na odtoku 0,0002, pro arofloron na přítoku 1,821 a odtoku 0,0007, pro lilial 0,491 na přítoku a 0,047 na odtoku. Linalool byl prokázán v nejvyšších koncentracích na přítoku v rozmezích 33-91  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , nižší koncentrace byly zjištěny pro aroacet a arofloron. Pro všechny lineární musk sloučeniny, kromě lilialu, byla v porovnání s nitro- a polycyklickými musk sloučeninami účinnost jejich odstranění v procesu čištění vynikající, tj. více než 99,5%. U lilialu se procento odstranění pohybovalo mezi 78,68 % až 96,13 %, což je rovněž velice uspokojivý výsledek. Tyto hodnoty potvrzují informace o charakteristikách tohoto druhu syntetických vonných látek, které by měly představovat takové chemické sloučeniny, které nebudou mít tendenci se bioakumulovat, budou biodegradabilní a budou finančně dostupné.

### 2.2.3.1 Ekotoxicita musk sloučenin

Musk sloučeniny mají relativně nízkou akutní toxicitu pro vodní organismy. Nicméně při delší expozici bylo pozorováno toxické působení těchto látek. V Tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty akutních toxicit pro různé druhy zástupců akvatických ekosystémů. Chronická toxicita byla testována na zebřičce (*Danio rerio*) v raných obdobích života. Hodnoty chronické toxicity nitromusk sloučenin jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 2: Akutní toxicita syntetických vonných látek pro zástupce akvatických ekosystémů [10]

Druh	Zjišťovaná veličina [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	MK	MX	Galaxolid HHCB	Tonalid AHTN
<i>Acartia tonsa</i>	48LC50	1,32	-	0,47	0,71
<i>D. magna</i>	24,48LC50	>5,6	-	-	-
<i>Nitocra spinalis</i>	96hLC50	>1,0	-	1,9	0,61
<i>Pseudokirchneriella supcapitata</i>	72hEC50	0,24		$\geq 0,85$	$\geq 0,80$
<i>Danio rerio</i>	96h přežití líhnutí	>0,4	>0,4	>0,67	>0,67
<i>Orizias latipes</i>	96hLC50	-	-	0,95	1,00

Tabulka 3: Chronická toxicita vybraných musk sloučenin [10]

Sloučenina	Organismus	Druh	Endpoint	Hodnota [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]
Musk keton	<i>Daphnia magna</i>	bezobratlý	21 dní přežití	LC50=338-675
	<i>Danio rerio</i>	ryba	8 týdnů reprodukce	LOEC=33
Musk xylen	<i>Daphnia magna</i>	bezobratlý	21 dní přežití	LC50=680
	<i>Danio rerio</i>	ryba	14 dní přežití	LC50=400
Galaxolid	<i>Daphnia magna</i>	bezobratlý	21 dní přežití	LC50=293
	<i>Danio rerio</i>	ryba	21 dní přežití	LC50=452
Tonalid	<i>Daphnia magna</i>	bezobratlý	21 dní vývoj, reprodukce	EC50=244
	<i>Danio rerio</i>	ryba	21 dní přežití	LC50=314

V příložených publikacích A1 a A2 jsou uvedeny výsledky hodnocení ekotoxicity sloučenin ze skupiny nitromusk, polycyklických a lineárních musk sloučenin. Například námi stanovená průměrná hodnota 24hEC50 pro organismus *D. magna* byla pro látky ze skupiny nitromusk sloučenin  $6,15 \text{ mg.l}^{-1}$  pro MX a  $6,14 \text{ mg.l}^{-1}$  pro MK. Pro zástupce polycyklických musk sloučenin byly tyto hodnoty pro galaxolid  $1,22 \text{ mg.l}^{-1}$  a pro tonalid  $1,51 \text{ mg.l}^{-1}$ , což je v souladu s literárními poznatky o větší toxicitě polycyklických musk sloučenin. Hodnoty 24hEC50 pro lineární musk sloučeniny na organismus *D. magna* byly až na výjimku lilialu ( $24\text{hEC}50 = 4,4 \text{ mg.l}^{-1}$ ) řádově vyšší (arocet:  $24\text{hEC}50 = 63,68 \text{ mg.l}^{-1}$ ; arofloron:  $24\text{hEC}50 = 53,63 \text{ mg.l}^{-1}$ ; linalool:  $24\text{hEC}50 = 156,26 \text{ mg.l}^{-1}$ ), což je v souladu s předpoklady o relativně nízké toxicitě této nejnovější skupiny syntetických vonných látek.

#### 2.2.4 Farmaka v životním prostředí

Léčiva jako biologicky aktivní látky jsou určena pro léčbu, lékařskou diagnostiku, případně jako prevence proti onemocnění. Jsou to v podstatě chemické sloučeniny, jejichž cílem je zlepšit kvalitu lidského života. Vzhledem k jejich rostoucí výrobě a spotřebě a následně i k rostoucímu vstupu těchto látek do životního prostředí se začíná negativně projevovat jejich vliv na přírodní ekosystémy. Negativně mohou působit buď obsahové nebo účinné látky přítomné v léčivech, případně také jejich metabolity a produkty transformace [39]. U léčiv je očekáván biologický účinek. Tato skutečnost je velmi důležitá s ohledem na osud těchto látek ve složkách životního prostředí a také na jejich působení na necílové organismy v něm žijící. Může docházet k ovlivňování potravních řetězců některých organismů, ke vzniku rezistentních kmenů bakterií a rovněž mohou být ovlivňovány technologické procesy používané na čistírnách odpadních vod. Léčiva, která jsou klasifikována jako tzv. mikropolutanty, se dostala do popředí zájmu zejména v posledních letech [40]. Jejich rezidua vstupují do složek životního prostředí třemi základními cestami. První cestou je úmyslný nebo neúmyslný únik z podniků vyrábějících léčiva, další cestu tvoří vypouštění veterinárních nebo zemědělských farmak po terapeutické nebo komerční aplikaci a třetí cesta je průnik humánních léčiv do prostředí, a to nejčastěji z odpadních vod zdravotnických zařízení a nemocnic [14]. Jejich zdrojem jsou rovněž exkrementy. Již provedené studie ukazují, že se u látek lépe rozpustných ve vodě může vylučovat až 90 % účinných látek a metabolitů močí, přičemž stolicí se vylučují léčiva lipofilnější povahy. Jejich průnik do životního prostředí může být také způsoben nezodpovědnou likvidací nepoužitých nebo prošlých léků splachováním do toalety. Jak již bylo prezentováno, jedním z významných zdrojů je rovněž zemědělství, zejména živočišná výroba, kde se za účelem zvýšení produkce používají růstové stimulanty, antibiotika (zejména jako profylaktika), ostatní léčiva potom při léčbě různých druhů nemocí, přičemž biotransformace

léčiv není efektivní pro všechny typy léčiv. V případě použití hnoje nebo močůvky ke hnojení mohou tyto biologicky aktivní látky vstupovat do ekosystému bez případné degradace na méně aktivní metabolity [14]. Léčivo, které je vyloučeno v nemetabolizované formě, vstupuje nejčastěji do odpadních vod jako biologicky aktivní substance, jejíž environmentální dopad není zcela objasněn [41]. Nemetabolizovaná léčiva patří často k nejhůře biologicky odbouratelným látkám vyskytujících se ve složkách životního prostředí [42]. Tyto chemické látky jsou často perzistentní a lipofilní; proto mají schopnost překonávat bariéru biomembrán, což jim umožňuje plnit specifické biologické funkce [39]. Obecně lze konstatovat, že metabolické procesy zvyšují rozpustnost těchto látek ve vodě, čímž usnadňují exkreci a minimalizují tak potenciální toxicitu [43]. Léčiva nejsou ve většině případů z odpadní vody v procesu jejího čištění na ČOV úplně eliminována [44]. Mnoho farmak, především však analgetika, stimulancia, nesteroidní antiflogistika, karbazepamin, artorvastatin, gemfibroxil a estradiol bylo identifikováno na odtoku z čistíren odpadních vod v rozmezí koncentrací od  $\text{ng.l}^{-1}$  do  $\mu\text{g.l}^{-1}$  [41]. To potvrzuje, že mikrobiální degradace ve spojení s koagulací nebo flokulací nejsou při odstraňování léčiv zcela efektivní [40, 41].

Léčiva mohou být degradována mikroorganismy aktivovaného kalu, mohou se sorbovat na čistírenský kal nebo odcházejí z ČOV beze změny přímo do recipientu, odkud jsou dále šířena do povrchových vod, které kontaminují. Největší problém představují antibiotika; tyto sloučeniny jsou speciálně určeny k potlačení růstu mikroorganismů a mohou proto narušovat bakteriální mikroflóru ČOV, která následně vykazuje horší efektivitu čištění. V tomto případě může mikrobiální inhibice vést k poklesu počtu mikroorganismů v provozních podmínkách ČOV a tím i k následnému poklesu účinnosti čištění. Tyto prezentované poznatky potvrzují to, že výstupy z ČOV představují jeden z významných zdrojů reziduí léčiv detekovaných v maticích odebraných ve vodním ekosystému. Takto může dojít až ke znečištění podzemních i pitných vod; samozřejmě však vždy záleží také na mobilitě lékové formy a také na její stabilitě [41, 42, 44]. Do půdy se léčiva dostávají nejčastěji z čistírenského kalu, který se používá ke hnojení, ale zdrojem může také být zavlažování povrchovou vodou, ve které je obsažena zcela nevyčištěná odpadní voda.

Léčiva patří do skupiny polutantů, které jsou někdy označovány termínem pseudopersistentní látky; tento termín objasňuje stav, při kterém jejich environmentální perzistence není sice vysoká, avšak díky jejich kontinuálnímu vstupu do složek životního prostředí je jejich environmentální hladina víceméně konstantní.

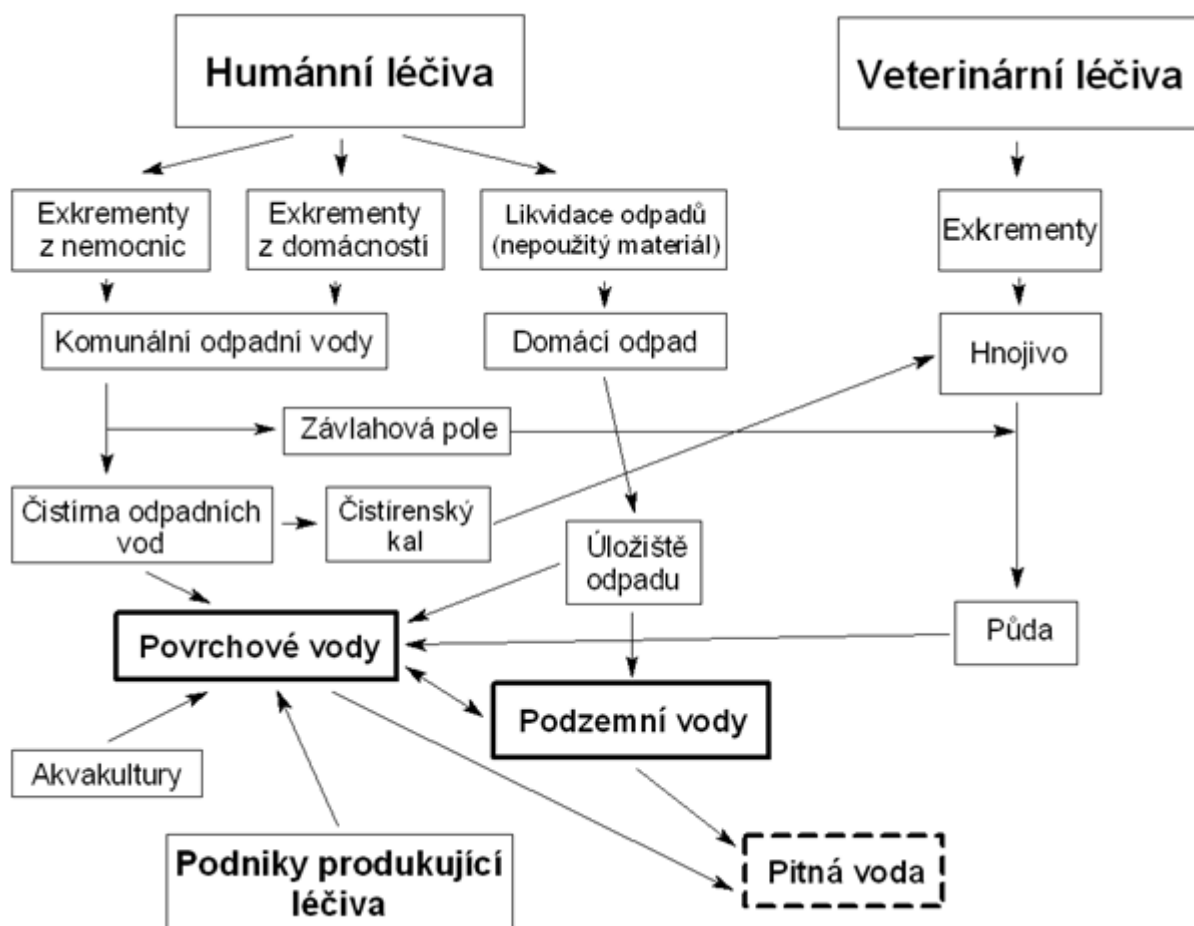
#### **2.2.4.1 Antibiotika**

Termín antibiotika původně označoval látky produkované mikroorganismy zasahující do růstu jiných mikroorganismů [45]. V současnosti se však za antibiotika považují i jejich syntetická analoga (např. penicilin V, ampicilin aj.), získaná syntetickými postupy ze základních látek, případně z polosyntetických prekurzorů. Označení „antibiotikum“ se váže k příslušné struktuře, nikoliv k reálnému původu látky [46].

Tato léčiva byla klasifikována jako prioritní rizikové látky, zejména vzhledem k jejich toxicitě vůči řasám a bakteriím. Antibiotika působí ve složkách životního prostředí různým způsobem: za prvé mají schopnost narušovat klíčové bakteriální procesy probíhající v povrchové vodě, dále cykly kritické v akvatické ekologii (nitrifikace/denitrifikace), v zemědělství by měly ovlivňovat půdní úrodnost prostřednictvím změn fixace dusíku, rozkladu organických látek apod. Kromě toho bylo prokázáno, že narušují potravní řetězce akvatických ekosystémů. Hodnoty jejich toxických dávek ve vztahu k bakteriím a mikrořasám jsou o 2 – 3 řády nižší než toxické hodnoty pro vyšší trofické úrovně [47, 48]. Primární klasifikace antibiotik vycházela z jejich efektu, a proto se rozdělovaly na baktericidní a bakteriostatické. V současnosti jsou rozdělována podle různých hledisek. Jedním z nejdůležitějších hledisek je jejich chemická struktura, podle které se dělí na peniciliny, tetracykliny, chinoliny,  $\beta$ -laktamová antibiotika, makrolidy, sulfonamidy aj. [47].



Antibiotika mohou zůstat ve složkách životního prostředí v nezměněné formě, případně zde můžeme detekovat i jejich degradační produkty. Pomocí výsledků prezentovaných v několika studiích bylo potvrzeno, že 30 – 90 % z dávky podaného antibiotika zůstává v nezměněné formě a v ekosystému ho jako kontaminant můžeme stanovit v této původní podobě [39, 44]. Kümmerer [47] uvádí, že až 70 % celkového množství těchto farmak bylo vyloučeno v nezměněné formě, tzn., že působí dosud jako aktivní substance. Vstup antibiotik do životního prostředí probíhá podobně, jak je tomu u ostatních farmak tzn., především v důsledku aplikace ve veterinární a humánní medicíně. Následně se pak dostávají do odpadních vod, a to především s exkrementy z domácností, nemocničních a zdravotnických zařízení. Dalším významným zdrojem antibiotik je zemědělská výroba, kde se antibiotika používají především jako profylaktika a růstové stimulanty; hnůj aplikovaný jako statkové hnojivo rovněž představuje vstup těchto látek do půdních ekosystémů. Jinou významnou cestou vstupu antibiotik do životního prostředí je jejich hojné používání v akvakultuře [44]. Zvyšující se podávání antibiotik v humánní i ve veterinární medicíně představuje velké riziko pro všechny složky životního prostředí. Množství antibiotik v životním prostředí neustále roste, což může vést až ke vzniku rezistence bakterií.



Obr. 1: Osud farmak v životním prostředí (upraveno podle [49])

Antibakteriální léčiva byla již detekována v sedimentech, dále na odtocích z čistíren odpadních vod, v kales z čistíren odpadních vod, v povrchových i podzemních vodách a již byla také kvantifikována v pitných vodách. Jejich koncentrace se vesměs pohybují v řádech  $\text{ng.l}^{-1}$  až  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Přestože jsou tyto úrovně velice nízké, v případě interakce těchto látek se složkami životního prostředí mohou negativně ovlivňovat necílové organismy a způsobovat tak závažné změny

ekosystémů. Nutno však upozornit i na to, že také antibiotika, která nebyla detekována, se mohou ve vodách vyskytovat v koncentracích pod mezí detekce používaných metod [47].

Již bylo řečeno, že antibiotika mají předpoklady narušovat procesy biologického stupně čištění v ČOV a ovlivňovat tak mikrobiální složku povrchových vod [40, 50]. V souvislosti s těmito poznatky je nezbytné konstatovat, že jejich rozšíření v životním prostředí představuje v současné době značný problém. Antibakteriální léčiva jsou velice stabilní, mohou se kumulovat v jednotlivých složkách životního prostředí, případně může docházet k jejich degradaci; v horším případě mohou vznikat biologicky aktivní metabolity, které mohou být nebezpečnější a mohou vykazovat i akutní toxicitu [47].

Stupeň eliminace antibiotik z odpadní vody závisí na mnoha faktorech. Jedním z nich je druh léčiva, dále technologie používaná na konkrétní ČOV, stáří aktivovaného kalu, schopnost antibiotik sorbovat se na čistírenský kal a v neposlední řadě také jejich degradace a transformace. Protože většina antibiotik je hydrofilní povahy, jsou vesměs v odpadní vodě přítomny v rozpuštěné formě. Je známo, že hydrofobní nepolární antibiotika se lépe sorbují na aktivovaný kal. Čistící procesy neodstraní léčiva z odpadní vody dokonale, míra eliminace antibiotik z odpadní vody se pohybuje mezi 30 – 90 % [39, 44].

Komplexní hodnocení účinků léčiv na organismy terestrických a akvatických ekosystémů nebylo v literatuře dosud prezentováno. V publikacích jsou převážně popisovány akutní účinky vybraných léčiv na organismy vodního ekosystému. Nutno si uvědomit, že v akvatickém ekosystému jsou navíc organismy vystaveny účinkům reziduí látek a jejich metabolitů po celý svůj vývojový cyklus. Současné znalosti i výsledky provedených studií naznačují, že léčiva přítomná ve složkách životního prostředí vesměs nevykazují akutní toxicitu [47]. Informace o chronické toxicitě a zejména o případném vlivu na multigenerační životní cyklus nebo na různá životní stádia jsou prozatím sporadické [51].

Ve většině zemí zatím není pro tyto účely vypracována platná legislativa; důvodem je především nedostatek informací z posouzení a zhodnocení ekotoxikologických rizik. Detailní metodické pokyny o hodnocení léčiv z hlediska možných nežádoucích dopadů na životní prostředí byly vydány regulačními institucemi pouze v několika málo případech. Jako příklad lze uvést Evropskou lékovou agenturu (EMA), která se zabývá udělováním licencí pro cytotoxické látky; tato navrhla jako hraniční hodnotu, tj. předpokládanou koncentraci v prostředí, která je pro životní prostředí nebezpečná, koncentraci  $10 \text{ ng.l}^{-1}$  pro jednotlivá léčiva. První doporučení pro testování ekotoxicity jako nezbytného předpokladu při registraci léčiv bylo realizováno pro nově registrované přípravky v roce 1995 Směrnicí Evropské unie 92/18 EEC a pro veterinární léčiva odpovídající „Note for Guidance“. Evropská komise následně vydala specifikující směrnici (direktiva 2001/83/EC), která nařizuje, aby povolení pro možnost aplikace léčivých přípravků pro humánní použití bylo doprovázeno zhodnocením rizikovosti pro životní prostředí [51]. Rizikovost těchto látek nespočívá jen v jejich vysoké spotřebě, ale také ve vstupu těchto látek do životního prostředí. Součástí rizikovosti je i posouzení jejich perzistence a v mnoha případech i biologické aktivity, s čímž souvisí i schopnost ovlivňovat klíčové biologické funkce. Kromě toho tyto substance působí v prostředí po dlouhou dobu, což vede k chronickému působení na přítomné organismy; důsledky tohoto působení se v běžných laboratorních testech vůbec neprojeví. Přestože již existují data o výsledcích akutních i chronických ekotoxikologických testů pro některá léčiva, jejich efekt v prostředí lze těžko odhadnout. Důvodem je to, že tyto látky se zde nevyskytují osamoceně, nýbrž v kombinacích různých směsí, a to nejen s léčivy, ale i s dalšími kontaminujícími látkami, jako jsou například pesticidy, prostředky osobní péče, rizikové prvky apod. Kromě toho, je obtížné odhadnout dlouhodobé efekty z výsledků testů akutních [51, 52].

#### 2.2.4.1.1 Ekotoxicita antibiotik

Ekotoxicita antibiotik pro akvatický ekosystém spočívá zejména v dopadech na sinice a bakterie, které jsou součástí vodního ekosystému a zastávají zde jak funkce producentů, tak v případě bakterií i rozkladačů. Toxické efekty uváděné u vyšších akvatických organismů jsou však prezentovány v hladinách environmentálně nerelevantních [47].

Jak již bylo dříve zmíněno, v případě kontaminace vodního ekosystému antibiotiky se pohybujeme v koncentracích na úrovni  $\text{ng.l}^{-1}$  až  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Toto množství má na organismus vliv z hlediska chronické toxicity, což znamená, že projev přítomnosti antibakteriálních léčiv se ukáže až po delších časových úsecích [48].

To potvrzuje i následující zdroj, ve kterém se uvádí, že akutní testy nejsou vhodným nástrojem k posuzování účinků antibiotik na bakterie [47]. Důvodem je především to, že antibiotika mají určité specifické funkce a dopady na necílové organismy, které jsou zřejmé až po prodloužené inkubační době. Testy s bakteriemi prokázaly, že vzhledem k negativnímu účinku je rozhodující chronická expozice antibiotiky, nikoliv akutní. Toto tvrzení je v souladu s údaji popsány v několika studiích, které se zabývaly především toxicitou novobiocinu, tetracyklinu, chloramfenikolu, ampicilinu a streptomycinu na bakterii *Vibrio harveyi*. Po krátké inkubační době, která je požadavkem popsané metodiky testu (30 – 60 minut), nebyly pozorovány téměř žádné toxické účinky na inhibici luminiscence jako sledovaného endpointu [53]. Ke stejnému závěru dospěl také Kümmerer [54] v testech s mikroorganismy aktivovaného kalu. Toxicita vůči řasám byla rovněž popsána; nutno však podotknout, že citlivost řas vůči antibiotikům je v závislosti na druhu velmi odlišná. Například v testech toxicity s řasou *Selenastrum capricornutum* bylo zjištěno, že tyto organismy jsou o 2 až 3 řády méně citlivé než sinice *Microcystis aeruginosa*. Růst této mikrořasy byl inhibován již při koncentracích nižších než  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  [55]. Velké rozdíly byly prokázány zejména mezi modrozelenými řasami, zelenými řasami a také vyššími rostlinami. Výjimku tvoří cyanobakterie, které patří mezi nejcitlivější [56].

Přestože se hodnoty toxicit vůči řasám řádově liší, nemohou být vyloučeny negativní efekty. Řasy jako producenti akvatických ekosystémů jsou základem potravních řetězců a pokles jejich množství může mít za následek disbalanci v těchto ekosystémech. Pokud je hodnocen vliv antibiotik na živočišné akvatické organismy, lze předpokládat, že rezidua těchto látek mohou mít dopady na jejich raná stádia, což se později může projevit na jejich populaci. Již bylo prokázáno signifikantní snížení líhnivosti u koryše *Artemia salina*, toxický efekt v podobě vysoké mortality u nauplií a inhibice reprodukce u *Daphnia magna*. Výsledky těchto studií rovněž dokumentují možnost ovlivnění nejen populací testovacích organismů, ale také navození disbalance ve vodním ekosystému, protože koryši jako zooplankton představují jeden z článků potravního řetězce. Rovněž bylo zjištěno, že antibiotika v environmentálně prokázaných hladinách nepůsobí toxicky na ryby; otázkou však zůstává chronická toxicita a aditivní, případně synergické, potenciační účinky těchto léčiv, které kontaminují akvatický ekosystém [54].

Kromě aplikace ekotoxikologických testů byly pro stanovení některých antibiotik vypracovány metody stanovení na principu separačních metod, které byly na našem pracovišti optimalizovány a validovány. Z antibiotik byly hodnoceny především makrolidy a sulfonamidy.

#### 2.2.4.2 Nesteroidní protizánětlivé látky

Nesteroidní protizánětlivé látky (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) představují v současné době nejčastěji aplikovaná farmaka k tlumení mírných a středně silných bolestí, dále ke snížení zánětlivých reakcí a rovněž jako antipyretika. Jsou to symptomatická léčiva potlačující bolest především periferním mechanismem a částečně i ovlivněním vnímání bolesti v CNS. Lze je zařadit do skupiny nenarkotických analgetik. U této skupiny látek vystupují do popředí zejména účinky antiflogistické (protizánětlivé). Přestože mají všechna tato léčiva podobný mechanismus

působení, u některých z nich vystupují do popředí více antipyretické vlastnosti, tzv. analgetika – antipyretika, u jiných zase naopak účinky protizánětlivé (nesteroidní protizánětlivé látky).

Již ve druhé polovině 18. století byla známa schopnost vrbové kůry (*Cortex salicin*) snižovat horečku. Počátkem 19. století z ní byl izolován antipyreticky účinný glykosid, který ukázal na počátku 19. století reálný směr výzkumu; výsledkem tohoto výzkumu byl objev kyseliny acetylsalicylové, která tvoří účinnou látku obsaženou téměř ve všech analgetikách. Výzkum pokračoval dále, v roce 1969 se začal vyrábět ibuprofen, který v současnosti patří mezi nejčastěji předepisované antiflogistikum a v sedmdesátých letech byl do praxe uveden diklofenak, další velmi rozšířené antiflogistikum a také naproxen jako první antirevmatikum se středně dlouhým biologickým poločasem eliminace. Devadesátá léta přinesla zcela novou generaci NSAIDs - tzv. selektivní inhibitory cyklooxygenázy II, vyznačující se prakticky absencí nežádoucích gastrointestinálních účinků.

Z hlediska chemické struktury lze nenarkotická analgetika rozdělit na deriváty anilinu, deriváty kyseliny salicylové, deriváty kyseliny anthranilové, deriváty 2-arylalkanových kyselin, tzv. kyselé enol-deriváty (různé typy enolizujících oxoheterocyklických sloučenin) a další. Bylo prokázáno, že v játrech dochází k intenzivní biotransformaci těchto látek za vzniku převážně neaktivních metabolitů prostřednictvím hydroxylace, oxidace a glukoronidace [57]. Vzhledem k tomu, že ani tato léčiva nebývají vždy kompletně eliminována v lidském ani zvířecím organismu, dostávají se do životního prostředí, kde mohou ovlivňovat přírodní ekosystémy. Analgetika a NSAIDs patří celosvětově k nejvíce užívaným skupinám léčiv. Pokud se týče jejich spotřeby, jsou celosvětově diklofenak, ibuprofen a ketoprofen na prvním místě. Důvodem je především to, že výdej těchto léků nevyžaduje lékařský předpis. Podle údajů zveřejněných Státním ústavem pro kontrolu léčiv byla analgetika a NSAIDs v České republice na prvním místě ve spotřebě počtu balení za rok 2010, kdy bylo spotřebováno 46,45 milionů balení léčiv, přičemž ibuprofen se na tomto počtu podílel 10,81 milionem balení, paracetamol 19,20 milionem balení, kyselina acetylsalicylová 7,96 milionem balení a diklofenak 4,09 milionem balení [20].

Výše specifikovaná léčiva patří do skupiny derivátů 2-arylalkanových kyselin a v posledních 15 letech byla rovněž nejčastěji detekována v životním prostředí. Ve Francii bylo v rámci jedné studie sledováno relativní zastoupení jednotlivých skupin léčiv detekovaných v životním prostředí; antibiotika s 18 % výskytu zaujímala první místo a NSAID s 16 % druhé místo; dále následovaly hormony, antiepileptika a betablokátory s 15 % [58]. Další z autorů studií zabývajících se touto problematikou provedl odhad, podle kterého se celosvětově spotřebuje až 940 tun diklofenaku ročně [59]. Zajímavé výsledky týkající se situace v evropských zemích byly publikovány Paxéusem, který porovnával koncentrace diklofenaku detekované v životním prostředí v 5 zemích EU; jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí 140 – 1480 ng.l<sup>-1</sup> [60].

Diklofenak a ibuprofen jsou v Evropě v odpadních vodách nejčastěji se vyskytující léčiva. Napomohly tomu i optimalizované analytické postupy, které byly použity pro sledování zejména analgetik a NSAID. Údaje prezentované pro ibuprofen a diklofenak byly pro různé evropské státy zpracovány pro odpadní a povrchové vody do přehledné Tabulky 4.

Tabulka 4: Koncentrace ibuprofenu a diklofenaku ve vodách vybraných evropských států [61]

Stát	Odpadní vody – přítok (ng.l <sup>-1</sup> )		Povrchové vody (ng.l <sup>-1</sup> )	
	ibuprofen	diklofenak	ibuprofen	diklofenak
Francie	219	488		
Rakousko	2679	4144		
V. Británie	405		18	8
Švédsko	751	111	56	669
Švýcarsko	4620	2940		
Španělsko	516	250	60	29
Německo			11	33
ČR (Brno)	25100*	10620*	1-140**	20-500**

\*přítok na ČOV Modřice

\*\*rozsah koncentrací zjištěný v řekách Svratka a Svitava

Nutno však upozornit na to, že koncentrace uvedené Lacinou [61] pro odpadní vodu odebranou na ČOV na přítoku, se týkaly pouze jedné čistírny odpadních vod, a proto nepředstavují průměr, což platí pro hodnoty koncentrací zjištěných v ostatních státech (Tabulka 4). Poskytují nám však představu o koncentraci těchto látek na přítoku ze spádové oblasti s cca 600 000 ekvivalentními obyvateli.

Množství odstraněné během čistících procesů se běžně uvádí v rozmezí 60 – 90 % pro středně polární léčiva. Také je známo, že polární léčiva bývají eliminována poměrně neúčinně, a to vzhledem ke svým hydrofilním interakcím. Velká část léčiv bývá v odpadních vodách odstraněna adsorpcí na aktivovaný kal, což částečně zprostředkovávají právě hydrofobní interakce [48]. Vyšší polarita léčiv má za následek to, že určité množství těchto látek zůstává ve vodě, která opouští ČOV a takto se tato léčiva mohou dostávat přímo do povrchových vod [44]. Polární léčiva, jakými jsou ibuprofen, naproxen, diklofenak a indomethacin (hodnoty pK<sub>a</sub> se pohybují v rozmezí od 4,1 do 4,9), jsou ve vodě obsaženy v disociovaném stavu, a proto se nesorbují na kal z ČOV a vyskytují především rozpuštěná ve vodě. Z těchto důvodů odstranění ibuprofenu a diklofenaku při čištění odpadních vod není zcela účinné. Účinnost eliminace pro diklofenak se pohybuje v závislosti na použitém technologickém procesu v rozmezí od 0 do 80 % [59]. Výsledky studie autorů, kteří kromě ibuprofenu sledovali i jeho metabolity hydroxy- a karboxy-ibuprofen, prezentují jejich až 95% odstranění z odpadní vody [62]. Nedostatečná eliminace léčiv na ČOV je hlavním důvodem, proč ovlivňují zejména organismy žijící ve vodě. Přestože rezidua analgetik v životním prostředí vesměs nepůsobí akutně na necílové organismy, jejich stále častější průkaz v různých složkách životního prostředí je alarmující. Z těchto důvodů je nezbytné zabývat se i jejich ekotoxicitou, a to také proto, že informace o jejich vlivech na organismy akvatického prostředí jsou nejednotné, případně úplně chybí.

#### 2.2.4.2.1 Ekotoxicita vybraných NSAIDs

Také NSAIDs mají nepříznivé účinky na akvatické organismy. Do následující tabulky byly sumarizovány ekotoxikologické hodnoty pro vybrané zástupce farmak pro vodní organismy, které byly vybrány z několika studií. Přestože se výsledky testů pohybují většinou řádově v jednotkách až desítkách mg, je třeba si uvědomit jejich pseudopersistenci a také naprostý nedostatek informací týkajících se chronické toxicity.

Tabulka 5: Ekotoxikologické hodnoty pro vybrané NSAIDs

Organismus	Ibuprofen [mg.l <sup>-1</sup> ]	Sodná sůl ibuprofenu [mg.l <sup>-1</sup> ]	Diklofenak [mg.l <sup>-1</sup> ]	Sodná sůl diklofenaku [mg.l <sup>-1</sup> ]
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	24hLC50: 7,1 <sup>***</sup>	72hEC50: 315* 72hEC50: 342,2**	24hLC50: 14,5 <sup>***</sup>	72hEC50: 72* 72hEC50: 71,9**
<i>Vibrio fischeri</i>			30minEC50: 0,011454 <sup>****</sup>	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>			48hEC50: 0,022704 <sup>****</sup>	
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50: 9,06 <sup>****</sup> 48LC50: 9,1 <sup>***</sup>	48hEC50: 108* 48hEC50: 101,2**	48LC50: 22,4 <sup>****</sup>	48hEC50: 68** 48hLC50: 22,4 <sup>****</sup>
<i>V. fischeri</i> ( <i>Microtox</i> )	5minEC50: 0,0123 <sup>****</sup>			
Ryby ( <i>druh nespecifikován</i> )	96hLC50: 173 <sup>****</sup>			
<i>Lemna minor</i>		168hEC50: 22*		168hEC50: 7,5*

\*Cleuvers 2003 [63]; \*\*Cleuvers 2004 [52]; \*\*\* Sanderson [64], \*\*\*\*Jemba [50]

U výsledků ekotoxikologických testů nebylo v literatuře převážně přesně specifikováno, o jakou chemickou látku se jedná a zda byla při sledování podpořena rozpustnost chemické látky vhodným rozpouštědlem. Na našem ústavu byla kromě stanovení těchto léčiv ve vodách zhodnocena účinnost jejich eliminace při čištění odpadní vody. Kromě toho bylo provedeno také ekotoxikologické hodnocení prostřednictvím organismů, které byly využívány v již zavedených testech ekotoxicity na našem ústavu. Byly testovány ampicilin a penicilín G ze skupiny makrolidových antibiotik, z NSAID ibuprofen a diklofenak. Podrobnější informace jsou uvedeny v **příložených publikacích A1 a A2**.

Ibuprofen se na přítoku ČOV Brno Modřice vyskytoval v rozmezí koncentrací 10,94–42,32  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a na odtoku v rozmezí 1,18–2,75  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Koncentrace diklofenaku na přítoku byly 1,09–9,46  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a na odtoku 1,02–2,17  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Na základě těchto hodnot byla vypočtena účinnost čistícího procesu pro ibuprofen 96 % a pro diklofenak 92 %, což je velmi uspokojující a lepší než publikovaná data, kde pro ibuprofen byla vyhodnocena účinnost odstranění větší než 90 % a pro diklofenak 39 % [65]. I pro tyto látky byla námi stanovena ekotoxicita. Diclofenac se projevil jako mírně toxičtější např. pro organismus *D. magna*; hodnoty 48hEC50 byly 17,2  $\text{mg.l}^{-1}$  a pro sodnou sůl ibuprofenu 56,4  $\text{mg.l}^{-1}$  (viz **publikace A1 a A2**).

V souladu s uvedenou literaturou i námi zjištěné výsledky potvrzují větší toxicitu pro diklofenak, avšak i tak by představovaly pouze malé riziko pro akvatický ekosystém, neboť reálné koncentrace těchto látek jsou řádově v  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Obdobná situace je i pro antibiotika. Pro penicilin G byla stanovena hodnota 48hEC50 na *D. magna* 878,5  $\text{mg.l}^{-1}$  a pro Ampicilín 850,5  $\text{mg.l}^{-1}$ . Tyto hodnoty indikují velmi nízkou akutní ekotoxicitu, nicméně vzhledem k tomu, že se jedná o látky se specifickým účinkem a k tomu, že ve vodě se nacházejí „koktejly“ těchto a mnoha dalších látek, je nezbytné nepodceňovat přítomnost reziduí těchto látek ve vodě.

### 2.2.5 Hasební prostředky na bázi tenzidů

Dalšími sloučeninami, u kterých bylo prováděno ekotoxikologické hodnocení, byly hasební prostředky na bázi pěn. Při hodnocení úrovně kontaminace životního prostředí je nutné si uvědomit, že každý hasební proces má své kladné i záporné stránky. Mezi kladné stránky patří pochopitelně rychlé uhašení požáru a zamezení jeho šíření, záporné stránky představuje potom následná kontaminace jednotlivých složek životního prostředí. Lze předpokládat, že ze všech složek životního prostředí budou nejvíce kontaminovány půdy; dále následuje vodní ekosystém a ovzduší. Pokud chceme charakterizovat vlastní proces hašení, tak je nezbytné konstatovat, že stále je nejpoužívanější hasební látkou voda, a to zejména pro svoji snadnou dostupnost. Aby došlo ke zlepšení jejích hasebních vlastností a rovněž k rozšíření možností jejího použití jako hasebního prostředku, jsou do ní přidávána různá aditiva. Mezi základní aditiva patří tenzidy.

Tenzid (surfaktant nebo saponát) je povrchově aktivní látka, která snižuje povrchovou nebo mezifázovou energii, a proto se samovolně koncentruje na fázovém rozhraní. Používané je také označení *surfaktanty* převzaté z angličtiny, zatímco název *tenzidy* byl odvozen z němčiny. Synteticky připravené tenzidy se také nazývají *saponáty* [66]. Tenzidy jsou chemické sloučeniny, které se staly součástí nejen mnoha přípravků, ale i technologií. Jsou obsaženy v pracích a mycích prostředcích, kosmetických přípravcích, jsou používány při výrobě potravin a v mnoha dalších odvětvích. Nicméně tenzidy nejsou pouze složkou produktů každodenní potřeby. Velmi důležitou roli hrají zejména při těžbě ropy, případně nerostných surovin, a v rafinačních technologiích. Ve velkých množstvích jsou používány rovněž jako pěnidla v hasebních prostředcích. Na základě tohoto výčtu lze konstatovat, že tak široké použití má málokterá skupina látek. S tím však souvisí rovněž vysoká míra uvolňování tenzidů do životního prostředí, kde mají, a to ve většině případů, negativní vliv na jednotlivé ekosystémy. Proto je snaha vyvíjet tenzidy, které jsou v biotických i abiotických systémech lépe rozložitelné. Kromě toho byla již zavedena různá legislativní opatření, která jsou zaměřena především na jejich používání a následné vypouštění do složek životního prostředí. Nicméně nutno konstatovat, že plošné používání tenzidů v hasebních prostředcích při likvidaci požárů je prozatím legislativně opomíjeno.

Důvodem řešení problematiky ekotoxikologického hodnocení hasebních prostředků na našem pracovišti bylo to, že v rámci výuky bakalářského studijního programu „Krizové řízení“ jsme spolupracovali s příslušníky HZS Jihomoravského kraje, z nichž mnozí byli našimi studenty. Na tomto základě jsme měli možnost získat k analýze matrice, které byly vzorkovány přímo na místě hasebního zásahu, a tyto jsme mohli následně testovat prostřednictvím testů ekotoxicity ve smyslu zákona o odpadech, tj. na podkladě posuzování výluhů testovaného materiálu. Získané výsledky nám umožnily posoudit, zda se jedná o odpad z kategorie nebezpečných odpadů. Do této kategorie jsme většinou zařadili ty půdní matrice, které při získávání výluhu třepáním pěnily.

Při hasebních zásazích se velmi často používají pěnové hasební prostředky, u nichž neexistuje mnoho poznatků o jejich vlivu na životní prostředí, a to především v podobě ekotoxikologických dat. Také informace o biodegradabilitě hasebních prostředků, které lze dosud získat pouze z bezpečnostních listů přiložených k hasebním prostředkům, jsou příliš obecné a nekonkrétní. Odborných studií zaměřených na tuto problematiku, zejména na posuzování biodegradability hasebních pěn, je velice málo a ne všechny získané údaje jsou reprezentativní a věrohodné. Pokud jsou vůbec uvedeny údaje o použité zkušební metodě, jsou příliš strohé a na jejich podkladě nelze pokus obvykle reprodukovat [67].

Hasební pěny jsou tvořeny směsí různých složek, zejména vody, povrchově aktivních látek, tj. tenzidů, dále organických rozpouštědel, polypeptidů, stabilizátorů pěn, inhibitorů koroze, konzervačních přísad a dalších aditiv [68]. Mechanismus hašení je v případě použití hasebních pěn proces fyzikální. Tento proces je založený na izolačním a chladícím efektu (izolace hořlavých par a plynů od pásma hoření). V současné době je pro hašení k dispozici několik typů pěnových koncentrátů. Jedná se o pěnidla proteinová (P - protein foam agents), syntetická (S - synthetic

foam agents) a odolávající alkoholu, která jsou vhodná zejména pro hašení polárních kapalin (AR - alcohol-resistant foam agents). Mezi proteinové koncentráty patří i pěnidla fluoroproteinová (FP) a fluoroproteinová tvořící vodní film (FFFP). Pěnotvorné přísady tvořící vodní film označujeme ve zkratce jako přísada AFFF (Aqueous Film Forming Foam). Mezi syntetické koncentráty potom patří, kromě standardních syntetických pěnidel, také pěnidla fluorosyntetická tvořící vodní film. Do skupiny koncentrátů odolávajících alkoholu spadají výše uvedená pěnidla s jistou modifikací, přičemž ta, která tvoří vodní film, se označují jako Alcohol resistant aqueous film forming foam - (AR-AFFF). Syntetické pěny jsou tvořeny směsí syntetických tenzidů a stabilizátorů; proteinová pěnidla jsou směsí produktů hydrolyzy granulovaných keratinových a stabilizačních a inhibičních přísad. Tato pěnidla produkují homogenní stabilní pěnové pokrývky. Fluoroproteinové koncentráty jsou tvořeny směsí proteinových pěnidel a fluorovaných tenzidů, jejichž úkolem je zvyšování tekutosti pěny. Více tekuté pěny zvyšují účinnost hašení a také odolnost pěny vůči hořícímu palivu [69, 70]. Všechny varianty pěnových hasebních prostředků jsou vysoce účinné při hašení velkých plošných požárů, avšak při jejich aplikaci dochází současně ke kontaminaci složek životního prostředí, zejména půdy [71]. Z dostupných dat jednoznačně vyplynulo to, že environmentální vlivy nejsou v České republice v současnosti při výběru pěnidel dostatečně zohledňovány. To může být způsobeno odběratelem, který tyto parametry nepožaduje, a dále také dodavatelem, který často není schopen environmentální vlastnosti pěnidel prokazatelně dokladovat. Některé parametry je možno získat z bezpečnostních listů pěnidel, kde by měla být uvedena toxicita pro vybrané vodní organismy, biologická odbouratelnost, CHSK a BSK<sub>5</sub>. Kromě toho by zde měly být prezentovány informace o způsobu likvidace náhodných úniků pěnidel a jejich zneškodnění [70].

## 2.2.6 Hasební prostředky a jejich dopad na životní prostředí

V posledních letech je možné pozorovat v České republice i ve světě zvýšený zájem veřejnosti o stav životního prostředí, a to zejména v lokalitách, kde lidé žijí, případně pracují. Je možné se domnívat, že k tomu pozitivnímu posunu přispěla také environmentální výchova, která začíná být uskutečňována již na základních školách. Lidé se více zajímají o to, co může mít negativní dopad na jednotlivé složky životního prostředí. U všech chemických látek, včetně všech chemických prostředků, musí být kromě jejich fyzikálně chemických vlastností k dispozici rovněž jejich environmentální vlastnosti. Kromě toho je nezbytné, aby u všech nových chemických látek i prostředků byla známá jejich toxicita a ekotoxicita. Důvodem je především to, abychom mohli, a to ještě před vlastní aplikací chemické látky nebo přípravku rozhodnout, zda se jedná o látky s negativními environmentálními vlastnostmi, případně také s vlastnostmi škodlivými pro lidský organismus.

Je známo, že požáry představují nejen vážné nebezpečí pro žijící organismy, ale mohou být rovněž významnou materiální hrozbou. Z toho důvodu je nezbytné, aby požární bezpečnost byla v rovnováze se všemi možnými riziky, která hasební prostředky pro jednotlivé složky životního prostředí potenciálně představují. Proto jenutné, aby byly ještě v předstihu kvantifikovány dopady pěnových hasebních prostředků na abiotické i biotické složky životního prostředí. Nutné je posuzovat dopady nejen na terestrické ekosystémy, ale také na ekosystémy akvatické. Je však potřeba věnovat pozornost nejen hasebním prostředkům jako celku, ale také jejich součástí, které mohou být pro životní prostředí rovněž nebezpečné. Jedná se především o tenzidy, polybromované bifenily a perfluorované sloučeniny, které jsou v retardérech hoření obsaženy.

Tenzidy, které jsou obsaženy v hasebních prostředcích jako povrchově aktivní látky, mají amfoterní charakter. Je známo, že povrchově aktivní látky snižují povrchové napětí vody. Současně však také víme, že vysoké povrchové napětí vody je důležité pro život vodních organismů. V literatuře již bylo prezentováno, že snížení povrchového napětí vody na 50 mN.m<sup>-1</sup> vyvolává smrt u celé vodní fauny [72]. Dále jsou v hasebních prostředcích kromě vody a tenzidů



obsaženy chemické látky typu rozpouštědel, stabilizátorů a případně dalších aditiv. Ze souboru výše specifikovaných poznatků o obsahových látkách hasebních pěn lze odvodit negativní dopady na životní prostředí. Největší negativní dopad na životní prostředí lze předpokládat především u vodních ekosystémů, kde může docházet k pění, k ovlivnění spotřeby kyslíku, toxicitě pro veškeré organismy a rovněž schopnosti emulgovat tuky. Lze se domnívat, že hasební prostředky mohou především způsobovat kontaminaci půdy, kontaminaci povrchové vody, která se tak stává dočasně neobyvatelnou pro zde žijící organismy a kontaminaci podzemní vody, která určuje míru čištění nutnou pro úpravu povrchové vody na vodu pitnou. Rovněž mohou mít vliv na technologické procesy používané při čištění odpadních vod; vyčištěná voda obsahující neodstraněné analyty má za následek druhotnou kontaminaci povrchových vod [71, 73, 74].

Jak již bylo uvedeno, mohou směsi chemických sloučenin obsažené v pěnidlech (tenzidy, ethylenglykol, butyldiglykol, propylenglykol, alkylpolyglykosidy, nonylalkohol) způsobovat značné problémy z hlediska toxicity aktivních látek, resp. jejich rozkladných produktů. Při aplikaci hasebních pěn mohou být nejvíce ohroženy ryby a ostatní vodní organismy.

Rovněž u hasebních prostředků a jejich rozkladných produktů je nutné uvažovat o biodegradaci. Biodegradaci lze charakterizovat jako molekulární rozklad organických sloučenin živými organismy a biodegradabilitu potom jako schopnost organické sloučeniny podléhat biologickému rozkladu. V rámci studie zpracované Królem a kol. [67] měla být porovnána a zhodnocena biodegradabilita sedmi různých typů pěnových koncentrátů, a to tří proteinových a čtyř syntetických. Výsledky této studie však nepotvrdily všeobecně platný názor, že proteinové pěnové koncentráty (P, FP, FFFP) jsou snadno biodegradovatelné. Vysoký stupeň biodegradace byl naproti tomu pozorován zejména u syntetických koncentrátů na bázi uhlovodíkových tenzidů. Poznátka získané v rámci této studie však umožnily seřadit testované přípravky od nejvyšší po nejnižší biodegradabilitu následovně: S > AFFF > třída A > AFFF-AR > FFFP > FP > P. Z porovnání této řady biodegradability s řadou akvatické toxicity vyplynulo, že snadno biodegradovatelné pěny jsou poměrně vysoce toxické pro akvatické organismy. Větší problémy u pěnidel však může způsobovat sekundární toxicita, tj. zejména toxicita vznikajících rozkladných produktů, jejichž doba biologické odbouratelnosti v životním prostředí vesměs není známa. Jako příklad lze uvést proteinová pěnidla přírodního původu, jejichž rozkladné produkty, jako je například amoniak, mohou ve velkých koncentracích toxicky působit na ryby ve vodních tocích [72]. V důsledku toho je velice náročné jednoznačně porovnat stupeň rizika, které mohou různé pěnové koncentráty představovat pro životní prostředí.

Pokud chceme posoudit vliv hasebních prostředků na životní prostředí, tak můžeme říci, že právě aditiva v podobě tenzidů jsou velkou měrou zodpovědná za případné negativní dopady. Průnik těchto substancí do životního prostředí má za následek kontaminaci půdy, povrchové vody, kontaminaci podzemní vody a narušování technologií používaných v čistírnách odpadních vod (dále jen ČOV). Přílišné uvolňování hasebních pěn do odpadních vod může zapříčinit nadměrné pění, které má za následek estetické a především funkční problémy čistících procesů na ČOV; zejména může být negativně ovlivněna funkce aktivovaného kalu a snížena účinnost čištění v anaerobních vyhnívacích nádržích. Nadměrný přísun hasebních pěn do ČOV je také příčinou vysoké hodnoty biochemické, resp. chemické spotřeby kyslíku (BSK, resp. CHSK) těchto odpadních vod. Vysoká spotřeba kyslíku může mít za následek tak velký pokles koncentrace kyslíku v cílovém recipientu, který následně způsobí úhyn ryb a rostlin [73].

Jak bylo uvedeno výše, vyznačují se jednotlivé složky hasebních prostředků a zejména aditiva značnou toxicitou. Významný je i transfer znečištění mezi jednotlivými složkami životního prostředí. Infiltrací těchto látek do půdy, vzhledem k tomu, že se různé složky protipožárních pěn mohou vázat na půdní částice, může docházet ke snižování akutní toxicity pro organismy akvatického ekosystému, zatímco na druhé straně to může mít za následek negativní dopad na organismy zde žijící [73].

Jak vyplývá z krátkého přehledu, problematika toxicity hasebních prostředků by neměla být z důvodu následné kontaminace životního prostředí opomíjena, a to vzhledem k širokému používání hasebních prostředků na bázi pěn při hašení plošných požárů.

**Příložené publikace A3 a A4** sumarizují výsledky posouzení ekotoxicity hasebních prostředků pro akvatický a terestrický ekosystém a ověření vlivu půdního sorpčního komplexu na tuto ekotoxicitu.

K tomuto účelu bylo vybráno celkem pět koncentrátů pěnidel, která jsou při hašení požárů hasičským záchranným sborem Jihomoravského kraje nejčastěji používaná a která současně zastupují jednotlivé skupiny hasebních pěn. Skupinu standardních syntetických pěnidel zastupovaly Sthamex F-15, Expyrol F-15 a Finiflam F-15, Moussol APS F-15 je zástupcem fluorosyntetických pěnidel tvořících vodní film a Pyrocool B patří mezi víceúčelová syntetická pěnidla [68].

STHAMEX F-15 (výrobce Dr. Sthamer Hamburg) je syntetické víceúčelové pěnidlo. Tento prostředek je nejčastěji v praxi používán jako 5% vodný roztok. Výrobce v technickém listu uvádí, že Sthamex F-15 je prostředkem fyziologicky nezávadným a snadno biodegradovatelným. Jeho základní složky jsou: 1,2-ethandiol < 25 %; 2-butoxyethanol < 25 %; syntetické tenzidy < 20 %; pěnový stabilizátor < 5 %) [75].

MOUSSOL APS F-15 (výrobce Dr. Sthamer Hamburg.) patří do kategorie AFFF/AR pěnidel. Jeho vysoká účinnost je založena na kombinaci speciálních povrchově aktivních látek, tvořících polymerní i vodný film a dále tenzidů ve formě stabilizátorů a nemrznoucích sloučenin. Polymerní film vytvořený na polárních rozpouštědlech efektivně zabraňuje samovolnému rozpadu pěny. Pro vyšší tekutost pěny vznikající na nepolárních uhlovodících jsou v pěnovém koncentrátu obsaženy fluorované tenzidy. Složení přípravku je následující: 1,2-ethandiol < 25 %; 2-(2-butoxyethoxy)ethanol < 15 %; syntetický tenzid < 5 %; fluorovaný tenzid < 10 %) [75].

EXPYROL F-15, 3% (produkt firmy Tyco / Safety Products.) je syntetický pěnový koncentrát, který je vyráběn ve dvou modifikacích. Jedná se o koncentrát pro tvorbu pěny tvořící vodný film na povrchu hašeného paliva (Expyrol AFFF F) a dále o syntetické pěnidlo (Expyrol MB F). Oba koncentráty použité jako smáčedla byly ředěny vodou na koncentraci 0,5 až 1 %. Přípravek obsahuje jako účinné látky 2-butoxyethanol, ethylenglykolmonobutylether, glykol-n-butylether, butyl-2-hydroxyethylether a 2-hydroxyethylbutylether [75].

Pro testování ekotoxicity hasebních prostředků byly na našem pracovišti použity testy v kontaktním uspořádání, což nám umožnilo objektivněji predikovat jejich vliv na biotu půdních ekosystémů. Postupně byly zavedeny rovněž kontaktní testy na *Eisenia fetida* (žížale hnojní) a na *Lactuca sativa* (salát setý), proto mohly být testovány účinky výše charakterizovaných hasebních prostředků na organismy akvatických i terestrických ekosystémů. Pro toto hodnocení byly zásobní roztoky koncentrátů hasebních prostředků smíseny s vodou v takovém poměru, ve kterém jsou nejčastěji používány v běžné hasičské praxi při hašení velkoplošných požárů (viz **příložená publikace A3**). Pro testování byly použity alternativní testy Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> a Daphtoxkit F<sup>TM</sup> na organismech *Thamnocephalus platyurus* a *Daphnia magna* a test standardní, tj. test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor* a inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*.

Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> je založen na 24-hodinové expozici sladkovodního korýše *T. platyurus* testované látce; po ukončení testování se vypočítává na základě mortality hodnota 24hLC50. Testování pomocí Daphtoxkitu F<sup>TM</sup> spočívá ve 48-hodinové expozici sladkovodního korýše *D. magna* testované látce; po ukončení testování je na základě imobilizace organismů vypočtena hodnota 24hEC50 a 48hEC50. Test inhibice růstu okřehku menšího *L. minor* vychází z normy ISO 20079:2005; podstatou je 168-hodinová expozice dvou až čtyřlístkových kolonií této rostliny testované látce; výsledkem je hodnota 168hIC50, která se vypočítává pomocí růstové rychlosti [76]. Inhibice růstu kořene hořčice bílé *S. alba* spočívá v 72-hodinové expozici semínek této rostliny testované látce; na základě inhibice růstu kořene se vypočte hodnota 72hIC50. Pokud jsou

místo inhibice růstu rostlinných organismů pozorovány stimulační účinky testované látky, není zpravidla hodnota 72hIC50, respektive hodnota 168hIC50 vyhodnocována [77]. Podrobnosti provedení testů jsou prezentovány v **publikaci A3**.

Výše zmíněnými testy byly hodnoceny jak pracovní roztoky vybraných prostředků, tak také výluhy jimi uměle kontaminovaných půdních matric. Abychom zjistili vliv půdního sorpčního komplexu na případné ovlivnění (snížení) ekotoxicity, byly po aplikaci pracovního roztoku příslušného hasebního prostředku na standardní půdu LUFA 2.3 připraveny z této půdy výluhy podle metodického pokynu MŽP k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů, které byly následně testovány [77].

Lufa 2.3 je komerčně distribuovaná standardní půda, která je k dostání v několika modifikacích, lišících se především obsahem organické hmoty, rozdělením velikosti částic a hodnotou pH. Podrobnosti nasycení půdy roztoky testovaných látek a provedení testů jsou uvedeny v **publikaci A3** spolu s výsledky těchto testů. Výsledky testů ekotoxicity v akvatickém uspořádání nám poskytly informace o působení hasebních prostředků po jejich uvolnění do akvatického ekosystému, tj. hodnotu akutní toxicity vůči organismům tohoto prostředí. Z výsledků vyplynula vysoká toxicita všech hasebních prostředků zejména vůči zástupcům koryšů. Hodnoty LC50, případně EC50, se pohybovaly v rozmezí desetin až jednotek ml.l<sup>-1</sup> pro většinu testovaných hasebních prostředků, výjimku tvořil pouze Moussol APS F-15, kde se tyto hodnoty pohybovaly v desítkách ml.l<sup>-1</sup>. Pomocí zástupce producentů rostliny *L. minor* byla rovněž prokázána vysoká toxicita, kromě prostředku Moussol APS F-15. Terestrická rostlina *S. alba* (hořčice bílá) byla nejméně citlivá vůči testovaným látkám. Toxicita pro tento organismus se pohybovala řádově v desítkách až stovkách ml.l<sup>-1</sup>, přičemž i pro tuto rostlinu byl Moussol APS F-15 nejméně toxický.

Hodnoty ekotoxicity vodných výluhů zeminy zjišťované prostřednictvím koryše *T. platyurus* byly vesměs výrazně nižší, než tomu bylo u roztoku příslušného prostředku. Zatímco u přípravku Pyrocool B byla ekotoxicita pracovního roztoku 24hLC50 3,65 ml.l<sup>-1</sup>, po aplikaci do půdy a následném vyluhování po 24 hodinách sorpce byla tato hodnota 88,76 ml.l<sup>-1</sup>, což představuje výrazný pokles ekotoxikologického účinku na testovací organismus. Podobně tomu bylo i u ostatních prostředků, s výjimkou Moussolu-APS F-15.

Dále byly pro toto testování aplikovány testy v kontaktním uspořádání, a to test únikového chování žízála podle metodiky ISO 17512-1:2008 [45] a screeningový test klíčivosti salátu setého *L. sativa* v souladu s metodikou ISO 17126:2005 [48].

Pomocí těchto testů byl posouzen ekotoxický účinek testovaných prostředků na organismy terestrického ekosystému při akutní expozici a rovněž bylo prostřednictvím testu na *L. sativa* posouzeno, zda dochází k degradaci a případnému snížení toxicity těchto látek za různých podmínek, tj. kdy půdy byly po aplikaci hasebních prostředků ponechány při laboratorní teplotě v prostředí světelného režimu běžného dne a zavlažování a také v temném prostoru bez zavlažování.

Screeningový test klíčivosti kořene salátu setého *L. sativa* je založen na 120-hodinové expozici vyklíčených semínek této rostliny v uměle kontaminované půdní matrici a na konci testu je na základě inhibice růstu kořene v jednotlivých roztocích koncentrační řady vypočtena procentuální hodnota klíčivosti, resp. inhibice růstu kořene. Tento test byl proveden s uměle kontaminovanou půdou, která byla uchována po dobu 14 dnů za definovaných podmínek při laboratorní teplotě 22 °C. Získané výsledky byly porovnány s výsledky testu, který byl proveden ihned po aplikaci hasebních prostředků a byl posouzen vliv degradačních procesů v půdě na míru ekotoxického účinku testovaných látek. Degradabilita těchto prostředků byla posuzována na základě změn toxicity hasebních prostředků po uplynutí doby 14 dnů, kdy se porovnávala inhibice růstu kořínků *L. sativa*. Podrobné výsledky jsou prezentovány v **publikaci A3**. Naše poznatky, kdy byla stanovena nižší míra negativního účinku, korespondují s výsledky jiných autorů, kteří potvrdili degradabilitu [67].

Posledním testem byl test únikového chování žížal, který rovněž potvrdil již prokázaný trend v ekotoxicitě testovaných prostředků, tj. že nejméně ekotoxickým prostředkem byl Moussol-APS F-15, kde byla únikovost 30 %, avšak 100% únikovost byla pozorována u prostředků Sthamex F-15 a Expyrol F-15.

Naše předpoklady o vlivu půdní matrice a jejího sorpčního komplexu na ekotoxicitu hasebních prostředků byly předmětem také další studie, která je shrnuta v **příložené publikaci A4**. Velkou měrou jsou ovlivněny zejména nepolární látky, které jsou vázány na půdní částice v závislosti na obsahu organického uhlíku v půdě, případně látky s iontově výměnnou aktivitou. Půdní sorpční komplex ovlivňuje chování a osud celé řady kontaminantů. Významnou roli mají rovněž podmínky prostředí, charakter půdy a klima, které mohou ovlivnit chování kontaminantů. Studie zaměřené na hodnocení rizik plynoucích z přítomnosti kontaminujících látek v prostředí využívají jak výsledky z biomonitoringu, tak také z ekotoxikologických testů. Půdní matrice může být hodnocena přímo, prostřednictvím kontaktních testů nebo prostřednictvím vodného výluhu [78]. Za účelem ověření vlivu půdní matrice na ekotoxicitu byly hasební prostředky opět testovány v podobě pracovních roztoků.

Byl proveden experiment v podobě infiltrační zkoušky, kdy na 30 cm sloupec standardní půdy LUFA 2.3 byly aplikovány pracovní roztoky testovaných prostředků a infiltráty byly jímány, specifikovány s ohledem na hodnoty pH a vodivosti a následně podrobeny testům ekotoxicity v akvatickém uspořádání stejně jako původní pracovní roztoky hasebních prostředků. Jako testovací organismy byly použity *S. alba* a *Allium cepa* (cibule kuchyňská). Testování pomocí tohoto organismu principiálně odpovídá testování se *S. alba*. Podrobné výsledky jsou uvedeny v **publikaci A4**, nicméně lze konstatovat, že se opět potvrdil obecný trend v ekotoxicitě hasebních prostředků, že Moussol-APS F-15 patří mezi nejméně ekotoxické hasební prostředky, dále následoval Finiflam F-15. Sthamex F-15 při použití *S. alba* vykazoval nejvyšší ekotoxicitu, hodnota 72hIC50 byla 22.63 ml.l<sup>-1</sup>. Rovněž se potvrdil vliv půdní matrice na složení/vlastnosti, a tím i na ekotoxicitu kontaminantů tohoto typu. Z literatury dosud není známo, jaké mechanismy sorpce nebo iontové výměny mohou ovlivňovat kontaminaci během infiltračního procesu [79]. Studie zaměřené na problematiku vlivu hasebních prostředků na životní prostředí jsou sporadické. V bezpečnostních listech těchto výrobků nejsou informace o jejich ekotoxicitě dostupné. Nicméně ekotoxita pro vodní prostředí je značná, zanedbatelné nejsou ani efekty těchto látek na půdní organismy. Porovnáme-li výsledky ekotoxikologických hodnot získané prostřednictvím testování pracovních roztoků (**publikace A3**, v **publikaci A4** provedeno grafické porovnání) a testováním filtrátů, je patrný rozdíl; s výjimkou Sthamexu F-15 měly oba přístupy testování významný vliv na výsledné ekotoxikologické hodnoty, přičemž ve většině případů vykazovaly pracovní roztoky větší negativní účinky na testovací organismy než filtráty. Z těchto poznatků vyplývá významný vliv půdní matrice na výslednou ekotoxicitu pro testovací organismy. Protože používání hasebních prostředků má za následek záchranu materiálních hodnot i životů, hraje zde značnou roli i finanční stránka věci. Poznatky o účincích těchto látek na životní prostředí by neměly být opomíjeny, protože vedle ekonomických aspektů je nezbytné prosazovat i aspekty ekologické [4, 5].

### 3 VÝZNAM BIOINDIKACE V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Pokud chceme hodnotit a správně posoudit negativní dopad lidských aktivit na kvalitu životního prostředí, je nezbytné si dopředu stanovit určitá kritéria. Důvodem je zejména to, že se neustále zvyšuje počet antropogenních vlivů působících na jednotlivé složky ekosystémů, což má za následek zvyšování rizika průniku různých škodlivých chemických látek, tj. kontaminantů, do všech složek životního prostředí. Významnou roli zde zastává rozvíjející se environmentální analytická chemie, která je schopná identifikovat a kvantifikovat polutanty na velmi nízkých a stále se snižujících koncentračních úrovních. Účinnou pomoc rovněž představuje analýza speciálních bioindikačních organismů, tzv. bioindikátorů, pomocí kterých můžeme nejen posoudit, zda a do jaké míry je daný ekosystém kontaminován, ale také předvídat důsledky této kontaminace pro živý organismus, popřípadě pro jeho populaci. Bioindikátory tak představují do jisté míry nástroj, který nejen že velkou měrou přispívá k posouzení stavu životního prostředí, ale navíc může vypovídat o stavu zátěže příslušné složky ekosystému v dané lokalitě, a v kombinaci s dalšími údaji týkajícími se úrovně kontaminace daným polutantem ve všech složkách ekosystému také o transportních mechanismech zjišťovaného kontaminantu a o jeho biodostupnosti.

#### 3.1 VYMEZENÍ POJMU BIOINDIKÁTOR, BIOINDIKACE

Jedním ze základních atributů živých organismů, včetně lidí, zvířat a rostlin, je jejich schopnost reagovat na vnější podněty; znamená to, že tyto podněty aktivují procesy, které za normálních okolností pomáhají organismu přežít [80]. Tímto podnětem může být například také forma polutantu, která vyvolává příslušnou odezvu v žijícím organismu, což může být následně použito jako kritérium, případně jako ukazatel pro určení přítomnosti znečišťujících látek určitého typu v životním prostředí [81]. Pro bioindikátory existuje několik definic, z nichž lze uvést alespoň dvě: podle Schuberta [82] jsou bioindikátory organismy nebo jejich společenstva, jejichž životní funkce jsou korelovány s faktory prostředí tak těsně, že mohou sloužit jako jejich ukazatele. Podle dalších autorů [83] jsou bioindikátory definovány jako organismy nebo společenství organismů, které reagují na znečištění životního prostředí změnou svých životních funkcí, případně tím, že tyto látky shromažďují.

Znamená to, že stav prostředí a jeho vlastnosti ovlivňují stav a vlastnosti biologických systémů. Na základě vyhodnocení stavu těchto biologických systémů lze zpětně usuzovat na vlastnosti prostředí. Na tomto principu je založen biomonitoring, který využívá při hodnocení právě bioindikační metody a bioindikační organismy.

Principy bioindikace jsou využívány rovněž v ekotoxikologii. Využití bioindikátorů a principu bioindikace, jako součásti ekotoxikologie, představuje jednu z metod hodnocení expozice, které jsou zaměřeny na sledování hladin a rozšíření toxikantu v prostředí; do této skupiny metod patří rovněž analýzy organismů, které jsou schopny specificky kumulovat ve svých tkáních sledované polutanty. Podle Boháče [84] lze definovat tři druhy bioindikátorových organismů. Prvním druhem jsou testovací organismy (senzitivní organismy), které jsou využívány v laboratorních testech pro bezprostřední studium účinků různých vlivů prostředí. Do této skupiny můžeme zařadit i metody ekotoxikologie vhodné pro hodnocení účinku, které využívají testovacích organismů v různě koncipovaných biotestech. Druhou skupinou bioindikátorových organismů jsou indikátory pro impaktní monitorování, tzn. organismy sentinely, které jsou používány pro sledování změn v terénu; zde jsou zaznamenávány různé fyziologické ukazatele, vývojové tendence, genetické změny apod. Mezi organismy sentinely, patří i speciální kumulativní bioindikátory, které akumulují a koncentrují polutanty z jejich okolí a potravou tak, že analýza jejich tkání poskytuje časově integrovaný odhad environmentálně dostupné koncentrace daného polutantu. Posledním

druhem bioindikátorů jsou tzv. bioindikátory ekologické homeostáze, tzv. ukazatelé; tyto druhy včetně jejich společenstev mohou sloužit jako indikátory kvality krajiny a jejích částí [84].

Na počátku 90. let 20. století byly specifikovány rozdíly mezi pojmem bioindikátor a biomonitor. Toto rozdělení úzce souvisí s kvalitativním/kvantitativním přístupem k chemické substanci v životním prostředí. Podle Markerta [85] je bioindikátor organismus, který obsahuje informace o kvalitě daného prostředí. Biomonitor je naopak organismus, který obsahuje informace o kvantitativním aspektu kvality životního prostředí. Biomonitor je vždy zároveň bioindikátorem, avšak bioindikátor nemusí nutně splňovat požadavky kladené na biomonitor [86]. Rozdíl mezi bioindikátorem a biomonitorem spočívá zejména v typu informace, kterou poskytují, tj. kvalitativní nebo kvantitativní. Studium změn probíhá prostřednictvím obsahu sloučenin nebo prvků, případně také na podkladě morfologie, histologie, ukazatelů biochemických změn, chování nebo struktury populace sledovaných organismů. Nicméně navzdory různému vymezení pojmů je nesporné, že rostlinné a živočišné organismy, které jsou v rámci biomonitoringu posuzovány z hlediska projevů fyziologických změn nebo kumulace polutantů ve svých tkáních, jsou významným a v podstatě i neopomenutelným nástrojem při dlouhodobém a komplexním posuzování stavu životního prostředí a jeho jednotlivých složek.

V literatuře již bylo prezentováno [85, 86], že pro soustavné sledování ekotoxikologických poruch v ekosystému jsou vhodné především takové rostlinné a živočišné druhy, které reagují na přítomnost nebo působení škodliviny v prostředí podobně jako kulturní plodiny, domácí zvířata, případně člověk. Je proto nesporné, že význam bioindikace je značný. S její pomocí lze posoudit přítomnost cizorodých látek v daném ekosystému, průběh jejich výskytu, případně odhalit zdroje znečištění. Biomonitoring je dnes již nezbytnou součástí ochrany životního prostředí, a to právě z důvodu sledování přítomnosti a transportu kontaminantů. Na závěr lze proto konstatovat, že systematický monitoring ekotoxikologického poškození složek ekosystému je prováděn na vhodných živých objektech, a to jak rostlinných, tak také živočišných.

### 3.2 VLASTNOSTI BIOINDIKÁTORŮ

Základní vlastnosti bioindikátorů lze shrnout do následujících hlavních bodů [87, 88]:

- výskyt v hojném počtu na stanovištích, která jsou předmětem zájmu,
- stálost základních fyziologických hodnot, případně morfologických znaků s malou ekologickou plastičností, a to ve vztahu k přírodním stanovištním podmínkám,
- včasnost reakce na antropogenního činitele nebo na procesy probíhající v ekosystémech
- tolerance vůči tomuto činiteli, tzn. schopnost přežití i dlouhodobého a intenzivního působení dané škodliviny,
- rychlý metabolismus, díky kterému se může projevit vliv xenobiotik, která jsou v organismu přítomná ve stopových i ultrastopových množstvích,
- dlouhou dobu života, díky které mohou být zjištěny i důsledky chronických zátěží,
- rychlý sled pokolení, především pro včasné zjištění genetických změn, případně vrozených poruch a deformit,
- musí náležet do okruhu druhů, u nichž byly již stanoveny základní fyziologické, biometrické a populační hodnoty,
- musí mít vztah k dané lokalitě, aby mohly být zjištěné odchylky vztaženy k danému ekosystému
- nesmí být ovlivněny pěstováním a chovy v umělých podmínkách,
- měly by být dostatečně velké, aby se nemuselo používat stopových a ultrastopových metod při zpracování individuálních odběrů.

Jak již bylo prezentováno, moje první odborné aktivity v této oblasti byly spojeny s Ústavem veterinární ekologie a ochrany životního prostředí FVHE, VFU Brno, kde jsem participovala na dílčích úkolech spojených s monitoringem životního prostředí, a to na vzorkování biotických

matric pro posouzení stavu (kontaminace) životního prostředí v rámci monitoringu "Hodnocení stavu životního prostředí: monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích" (financovaného grantem MR/14/95 Ministerstva životního prostředí ČR (MŽP ČR 1992 – 2000). V rámci tohoto monitoringu byly rovněž vzorkovány bioakumulační organismy, které jsou stále využívány pro kvantitativní stanovení kontaminantů a jsou klasifikovány jako bioindikátor citlivý nebo „schopný akumulace“. Vlastnosti bioindikátorů tohoto typu sumarizuje ve své práci Knappová [89]. Bioakumulátorový organismus (v anglickém jazyce rovněž biomonitor), by měl splňovat následující ukazatele:

- akumulovat polutant, aniž by byly biomonitorizační organismy poškozeny nebo usmrceny hladinami koncentrací polutantů, se kterými přijdou do styku,
- být široce zeměpisně rozšířen,
- vyskytovat se hojně, být přisedlý nebo zřídka pohyblivý a reprezentativní pro danou lokalitu,
- být dostupný řadu let a dostačovat množstvím využitelných tkání pro dlouhodobou analýzu,
- umožnit snadný odběr a být rezistentní vůči laboratorním podmínkám; stejně tak být použitelný pro cílenou absorpci kontaminantů v rámci laboratorních analýz,
- při laboratorních studiích mít vysoký koncentrační faktor pro kontaminant; umožňovat přímou analýzu bez předešlého nárůstu koncentrace,
- vykazovat jednoduchou korelaci mezi množstvím kontaminantu, obsaženém v organismu a průměrnou koncentrací v okolním prostředí; odezva organismu, tj. obsah kontaminantu, eventuálně stupeň poškození, by měly odrážet kontaminaci prostředí ("*dose-response sensitivity*"),
- mít stejnou korelaci pro určitou hladinu kontaminantu s okolním prostředím ve všech sledovaných lokalitách a za jakýchkoliv podmínek.

Výběr vhodného organismu je proto podstatným parametrem pro celý monitoring a jeho výsledky. Vyžaduje však důkladnou znalost podmínek prostředí i biologické možnosti organismu. Pro monitoring a studium kumulace polutantů v organismech je možno využít dvou přístupů, a to aktivního nebo pasivního. Při pasivním monitoringu je studována zátěž organismu v jeho přirozeném prostředí, zatímco u aktivního monitoringu je sledována odezva u organismu, který byl vypěstován v uměle dekontaminovaném prostředí, na aktuální environmentální podmínky v určitém období [89, 90]. Aktivní monitoring má bezesporu výhodu v možnostech vysoké standardizace podmínek, za kterých tento monitoring probíhá. Z tohoto důvodu je vhodným nástrojem například při identifikaci lokálních zdrojů znečištění. Během několika desítek let, po které se biomonitoring rozvíjí, je stále rozšiřováno spektrum organismů, živočišných a rostlinných, které jsou využívány. Jejich přehled uvádí Vávrová [88] a rovněž kolektiv autorů [91]. V rámci sledování úrovně kontaminace lidské populace jsou pro stanovení zátěže obyvatel různými typy kontaminantů také používány matrice biotického původu (mateřské mléko, krev, moč, vlasy, nehty). S využitím akumulčních bioindikátorů rovněž úzce souvisí pojmy biokoncentrace, bioobohacování a bioakumulace. V rámci procesu biokoncentrace dochází v živém organismu k hromadění toxikantu ve vyšší koncentraci, než je v okolním prostředí. Týká se to především těch kontaminantů, které vesměs nepodléhají biotransformačním procesům v organismu. Měřítkem biokoncentrace je biokoncentrační faktor, který je definován jako poměr mezi koncentrací látky v organismu a koncentrací látky v prostředí. Biomagnifikace představuje kumulaci toxikantu příjmem kontaminované potravy při přestupu na vyšší trofickou úroveň a bioakumulace navýšení kontaminantu v organismu v důsledku obou zmíněných procesů tj. příjmu toxikantu z potravy a z okolního prostředí.

V historickém pohledu se pozornost různých monitorizačních programů u nás soustředila převážně na toxické prvky a různé anorganické anionty, pro které byly vypracovány více či méně

spolehlivé analytické postupy. Rozvoj nových analytických metod v posledních desetiletích umožnil detailnější studium organických kontaminantů, a to nejen mateřských látek, ale také jejich degradačních produktů. Sledování organických kontaminantů, zejména persistentních organochlorovaných sloučenin, bylo v bývalém Československu zahájeno až od 80. let minulého století a bylo zaměřeno zejména na potraviny a pitnou vodu. Kontaminace potravních řetězců a dalších biotických matric se začala sledovat v 90. letech minulého století, kdy byly zahájeny příslušné monitorizační studie

Monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích zahrnuje sledování kontaminace potravin, krmiv a surovin určených k jejich výrobě, včetně biomonitoringu, tj. kontaminace volně žijících organismů, kteří doplňují spotřební koš člověka. Zároveň jsou hodnoceny i složky okolního prostředí, které tuto kontaminaci mohou způsobit nebo ovlivnit. Patří mezi ně půda, povrchová voda a vstupy těchto složek do prostředí.

Zatímco bioindikátory mohou vypovídat o stavu zátěže příslušné složky ekosystému v dané lokalitě a v kombinaci s dalšími údaji, tj. kontaminací ovzduší, vody nebo půdy, případně o transportních mechanismech a některé z nich také o biodostupnosti, vyšetření zemědělských plodin na obsah kontaminantů poskytuje navíc data, která bezprostředně souvisí s potenciální expozicí člověka škodlivinám obsaženým v jeho dietě v daném ekosystému [90].

### 3.3 POLYCHLOROVANÉ BIFENYLY A JEJICH STANOVENÍ

Polychlorované bifenyly (PCBs) patří do skupiny persistentních organických polutantů, které díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem představují závažná rizika pro životní prostředí; rovněž jsou známy pod označením **PBTs** (**P**ersistent, **B**ioaccumulative, **T**oxic). Tyto chemické látky setrvávají v životním prostředí, jsou schopné dálkového transportu a bioakumulace v rostlinných a živočišných tkáních. Tyto vlastnosti umožňují jejich koloběh v životním prostředí a kumulaci v půdách, sedimentech a v živých organismech.

Polychlorované bifenyly (PCBs) jsou substituční deriváty bifenyly. Vznikají substitucí 1 až 10 atomů chloru na bifenyl a mohou vytvořit až 209 sloučenin, tzv. kongenerů, lišících se stupněm chlorace a polohou atomů chloru na bifenylu.

PCBs byly vyráběny řízenou chlorací bifenyly a vzniklé technické směsi se lišily celkovým obsahem chloru; podle toho byly také označovány. V USA a Velké Británii byl nejčastěji distribuován Aroclor (Aroclor 1260 obsahoval 60 hmot. % chloru); v bývalém Československu se nejvíce vyráběly směsi pod názvem Delor, Hydeler a Delotherm (Delor 106 byl obdobou Arocloru 1260). Dále byly obchodní preparáty PCBs vyráběny rovněž v Německu (Clophen), Francii (Phenoclor, Pyralene), Španělsku (Fenoclor, Pyralene), SSSR (Sovol, Sovtol), Japonsku (Santoterm, Kanechlor) a v Itálii (Phenclor Apirolio). Nikdy se však nevyráběly PCBs jako samostatné kongenery, vždy pouze směsi. Základní technická směs by mohla obsahovat kromě PCBs i příměsi jiných chlorovaných látek, například polychlorovaných naftalenů, polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a polychlorovaných dibenzofuranů.

Z hlediska svých fyzikálně-chemických vlastností jsou PCBs bezbarvé až nažloutlé kapaliny, viskózní až voskovité povahy, jejich relativní molekulová hmotnost je v rozmezí 223,1 – 498,5 g.mol<sup>-1</sup>. Jsou nehořlavé, stabilní i za vysokých teplot, ohnivzdorné (bod vzplanutí 170 – 380°C), mají malou těkavost, jsou nekorozivní, mají výborné teplotnosné vlastnosti, bod tání v rozsahu 34 – 198°C, bod varu v rozmezí 260 – 450°C, nízkou tenzi par, vysokou dielektrickou konstantu, nízkou rozpustnost ve vodě, velký elektrický odpor a značnou hustotu. Jsou snadno rozpustné v organických rozpouštědlech, olejích a tucích.

PCBs se používaly v otevřených a uzavřených systémech. V otevřených systémech byly využívány jako plastifikátory, byly součástí lubrikantů, impregnačních materiálů, lepidel, vosků, tuže, samopropisovacího papíru, barev, aditiv do cementů a omítek, materiálů na mazání



odlévacích forem, materiálů pro odlučovače prachu, těsnících kapalin, inhibitorů hoření, imerzních olejů a pesticidů. V uzavřených systémech sloužily jako chladicí kapaliny do transformátorů, dielektrické kapaliny do malých i velkých kondenzátorů, ohnivzdorné a teplotně odolné antikoroziní hydraulické kapaliny v důlních zařízeních a vakuových pumpách a jako teplotně odolná média.

Do lidského organismu PCBs vstupují potravou, vdechováním a pokožkou. Mají lipofilní charakter, a proto se v lidském těle kumulují. Některé kongenery vykazují značné negativní působení na zvířata i na člověka; konkrétní projevy jsou závislé na druhu organismu. Biologické a toxické účinky PCBs ovlivňuje především jejich struktura. Pro lidský organismus je však významnější chronický efekt. Akutní toxicita PCBs je nízká, hodnoty LD<sub>50</sub> jsou vzhledem k variabilitě biologických účinků pro různé kongenery velmi rozdílné, a proto se převážně testují jejich kompletní technické směsi. Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) při WHO byly PCBs zařazeny do kategorie B2, tj. látky s pravděpodobným karcinogenním účinkem na člověka (R)[92].

Polychlorované bifenyly se v environmentálních i biotických matricích vyskytují ve stopových koncentracích, což klade značné nároky na jejich přesnost, správnost, citlivost a selektivitu. Z celkem 209 možných kongenerů je možno ve významnějším množství detekovat ve složkách životního prostředí cca 90, což se však neprovádí. Proto bylo pro hodnocení biotického materiálu určeno sedm tzv. „indikátorových kongenerů (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180); kromě toho jsou také monitorovány toxikologicky významné non-ortho (PCB 77, 81, 126, 169), mono-ortho (PCB 105, 114, 156, 157, 167, 189) a některé di-ortho (PCB 128, 149, 170) kongenery PCBs [92].

Základními kroky při analýze PCBs v environmentálních a biotických matricích jsou:

- Odběr a uchování vzorku
- Extrakce analytů ze vzorku (izolační techniky)
- Přečištění vzorku (odstranění nežádoucích koextrahovaných podílů)
- Frakcionace/separace sledovaných analytů
- Identifikace a kvantifikace analytů

Příprava vzorku biotických a některých environmentálních matric zahrnuje:

- Homogenizaci vzorku s bezvodým síranem sodným (dehydrataci)
- Extrakci, nejčastěji podle Soxhleta, sonikaci, případně sonikaci a vytřepávání mezi dvě nemísitelné fáze, zrychlenou vysokotlakou extrakci PSE (ASE, PLE), MAE
- Přečištění extraktu (odstranění lipidů) pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) nebo adsorpční chromatografie (silikagel, florisil, směsná kolona florisil + oxid hlinitý); kyselé hydrolyzy nebo oxidativní dehydratace
- Identifikaci & kvantifikaci: plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD) nebo s hmotnostním detektorem (GC/MS).

Odběr reprezentativního vzorku pro stanovení PCBs představuje stěžejní část analytického procesu, protože špatné vzorkování se může podílet více než 50 % na celkové chybě měření. Proto je nezbytné aplikovat systém kontrolních vzorků, aby bylo možné eliminovat zdroje chyb na minimum a pro odběry používat správné typy odběrového zařízení.

Izolační techniky použité při analýze PCBs jsou založeny na extrakci. Typ extrakce je nutné zvolit podle typu matrice. Abychom generovali přesné a pravdivé výsledky, je nezbytné si při optimalizaci metody ověřit, který typ extrakce je z hlediska výtěžnosti nejvhodnější. Pro kapalné vzorky je upřednostňována extrakce kapalina-kapalina (LLE), případně extrakce na tuhou fázi (SPE), pro pevné matrice lze použít Soxhletovu extrakci, sonikaci, sonikaci a vytřepávání mezi dvě nemísitelné fáze, PSE a MAE.

Přečištění extraktu pro stanovení PCBs je důležité provádět proto, abychom odstranili koextrakty, které mohou způsobovat kontaminaci dávkovače plynového chromatografu nebo

kolony, případně interferenci píků nebo kolísání odezvy při použití ECD. Zvláště je to důležité při zjišťování minoritních kongenerů v sedimentu a také toxických kongenerů v biotě. Nejčastěji je používána GPC, při které však nedochází k úplnému odstranění lipidů, a dále adsorpční chromatografie, která má zase omezenou kapacitu kolony. Kyselá hydrolyza nebo oxidativní dehydratace se aplikují v případě, kdy nejsou zcela odstraněny lipidy.

Fracionace/separace jsou do postupu pro stanovení PCBs zařazovány tehdy, kdy je kromě indikátorových majoritních kongenerů zapotřebí stanovit také minoritní kongenery, případně non-ortho a mono-ortho kongenery PCBs. Pro frakcionaci lze použít klasickou adsorpční chromatografii se sorbentem oxidem hlinitým, dále kolonu s aktivním uhlím, případně ve směsi se silikagelem nebo pyrenylovou kolonu (HPLC-PYE), která se používá především k separaci ortho- a non-ortho PCBs od méně planárních kongenerů; stacionární fází je 2-(1-pyrenyl) ethyldimethylsilylovaný silikagel. Separace na této koloně má velmi dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost. Rovněž umožňuje za specifických podmínek úplnou separaci kritického páru PCB 138 a PCB 163 a separaci PCDDs/PCDFs od kongenerů PCBs. Většinou se však sledují indikátorové kongenery, minoritní kongenery nebo toxické kongenery odděleně.

Pro izolaci PCB z analyzovaných abiotických i biotických matric a jejich následné stanovení jsme na pracovišti na VFU Brno používali tyto postupy, přičemž vzorky byly odebírány tak, aby stačily pro potřebná paralelní stanovení:

**Izolace lipidického podílu** - gravimetricky: po homogenizaci vzorků tkání byla potřebná navážka vzorku rozetřena s vysušeným síranem sodným na sypkou směs. Směs byla kvantitativně převedena do Soxhletova extraktoru, kde probíhala kontinuálně po dobu 8 hodin extrakce; extrakčním činidlem byla pro izolaci PCB z matrice směs n-hexan : diethylether (94:6). Po ukončení extrakce a odpaření rozpouštědla byl získaný tuk zvážen a byl vypočten lipidický podíl v g/100g tkáně.

**Biota** – potřebná navážka vyextrahovaného tuku byla rozpuštěna v 1–2 ml n-hexanu a kvantitativně přenesena na kolonu pro sloupcovou chromatografii, naplněnou aktivovaným florisilem. Elučním činidlem byla směs n-hexan : diethylether (94:6) o objemu 70 ml. Extrakt byl odpařen na RVO a odparek rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla. Pokud nebyly kolonovou chromatografií odstraněny veškeré koextrakty, bylo provedeno dočištění kyselou hydrolyzou pomocí konc. kyseliny sírové. Přečištěný extrakt o konečném objemu 1 ml byl kvantitativně převeden do vialky a takto byl vzorek připraven pro vlastní analýzu HRGC/ECD.

**Rostliny** – z kompozitních vzorků (3000 g) byl připraven laboratorní vzorek o hmotnosti 300 g. Navážka pro analytické stanovení byla cca 50 g. Vzorek byl následně extrahován 70 ml směsí n-hexanu : acetonu (94:6), přičemž byla provedena pětinasobná extrakce, ještě podpořená třepáním. Spojené extrakty byly odpařeny na výsledný objem 10 ml, následovalo přečištění kyselou hydrolyzou s koncentrovanou kyselinou sírovou (96-98%); organická fáze byla odpařena do sucha, rozpuštěna v 1 ml hexanu a následně přečištěna pomocí SPE na kolonkách s C<sub>18</sub> nebo na koloně s florisilem nebo s oxidem hlinitým. Extrakt byl zahuštěn na RVO a odparek rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla.

**Krevní plazma** – do zkumavky byly odměřeny 4 ml plazmy, přidány 2 ml methanolu a vzorek byl intenzivně promícháván 1 minutu; potom bylo přidáno 12 ml n-hexanu a opět bylo intenzivně mícháno 4 minuty. Hexanová vrstva byla kvantitativně převedena do jiné zkumavky a k tomuto extraktu byl přidán 1 ml konc. kyseliny sírové a obsah byl intenzivně protřepán; organická vrstva byla kvantitativně převedena do zkumavky a po odpaření do sucha opětovně rozpuštěna v 5 ml hexanu a dočištěna kolonovou chromatografií na florisilu. Extrakt byl zahuštěn na RVO a odparek rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla.

**Plynová chromatografie** – byl použit plynový chromatograf Hewlett-Packard 5890 série II s ECD. Jednotlivé indikátorové kongenery PCBs byly identifikovány porovnáním s retenčními časy standardů. Ke kvantitativnímu stanovení byla použita metoda vnějších standardů (fy Baker)

Pro porovnání a stanovení výtěžnosti byly použity referenční materiály vyextrahovaný tuk od fy Ehrenstorfer, R 900 00 12, organochlorinated pesticides and PCBs. Modifikace podmínek plynově chromatografické analýzy byla provedena za účelem separace PCB 28 a 31 od dalších interferujících látek (o,p'-DDE a PCB 101 nebo p,p'-DDT a PCB 138); rovněž mělo být zabráněno interferenci s estery kyseliny ftalové. Kapilární kolona HP 5 (Hewlett-Packard), 60 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,2 μm; stacionární fáze 5% difenyldimethylsiloxan; injektor: split/splitless, teplota injektoru 250 °C, dávkování 1 μl bezděličově technikou „hot needle“, interval zavření děliče 150 s; nosný plyn: helium, konstantní průtok 1,0 ml.min<sup>-1</sup>, teplotní program: 40 °C po dobu 5 min, poté nárůst 30 °C.min<sup>-1</sup> do 180 °C, nakonec po 2 °C.min<sup>-1</sup> do 280 °C; 280 °C po 10 min.; detektor: <sup>63</sup>Ni ECD, teplota 300 °C.

V případě rostlinných matric bylo stanovení provedeno na HRGC/ECD s využitím dvou kapilárních kolon (HP 5 a HP 17) připojených k jednomu injektoru. Ostatní podmínky analýzy byly stejné.

### 3.4 VYBRANÉ BIOINDIKÁTOROVÉ ORGANISMY

#### 3.4.1 Ryby jako bioindikátory

Při posuzování kontaminace vodních ekosystémů xenobiotiky jsou pro komplexní hodnocení této zátěže využívány nejen abiotické (voda, sediment), ale také biotické složky životního prostředí. Mezi ty patří zejména makrozoobentos, makrofyta, biofilmy a ryby, přičemž ryby patří mezi nejvýznamnější bioindikátory, zejména pak dravé ryby, které představují poslední článek potravního řetězce. Celá řada xenobiotik podléhá pouze částečné biodegradaci a ty mají schopnost bioakumulace v tukové tkáni ryb [93]. Proto jsou ryby často využívány jako bioindikátory k biomonitoringu akvatického ekosystému. Vhodnými bioindikačními druhy ve vodách jsou především jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*), který se vyskytuje téměř v celé Evropě a v ČR žije ve všech tekoucích vodách kromě horských potoků. Dalším obdobně rozšířeným druhem je cejn velký (*Abramis brama*); jedná se o všežravou rybu, která se v mládí živí především planktonem, v dospělosti potom bentosem. Dalšími vhodnými organismy jsou parma obecná (*Barbus barbus*), okoun říční (*Perca fluviatilis*) a štika obecná (*Esox Lucius*). Parma obecná žije při dně, živí se larvami chrostíků, pošvatek, jepic, měkkýšů a dalších vodních bezobratlých. Parma obecná roste velmi pomalu a je ve velmi intenzivním kontaktu s dnovým sedimentem, který obsahuje značné množství kontaminantů; s tím úzce souvisí silná akumulace těžkých kovů a organických xenobiotik. Její nevýhodou je omezený výskyt v našich řekách. Okoun říční je zástupce dravých ryb, jedná se o velmi žravou rybu s pomalým růstem. Mladší kusy se živí zejména zooplanktonem, starší jedinci jsou výlučnými predátory. Obývá stojaté i tekoucí vody. Je rozšířen prakticky v celém mírném pásu Evropy. Rovněž štika obecná (*Esox Lucius*) je významným bioindikačním dravým druhem. Štika je typický dravec, její potravou jsou ryby (okoun, plotice, proudník) i žáby. Přirozeně se vyskytuje v pomalu tekoucích nebo stojatých vodách po celé Evropě. Pro reprezentativnost výsledků je nutné provádět hodnocení zátěže vodního ekosystému na větším počtu ryb, což může být limitováno omezeným výskytem některých druhů ryb v různých lokalitách (např. okouna říčního a parmy obecné). Z tohoto hlediska se jeví vcelku universálním bioindikátorem kontaminace vodních toků v ČR jelec tloušť a cejn velký. Jejich výskyt v našich řekách je hojný, jsou všežravými druhy, žijícími u dna řek. Takto mohou odrážet nejen příjem polutantů z kontaminované vody a sedimentů, ale také z potravy.

Podle Randáka [93] jsou ke zjišťování úrovně kontaminace vhodná juvenilní stádia ryb. Důvodem je především to, že juvenilní ryby je z časových i ekonomických hledisek méně náročné vzorkovat, než dospělou rybí populaci. Výhoda této věkové skupiny pro účely bioindikace spočívá rovněž v tom, že v prvních měsících svého života ryby téměř nemigrují a zjištěná kontaminace tak jednoznačně odráží lokalitu, ve které se vyskytují. Pomocí juvenilních ryb lze provádět nejen dlouhodobý biomonitoring, ale také monitoring bodových zdrojů znečištění, případně sledovat

zátěž podélných profilů vodních toků. V prvních měsících svého života je jejich potravou zejména plankton, řasy a biofilmy, které mají podobné složení a pravděpodobně obsahují i stejná xenobiotika. Lze se proto domnívat, že zatížení dané lokality xenobiotiky se odráží i v zatížení juvenilních ryb v tomto ekosystému žijících. Výhodou je také to, že toto vývojové stádium ryb zůstává v prvních měsících života v lokalitě, kde se vylíhly a také jsou snadněji odlovitelné v porovnání se staršími jedinci, kteří se vyskytují ve větších hloubkách [93].

Kontaminace ryb PCBs, OCPs (organochlorové pesticidy) a jinými persistentními organickými polutanty se vzhledem k jejich malé rozpustnosti ve vodě odehrává prostřednictvím potravy přes fyto- a zoobentos. Tyto sloučeniny jsou vázány na sedimenty, resp. na organický podíl a jejich potravou je především fyto- a zoobentos; to je také příčinou jejich zpětného průniku do jednotlivých článků potravního řetězce. Vzhledem k velmi omezené biodegradaci těchto chemických sloučenin u studenokrevných organismů patří ryby mezi vhodné bioindikátory zátěže složek životního prostředí s vysokým bioakumulačním potenciálem, což jsou např. PAHs a jejich substituční deriváty [94]. Z hlediska interpretace výsledků vztahujících se k lipofilním látkám je zapotřebí vzít v úvahu i způsob vyjadřování výsledků tzn., zda budou vztaženy na čerstvou hmotnost, sušinu nebo lipidický podíl. U tučných ryb, s vysokým podílem obsahu tuku ve svalovině, protože jsou výsledky pro příslušný lipofilní kontaminant vztaženy na hmotnost tohoto tuku, nemusí být vysoké, po přepočtu na hmotnost svaloviny naopak díky vysokému podílu tuku ve svalovině, mohou být závažné. Celá řada studií vychází z extrakce tukových podílů a následného stanovení cílových lipofilních analytů. V současnosti se v ČR doporučuje používat přepočet na tuk pouze u ryb majících lipidický podíl do 10 %. Analýzou tkání ryb, a to v porovnání s analýzou dnových sedimentů, lze objektivněji hodnotit rizika plynoucí z přítomnosti kontaminantů v akvatickém ekosystému, neboť takto lze zjistit jejich biologickou dostupnost. Ryby zůstávají velmi významným bioindikátorem persistentních organických látek a rizikových prvků i v dnešní době o čemž svědčí i příklady studií publikované v posledních letech [95-98].

**V publikaci BI** jsou prezentovány poznatky, které byly získány při využití ryb pro indikaci kontaminace akvatického ekosystému; sledovány byly indikátorové kongenery PCB a rizikové prvky (Zn, Cu, Ni, Hg, MeHg, As, Pb, Cd). Ryby pocházely z vodní nádrže Smraďavka, která je situována nedaleko továrny Colorlak, kde se využíval komerční produkt Delor 106. Byla analyzována svalovina ryb dravých (štika obecná *Esox lucius*, a candát obecný *Sander lucioperca*), dále ryb živících se převážně bentickými organismy (úhoň říční *Anguilla anguilla*, kapr obecný *Cyprinus carpio*); z všežravých ryb to byli cejn velký (*Abramis brama*), plotice obecná (*Rutilus rutilus*), lín obecný (*Tinca tinca*). Kromě lína a candáta (pouze jeden kus) bylo k dispozici 8 kusů od každého druhu. Detailní výsledky analýz jsou prezentovány v příslušné publikaci. Z výsledků vyplynulo, že všechny hodnoty ležely pod hygienickými limity stanovenými pro rezidua rizikových prvků platnými v ČR (As 1,000 mg.kg<sup>-1</sup>; Cd 0,100 mg.kg<sup>-1</sup>; Hg 0,100 v mg.kg<sup>-1</sup> a Pb 0,500 v mg.kg<sup>-1</sup>). Zajímavé bylo zjištění, že nejnižší koncentrace rizikových prvků byly prokázány u štik, což jsou dravci a nejvyšší u lína, který patří mezi všežravce zdržující se převážně u dna. Je však zapotřebí upozornit na to, že v rámci této práce nebylo určeno stáří ryb a byl analyzován pouze jeden lín. Při porovnání našich výsledků s výsledky publikovanými Státní veterinární správou (SVS) v roce 2001, byly hodnoty prokázány u sledovaných analytů v naší studii nižší. Naše data byla rovněž konfrontována s výsledky podobné studie slovenských autorů, kteří mapovali oblast v okolí Prešova; zatímco u nás nebyly překročeny hygienické limity, slovenští autoři uvedli překročení hygienických limitů v 10 % případů. Týkalo se to především mědi a kadmia, sporadicky arsenu a chromu [99]. Obsah indikátorových kongenerů PCBs rovněž nepřesahoval hygienické limity platné v ČR (suma indikátorových kongenerů PCBs byla 2 mg/kg); naše výsledky byly v souladu s výsledky publikovanými Státní veterinární správou (SVS). Nejvíce zastoupenými kongenery PCBs byly u všech vzorků PCB 138, 153 a 180. Výsledky slovenských autorů potvrdily výraznější kontaminaci sledované oblasti v okolí Prešova, kde byly překročeny

hygienické limity v rámci jejich studie o 8,76 %; nejvyšší obsah jednotlivých kongenerů byl také prokázán ve svalovině lína. Přestože jsme předpokládali, že vzhledem k blízkosti továrny Colorlak bude v našich vzorcích prokázán zvýšený obsah některých rizikových prvků a PCBs, nebyly tyto předpoklady prostřednictvím bioindikátorů potvrzeny. Vhodnost použití ryb pro bioindikaci byla potvrzena autory mnoha dalších studií [95-98].

### 3.4.2 Volně žijící živočichové (lovná zvěř a drobní zemní savci) jako bioindikátory

Savci reprezentují velmi užitečné organismy pro účely biomonitoringu. Zatímco rostliny indikují zátěž životního prostředí v čase (za určité období jejich růstu), živočišné bioindikátory indikují zátěž prostředí nejen v čase, ale i v prostoru, který tvoří jejich domovský okrsek, jehož jsou nedílnou součástí. Předpokládá se, že býložravci (herbivora) kumulují lépe rizikové prvky a radionuklidy než šelmy (carnivora), kumulující naopak více organochlorované sloučeniny, což pochopitelně souvisí i s jejich postavením v potravním řetězci [100]. Mezi nejvhodnější bioindikátory terestrických ekosystémů můžeme podle Novákové [101] zařadit zajíce polního (*Lepus europaeus*), srnce obecného (*Capreolus capreolus*), bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), koroptev polní (*Perdix perdix*), kachnu divokou (*Anas platyrhynchos*) a rovněž drobné zemní savce. Výše specifikované druhy jsou rozšířené téměř na celém území Evropy a v ČR jsou preferovány z důvodu jejich dostupného množství pro různé monitorizační studie.

**Lovná zvěř** - srnčí zvěř je využitelná jako vhodný bioindikátor kontaminace zejména pro rizikové prvky (arsen, olovo, kadmium, fluor) a radionuklidy jako je cesium (izotop 137, 134), stroncium 90, stejně jako pro celou řadu organohalogenovaných látek [100].

Vhodností využití srnců jako bioindikátorů se ve své studii zabýval Holm [102]. V časovém období pěti let (1985-1990) byly vzorkovány tkáně 483 odlovených srnců, u kterých byl v játrech, ledvinách a mozku zjišťován obsah 20 organických a 15 anorganických kontaminantů. Z výsledků této studie vyplynulo, že srnec je velmi dobrým bioindikátorem v rámci terestrického potravního řetězce, a to z několika důvodů: kontrolovatelné teritorium (25-40 ha), definovaná potrava, výborná dostupnost každý rok v rámci pravidelných honů a rovněž dobrá akumulace kontaminantů v játrech. Srnci jsou dobře prostudovaným druhem, adaptovaným na podnebí Evropy a zejména játra jsou vhodným orgánem nejen vzhledem k velikosti získaného vzorku, ale i pravidelné distribuci kontaminantů v celém orgánu. Obsah kontaminantů byl variabilní v období od května do srpna, zatímco stabilizovaná hladina kontaminantu byla v září a říjnu; optimální věk jedinců by měl být menší než 18 měsíců. Lovná zvěř byla také často používaným bioindikačním druhem při hodnocení kontaminace ekosystému polychlorovanými bifenyly [102].

Příkladem z posledního období může být rozsáhlá studie z oblasti severozápadního Polska, kde v orgánech srnčí a jelení zvěře byly sledovány jak rizikové prvky [103], tak i polychlorované bifenyly [104]. Olovo a kadmium byly detekovány téměř ve všech vzorkovaných orgánech srnčí a jelení zvěře, přičemž koncentrace kadmia byla mnohem vyšší než olova (medián pro obsah Pb v játrech a ledvinách byl v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny 0,055 a 0,092 u srnce, 0,067 a 0,081  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u jelena. U srnce byl obsah kadmia v játrech 0,770  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny, v ledvinách 6,139  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a 0,422 v játrech a 6,365  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  v ledvinách u jelena. Tyto poměrně vysoké hodnoty prokázaly zátěž dané oblasti Cd a Pb; současně docházelo k překročení povolených limitů pro tyto komodity. Polychlorované bifenyly byly stanoveny jako suma indikátorových kongenerů PCBs; do  $\Sigma\text{PCB}$  patří podle IUPAC kongenery 28, 52, 101, 138, 153 a 180. V játrech srnců byla  $\Sigma\text{PCB}$ , vyjádřeno na tuk  $30,24 \pm 12,35 \text{ ng g}^{-1}$  a  $60,13 \pm 14,23 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  u jelenů, v plicní tkáni  $24,21 \pm 10,02$  a  $45,22 \pm 9,77 \text{ ng g}^{-1}$  u srnčí a jelení zvěře. Kongenery PCB 138, 153 a 180 byly dominantními v játrech, zatímco PCB 138 a 153 v plicích. V letech 2010/2011 byla v Polsku provedena podobná studie, v rámci které bylo analyzováno 141 vzorků tukové tkáně divoce žijících živočichů, tj. 84 divokých prasat, 320 jelenů a 25 srnců [105]. Metodou kapilární plynové chromatografie byly zjišťovány tyto POPs; izomery HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -HCH), HCB,  $\Sigma\text{DDT}$  (p,p'-DDT; o,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD) a PCBs (šest indikátorových kongenerů PCB 28, 52, 101, 138, 153, a 180). Průměrná koncentrace

$\Sigma$ DDT, vyjádřeno na tukovou tkáň, byla v rozmezí od 0,241 mg.kg<sup>-1</sup> (divoká prasata) až 0,032 mg.kg<sup>-1</sup> (jelen), PCB od 0,015 mg.kg<sup>-1</sup> (divoká prasata) a 0,010 mg.kg<sup>-1</sup> (srnec). V celkovém množství DDT představovalo p,p'-DDE 82 % a podíl kongenerů PCB 153, PCB 138, PCB 180 k celkovému množství  $\Sigma$ PCB byl 98%, přičemž vyšší hladiny sledovaných kontaminantů pocházely ze zvířat odlovených v průmyslových oblastech [105]. Za období, které bylo časově srovnatelné s našimi studiemi, byly zajímavé zejména ty, které monitorovaly oblasti na Slovensku, poblíž chemické továrny Chemko Strážské, která vyráběla v letech 1959-1984 směsi PCB pod komerčním názvem Delor 103 až Delor 106, Hydeler a Deloterm. V séru, tkáních a parenchymatózních orgánech byla zjišťována kontaminace PCB u zvěře z modelového objektu „Orlová“, který se nacházel přímo v areálu Chemko Strážské. V roce 1997 překračovaly zjištěné koncentrace povolené limity u bažantů, což iniciovalo monitorování těchto polutantů i u predátorů drobných živočichů, tj. toulavých koček a lišek. Výsledkem této studie bylo zjištění, že ačkoliv byla výroba ukončena v roce 1984, hladiny těchto polutantů byly velmi vysoké; například u kočky byl stanoven obsah kongeneru PCB 138 14,7 mg.kg<sup>-1</sup>. Přičemž v příslušné době hygienický limit pro tento kongener v potravinách byl 0,20 mg.kg<sup>-1</sup>. U bažanta byl nejvíce zastoupen kongener PCB 180 rovněž ve vysokých hodnotách (3,39 mg.kg<sup>-1</sup>) limit pro tento kongener byl 0,15 mg.kg<sup>-1</sup>. U zajíců a divokých prasat sice hodnoty nedosahovaly takové výše jako u bažantů, nicméně byly těsně pod povoleným limitem. U srnce byly limity překročeny pouze u jednoho kusu, zatímco u jelení zvěře překročeny nebyly. Cílená depistáž prováděná v následujícím roce prokázala, že koncentrace PCBs již překročily povolené limity u všech monitorovaných zvířat ve svalovině a v játrech. Autoři této studie předpokládali, že to mohlo být způsobeno vysokou hladinou spodní vody v těchto letech, která mohla z ilegálních skládek vyplavit sledované polutanty [106]. Výsledky další studie, prováděné v letech 1995-2000 prokázaly, že jak maximální, tak také průměrné hodnoty PCBs byly nejvyšší u bažantů; zejména to platilo pro kongener PCB 153, který 142 x překračoval povolený limit (jeho průměrná hodnota byla 8,53 mg.kg<sup>-1</sup>, maximální 28,53 mg.kg<sup>-1</sup>). Také koncentrace kongeneru 28 byla relativně vysoká, což mohlo být způsobeno sekundární zátěží z atmosférické depozice, protože tento kongener je u savců poměrně dobře metabolizován a ve tkáních se běžně nekumuluje [107]. V podobné studii prováděné v oblasti Michalovců byla průměrná hodnota  $\Sigma$ PCB u volně žijící zvěře (jeleni, srnci, divoká prasata) 103 ng.g<sup>-1</sup> tuku, zatímco hodnota zjištěná u organismů z kontrolní oblasti (Stropkov) byla pouze 33,2 ng.g<sup>-1</sup> tuku [108]. Všechny výše uvedené studie využívaly lovnou zvěř jako vhodné indikátory kontaminace ekosystému a potvrzují tak také vhodnost lovné zvěře pro účely biomonitoringu rizikových prvků a POPs.

**Drobní zemní savci** patří rovněž mezi organismy používané pro účely monitorizačních studií v rámci terestrických ekosystémů. Využití drobných zemních savců jako bioindikátorů představuje řadu výhod, z nichž nejdůležitější je ekonomická nenáročnost pro monitoring, dále výborná dostupnost ve větším množství v porovnání s obvykle používanými bioindikátory (lovná zvěř nebo hospodářská zvířata). Kromě toho mají velmi úzký vztah ke sledované lokalitě, protože jejich teritorium je mnohem menší než u lovné zvěře. Výhodou je také délka života, která se pohybuje kolem 1,5 roku, což umožňuje sledovat účinky znečištění na více generacích [109].

Studie, využívající tyto organismy pro posouzení environmentální kontaminace, byly převážně zaměřeny na kontaminaci těžkými kovy, radionuklidy, případně i na organochlorové látky [110, 111]. Práce týkající se koncentrace PCBs ve tkáních drobných zemních savců však nebyly příliš časté a vesměs hodnotily koncentraci popř. účinek PCBs jako sumy v přepočtu na komerční směsi (Aroclor 1242,1254,1260 apod.). S rozvojem analytických metod a kongenerově specifické analýzy byla postupně pozornost zaměřena na indikátorové kongenery PCBs a později na ty, které vykazovaly výraznou toxicitu [112, 113]. Korelace mezi kontaminací prostředí, potravními zdroji a výslednou zátěží organismu potvrdil i Johnson, který se ve své studii, prováděné prostřednictvím drobných zemních savců jako bioindikátorů, zaměřil na posouzení kontaminace životního

prostředí polychlorovanými bifenyly v okolí skládky. Pro sledování byli vybráni rejsek obecný (*Sorex araneus*), hraboš mokřadní (*Microtus agrestis*) a myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*). U rejska byl v lokalitě u skládky zjištěn 13x vyšší obsah PCBs než u myšice a 24x vyšší obsah PCBs než u hraboše. V kontrolní oblasti byla  $\Sigma$ PCB u rejska přibližně 5x větší, v porovnání se zbývajícími druhy myší [112]. Rovněž byla provedena kongenerově specifická analýza zaměřená na indikátorové kongenery. Nejvyšší koncentrace byla stanovena opět ve tkáni rejska, následovala myšice a nakonec hraboš. Přestože u všech myší byly zastoupeny všechny indikátorové kongenery, jejich zastoupení reflektovalo nejenom stupeň chlorace, ale rovněž i potravní zdroje. U rejska bylo zastoupení kongenerů následující: 153>138>>180>118>>28>101>52 a u hraboše: 28>118>153>138>180, 52>101. Zastoupení kongenerů ve tkáních všežravé myšice se od obou druhů sice lišilo, avšak bylo spíše podobné tomu, které bylo zjištěno u hraboše, tj. 153>138>118>180>28>52, 101. Významné mezidruhové rozdíly v zastoupení indikátorových kongenerů velmi úzce souvisí s potravou, protože u hmyzožravých (rejsků) byly detekovány spíše výsechlorované kongenery (153, 138 a 180), zatímco u herbivorů (hraboš) byly dominantní nízechlorované kongenery 28 a 118. Autoři této studie navrhují rejska jako nejvhodnější bioindikační organismus pro sledování kontaminace prostředí chlorovanými látkami [112]. Rovněž v naší studii [109] zaměřené na zhodnocení kontaminace lovné zvěře a drobných zemních savců byla aplikována kongenerová analýza; pro sledování však byli vybráni drobní zemní savci živící se převážně rostlinnou potravou, protože jsou vhodnější pro sledování kontaminace; takto je vyloučen vliv bioakumulace prostřednictvím dalšího článku potravního řetězce, jak je tomu u hmyzožravých. Tento výběr vycházel z komplexní studie, do které bylo zapojeno moje původní pracoviště (VFU BRNO), kdy byl ve spolupráci s odborníky z Ústavu ekologie krajiny AV ČR v Brně proveden výběr níže uvedených drobných zemních savců na podkladě zhodnocení skladby potravy a obsahu lipidů ve tkáních. Rovněž byla řešena otázka velikosti směšného kompozitního vzorku, který by poskytl dostatečné množství lipidického podílu pro analýzy. Pro účely biomonitoringu byl využit hraboš polní (*Microtus arvalis*), což je nejběžnější evropský druh hraboše, protože preferuje zelenou potravu bohatou na bílkoviny a na podzim a v zimě přechází na podzemní části rostlin; dále norník rudý (*Clethrionomys glareolus*), který obývá lesní prostředí, dobře šplhá, takže není při shánění potravy odkázán jen na sběr na zemi, okusuje pupeny, výhonky, jehličí i kůru. Na jaře se může žít i živočišnou potravou, teritorium dospělého je kolem 0,1–0,7 ha. Dále byla vybrána myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*), což je náš nejběžnější hlodavec, který se nachází všude mimo souvislé lesní porosty a může osidlovat i haldy, výsypky a městskou zástavbu. Jedinec obývá území o rozloze 1 až 2 hektary, živí se zejména semeny a plody, potravní spektrum doplňuje mechy, lišejníky popř. drobnými živočichy. Posledním zvoleným organismem byla myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), která má podobné potravní návyky jako myšice křovinná; na rozdíl od ní však obývá výhradně souvislé lesy, případně břehy potoků se souvislým stromovým porostem.

**Publikace B2** byla zaměřena na posouzení využití některých živočišných bioindikátorů. Lovná zvěř (zajíci, srnci, daňci, bažanti) a drobní zemní savci (*M. arvalis*, *C. glareolus*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*) pocházely z oblasti Staré Město u Uherského Hradiště a to cíleně, protože se jednalo o oblast, kde byly dlouhodobě až do zákazu v roce 1986, používány v podniku Colorlak pro výrobu barev a laků směsi PCB československé provenience, tj. Delor 106. Drobní zemní savci byli také odloveni v oblasti Velká Losenice na Žďársku, která představovala kontrolní nezatíženou oblast. Tkáň lovné zvěře (játra, ledviny, svaly) byly analyzovány jednotlivě, zatímco u drobných zemních savců vzhledem k velikosti vzorků a obsahu tuku byly z individuálních vzorků smíchány vzorky kompozitní (5 kusů daného druhu) a indikátorové kongenery PCBs byly zjišťovány pouze v kůži, svalovině, trávící soustavě a/nebo v játrech. Obsah lipidického podílu byl zjišťován u 20 ks hraboše polního (*M. arvalis*), 20 ks norníka rudého (*C. glareolus*), 16 ks myšice lesní (*A. flavicollis*) a 12 ks myšice křovinné (*A. sylvaticus*). Pro analýzu byly použity vzorky hrabošů, které pro naše účely byly smluvně odloveny v letech 1996 až 1998 odborníky z Ústavu ekologie

krajiny AV ČR v Brně. Určení příslušnosti k určitému biologickému druhu prováděli rovněž pracovníci tohoto ústavu. Byla provedena kongenerově specifická analýza pro stanovení indikátorových kongenerů (a to PCB 28, 52, 101, 118,138,153,180) podle postupu uvedeného v úvodní části této kapitoly. Pro účely stanovení ve tkáních lovné zvěře bylo analyzováno 25 vzorků svaloviny a jater zajíců, srnců a daňků a 18 vzorků jater a svaloviny bažantů. V rámci této monitorizační studie byly také analyzovány jikry ryb odlovených ve vodní nádrži Smradávka a mrtvé včely, které byly sesbírány od místních včelařů. Z našich výsledků, týkajících se nejen kontaminace lovné zvěře, ale také ryb, případně včel vyplynulo, že v nejnižších koncentracích byl zastoupen kongener PCB 101, který byl často i pod detekčním limitem. Z nížechlorovaných PCBs byly detekovány zejména kongener 28 a 52, což poukazovalo i na atmosférickou depozici v této oblasti kontaminované v minulosti; naše zjištění korespondovala s výsledky autorů na Slovensku z podobně kontaminované oblasti v okolí Chemka Strážské [107]. Individuální a také průměrné koncentrace výšechlorovaných kongenerů PCBs (PCB 118, 138,153 a 180) nepřesahovaly povolené limity pro lovnou zvěř, avšak množství výskytu těchto kongenerů ve vzorcích, zejména PCB 138, 153 a 180, bylo alarmující. Rovněž v porovnání s výsledky prezentovanými SVS pro dané období byly naše nálezy vyšší než průměrné celostátně uváděné údaje. Výsledky analýz u ostatních živočišných bioindikátorů (bažant, včely, kapr) odebíraných ze stejné oblasti potvrdily trendy v zastoupení jednotlivých kongenerů, tj. nízké koncentrace pro kongener 101, 118, přičemž nejnižší byly u vzorků včel. Poměrně vysoká koncentrace nížechlorovaných kongenerů 28 a 52 souvisí pravděpodobně se sekundární kontaminací, která byla prokazována také u ostatních organismů použitých pro bioindikaci. Také u těchto bioindikátorů byl zjištěn vysoký obsah výšechlorovaných kongenerů podílejících se na sumě PCBs. Pokud se týče drobných zemních savců, výsledky nepotvrdily signifikantní rozdíly v koncentraci jednotlivých kongenerů zjištěné u organismů z kontaminované a z kontrolní oblasti. Vzhledem k našim poznatkům však lze doporučit drobné zemní savce jako vhodné bioindikátory pro indikaci kontaminace příslušného ekosystému, což potvrzují údaje i z dalších studií [112, 114]. Protože jsme detekovali pozitivní nálezy i v kontrolní oblasti, lze se domnívat, že se zde pravděpodobně vyskytoval neznámý zdroj kontaminace.

### 3.4.3 Terestrické rostliny jako bioindikátory

Využití rostlinných bioindikátorů při sledování kontaminace potravních řetězců v terestrických ekosystémech indikuje, jaké kontaminanty a v jakém množství jsou dostupné především vyšším rostlinám. Tyto rostliny jsou potravou, případně surovinou pro potravinářský průmysl, nebo slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata a také jsou součástí potravního koše volně žijící zvěře mající vztah k dané lokalitě. Rostlinné bioindikátory můžeme použít v rámci pasivní bioindikace, při které se využívá schopnosti selektivního poškození rostlinných částí (reakční bioindikátor, sentinel), nebo kumulace některých látek ve vybraných rostlinách (akumulační bioindikátor). Při tomto typu sledování se používají kulturní plodiny nebo plané rostliny rostoucí v zájmové oblasti. V rámci aktivní (expoziční) bioindikace jsou vybrané rostliny vystaveny vlivům okolního prostředí; ty pak reagují akumulací sledovaných látek (akumulační bioindikátor) nebo poškozením (reakční bioindikátor). Obvykle se jedná o rostliny, předpěstované za určitých, normalizovaných a předem daných podmínek a slouží pro indikaci emisní zátěže. Tyto bioindikátory jsou obvykle umísťovány do zájmové oblasti ve standardizovaných kulturách, kde se sleduje jejich reakce. Pro pasivní monitoring emisní zátěže rostlin doporučuje Honzík [115] smetánku lékařskou, jitrocel větší, bez černý, řebříček obecný, kostřavu červenou, sléz kadeřavý a oves hluchý, tj. rostliny, jejichž výskyt je po ČR rovnoměrně rozptýlen. V rámci aktivního monitoringu jsou využívány kukuřice setá, salát hlávkový, špenát setý a ředkvička setá. V současné době je věnována zvýšená pozornost plyným emisím a jejich negativnímu působení na zemědělské rostliny. Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV) doporučuje jako doplněk ke stanovení koncentrace indikační složky, tj. koncentrace oxidu siřičitého ve vzduchu, sledovat chemismus polévatého aerosolu a



atmosférické depozice, a to v kombinaci se sledováním rostlin-bioindikátorů. Pro tyto účely byly v rámci monitoringu VÚRV navrženy smetánka lékařská *Taraxacum officinale* L. (pasivní akumulární indikátor) a jílek vytrvalý *Lolium perene* (aktivní/akumulární). Výsledky tohoto sledování poskytují přímé důkazy o škodlivém vlivu imisí na zemědělskou výrobu.

Metodika aktivního biomonitoringu byla rovněž používána na vybraných stanovištích Ústředního zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) [116], kde byl také používán jílek mnohokvětý (*L. multiflorum*), s měsíčním odběrem zelené hmoty a borovice černá (*Pinus nigra*) s ročním resp. půlročním odběrem jednoletých jehlic. V tomto případě byly tyto rostlinné bioindikátory aplikovány pro monitoring imisní zátěže. Emisní zátěž je rovněž dlouhodobě v ČR sledována prostřednictvím mechů. Tzv. První celoevropský a český program zjišťování obsahu prvků v mechu proběhl v letech 1990/1991; v rámci tohoto projektu byly analyzovány vzorky mechu z 33 lokalit (*Pleurozium schreberi*), který byl odebrán z 78 % celkového počtu lokalit a (*Polytrichum formosum*) z 12 % lokalit; stanovovány byly koncentrace As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Se, V a Zn [117].

Zdrojem kontaminace rostlin POPs v terestrickém ekosystému se zabývali v letech 2000 a 2001 také ve Výzkumném ústavu meliorací a ochrany půdy (VÚMOP). Při sledování korelace zvýšených obsahů POPs v rostlinách se zvýšeným obsahem v půdách byla zjištěna minimální shoda. Ani ve vyšších polohách okresů Libereckého a Královéhradeckého kraje nebyla prokázána shoda mezi zátěží půd a rostlin POPs. Autoři tohoto projektu prokázali, že zátěž rostlin sledovanými POPs byla rozhodující měrou ovlivněna v terénních podmínkách atmosférickou depozicí; také se na obsahu POPs v rostlinách v rámci provedeného sledování prakticky neprojevil transfer půda-rostlina. Výsledky získané těmito autory jim umožnily odvodit vysokou závislost POPs obsažených v rostlinách na atmosférické depozici, případně na dalších vstupech do rostlin mimokořenovým příjmem, přičemž transfer půda-rostlina byl u sledovaných POPs málo významný [118]. Tuto skutečnost potvrdili i další autoři [119].

Jak již bylo prezentováno, jednoznačně nebyl prokázán přestup PCBs z půdy rostlin; kontaminanty jsou většinou nasorbovány na povrchu kořenového systému a kontaminace nadzemních částí vegetace PCBs souvisí především s atmosférickými imisemi; mohou se však také uplatňovat reemise, a to zejména těžkavějších PCBs z půdy [118]. K podobnému závěru dospěl také O'Connor [120], který prováděl skleníkové pokusy na kulturních rostlinách (salát, mrkev) a na travním porostu, když sledoval přestup PCBs z kalů komunálního odpadu, silně kontaminovaného PCBs ( $52 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Ani v tomto případě se neprokázal přestup PCBs do nadzemních částí kořenovým systémem rostliny. Pouze zjistil transfer do kořene mrkve, a to jen do slupky. Tuto skutečnost si lze vysvětlit vysokým podílem lipofilních karotenoidů obsažených v této části mrkve. Bioakumulace kořenovým systémem byla však potvrzena v polních studiích prováděných se slunečnicemi a kukuřicí, kdy Kačálková [121] sledovala přestup PCBs a PAHs z kontaminované půdy do kukuřice (*Zea mays* L.), slunečnice (*Helianthus annuus*), topolu (*Populus nigra* a *P. maximowiczii*) a vrby (*Salix smithiana*); tyto pokusy se uskutečnily v oblasti bývalé spalovny odpadu v Hradci Králové. Výsledky screeningového vyšetření potvrdily heterogenní kontaminaci půdy PCBs a PAHs, přičemž kontaminace půdy PCBs odpovídala Deloru 106 nebo Arochloru 1260 (koncentrace PCBs v půdě byla  $1,530 \text{ ug.kg}^{-1}$  sušiny). Výpočty biokoncentračních faktorů potvrdily, že PCBs se nejvíce kumulovaly v kořenech kukuřice a slunečnice, a to především kongenery 138, 153 a 180; z výsledků vyplynulo, že hexa- a heptavýšchlorované kongenery PCBs se kumulují mnohem více než nížechlorované tri- až penta-chlorované kongenery. Rovněž další provedená studie potvrdila, že některé druhy rostlin jsou schopny kumulovat PCBs do kořenů. Studována byla kontaminace u kořenové zeleniny a bylo prokázáno, že tato zelenina je schopna kumulovat PCBs, a to v pořadí petržel, mrkev a červená řepa, přičemž z celkového stanoveného množství bylo ve slupce červené řepy a mrkve 75,3 a 93,6 %. Takovým způsobem mohou kořeny některých rostlin představovat potenciál pro fytoremediace [122].

V rámci projektu MŽP ČR “Hodnocení stavu životního prostředí: Monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích“, prováděného v letech 1995 až 2000, byly pro účely monitoringu využity rostlinné bioindikátory, a to pro sledování POPs (PAHs, PCBs, OCPs). Bylo sledováno 12 PAHs (z 16 prioritních podle US EPA nebyl posuzován naftalen, acenaften, acenaftylen a fluoren), dále 7 indikátorových kongenerů PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) a 6 organochlorových pesticidů ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -HCH, HCB, DDT, DDE, případně další metabolity DDT). Tento monitoring byl prováděn na 22 lokalitách; PAHs byly zjišťovány v zemědělských plodinách (jablka, pšenice, olejniny a zelí), krmivu (vojtěška), pylu, rybách, mechu, jehličí a úhrnné atmosférické depozici, zatímco PCBs a OCPs byly sledovány ve tkáních volně žijící zvěře (zajíc, srnec), bramborách, pylu, rybách, mechu, jehličí a mokré atmosférické depozici [123].

Za účelem sledování zatížení potravních řetězců a pro porovnání kontaminace terestrických ekosystémů prostřednictvím zátěže půd a rostlin jsou vesměs odebírány vzorky kulturních rostlin, objemových krmiv, olejnin, pšenice a rovněž tzv. rumištní rostliny. Kulturní rostliny mají vztah k příslušným lokalitám a můžeme je proto využít zejména pro hodnocení úrovně znečištění běžných ekosystémů, rostliny rumištní jsou naopak více využívány pro hodnocení starých zátěží. Jako součást potravy volně žijících zvířat byly analyzovány také okusové rostliny a travní porosty. Publikované studie se spíše zaměřovaly na hodnocení krmných rostlin, případně těch, které sloužily pro výživu člověka. Studií, které by se zabývaly rostlinnými bioindikátory ve spojení s volně žijícími organismy, bylo dosud uveřejněno jen málo.

**V publikaci B3** jsou prezentovány výsledky analýz rostlinných bioindikátorů pro posouzení úrovně kontaminace ekosystémů zatížených PCBs. Vojtěška, obiloviny, olejniny, rumištní rostliny byly odebírány na rekultivované skládce odpadů a na ilegální skládce v oblasti, kde byly uloženy odpady po výrobě barev obsahujících výsechlorované směsi PCBs (Delor 106). Rovněž byly vzorkovány okusové rostliny, které tvoří hlavní složku potravy lovné zvěře. Bylo konstatováno, že rostlinné bioindikátory jsou při posuzování kontaminace ekosystému analyzovány spíše jako doplňkový zdroj informací, na rozdíl od živočišných bioindikátorů. Pro detailní hodnocení znečištění ekosystému by však podle našeho názoru měly být vždy zařazeny, protože poskytují informace nejenom o atmosférické depozici, ale také o vlivech neočekávaných událostí, jakými byly např. povodně apod. V naší studii byly v rumištních rostlinách, kterými byly kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) a lebeda rozkladitá (*Atriplex patula*) a v kulturních rostlinách, tj. ve slunečnici roční (*Helianthus annuus*), vojtěšce seté (*Medicago sativa*), řepce olejce (*Brassica napus*), pšenici seté (*Triticum aestivum*), v travním porostu a v okusových rostlinách zjišťovány indikátorové kongenery PCBs. Nejvyšší individuální hodnoty byly u kulturních rostlin kvantifikovány pro PCB 138 (vojtěšky  $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$  sušiny) a obiloviny ( $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$  sušiny). Ze všech plodin byly poněkud vyšší hodnoty všech kongenerů zjištěny u řepky olejky, s maximálním obsahem PCB 28 (individuální hodnota  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), což lze opět přisoudit spíše atmosférické depozici než místním zdrojům kontaminace. Hodnoty námi prokázány byly vesměs v souladu s výsledky monitorizačních programů organizovaných Ministerstvem životního prostředí ČR a Ministerstvem zemědělství ČR. U rumištních rostlin odebíraných na ilegální skládce byla situace poněkud odlišná, koncentrace indikátorových kongenerů byla vyšší zejména u kongeneru PCB 138 a PCB 153 (nejvyšší průměrná koncentrace  $8,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$  a  $7,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$  u kopřivy dvoudomé); mezi jednotlivými druhy rostlin nebyly výrazné rozdíly. Také v případě nížechlorovaných kongenerů PCB nebyly u jednotlivých rostlinných druhů vesměs prokázány signifikantní rozdíly; PCB 28 byl detekován ve vyšších hladinách než PCB 52, avšak ani zde nebyly výrazné rozdíly mezi hodnotami pro různé rostlinné druhy. Přítomnost těchto kongenerů potvrdila rovněž spojitost s atmosférickou depozicí. U okusových rostlin byly prokázány podobné trendy jako u rumištních rostlin. Ve všech analyzovaných vzorcích byly detekovány indikátorové kongenery, s výjimkou PCB 101 a PCB 118. Přítomnost výsechlorovaných PCBs u rumištních a okusových rostlin poukázala na možnou spojitost s ilegální skládkou odpadů a s možnými reemisemi těchto kongenerů z bodových zdrojů.

Kauzalita mezi znečištěním pocházejícím ze starých zátěží a plodinami zde pěstovanými, které jsou součástí krmné dávky a transferem PCBs do tkání hospodářských zvířat, byla řešena v **publikaci B4**. V okrese Uherské Hradiště byly ve dvou lokalitách, a to v obci Stupava, která je situována v ochranném pásmu vodní nádrže s ekologickým zemědělstvím a v obci Buchlovice, kde byla prováděna intenzivní zemědělská výroba (návětrná strana od továrny Colorlak, kde byla v roce 1987 ukončena výroba barev s obsahem Deloru 106), vzorkovány závlahová voda, objemné krmivo, travní porost, žlabové vzorky a také vojtěška a jetel jako bioindikátory rostlinného původu, které byly součástí krmné dávky. Rovněž byly odebrány vzorky mléka, jater a svaloviny dojnic a krmných býčků. Hodnoty koncentrací v závlahové vodě nepřesahovaly ani v jedné lokalitě hodnotu  $0,1 \text{ ng.l}^{-1}$ , což je limit pro sumu kongenerů PCBs v pitné vodě. Rovněž travní porosty měly nízké hladiny indikátorových kongenerů, a to zejména v obci Stupava, kde kongenery 52, 101, 118 byly pod limitem detekce. I v případě složek krmné dávky, odebrané v obci Buchlovice, nebyly prokázány vysoké hodnoty v některých maticích (pšenice, sláma); kongenery 52, 101 a 118 byly pod detekčním limitem a byly v souladu s pozadovými hodnotami uváděnými v ČR. Ve tkáních dojnic a býčků byly nejvíce zastoupenými kongenery 153, 138 a 180 a 28, a to zejména v játrech. Pro žlabové vzorky a objemné krmivo bylo kongenerové zastoupení podobné a žádné nálezy nebyly nadlimitní. Podobné trendy v kongenerovém zastoupení v analyzovaných maticích se prokázaly i v oblasti Stupava, přičemž ve složkách krmné dávky byly kongenery 101 a 118 pod mezí detekce; v případě vojtěšky a slámy byl pod mezí detekce i kongener 180, u pšenice také kongenery 28 a 52. Hodnoty stanovené pro jednotlivé kongenery v jednotlivých maticích v regionu Stupava byly nižší než u matic odebraných v Buchlovicích. Cílem této práce bylo rovněž vypočítat tzv. „carry over“ faktor (koeficient transferu, který je dán poměrem koncentrace ve finálním produktu ke koncentraci v krmivu) a posoudit, zda dochází k transferu xenobiotik z krmiva do tkání zvířat. Tyto faktory byly vypočteny pouze pro oblast Buchlovice pro ty kongenery, jejichž hodnoty se nepohybovaly blízko limitům detekce, tj. PCB 138, 153 a 180. Hodnoty koeficientu transferu nad 0,1 (dojnice 0,2-1,0; býčci 0,3-1) ve svalovině a játrech býčků a ve svalovině, játrech a mléce dojnic indikovaly, že krmivo bylo zdrojem kontaminace tkání. Z prezentovaných dat lze odvodit, že rostliny představují významný bioindikátor nejenom z hlediska posouzení kontaminace příslušného ekosystému a případných zdrojů kontaminace, ale také pro posouzení úrovně kontaminace potravního řetězce.

#### **3.4.4 Krev jako matrice pro indikaci zátěže persistentními polutanty**

V posledních letech se pro bioindikaci doporučuje také využívání biomarkerů. V podstatě se jedná o způsob zjišťování specifických/nеспецифických reakcí organismu na přítomná xenobiotika. Tento způsob indikace vychází z principu, že efekty vyvolané xenobiotikem jsou iniciovány jejich interakcí s receptory v živém organismu. Krev je v rámci monitorizačních studií velmi vhodnou maticí, neboť je dosažitelná ještě v průběhu života organismu. Kromě stanovení zájmových analytů je vhodnou maticí i pro sledování změn odehrávajících se v organismu po působení tohoto analytu na cílové struktury prostřednictvím tzv. biomarkerů účinku, které, jak již bylo uvedeno, mohou být pro danou látku specifické. V širším slova smyslu je identifikace xenobiotika nebo jeho metabolitu v tělních tekutinách rovněž biomarkerem, a to biomarkerem expozice. V dnešní době je zejména biomarkerům účinku věnována značná pozornost, protože představují změny na suborganismální úrovni (biochemické, fyziologické alterace), které je možné odhalit dříve, než dojde k životu ohrožující situaci pro cílový organismus. Na základě tohoto biochemického markeru lze hodnotit nejenom expozici životního prostředí chemickými škodlivinami, ale také provádět hodnocení zdravotních rizik.

Krev jako transportní médium látek endogenního původu představuje maticí, kterou jsou transportovány i látky exogenního původu, tj. i xenobiotika typu PCBs. PCBs jako lipofilní látky by měly být transportovány především prostřednictvím lipoproteinové frakce krve. Z pokusů však vyplynulo, že distribuce PCBs je mnohem komplexnější a nevychází z pouhé rozpustnosti

v lipidových komponentech frakcí plazmy. Z literatury vyplynulo jejich spojení s apolipoproteiny a plazmovými proteiny, které byly významné při transportu PCBs do tkání. Bifenylly substituované halogeny nejsou vázány na specifická místa proteinů, předpokládá se spíše jejich vazba na hydrofobní místa krevních proteinů nebo celulárních složek krve [124]. Z výsledků pokusu, kdy byl holubům injekčně aplikován komerční přípravek Aroclor 1254 vyplynulo, že frakce bohaté na lipidy (chilomikrony a VLDL) obsahovaly především kongener PCB 153, ostatní kongenery tohoto přípravku byly distribuovány mezi LDL a další frakce chudé na lipidy, zejména albumin [125]. Porovnání koncentrací PCB v různých složkách krve byla věnována další studie, s cílem zjistit jejich distribuci [126]. Z výsledků vyplynulo, že většina tri- a tetra- chlorovaných bifenylů měla větší zastoupení a výrazně vyšší hladiny v celé krvi, než v séru (25 % z celkové fortifikace) nebo v plazmě (40 %); výšechlorované bifenylly (hexa- až okta-) vykazovaly zcela opačný trend. V plazmě nebo v séru bylo jejich procentuální zastoupení mezi 55 – 83 %. Na základě těchto výsledků bylo odvozeno možné spojení nížechlorovaných bifenylů s červenou krevní řadou.

Na pracovišti VFU Brno byla analyzována krev prasat, a to za účelem zjistit, zda je možné ji použít jako vhodnou matici pro zjištění kontaminace organismu PCBs a posoudit průběh metabolizace jednotlivých kongenerů PCBs; o detailech pojednává **publikace B5**. Do pokusu byla zařazena prasata plemene české bílé ušlechtilé o hmotnosti cca 40 kg, která byla ustájena v nově vybieleném vepříně. Perorálně jim byly ve 14 denních intervalech podávány želatinové tobolky s obsahem Deloru 103 nebo 106 (1 mg.kg<sup>-1</sup> byl obsažen ve vepřovém sádle). Týden po podání byla odebírána krev, a to celkem ve 13 odběrech. Zpracování krve probíhalo podle výše prezentovaného postupu. Protože preanalytické postupy velmi ovlivňují výsledky analýz, bylo v tomto případě zapotřebí dbát na to, aby při extrakci organickými rozpouštědly z krevní plazmy nedocházelo k zákalu (precipitace bílkovin, snížení výtěžnosti metody). Z výsledků získaných v rámci pokusu vyplynulo, že ve skupině pokusných jedinců, kterým byl podáván Delor 103 (převaha nížechlorovaných kongenerů 52, 101 a 118), postupně klesala koncentrace těchto kongenerů a zvyšovala se koncentrace výšechlorovaných PCBs (138, 153, 180), zejména PCB 153; tento experimentálně potvrzený poznatek je v souladu s poznatky z literatury, kde bylo deklarováno, že nížechlorované kongenery se snáze metabolizují [127]. Dynamika PCBs v krevní plazmě byla posouzena na podkladě vypočteného poměru mezi koncentrací níže- a výšechlorovanými PCBs. U jednoho pokusného jedince na začátku experimentu byl poměr 1:0,97, po 13. odběru (26 týdnů) 1:2,44, přičemž průměrná hodnota pro pokusnou skupinu byla 1:1,38. Hodnoty se pohybovaly na úrovni mg.kg<sup>-1</sup>. Zatímco koncentrace kongeneru 52 a 101 klesala, u PCB 153 stoupala. Nečekané výsledky byly získány u kontrolní skupiny, kde u dvou jedinců byly také koncentrace nad mezí detekce (zjištěné hodnoty se pohybovaly na úrovni µg.kg<sup>-1</sup>) a proto mohl být rovněž vypočten poměr mezi níže- a výšechlorovanými kongenery. Pro průměrný obsah indikátorových kongenerů PCBs v krevní plazmě byl za celé sledované období vypočten podíl, a to 1:3,19; tento podíl, stejně jako pozitivní hodnoty obsahu PCBs, indikovaly externí zdroj kontaminace. Z výsledků je zřejmé, že lokalita byla zatížena Delorem 106 z továrny Colorlak, který se nacházel v blízkosti JZD Boršice u Buchlovic, ve kterém pokus probíhal. Významným zdrojem může být také stájový prach [128], případně krmivo, jak již bylo prokázáno i v našich studiích (**publikace B3 a B4**). U pokusné skupiny, které byl aplikován Delor 106, byl poměr nížechlorovaných PCBs ku výšechlorovaným PCBs, který byl vypočten na základě průměrných hodnot 1:4,69 (13 týden). V tomto případě rovněž převažovaly výšechlorované kongenery PCBs, což bylo rovněž potvrzeno dynamikou výskytu kongenerů PCBs v krevní plazmě, která v průběhu 13 odběrů vykazovala nárůst koncentrace kongeneru 138 a 153. Nejnižší hodnoty byly prokázány u kongenerů 52 a 118, což představovalo hlavní rozdíl od pokusné skupiny, které byl podáván Delor 103. Na podkladě získaných výsledků je možné konstatovat, že nebyla jednoznačně potvrzena možnost odhadu kontaminace tkání na základě informací získaných analýzou krve. Pro objektivní odvození vztahu mezi hodnotami obsahu PCBs zjištěnými v krvi a ve tkáních hospodářských zvířat by bylo zapotřebí odebírat v předem stanovených časových intervalech

nejenom krev, ale také bioticky tuk, a to ještě za života zvířete a takto získat potřebná data pro jednoznačné stanovení korelace mezi obsahem PCBs v krvi a ve tkáních hospodářských zvířat. Hladiny PCBs a jiných persistentních lipofilních kontaminantů v životním prostředí byly nulové v čase 0, tj. před obdobím, kdy začaly být vyráběny a používány. Na podkladě analýzy krve je proto možné určit, zda organismus přišel do kontaktu s kontaminanty typu PCBs ve větším rozsahu, než odpovídá pozadovým hodnotám. Nelze sice určit, jak dlouho a v jakém rozsahu tato expozice probíhala, avšak z kongenerového zastoupení je možné posoudit, jaká komerční směs se na této kontaminaci mohla dominantně podílet.

## 4 ZÁVĚR

Předložená habilitační práce představuje odborné aktivity uchazečky v oblasti zhodnocení využití organismů pro posuzování zátěže životního prostředí znečišťujícími látkami antropogenního původu. V širším slova smyslu bylo toto odborné zaměření spojeno s využíváním principů ekotoxikologie, což je relativně mladý, ale rychle se rozvíjející obor, o čemž svědčí i počty publikací z této oblasti. Ekotoxikologie je rovněž v současnosti neopominutelný vědní obor, což vyplývá i z legislativy, která vyžaduje ekotoxikologické posouzení pro každou nově zaváděnou chemickou látku a přípravek. Studování vzájemných vztahů a zákonitostí mezi toxickými látkami a živými organismy je zahrnuto do té části ekotoxikologie, která se zabývá bioindikací. Na pracovišti VFU Brno byly využívány bioindikátory rostlinného a živočišného původu a principy bioindikace jako jedna z metod hodnocení expozice kontaminanty. Do této skupiny metod patří rovněž analýzy organismů, tzv. bioakumulátorů, které jsou schopny ve svých tkáních specificky kumulovat sledované polutanty.

Od konce 80. let 20. století byly systematicky monitorovanými polutanty polychlorované bifenyly, které byly předmětem sledování mnoha studií. Rovněž moje bývalé pracoviště bylo v této oblasti aktivní, a to díky vazbám na probíhající monitoring potravních řetězců a rovněž na JZD Boršice u Buchlovic, které patřilo do oblasti Starého Města u Uherského Hradiště, kde se nacházela továrna Colorlak, ve které byly vyráběny barvy s použitím Deloru 106; právě tato továrna představovala bodový zdroj kontaminace těmito persistentními organickými polutanty. V našich pracích jsme prokázali význam využití akumulčních bioindikátorů pro odhad kontaminace příslušného ekosystému a současně i k odhalení příslušných zdrojů kontaminace.

Využití bioindikačních organismů v testech ekotoxicity jako součásti metod hodnocení účinku, bylo předmětem aktivit spojených se stávajícím pracovištěm uchazečky, a to FCH VUT v Brně. Pro hodnocení vybraných skupin polutantů byly využívány testy ekotoxicity na úrovni organismů. Přestože v této oblasti postupuje vývoj směrem k hodnocení účinku polutantů i na suborganismální úrovni, tj. prostřednictvím biomarkerů účinku, zůstávají klasické standardní testy ekotoxicity důležitým nástrojem pro odhad chování a účinků látek v terestrických a akvatických ekosystémech. Využívání právě těchto standardních testů pro hodnocení chemických látek, ekotoxicity odpadů, případně ekotoxicity sedimentů a jiných matric vnášených do ekosystému, je zakotveno v legislativně nejen České republiky, ale také Evropské unie a dalších zemí, které se aktivní ochranou životního prostředí zabývají.

## 5 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] Lardy-Fontan S., Brieudef V., Candido P., Couturier G., Lalere B., Budzinski H., Lavison G. Development and implementation of a Di-MS based method with full uncertainty estimate to achieve measurement of pharmaceutical residues in natural waters. International Congress of Metrology 2015. p. 05001.
- [2] Zákon o životním prostředí. Sbírka zákonů 17/1991. Česká republika.
- [3] Truhaut R.: *Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1977, vol. 1, pp. 151-173.
- [4] Hoffman D.J., Barnett A., Rattner G., Burton A., Cairns J.: *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2003. 1290 s. ISBN 978-1-4200-3250-5
- [5] Connel D., Lam P., Richardson B., Wu R.: *Introduction to Ecotoxicology*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd., 1999. 170 s. ISBN 0-632-03852-7
- [6] Anděl P.: *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, s.r.o., 2011. 243 s. ISBN 978-80-903787-9-7
- [7] Rimkus G., Wolf M.: *Contamination of Schleswig-Holstein game by harmful substances. 4. Lead, cadmium and mercury contents in the meat and organs of game animals and game birds*. Fleischwirtschaft, 1987, vol. 67, pp. 1150-1154.
- [8] Rimkus G., Wolf M.: *Contamination of Schleswig-Holstein game by harmful substances. 3. Conception and organization of a game examination program - residues of organochlorine compounds in the muscle fat and liver fat of game animals and game birds*. Fleischwirtschaft, 1987, vol. 67, pp. 868-873.
- [9] McClellan K., Halden R.U.: *Pharmaceuticals and personal care products in archived US biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey*. Water Research, 2010, vol. 44, pp. 658-668.
- [10] Brausch J.M., Rand G.M.: *A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity*. Chemosphere, 2011, vol. 82, pp. 1518-1532.
- [11] Sumner N.R., Guitart C., Fuentes G., Readman J.W.: *Inputs and distributions of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study*. Environmental Pollution, 2010, vol. 158, pp. 215-222.
- [12] Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J.: *The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK*. Water Research, 2008, vol. 42, pp. 3498-3518.
- [13] Roberts P.H., Thomas K.V.: *The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment*. Science of the Total Environment, 2006, vol. 356, pp. 143-153.
- [14] Heberer T.: *Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water*. Journal of Hydrology, 2002, vol. 266, pp. 175-189.
- [15] Pascoe D., Karntanut W., Muller C.T.: *Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian Hydra vulgaris*. Chemosphere, 2003, vol. 51, pp. 521-528.
- [16] Krahn M.M., Hanson M.B., Schorr G.S., Emmons C.K., Burrows D.G., Bolton J.L., Baird R.W., Ylitalo G.M.: *Effects of age, sex and reproductive status on persistent organic pollutant concentrations in "Southern Resident" killer whales*. Marine Pollution Bulletin, 2009, vol. 58, pp. 1522-1529.
- [17] Baur A.: *Studien über den künstlichen Moschus*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1891, vol. 24, pp. 2832-2843.
- [18] Luckenbach T., Epel D.: *Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters*. Environmental Health Perspectives, 2005, vol. 113, pp. 17-24.
- [19] Daughton C.G., Ternes T.A.: *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?* Environmental Health Perspectives, 1999, vol. 107, pp. 907-938.
- [20] Salvito D.: *Synthetic musk compounds and effects on human health?* Environmental Health Perspectives, 2005, vol. 113, pp. A802-A803.

- [21] Rowe D.J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Blackwell Publishing Ltd., 2009. 336 s. ISBN 9781444305517
- [22] Tanabe S.: *Synthetic musks - arising new environmental menace?* Marine Pollution Bulletin, 2005, vol. 50, pp. 1025-1026.
- [23] Dietrich D.R., Chou Y.J.: *Ecotoxicology of Musks*. In: Daughton CG, Jones-Lepp TL, editors. *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*: American Chemical Society; 2001. p. 156-167.
- [24] Ruzicka L., Stoll M., Schinz H.: *Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes. II. Synthese der carbocyclischen Ketone vom Zehner- bis zum Achtzehnering*. Helv Chim Acta, 1926, vol. 9, pp. 249-264.
- [25] Sommer C.: *The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry*. In: Rimkus G, editor. *Series Anthropogenic Compounds*: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 1-16.
- [26] Kraft P.: *'Brain aided' musk design*. Chemistry & Biodiversity, 2004, vol. 1, pp. 1957-1974.
- [27] Eh M.: *New alicyclic musks: The fourth generation of musk odorants*. Chemistry & Biodiversity, 2004, vol. 1, pp. 1975-1984.
- [28] Regueiro J., Garcia-Jares C., Llompart M., Lamas J.P., Cela R.: *Development of a method based on sorbent trapping followed by solid-phase microextraction for the determination of synthetic musks in indoor air*. Journal of Chromatography A, 2009, vol. 1216, pp. 2805-2815.
- [29] Lignell S., Darnerud P.O., Aune M., Cnattingius S., Hajslova J., Setkova L., Glynn A.: *Temporal trends of synthetic musk compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products*. Environmental Science & Technology, 2008, vol. 42, pp. 6743-6748.
- [30] Yamagishi T., Miyazaki T., Horii S., Kaneko S.: *Identification of musk xylene and musk ketone in fresh-water fish collected from the Tama River, Tokyo*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1981, vol. 26, pp. 656-662.
- [31] Yamagishi T., Miyazaki T., Horii S., Akiyama K.: *Synthetic musk residues in biota and water from Tama River and Tokyo Bay (Japan)*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1983, vol. 12, pp. 83-89.
- [32] Rimkus G.G., Butte W., Geyer H.J.: *Critical considerations on the analysis and bioaccumulation of musk xylene and other synthetic nitro musks in fish*. Chemosphere, 1997, vol. 35, pp. 1497-1507.
- [33] Rimkus G.G., Wolf M.: *Nitro musk fragrances in biota from fresh-water and marine-environment*. Chemosphere, 1995, vol. 30, pp. 641-651.
- [34] Musk xylene and other musks. Hazardous Substances Series: OSPAR Commission; 2004. p. 1-45.
- [35] Hajšlová J., Gregor P., Chládková V., Alterová K.: *Musk compounds in fish from Elbe River*. Organohalogen Compounds, 1998, vol. 39, pp. 253-256.
- [36] Rimkus G.G.: *Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment*. Toxicology Letters, 1999, vol. 111, pp. 37-56.
- [37] Zouhar L.: *Studium průniku „musk“ sloučenin do abiotických a biotických složek vodních ekosystémů*. Brno, 2013. Disertační práce, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně. Supervisor Prof. RNDr. Vávrová M.
- [38] Lee I.-S., Lee S.-H., Oh J.-E.: *Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment*. Water Research, 2010, vol. 44, pp. 214-222.
- [39] Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H., Jorgensen S.E.: *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review*. Chemosphere, 1998, vol. 36, pp. 357-394.
- [40] Gomez M.J., Petrovic M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D.: *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters*. Journal of Chromatography A, 2006, vol. 1114, pp. 224-233.
- [41] Kummerer K.: *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review*. Chemosphere, 2001, vol. 45, pp. 957-969.



- [42] Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen L.P., Lutzhoft H.C.H., Halling-Sorensen B.: *Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use*. Chemosphere, 2000, vol. 40, pp. 783-793.
- [43] Vermeulen N.P.E.: Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides C, editor. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. Boca Raton: CRC Press; 1996. p. 29-54.
- [44] Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L.: *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. Science of the Total Environment, 1999, vol. 225, pp. 109-118.
- [45] Waksman S.A.: *What is an antibiotic or an antibiotic substance*. Mycologia, 1947, vol. 39, pp. 565-569.
- [46] Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT, 2002. 415 s. ISBN 80-7080-495-5
- [47] Kuemmerer K.: *Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I*. Chemosphere, 2009, vol. 75, pp. 417-434.
- [48] Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W., Costanzo S.D.: *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water*. Science of the Total Environment, 2009, vol. 407, pp. 2711-2723.
- [49] Heberer T.: *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicology Letters, 2002, vol. 131, pp. 5-17.
- [50] Jjemba P.K.: *Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, vol. 63, pp. 113-130.
- [51] Šírdlova P., Podlipná R., Vaněk T.: *Cytostatická léčiva v životním prostředí*. Chemické Listy, 2011, vol. 105, pp. 8-14.
- [52] Cleuvers M.: *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, vol. 59, pp. 309-315.
- [53] Thomulka K.W., McGee D.J., Lange J.H.: *Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism vibrio-harvey I*. Journal of Environmental Science and Health Part a-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control, 1993, vol. 28, pp. 2153-2166.
- [54] Kummerer K., Alexy R., Huttig J., Scholl A.: *Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria*. Water Research, 2004, vol. 38, pp. 2111-2116.
- [55] Halling-Sorensen B.: *Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming*. Chemosphere, 2000, vol. 40, pp. 731-739.
- [56] Brain R.A., Hanson M.L., Solomon K.R., Brooks B.W.: *Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: Effects and risks*. In: Whitacre DM, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 192. New York Springer-Verlag; 2008. p. 67-115.
- [57] Lincová D., Farghali H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0
- [58] Santos L.H.M.L.M., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M.: *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. Journal of Hazardous Materials, 2010, vol. 175, pp. 45-95.
- [59] Zhang Y., Geissen S.-U., Gal C.: *Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*. Chemosphere, 2008, vol. 73, pp. 1151-1161.
- [60] Paxeus N.: *Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment*. Water Science and Technology, 2004, vol. 50, pp. 253-260.
- [61] Lacina P.: *Využití plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí pro posouzení kontaminace odpadních a povrchových vod rezidui léčiv*. Brno, 2012. Disertační práce, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně. Supervisor Prof. RNDr. Vávrová M.
- [62] Mompelat S., Thomas O., Le Bot B.: *Contamination levels of human pharmaceutical compounds in French surface and drinking water*. Journal of Environmental Monitoring, 2011, vol. 13, pp. 2929-2939.

- [63] Cleuvers M.: *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology Letters, 2003, vol. 142, pp. 185-194.
- [64] Sanderson H., Thomsen M.: *Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action*. Toxicology Letters, 2009, vol. 187, pp. 84-93.
- [65] Hernando M.D., Mezcuca M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D.: *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. Talanta, 2006, vol. 69, pp. 334-342.
- [66] Macht K.: *Hašení vodou, vodní proudy, proudnice [konspekty odborné přípravy jednotek požární ochrany]*. Praha: MV - generální ředitelství Hasičského záchranného sboru ČR, 2004. 14 s. ISBN 80-86640-22-1
- [67] Krol B., Prochaska K., Chrzanowski L.: *Biodegradability of Firefighting Foams*. Fire Technology, 2012, vol. 48, pp. 173-181.
- [68] Mizerski A., Sobolewski M., Król B.: *Hasičí pěny*. Ostrava: Spektrum (Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství), 2009. 181 s. ISBN 978-80-7385-075-3
- [69] Orlicková K.: *Hasební látky*. 1 ed. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 1995. 90 s. ISBN 80-902-0010-9
- [70] Orlicková K.: *Hasiva klasická a moderní*. 1 ed. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 2002. 92 s. ISBN 80-861-1193-8
- [71] Adams R., Simmons D.: *Ecological effects of fire fighting foams and retardants: a summary*. Australian Forestry, 1999, vol. 62, pp. 307-314.
- [72] Balog K.: *Hasiace látky a jejich technologie*. 1 ed. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 2004. 171 s. ISBN 80-866-3449-3
- [73] Moody C.A., Field J.A.: *Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams*. Environmental Science & Technology, 2000, vol. 34, pp. 3864-3870.
- [74] Adams R., Simmons D.: *Ecological effects of fire fighting foams and retardants*. Australian Bushfire Conference, Bushfire '99, Albury: Charles Stuart University, pp. 1-7
- [75] Sikora H.: *Studium vlivu požárů skládek komunálních a průmyslových odpadů na kontaminaci životního prostředí, produkty hoření pryže a halogenovaných polymerů*. Brno, 2014. Fakulta chemická VUT v Brně. Supervisor Čáslavský J.
- [76] ČSN EN ISO 20079 (757745) *Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) - Zkouška inhibice růstu okřehek*. Praha: Český normalizační institut; 2007.
- [77] *Metodické pokyny: Metodický pokyn k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. Věstník ministerstva životního prostředí*. Praha: ALQ Plus, s.r.o; 2002. p. 12-27.
- [78] Lors C., Ponge J.-F., Martinez Aldaya M., Damidot D.: *Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils*. Environmental Pollution, 2011, vol. 159, pp. 2974-2981.
- [79] Ruggiero P., Pizzigallo M.D.R., Crecchio C.: *Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues*. In: Violante A, Huang PM, Bollag JM, Gianfreda L, editors. *Developments in Soil Science*: Elsevier; 2002. p. 95-133.
- [80] Mevius W.: *Taschenbuch der Botanik, Teil 1*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1955s.
- [81] Schönbeck H., Buch M., van Haut H., Scholl G. *Biologische Messverfahren für Luftverunreinigungen*. VDI Berichte 1970. p. 225-236.
- [82] Schubert R.: *Bioindikation in terrestrischen Ökosystemen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1985s.
- [83] Arndt U., Nobel W., Schweizer B.: *Bioindikatoren - Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 1987s.
- [84] Boháč J.: *Organismy jako bioindikátory měnícího se prostředí*. Životné prostredie, 1999, vol. 33, pp. 126-129.

- [85] Markert B.: *Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2007, vol. 21, Supplement 1, pp. 77-82.
- [86] Wilkomirski B.: *History of bioindication*. Monitoring Środowiska Przyrodniczego, 2013, vol. 14, pp. 137-142.
- [87] Dykyjová D.: *Metody studia ekosystémů*. Praha: Academia, 2004. 104 s.
- [88] Vávrová M.: *Využití bioindikátorů při hodnocení starých zátěží terestrického ekosystému* [online]. 2005, [cit. 7.12.2015] available from: <<http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2004/vvf-12-04.pdf>>.
- [89] Knappová M.: *Využití jehličí jako pasivního vzorkovače pro sledování kvality ovzduší* Brno, 2010. Masarykova universita. Supervisor doc. RNDr. Jana Klánová PD.
- [90] Kocourek V., Hajšlová J., Tomaniová M.: *Přehled imisní zátěže agrárního ekosystému vybranými prioritními organickými polutanty* [online]. 2003, [cit. 7.12.2015] available from: <<http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2002/vvf-10-02.pdf>>.
- [91] Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. ed.: *Bioindicators & Biomonitorers: Principles, Concepts and Applications*. Amsterdam: Elsevier, 2003 pp 977. 0-08-044177-7
- [92] Erickson M.D.: *Analytical chemistry of PCBs*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. 667 s. ISBN 978-0873719230
- [93] Randák T., Slavík O., Tlábek V., Horký P.: *Využití juvenilních ryb v rámci monitoringu kontaminace vodního prostředí cizorodými látkami*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 2008. 28 s. ISBN 80-85900-59-9
- [94] Böhm S., Hajšlová J., Kocourek V., Koplík R., Schulzová V., Skácel M., Suchánek M., Volka K.: *Hodnocení stavu životního prostředí: Monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích v roce 1996*. Praha Vydavatelství VŠCHT, 1997s. ISBN 80-7080-310-X
- [95] Jarova K., Vavrova M., Palikova M., Charvatova M., Vecerek V.: *PCBs CONTAMINATION IN COMPARISON BETWEEN OMNIVOROUS AND PREDATORY FISH FROM THE BRNO WATER RESERVOIR, CZECH REPUBLIC*. Fresenius Environmental Bulletin, 2012, vol. 21, pp. 3930-3936.
- [96] Lana R., Vavrova M., Navratil S., Brabencova E., Vecerek V.: *Organochlorine Pollutants in Chub, *Leuciscus cephalus*, from the Svatka River, Czech Republic*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, vol. 84, pp. 726-730.
- [97] Zelnickova L., Svobodova Z., Marsalek P., Dobsikova R.: *Persistent organic pollutants in muscle of fish collected from the Nove Mlyny reservoir in Southern Moravia, Czech Republic*. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, vol. 187, pp.
- [98] Dvorak P., Andreji J., Dvorakova-Liskova Z., Vejsada P.: *Assessment of selected heavy metals pollution in water, sediments and fish in the basin Dyje, Czech Republic*. Neuroendocrinology Letters, 2014, vol. 35, pp. 26-34.
- [99] Rajzák P., Očipová D.: *Contaminants in samples of wildlife animals and fishes in the region of Prešov in the years 1995-2000*. The eleventh scientific symposium with international participation on ecology in selected agglomerations of Jelšava, Lubeník and Central Spiš, Hrádok u Jelšavy:2002. pp. 232-238
- [100] Tataruch F., Kierdorf H.: *Mammals as biomonitors*. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, editors. *Bioindicators & Biomonitorers: Principles, concepts and applications*. Amsterdam: Elsevier; 2003. p. 737-772.
- [101] Nováková E., Paukert J.: *Návrh metody na výzkum dlouhodobého sledování změn znečištění prostředí na území regionální stanice GEMS*. In: *Regionální stanice GEMS, 1. svazek*. Praha: Hydrometeorologický ústav, 1979. 186 s.
- [102] Holm J.: *Investigation of roe deer - criteria for use as a bioindicator in specimen banking*. Science of the Total Environment, 1993, vol. 140, pp. 237-249.
- [103] Wieczorek-Dabrowska M., Tomza-Marciniak A., Pilarczyk B., Balicka-Ramisz A.: *Roe and red deer as bioindicators of heavy metals contamination in north-western Poland*. Chemistry and Ecology, 2013, vol. 29, pp. 100-110.

- [104] Tomza-Marciniak A., Pilarczyk B., Wieczorek-Dabrowska M., Bakowska M., Witczak A., Hendzel D.: *Polychlorinated biphenyl (PCB) residues in European roe deer (Capreolus capreolus) and red deer (Cervus elaphus) from north-western Poland*. Chemistry and Ecology, 2011, vol. 27, pp. 493-501.
- [105] Niewiadowska A., Kiljanek T., Semeniuk S., Zmudzki J.: *ORGANOCHLORINE PESTICIDES AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN GAME ANIMALS FROM POLAND*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2013, vol. 57, pp. 197-201.
- [106] Ciberej J., Breyll L., Kováč G.: *Influence of the environment on the state of health of wild animals living at the territory of Chemko Strážské plant*. Conference about environmental problems on the occasion of awarding the Certificate of Environmental management system according to STN EN ISO 14001, Strážské:pp. 16-21
- [107] Ciberej J., Bílá A., I. B.: *Information about monitoring of PCB in wild animals living at the territory of Chemko Strážské plant*. Conference about environmental problems on the occasion of awarding the Certificate of Environmental management system according to STN EN ISO 14001, Strážské:pp. 16-21
- [108] Kocan A., Petrik J., Jursa S., Chovancova J., Drobna B.: *Environmental contamination with polychlorinated biphenyls in the area of their former manufacture in Slovakia*. Chemosphere, 2001, vol. 43, pp. 595-600.
- [109] Sebestianová N., Vávrová M., Zlámalová Gargošová H.: *Posouzení vhodnosti vybraných druhů drobných zemních savců pro potřeby biomonitoringu*. Veterinářství, 2001, vol. 51, pp. 524-528.
- [110] Shore R.F.: *Predicting cadmium, lead and fluoride levels in small mammals from soil residues and by species-species extrapolation*. Environmental Pollution, 1995, vol. 88, pp. 333-340.
- [111] Talmage S.S., Walton B.T.: *Small mammals as monitors of environmental contaminants*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1991, vol. 119, pp. 47-108.
- [112] Johnson M.S., Leah R.T., Connor L., Rae C., Saunders S.: *Polychlorinated biphenyls in small mammals from contaminated landfill sites*. Environmental Pollution, 1996, vol. 92, pp. 185-191.
- [113] Blankenship A.L., Zwiernik M.J., Coady K.K., Kay D.P., Newsted J.L., Strause K., Park C., Bradley P.W., Neigh A.M., Millsap S.D., Jones P.D., Giesy J.P.: *Differential accumulation of polychlorinated biphenyl congeners in the terrestrial food web of the Kalamazoo River superfund site, Michigan*. Environmental Science & Technology, 2005, vol. 39, pp. 5954-5963.
- [114] Batty J., Leavitt R.A., Biondo N., Polin D.: *An ecotoxicological study of a population of the white footed mouse (Leromyscus-Leucopus) inhabiting a polychlorinated biphenyls-contaminated area*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1990, vol. 19, pp. 283-290.
- [115] Honzík R.: *Kauzální monitoring vlivu imisí na zemědělskou výrobu. Souhrnná zpráva za období 2004-2010* [online]. 2010, [cit. available from:<<https://sites.google.com/a/eto.vurv.cz/monitoring-imisi/monitoring-imisi/vyzkumna-zprava>>].
- [116] Klementová L.: *Výsledky aktivního biomonitoringu. Zpráva za rok 2013. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně* [online]. 2014, [cit. 12.12.2015] available from:<[http://eagri.cz/public/web/file/353565/ZZ\\_biomonitoring\\_2013\\_FINAL.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/353565/ZZ_biomonitoring_2013_FINAL.pdf)>.
- [117] Suchara I. Určení úrovně znečištění významných lesních oblastí ČR kovy pomocí analýzy mechů a lesního humusu. Vyr. Zpr., Projekt MŽP ČR GA/1171/93, ms.: VÚOZ Průhonice; 1994. p. 1-57.
- [118] Zbíral J., Vácha R., Sáňka M., Holoubek I. 6.5 - 6.7 Krmiva, kaly, biomonitoring. In: Holoubek I, editor. Úvodní národní inventura persistentních organických polutantů 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, sro, Brno v zastoupení Konsorcia RECETOX - TOCOEN & Associates, TOCOEN REPORT No 249. Brno 2003.
- [119] Webber M.D., Pietz R.I., Granato T.C., Svoboda M.L.: *Plant uptake of PCBs and other organic contaminants from sludge-treated coal refuse*. Journal of Environmental Quality, 1994, vol. 23, pp. 1019-1026.
- [120] Oconnor G.A., Kiehl D., Eiceman G.A., Ryan J.A.: *Plant uptake of sludge-borne PCBs*. Journal of Environmental Quality, 1990, vol. 19, pp. 113-118.

- [121] Kačálková L., Tlustoš P.: *The uptake of persistent organic pollutants by plants*. Central European Journal of Biology, 2011, vol. 6, pp. 223-235.
- [122] Javorska H., Tlustos P., Kaliszova R.: *Degradation of Polychlorinated Biphenyls in the Rhizosphere of Rape, Brassica napus L.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, vol. 82, pp. 727-731.
- [123] Holoubek I., Hajšlová J., Sáňka M., Kužílek V., Rieder M., Novák J., Čupr P., Tomaniová M., Kocourek V., Volka K. 10. Monitoring persistentních organických polutantů v ČR. In: Holoubek I, editor. Úvodní národní inventura persistentních organických polutantů 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, sro, Brno v zastoupení Konsorcia RECETOX - TOCOEN & Associates, TOCOEN REPORT No 249. Brno2003.
- [124] Matthews H.B., Surlis J.R., Carver J.G., Anderson M.W.: *Halogenated biphenyl transport by blood components*. Fundamental and Applied Toxicology, 1984, vol. 4, pp. 420-428.
- [125] Borlakoglu J.T., Welch V.A., Wilkins J.P.G., Dils R.R.: *Transport and cellular uptake of polychlorinated-biphenyls (PCBs). 2. Association of individual PCB isomers and congeners with plasma-lipoproteins and proteins in the pigeon*. Biochemical Pharmacology, 1990, vol. 40, pp. 265-272.
- [126] Mes J., Marchand L., Turton D., Lau P.Y., Ganz P.R.: *The determination of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbon residues in human blood, serum and plasma - a comparative study*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1992, vol. 48, pp. 175-186.
- [127] Grimm F.A., Hu D., Kania-Korwel I., Lehmler H.J., Ludewig G., Hornbuckle K.C., Duffel M.W., Bergman A., Robertson L.W.: *Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Critical reviews in toxicology, 2015, vol. 45, pp. 245-272.
- [128] Raszyk J., Gajduskova V., Ulrich R., Jarosova A., Sabatova V., Salava J., Palac J.: *Occurrence of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the stable and outside stable environment of farms for pig fattening*. Veterinarni Medicina, 1996, vol. 41, pp. 165-171.

## 6 SEZNAM PŘÍLOH

- A1: ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M.; DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H.; MRAVCOVÁ, L.; VYDROVÁ, L.; ZOUHAR, L. The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater. In: F.S.G. Einschlag (Ed.), *Waste Water - Evaluation and Management*. InTech Open Science, Rijeka, Croatia, 2011, p. 3-30, ISBN 978-953-307-233-3
- A2: ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M. Selected Pharmaceuticals and Musk Compounds in Wastewater. In *Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*. 1. Rijeka, Croatia: Intech Open Science, 2013. p. 121-144. ISBN: 978-953-51-0882- 5.
- A3: HŘIBOVÁ, Š.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M. Ecotoxicological Evaluation of Fire Fighting Foams. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2014, vol. 2014 (23.), no. 12, p. 3029-3035. ISSN: 1018- 4619.
- A4: HŘIBOVÁ, Š.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M. Sorption ability of the soil and its impact on environmental contamination. *Interdisciplinary Toxicology*, 2015, vol. [7], no. 4, p. 177-183. ISSN: 1337- 9569.
- B1: VÁVROVÁ, M.; STOUPALOVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E. Assessing contamination levels in a reservoir on the basis of the determination of xenobiotics in fish. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 8, p. 901-905. ISSN: 1018- 4619.
- B2: VÁVROVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E.; VEČEREK, V.; KOŘÍNEK, P.; ZUKAL, J.; ZEJDA, J.; SEBESTIÁNOVÁ, N.; KUBIŠTOVÁ, I. Game animals and small terrestrial mammals – suitable bioindicators of the pollution assessment in agrarian ecosystems. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 2, p. 165-172. ISSN: 1018- 4619.
- B3: VÁVROVÁ, M.; KOŘÍNEK, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E. Plant bioindicators as a tool for evaluation of agrarian ecosystems. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 2, p. 219-226. ISSN: 1018- 4619.
- B4: VÁVROVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E. Impact of Environmental Pollution on Contamination of Locally Grown Roughage. *Acta Veterinaria Brno*, 2002, vol. 71, p. 389-400.
- B5: VÁVROVÁ, M.; ŠUCMAN, E.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.. The use of blood plasma as a suitable bioindicator to monitor the levels of PCBs in pig tissues. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 8, p. 876-882. ISSN: 1018- 4619.

# Příloha A1:

ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M.; DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H.; MRAVCOVÁ, L.; VYDROVÁ, L.; ZOUHAR, L. The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater. In: F.S.G. Einschlag (Ed.), *Waste Water - Evaluation and Management*. InTech Open Science, Rijeka, Croatia, 2011, p. 3-30, ISBN 978-953-307-233-3

# The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater

Helena Zlámalová Gargošová, Milada Vávrová, Helena Doležalová Weissmannová, Ludmila Mravcová, Lucie Vydrová and Libor Zouhar  
*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry  
Czech Republic*

## 1. Introduction

The term “new” environmental pollutant covers all anthropogenic contaminants that have been released in the environment over the last few decades. Research into their fate and impact on the environment has started relatively recently. The group of new environmental pollutants consists of persistent organic pollutants (POPs) including DDT, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and a wide range of organic pesticides. This group has recently been expanded with polybrominated flame retardants, drugs, detergents, and personal hygiene products. Chemicals, used everyday in homes, industry and agriculture, can enter the environment in wastewater. According to the United Nations Organization 884 million people do not have access to safe drinking water, and over 2.6 billion people do not have access to proper sanitation systems. On July 28, 2010, the UN General Assembly passed a resolution supporting water as a human right and urging governments and international organizations to address this important human right.

Interest in the presence of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in the environment has increased significantly over the last decade. Pharmaceuticals and synthetic musk compounds in personal care products (PPCPs), are groups of organic micropollutants which are routinely detected in surface water, ground water and even in drinking water (McClellan and Halde, 2010). Hundreds of tons of these compounds are dispensed in communities every year. PPCPs are regarded as being potentially hazardous compounds as some are ubiquitous, persistent and biologically active compounds with recognised endocrine disruption functions (Kasprzyk-Hordern et. al., 2002). Many pharmaceuticals, upon administration, are degraded in the body and may even become inactive, but others, often those applied externally, excreted or not absorbed fully, can leave the body in their active forms. (Roberts & Thomas, 2006). The others only slightly transformed or even unchanged often conjugated to endogenous substrate (e.g. glucuronic acid, sulfuric acid, acetic acid to polar molecules. (Roberts and Thomas, 2006). These conjugates are easily cleaved during sewage treatment and, thus, several pharmaceutically active compounds (PhACs) are discharged almost unchanged from municipal sewage treatment plants (STPs) into the receiving waters (Heberer, 2002). The wide range of trace chemical contaminants persisting in municipal wastewater after conventional treatment



includes inorganic compounds, heavy metals, persistent organic pollutants like endocrine disrupting compounds, pharmaceutically active compounds; personal care products (PPCPs), disinfection by-products and many other complex compounds persist through the waste water treatment process. As a result, terrestrial and aquatic organisms can be exposed to these compounds when treatment by-products are subsequently reintroduced into the broader environment. Exposure can be associated with effluents from waste water treatment plants (WWTPs) leach from landfills, and runoff or leach from land that has received applications of reclaimed waters and/or biosolids. Thus, a number of PPCPs are widely detected in water resources throughout the world (Edwards et al., 2009; Lapen et al., 2008; Fatta-Kassinos et al., 2010). From reasons mentioned above is very important to monitor large spectra of chemicals not only in biosolids, which represents inevitable by-products of WWTPs, but in reclaimed water from municipal wastewater treatment. Waste water treatments produces large amount of sewage sludges/biosolids. Part of them is after treatment process used as fertilizer (Jones-Lepp & Stevens, 2006). The Sewage Sludge Directive 86/278/EEC seeks to encourage the use of sewage sludge in agriculture and to regulate its use in such a way as to prevent harmful effects on soil, vegetation, animals and man. On the other hand sludge could be posing a risk for environment they tends to concentrate heavy metals and organic but its, however, rich in nutrients such as nitrogen and phosphorous and contains valuable organic matter. Directive 86/278/EEC sets limit values for seven heavy metals, for some congeners of PCBs and AOX (Absorbable organic halides) other organic compounds and ecotoxicity tests aren't required The European Commission is currently assessing whether the current Directive should be reviewed – and if so, the extent of this review (Council directive, 1986).

In the 1980' and 90' the focus on the analysis of sewage sludge mainly deal with pathogens, inorganic (metals), polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) (Alcock et al.; 1996 Eljarrat et al., 2001). In 21TH century analysis of these matrices is not target only for selected traditional analytes but new xenobiotics as pharmaceuticals and musk compounds in sewage sludge are reported (Herren & Berset 2000; Zorita et al., 2009; McClellan & Halde, 2010). Ecotoxicological evaluation of sewage sludge as integral part of environmental analysis started to appear in this century sparsely (Park et al. 2005, Domene et al., 2008). Chemicals analysis is integral part of water quality evaluation but to predict effect of this water or used sewage sludge on environment is necessary to use some other possibilities. Useful toll for this could be biotests. Global evaluation of wastewaters should include ecotoxicological tests to complete the chemical characterization. The integrated assessment of biological effects of wastewater discharges in the ecosystems is relevant and ecotoxicity tests are referred as extremely useful tools for the identification of environmental impacts (Mendonca et al., 2009).

### 1.1 Pharmaceuticals

Pharmaceuticals are biologically active substances. It is documented that drug production and consumption are increasing worldwide, both in human and veterinary medicine. The consequence of this trend is the increased input of these substances into the environment, where they can exist in their original or metabolized form and can have significant impacts on natural ecosystems (Halling-Sørensen, 1998). The hazardous source of pharmaceuticals represents agriculture, predominantly livestock production. Growth stimulants and antibiotics used as prophylaxis drugs entered ecosystem in faeces and urine as fertiliser

without possibilities degradation on less active metabolites in WWTP (Koschorreck et al., 2002). Biodegradation in digestive system of animals it is possible, but not for all substance. In study (Halling-Sorensen et al., 1998; Hirsch et al., 1999) was demonstrate, that 30–90 % doses of antibiotics enter he environment in origin form. At the end Pharmaceuticals are specially target on elimination of pathogenic organisms, in this case they could decrease number of microorganisms in WWTP and affect treatment process of water treatment. Antibiotics were recently classified as a priority risk group due to their high toxicity to algae and bacteria at low concentrations and their potential to cause resistance amongst natural bacterial populations Hence, antibiotics in surface water have the potential to disrupt key bacterial cycles/processes critical to aquatic ecology (nitrification/denitrification) or agriculture (soil fertility) and animal production (rudimentary processes) (Watkinson et al., 2007; Watkinson et al. , 2009).

	Diclofenac Sodium	Ibuprophen sodium	Ampicillin	Penicillin G
CAS	15307-79-6	31121-93-4	69-53-4	61-33-6
Physical state	White or slightly yellowish crystalline powder, slightly hygroscopic Sparingly soluble in water, freely soluble in methanol.	White crystalline powder. Sparingly soluble in water, freely soluble in acetone, methanol, ether.	White powder, slightly hygroscopic. Soluble in water, insoluble in alcohol, oils.	White powder. Soluble in water, insoluble in alcohol, various oils and paraffin's.
Molecular weight (g/mol)	318.13	228.26	371.39	334.39
Melting point (°C)	278-279	75–78	324.85	243.10
Boiling point (°C) at 25°C	412.00	157.00	622.61	565.30
Water solubility (mg l <sup>-1</sup> ) at 25°C	50.00	57,90	439.30	210.40
Henry's Law Constant (atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	5.29.10 <sup>-9</sup>	1.23.10 <sup>-6</sup>	2.97.10 <sup>-16</sup>	1.88.10 <sup>-13</sup>
Log K <sub>ow</sub>	1.56	~ 1.00	1.45	1.83
Log K <sub>oc</sub>	2.92	2.59	2.73	2.63

Table 1. Physico-chemical characteristics of pharmaceuticals

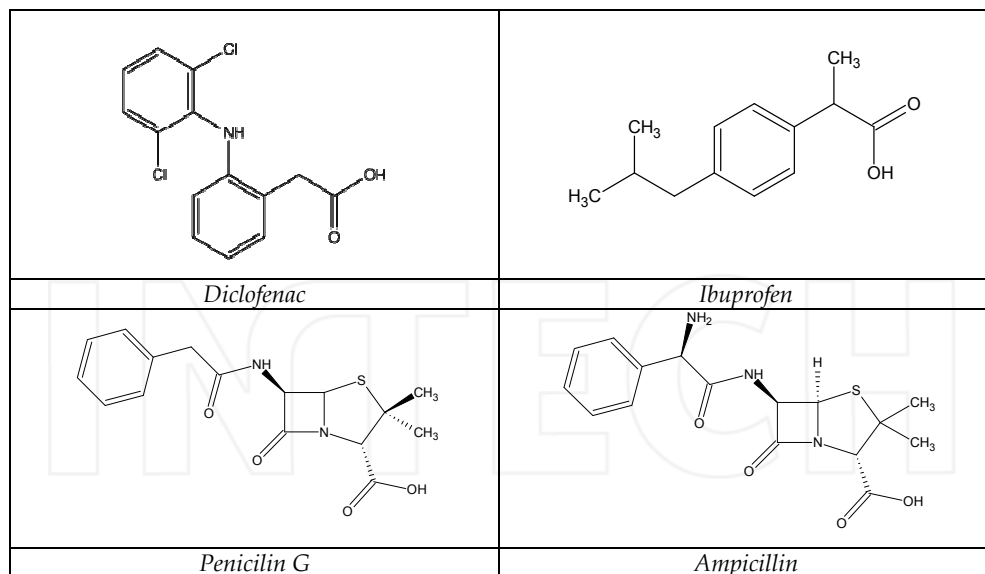


Fig. 1. Structural formulae of selected pharmaceuticals

Since pharmaceuticals are designed with the intention of performing a biological effect, this concept may be very important for these specific substances in terms of fate and effects toward non target organisms in the environment, even at low concentrations. The food chain of some organisms is affected and pathogenic organisms can develop their resistance against these substances. Another important problem is presented by the negative impact on bacterial microflora in biological cleaning processes. Pharmaceuticals are classified as the so-called "microcontaminants", which have been causing significant concern within the environmental area during past years. (Beausse 2004; Gómez et al., 2006)

The most pharmaceuticals are not completely removed in the wastewater treatment plant (Beausse, 2004; Gómez et al., 2006; Ramirez et al., 2007). They are partially eliminated by sorption to wastewater sludge or by biodegradation. The elimination level differs in dependence on the substance type and process conditions. The elimination of antibiotics from the wastewater treatment plants can be also affected by sludge age. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects such as diclofenac, ibuprofen and ketoprofen are one of the most widely used. It also belongs to the most frequently detected pharmaceuticals in the water-cycle in Europe. Antibiotics are the important group of the drugs affecting the environment. They are classified as biological, semisynthetic or synthetic substances. They are characterized by their selective toxicity against bacteria and they can be used to treat various infections. More than one hundred antibiotics are presently used. The primary classification of antibiotics is based on their effects and differentiates them on bactericidal and bacteriostatic. (Yang & Carlson, 2003; Kay et al., 2005).

## 1.2 Musk compounds

Synthetic aromatic substances or musk compounds ("white musk") are lipophilic contaminants, with the ability to accumulate in the components of the environment. They

belong to the group of priority persistent pollutants and may occur in the components of the environment and human tissue. Since they have potential carcinogenic properties, efforts are currently being made to limit or ban their use in many regions worldwide.

Generally, synthetic aromatic substances or musk compounds can be divided into 4 groups: linear musk compounds, macrocyclic musk compounds, polycyclic musk compounds and nitro musk compounds. The last two groups are used most frequently as fragrances in personal hygiene products (perfumes, cosmetics, soaps, and shampoo), cleaning and disinfection products, industrial cleaning products, air fresheners, etc.

Synthetic aromatic substances were launched on the market in the early 20th century. The volume of their production has significantly increased over the last 50 years (Luckenbach & Epel, 2005). Galaxolide (HHCB) and Tonalide (AHTN) are examples of the most important musk compounds from the group of polycyclic compounds. Musk xylene, musk ketone and musk ambrette are well-known nitro musk compounds. The production of nitro musk compounds (i.e. compounds containing one or more nitro groups in a molecule) that are generally included in a group of substances posing a risk to the environment has decreased over the last years. By contrast, the production of polycyclic synthetic aromatic substances that are less toxic has increased and these substances are used in an abundant manner as additives in many products such as soaps, shampoos, deodorants, body lotions, perfumes, cleaning and disinfecting agents, air fresheners, industrial cleaning agents, etc. Unlike nitro

	Tonalide (AHTN, Fixolide)	Galaxolide (HHCB, Abbalide)	Musk ketone	Musk xylene
CAS	1506-02-1	1222-05-5	81-14-1	81-15-2
Physical state	Soluble in alcohol, oils, white solid crystal	Viscous liquid, No colour and stabile liquid	Soluble in alcohol, various oils, pale yellow crystals	Soluble in alcohol, oils, pale yellow crystals or fine crystalline powder
Molecular weight (g/mol)	258.41	258.39	294.27	297.27
Melting point (°C)	104.26	104.26	241.07	245.65
Boiling point (°C) at 25°C	325.92	325.92	560.94	570.75
Water solubility (mg l <sup>-1</sup> ) at 25°C	0.24	0.21	0.46	0.15
Henry's Law Constant (atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	2.28.10 <sup>-4</sup>	2.57.10 <sup>-4</sup>	1.33.10 <sup>-19</sup>	3.15.10 <sup>-17</sup>
Log K <sub>ow</sub>	5.70	5.90	4.30	4.90
Log K <sub>oc</sub>	3.72	3.72	3.58	3.58

Table 2. Physico-chemical characteristics of musk compounds

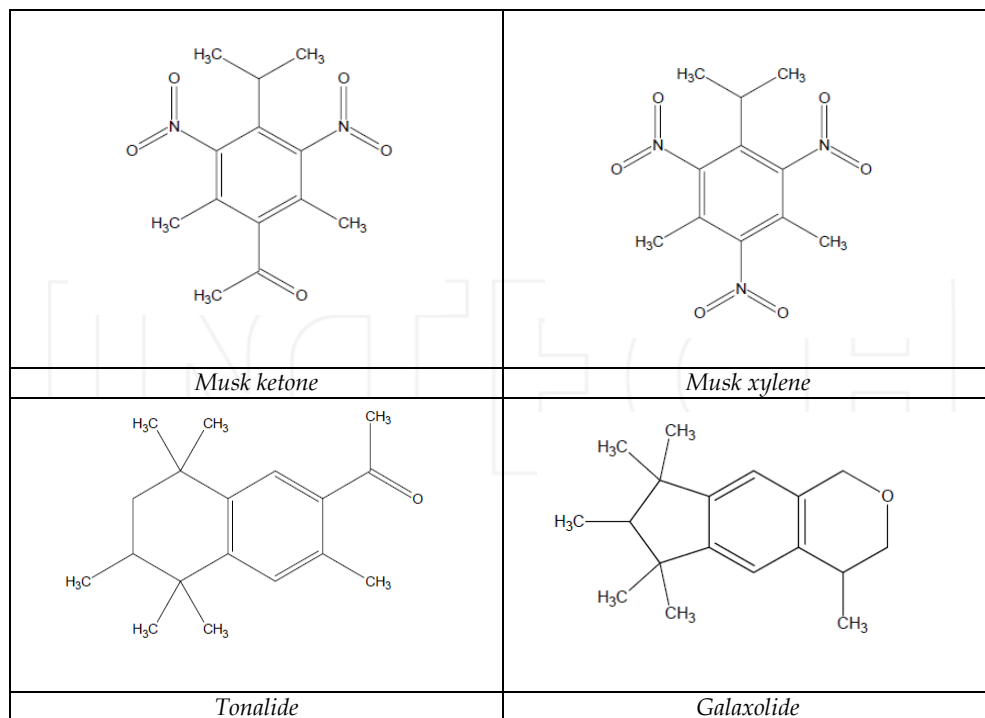


Fig. 2. Structural formulae of selected musk compounds

musk compounds, polycyclic musk compounds are more resistant against light and bases, and bind to fabrics quite easily. They are therefore used in cosmetic products and detergents more frequently. Logically, the reduced production of nitro musk compounds resulted in the increased production of polycyclic substances.

Synthetic aromatic substances are lipophilic, persistent organic compounds that show bioaccumulation abilities in the aquatic ecosystem. They were detected in the samples of air and dust collected in self-contained premises (Regueiro et al., 2009). A number of studies revealed the presence of musk compounds in the tissues of aquatic animals and also in human tissues. Musk compounds were also detected in fat tissue, human milk and blood plasma (Lignell et al., 2008).

The recent studies provided the presence of musk compounds in abiotic and biotic matrices. After their application the AHTN and HHCB are generally transported to wastewater treatment plants via industrial and municipal wastewaters (Fromme et al. 2001; Valdernes et al. 2006, Wombacher et al. 2009). The various concentrations of the polycyclic musks have been determined in sewage treatment plants (on influent and effluent), surface waters, sediment in various region of Europe and their concentration in aquatic ecosystems is highly depended on the distance from wastewater treatment plants. These toxic compounds are now widely found in variety of biota in the many regions in the world and its typical organism (Tanabe 2005; Nakata et al. 2007). The potential impact of polycyclic musk compounds were studied in relation to biodegradation, bioconcentration, determination of their concentrations in environmental matrixes (Bester 2009; Onesios et al. 2009; Lee et al. 2010; Sumner et al. 2010).

## 2. Environmental analysis

The analysis of organic pollutants and the preparation of other samples required for the analysis start with the concentration of an analytes which can be achieved by using different methods, for example by liquid-liquid extraction, solid phase extraction, purge & trap, headspace or other techniques that may be time demanding and require sophisticated instruments and organic solvents.

The solid-phase microextraction method (SPME) is a simple and efficient sorption-desorption technique allowing the analytes to be concentrated. It is based on the exposure of a small amount of sorbent (extraction phase) to an excess of a sample. The goal of most SPME procedures used for sample preparation prior to analysis is to obtain a particular analytes in a sufficient detectable amount without any unwanted admixtures. In the case of SPME, analytes bind to a fibre until the steady state is reached. The SPME method is used in both qualitative and quantitative analysis. The accuracy and precision of the results is affected by a number of factors. The SPME method provides linear calibration dependence in a wide range of concentrations. The proper choice of fibre will ensure reproducible results even at low levels of analytes.

SPE is typically performed manually, but there are some significant disadvantages with this approach (Fatta et al., 2007):

- manual (off-line) SPE is time-consuming as well as labor-intensive and costly, which compromises productivity;
- exposure to hazardous or infectious matrices (such as sewage) involves safety issues; and,
- the recovery of the analytes can vary from batch to batch, causing reproducibility problems.
- direct injection of untreated samples;
- automatic sample clean-up and/or analyte enrichment;
- elimination of conventional manual sample pretreatment steps;
- faster procedures;
- methods are less prone to errors, resulting in Berger reproducibility;
- reduction of health risks; and,
- samples can be run unattended (e.g., overnight or over the weekend).

The methods of high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD) or mass detector (MS) are also the widely utilizing analytical method (HPLC-DAD, HPLC-MS) for determination of pharmaceuticals and musk compounds. The method gas chromatography with mass detector (GC-MS) or gas chromatography with atomic emission detector (GC-AED) detect compound with excellent sensitivity.

### 2.1 Sampling area

The first one is large-scale wastewater treatment plant of the City of Brno (catchment region for a population of 500,000 people). There is municipal waste water treated. This facility was launched in 1961 as classic two-stage plant with anaerobic sludge stabilization. In the period between 2001 - 2003 the overall reconstruction and extension of the WWTP was realized with the main objective to meet the treated wastewater effluent limits set by Czech and European standards and regulations, and to ensure sufficient capacity of the facility to accommodate the growing demand of the city of Brno with almost 500 thousand of

inhabitants and several industrial facilities, but also of increasing number of the surrounding agglomerations successively connecting to the Brno sewerage system. Nowadays, the technology in WWTP Brno-Modřice corresponds to the EU parameters. The second WWTP collects waste water from laboratories and from research workplaces is there collected. The municipal WWTP uses technology of anaerobic stabilization of sewage sludges. This closing step is included to minimize decomposition of residual organic material and mainly to eliminate pathogenic organisms. Three previous steps of water treatment include mechanical removing of settled elements, chemical treatment - defosfatation and denitrification in anaerobic tank. Follow biological treatment in activated tank, under oxygen conditions. Secondary settlement tank is final tank where is activated sewage sludge settled and separated out from treated water. The technology of small local WWTP located on the grounds of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno involves aeration in activated tank, followed with separation of activated sewage sludges. Water is sanitized with chlorine and sewage sludges are thermic stabilised (125 °C/35min). Then water enters to communal sewerage system. The amber glass sample bottles were used for this collection. The samples were processed immediately or stored in a refrigerator till the following day. If necessary, the samples were filtered to remove rough impurities.

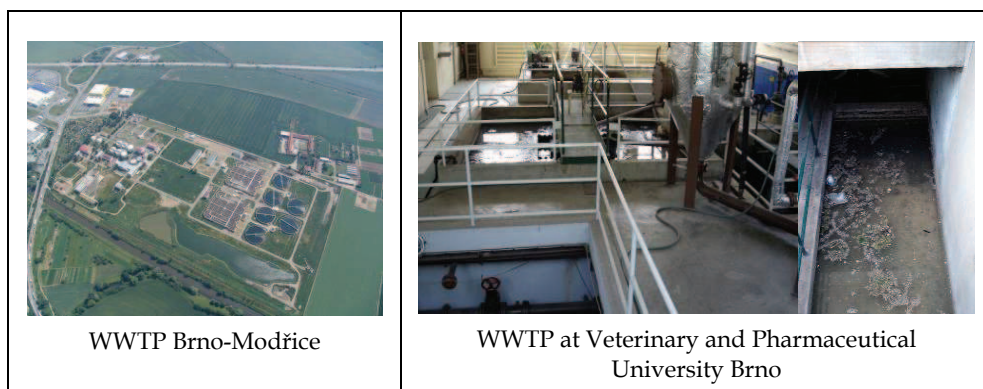


Fig. 3. The sampling localities

Wastewater samples have been collected from the two wastewater treatment plant - municipal WWTP Brno-Modřice and WWTP at Veterinary and Pharmaceutical University Brno in one-day intervals and from in seven-days intervals. The sampling of waste water and sludge for experiments were from the WWTP inlet, outlet and lagoon (pond) from reason of comparing.

## 2.2 The analysis of pharmaceuticals

The application of advanced measurement technologies (e.g., gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and GC with tandem MS (GC-MS2) or liquid chromatography with MS (LC-MS) and LC with tandem MS (LC-MS2)) to environmental analysis has allowed the determination of a broader range of compounds, including pharmaceuticals, and has therefore permitted more comprehensive assessment of environmental contaminants. LC-MS2 is becoming more commonly used in pharmaceuticals analysis

because of its high sensitivity and its ability to confirm compounds (as compared with conventional LC with ultraviolet (UV) or fluorimetric detection). LC-MS2 allows separation and detection of compounds having the same molecular mass but different product ions, even if they co-elute. MS2 detection is therefore preferred for increased analytical sensitivity and selectivity in complex matrices, such as wastewaters. (Kot-Wasik et al., 2007).

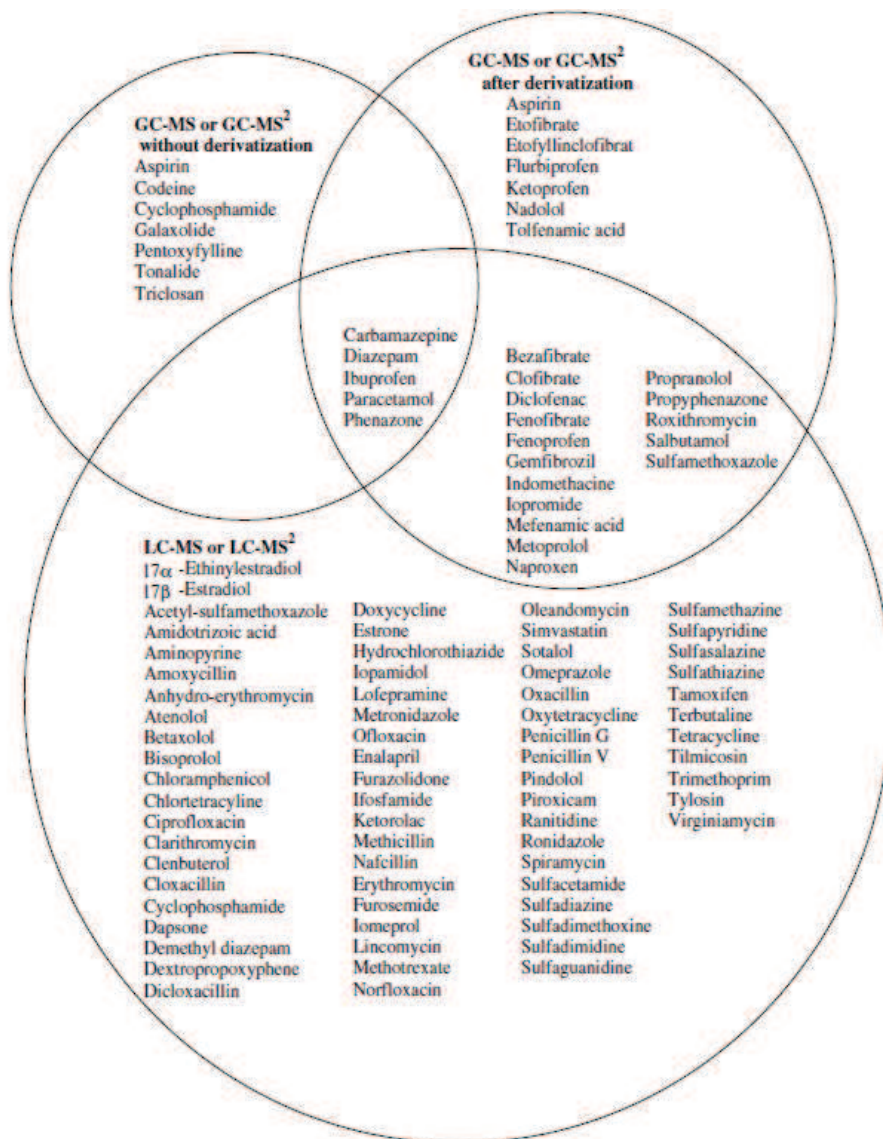


Fig. 4. Analytical methods applied for the most common pharmaceuticals in water and wastewater (Fatta et al.,2007)



Solid phase extraction (SPE) was employed as the separation method for isolation of given pharmaceuticals and high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection was used for their determination. The optimised and validation method was used to model samples of water. Obtained results were evaluated and their interpretation was done.

Several different columns were tested for diclofenac (Nonsteroidal anti-inflammatory substances – NSAIDs). Oasis HLB is column with hydrophilic-lipophilic balance. It includes copolymer divinylbenzen/N-vinylpyrrolidin. Often they are used for solid phase extraction of pharmaceuticals.

Sorbent with polymerization bonded oktadecyl phase is in ENVI-18. These columns are employed especially for environment. LC SAX was last tried column. It is ion exchanger column with polymerization bonded quaternary amine.

From the Table 3 it is implied, that the respective procedure for SPE is acceptable for diclofenac when using Oasis HLB and ENVI-18 cartridges. The Oasis HLB column was selected as the suitable one, due to highest yields of diclofenac from the cartridges tested. To find the optimal procedure SPE for both drugs, other SPE courses were tested on Oasis HLB columns.

SPE	Original diclofenac concentration (mg/ml)	Final concentration of diclofenac (mg/ml)	Diclofenac recovery %
Oasis HLB	0.0150	0.0042	28.04
ENVI-18	0.0150	0.0036	24.23
LC-SAX	0.0150	$2.37 \cdot 10^{-5}$	0.16

Table 3. Recovery on SPE columns HLB when testing various procedures

The pharmaceutical Diclofenac and Ibuprofene were determined at inflow and outflow of WWTP Brno-Modřice. The determined concentration of ibuprofene at inflow was 1018.14 ng/l and at outflow 195.97 ng/l. The efficiency of water treatment process for Ibuprofene was 80%. The aim of this work was to develop both a suitable analytic method for analytes isolation from a given matrix and an optimal technique for identification and determination of analgetics residues in waters. Solid phase extraction (SPE) was employed as the separation method for isolation of given pharmaceuticals and high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection was used for their determination. The optimized method was used to model samples of water. Obtained results were evaluated and their interpretation was done

The aim of this work was to develop both a suitable analytic method for analytes isolation from a given matrix and an optimal technique for identification and determination of analgetics residues in waters. Solid phase extraction (SPE) was employed as the separation method for isolation of given pharmaceuticals and high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection was used for their determination. The optimized method was used to model samples of water. Obtained results were evaluated and their interpretation was done.

Analytes	N	1	2	3	4	5
Diclofenac	Inflow					
	I1	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
	I2	1363.16	84.40	1874.95	2511.63	1970.58
	I3	1669.12	< LOD	2139.03	2439.98	2148.06
	Outflow					
	O1	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
	O2	5.69	NQ	NQ	NQ	NQ
	O3	9.29	NQ	NQ	NQ	NQ
	Ibuprophene	Inflow				
I1		NQ	NQ	503.78	2229.30	1170.20
I2		NQ	NQ	272.50	1164.81	188.08
I3		NQ	NQ	1271.06	193.30	432.21
Outflow						
O1		NQ	NQ	222.70	212.41	69.29
O2		NQ	NQ	275.19	181.85	153.38
O3		NQ	NQ	155.22	124.58	369.10

Table 4. The determined concentration of selected pharmaceuticals in waste water on inflow of WWTP Brno-Modřice (ng/l, n=10)

### 2.3 The analysis of musk compounds

In view of the physicochemical properties of musk compounds, most common analytical methods include separation by gas chromatography (GC) followed by online mass spectrometry (MS). Gas chromatography shows low detection limits, high selectivity and sensitivity for determination of musk compounds.

Developments in the determination of synthetic musk fragrances in environmental matrices have been widely reviewed by A.M. Peck, 2006.

Traditional and worldwide used musk compounds Galaxolide®, Tonalide®, Musk xylene and Musk ketone were analysed. Samples were taken from the influent, effluent and small pond in the WWTP Brno-Modřice municipal waste water treatment plant. Musk xylene was surprisingly found as the dominating compound, followed by Galaxolide, Tonalide and Musk ketone.

Head-space SPME with PDMS/DVB 65-µm fibre was used for the isolation of musk compounds from real waste water samples. Then the SPME was removed and sorbed compounds were immediately desorbed in the injector of GC/MS system. Mass spectrometer was operated in SIM mode list of target ions and qualifiers for traditional musks shows Table 1, those for Czech fragrances presents Table 2. External standard method and standard addition method were utilized for quantization; recovery of the whole analytical process was controlled by deuterated standards (Musk xylene D15, Tonalide D3).

During optimization, several real samples were also measured. It was found that the sample matrix had a significant negative effect on the determination of all analytes before ultrafiltration. HHCB and AHTN could only be detected in undiluted sample; however, after the standard addition, their response in the undiluted sample decreased. It was therefore decided to dilute samples at a ratio of 1:5 while maintaining the total volume of 14 ml. Distilled water was used for dilution. At this dilution and submersion, AMB and MK

behaved as expected, showing the increasing response to the standard addition. In this case, it was decided to increase the dilution ratio to 1:10 and switch to the headspace. Thanks to the high concentrations of HHCB and AHTN in the undiluted sample, it was possible to employ greater dilution for the assay of HHCB and AHTN in the real sample. Samples after ultrafiltration were not as difficult to analyse as samples before ultrafiltration.

Sample	Galaxolid (HHCB)		Tonalid (AHTN)		Musk ketone (MK)	
	Inflow (ng/ml)	Outflow (ng/ml)	Inflow (ng/ml)	Outflow (ng/ml)	Inflow (ng/ml)	Outflow (ng/ml)
1	187.7	0.66	24.64	0.179	2.28	0.082
2	575.1	NQ	141.40	0.220	0.74	0.010
3	54.1	1.84	33.32	0.695	2.56	0.020
4	213.3	0.56	33.69	0.231	ND	ND
5	31.1	0.55	12.80	0.811	ND	ND
6	210.8	1.74	15.86	0.736	ND	ND
7	86.7	0.67	5.19	0.172	ND	NQ
8	50.1	0.50	10.62	0.156	ND	ND
9	772.0	0.57	57.56	0.145	ND	NQ
10	77.6	0.52	12.31	0.151	ND	NQ
Mean	225.9	0.85	34.74	0.350	1.860	0.037

Table 5. The levels of analytes detected in samples, (inflow = before ultrafiltration, outflow = after ultrafiltration (n=10))

As seen in Table 5 the highest levels were observed for HHCB in samples before ultrafiltration where the maximum level was 772.0 ng/ml whereas the lowest level was 31.1 ng/ml. The levels in samples collected at the outflow were low. Maximum concentrations were observed in samples before ultrafiltration where the maximum estimated concentration was 141.40 ng/ml. The minimum concentration in samples before ultrafiltration was 5.19 ng/ml. The levels of AHTN in samples after ultrafiltration varied in a range of 0.811-0.145 ng/ml.

Musk ketone (MK) was found in the inflow only during first three days of analysis. Its respective levels varied in a range of 0.74-2.062 ng/ml. The performance of elimination of three monitored analytes reached 99%. The performance for HHCB varied in a range of 96.60-99.93%, for AHTN in a range of 93.66-99.84%, and for MK in a range of 96.43-99.23%.

The flow of wastewater in the ultrafiltration step varied in a range of 160-300 l/h. The facility is operated 10 hrs a day on working days. The annual balance is based on 253 days. The mean flow of wastewater through the ultrafiltration step is approximately 230 l/h. The discharge into the municipal sewer system is important, i.e. water that flows to the wastewater treatment plant. For better clarity, the amounts of analytes that enter the ultrafiltration step are also provided. All values are recalculated to the mean flow of 230 l/h. Musk compounds are widely used as fragrances in cosmetic industry and its related fields. Due to their massive use over the last few decades, they are currently being detected in the majority of components of the environment. The first step to assay musk substances is to optimize the procedures of the isolation, identification, and quantification of individual

N	Compound concentration (ng.l <sup>-1</sup> )											
	Galaxolide (HHCB)			Tonalide (AHTN)			Musk xylene (MX)			Musk ketone (MK)		
	Inflow	Outflow	Pond	Inflow	Outflow	Pond	Inflow	Outflow	Pond	Inflow	Outflow	Pond
1	921	530	71	262	80	37	1223	955	972	56	47	71
2	996	504	107	248	120	47	961	697	592	57	33	34
3	762	646	111	194	180	56	1019	688	543	60	54	34
4	739	528	101	192	132	56	1100	558	417	56	49	49
5	880	858	149	217	170	66	1135	1491	686	58	54	27

Table 6. Concentrations of traditional musks in Brno-Modrice WWTP (n=10)

analytes investigated. Great efforts during method optimization have been made to develop an efficient method that would be not time-consuming; eliminate possible errors during the entire procedure; and prevent the pollution of the external environment. Samples of wastewater collected at a cosmetic company before and after the ultrafiltration step were analysed using the SPME method (solid phase microextraction), followed by GC/MS (gas chromatography combined with mass spectrometry) as an end-point. The results are summarized in the following points:

- Analytes were determined in real samples using the SPME method and GC/MS as an analytical end-point. All samples collected before ultrafiltration contained HHCB and AHTN. Concentrations of HHCB and AHTN varied in a range of 31.1-772 ng/ml and 5.2-141.4 ng/ml, respectively. The levels of musk ketone in wastewater flowing to the ultrafiltration step varied in a range of 0.74-2.56 ng/ml
- All samples of wastewater flowing from the ultrafiltration step contained AHTN at levels that ranged from 0.15 to 0.81 ng/ml. HHCB was detected in almost all samples of wastewater (except for one) collected after the ultrafiltration step. The levels of HHCB varied in a range of 0.52-1.84 ng/ml. MK was found in wastewater before the ultrafiltration step only 3times. Its levels varied in a range of 0.01-0.08 ng/ml.
- The calculation assumes 253 working days in 2010 to estimate the amount of discharged substances per year, with 20 days for every month. The amount of analytes is as follows: HHCB - 131.42 kg per year, 10.39 kg per month; AHTN - 20.21 kg per year, 1.60 kg per month; MK - 1.08 kg per year, 0.09 kg per month.
- Quantities of individual monitored musk compounds discharged were assessed in the same manner as in the previous point. The amount of discharged analytes is as follows: HHCB - 1.04 kg per year, 0.08 kg per month; AHTN - 0.20 kg per year, 0.02 kg per month; MK - 0.02 kg per year and 1.70 g per month. The efficiency of ultrafiltration employed to remove musk substances ranged from 96 to 99% in this particular case.

Although the efficiency of ultrafiltration is high, the respective analytes are still present in the wastewater that flows to the wastewater treatment plant.

### 3. Environmental toxicology

Environmental toxicology or ecotoxicology deals with potentially harmful effects on organisms of countless man-made chemicals and wastes released into biosphere Ecotoxicity tests, biotests, bioassays are the only way how to find out experimentally ecotoxicological characteristic of chemicals, hazardous wastes and other various matrices. Bioassays could give answer on following questions:

- interaction between the substances (additive, synergistic, antagonistic etc)
- toxic effect after degradation and transformation of products
- quantity of the bioavailable chemicals
- effects on biota.

Testing system is exposed to various concentration of tested substance at exactly defined conditions (Park, et al., 2005). Contrary of the chemical analysis the tests are not able to identify the xenobiotics in the environment, on the other hand their advantage consist in prediction of effect on testing biological material. Advantages of biotests are also unquestionable. There are able to characterize hazard of xenobiotics in environment contrary to chemical analysis, which is able xenobiotics only identify and quantify. In addition in ecosystem hazardous compounds no exist separately but in various combinations wit mixture toxicity and environmental impact (Hoffmann, 2003). Biotest could be classified from various points of view. Standard and alternative test are the most basic classification. Standard toxicity tests are recommended by different international organizations such as ISO, EPA, OECD. The necessity to screen many samples for toxicity have lead to the increasing application of rapid miniaturized toxicity tests that are also called microbiotests, alternative assays, small-scale tests, microtests or second generation biotests. A microbiotest or alternative assay can be defined as involving the exposure of a unicellular or small multicellular organism to a liquid sample in order to measure a specific effect. Alternative toxicity tests have attractive features in comparison to standard toxicity tests; high cost efficiency, modest time and laboratory space requirements, possibility to test many samples at once, low sample volume requirements, (Blaise, 1991; Rojíčková, 1998). According to exposure time are the acute, semi-chronic and chronic tests used. The tests could be classified as terrestrial or aquatic. The aquatic tests use water solution of tested compounds or water leaches of tested matrices. In the terrestrial tests are testing organisms in direct contact with tested matrices. The selection of biotests used for toxicity assessment depends on the type of information that is required, the state, physical and chemical features of a sample or substance investigated and on sensitivity and relevance of a test species. However, if only one single test is used, the estimated toxicity would reflect the sensitivity of that test only, with a risk for underestimation of the potential toxicity for that particular substance with regard to the ecosystem. The use of a battery of biotests, representing differences in sensitivity of test organisms from various trophic levels is recommended to prevent this situation. Therefore it is important to identify potential toxins and understand the magnitude of their impact on different terrestrial and aquatic ecosystems (Schowanek et al., 2004)

### 3.1 Procedure of ecotoxicity test

The aim of the ecotoxicological tests is the determination of effective concentration (EC), eventually lethal concentration (LC) or inhibition concentratin (IC) to assess the effect of chemical compound, water wastes and leaches of various materials (sediments, soils, wastes etc.) on aquatic and terrestrial organisms. From this date the ecotoxicological impact to aquatic and terrestrial ecosystems can be also derived. These concentrations of tested compounds cause the mortality of 50 % testing organisms or 50% inhibition growth rate in relation to control tests. Lower values of LC(EC,IC)50 indicate higher toxicity to the organisms. In accordance with testing regulation the limit test, preliminary tests and definitive test were conducted with single compounds. In limit test concentration 100 mg L<sup>-1</sup>

of tested compounds is used. Preliminary tests served to find approximate toxicity of the chemical compounds if is not known. In this case (range finding test) the dilution series was following 100 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 0,1 mg L<sup>-1</sup> and 0,01. The definitive test served to calculation value of LC(EC,IC)50. Range of dilution series of the definitive test was determined by results of preliminary test.

From obtained experimental ecotoxicological endpoints (EC50, IC50, LC50) of ecotoxicity tests the quantification of ecotoxicity values is calculated. These parameters refer to the concentration of toxic substance that results in 50% reduction of end-point relative to control at a given period of time (ISO/TS 20281:2006). The results of tests are suitable statistical evaluated with using the statistical software. The significant differences (p<0.05) in the measured parameters in each of tests (inhibition of growth, immobilization etc.) are evaluated by ANOVA test.

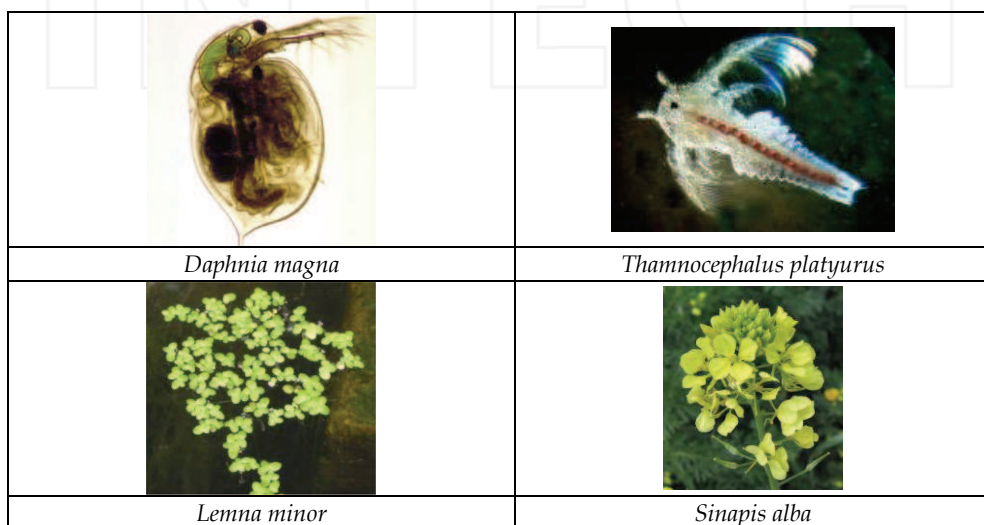


Fig. 5 The testing organisms

### 3.1.1 *Daphnia magna* acute immobilization test

The testing organisms *Daphnia magna* is a component of freshwater zooplankton. It refers to group *Arthropoda*, *Branchiopoda*, *Daphnidae*. *Daphnia* are small arthropods of 1–5 mm in size. They live in various aquatic environments ranging from acidic swamps to freshwater lakes, ponds, streams and rivers. Often they are found in large amounts. Ontogenesis of individual is direct without larval stages. During the year there is one or several biological cycles in which parthenogenetic generations are alternated by bisexual generations which enclose the cycle. This test serves for testing of effect of chemicals on plankton organisms. The importance of the test consists in plankton organisms served as feed for fish and are therefore significant component of water biocoenosis and food chain. For the calculation value of EC50 alternative Daphtoxkit F<sup>TM</sup> was used (purchased from MicroBioTests Inc., Gent, Belgium). This toxkit includes dormant eggs in chitinous capsule (ephippia) of crustaceans *Daphnia magna*. The Daphtoxkit F<sup>TM</sup> makes use of such dormant eggs produced under controlled conditions with a standard *Daphnia magna* strain. The tests were

conducted following the *Standard Operational Procedure* of the Daphtoxkit F™ which is in accordance with the OECD and ISO test protocols for the acute *Daphnia magna* toxicity tests (OECD, 2004; ISO, 1996). Standard Freshwater was prepared with the concentrated salt solutions included in the kit. This medium, which has the composition recommended by the ISO for acute toxicity tests with *Daphnia magna*, is used as a hatching medium and as a dilution medium for the preparation of the toxicant dilution series. The assays were carried out in the multiwell test plates provided in the kits. Ehippia were hatched in petri dishes with Standard Freshwater (ISO) medium three days before test at temperature 20-22 °C, continuous illumination of 6 000 lux. Two hours prior to test were the neonates pre-fed with suspension of spirulina powder to provide them energetic reserve. Daphnids aged less than 24 were exposed to dilution series of tested compounds. 20 individuals were subdivided in four replicates for every concentration of multiwell plate (well volume is 5 ml). The same procedure was done with control Daphnids (20 individual subdivided in 4 wells). In fine was multiwell plate sealed with a strip of parafilm and covered with lid. Experiments were conducted at temperature 20 °C in darkness incubator. Immobility (the endpoint for effect calculation) was observed after 24 and 48 h. The values of 24hEC50 and 48hEC50 were calculated by probit analysis. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceed 10%.

### 3.1.2 *Thamnocephalus platyurus* acute immobilization test

For calculation value of LC50 alternative test Thamnotoxkit F™ was used (purchased from MicroBioTests Inc., Gent, Belgium). This test is often used to screening toxicity in freshwater and determination of acute toxicity Thamnotoxkit is similar to Daphtoxkit F™ contains all the materials to perform six complete acute (24-h) toxicity tests (range-finding or definitive) based on mortality as the effect criterion the assays were performed on larvae of the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* hatched from cysts. The procedure of this test is similar as mentioned above. Standard freshwater was prepared by diluting the concentrated salt solutions included in the kit to obtain 1 l of medium (moderately hard reconstituted freshwater made up according to the US EPA formula) which serve for hatching the cysts and to prepare the toxicant dilution series. The eggs of crustaceans were hatched 24 hours before testing at temperature 25 °C under continuous illumination 4000 lux. Design of the test is similar to Daphtoxkit F™ test, multiwell plates are smaller (1 ml volume), and number of testing organisms in each well is 10. Each toxicant concentration was tested out in three replicates. The test procedure followed the *Standard Operational Procedure* of the Thamnotoxkit F™ magna microbiotest. The test plates subsequently were incubated at 25 °C in darkness. Lethality (endpoint for effect calculation) was observed after 24 h. The values of 24hLC50 were calculated by probit analysis. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceed 10%.

### 3.1.3 Root growth inhibition toxicity test on *Sinapis alba*

The test was developed for testing of harmlessness of waste waters, which could be used for sewage irrigation. Effect on seed germination and root growth of mustard (*Sinapis alba*) in first stadium of development is tested. Test consists of cultivation of the seeds on beds saturated with solutions of tested chemical in comparison with seeds grown on bed saturated with dilution medium. Mustard, *Sinapis alba* L., (*Brassica alba* L.) belongs to *Brassicaceae*. It is annual, early spring grown oil bearing plant. Mustard root is thin; shoot is erect, hairy and up to 150 cm high with clear green leaves. Seeds are relatively big, in

comparison with other *Brassicaceae* and are yellow or whiteyellow of a round shape. They reach to 1.5 - 4 mm in diameter. After germination, simple root with hypocotyle grows up. The high quality seeds of *Sinapis alba* are exposed to solution of tested compounds at temperature  $20 \pm 2$  °C in the darkness incubator for 72 hours. The seeds (30 pieces) for every tested concentration are placed on filter paper in Petri-dishes. Paper is moistened with solution of tested compounds. Dilution series of tested compounds were prepared by dilution of stock solution of tested compounds in diluent medium. Diluent medium was prepared by filling up of 2.5 ml from stock solution of every salt to 1 l volume flask. Stock solution of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  was prepared by solution of 11.76g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 1l volume flask. The other stock solution was prepared by solution of 4,93 g of each salt ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ) in 1l volume flask. Two replicates were done for every dilution series. For calculation values of IC50 the lengths of hypocotyls of germinated seeds in tested and in control group were measured. The inhibition of root growth (the endpoint for effect calculation) was measured after 72 hours. The test was considered valid if the number of germinated seeds in control was at least 90 %; organisms in the control did not exceed 10%.

#### 3.1.4 *Lemna* growth inhibition test

The test has been used for toxicity of solutions and suspensions testing. A higher freshwater plant, duckweed (*Lemna minor* L.) is used. From this point of view we can talk about semi-chronic exposition, where immediate effect, as well as long-term effect, is involved and visible in growth of new generation of plants.

Taxonomically *Lemna minor* L. belongs to angiosperms (*Angiospermophyta*) monocotyledonous plants (*Monocotyledonopsida*), *Lemnaceae*. These macrophytes take place at maintained water areas where they serve as feed e.g. for fish and water birds. *Lemna minor* (duckweed) cover surface of stagnant waters and are the most known species from pleustonic communities.

*Lemna* tests with duckweed *Lemna minor* were performed according OECD Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test using Steinberg medium (OECD 2006). Biotest were carried out in 200 ml beakers filled with 150 ml solution (dilution series of tested compounds diluted in Steinberg medium). The beakers were inoculated with 14 fronds. Plants with two or three fronds were chosen as inoculum. Six control and treatment replicates were used. Test were carried out at temperature  $24 \pm 2$  °C, light intensity was adjusted at 8000 lux. Test duration was 7 days (168 h). Number of fronds was controlled at days 0, 3, 5 and 7. The second monitored characteristic was the dry mass determinate at temperature 60 °C to constant weight. Dry mass was determined on the beginning of the test too. For this purposes were 6 additional control inoculated. Growth inhibition (measured as the increase in number of fronds during 7 days of incubation as compared to a corresponding control) was recorded after 168 h. Growth inhibition as the toxicological endpoint served for calculation value of 168hIC50. The test was considered valid if the number of fronds grown eightfold.

### 3.2 The ecotoxicity of chemicals

Synthetic musk compounds, pharmaceutical residues (particularly analgesics and antibiotics) were ecotoxically evaluated. Ecotoxicity was assessed by alternative tests using species such as *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna* and a phytotest using white mustard (*Sinapis alba*) as a terrestrial testing organism and *Lemna minor* as water testing organisms. The mentioned species were used to assess the effect of musk compounds and



pharmaceuticals on the aquatic ecosystem (*Lemna minor*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*) and on terrestrial plants represented *Sinapis alba*. Test species mentioned above were also used to assess the ecotoxicity of sludge originating from a particular wastewater treatment plant, at some stages of sludge treatment.

### 3.2.1 Ecotoxicological evaluation of pharmaceuticals

Pharmaceuticals are environmentally were similar to other chemicals. In fact, high quantities of pharmaceuticals are discharged into sewage treatment plants. Local discharge of pharmaceuticals also contributes to environmental contamination due to high concentrations in small sites. The ecotoxicological effects of drugs on different levels of the biological hierarchy, from bacteria to the entire biosphere, are not well known. They are biologically active compounds that may interfere with specific biological systems (e.g. enzymes) or generically act depending on their properties. (Isidori et al. 2005). The growing use of direct toxicity assessment is a result of existing or new regulation implementing (e.g. EU Directive 93/67/EEC, REACH). International and national authorities have available ecotoxicity biotests which represent useful tools for the prediction of environmental impacts. EU Directive 93/67/EEC (Commission of the European Communities, 1996) classifies substances to their EC50 values in different classes; < 1 mg L<sup>-1</sup>, (very toxic to aquatic organisms); 1-10 1 mg L<sup>-1</sup> (toxic to aquatic organisms); 10-100 mg L<sup>-1</sup> (harmful to aquatic organisms) substance with value EC50 above 100 mg L<sup>-1</sup> would not be classified. Ibuprofen and diclofenac belong to the group of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. This one are the most frequently identified in detectable concentration in environment and in sewage water. The concentrations were between 0.01-510 µg L<sup>-1</sup> for diclofenac and 0.49-990 µg L<sup>-1</sup> for ibuprofen. Elimination of these pharmaceuticals in WWTP is something about 87 % for ibuprofen and 49-59% for diclofenac (Heberer, 2002; Kümmerer, 2002; Kosjek et al., 2007). Cleuvers (Cleuvers, 2003) summarized results of some studies. The following concentration are reported; diclofenac ≤ 1.59 µg L<sup>-1</sup>, ibuprofen ≤ 3.35 µg L<sup>-1</sup>, acetylsalicylic acid (ASA) 1.51 µg L<sup>-1</sup> in sewage, lower concentration (0.01-0.5 1 µg L<sup>-1</sup>) in river water, Ternes (Ternes et al., 1998) reported concentration of above mentioned pharmaceuticals and of naproxen some > 1 µg L<sup>-1</sup> in WWTP and again lower concentration in surface water. Data summarized by Watkinson (Watkinson, et al. 2007) indicate that WWTPs often partially remove selected drug 20-90 %. They could be present in effluents and consequently in surface water. Isidori (Isidori et al., 2005) reported results from studies concerning occurrence antibiotics in water; lincomycin, erythromycin and clarithromycin in the rivers Po and Lambro in Northern Italy were detected at concentrations between 10 and 100 ng/L, in Switzerland, quinolones occurred at effluents at concentrations between 249 and 45 ng/L, respectively. Reported concentration are not extremely high contrary others pollutants, but drugs should stay in the centre of researches, because of their biological activity.

Ecotoxicological evaluation of some pharmaceuticals were conducted: from the group of non-steroidal anti-inflammatory substances Diclofenac sodium (2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid, Ibuprofen sodium 2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid, Ampicillin from the group of antibiotics. (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid and Penicillin G 2S,5R,6R)-3,3-dimethyl-7-oxo-6-[(2-phenylacetyl)amino]-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid. Some studies were conducted to calculate ecotoxicological values for drugs. For diclofenac values of 30minEC50 on *Vibrio fischeri* for were 11.45 mg L<sup>-1</sup> for *Ceriodaphnia dubia* value of 48hEC50 22.70 mg L<sup>-1</sup> for *Daphnia*

*magna* 68 mg L<sup>-1</sup> and for *Lemna minor* EC50 7.50 mg L<sup>-1</sup>. For ibuprofen value of EC50 101.20 mg L<sup>-1</sup> on *Daphnia magna* 342 mg L<sup>-1</sup> in acute algal test on *Desmodesmus subspicatus*, 173 mg L<sup>-1</sup> in acute toxicity test on fish and 22.00 mg L<sup>-1</sup> is value of EC50 for *Lemna minor* (Cleuvers, 2003; Ferrari et al., 2003; Ferrari et al., 2004; Jemba 2006).

Informations concerning ecotoxicity of penicillin G and ampicillin on above mentioned organism are sporadic. Available data served for preparing dilution series in preliminary tests. On the ground results of preliminary test were definitive test conducted. Achieved results summarized table 7.

Substances	<i>Daphnia magna</i>		<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Lemna minor</i>
	24hEC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	48h EC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	168hIC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	72hIC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	24hLC50 (mg.L <sup>-1</sup> )
Diclofenac-Na	53.0 (48.6 - 56.1)	17.2 (15.8 - 19.1)	169.4 (162.2 - 174.1)	83.8 (77.6 - 85.4)	15.2 (13.6 - 16.2)
Ibuprophen-Na	106.4 (96.4 - 110.0)	56.4 (53.7 - 59.6)	195.9 (188.7 - 197.0)	122.2 (118.6 - 125.4)	200.8 (196.4 - 205.0)
Penicillin-G	874.4 (867.0 - 879.5)	878.5 (871.8 - 883.2)	n.d.	653.4 (647.1 - 655.6)	857.2 (854.3 - 860.3)
Ampicillin	823.2 (815.0 - 831.1)	850.5 (839.8 - 858.4)	n.d.	286.7 (281.0 - 291.2)	650.3 (646.7 - 651.5)

Table 7. The ecotoxicity endpoints to crustaceans and plant testing organisms for pharmaceuticals

In most of biotests diclofenac exhibits greatest ecotoxicity, follows ibuprofen, ampicillin and penicillin G. It corresponds with results presented by Wollenberg (Wollenberg et al., 2000). Ecotoxicological values for some antibiotics were approximately 1000 mg.L<sup>-1</sup> oxytetracycline, 680 mg.L<sup>-1</sup> tylosine. It seems that antibiotics of penicillane (penicillin, ampicillin ) and tetracycline (oxytetracycline) exhibit only low acute toxicity. According EU Directive 93/67/EEC belongs to the group of chemicals which would not be classified. Ibuprofen and diclofenac on the basic of scheme of classification would be classified as potentially harmful to aquatic organisms. In spite of higher ecotoxicity of NSAIDs acute toxicity is unlikely. With regard to purpose for which pharmaceuticals are generated (bring some benefit to alive organisms) strong acute effects caused by specific mechanisms may actually not be expected. In addition value of EC50 for *Daphnia magna* is manifold higher than measured in environment. From this point of view is prediction of chronic effect much more relevant. Moreover residues of pharmaceuticals do not exist by itself in the environment. Toxicity of a single substance could increase strongly in combination with other especially when mode of action is similar. On the basis of these facts is necessary to test toxicity of mixture compounds on battery of organisms representing various levels of ecosystem (Cleuvers 2003 & Fatta-Kassinos, 2010).

### 3.2.2 Ecotoxicological evaluation of musk compounds

*Polycyclic musks*, the common name for synthetic musks with rings in their chemical structure, are the most commonly produced and used musks. They include substances such as traseolide (AHTI), celestolide (ADBI), fixolide/tonalide (AHTN), versalide (ATTN), galaxolide (HHCB), etc. *Nitromusks*, the common name for a group of (artificial) nitrogen-containing musks (produced by nitration of organic compounds), includes a number of compounds, such as: musk ketone, musk ambrette, musk tibetene, musk alpha and musk moskene (in addition to musk xylene) (; Balk and Ford, 1999; HERA, 2004).

The musk tested compounds were Galaxolide, 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyrane, Tonalide 1-(5,6,7,8-tetryhydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethnone, Musk-ketone 1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2,6-dinitro-4-acetylbenzene and Musk-xylene 1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene.

The effect of musk compounds on the organism were studied from several view namely for one organism as the acute or subchronic toxicity (Boleas et al. 1996; Carlsson & Norrgren 2003; Dietrich & Hitzfeld 2004; Mori et al. 2006). The acute toxicity of AHTN and HHCB were tested on the algae (*Pseudokirchineriella subscapitata*), crustacean (*Daphnia magna*), springtails (*Folsomia candida*), nematode worm (*Caenorhabditis elegans*), earthworms (*Eisenia fetida*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), zebrafish (*Danio rerio*), brook minnow (*Pimephales promelas*), South African frog (*Xenopus laevis*) and bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*).

The table 8. shows the ecotoxicological obtained dates from using tests for tonalide, galaxolide, musk ketone and musk xylene.

Substances	<i>Daphnia magna</i>		<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Lemna minor</i>
	24hEC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	48h EC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	168hIC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	72hIC50 (mg.L <sup>-1</sup> )	24hLC50 (mg.L <sup>-1</sup> )
Tonalide (AHTN)	1.51 (1.48 - 1.53)	1.33 (1.29 - 1.36)	1.58 (1.55 - 1.60)	5.42 (5.38 - 5.45)	5.20 (5.18 - 5.22)
Galaxolide (HHCB)	1.22 (1.19 - 1.24)	1.12 (1.08 - 1.13)	1.14 (1.11 - 1.16)	4.92 (4.87 - 4.95)	4.62 (4.58 - 4.66)
Musk ketone	2.33 (2.28 - 2.35)	2.13 (2.10 - 2.15)	6.14 (6.12 - 6.17)	4.84 (4.79 - 4.87)	5.36 (5.32 - 5.40)
Musk xylene	2.39 (2.32 - 2.41)	2.22 (2.18 - 2.26)	6.16 (6.13 - 6.20)	5.68 (5.65 - 5.71)	5.36 (5.33 - 5.39)

Table 8. The ecotoxicity endpoints to crustaceans and plant testing organisms for polycyclic musks and nitromusks

The higher ecotoxicity is typical for polycyclic musk compounds (AHTN and HHCB), but results showed the lower ecotoxicity for nitromusk compounds (musk ketone and musk xylene). The sensitivity of organisms is various. The fresh crustaceans (*Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*) and *Lemna minor* are most sensitive than terrestrial plant (*Sinapis alba*).

### 3.3 Ecotoxicological evaluation of the sludges from wastewater treatment plant (WWTP)

Modern sanitary practices result in large volume of human waste, as well as domestic and industrial sewage, which are collected and treated at common collection points WWTP. The growing use of sewage sludge as fertilizer results in many studies concerning their chemical analysis and hazard assessment (Jones-Lepp and Stevens, 2003; Fatta-Kassinos et al., 2010). Wastewater undergo preliminary, primary, secondary and in some cases tertiary treatment before sewage sludge are produced. Wastewater treatment unit operations and processes have three important parts. Physical unit operations - screening, comminution, flow equalization, sedimentation, flotation, granular-medium filtration, Chemical unit operations - chemical precipitation, adsorption, disinfection, dechlorination, other chemical applications, Biological unit operations - activated sludge process, aerated lagoon, trickling filters, rotating biological contactors, pond stabilization, anaerobic digestion, biological nutrient removal. Sludge resulting from wastewater treatment operations is treated by various methods in order to reduce its water and organic content and make it suitable for final disposal and reuse. Anaerobic wastewater treatment is the biological treatment of wastewater without the use of air or elemental oxygen. Anaerobic digestion/stabilization reduces the volatile solid content by approx. 60 to 65 %, and significantly reduces pathogens. The sludges from waste water treatment are several types and its composition and properties depend on the level of the waste treatment.

- Raw sludge is untreated non-stabilized sludge. It tends to acidify digestion and produces odours.
- Primary sludge is produced through the mechanical wastewater treatment process. The sludge amassing at the bottom of the primary sedimentation basin is also called primary sludge. Primary sludge consists to a high portion of organic matters, as faeces, vegetables, fruits, textiles, paper etc.
- Activated Sludge - The removal of dissolved organic matter and nutrients from the wastewater takes place in the biological treatment step. It is done by the interaction of different types of bacteria and microorganisms. The resulting sludge from this process is called activated sludge. The activated sludge exists normally in the form of flakes, which besides living and dead biomass contain adsorbed, stored, as well as organic and mineral parts.
- Return activated sludge - The activated sludge flows from the biological aeration basin into the final clarifier. The main part of the separated sludge, which is transported back to the aeration basin, is called return activated sludge.
- Secondary sludge (Excess sludge) - To reach a constant sludge age the unused biomass has to be removed from the biological treatment system as excess sludge. The excess sludge contains not-hydrolysable particulate materials and biomass due to metabolisms.
- Tertiary sludge - Tertiary sludge is produced through further wastewater treatment steps e.g. by adding a flocculation agent.

The sludges from WWTP are various applications, mainly in agricultures and recultivation in relation to environmental Directive 86/278/EEC (Council directive, 1986). On the other hand they could represent big problem because of concentrated xenobiotics. The heavy metals Zn, Cu, Co, Pb, Hg, Cr, Cd, anthropogenic xenobiotics (PCB, dioxins, PAHs, etc) are serious contaminants of sludges. The stabilized sludges with containing organic matter,

nutrients and biologically active substances represent the source of failure nutrients and elements (N, P, K, Ca, Mg) and also organic matter, but their application on the land is limited by xenobiotics and pathogen organisms. In 2006, were produced in Czech republic 220700 tons of sewage sludge (expressed in dry matter) 75 % of sewage sludge was land-applied, 0,9 % incinerated, 13 used in other methods and 13 % were disposed on dumps. Ratio of disposed sewage is relatively high. Some studies indicate that not only traditional analytes [i.e., PAHs, PCBs, polychlorinated naphthalenes (PCNs -structurally similar to PCBs, several of which exhibit dioxin- like toxicity), polychlorinated n-alkanes (PCAs)], and for a class of PPCPs - synthetic musks are present at significant concentrations (Jones-Lepp and Stevens, 2003). The Hazardous Waste Council Directive 91/689/EEC set the rules for the management, recovery and correct disposal of hazardous wastes. The directive has established, in its Annex I, different categories of wastes In order to characterise wastes as hazardous, must display any of the 14 properties specified in Anne III. Property labelled H14 - "ecotoxic" exhibits substances and matrices which present or may present immediate or delayed risk for one or more sectors of the environment (Pablos et al., 2009). To decide if wastes are hazardous ecotoxicological values LC(EC, IC)50 resulting from bioassay provided by legislation on *Daphnia magna*, *Sinapis alba*, fresh water algal *Scenedesmus subspicatus* and vertebrate *Danio rerio* are required.

Sludge mainly collected from wastewater treatment plants (WWTP Brno-Modřice) were subjected to ecotoxicological characterization to provide a preliminary assessment of their ecotoxicity. The various type of sludges were analyzed - anaerobic stabilized sewage sludge (AS), dewatered anaerobic stabilized sewage sludges (DWAS) and desiccated stabilized sewage sludge (DSAS) and activated sludge (ASV) from the small WWTP of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno were tested. Several toxicity tests were performed under standard laboratory conditions using freshwater crustaceans (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*) and aquatic and terrestrial plants *Sinapis alba*. The values of 24hLC50, 48hEC50 and 72hIC50 are the basic data for the ecotoxicological assessment of the sludge and for their classification following the Czech legislation. Following legislation concerning ecotoxicological evaluation of waste were the test conducted on water leaches of sewage. Wastes are extracted with the corresponding test medium in ratio 10L/kg dry water for 24h. Leaches were diluted using dilution medium corresponding to each testing organism in dilution series similarly to procedure with chemical substances (50, 100, 300, 500, 700 ml L<sup>-1</sup> and leach non-diluted only saturated with salt belonging to testing organisms - I series). To compare ecotoxicity of sewage of various humidity, were sludge diluted with water to have uniform dry matter as the most humid sewage (AS - II series. In case that

	Daphnia 48hEC50 (ml L <sup>-1</sup> )		Thamnocephalus 24hLC50 (ml L <sup>-1</sup> )		Sinapis 72hIC50 (ml L <sup>-1</sup> )	
	I series	II series	I series	II series	I series	II series
AS	52.04	-	22.81	-	203.62	-
DWAS	136.38	340.37	39.57	128.02	262.00	-
DSAS	236.42	540.21	139.64	343.15	266.56	-
ASV	38.17	426.89	129.57	422.34	-	-

- value of IC50 could not be calculated because of growth inhibition was below 50%

Table 9. The values of LC(EC, IC)50 calculated for various type of sewage sludge

values of LC(EC, IC)50 resulting from bioassays provided by Czech legislation are higher or equal to 10 ml L<sup>-1</sup> at least for one of testing organisms (*Daphnia magna*, *Sinapis alba*, fresh water algal *Scenedesmus subspicatus* and vertebrate *Danio rerio*) are the waste evaluated as hazardous. Calculated values of LC(EC, IC)50 are in table 9.

In spite of the fact that testing organisms are not the same as define Czech legislation we can predict that in no case sewage exhibit property labelled H14. Obtained values are above 10 ml L<sup>-1</sup> in all case. The most sensitive organisms are crustacean especially *Thamnocephalus platyurus*. As environmentally friendly appears DWAS and DSAS - activated sludge which is anaerobic stabilized and dewatered and consequently desiccated. It is possible that these processes decrease amount of some water soluble or temperature instable xenobiotics. The ecotoxicity assays confirmed that no sludge constituted a hazardous waste from ecotoxicological point of view. Our results are in according to recent study concerning ecotoxicity assays of different sludge (aerobic, anaerobic, unstabilised and sludge from a waste stabilisation pond) which confirmed that no sludge constituted a hazardous waste (Fuentes et al., 2006). The other question is if the bioassays of water leaches are relevant to predict ecotoxicity of solid matrices (waste, sediments, sewage). The aim of study conducted on various organisms by (Leitgib et al. 2007; Domene et al., 2008) was to assess applicability and reliability of several environmental toxicity tests, comparing the result of the whole soils and their water extracts. Measured endpoints were the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* (bacterium), the dehydrogenase activity inhibition of *Azomonas agilis* (bacterium), the reproduction inhibition of *Tetrahymena pyriformis* (protozoon), and *Panagrellus redivivus* (nematode), the mortality of *Folsomia candida* (springtail), the root and shoot elongation inhibition of *Sinapis alba* (plant: white mustard) and the nitrification activity inhibition of an uncontaminated garden soil used as "test organism". In most cases, the contact ecotoxicity tests conducted on solid matrices indicated more harmful effect of these samples than the tests using matrices extracts.

Organisms	Type of test	Endpoints	Exposition time	Result	Directiva
Tests of solid waste					
<i>Eisenia fetida</i> - springtail	acute	mortality	14 days	LC50	ISO 11268-1
<i>Avena sativa</i> , <i>Brassicca rapa</i> - plants	acute	germination, growth inhibition	14 days	IC50	ISO 11269-2
Test of water leach of waste					
<i>Vibrio fischeri</i> - bacterium	acute	inhibition of luminescence	30 min	EC50	ISO 11348
<i>Daphnia magna</i> - crustacean	acute/chronic	inhibition of mortality	48 h	EC50	ISO 6341
<i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchmeriella subcapitata</i> - algae	chronic	growth inhibition	3 days	EC20	ISO 8692

Table 10. Fundamental battery of ecotoxicity test for ecotoxicological evaluation of solid matrices

Direct contact environmental toxicity tests are more reliable and enable better prediction of environmental risk of tested matrices. Based on several studies (Rojíčková et al., 1998; Leitgig et al., 2007; Pablos et al., 2009) resulting in similar findings are in Czech recommended another test inclusive obligatory battery of tests mentioned in Czech Legislation. The direct contact environmental toxicity bioassays are able to follow the requirements of environmental toxicology: reliability, sensibility, reproducibility, rapidity and low cost.

#### 4. References

- Alcock, R.E.; Bacon, J.; Bardget, R. D.; Beck, A. J.; Haygarth, P. M.; Lee, R. G. M.; Parker, C. A. & Jones K. C. (1996). Persistence and fate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sewage sludge-amended agricultural soils, *Environmental Pollution*, Volume 93, 83-92.
- Balk, F. & Ford, R.A. (1999). Environmental risk assessment for the polycyclic musk AHTN and HHCB in EU, I. Fate and exposure assessment, *Toxicol Lett* 111, 57-79.
- Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances, *Trends in Analytical Chemistry* 23, 753-761.
- Bester, K. (2009). Analysis of musk fragrances in environmental samples, *J Chromatogr A* 1216, 470-480.
- Blaise, Ch. (1991). Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects, *Environmental Toxicology and Water Quality* 6, 145-155.
- Boleas, S.; Fernandez, C. & Tarazona, J.V. (1996). Toxicological and kinetic study of musk xylene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Bull Environ Contam Toxicol* 57, 217-222.
- Carlsson, G. & Norrgren, L. (2004). Synthetic Musk Toxicity to Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 46, 102-105.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology letters* 142, 185-194.
- Cleuvers, M. (2003). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 2004, 309-315.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drug diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 309-315.
- Commission of the European Communities, 1996. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Part II: Environmental Risk Assessment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Council of the European Communities (1986) council directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and particular of the soil, when sewage sludges is used in agriculture, official Journal L, 181:0006-0012
- Dietrich, D.R. & Hitzfeld, B.C. (2004). Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment. Chapter in: Gerhard G Rimkus (ed) *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer-Verlag, Berlin 233-244.

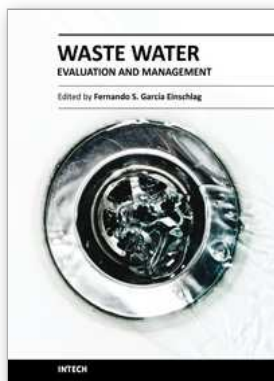
- Domene, X.; Alcañiz J.M. & Andrés, P. (2008). Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms, *Environ Pollut.* 151, 549-58.
- EC, 1991. Council Directive 91/689/EEC of 12 December 1991 on hazardous waste. Off. J. Eur. Commun. L Legis 1991;377:0020-7 [31/12/1991].
- Eljarrat, E.; Caixach, J. & Riva J.(2001). Evaluation of dioxin contamination in sewage sludge discharges on coastal sediments from Catalonia, Spain, *Water Research* 35, 2799-280.
- Fatta, D.; Nikolaou, A.; Achilleos, A. & Meric, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater, *Trends in Analytical Chemistry* 26, 515-533.
- Fatta-Kassinos, D.; Kalavrouziotis, I.K.; Koukoulakis, P.H. & Vasquez, M.I. (2010). The risk associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment, *Science of The Total Environment*, In Press, Corrected Proof.
- Ferrari, B.; Paxéus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A. & Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac, *Ecotoxicol Environ Saf* 55, 359-370.
- Ferrari, R.; Mons, B.; Vollat, B.; Frayse, B.; Paxéus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A. & Garric, J. (2004). Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?, *Environ Toxicol Chem* 23, 1344-1354.
- Fromme, H. Otto, T. & Pilz, K. (2001). Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany), *Water Res* 35,121-128.
- Fuentes, A.; Lloréns, M.; Sáez, J.; Aguilar, M.I.; Pérez-Marín, A.B.; Ortuó, J.F. & Meseguer V.F. (2004). Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges, *Environmental Pollution* 143, 355-360.
- Gómez, J. M.; Petrovic, M.; Fernandez-Alba, A. R.; & Barcelo, D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters, *Journal of Chromatography A*. 1114, 224-233.
- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhof., H.C. & Jørgensen, S.E. (1998). Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review, *Chemosphere* 36, 357-393.
- Heberer, H. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residue from municipal sewage to drinking water, *Journal of Hydrology* 266, 175-189.
- Heberer, T.(2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data, *Toxicology Letters* 131, 5-17.
- HERA (2004). Polycyclic Musks AHTN (CAS 1506-02-1) and HHCB(CAS 1222-05-05): Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Cleaning Products; *Environmental Section*, Version 2:1-81
- Herren, D.; Berset, J. D. (2000). Nitro musks nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges. Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterization of the aminometabolites, *Chemosphere* 40, 565-574.
- Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; & Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 225, 109-118.



- Hoffman, D.J.; Rattner, B.; Burton, G.A.; & Cairns, J. *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd edition, Lewis Publisher 2003, 1290p. ISBN 1-56670-546-0.
- Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L. ; & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Science of The Total Environment* 346, 87-98.
- ISO 11268-1:1993 : Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate
- ISO 11268-2:1998 : Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 2: Determination of effects on reproduction
- ISO 11348-3:2007 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria
- ISO 20079:2005 Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test
- ISO 6341:1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test
- ISO 8692:2004 Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
- ISO/TS 20281:2006 Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data
- Jjemba, P.K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment, *Ecotoxicol Environ Saf* 63, 113-30.
- Jones-Lepp, & T.L.; Stevens, R. (2006). Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 38, 1173-1183.
- Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M. & Guwy, A.J.(2008). The occurrence of Pharmaceuticals, personal care products endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK, *Water Research* 42, 3498-351.
- Kay, P.; Blackwell, P.A.; Boxall & A.B.A. (2005). Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land, *Chemosphere* 59, 951-959.
- Koschorreck, J.; Koch, C. & Ronnefahrt, I. (2002). Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU - a regulatory perspective, *Toxicology Letters* 131, 117-124.
- Kosjek, T.; Heath, E. & Kompare, B. (2007). Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007, vol. 387, no. 4, pp. 1378-1387
- Kot-Wasik, A.; Debska, J. & Namieśnik, J. (2007). Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products, *Trends in Analytical Chemistry* 26, 557-568.
- Kümmerer, K. (2002). Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review, *Chemosphere* 45, 957-969.
- Lapen, D.R.; Topp, E.; Metcalfe, CD.; Li, H.; Edwards, M.; Gottschall, N., Bolton, P.; Curnoe, W.; Payne, M. & Beck, A. (2008). Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following land application of municipal biosolids, *Sci Total Environ*. 25; 50-65.

- Lee, I.S.; Lee, S.H.; Oh, J.E. (2010). Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment, *Water Res* 44, 214-222.
- Leitgib, L.; Kálmán, J. & Gruiz, K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* 66, 428-434.
- Lignell, S.; Darnerud, P.O.; Aune, M.; Cnattingius, S.; Hajslova, J.; Setkova, L. & Glynn, A. (2008). Temporal trends of synthetic musk compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products, *Environ Sci Technol* 42, 6743-6748.
- Luckenbach, T. & Epel, D. (2005). Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters, *Environ Health Perspect* 113, 17-24.
- McClellan, K. & Halde, R.U. (2010). Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey, *Water Research* 44, Pages 658-668.
- Mendonca, E.; Picado, A.; Paixão S.M.; Silva, L.; Cunha, M.A. Leitão, S.; Moura, I.; Cortez, C. & Brito, F. (2009). Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal, *Journal of Hazardous Materials* 163,665-670.
- Mori, T.; Morita, F.; Inokuchi, A.; Takao, Y.; Kohra, S.; Tominaga, N.; Takemasa, T. & Arizono, K. (2006). Ecotoxicological Effect of Polycyclic Musks on *Caenorhabditis elegans*, *J Health Sci* 52,276-282.
- Nakata, H.; Sasaki, H.; Takemura, A.; Yoshioka, M, Tanabe, S. & Kajman, K. (2007). Bioaccumulation, Temporal Trend, and Geographical Distribution of Synthetic Musks in the Marine Environment, *Environ Sci Technol* 41, 2216-2222.
- OECD (2004): Guideline for the Testing of Chemicals. *Daphnia* sp. Acute immobilization Test No. 202. OECD, Paris, France
- OECD (2006): Guideline for the Testing of Chemicals. *Lemna* sp. Growth inhibition test No. 221. OECD, Paris, France
- Onesios, K.M.; Yu, J.T. & Bouwer, E.J. (2009). Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review, *Biodegradation* 20, 441-466.
- Pablos, M.V.; Fernández, C.; del Mar Babín, M.; Navas, J. M.; Carbonell, G.; Martini, F.; García-Hortugüela, P. & Tarazona J.V. (2009). Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes, *Ecotoxicology and Environmental safety* 72, 1594-1600.
- Park, S. G.; Chung, Ch. S.; Lee, S. H.; Hong, G.; Kim, S. H; Park, S. Y; Yoon, S. Y. & Lee, S. M. (2005). Ecotoxicological Evaluation of Sewage Sludge Using Bioluminescent marine Bacteria and Rotifer, *Ocean Science Journal* 40, 91-100.
- Peck, A.M. (2006) Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 907-939.
- Ramirez, A., J.; Mottaleb, M., A.; Brooks, B., W. & Chambliss, K., C. (2007). Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 79, 3155-3163.
- Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of C (REACH), regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, 2006.

- Regueiro, J.; Garcia-Jares, C.; Llompарт, M. Lamas, J.P. & Cela, R. (2009). Development of a method based on sorbent trapping followed by solid-phase microextraction for the determination of synthetic musks in indoor air, *J Chromatogr A* 1216, 2805-2815.
- Roberts, P.H. & Thomas, K.V. (2006) The occurrence of selected Pharmaceutical in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Science of the Total Environment* 356 , 143-153.
- Rojčičková-Padrťová, R.; Maršálek, B. & Holoubek, I. (1998). Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery, *Chemosphere* 37, 495-507.
- Schowaneck, D.; Carr, R.; David, H.; Douben, P.; Hall, J.; Kirchmann, H.; Patria, L.; Sequi, P.; Smith, S. & Webb, S. (2004). A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture-conceptual framework, *Regul. Toxicol. Pharm.* 40, 227-251.
- Stevens, J.L.; Stern, G.A. Tomy, G.T. & Jones, K.C. (2003). PAHs, PCBs, PCNs, organochlorine pesticides, synthetic musks and polychlorinated n-alkanes in UK sewage sludge, survey results and implications, *Environ. Sci. Technol.* 37, 462-467.
- Sumner, N.R.; Guitart, C.; Fuentes, G. & Readman, J.W. (2010). Inputs and distributions of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study, *Environ Pollut* 158, 215-222.
- Tanabe, S. (2005). Synthetic musks-arising new environmental menace? *Mar Pollut Bull* 50,1025-1026.
- Ternes, T., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.* 32, 3245-3260
- Topp, E.M; Metcalfe, C.D.; Li, H.; Gottschall, N.; Bolton, P.; Curnoe, W.; Payne, M.; Beck, A., Kleywegt, & Lapen, D.R. (2009). Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following surface spreading and injection of dewatered municipal biosolids to an agricultural field, *Science of The Total Environment* 407, 4220-4230.
- Valdersnes, S.; Kallenborn, R. & Sydnes, L.K. (2006). Identification of several Tonalide® transformation products in the environment, *Int J Env Anal Chem* 86, 461 - 471.
- Watkinson, A.J.; Murby, E.J. & Costanzo, S.D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling, *Water Research* 41, 4164-416
- Watkinson, A.J.; Murby, E.J.; Kolpin, D.W. & Costanzo, S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water, *Science of The Total Environment* 407, 2711-2723.
- Wollenberger, L.; Halling-Sørensen, B. & Kusk, K.O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*, *Chemosphere* 40, 723-730.
- Wombacher, W.D. & Hornbuckle, K.C. (2009). Synthetic musk fragrances in a conventional drinking water treatment plant with lime softening, *J Environ Eng* 135, 1192-1198.
- Yang, S. & Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes, *Water Research* 37, 4645-4656.
- Zorita, S.; Måtensson, L. & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden, *Science of The Total Environment* 407, 2760-2770.



## **Waste Water - Evaluation and Management**

Edited by Prof. Fernando Sebastián García Einschlag

ISBN 978-953-307-233-3

Hard cover, 470 pages

**Publisher** InTech

**Published online** 01, April, 2011

**Published in print edition** April, 2011

Fresh water resources are under serious stress throughout the globe. Water supply and water quality degradation are global concerns. Many natural water bodies receive a varied range of waste water from point and/or non point sources. Hence, there is an increasing need for better tools to assess the effects of pollution sources and prevent the contamination of aquatic ecosystems. The book covers a wide spectrum of issues related to waste water monitoring, the evaluation of waste water effect on different natural environments and the management of water resources.

### **How to reference**

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Helena Zlámalová Gargo ov , Milada Vávrová, Helena Dole alov  Weissmannová, Ludmila Mravcová, Lucie Vydrová and Libor Zouhar (2011). The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater, *Waste Water - Evaluation and Management*, Prof. Fernando Sebastián García Einschlag (Ed.), ISBN: 978-953-307-233-3, InTech, Available from:

<http://www.intechopen.com/books/waste-water-evaluation-and-management/the-use-of-methods-of-environmental-analysis-and-ecotoxicological-tests-in-the-evaluation-of-wastewa>

**INTECH**  
open science | open minds

### **InTech Europe**

University Campus STeP Ri  
Slavka Krautzeka 83/A  
51000 Rijeka, Croatia  
Phone: +385 (51) 770 447  
Fax: +385 (51) 686 166  
[www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)

### **InTech China**

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai  
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China  
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元  
Phone: +86-21-62489820  
Fax: +86-21-62489821

# Příloha A2:

ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M. Selected Pharmaceuticals and Musk Compounds in Wastewater. In *Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*. 1. Rijeka, Croatia: Intech Open Science, 2013. p. 121-144. ISBN: 978-953-51-0882- 5.

---

# Selected Pharmaceuticals and Musk Compounds in Wastewater

---

Helena Zlámalová Gargošová, Josef Čáslavský and  
Milada Vávrová

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/52047>

---

## 1. Introduction

In order to achieve sustainable development, environmental protection shall constitute an integral part of the development process and cannot be considered in isolation from it [1]. The environment, especially water ecosystem, is continuously loaded with foreign organic chemicals (xenobiotics) released by urban communities and industries. Water is not a commercial product like any other but, rather, a heritage which must be protected, defended and treated as such [2]. In the 20<sup>th</sup> century, many organic compounds, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides (OCPs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) have been produced and, in part, released into the environment [3]. The ultimate sink for many of these contaminants is the aquatic environment, either due to direct discharges or to hydrologic and atmospheric processes [4]. In the 21<sup>st</sup> century „new“ pollutants namely pharmaceuticals, cosmetics and endocrine disrupting chemicals (EDCs) have become a source of concern. Collectively, they are referred to as PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) and are now viewed as emerging contaminants. A wide range of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) is available on the market. From this range various classes, e.g., antibiotics, antiphlogistics, antiepileptics, beta-blockers, lipid regulators, vasodilators, and sympathomimetics, have been detected in drinking water, groundwater, wastewater, sewage, and manure [5]. In last time there is increasing evidence that some of these compounds are persistent in the environment, impacting nontarget organisms in various ways including changes in sex ratios of higher organisms [6,7]. The presence of a xeno-

biotic compound in a segment of an aquatic ecosystem does not, by itself, indicate injurious effects. Traditional chemical measurements alone are an insufficient basis for ecotoxicity assessments. In general, both basic and advanced analytical chemical instruments such as ICP/MS, GC/MS, HPLC/MS etc. are used for water quality analysis. However, it is difficult to distinguish accurately the diverse and complex chemicals, even when using those advanced chemical instruments. Furthermore, it is also almost impossible to detect the impact on living organisms in the receiving environment due to their bioavailability and the interaction caused by the synergistic and antagonistic effect of different chemicals. Therefore a new approach of identifying viable and ecologically relevant invertebrate toxicity testing models seems very promising to assess the biological effects and ecological risk of exotic chemicals when released into the environment as a battery of single species bioassays [8].

### 1.1. Pharmaceuticals

Pharmaceuticals (also drugs, medicaments, medications, medicines etc.) are biologically active substances designated for use in the medical diagnosis, cure, treatment, or prevention of disease [9]. These compounds improve the quality of human life, but due to their increasing production and consumption resulting in their growing input into the environment there is increasing impact of these compounds on the natural ecosystems, caused either by the active compounds contained in medicaments or by their metabolites and transformation products [10]. These compounds are sometimes called as pseudo-persistent pollutants, because in many cases their persistence is not high, but due to continual input their levels in the environment are kept less or more constant. The discharges from waste water treatment plants represent one important source of pharmaceuticals in the water ecosystem, because most of drugs is incompletely removed in waste water treatment plants (WWTP) [11-13]; they could be partially removed by sorption on the sewage sludge or degraded by microorganisms in activated sludge. The removal efficiency depends on many factors like drug properties, type and parameters of the cleaning process, age of the activated sludge. The sludge activity could be also negatively influenced by the presence of antibiotics in treated waste water.

Another important source of pharmaceuticals in the water ecosystem is agriculture, especially livestock production, where growth stimulants are used to increase production and antibiotics are administered as prophylactic medication to animals. Biotransformation of drugs during animal digestion is not very effective; from 30 to 90 % of administered active compounds is excreted unchanged [10,14] and enter the environment directly via urine or faeces, or in manure and suds used as fertilizers.

*Non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects are one group of the most frequently used medicaments. Ibuprofen and paracetamol followed by diclofenac, ketoprofen and naproxen are the most well-known members of this group. Their extensive use is caused by the fact, that many drugs in this group do not require medical prescription. These compounds also belong to the most frequently detected pharmaceuticals in the European waters. E.g. for ibuprofen the concentra-

tions of units to tens of  $\text{ng.L}^{-1}$  in surface water, tens of  $\text{ng.L}^{-1}$  in raw waste water and from tenths to units of  $\text{ng.L}^{-1}$  in discharged water were found in the Czech Republic [15].

Antibiotics are another important group of pharmaceuticals. This term originally denoted "any substance produced by a microorganism that is antagonistic to the growth of other microorganisms in high dilution" [16]. Nowadays also synthetic compounds are included in this group. Antibiotics have been recently classified as a priority risk compounds due to their high toxicity to algae and bacteria. Hence, these compounds in surface water have the potential to disrupt the key bacterial cycles and/or processes critical to aquatic ecology (nitrification/denitrification), agriculture (soil fertility) and animal production (rudimentary processes) [17,18]. Under long-term exposition the resistance of some pathogenic organisms could develop [11,12].

*Macrolide antibiotics* are a group of drugs frequently used in human and veterinary medicine. These primarily bacteriostatic antibiotics with a broad antibacterial spectrum are probably the largest group of natural medicines. Macrolides have acquired its name by macrocyclic lactone ring with 14, 15 or 16 carbon atoms, substituted with alkyl, aldehyde, ketone or hydroxyl groups, and with one or more neutral or basic amino sugars bonded to the ring by glycosidic bond. The first macrolide antibiotic, erythromycin, was isolated in 1952 from the metabolic product of fungus *Streptomyces erythreus* [19].

Macrolide antibiotics can be classified into four groups [20]:

1. Natural macrolides of 1<sup>st</sup> generation have a short half-life; therefore they must be administered in relatively high and frequent doses. There is a potential of interactions with some other drugs.
2. Synthetic macrolides of 2<sup>nd</sup> generation have more favourable pharmacokinetic properties, applications are therefore less frequent and doses are lower than at first-generation macrolides. There is also a lower incidence of drug interactions.
3. Azalides are formed by incorporating nitrogen into the 14-member lactone ring. From other macrolides they differ with high half-life and very slow release from tissues.
4. Ketolides are the newest and so far little studied group of macrolide antibiotics. These drugs were prepared by replacing sugar cladinose in the 14-member lactone ring by keto-group and by attaching a cyclic carbamate group in the lactone ring. Due to these modifications ketolides have much broader antimicrobial spectrum than other macrolides; besides, they are also effective against macrolide-resistant bacteria, due to their ability to bind at two sites at the bacterial ribosome.

## 1.2. Musk Compounds

Musk compounds - synthetic fragrances - are substances with pleasant smell which are present in personal hygiene products (perfumes, cosmetics, soaps, and shampoo), in cleaning and disinfection products, industrial cleaning products, air fresheners, etc. to give them characteristic and pleasant scent. These compounds have been marketed since the begin-



ning of 20<sup>th</sup> century and their industrial production has significantly increased during the last 50 years [21]. Nowadays, four major classes of synthetic fragrances could be met: nitromusks, polycyclic musks, macrocyclic musks and alicyclic (or linear) musks. Nitromusks were the first produced compounds of this type; structure of these compounds is based on two- or threefold nitrated benzene with additional substitution by alkyl-, methoxy- or keto- groups. Musk xylene (MX), musk ketone (MK) and musk ambrette (MA) are the most important members of this group. These compounds show musk-like odour in spite of the fact that their structure is very different from natural musk compounds. They are partially soluble in water (0.15 ng.L<sup>-1</sup> for MX; 0.46 ng.L<sup>-1</sup> for MK), but their relatively high octanol-water partition coefficients (log Kow = 4.4, 3.8 and 4.0 for MX, MK and MA, respectively) [22] indicate high bioaccumulation potential in water biota. These compounds are also relatively persistent. According to data published till now, nitro musks show low or none acute toxicity to aquatic organisms, but they are potentially toxic over long time period [23,24]. It has been suggested that their transformation products are potentially highly toxic [25]. The worldwide production of MX and MK (which are the only two nitromusks of industrial importance today) in 2000 was estimated to 200 metric tons and it shows decreasing tendency [26].

Polycyclic musks with several cycles in their structure were discovered in 1950s [27]. Chemically they are indane, tetraline or coumarine derivatives and tricyclic compounds. Currently, these musks are the most widely used. Galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) in recent years are the most important commercial synthetic musks [21,28] followed by celestolide (ADBI), phantolide (AHMI), and traesolide (ATII). Total worldwide use of polycyclic musks in year 2000 was approximately 4000 tons [26]. These compounds are more resistant against light and bases and bind well to fabric. Nevertheless, HHCB and AHTN are toxic to aquatic invertebrates at concentration levels of ppb to low ppm, but they are almost non-toxic to fish; similar situation occurs during longer exposition [29]. The first report about the presence of these compounds in water and fish appeared in 1984, one year later these compounds were found in human samples [27].

Macrocyclic musk compounds were discovered in 1926 by Austrian chemist Leopold Ruzicka [30,31] who characterized natural musks muscone and civetone as cyclic macromolecules and proposed the method of their synthesis. Since then, many other compounds of this type has been characterized and synthesized. It was found that natural macrocyclic musks are 15- or 17-membered rings, musks of animal origin are mainly ketones, whilst those of plant origin are lactones. These compounds show excellent stability to light and alkaline condition and very good fixation to fabric, nevertheless their synthesis is difficult and usually multi-step procedure, and therefore their production costs are high. Due to this fact the use of these compounds is limited, but they are expected to be of increasing importance in future [27].

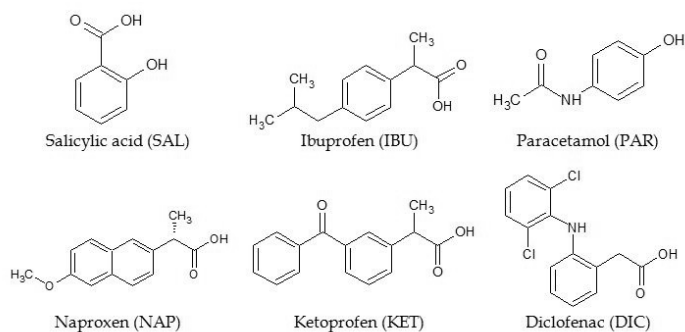
Alicyclic musks, known also as linear musks or cycloalkyl esters, represent the youngest group of synthetic musks. Their structure is formed by modified cykloalkyl esters. The first compound of this group – cyclomusk - was introduced in 1975 [32]. In 1990, the first commercially successful linear musk – helvetolide – was launched, another linear musk – Ro-

mandolide – was described ten years later [33]. Due to relative novelty there is lack of information describing their occurrence in the environment and their ecotoxicity. A wide range of musk compounds of this group are produced and marketed by the Czech company Aroma Prague Ltd.

## 2. Environmental Analysis

### 2.1. Target Compounds

For this study six frequently used acidic non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were selected. Figure 1 shows their structures and Table 1 summarizes their physical-chemical properties.



**Figure 1.** Structures of selected NSAIDs.

Compound	CAS No.	Molecular mass (g.mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	log K <sub>ow</sub>
Salicylic acid	69-72-2	138.1207	2.97	2.4
Ibuprofen	15687-27-1	206.2808	4.91	3.6
Paracetamol	103-90-2	151.1626	9.38	0.4
Naproxen	22204-53-1	230.2592	4.15	2.8
Ketoprofen	22071-15-4	254.2806	4.45	3.2
Diclofenac	15307-86-5	296.149	4.15	3.9

**Table 1.** Physical-chemical properties of selected NSAIDs [34-37].

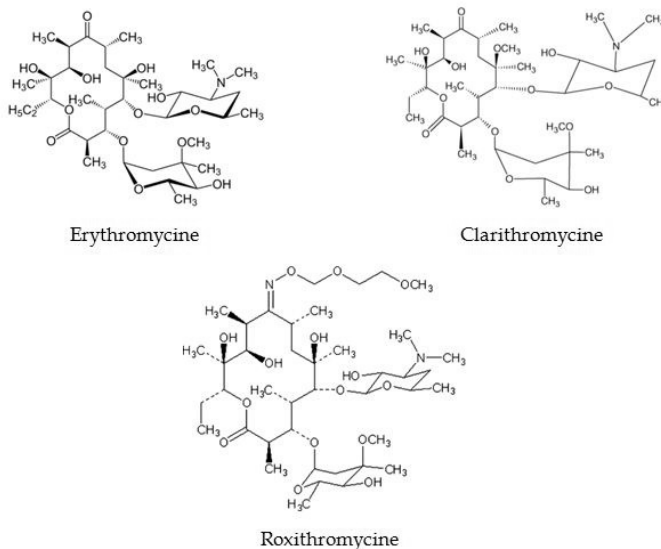
From the group of macrolide antibiotics following drugs were selected:

*Erythromycin* is a mixture of macrolide antibiotics that are produced by the microorganism *Streptomyces erythreus*. The main ingredient is erythromycin A. Erythromycin is a white to pale yellow powder or form a colourless to pale yellow crystals. It is slightly hygroscopic, poorly soluble in water, soluble in ethanol and methanol. It is metabolized in the acidic environment of the stomach to inactive by-products (ketones, alcohols, ethers), which are responsible for its low bioavailability and gastrointestinal side effects. This bacteriostatic macrolide antibiotic is used for treatment of respiratory infections caused mainly mycoplasma, chlamydia, staphylococci or streptococci, as well as of infections of the skin or urinary tract.

*Clarithromycin* is used for treating of respiratory infections caused mainly by mycoplasma, chlamydia, staphylococci or streptococci, as well as of infections of the skin or urinary tract. Clarithromycin has strong antibacterial properties and is more resistant against acidic environment than erythromycin; it has also improved pharmacokinetic properties and is better tolerated in the GIT. Clarithromycin is a white crystalline powder, practically insoluble in water but soluble in acetone.

*Roxithromycin* is a newer macrolide antibiotic with better tolerance than that of erythromycin. It is used to treat the same diseases as erythromycin and also to treat isosporiasis.

Chemical structures of selected macrolide antibiotics are in Figure 2.

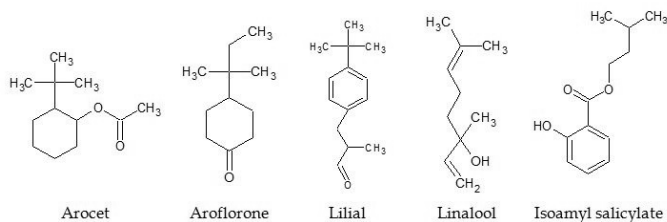


**Figure 2.** Structures of selected macrolide antibiotics.

Compound	CAS No.	Molecular mass (g.mol <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Erythromycine	114-07-8	733.93	3.06
Clarithromycine	81103-11-9	747.95	3.16
Roxithromycine	80214-83-1	837.05	2.75

**Table 2.** Physical-chemical properties of selected macrolides [34,35,37].

Musk compounds selected for this study are from the group of linear musks produced and marketed in the Czech Republic by Aroma Prague Company. They are used for preparation of various fragrances and perfume compositions. Their structures are given in Figure 3 and physical-chemical properties in Table 3.



**Figure 3.** Structures of selected linear musks.

Compound	CAS No.	Molecular mass (g.mol <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>
Aroacet	88-41-5	198.30	4.42
Aroflorone	16587-71-6	168.26	3.40
Lilial	80-54-6	204.31	4.36
Linalool	126-91-0	154.25	3.38
Isoamyl salicylate	87-20-7	208.25	4.49

**Table 3.** Physical-chemical properties of selected linear musks.

## 2.2. Sampling locality

The presence of target compounds was monitored in the wastewater from municipal waste water treatment plant (WWTP) Brno – Modřice (catchment region for population of about

500,000 people). This facility was launched in 1961 as classic two-stage plant with anaerobic sludge stabilization. In the period between 2001 – 2003 the overall reconstruction and extension of the WWTP was realized with the main objective to meet the treated wastewater effluent limits set by Czech and European standards and regulations, and to ensure sufficient capacity of the facility to accommodate the growing demand of the city of Brno with almost 500 thousand of inhabitants and several industrial facilities, and also increasing number of the surrounding agglomerations successively connecting to the Brno sewerage system. Nowadays, the technology in WWTP Brno-Modřice corresponds to the EU parameters. Waste water cleaning process includes mechanical removal of rough solid particles – mechanical treatment, which is followed by fat removal. Water is then directed to the sedimentation tanks for removal of fine particles. The next step is biological treatment under anaerobic conditions where dephosphatation and denitrification occurs, followed by biological degradation under aerobic conditions. The rest of the non-biodegradable phosphorus is subsequently removed by chemical precipitation with ferric sulphate. Activated sludge is removed from the water in sedimentation tank, water is then discharged into the recipient and sludge is thickened and decayed. Produced bio-gas is used for the combined generation of heat and electricity. The residence time (technological delay) between inlet and comparable outlet in Brno WWTP is 24 hours.



**Figure 4.** Sampling locality – waste water treatment plant Brno - Modřice.

Composite 24-hour samples were collected at inflow and outflow of the WWTP by automatic sampling device in 2-hours intervals. Individual portions were collected in the dark glass sample containers with a capacity of 1 L. Samples for analysis of NSAIDs were collected at inflow and outflow of WWTP during July and August 2011, for determination of macrolides

and musk compounds from 11<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> of April 2011. Samples were picked up from the WWTP daily and transported to laboratory, where they were either analysed immediately or stored in a refrigerator at 5 °C and analysis was initiated within 24 hours.

### 2.3. Analysis of Pharmaceuticals

Solid phase extraction (SPE) was applied for the isolation of target compounds from waste water. The suspended particles were removed by filtration using Büchner funnel and filter paper Munktell Filtrak No 388 and No 390 for inflow samples and 390 for outflow samples and pH of the samples was adjusted to a value of 2 by addition of hydrochloric acid (NSAIDs) or formic acid (antibiotics). 300 mL of waste water was then subjected to solid phase extraction using Oasis HLB cartridges (volume 3 mL, 60 mg of sorbent, Waters, USA), which were previously activated by 6 mL of methanol and washed with 6 mL Milli-Q water at pH = 2. After loading of sample the cartridge was again washed by 6 mL Milli-Q water at pH = 2, dried for 5 minutes under flow of nitrogen and then the target compounds were eluted by 6 mL (NSAIDs) or 10 mL (antibiotics) of methanol. The eluate was then evaporated to dryness under gentle stream of nitrogen. For the analysis of NSAIDs the residue was dissolved in 300 µL of BGE and analysed by capillary zone electrophoresis with UV detection. For analysis of macrolides the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analysed by HPLC/MS.

#### 2.3.1. Analysis of NSAIDs by capillary zone electrophoresis:

Agilent CE instrument equipped with UV-VIS detector of DAD type was used. Analytical conditions were as follows.

- Separation capillary: fused silica uncoated, ID = 75 µm, L = 83.5 cm, l = 75.4 cm
- Background electrolyte (BGE): 25 mmol.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> in Milli-Q water (before each injection, the capillary was treated successively with alkaline solution of 0.1 M NaOH, water and BGE)
- Separation voltage: 30 kV, positive polarity
- Temperature of separation capillary: 25 °C
- Detection: 210 nm (bandwidth of 40 nm), 200 nm (bandwidth of 20 nm), 230 nm (bandwidth of 10 nm)
- Sample injection: hydrodynamic, pressure pulse at capillary inlet 5 kPa for 5 s
- Analysis time: 25 min

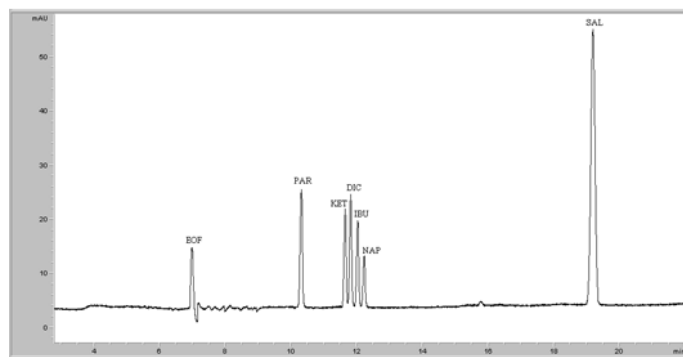
Fig. 5 shows an example of electrophoregram.

Obtained results together with removal efficiency and limits of detection are presented in Table 4.

Compound	Concentration		Removal efficiency (%)	LOD [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]
	influent [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]	effluent [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]		
Salicylic acid	5.58–44.15	0.47–3.53	97	0.46
Ibuprofen	10.94–42.32	1.18–2.75	96	1.17
Paracetamol	1.00–14.61	0.52–1.65	97	0.46
Naproxen	0.61–14.48	0.51–2.35	78	0.50
Ketoprofen	2.15–28.21	1.34–6.46	92	1.28
Diclofenac	1.09–9.46	1.02–2.17	92	0.98

**Table 4.** Concentrations of NSAIDs at inflow and outflow, removal efficiency and limits of detection.

The ranges of concentrations of selected drugs in the influent and effluent and average removal efficiency of the WWTP for each drug are listed in Table 4. All selected drugs were detected in analysed samples of wastewater. Salicylic acid (average concentration  $28.21 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and ibuprofen (average concentration  $23.11 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), were detected at highest concentrations and almost in all samples. It is caused by the fact, that these compounds are contained in the majority of the most frequently used drugs in the Czech Republic. The levels of other monitored analgesics were below  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Relatively low concentration of favourite painkiller – paracetamol – was surprising, but the reason could be partial decomposition of this compound in waste water before the inflow to the WWTP. Ketoprofen, diclofenac and naproxen were detected in wastewater only in some cases.



**Figure 5.** Electrophoregram of NSAIDs standards: EOF – Mesityl oxid (marker of electroosmotic flow); PAR – paracetamol; KET – ketoprofen; DIC – diclofenac; IBU – ibuprofen; NAP – naproxen; SAL - salicylic acid.

Average removal efficiency of all analysed compounds was above 90 %, except for naproxen with an average removal efficiency of 78 %.

### 2.3.2. Analysis of antibiotics by HPLC/MS

Analysis of samples was performed using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC/MS). Agilent 1100 Series liquid chromatograph with Agilent 6320 spherical ion trap mass spectrometer and electrospray ionization were employed. Zorbax Eclipse XDB - C18 column (2.1 x 150 mm, particles 3.5  $\mu\text{m}$ ) protected by Zorbax Eclipse XDB - C18 precolumn (2.1 x 20 mm, particles 3.5  $\mu\text{m}$ ) was used for separation, binary mobile phase consists from 10mM ammonium acetate (A) and acetonitrile (B), gradient started from 25 % B to 55 % B in 3 min, then 90 % B in 10 min. Flow rate was 150  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Conditions for electrospray: pressure of nebulizing gas ( $\text{N}_2$ ) 20 psi, flow and temperature of drying gas ( $\text{N}_2$ ) 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and 350  $^\circ\text{C}$ , respectively. Positive ions were scanned within the range  $m/z$  100 – 900. Individual compounds were identified by the combination of retention time and quasi-molecular ion detection (erythromycin:  $t_{\text{R}}=11.2$  min,  $m/z = 734.8$ ; clarithromycin:  $t_{\text{R}} = 13.0$  min,  $m/z = 748.3$ ; roxithromycin:  $t_{\text{R}} = 13.4$  min,  $m/z = 837.4$ ), external standard method based on the response on fragmentograms corresponding to the quasi-molecular peaks of individual compounds was used. Metrological parameters of used analytical method are presented in Table 5.

Parameter	Compound		
	Erythromycin	Clarithromycin	Roxithromycin
Coefficient of determination ( $R^2$ )	0.9962	0.9993	0.9971
LOD [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	0.1440	0.2428	0.0970
LOQ [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	0.4305	0.7251	0.2903

**Table 5.** Metrological parameters of HPLC/MS method.

In real samples the presence of macrolide antibiotics was proved only exceptionally and at levels close to limits of detection (erythromycin 17., 18. and 19. 4. 2011 at inflow at levels of 0.274  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , roxithromycin 12.4.2011 at outflow 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Clarithromycin was not detected at concentrations exceeding LOD at all. Therefore it could be concluded that macrolide antibiotics don't represent any serious risk for the receiving water.

### 2.4. Analysis of musk compounds

Solid Phase Microextraction (SPME) in head-space mode was used for the isolation of target analytes from waste water. Fibre with 65  $\mu\text{m}$  mixed layer polydimethylsiloxane – divinylbenzene was selected as optimal on the base of previous studies realized in our laboratory. 22 mL glass vials closed with Teflon-lined silicon septum were used. 14 mL of raw sample was placed into the vial, 3.75 g NaCl was added, after inserting of magnetic stirrer vial was closed and heated up to the temperature of 80  $^\circ\text{C}$  in water bath. Magnetic stirrer was set to 900 rpm. Equilibration time was 5 minutes, followed by 40 minute sorption. Blank samples were treated by the same method using de-ionized water.



Compound	Quantification ion (m/z)	Qualifier ions (m/z)		$t_r$ (min)	
Linalool	93	71	121	9.12	
Arocet (2 isomers)	82	123	57	13.483	14.044
Aroflorone	98	168	71	15.330	
Lilial	189	204	147	20.675	
Isoamyl salicylate	120	138	208	20.825	

**Table 6.** Experimental parameters for the GC/MS analysis of linear musks.

Isolated compounds were analysed by GC/MS using Agilent 6890N GC and Agilent 5973 MS equipped with quadrupole analyser and electron ionization @ 70 eV. Separation column was DB-5MS (20 m x 0.18 mm x 0.18  $\mu$ m) (J&W), helium 6.0 (SIAD, Czech Republic) at a flow rate of 0.8 mL.min<sup>-1</sup> (constant flow mode) was the carrier gas. Desorption from SPME fibre was realized in split/splitless injector of the GC in splitless mode for 3 min at a temperature of 250 °C. Column temperature program was as follows: 50 °C for 3 min, then 10°/min to 90 °C, then 5°/min to 120 °C, hold 4 min, then 10°/min to 160 °C, 5°/min to 185 °C, 20°/min to 285 °C, final isotherm 2 min. GC/MS interface temperature was set to 285 °C, temperature of ion source was 250 °C. Mass spectrometer was operated in SIM mode; parameters are summarized in Table 6.

Date	Linalool [ $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ]		Arocet [ $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ]		Aroflorone [ $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ]		Lilial [ $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ]		Isoamyl salicylate [ $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ]	
	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow
11.4.11	61.31	ND	2.633	ND	3.442	ND	1.222	0.049	0.975	NQ
12.4.11	42.33	NQ	2.406	ND	1.342	ND	0.406	0.049	0.922	ND
13.4.11	33.28	NQ	2.847	ND	1.413	ND	0.439	0.017	0.328	ND
14.4.11	36.75	ND	1.388	ND	0.809	NQ	0.429	0.060	0.589	NQ
15.4.11	25.92	0.199	0.473	ND	0.369	ND	0.197	0.042	0.121	NQ
16.4.11	66.72	0.139	1.399	ND	1.427	ND	0.404	0.049	0.403	NQ
17.4.11	39.57	NQ	0.546	ND	0.727	ND	0.307	0.033	0.202	ND
18.4.11	90.81	0.114	3.223	ND	5.336	ND	0.391	0.058	0.492	NQ
19.4.11	75.67	ND	4.294	ND	2.419	NQ	0.684	0.065	0.734	NQ
20.4.11	84.79	ND	4.406	ND	0.925	ND	0.433	0.047	0.495	ND
Average	55.72	0.046	2.361	0.0002	1.821	0.0007	0.491	0.047	0.526	0.0003
LOD	0.0012		0.0004		0.0011		0.0002		0.0004	
LOQ	0.0041		0.0014		0.0037		0.0008		0.0012	

**Table 7.** Concentrations of selected linear musks in waste water. For the calculation of average compound concentrations following values were used: ND = 0.5 • LOD and NQ = LOD.

Table 7 presents the concentrations of selected linear musks in raw and cleaned waste water. Linalool was found in highest concentrations at inflow ranging from 33 to 91  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , followed by aroacet and aroflorone with levels in low units of  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Inflow concentrations of lilial and isoamyl acetate were in tenths of  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . These concentrations are lower than that of polycyclic musks at the same locality – levels found for galaxolide and tonalide were in hundreds and tens of  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectively [38]. For all linear musks except of lilial, high removal efficiencies were attained, usually more than 99.5 %. Lilial removal efficiency was between 78.68 and 96.13 % (average 88.7 %). These results are very satisfactory.

### 3. Ecotoxicology

Our generation has recently stepped over a threshold of the new millennium. The growth of the human population coupled with increasing consumption and overuse of natural resources brings with it also growing impact on the total environment. The human activities that have accelerated since the 18<sup>th</sup> century with the beginning of the industrial revolution led in many cases to long-term consequences which disturbed the natural balance and gathered an irreversible and uncontrollable character [39]. Effects of above mentioned human activities, mainly uncontrolled release of various manmade chemicals, is not without adverse consequences. These negative effects are studied within the discipline of ecotoxicology, which was firstly defined around 1969 by Dr. René Truhaut, a member of the French Academy of Sciences. This new field of science "Ecotoxicology" he defined as "the study of adverse effects of chemicals with the aim of protecting natural species and populations." Thus ecotoxicology deals with potentially harmful effects of countless man-made chemicals and wastes released into biosphere on organisms. Ecotoxicity involves the identification of chemical hazards to the environment. "Ecotoxicity studies measure the effects of chemicals on fish, wildlife, plants, and other wild organisms" [40,41]. Bioassays are one of the main tools in ecotoxicological assessments. Ecotoxicology has the task to examine effects of chemicals or environmental samples on species, biocenoses and ecosystems. Results of ecotoxicological research constitute the main scientific background for setting immission standards for the protection of the environment. The Water Policy Directive [2] of the European Union (EU) strives for a good ecological and chemical status for surface waters. This Directive is to contribute to the progressive reduction of emissions of hazardous substances to water. However, the Directive is aimed especially at a monitoring of the state of the waters and is based on a combined approach using control of pollution at source (substance-specific assessment) through the setting of emission limit values and of environmental quality standards instead of an assessing threats to the waters from effluent discharges [2,42]. The solution is the whole effluent assessment (WEA), which can be defined as the assessment of the whole effluents by using a range of biological methods or techniques in order to reveal (potential) effects. It focuses on toxicity (acute and chronic), genotoxicity (including mutagenicity), bioaccumulation and persistence. Therefore WEA increases the understanding of the combined effect of all known and unknown substances, especially in complex mixtures [43]. Global evaluation of wastewaters should include ecotoxicological tests to complete the chemical

characterization. The integrated assessment of biological effects of wastewater discharges in the ecosystems is relevant and ecotoxicity tests are referred as extremely useful tools for the identification of environmental impacts [44]. On the other hand there exist some ways how to partially prevent environment and water ecosystem. On 1<sup>st</sup> June 2007 EU regulation REACH entered into force. The law is the European Community Regulation on chemicals and their safe use [45]. It deals with the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances. The aim of REACH is to improve the protection of human health and the environment through the better and earlier identification of the intrinsic properties of chemical substances. Three specific properties of a chemical are used to describe its potential hazard to the aquatic environment [46,47]:

- Aquatic toxicity: The hazard of a substance to living organisms, based on toxicity tests to aquatic animals and plants.
- Degradability: The persistence of the substance in the environment, based on molecular structure or analytical testing.
- Bioaccumulation/bioconcentration: The accumulation of a substance in living organisms (from water sources for bioconcentration), which may or may not lead to a toxic effect; based on calculations or bioconcentration factor (BCF) studies using fish.

Aquatic toxicity is determined using internationally harmonized test methods, which are preferred; in practice, data from national methods may also be used where they are considered as equivalent. Data are preferably to be derived using OECD Test Guidelines, US Environmental Protection Agency (EPA) or equivalent according to the principles of Good Laboratory Practices (GLP). For ecotoxicity evaluation of chemicals fish, crustacean, algae and freshwater plant (*Lemna minor*) are used. On the base of obtained results from tests the hazards to the aquatic environment which they present is identified and chemical substances are classified into categories and they are assigned risk phrases [46,48,49].

### 3.1. Ecotoxicity testing of chemical compounds

To assess the effect of chemical compounds on various aquatic organisms the ecotoxicity tests, biotests, bioassays using organisms from various trophic levels are used. The goal of the ecotoxicological tests is the determination of effective concentration (EC), eventually lethal concentration (LC) or inhibition concentrations (IC) [40]. These parameters refer to the concentration of toxic substance that results in 50% reduction of end-point relative to control at a given period of time [50]. These concentrations of tested compounds cause the mortality of 50 % testing organisms or 50% inhibition growth rate in relation to control group. Lower values of LC (EC, IC)50 means higher toxicity of the tested chemical compounds. In accordance with testing regulation the limit test, preliminary tests and definitive test were conducted with single compounds. In limit test concentration 100 mg.L<sup>-1</sup> of tested compound is used. Preliminary tests (range finding test) are used to find approximate toxicity of the chemical compounds if it is unknown. In this case the dilution series is following: 100 mg.L<sup>-1</sup>, 10 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 0.1 mg.L<sup>-1</sup> and 0.01 mg.L<sup>-1</sup>. The results of preliminary tests are

used to determine the range of dilution series of the final test. From obtained experimental endpoints (mortality, immobility, growth inhibition etc.) in ecotoxicity tests the ecotoxicological values EC50, IC50, LC50 are calculated

### 3.1.1. *Daphnia magna* – acute toxicity test

*Daphnia magna* is a common component of freshwater zooplankton. It refers to the group of *Arthropoda*, *Branchiopoda*, *Daphnidae*. *Daphnia* are small arthropods of 1–5 mm in size. They live in various aquatic environments. Ontogenesis of individual is direct without larval stages. During the year there is one or several biological cycles in which parthenogenetic generations are alternated by bisexual generations which enclose the cycle. Species *D. magna* is the largest species of *Daphnia* group. Thus it is vulnerable to fish predation that it is excluded from fish-inhabiting lakes. It occurs mainly in ephemeral habitats like small ponds and rockpools where vertebrate predators are rare. *D. magna* is most commonly used species in aquatic toxicity testing because of many characters that make it easy and economical to culture it in the laboratory. It is relatively small but bigger than other daphnids, thus manipulation with it is easy. It has short life cycle, high fecundity, and parthenogenetic reproduction. On the other hand in a few comparative studies *D. magna* tended to be less sensitive to toxic substances than other cladocerans, and this may be due in part to life-history and size differences [51,52]. *Daphnids* are integral part of water biocenosis and food chain; this is the reason why their using in ecotoxicity testing is important. There exist many national and international standard methods which use this organism for acute or chronic ecotoxicity assessment [53-59].

Alternative small scale method Daphtoxkit F<sup>TM</sup> (purchased from MicroBioTests Inc., Gent, Belgium) for the determination of EC50 value was used for our purposes. The Standard Operational Procedure of the Daphtoxkit F<sup>TM</sup> is in accordance with the OECD and ISO test protocols for the acute *Daphnia magna* toxicity tests [54,55]. Standard Freshwater was prepared with the concentrated salt solutions included in the kit. This medium, which has the composition recommended by the ISO for acute toxicity tests with *D. magna*, is used as a hatching medium and as a dilution medium for the preparation of the toxicant dilution series. Because of low water solubility of tested substances DMSO as solvent for preparation of 100 mg.L<sup>-1</sup> stock solutions of tested compounds was used. Maximal concentration of DMSO used for dilution series preparation in tests was 3 %. This concentration doesn't exhibit any negative influence on testing organisms in control group. *Ephippia* were hatched in Petri dishes with Standard Freshwater (ISO) medium three days before test at temperature 20 - 22 °C under continuous illumination of 6 000 lux. Pre-feeding of neonate with suspension of spirulina powder was done two hours before the test to prove them energetic reserve. *Daphnids* (aged less than 24 hours) were exposed to dilution series of tested compounds in preliminary and final tests. Experiments were conducted at temperature 20 °C in darkness incubator. After 24 and 48 h the endpoint - immobility was observed. The values of 24hEC50 and 48hEC50 were calculated by probit analysis. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceeded 10 %.

### 3.1.2. *Thamnocephalus platyurus* - acute toxicity test

Ecotoxicological evaluation of selected musk substances was done also via freshwater crustaceans *Thamnocephalus platyurus*. It refers to class *Branchiopoda* orders Anostraca, originated from North America. For calculation value of 24LC50 alternative test Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> was used (purchased from MicroBioTests Inc., Gent, Belgium). The *T. platyurus* assay has already been incorporated in some countries in regional or national regulations for toxicity testing but requests have also been formulated from various sides to propose this micro-biotest to “international” organisations for endorsement as a “standard toxicity test”, for specific applications in a regulatory framework. On the base of proposal to the International Standardisation Organisation (ISO) for consideration the *T. platyurus* micro-biotest as a new ISO standard ecotoxicological test committee draft ISO/CD 14380 was in 2010 prepared. This test is often used to toxicity assessing in freshwater, waste water and determination of acute toxicity of chemicals [60-62]. Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> is similar to Daphtoxkit F<sup>TM</sup> - it also contains all the materials to perform six complete acute (24-hour) toxicity tests (range-finding or definitive) based on mortality of testing organisms. Larvae of the fairy shrimp *T. platyurus* hatched from cysts are used. The test procedure followed the Standard Operational Procedure manual of the Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> micro-biotest. Standard freshwater was prepared by diluting of the concentrated salt solutions included in the kit to obtain 1 L of medium, which served for hatching of the cysts and for preparation of the toxicant dilution series. In case of organisms *T. platyurus* acetone as solvent for preparation of 100 mg.L<sup>-1</sup> stock solution of tested compounds was used. Maximal concentration of acetone used for dilution series preparation in tests was 3 %, which have no negative effect on testing organisms in control group. Before testing the eggs of *T. platyurus* were hatched 24 hours at a temperature of 25 °C under continuous illumination at 4 000 lux. The assays were carried out in the multiwell test plates provided in the kits in the darkness at temperature of 25 °C. Larvae were exposed to dilution series of tested compounds in preliminary and final tests. Lethality (endpoint for effect calculation) was observed after 24 h. The values of 24hLC50 were calculated by probit analysis. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceed 10 %.

### 3.2. Ecotoxicity of linear musk compounds

In our study four selected synthetic linear musk compounds were evaluated via alternative ecotoxicity tests on freshwater crustaceans *T. platyurus* and *D. magna*: Arocet (2-*tert*-butylcyclohexylacetate, Aroflorone (4-*tert*-amylcyclohexanone), Lilial [3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methylpropanal] and Linalool (3,7-dimethylocta-1,6-diene-3-ol). All substances were obtained from their producer Aroma Praha Company Ltd. Information on the occurrence of these substances in waste water and surface water as well as information concerning their ecotoxicity is absent in scientific literature. Material safety data sheet (MSDS), if available, gives only data concerning their toxicity. The Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals (GHS) describes testing for hazards to the aquatic environment in Part 4, Chapter 4.1 [47]. The purpose of obtaining aquatic toxicity data for chemicals

is to classify them to their acute or chronic toxicity in the hazard classification in different classes. Ecotoxicological values obtained on the most sensitive of testing organisms (fish, crustacean algae or other aquatic plant) in acute toxicity tests serve to classification in three acute classification categories; ecotoxicological value < 1 mg.L<sup>-1</sup>, (class I-very toxic to aquatic organisms); 1 - 10 mg.L<sup>-1</sup> (class II-toxic to aquatic organisms); 10 - 100 mg.L<sup>-1</sup> (class III-harmful to aquatic organisms). Substances with value EC50 above 100 mg.L<sup>-1</sup> would not be classified. Results obtained in test of acute toxicity on *D. magna* and *T. platyurus* are summarized in Table 8. To compare toxicity of linear musk compounds with other musks in Table 9 are summarized results obtained in our laboratory on the same testing organisms via the same testing procedure [38].

Tested compounds	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Daphnia magna</i>	
	24hLC50 [mg.L <sup>-1</sup> ]	24EC50 [mg.L <sup>-1</sup> ]	48EC50[mg.L <sup>-1</sup> ]
Lilial	11.98	4.4	2.13
Arocet	54.52	63.68	40.23
Arofloron	68.34	53.63	40.42
Linalool	53.94	156.26	124.59

**Table 8.** Results of acute toxicity tests of linear musks on *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*.

Group	Compound	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Daphnia magna</i>	
		24h LC50 [mg.L <sup>-1</sup> ]	24h EC50 [mg.L <sup>-1</sup> ]	48h EC50 [mg.L <sup>-1</sup> ]
Nitromusks	Musk xylene	6.15	2.39	2.22
	Musk ketone	6.14	2.33	2.13
Polycyclic musks	Galaxolide (HHCB)	1.14	1.22	1.12
	Tonalide (AHTN)	1.58	1.51	1.33

**Table 9.** Results of acute toxicity tests of nitromusks and polycyclic musks on *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*.

From compounds tested in our study lilial was found as the most toxic to testing organisms. Although we have ecotoxicological values only on one organism defined for chemicals water ecotoxicity assessment, on the base of 48EC50 values obtained for *D. magna* we could try to classify them as follows: all substances except linalool and lilial were harmful to aquatic organisms (class-III). Lilial was found to be toxic to aquatic organisms (class-II). From results obtained on a limited number of species it seems that linalool is not hazardous to aquatic environment. In comparison with results obtained in our similar study on the same testing organism for polycyclic and nitro musk (see Table 9) we can conclude that linear

musk compounds are more friendly to the environment than polycyclic and nitro musks. The 48EC50 values for tonalide, galaxolide, musk ketone and musk xylene on *D. magna* were 1.33 mg.L<sup>-1</sup>, 1.12 mg.L<sup>-1</sup>, 2.13 mg.L<sup>-1</sup> and 2.22 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. In this case they could be classified as toxic to aquatic organisms (II-class). As seems the linear musk compounds (exception lilial) are in our case in the order of ten times less toxic to the testing organism *T. platyurus* and *D. magna* than polycyclic and nitro musks. As mentioned above this finding is very positive in view of prevention of environmental pollution because the production of linear musk compounds in the Czech Republic is on the rise and replaces the use polycyclic and nitro musk compounds. Equally important is the finding that the concentration at the outlet of the WWTP was mostly below the detection limit as in this article published. Exception is only lilial, but its levels detected at the WWTP outflow (mean value 0.047 µg.L<sup>-1</sup>, see Table 7), are much lower than in our case the value of 24LC50 found in our experiments.

#### 4. Conclusions

As a consequence of increasing living standard of mankind the environment is loaded with increasing number of various chemicals. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) belong to the group with increasing use, but these compounds also attract increasing interest as new or emerging environmental contaminants. Negative effects of these compounds or formulations are caused not only by parent compounds, but also their degradation or transformation products could show in some cases even stronger negative effects than their precursors.

This study was focused on three groups of chemicals belonging to PPCPs: non-steroid anti-inflammatory drugs, which are used widely, macrolide antibiotics which gain wider importance due to their therapeutical properties, and linear musk compounds which represent the most modern synthetic fragrances with great perspectives. The levels of these compounds at the inflow and outflow of waste water in municipal waste water treatment plant in Brno-Modřice were determined. From the group of non-steroid anti-inflammatory drugs ibuprofen was the compound with the highest concentration in the raw waste water reaching more than 40 µg.L<sup>-1</sup>, followed by salicylic acid and ketoprofen. The removal efficiency of the cleaning process was found to be very good for all compounds under study with the exception of naproxen – its removal efficiency was 78 %, in all other cases it was better than 90 %.

The levels of macrolide antibiotics (erythromycin, clarithromycin and roxithromycin) were found to be very low in raw waste water (in several samples erythromycin and roxithromycin were found in sub- µg.L<sup>-1</sup>, their levels in cleaned waste water were below the limits of detection of used analytical procedure. It could be stated that these compounds due to low concentrations don't represent any serious risk for the receiving water.

The concentrations of linear musks produced in the Czech Republic in the raw waste water ranged from tens of µg.L<sup>-1</sup> for linalool, units of µg.L<sup>-1</sup> for aroacet and aroflorone to sub- µg.L<sup>-1</sup> levels for lilial and isoamylacetate. Removal efficiencies were in common better than 99.5 % with exception of lilial with average removal efficiency of 88.7 %. The last compound also



exhibited the highest ecotoxicity from all tested linear musk compounds with 24EC50 value 4.4 mg.L<sup>-1</sup>. Nevertheless, this value significantly exceeds the concentrations found in real samples.

## Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support from the project No. FCH-S-12-4 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

## Author details

Helena Zlámalová Gargošová\*, Josef Čáslavský and Milada Vávrová

\*Address all correspondence to: [zlamalova@fch.vutbr.cz](mailto:zlamalova@fch.vutbr.cz)

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Brno, Czech Republic

## References

- [1] UN- United Nations. (1992). Report of the United Nations Conference on Environment and Development. Resolutions Adopted by the Conference. A/CONF.1/26/Rev. 1, United Nations, 3-14 June, Rio de Janeiro; CONF.151/26/Rev.1(Report), 1.
- [2] Directive 2000/60/EC of European Parliament and of the Council of 23 October. (2000). establishing a framework for Community action in the field of water policy. 2000/60 (Directives).
- [3] Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- [4] Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK, editors. *Aquatic toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* 1st ed. Boca Raton Lewis Publishers, CRC press, 87-206.
- [5] Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(1), 113-130.
- [6] Pascoe, D., Karntanut, W., & Muller, C. T. (2003). Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 51(6), 521-528.



- [7] Krahn, M. M, Hanson, M. B, Schorr, G. S, Emmons, C. K, Burrows, D. G, Bolton, J. L, et al. (2009). Effects of age, sex and reproductive status on persistent organic pollutant concentrations in "Southern Resident" killerwhales. *Marine Pollution Bulletin*, 58(10), 1522-1529.
- [8] Tapaneeyakul, N. (2008). Perspective of Ecotoxicological Conduction for Water Quality. *Monitoring in Thailand. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry- Biological Responses to Chemical Pollutants. 1<sup>st</sup> ed.*, Thailand, TERRAPUB, 31-35.
- [9] Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. Article 1. Published March 31, 2004. Accessed 17 August 2008. 2004
- [10] Halling-Sorensen, B., Nielsen, S., Lanzky, P., Ingerslev, F., Lutzhoft, H., & Jorgensen, S. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-394.
- [11] Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 753.
- [12] Gomez, M., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A., & Barcelo, D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224-233.
- [13] Ramirez, A. J., Mottaleb, M. A., Brooks, B W., & Chambliss, C K.. (2007). Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(8), 3155-3163.
- [14] Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of Total Environment*, 225, 1-2, 109-118.
- [15] Lacina, P. (2012). Application of gas chromatography with mass spectrometric detection for the assessment of drug-residue contamination of wastewaters and surface waters. *PhD thesis. Faculty of Chemistry, Brno University of Technology*.
- [16] Waksman, S. A. (1947). What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*, 39(5), 565-569.
- [17] Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, 41(18), 4164-4176.
- [18] Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of Total Environment*, 407(8), 2711-2723.

- [19] Lilly, E., Bunch, R. L., & McGuire, J. M. Erythromycin, its salts, and method of preparation. *U.S.A. patent 2,653,899*.
- [20] Dang, V., Nandan, N., Cooper, T. W., Greenfield, R. A., & Bronze, M. S. (2007). Part VII. Macrolides, azalides, ketolides, lincosamides, and streptogramins. *Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 100(3), 75-81.
- [21] Luckenbach, T., & Epel, D. (2005). Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environmental Health Perspectives*, 113(1), 17-24.
- [22] Schramm, K., Kaune, A., Beck, B., Thumm, W., Behechti, A., Kettrup, A., et al. (1996). Acute toxicities of five nitromusk compounds in *Daphnia*, algae and photoluminescent bacteria. *Water Research*, 30(10), 2247-2250.
- [23] Sousa, J. V., & Suprenant, D. C. (1984). Acute Toxicity of 1618.02 (musk xylene) to Bluegill (*Lepomis macrochirus*). Report #BW-84-2-1549.
- [24] Tas, J., Balk, F., Ford, R., & van de Plassche, E. (1997). Environmental risk assessment of musk ketone and musk xylene in the Netherlands in accordance with the EU-TGD. *Chemosphere*, 35(12), 2973-3002.
- [25] Daughton, C., & Ternes, T. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107, 907-938.
- [26] Salvito, D. (2005). Synthetic musk compounds and effects on human health? *Environmental Health Perspectives*, 113(12), A802-A803.
- [27] Sommer, C. (2004). The role of musk and musk compounds in the fragrance industry. Rimkus GG, editor, *Synthetic musk fragrances in the environment* (1st ed.), Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1-16.
- [28] Tanabe, S. (2005). Synthetic musks - arising new environmental menace? *Marine Pollution Bulletin*, 50(10), 1025-1026.
- [29] Dietrich, D. R., & Chou, Y. (2001). Ecotoxicology of musks. Daughton CG, Jones-Lepp TL, editors. *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*: American Chemical Society, 156-167.
- [30] Ruzicka, L. (1926). Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes I. Über die Konstitution des Zibetons. *Helv Chim Acta*, 9, 230-248.
- [31] Ruzicka, L. (1926). Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes VII. Über die Konstitution des Muscons. *Helv Chim Acta*, 9, 715-729.
- [32] Kraft, P. (2004). 'Brain aided' musk design. *Chemical Biodiversity*, 1(12), 1957-1974.
- [33] Eh, M. (2004). New alicyclic musks: The fourth generation of musk odorants. *Chemical Biodiversity*, 1(12), 1975-1984.

- [34] Schroeder, H. F., Tambosi, J. L., Sena, R. F., Moreira, R. F. P. M., Jose, H. J., & Pinnekamp, J. (2012). The removal and degradation of pharmaceutical compounds during membrane bioreactor treatment. *Water Science and Technology*, 65(5), 833-839.
- [35] Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Wert, E. C., & Yoon, J. (2007). Removal of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Desalination*, 16 -23 .
- [36] Narvaez, J. F. V., & Jimenez, C. C. (2012). Pharmaceutical Products in the Environment: Sources, Effects and Risks. *Vitae Revista De La Facultad De Quimica Farmaceutica*, 19(1), 93-108.
- [37] Kim, J. W., Jang, H. S., Kim, J. G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., et al. (2009). Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung river South Korea. *Journal of Health Science*, 55(2), 249-258.
- [38] Zlámalová Gargošová, H., Vávrová, M., Doležalová Weissmannová, H., Mravcová, L., Vydrová, L., & Zouhar, L. (2011). Waste Water Quality Monitoring: The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater. In: Einschlag FSG, editor, *Waste Water Evaluation and Management*, 3-30.
- [39] Twardowska, I. (2004). Ecotoxicology, environmental safety, and sustainable development- challenges of the third millennium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1), 3-6.
- [40] Hoffman, D., Rattner, B. A., Burton Jr, G. A., & Cairns, J., Jr. (2003). Handbook of ecotoxicology. 2<sup>nd</sup> ed., Boca Raton, Lewis Publishers.
- [41] US EPA ECOTOX database. (2007). <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>.
- [42] Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., & Herve, S. (2004). Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 263-272.
- [43] OSPAR-PRAM. (2000). Whole Effluent Assessment within the Framework of OSPAR, PRAM 00/5/5-E. 2000 *Pram 00/5/5-E(OSPAR-PRAM)*.
- [44] Mendonca, E., Picado, A., Paixao, S. M., Silva, L., Cunha, M. A., Leitao, S., et al. (2009). Ecotoxicity test in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of Hazardous Materials*, 665 -670.
- [45] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. 2006;1907/2006(REACH).

- [46] Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH). 2008;440/2008(REACH).
- [47] Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals (GHS). (2011). Annex 8, Guidance on hazards to the aquatic environment. 4 st edition([http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/04files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html)).
- [48] Commission Regulation (EC) No 761/2009 of 23 July 2009 amending, for the purpose of its adaptation to technical progress, regulation (EC) No 440/2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registrarion, Evaluation, Autorization and Restriction of Chemicals (REACH). 2009;761/2009(REACH).
- [49] Regulation (EC) no 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. 2008.
- [50] ISO/TS 20281. (2006). Water quality- Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data.
- [51] Enserink, L., de la Haye, M., & Maas, H. (1993). Reproductive strategy of *Daphnia magna*: Implications for chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 25(1-2), 111.
- [52] Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90(2), 263-267.
- [53] ASTM. (2000). Standard Guide for Conducting Three-Brood, Renewal Toxicity Test with *Ceriodaphnia dubia*, Method E 1295-89. *Annual Book of ASTM Standards*, 11.05, ASTM, Philadelphia, PA.
- [54] ISO 6341. (1996). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Edition 3, (monolingual), 9.
- [55] OECD. (2004). Guidelines for the testing of Chemicals/Section 2: Effects on Biotic Systems: Test 202 *Daphnia* sp. *Acute Immobilisation Test*, OECD Code: 979920201E1, OECD Publishing.
- [56] OECD. (1998). Guideline for the Testing of Chemicals. *Daphnia magna* Reproduction Test 211. OECD, Paris, France.
- [57] ASTM. (2000). Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests, Method E 1193-97. *Annual Book of ASTM Standards*, 11.05, AST, Philadelphia, PA.
- [58] U.S. EPA. (1996). Daphnid chronic toxicity test. Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.1300. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, OC*.

- [59] ISO. (2000). Water Quality. Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). *International Standard ISO, 10706*, Geneva, Switzerland.
- [60] Palma, P., Alvarenga, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R. M., Soares, A., et al. (2010). Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 703-716.
- [61] Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., & Barbosa, I. R. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, 81(5), 485-489.
- [62] Daniel, M., Sharpe, A., Driver, J., Knight, A., Keenan, P., Walmsley, R., et al. (2004). Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(11), 855-865.

# Příloha A3:

HŘIBOVÁ, Š.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M. Ecotoxicological Evaluation of Fire Fighting Foams. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2014, vol. 2014 (23.), no. 12, p. 3029-3035. ISSN: 1018- 4619.

# ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF FIRE FIGHTING FOAMS

Šárka Hřibová<sup>1</sup>, Helena Zlámalová Gargošová<sup>1,\*</sup> and Milada Vávrová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

Presented at the 17<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region (MESAEP), September 28 - October 01, 2013, Istanbul, Turkey

## ABSTRACT

Surfactants form a group of daily-used substances that have become a part of our life. For their advantageous properties they are used as the main components of foam extinguishing agents, which are applied in fighting with widespread fires.

The main aim of our study was the evaluation of ecotoxicological influence of the most used foam extinguishing agents (FEAs) concentrates which are often applied in fire cases by Fire Rescue Unit in South Moravian region, Czech Republic. Following preparations were selected: Sthamex F-15, Finiflam F-15, Expyrol F-15, Mousol-APS F-15 and Pyrocool B.

In this study the working solutions of selected agents at their effective concentrations (3 – 5%) were tested. To predict their ecotoxicity for aquatic ecosystems the ecotoxicological tests in aquatic arrangement using animal organisms *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna* and plant organism *Lemna minor* and *Sinapis alba* were conducted.

Subsequently the leachates of soil contaminated by firefighting agents were evaluated via the same organisms with the aim to assess possible influence of soil sorption complex on ecotoxicity reduction. Ecotoxicological tests in contact arrangement using animal organism - earthworm *Eisenia fetida*, and plant organism - lettuce seeds *Lactuca sativa* were also conducted to predict the ecotoxic effect of FEAs on terrestrial organisms and possible influence of biodegradability on ecotoxicity reduction.

The results of ecotoxicological tests in aquatic as well as in contact arrangement should arouse attention because the fire-fighting agents exhibit high ecotoxicity. Mousol-APS F-15 was assessed as the least toxic agent, although its toxicity is still considerable. The influence of soil sorption complex and biodegradation processes on FEAs ecotoxicity reduction was observed. On the base of obtained results, this study points out the need of ecotoxicological testing of foam extinguishing agents and highlights the lack of legislative measures.

## KEYWORDS:

ecotoxicity, fire-fighting foams, surfactants, water leachates.

## 1. INTRODUCTION

Surfactants have become widely used substances in all industrial branches over the world, including the field of fire protection. Usually they are used as stabilizing and wetting agents in fire-fighting foam concentrates because of their useful properties. Thus the extinguishing foams are mixtures of water, surfactants, solvents and other additives.

In fact, uncontrolled fires represent significant risk for living organisms, nature ecosystems and also significant threat of material. Due to this fact issue of fire prevention and fire extinguishing has a high priority. In the fight against fires air-mechanical extinguishing foams are often used, which are available in several basic modifications, i.e. protein foam agents, synthetic foam agents and alcohol-resistant foam agents. All these agents help us to inhibit and extinguish spacious fires, but after their application they simultaneously contaminate the environment [1].

Surfactants contained in extinguishing agents are surface active substances, which have amphoter character. This special property causes foaming of water, higher oxygen demand, water toxicity and emulsifying of fats. Penetration of these substances into the environment causes water and soil contamination and disruption of waste water treatment processes. It results in significant acute toxicity of contaminated matrices and in transfer of pollution to the other environmental compartments. In the soil environment the sorption of various constituents of fire-fighting foams on soil particles can take place and this could lead to the reduction of acute toxicity for aquatic ecosystem, but on the other hand it could increase of acute toxicity for soil organisms [2].

Current legislative measures are focused only on surfactants in detergents, but they are overlooked in fire-fighting foam concentrates. The objective of this study was the ecotoxicity evaluation of selected fire-fighting foams via ecotoxicological tests in aquatic as well as in contact arrangements and the assessment of their influence on the environment. Effect of soil sorption complex on ecotoxicity reduction of tested agents was also evaluated.

\* Corresponding author



TABLE 1 - The overview of ecotoxicologically evaluated extinguishing agents.

Commercial designation	Extinguishing foam type	Concentration of working solution	Manufacturer
Sthamex F-15	Multipurpose foaming agent	5 %	Dr. Sthamer, Hamburg, Germany
Expyrol F-15	Synthetic foaming agent	3 %	Tyco/Safety Products, UK
Finiflam F-15	Synthetic multipurpose foaming agent	3 %	Tyco/Safety Products, UK
Moussol-APS F-15	Alcohol-resistant foaming agent	3 %	Dr. Sthamer, Hamburg, Germany
Pyrocool B	Synthetic foaming agent	3 %	Pyrocool Slovakia spol. s.r.o., Slovakia

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Tested materials

Five specific fire-fighting foam agents, namely Sthamex F-15, Expyrol F-15, Finiflam F-15, Moussol-APS F-15 and Pyrocool B were selected for ecotoxicity testing. Summary information about them is given in Table 1.

Samples of the above mentioned extinguishing agents were obtained from Fire Rescue Unit of South Moravian region in the Czech Republic. Ecotoxicity tests were conducted with working solution of mentioned agents at effective concentrations which are listed in Table 1.

### 2.2 Testing methods

For the ecotoxicological evaluation of mentioned FEAs two batteries of tests in aquatic and terrestrial arrangements were applied. The acute toxicity in water environment was assessed via test battery which included *Lemna* sp. growth inhibition test, *Sinapis alba* (white mustard) root growth inhibition test and alternative tests Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> and Daphtoxkit F<sup>TM</sup> magna.

**The Lemna test** with duckweed *Lemna minor* was performed according to the standard test ISO 20079:2005 *Lemna* sp. Growth Inhibition Test using Steinberg medium. This medium was used as culture and diluent medium. Biotests were carried out in 200 ml beakers filled with 100 ml of relevant sample solution (dilution series of tested compounds diluted in Steinberg medium). The beakers were inoculated with two to four-fronds colonies of *L. minor* with total number of 9 fronds in each beaker. Tests under condition of continuous illumination, light intensity 6 000 – 10 000 lux and temperature  $24 \pm 2^\circ$  were carried out.

Thereafter number of fronds was counted. Growth inhibition (measured as the decrease in number of fronds during 7 days of incubation as compared to a corresponding control) was recorded after 168 h. Growth inhibition as the toxicological endpoint served for calculating value of 168hIC<sub>50</sub>. The test was considered valid, if the number of fronds in control test increased eightfold [3].

***Sinapis alba* root growth inhibition test** follows Methodological guideline No. 11/2007 of the Department of Waste of The Ministry of Environment of the Czech Republic for the determination of waste ecotoxicity. Principle of the test consists in 72-hour exposure of the high quality seeds of *S. alba* to tested solution at the tempera-

ture of  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  in the darkness. Stock solutions of various salts needed for preparation of diluent medium for this testing organism were obtained as follow: (i)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  was prepared by dilution of 11.76 g in 1 000 ml volume flask. The other stock solutions were prepared in following concentrations of salt: (ii)  $4.93 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; (iii)  $2.59 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{NaHCO}_3$ ; (iv)  $0.23 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{KCl}$ . 2.5 ml from each stock solution was transferred to 1 000 ml volume flask and this one was refill to the volume of 1 000 ml in accordance methodological guideline with distilled water to obtain diluent medium. 30 high quality seeds of *S. alba* with same size and ochre colour have been deployed to each concentration of tested sample solution. Seeds were placed on filter paper in Petri-dishes, which was moistened with 6 ml of relevant sample solution. After 72 hours the lengths of hypocotyls of germinated seeds in tested and in control group were measured. The inhibition of root growth (the endpoint for effect calculation) was evaluated and value of 72hIC<sub>50</sub> - the result of the test - was calculated [4].

**Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>** is one of the alternative tests from production line of Belgian company MicroBioTests Inc. Gent, Belgium. This user-friendly test is based on the mortality of freshwater crustacean *T. platyurus* after 24-hour exposition in tested solution. The test procedure followed the *Standard Operational Procedure* of the Thamnotoxkit FT<sup>TM</sup>. The hatching of the cysts was initiated 20 – 22 hour prior to the start of the toxicity test under continuous illumination of 3 000 to 4 000 lux at  $25^\circ\text{C}$ . As dilution and hatching medium served standard freshwater, which was prepared by mixing of contents of five vials (the concentrated salt solutions included in the kit) and filling to the volume of 1 000 ml by distilled water. Medium (moderately hard reconstituted freshwater made up according to the US EPA formula) was aerated for at least 15 minutes and served for hatching the cysts and for preparation of the toxicant dilution series. The assays in the multiwell (1 ml volume per well) test plates provided in the kits were carried out. Each toxicant concentration was tested out in three replicates - ten individuals to three test wells. The test plates subsequently were incubated at  $25^\circ\text{C}$  in darkness. After 24 hours number of dead organisms was counted. The result of the assay is value of 24h LC<sub>50</sub>, which was calculated by probit analysis [5]. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceed 10 %.

**Daphtoxkit F<sup>TM</sup> magna** is another alternative toxicity assay produced by the company MicroBioTests Inc., Gent,



Belgium. The test was conducted following the *Standard Operational Procedure* of the Daphtokit F<sup>TM</sup> magna which is in accordance with the OECD and ISO test protocols for the acute *Daphnia magna* toxicity tests. Assay is based on immobilisation or mortality of cladocerans *D. magna* after 48-hour exposure to test solution. The hatching of ephippia was initiated 72 hours prior to the start of the toxicity test under continuous illumination of 6 000 lux at a temperature of 20 – 22 °C. As dilution and hatching medium Standard Freshwater (ISO) was prepared by mixing of contents of four vials, which are constituent part of the kit, and filling it to volume 1 000 ml by distilled water, followed by 15 minute aeration and preparing dilution series. Subsequently daphnids aged less than 24 hours were exposed to the dilution series of tested compounds. 20 individuals were subdivided in four replicates for every concentration and control group of multiwell plate (well volume is 10 ml). At the end the multiwell plate with a strip of parafilm was sealed and covered with lid. Experiments were conducted at temperature 20 °C in darkness incubator. After 24 and 48 hours number of immobilised organisms was counted. Values of 24hEC50 and 48hEC50 are the results of the assay. The test was considered valid if the number of dead organisms in the control did not exceed 10 % [6].

For the evaluation of soil sorption complex influence on the ecotoxicity change of tested agents, leachates of soil artificially contaminated with FEAs via the same testing organisms were tested. Standard European soil - Lufa 2.3 as standard matrix was selected. The contamination of LUF 2.3 with working solutions of selected agents about effective concentration was performed as follows: known amount of LUF 2.3 was saturated to 70 % of its water holding capacity (WHC). Aqueous leachates prepared in accordance to Methodological guideline of Department of Waste on the determination of leaching of wastes (by 24-hour shaking in the end-over-end shaker of sample - standard soil contaminated with FEA with distilled water in ratio 1:9 – solids/distilled water and subsequent filtration) was tested. Leaching under speed 5 to 10 RPM for 24 hours was performed. 15 minute sedimentation and filtration through filter paper with of pores 5 µm followed [7]. Basic characteristics of individual leachates are shown in Table 2.

**TABLE 2 - Basic characteristics of soil contaminated by individual foaming agents**

Contaminant	pH	κ (µS.cm <sup>-1</sup> )
Sthamex F-15	6.71	351.0
Moussol-APS F-15	6.93	175.5
Finiflam F-15	7.24	278.0
Expyrol F-15	7.45	331.0
Pyrocool B	6.61	282.0

The acute toxicity in soil was assessed by test battery which included Screening test of germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) and Test of escape behaviour with earthworms (*Eisenia fetida*).

**Screening test of germination of lettuce seeds (*L. sativa*)** was performed in accordance with ISO 17126:2005. Lettuce seeds were left for germination on filter paper moistened with distilled water for 22 - 24 hours under laboratory temperature in darkness. Thereafter 15 germinated seeds were deployed into vessel with 400 g of contaminated soil which was prepared by saturation of foaming agent to 70 % of WHC value. These were incubated under dark conditions and temperature 24 °C for 120 ± 2 hours. At the end of the test seedlings were taken out from contaminated soil and length of their roots was measured. As the result of the assay the value of percentage inhibition was determined and Dunnett's *t*-test was applied to decide if statistically significant difference between control test and tested sample exists (ecotoxicity yes or not) [8]. Screening test with the contaminated soil after 14-day deposition under different condition (light, irrigation/dark, no irrigation) was repeated to assess if biodegradation processes have influence on resulting ecotoxicity.

**Test of escape behaviour with earthworms (*E. fetida*)** follows ISO 17512-1:2008 and uses terrestrial organism earthworm *E. fetida* for quick assessment of contaminated soil effects. The test was performed in two-chamber design. Identical amounts of standard artificial soil about 250 g were weighed to each chamber severed by inert bulkhead. One part of soil was saturated by distilled water to 70 % of WHC value and the second one by work solution of tested foaming agent. Thereafter the bulkhead was removed and 10 adult organisms with weight about 300 ± 10 mg were inserted on the borderline of two different soil. Testing vessels were covered up by the parafilm and placed to air-conditioned space at temperature 24 °C and permanent lighting regime with light intensity 6 000 lux for 48 hours. After 48 hours the number of organisms in each part of soil was counted. The rate of escape behaviour in percentages was determined as result of the test [9].

## RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Tests of Ecotoxicity in Aquatic Arrangement

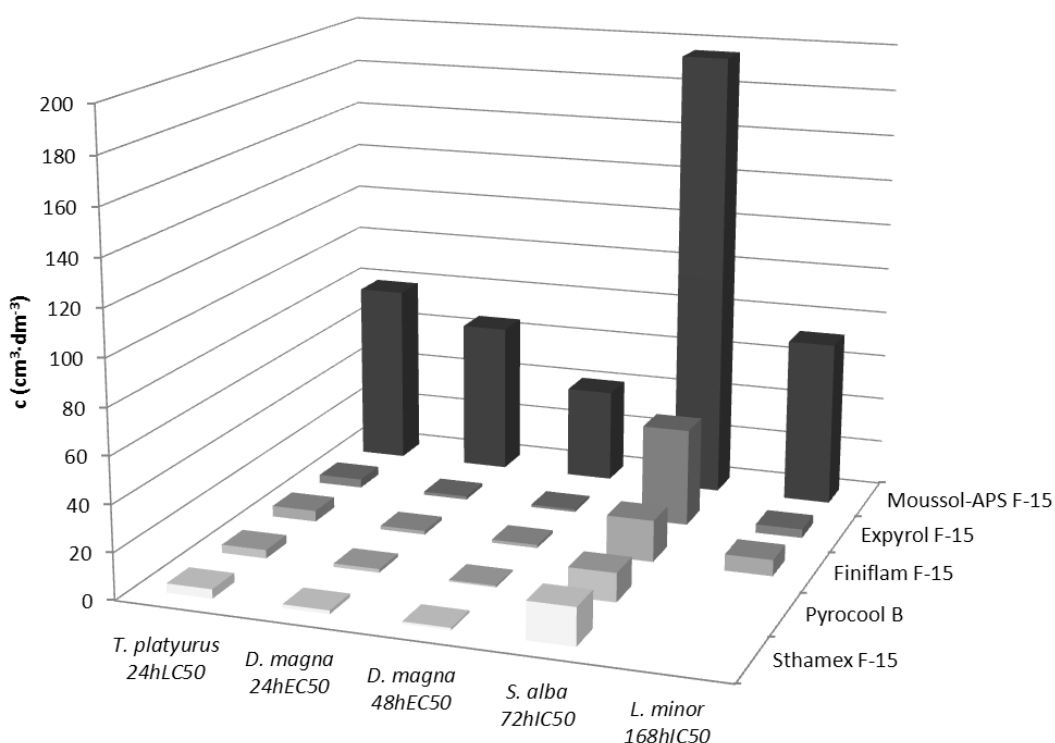
The results of ecotoxicity tests performed in aquatic arrangement provide information about effects of FEAs on aquatic organisms after releasing into aquatic environment. Ecotoxicological values calculated on the base of results obtained by evaluation of mentioned ecotoxicology tests in aquatic arrangement are presented in Table 3. These results indicate high ecotoxicity during acute exposure of aquatic organisms.

Moussol-APS F-15 was conclusively determined as the least ecotoxic from all tested FEAs for all testing organisms. Ecotoxicological effects of other FEAs are quite comparable. All obtained results predict high risk for aquatic ecosystems. All aquatic organisms exhibit similar sensitivity to all FEAs. *S. alba* has been found as the least sensitive organisms in aquatic arrangement toxicity testing but it is in fact terrestrial plant organism. Figure 1 shows com-

**TABLE 3 - Ecotoxicological values [ $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ ] calculated on the base of results of ecotoxicity tests conducted in aquatic arrangement**

Ecotoxicological values/ testing organism	Sthamex F-15	Moussol-APS F-15	Finiflam F-15	Expyrol F-15	Pyrocool B
24hLC50 <i>T. platyurus</i>	3.93	78.88	4.79	3.74	3.65
24hEC50 <i>D. magna</i>	1.54	65.80	1.61	1.44	1.52
48hEC50 <i>D. magna</i>	0.96	40.62	1.37	1.09	0.68
168hIC50 <i>L. minor</i>	n. p.	72.08	7.01	3.80	n. p.
72hIC50 <i>S. alba</i>	16.05	195.53	17.95	42.32	12.39

n. p. – not performed


**FIGURE 1 - Graphical comparison of FEAs ecotoxicity and testing organisms sensitivity**

parison of FEA ecotoxicity and comparison of testing organisms sensitivity.

### 3.2 Influence of soil sorption complex on ecotoxicity change

During evaluation of soil sorption complex influence, noticeable ecotoxicity decrease was found.

The comparison of results of Thamnotokit F<sup>TM</sup> ecotoxicity test performed with working solutions of mentioned agents at effective concentrations and subsequently with leachates of soil contaminated by firefighting agents is shown on Figure 2.

Effective concentrations determined for water leachates are distinctly higher, which means that ecotoxicity is several fold lower. For leachates of Sthamex F-15 and

Finiflam F-15 no ecotoxicity was observed. This fact predicts appreciable soil sorption complex influence on ecotoxicity reduction.

### 3.3. Ecotoxicity tests in contact arrangement

The results of ecotoxicity tests in contact arrangement provide information about direct ecotoxicological influence of FEAs after their releasing into soil environment and after acute exposure of organisms. Obtained results are consistent with results of tests in aquatic arrangement. Even in this case, the acute toxicity of FEAs is quite high. Concrete results obtained by evaluation of contact ecotoxicity tests are presented in Figure 3 and Figure 4.

Figure 3 shows root growth inhibition of *L. sativa* in freshly contaminated soil with FEAs in comparison with

inhibition effects two weeks after FEAs deposition; during this period different specific conditions (i.e. light, irrigation, laboratory temperature/dark, no irrigation, cold) were applied. Moussol-APS F-15 was determined as the least ecotoxic FEAs from all tested agents again. These

results predict high risk even for terrestrial ecosystems, because inhibition effect is significant. Positive finding is the fact that soil deposition resulted in lower ecotoxicity effects. As the chart 3 shows, the ecotoxicity is lower in soil after deposition (dark/light conditions)

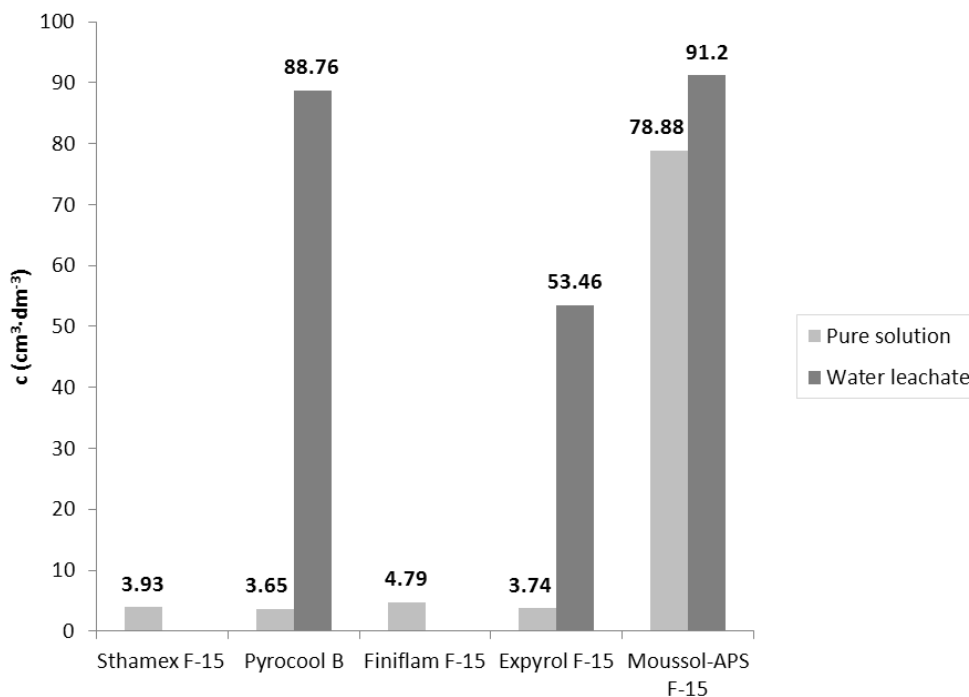


FIGURE 2 - Graphical comparison ecotoxicity of FEAs (working solution) and leachates from contaminated soil (Water leachate).

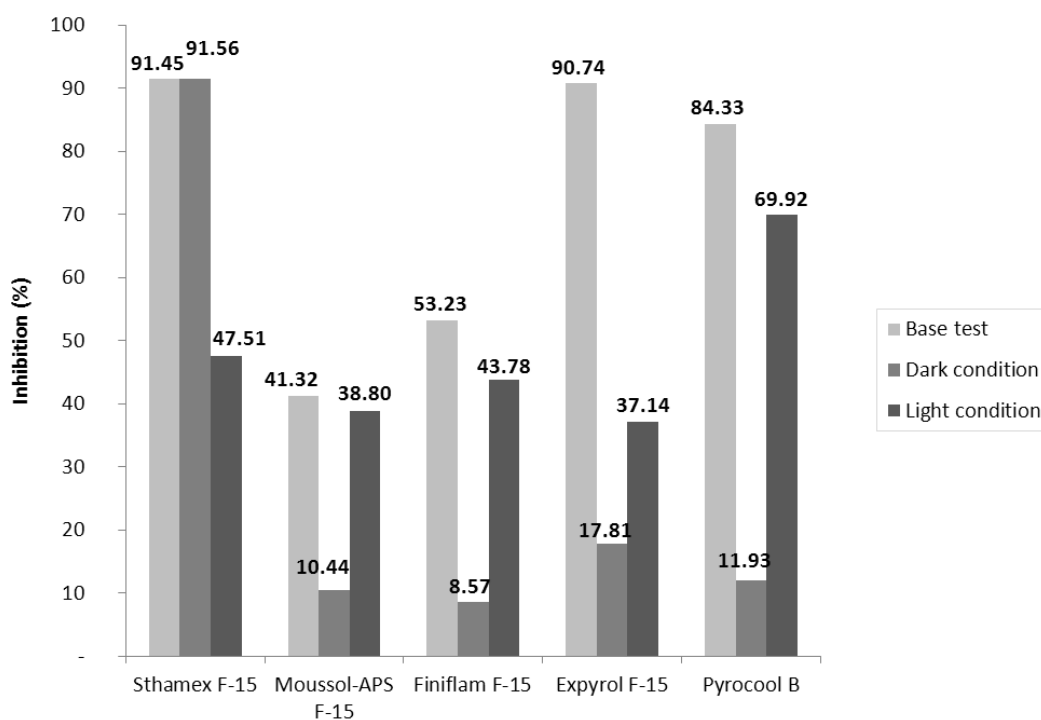


FIGURE 3 - Results of Screening test of lettuce seeds (*L. sativa*) germination under standard conditions in comparison with results on contaminated soil stored under various conditions.

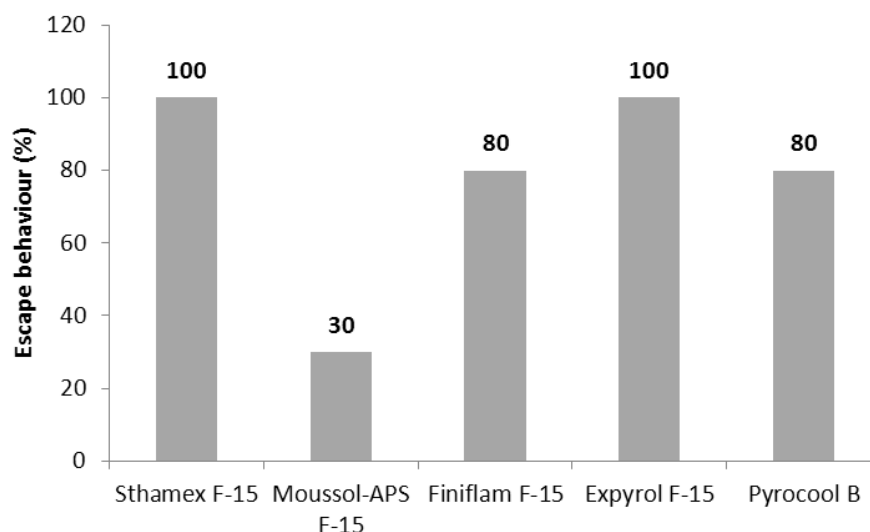


FIGURE 4 - Results of Test of escape behaviour with earthworms *Eisenia fetida* performed in soil contaminated with FEAs.

than in freshly (base test) contaminated one. The positive influence of degradation processes on ecotoxicity reduction is demonstrated wherein the temperature and light play an important role.

This fact is in accordance with published information about biodegradability of surface active agents. For example, the Polish study published in 2012 deals with various tendencies of different types of fire-fighting foams to biodegradation. Results of this study indicate the dependence between composition of FEAs and their ability to biodegradation [10].

The main idea of our study is the assumption that the most problematic components of fire-fighting foams are surfactants. Unfortunately, FEAs producers don't publish information about mentioned agents' composition, so we cannot confidently confirm this assumption.

Figure 4 presents the results of Tests of escape behaviour with earthworm *E. fetida*. The results of this test agree with those of other tests. Again in this case the Moussol-APS F-15 is the least toxic agent. On the other hand in the experiments with Sthamex F-15 and Expyrol F-15 full escape was observed, which again demonstrates the high toxicity of these products.

#### 4. CONCLUSIONS

Our study was focused on the ecotoxicological evaluation of fire-fighting foam concentrates. For this purpose commonly available and frequently used foam concentrates Sthamex F-15, Expyrol F-15, Finiflam F-15, Moussol-APS F-15 and Pyrocool B were selected.

Obtained results from tests in aquatic and contact arrangement give evidence about high ecotoxicity caused by acute exposition of organisms to the tested substances.

Although the Moussol-APS F-15 was evaluated as the least ecotoxic agent, its ecotoxicity is still very high and predicts significant environmental risk for living organisms. The influence of soil sorption complex on FEAs ecotoxicity reduction was proved on the basis of results obtained via ecotoxicity tests conducted with water-leachate of artificially contaminated soil. It is positive for organisms of aquatic ecosystem where ecotoxicity is decreasing at the expense of terrestrial ecosystem where the ecotoxicity is conversely increasing. This fact was confirmed by the results of ecotoxicity tests in contact arrangement.

The influence of biodegradation processes on ecotoxicity reduction has been demonstrated through the results of screening tests of germination of lettuce seeds conducted after contaminated soil storage under different conditions. It means that biodegradation processes have a positive influence with the meaning of environmental risks decrease. Results of our study give a suggestive direction of next research both in FEAs ecotoxicity assessment and influence of soil sorption complex together with biodegradation processes on the ecotoxicity reduction.

It is important because of current legislation deals with surfactants themselves and their mixtures in detergents but neglects them in the mixtures of fire-fighting foaming agents.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the grant no. FCH-S-13-2087 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

*The authors have declared no conflict of interest.*

## REFERENCES

- [1] Adams R., Simmons D. (1999) Ecological effects of fire-fighting foams and retardants: a summary. *Australian Forestry* **62**, 307–314.
- [2] Moody, C.A., Field, J.A. (2000). Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3864–3869.
- [3] ISO 20079 (2005) Water quality - Determination of toxic effect of water constituents and waste to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test
- [4] Methodological guideline of Department of Waste to determine the ecotoxicity of waste, Bulletin of the Ministry of Environment of the Czech Republic, part 4, April 2007
- [5] Thamnotokit F. (1995). Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel: Deinze, Belgium.
- [6] Daphtokit F magna. (1996). Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel: Deinze, Belgium.
- [7] Methodological guideline of Department of Waste on the determination of leaching of wastes, Bulletin of the Ministry of Environment of the Czech Republic, part 9, September 1998
- [8] ISO 17126 (2005) Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.)
- [9] ISO 17512-1 (2008) Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia Andrei*)
- [10] Król, B., Prochaska, K., Chrzanowski, L. (2012). Biodegradability of firefighting foams. *Fire Technology*. **48**, (2), 173-181.

---

**Received:** June 05, 2014

**Accepted:** June 13, 2014

## CORRESPONDING AUTHOR

**Helena Zlamalova Gargosova**

Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection

Faculty of Chemistry

Brno University of Technology

Purkynova 118

612 00 Brno

CZECH REPUBLIC

E-mail: zlamalova@fch.vutbr.cz

# Příloha A4:

HŘIBOVÁ, Š.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M. Sorption ability of the soil and its impact on environmental contamination. *Interdisciplinary Toxicology*, 2015, vol. [7], no. 4, p. 177-183. ISSN: 1337- 9569.

## ORIGINAL ARTICLE

# Sorption ability of the soil and its impact on environmental contamination

Šárka HŘIBOVÁ, Helena ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, Milada VÁVROVÁ

Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

ITX070414A01 • Received: 14 September 2014 • Revised: 23 November 2014 • Accepted: 26 November 2014

## ABSTRACT

From the physical point of view, soil is a heterogenic polydisperse system. It often becomes a place of a secondary contamination during extinguishing uncontrolled areal fires in nature. Foam extinguishing agents (FEAs), used at these events, basically contain surface active substances and perfluorinated compounds. These tend to be captured in the soil matrix due to their specific properties. Contaminants could be partly flushed out with rainwater, which causes several times dilution of contamination and lower ecotoxic activity. However in the dry season, foam solution infiltrates into the bed soil without any dilution. This study deals with the direct influence of soil the sorption complex on ecotoxicity of five selected FEAs, i.e. Expyrol F 15, Finiflam F 15, Moussol APS F 15, Pyrocool B and Sthamex F 15. The substances tested were prepared in concentration of work solution and then applied on standard soil matrix LUFA 2.3. For experimental purposes, a column infiltration apparatus was designed and compiled. Filtrates were collected and then tested using the plant organisms *Sinapis alba* and *Allium cepa* L. The study compared ecotoxicologic effects of filtrates with an original work solution. Moussol APS F 15 seems to be the least ecotoxic of the FEAs tested. A direct influence of soil sorption complex onto ecotoxicity reduction was also established. This finding demonstrates the sorption ability of soil particles and ion exchange activity of the soil matrix. It is a positive finding for biota of aquatic environment, yet at the expense of those in soil.

**KEY WORDS:** soil; FEAs; infiltration; filtrate; ecotoxicity

## Introduction

Soil is the most complicated environmental compartment. It consists of solid organic and inorganic material, soil water and gas and, of course, biotic components. All three environmental compartments (water, air, soil) are linked (Vavříček & Kučera, 2014). Due to this fact, the majority of contamination comes into the soil bed. A wide range of man-made chemicals is then partly or totally captured there. It depends on the physicochemical properties of soil whether the contaminant will be captured or somehow changed. The sorption, sequestration, biodegradation, volatilization, leaching, desorption and the uptake of plant and soil organisms, which contribute to the further fate of contaminants in the soil environment. All processes mentioned act on the contamination concurrently in dependence on the nature of pollution and the soil matrix (Domene *et al.*, 2010). Contaminants

like surfactants affect biological and physical properties of soil (Koehler *et al.*, 2004).

It should be noted that the soil sorption complex affects the contaminant fate in the environment in dependence on its chemical nature. For example, mostly affected are non-polar substances bound on solid soil particles or substances with ion-exchange activity. Non-polar substances are of lipophilic nature and they can be captured in the soil bed as they are passing through it. Ion active substances can exchange ions from bonding groups and thus change their own character. All these processes can influence the bioavailability of the contaminant and also its toxic activity (Ruggiero *et al.*, 2002). In addition, hardly controllable environmental conditions, such as climate, can exert significant effects on the behavior of contamination. An example is the comparison of the dry and the rainy season (Ruggiero *et al.*, 2002).

Environmental contamination can be assessed in several ways. Risk assessment studies involve both biomonitoring and ecotoxicology testing. Basically, they are most frequently used for testing surface and ground waters and also soils. In the case of soil testing, we have two possibilities. The soil matrix can be assessed directly via contact testing using soil organisms or via water leachate testing using water organisms.

Correspondence address:

Šárka Hřibová, Ing.

Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection,  
Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,  
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno 12, Czech Republic  
TEL.: +420 541 149 435 • E-MAIL: xchribovas@fch.vutbr.cz



Contact test arrangements are simple with clear results. The direct influence of contaminated soil can be thus evaluated (Domene *et al.*, 2010; Lors *et al.*, 2011). In contrast, water leachate testing offers information about contamination dispersion, its solubility and, vice versa, about the ability of the soil to capture individual contaminants (Lors *et al.*, 2011). In the Czech Republic, water leachates have to be prepared according to standard guidelines issued by the Ministry of Environment of the Czech Republic. The manual is harmonized with ISO (2007). During leachate preparation, a ten-time dilution of contamination concentration occurs (ISO, 2007; Methodological Guideline of the Waste Department to Determine the Ecotoxicity of Waste, 2007). This step causes a particular deviation and defacement of the real fate of the contaminant. It is necessary to count with the dilution factor to obtain approximate information about ecotoxic activity. Nevertheless, it could be associated with a high error. This may be the reason why bioassays with water extracts are poorly predictive during assessment of environmental risks of soil contamination (Lors *et al.*, 2011).

This hypothesis naturally leads to the effort of designing an experiment for assessment of the influence of the soil matrix on contamination by the infiltration process.

## Materials and methods

### Soil matrix

The standard soil matrix LUFA 2.3 (LUFA Speyer Germany) was used. It is naturally occurring soil in a selected area, which is simultaneously used in agriculture. LUFA 2.3 is classified as sandy loam soil type in accordance with the United States Department of Agriculture (USDA).

The supplier warrants that biocidal fertilizers, organic manure, or pesticides have not been applied for five years at least. Soil can not be sampled earlier than three months after application of mineral fertilizers. Samples are taken from the depth of 20 cm and sieved through a 2 mm sieve. The supplier provides information about soil composition and properties. Some of them are listed in Table 1 (LUFA Speyer, 2013).

The advantage of this type of soil matrix lies in its similarity with the natural soil ecosystem. Artificial soil provided by OECD 207 can not provide this quality.

**Table 1.** Mean values of LUFA 2.3 analysis with standard deviation referred to dry matter.

Parameter	Unit	Value
Nitrogen	% N	0.08±0.02
pH-value	0.01M CaCl <sub>2</sub>	6.80±0.20
CEC	meq/100g	10.9±1.10
WHC	g/100g	37.3±1.80
Organic carbon	% C	0.94±0.10

CEC – cation exchange capacity; WHC – water holding capacity; meq - milliequivalent

### Agents tested

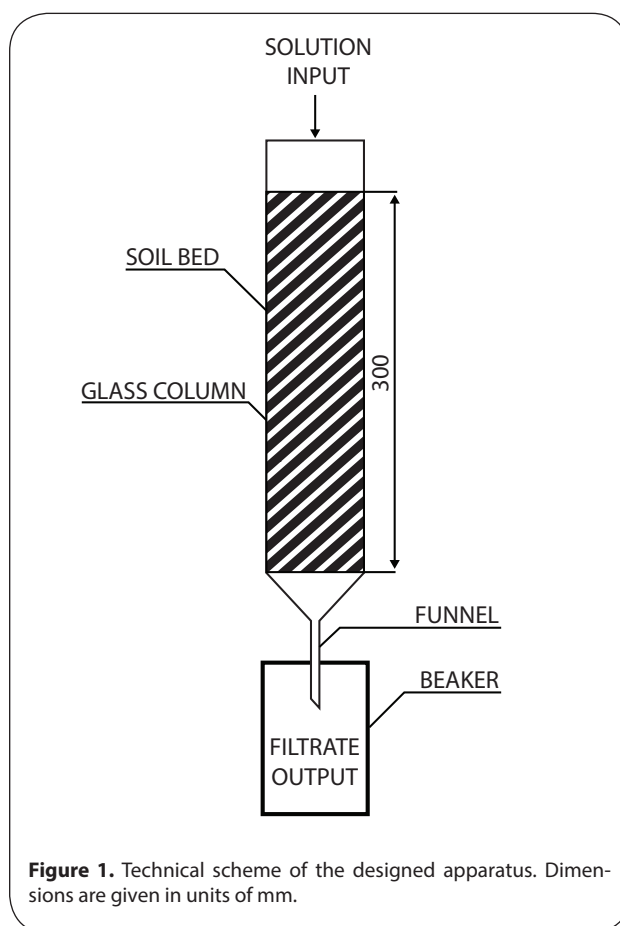
In this study, fire extinguishing agents (FEAs) were tested. These substances are complicated mixtures composed mainly of alcohols, surfactants and other additives. Some of them contain perfluorinated compounds, which belong to persistent organic pollutants (POPs) with relatively high environmental toxicity. Surfactants contained in such a mixture can exchange some ionic groups with soil sorption complex. Perfluorinated compounds can be then adsorbed on solid soil particles, clay surfaces and abiotic organic matter such as humic substances. Adsorption on microbial biofilms is also possible (Lors *et al.*, 2011).

We chose five FEAs for our experiments, i.e. Expyrol F-15 (EXP), Finiflam F-15 (FIN), Moussol-APS F-15 (MOU), Pyrocool B (PYR) and Sthamex F-15 (STH). These FEAs are used by the Fire Rescue Unit of the South Moravian Region of the Czech Republic.

For experimental purposes, FEAs were diluted with deionized water to concentrations of commonly used work solutions, i.e. 5% concentration for STH and 3% for the other ones. Solutions were used as stock solutions and tested for hazardous property H14 (ecotoxicity).

### Experimental design

At the beginning of our experiment, the column apparatus for infiltration was designed. It was compiled from a glass cylinder with specific proportions (see Figure 1). Standard soil matrix was placed in such a way that it



**Figure 1.** Technical scheme of the designed apparatus. Dimensions are given in units of mm.



reached average height, which corresponds to topsoil height and also height used for infiltration *in-situ* experiments (Hirzel & Matus, 2013; Johnson, 1963; Mijangos & Garbisu, 2010). Work solutions of the FEAs tested were individually applied in exact volume onto a thus prepared matrix. The out-coming filtrates were collected and then tested via ecotoxicology tests. Work solutions were tested in the same way as their filtrates.

### Column preparation

The bottom of the column was fixedly isolated by sterile gauze. Standard soil matrix was added in order to reach 30 cm height after moderate shaking down. An identical amount ( $736.5 \pm 1.1$  g) of soil matrix was used for every infiltration process.

### Filtrate preparation

Filtrates were prepared by using FEAs stock solutions. Every single solution was poured into the prepared column and left to infiltrate spontaneously. Decrease of the soil column occurred at the end of the infiltration.

Properties of work solutions and filtrates are presented in Table 2. Parameters of stock solutions were measured before infiltration, parameters of filtrates after the process. Accurate experimental conditions are listed in Table 3.

### Ecotoxicological assessment

Ecotoxic activity of the prepared samples was evaluated using the plant organism white mustard *S. alba* and the higher plant *A. cepa* L.

### *Sinapis alba* root growth inhibition test

The test was performed in standard arrangement according to the Methodological Guideline No. 11/2007 of the Department of Waste of The Ministry of Environment of the Czech Republic for the determination of waste ecotoxicity. The principle of the test lies in observation of inhibition or stimulation of mustard root growth. Thirty mustard seeds were exposed to several concentration levels of the samples tested and the length of germinated roots was measured after 72 hour exposition.

Seeds were applied at filtrate paper, moistened with relevant solution, in Petri dishes of about ten centimetre diameter. Petri dishes were placed into an incubator under dark condition and constant temperature of 20 °C for 72 hours. At the end of the test, the length of germinated roots was measured. Two replicates were done for every concentration level, including control.

The control test was performed simultaneously with every assay. Standard dilution medium was used in the control. It is a mixture of four essential salts, namely calcium chloride dihydrate in final concentration 11.76 g/L, magnesium sulphate heptahydrate 4.93 g/L, sodium bicarbonate 2.59 g/L and potassium chloride 0.23 g/L (Methodological Guideline of the Waste Department to Determine the Ecotoxicity of Waste, 2007).

### Test inhibition of root elongation of onion sets *Allium cepa* L.

The assay principle is assessment of inhibition, or stimulation, on the basis of comparison of root length in toxicant solution with the length in control test. Six onion sets were exposed to several concentration levels both of FEAs and their filtrates. The length of germinated roots was measured after seven days. To obtain more precise results, the roots were cut and the total biomass amount was determined for every concentration level.

Onion sets were peeled and rehydrated one day to germination before testing. They were put into tubes and filled with the relevant solution. The tubes with onions were maintained in laboratory conditions under ordinary daylight regimen and 20 °C for seven days. During the test, the solutions tested in tubes were continuously refilled. Finally, the length of germinated roots was measured. The amount of the total biomass was then determined for every single solution. Two replicates were done for every concentration level. The control test was performed simultaneously with every assay in two replicates (Fiskesjö, 1985; Olorunfemi & Ogunsanwo, 2011).

Steinberg medium, used in the Lemna sp. growth inhibition test, was chosen as standard dilution medium. It was used for the dilution of both samples and the control solution (ISO, 2005).

### Statistical analysis

The obtained data were subjected to statistical analysis by using the statistical software GraphPad Prism 6.0 in order to compare the toxicity of filtrates and work solutions.

The data were tested with analysis of variance (one-way ANOVA) to control statistically significant deviation of root lengths between all replicates in every concentration level.

**Table 2.** Fundamental properties of stock solutions and filtrates.

Sample type	Stock solution		Filtrate	
	pH	$\gamma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	pH	$\gamma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
EXP	7.118	1051	6.043	772
FIN	7.430	830	5.442	1049
MOU	6.643	283	5.017	469
PYR	7.375	1492	4.638	1566
STH	7.530	1522	5.849	1258

$\gamma$  – electrical conductivity

**Table 3.** Experimental conditions for infiltration and experiment outputs.

FEA	Soil weight (g)	IH of soil bed (cm)	FH of soil bed (cm)	Volume of applied solution (mL)	Filtrate volume (mL)
EXP	735.10	30±0.5	24.5±0.5	1000	850
FIN	737.85	30±0.5	24.0±0.5	1000	850
MOU	735.34	30±0.5	24.0±0.5	1000	850
PYR	737.30	30±0.5	24.5±0.5	1000	850
STH	736.70	30±0.5	24.0±0.5	1000	850

IH – initial height, FH – final height

**Results**

IC50 values, i.e. concentration causing 50% inhibition of root growth, were calculated with 95% interval of confidence using nonlinear regression of dose-response curve

as final results of the tests. Figure 2 represents individual dose-response curves for filtrates.

Appropriate results obtained for the organism *S. alba* are listed in Table 4 and for *A. cepa* in Table 5. Listed are only values counted from biomass results in the table.

**Table 4.** Ecotoxicological effects of the samples tested – *S. alba* root growth inhibition.

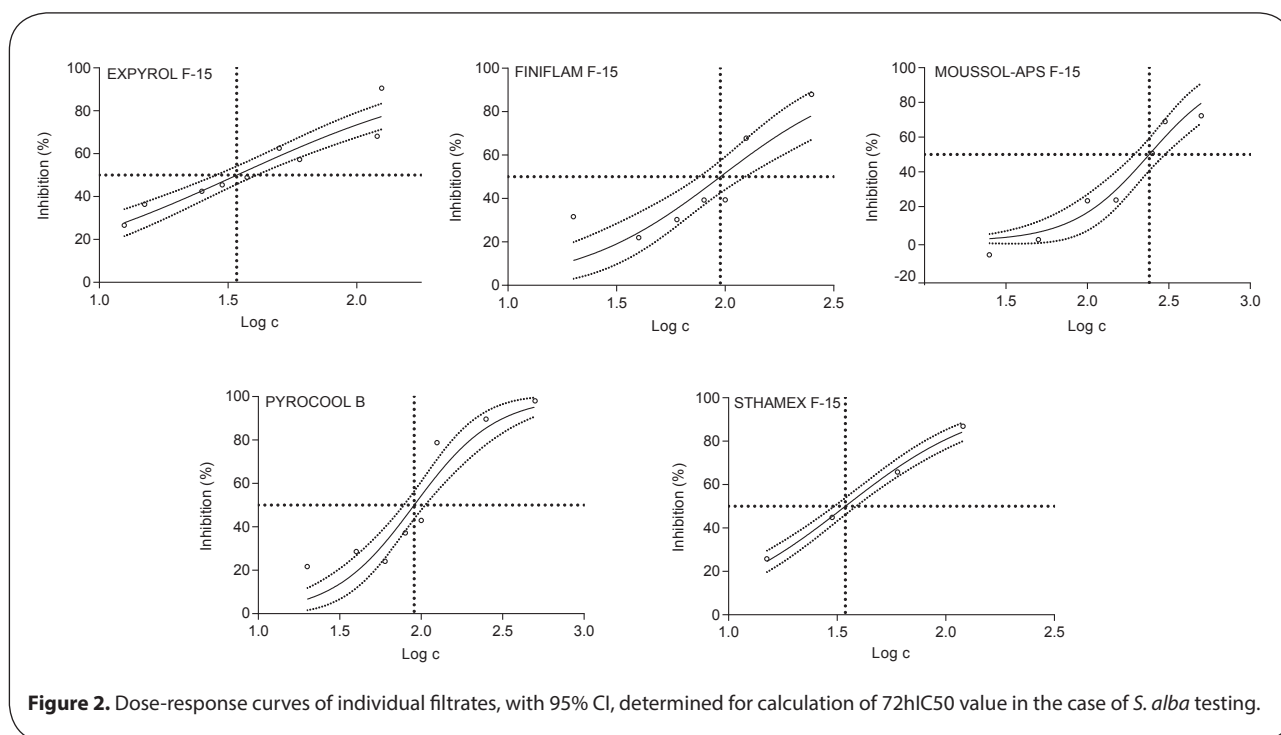
FEA	Stock solution			Filtrate		
	LogIC50±SE	72hIC50 (mL/L)	95% CI	LogIC50	72hIC50 (mL/L)	95% CI
EXP	1.496±0.072	31.33	21.40–45.87	1.534±0.036	34.24	28.69–40.85
FIN	1.728±0.079	53.40	36.29–78.56	1.978±0.047	95.03	75.78–119.2
MOU	2.201±0.020	158.8	141.6–178.1	2.380±0.040	239.7	195.8–293.5
PYR	1.364±0.023	23.09	20.63–25.86	1.957±0.031	90.59	78.29–104.8
STH	1.355±0.025	22.63	20.05–25.53	1.538±0.020	34.48	30.74–38.68

CI – confidence interval, SE- standard error

**Table 5.** Ecotoxicological effects of the samples tested – inhibition of *A. cepa* L. root elongation.

FEA	Stock solution			Filtrate		
	LogIC50±SE	168hIC50 (mL/L)	95% CI	LogIC50	168hIC50 (mL/L)	95% CI
EXP	1.281±0.102	19.10	9.036–40.39	1.337±0.075	21.74	12.58–37.57
FIN	1.541±0.053	34.75	23.52–51.34	1.545±0.004	35.05	33.71–36.44
MOU	1.884±0.058	76.49	52.77–110.9	2.315±0.605	206.3	OAS
PYR	0.919±0.069	8.293	5.021–13.70	1.186±0.086	15.35	9.244–25.48
STH	1.460±0.065	28.81	15.10–54.98	1.515±0.022	32.76	28.56–37.58

CI – confidence interval, SE- standard error, OAS – outside the acceptable scope



**Figure 2.** Dose-response curves of individual filtrates, with 95% CI, determined for calculation of 72hIC50 value in the case of *S. alba* testing.

Measuring of root length is not sufficient, due to the high deviation between individual roots on each onion.

Further, the 72hIC10 (*S. alba* test) values were counted for filtrates. They were compared with 72hIC10 values obtained for commonly prepared leachates, as carried out last year in our previous study (Hřibová *et al.*, 2014). The values were counted by taking into account the dilution factor ten. In no case of leachate testing was 50% inhibition reached. Figure 4 summarizes these results.

## Discussion

The experimental infiltration process had a significant impact on pH reaction and conductivity of solutions (see Table 2). All filtrates had lower pH value than the corresponding stock solutions. On the contrary, conductivity of filtrates compared to stock solutions was elevated in the case of FIN, MOU and PYR. Filtrates of EXP and STH had lower values.

This finding points to the direct influence of the soil matrix on physico-chemical properties of contamination. This is the consequence of combination of many natural processes held in bed soil, climatic conditions and chemical composition of contamination (Lors *et al.*, 2011; Ruggiero *et al.*, 2002).

In the case of assessment of *S. alba* root growth inhibition, Sthamex F-15 proved to be the most toxic agent with 72hIC50 value 22.63 mL/L. Toxicity of the selected FEAs was decreasing in the order STH>PYR>EXP>FIN>MOU.

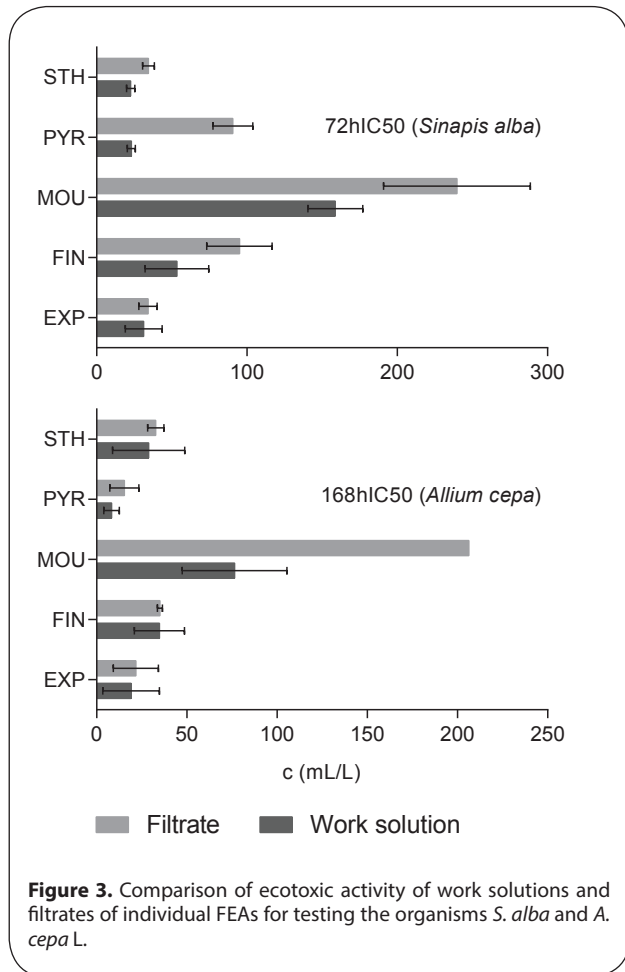
A somewhat different trend was observed in the case of inhibition of *A. cepa* root elongation testing. Toxic activity of FEAs was decreasing in the order PYR>EXP>STH>FIN>MOU. This time, Pyrocool B was found to be the most ecotoxic agent with 168hIC50 value 8.29 mL/L.

On the other hand, Moussol-APS F-15 proved the least ecotoxic agent in all cases. All agents could fall within the hazard category 3 (concentration ranging 10–100 mL/L; harmful to aquatic life) given by Global Harmonised System (GHS), except Pyrocool B and Moussol-APS F-15. In the case of testing the organism *A. cepa*, Pyrocool B could fall within the category 2 (concentration ranging 1–10 mL/L; toxic for aquatic life). The least toxic agent, Moussol-APS F-15, could not fall within any category in the case of the organism *S. alba* since the IC50 value was higher than 100 mL/L (GHS, 2005).

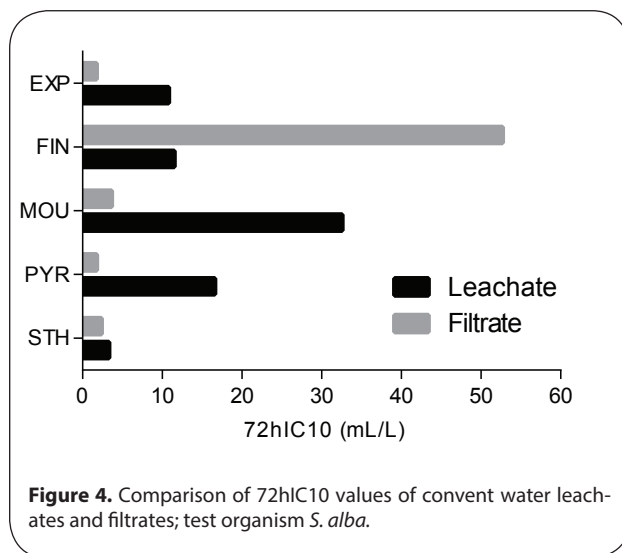
Indeed, classification of FEAs into GHS categories is complicated, because their current composition is not exactly known. Another option is available. FEAs can be classified by US Fish and Wildlife Service Acute Toxicity Rating Scales, which is used by OECD. According to this classification, Pyrocool B is moderately toxic (IC50 range 1–10 mL/L) for *A. cepa* and Moussol-APS F-15 is practically non-toxic (IC50 range 100–1 000 mL/L) for *S. alba*. The other FEAs fall into the slightly toxic category with IC50 range of 10–100 mL/L (Seow, 2013).

Both classification scales were proposed for acute toxicity testing of water animal organisms such as crustaceans and fish. Thus concerning the effect on plant testing, it can be used only for better imagination about the degree of negative influence of complicated mixtures like FEAs.

Figure 3 represents the comparison of toxic activity of FEAs work solutions with their filtrates. The figure clearly shows that filtrates affect both testing organisms



**Figure 3.** Comparison of ecotoxic activity of work solutions and filtrates of individual FEAs for testing the organisms *S. alba* and *A. cepa* L.



**Figure 4.** Comparison of 72hIC10 values of convent water leachates and filtrates; test organism *S. alba*.

less than work solutions. This trend is significant in the case of Pyrocool B, Moussol-APS F-15 and Finiflam F-15. Ecotoxicity decrease of the remaining FEAs is weak or almost none.

This finding points to some influence of soil environment on ecotoxicity reduction of contamination. We do not know exactly which physicochemical mechanisms have a major participation in this process. Sorption as well as ion exchange or sequestration could affect the composition of mixtures during the infiltration process (Ruggiero *et al.*, 2002).

Only few studies have so far focused on environmental impacts of FEAs. FEAs are commonly known to be hazardous for organisms of aquatic ecosystems (Adams *et al.*, 2004; Koehler *et al.*, 2004), yet very little is known about their impact on plant species (Adams *et al.*, 2004). Adams *et al.* applied fire-fighting foams used in Australia onto seedlings of higher plant Australian species. They observed no detectable impacts on growth characteristics, flowering and leaf damage (Adams *et al.*, 2004).

Another study was done by Koehler *et al.* This field study provided information about the impact of foam on soil invertebrates, sampled at different times after foam application. Neither did they observe any detectable impact. However the authors admit that further investigation of soil invertebrates at finer taxonomic level may reveal population changes (Koehler *et al.*, 2004).

Ecotoxicity of non-foam fire chemicals was compared with foams in Midwest Science Center in South Dakota. Bioassays were performed with fish, daphnids, amphipods and algae in the study. The results point to a higher toxicity of foams compared with non-foam chemicals used as fire retardants (Hamilton *et al.*, 1996).

Last year, we did an ecotoxic evaluation of FEAs which are the subject of the current work. The results confirmed high risks for aquatic environment and pointed to the influence of soil on ecotoxicity reduction. Conventionally prepared leachates were assessed in that study (Hřibová *et al.*, 2014).

This year, we compared the results of testing water leachate and filtrates (see Figure 4). A negligible divergence was observed in the case of Sthamex F-15. The remaining FEAs showed considerable variances. It is obvious that two different approaches to soil contamination assessment do not provide the same results. The first and more common possibility is water leachate testing with consideration of the dilution factor. The second one is direct testing of filtrates released from the soil bed after infiltration of a contaminant.

## Conclusion

The present work is focused on the assessment of ecotoxic activity of FEAs. Five foaming agents were chosen, namely Expyrol F-15, Finiflam F-15, Moussol-APS F-15, Pyrocool B and Sthamex F-15. A further aim of the study was rating of the direct influence of the soil matrix on the contami-

nation fate in the environment and subsequently on the reduction of its ecotoxicity.

The results from tests with the plant organisms *S. alba* and *A. cepa* L. provided information about risks for the aquatic environment. Moussol-APS F-15 proved to be the least hazardous agent for both test organisms. Overall, all the FEAs tested are among the slightly toxic and harmful substances according to the GHS and OECD classification systems.

It is important to assess the further fate of fire-fighting foam after its application at the site of fire. Results of two different experimental approaches were compared. Laboratory testing of water leachates prepared according to ISO (ISO, 2007; Methodological Guideline of the Waste Department to Determine the Ecotoxicity of Waste, 2007) was done last year in our previous study. This year, an apparatus for infiltration experiment was designed to assess the direct impact of soil on the contaminant during its passage through the matrix. Filtrates were tested in the same way as leachates. Comparison of the results points to great differences between the approaches.

The message is clear. When assessment of contamination behavior in the environment is needed, it is necessary to consider climatic and further natural conditions. The situation of the rainy season is different from that of the dry one, yet there is no direct division in real ecosystems. Conditions are changing quickly and many factors play a role in contaminant transportation and its transformation. Field studies may provide a better approach in this case.

Finally, in the case of fighting fires, it is important to take into account several factors including economic ones, effectivity and hazards for the environment. Only field studies could promote our understanding of natural processes occurring in a contaminated area and help to decide about the most effective and the least dangerous solutions.

## Acknowledgement

The study was supported by the grant no. FCH-S-14-2487 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

## REFERENCES

- Adams R, Simmons D, Hartskeerl K, Koehler M. (2004). Surviving suppression: no detectable impacts of Class A foam on soil invertebrates and some Australian native plants. *Bushfire 2004: earth, wind & fire: fusing the elements: conference proceedings*, Department for Environment and Heritage, Adelaide, South Australia.
- Domene X, Colón J, Uras MV, Izquierdo R, Àvila A, Alcañiz JM. (2010). Role of soil properties in sewage sludge toxicity to soil collembolans. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 1982 – 1990.
- Fiskesjö, G. (1985). The Allium test as standard in environmental monitoring. *Hereditas* **102**: 99-112.
- Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), United Nations, 2005.

- Hamilton SJ, McDonald SF, Gaikowski MP, Buhl KJ. (1996). Toxicity of fire retardant chemicals to aquatic organisms: Progress report. *Information Report - Petawawa National Forestry Institute PI X*. **123**; pp. 132–144.
- Hirzel J, Matus I. (2013). Effect of soil depth and increasing fertilization rate on yield and its components of two durum wheat varieties. *Chilean J. Agric. Res.* **73**: 55–59.
- Hřibová Š, Zlámalová Gargošová H, Vávrová M. (2014). Ecotoxicological evaluation of firefighting foams. *Fresenius Environmental Bulletin* (in press).
- ISO, 2005. Water quality – Determination of toxic effect of water constituents and waste to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. International Organization for Standardization, Geneva. ISO 20079.
- ISO, 2007. Soil Quality. Leaching Procedures for Subsequent Chemical and Ecotoxicological Testing of Soil and Soil Materials. Part 2. Bath Test Using a Liquid to Solid Ratio of 10 l/kg Dry Matter. International Organization for Standardization, Geneva. ISO 21268-2.
- Johnson AI. (1963). A Field Method for Measurement of Infiltration. *U. S. Geol. Survey Water-Supply Paper 1544-F*. p. F1–F27.
- Koehler M, Adams R, Simmons D. (2005). Does application of firefighting foam affect soil invertebrates? *Victorian naturalist* **122**: 128–133.
- Lors C, Ponge JF, Martínez Aldaya M, Damidot D. (2011) Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils. *Environ Pollut.* **159**: 2974–2981.
- Vavříček D, Kučera A. (2014). Lesnická pedologie pro posluchače LDF Mendelu v Brně. Ústav geologie a pedologie. p. 176.
- LUFA Speyer [webpage on the Internet]. Analyses Data Sheet. Speyer, Germany: LUFA Speyer [updated 2013 May; cited 2014, Aug]. Available form: <http://www.lufa-speyer.de/images/stories/bodanalyse.pdf>
- Methodological guideline of Department of Waste to determine the ecotoxicity of waste, Bulletin of the Ministry of Environment of the Czech Republic, part 4, April 2007.
- Mijangos I, Garbisu C. (2010). Consequences of soil sampling depth during the assessment of the effects of tillage and fertilization on soil quality: a common oversight. *Soil and Tillage Research* **109**: 169–173.
- Olorunfemi DI, Ogunsanwo MW. (2011). Evaluation of the differential growth conditions, heavy metal composition and cytogenetics of *allium cepa* by the use of chromosome aberration bioassay. *Science World Journal* **6**: 21–25.
- Ruggiero P, Pizzigallo MDR, Crecchio C. (2002). Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues, in *Ecological significance of the interactions among clay minerals, organic matter and soil biota* pp. 95–133, Elsevier Science B.V.
- Seow J. (2013) Environmental Considerations When Using Fire Fighting Foam in *Fire Fighting Foams with Perfluorochemicals – Environmental Review* pp. 22–27.

# **Příloha B1:**

VÁVROVÁ, M.; STOUPALOVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E. Assessing contamination levels in a reservoir on the basis of the determination of xenobiotics in fish. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 8, p. 901-905. ISSN: 1018- 4619.



# ASSESSING CONTAMINATION LEVELS IN A RESERVOIR ON THE BASIS OF THE DETERMINATION OF XENOBIOTICS IN FISH

M. Vávrová<sup>1</sup>, E. Šucman<sup>2</sup>, J. Páč<sup>2</sup>, H. Zlámalová-Gargošová<sup>1</sup>,  
M. Stoupalová<sup>1</sup>, J. Jirušková<sup>1</sup>, S. Navrátil<sup>1</sup> and M. Palíková<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Biochemistry and Biophysics, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

## SUMMARY

In our research the fish caught in surface water of the Smrad'avka reservoir were studied. Some inorganic and organic pollutants were monitored in the muscles and the digestive system of these fish. The monitoring focused particularly on indicator congeners of PCBs, because the reservoir is situated in the surroundings of a reclaimed waste site with deposited wastes consisting of paints containing Delor 106. The highest levels were found for the following PCB congeners ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  of fish tissue): PCB 28 (14.280) in eel, PCB 52 (1.1446) in tench, PCB 101 (7.417) in tench, PCB 118 (1.741) in tench, PCB 138 (34.980) in tench, PCB 153 (49.800) in tench and PCB 180 (27.780) in tench. Also contents of high-risk elements were analysed (zinc, copper, nickel, arsenic, lead, cadmium and mercury). Samples containing higher levels of mercury were also analysed for methylmercury. The levels of particular trace elements ranged as follows: Zn 3.7 – 12.5, Cu 0.126 – 0.612, Ni 0.045 – 0.125, Hg 0.0476 – 0.3152, MeHg 0.0115 – 0.0820 and As 0.0216 – 0.0480, Pb 0.002 – 0.030, Cd 0.001 – 0.007 mg per kg of fish tissue.

**KEYWORDS:** high-risk elements, indicator congeners of PCBs, bioindicator, fish, reservoir Smrad'avka.

## INTRODUCTION

Fish is one of the species which is most often used as an environmental bioindicator to monitor the level of pollution in hydrosphere. It is recommended that this monitoring should be complex which means, that the levels of xenobiotics should be estimated not only in water but also in sediment and tissues of animal bioindicators. Monitoring studies of this kind are sometimes extended to phytoplankton and zooplankton [1]. Fish are often screened for high risk elements and PCBs.

In their studies [2 - 4], the researchers were thoroughly monitoring the levels of high risk elements in fish living in Finnish coastal waters, the Baltic sea and offshore waters of western Estonia. According to available literature, fresh-water fish have not been extensively researched as a bioindicator to evaluate the level of contamination in a fresh-water ecosystem.

The Ministry of the Environment and the Ministry of Agriculture of the Czech Republic are annually evaluating the contamination of fish, focussing particularly on determination of high risk elements such as PCBs and OCHI. The current levels of particular pollutants are not too high and comply with both, domestic and European limits; an increased level of pollution was only found as a consequence of ecological accidents. Some publishing researches in the Czech Republic are monitoring the levels of high risk elements with respect to health of fish, focussing on accumulation of high risk elements (Ni, Cr, Cu) in selected tissues and organs of gudgeon (*Gobio Gobio*). Kráčmar et al. [5] found that the content of these pollutants did not exceed the maximum permissible limit, although the levels of nickel and chromium at two sites monitored were different. A similar study was carried out on brown trout (*Salmo trutta morha fario*) and perch (*Perca fluviatilis*) in the national nature reserve Mořské oko (The Vihorlat mountains) and at the Dobšinská reservoir in Slovakia [6]. The authors monitored the levels of copper, zinc, cadmium, arsenic, lead and mercury. The nature reserve Mořské oko is an isolated ecosystem which provides optimum conditions for monitoring pollution using bioindicators. The levels of pollutants in tissues did not exceed respective permissible limits. However, a high content of cadmium in both water and sediment was detected, which may be due to adjacent industrial towns (Snina, Humenné). Increased levels of monitored elements were found in fish from the Dobšinská reservoir. This reservoir is a popular tourist destination located adjacently to a busy railway line. We introduce these data,

because our monitoring study was also performed in fish occurring in fresh-water reservoirs.

The monitoring of organic pollutants such as PCBs performed world-wide employs different species of bioindicators. Fresh-water ecosystems were studied only by Spanish authors [7], who evaluated the distribution of PCB congeners in tissues of lake fish. In the Czech Republic, a complex study was conducted by Hajšlová et al. [8], who identified three species of fish as suitable bioindicators to evaluate the level of contamination in the fresh-water ecosystem. In their study, PCB 153 served as a representative congener. In the Czech Republic a complete study was performed by Vávrová et al. [9, 10], who monitored the content of PCBs at a site located in the river Morava watershed after floods in 1997 and 1998. Their results showed increased levels of PCBs in sediments; a massive accumulation however of PCBs in fish tissues was not found. Holoubek et al. [11] monitored the levels of all primary organic pollutants at other sites located in the river Morava watershed. Slovak authors published results of a 5-years' monitoring carried out in the surroundings of Chemko Strážské in the Prešov district, where commercial products named Delor were produced in the past. Most of the findings which exceeded the maximum permissible limit were found in predatory fish. In other fish species, the levels did not exceed the limits [12]. The findings exceeding the permissible limits were evaluated according to EU regulations.

## MATERIAL AND METHODS

The fish were taken from the Smradavka reservoir in order to find out whether fish can serve as a bioindicator for evaluating the level of pollution in a fresh-water ecosystem. The fish were caught by workers of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno in cooperation with workers of the River Morava watershed using an electrical device (direct current). The caught was done properly by licensed workers in compliance with the law relating to the protection of animals against maltreatment. The following species of fish were taken: tench, carp, bream, zander, roach, pike, and eel.

### Chemicals

Elements risk analysis: all chemicals used for analytical work came from Analytical Grade (Merck, Germany), except for HNO<sub>3</sub> (65%), which was additionally purified by subboiling distillation. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) and HCl (37%) were used - both from Suprapur, Merck, Germany. For dissolution and/or dilution of chemicals, fresh deionised water with specific resistance >0.4 MΩ.m was used. Standards of particular elements were prepared from commercial 1 000 mg/l stock solutions (Analytika, Czech Republic).

Anhydrous sodium sulphate of analytical grade was heated in a muffle furnace at 650°C for 4 h - Florisil 60/100 mesh cleaned and heated at 600°C - before use.

The sorbents were activated in a hot-air drier at 130°C (the activated sorbents can be stored in brown wide-neck bottles in a desiccator for 3 days); hexane, petroleum ether, diethylether, residues analysis grade; sulphuric acid 96% (Suprapur, Merck).

A standards PCB congener mixture in hexane with concentration of 100 µg of each congener per 1 ml (J.T. Baker) was used; reference material was obtained from the Commission of the European Communities, BCR (Chlorobiphenyls in mackerel oil, No: 350).

### Preanalytical and analytical procedures

Samples of tissues from fish were subjected to mineralization under wet conditions using a mixture of sulfuric acid and nitric acid (2:1). The levels of lead, cadmium, copper and nickel were determined using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS), zinc was determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS), mercury by Cold-Vapour Atomic Absorption Spectrometry (CV-AAS) and arsenic by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS). Samples in which mercury was detected were subjected to analysis for the content of methyl mercury. After extraction, methyl mercury was determined using gas chromatography with electrochemical detection [13].

As to extraction of PCBs from fish tissues: the samples were homogenised, titrated with anhydrous sodium sulphate and extracted three times with a petroleum ether-diethylether mixture (96:4). The extraction was enhanced by sonication. The solvent was removed in a rotary vacuum, and 100 to 200 mg of the residue was weighted for the clean-up in a florisil column. The clean-up procedure was completed with sulphuric acid. Residues obtained by extraction of tissue samples were dissolved in hexane [14]. PCBs were determined using dual-column high-performance gas chromatography with electrochemical detection (ECD) using HP 5 and HP 17 columns.

GC conditions: HP 5890 gas chromatograph, series II; column: HP 5 and HP 17, length: 60 m, inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.2 µm; injector: split/splitless (150 s), temperature: 250°C, injected amount: 1 µl, carrier: helium - linear velocity: 36.5 cm/s; temperature program: 2.5 min at 40°C followed by heating to 180°C at a rate of 30°C/min, then to 280°C at a rate of 2°C/min, 10 min at 280°C; detector <sup>63</sup>Ni ECD, temperature: 300°C; pressure program: constant flow - 1.0 m/min.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of our study are summarized in tables that include not only average values and medians but also ranges. The average level of risk elements in muscles of fish taken from the reservoir Smradavka is provided in Table 1. It follows from this table, that 7 fish species (tench, carp, bream, zander, roach, eel and pike) were



**TABLE 1**  
Content of risk elements in fish tissues [mg/kg].

Elements		Pike n=8	Zander n=1	Eel n=8	Bream n=8	Roach n=8	Carp n=8	Tench n=1
Zn	mean	4.92	5.78	8.98	9.72	3.74	9.39	12.5
	median	4.85	5.78	9.05	9.80	3.92	9.12	12.5
	range	4.30-5.15	-	7.08-9.76	8.760-10.500	3.18-4.22	8.660-9.712	-
Cd	mean	<0.002	<0.002	0.005	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
	median	-	-	0.004	-	-	-	-
	range	-	-	0.001-0.007	-	-	-	-
Cu	mean	0.126	0.153	0.612	0.296	0.216	0.270	0.509
	median	0.112	0.153	0.0595	0.300	0.203	0.276	0.509
	range	0.100-0.141	-	0.575-0.640	0.265-0.322	0.196-0.235	0.240-0.291	-
Ni	mean	0.045	0.066	0.125	0.115	0.055	0.067	0.106
	median	0.045	0.066	0.130	0.105	0.048	0.059	0.106
	range	0.020-0.060	-	0.098-0.150	0.096-0.131	0.030-0.062	0.050-0.078	-
Pb	mean	<0.002	<0.002	0.005	0.011	<0.002	0.014	<0.002
	median	-	-	0.004	0.010	-	0.018	-
	range	-	-	0.002-0.009	0.002-0.030	-	0.005-0.026	-
Hg	mean	0.2045	0.2575	0.3152	0.2092	0.0926	0.0476	0.1262
	median	0.2060	0.2575	0.3098	0.2075	0.0876	0.0455	0.1262
	range	0.1905-0.2815	-	0.2412-0.3915	0.1454-0.2928	0.0715-0.0995	0.0395-0.0510	-
MeHg	mean	0.0335	0.0635	0.0820	0.416	0.0115	0.0287	0.0282
	median	0.0342	0.0635	0.0805	0.0404	0.0120	0.0282	0.0282
	range	0.0295-0.0378	-	0.0790-0.0870	0.0141-0.0597	0.0100-0.0132	0.0188-0.0385	-
As	mean	0.0279	0.0349	0.0335	0.0216	0.0250	0.0243	0.0313
	median	0.0270	0.0349	0.0309	0.02230	0.0238	0.0215	0.0313
	range	0.0255-0.0293	-	0.0269-0.0363	0.0188-0.0270	0.0225-0.0272	0.0196-0.0290	-

**TABLE 2**  
Content of PCB indicator congeners in muscle tissues of fish [µg/kg].

PCB		Pike n=6	Zander n=1	Eel n=8	Bream n=8	Roach n=6	Carp n=8	Tench n=1
28	mean	1.086	0.604	4.646	4.165	0.572	1.488	9.654
	median	1.266	0.604	1.737	5.012	0.530	1.448	9.654
	range	0.356-1.636	-	0.830-14.280	0.315-6.322	0.348-0.976	0.907-1.034	-
52	mean	0.349	0.001	1.047	1.206	0.208	0.517	1.446
	median	0.225	0.001	0.408	0.861	0.135	0.517	1.446
	range	0.232-0.559	-	0.404-3.084	0.106-2.996	0.084-0.484	0.373-0.661	-
101	mean	0.577	0.464	3.299	4.501	0.430	0.810	7.417
	median	0.601	0.604	1.617	4.969	0.412	0.810	7.417
	range	0.184-0.946	-	0.602-9.360	0.305-7.761	0.256-0.612	0.793-0.827	-
118	mean	0.194	0.001	0.596	1.482	0.171	0.335	1.741
	median	0.122	0.001	0.562	1.194	0.140	0.335	1.741
	range	0.106-0.355	-	0.366-0.984	0.192-3.350	0.104-0.315	0.327-0.342	-
138	mean	9.978	1.164	11.842	13.540	4.379	6.783	34.980
	median	8.380	1.164	9.304	13.738	1.780	6.783	34.980
	range	2.480-19.073	-	5.700-23.060	2.715-23.970	1.040-9.615	4.565-9.180	-
153	mean	13.409	1.680	16.671	22.429	5.647	10.420	49.800
	median	13.060	1.680	13.511	20.734	2.500	10.420	49.800
	range	3.168-24.000	-	8.260-31.400	3.960-44.285	1.440-12.360	6.560-14.280	-
180	mean	6.938	1.012	7.359	5.941	0.382	4.353	27.780
	median	6.270	1.012	4.693	5.778	1.055	4.353	27.780
	range	1.360-13.185	-	2.800-17.250	1.010-11.720	0.650-5.520	2.430-6.276	-

monitored. The number of fishes in each group was different ranging between 1 (zander, tench) and 8 (eel, bream). It can be seen from the values introduced in this table, that the level of contamination in fish taken from this reservoir is very low and that the current limit for residues, which is valid in the Czech Republic, was not exceeded in any case. The levels of the most often monitored risk elements such as cadmium and lead were below the detection limit in several cases. The lowest level of all risk elements was found in pike (predatory fish), while the highest level was detected in tench which lives predominantly near the bottom. Although the levels of risk elements were very low, the presence of methyl mercury cannot be neglected. The levels of risk elements were compared with the data published by the State Veterinary Administration of the Czech Republic in 2001 [15], which showed that the findings are significantly lower than other published data. However, it should be emphasized that the levels found all over the Czech Republic were not high, and that the hygienic limit was exceeded only once for arsenic (predatory fish - rainbow trout) and once for mercury (barbel). The findings were also compared with data published in Slovakia. On the basis of this comparison, it can be concluded that fish taken from the reservoir Smrad'avka were less contaminated than fish monitored in the Prešov district, where in 10% cases the levels of some risk elements were above hygienic limits - particularly mercury and cadmium; sporadically arsenic and chromium.

The following Table 2 shows average levels of indicator PCB congeners ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) detected in identical fish species. It can be seen that the level of these xenobiotics did not exceed hygienic limits. The levels of high- and low-chlorinated PCB congeners found in most fish species were not elevated and fall in the range of values published in monitoring studies performed by the Ministry of the Environment and Ministry of Agriculture of the Czech Republic. The levels of PCB 153 and PCB 138 congeners were the highest in all fish species. Our results were in good agreement with the data reported by Hajšlová et al. [8], who conducted a long-term monitoring of PCB levels in fish from Czech rivers. Findings concerning a level of contamination in fish in the Prešov district showed that this site is more polluted, since the hygienic limit was exceeded in 8.76% of the cases [12]. The highest levels were also detected for PCB 153 and for PCB 180.

The results obtained in this study demonstrate that the levels of inorganic and organic pollutants in fish taken from the fresh-water reservoir Smrad'avka are not very high, although this site is close to a plant where a commercial product containing Delor 106 was used in the production of colours and paints. This is a positive finding particularly in respect to the fact, that this reservoir is a summer holiday area and water from the lake is used for watering. Another study performed at our department which focussed on the analysis of samples of waters and

sediments collected from this reservoir showed, that the levels of risk elements and PCBs fell in the range of values found in waters and sediments from other regions of the Czech Republic.

## CONCLUSION

The present study aimed to monitor the levels of risk elements and the most common indicators are PCB congeners in several fish species taken from the fresh-water reservoir of Smrad'avka. Fish as one of the most suitable bioindicators of animal origin was chosen for this study. The levels of particular trace elements ranged as follows: Zn 3.7 – 12.5, Cu 0.126 – 0.612, Ni 0.045 – 0.125, Hg 0.0476 – 0.3152, MeHg 0.0115 – 0.0820 and As 0.0216 – 0.0480 mg per kg of fish tissue. The highest levels of PCB congeners in fish were varying and did not seem to characterize a particular fish species. The highest levels were found for the following PCB congeners ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): PCB 28 (14.280) in eel, PCB 52 (1.1446) in tench, PCB 101 (7.417) in tench, PCB 118 (1.741) in tench, PCB 138 (34.980) in tench, PCB 153 (49.800) in tench and PCB 180 (27.780) in tench.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic (CEZ: J16/98" 162700004)

## REFERENCES

- [1] Zima, S. and Vávrová, M. (1997) Organic pollutants in environmental bioindicators, (In Slovak). *Ekológia & Život*, 1, 28-29.
- [2] Voight, H.R. (1999) Concentrations of heavy metals in fish from coastal waters around the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 56, 140-141.
- [3] Voight, H.R. (2000) Heavy metal and organochlorine levels in coastal fishes from the Väike Väin Stait, Western Estonia, in high summers. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.*, 49, 335-343.
- [4] Zauke, G.P. and Savinov, V.M. and Ritterhoff, J. and Savinova, T. (1999) Heavy metals in fish from the Barents Sea in (summer 1994). *Science of the Total Environment*, 227, 161-173.
- [5] Kráčmar et al. (2002) Accumulation of risk elements (Ni, Cr a Cu) in some organs of *Gobio gobio* in two localities in the Vlára river. In: *Proceedings, The eleventh scientific symposium with international participation on ecology in selected agglomerations of Jelšava Lubeník and Central Spiš, Hrádok 2002*, 30-33.

- [6] Turčeková L., Hanzelová V., Špakulová M. (2002) Heavy metals in ecosystems of Morské oko lake and Dobšíná water reservoir. In: Proceedings, The eleventh scientific symposium with international participation on ecology in selected agglomerations of Jeřava Lubeník and Central Spiš, Hrádok 2002, 190-194.
- [7] Sanchez, J. and Sole, M. and Albaiges, J. (1993) A Comparison of PCB congeners and other chlorinated compounds in fishes from coastal areas and remote lakes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 50, 269-284.
- [8] Hajslova, J. and Schoula, R. and Kocourek, V. and Holadova, K. and Poustka, J. and Kohoutkova, J. and Svobodova, Z. (1997) Polychlorinated biphenyls and other persistent chlorinated contaminants in fish as indicators of pollution of aquatic ecosystem in Czech Republic. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 59, 279-291.
- [9] Vávrová, M. and Šucman, E. and Vávra, S. and Sebestiánová, N. and Gargošová, H. and Zima, S. (1999) The use of bioindicators in assessment in ecosystems in flooded areas. In: Book of Abstracts 7<sup>th</sup> Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Lawrence, Kansas USA, 73-74.
- [10] Vávrová, M. and Šucman, E. and Kořínek, P. and Zlámalová Gargošová, H. (2002) Assessment of ecosystem contamination in flooded areas of Moravia, Czech Republic during the period 1997-2001. In: Book of abstracts ISEAC 32 Conference (International Symposium on the Environment and Analytical Chemistry). Plymouth, 79.
- [11] Holoubek, I. and Kočan, A. and Holoubková, I. and Hilscherová, K. and Kohoutek, J. and Falandysz, J. and Roots, O. (2000) Persistent, bioaccumulative and toxic compounds in the central and eastern european countries – levels, trends. In: Book of Abstracts 7<sup>th</sup> Regional Meeting of the Central and East European Section of SECOTOX, Bratislava, 22-25.
- [12] Rajzák P., Očipová D. (2002) Contaminants in samples of wildlife animals and fishes in the region of Prešov in the years 1995-2000. In: Proceedings, The eleventh scientific symposium with international participation on ecology in selected agglomerations of Jeřava Lubeník and Central Spiš, Hrádok 2002, 232-238.
- [13] Šucman, E. and Vávrová, M. and Zima, S. and Kořínek, P. and Pavelka, J. and Zlámalová Gargošová, H. (2001) Studies on the transfer of harmful substances from feed to chicken tissues. *Can. J. Anal. Sci. And Spectr.*, 46, 89-94.
- [14] Vávrová, M. and Zlámalová Gargošová, H. and Šucman, E. (2002) Impact of environmental pollution on contamination of locally grown roughage. *ACTA VET. BRNO*, 71, 389-400.
- [15] Autors (2001) State Veterinary Administration of the Czech Republic. Praha 2001.

---

Received for publication: January 23, 2003  
Accepted for publication: February 17, 2003

---

#### CORRESPONDING AUTHOR

---

**M. Vávrová**  
Department of Veterinary Ecology  
and Environmental Protection  
Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology  
University of Veterinary and  
Pharmaceutical Sciences Brno  
Palackého 1-3  
612 42 Brno - CZECH REPUBLIC

e-mail: vavrovam@vfu.cz

# Příloha B2:

VÁVROVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E.; VEČEREK, V.; KORÍNEK, P.; ZUKAL, J.; ZEJDA, J.; SEBESTIÁNOVÁ, N.; KUBIŠTOVÁ, I. Game animals and small terrestrial mammals – suitable bioindicators of the pollution assessment in agrarian ecosystems. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 2, p. 165-172. ISSN: 1018- 4619.

# GAME ANIMALS AND SMALL TERRESTRIAL MAMMALS – SUITABLE BIOINDICATORS FOR THE POLLUTION ASSESSMENT IN AGRARIAN ECOSYSTEMS

Vávrová, M.<sup>1</sup>, Zlámalová Gargošová, H.<sup>1</sup>, Šucman, E.<sup>2</sup>, Večerek, V.<sup>3</sup>,  
Kořínek, P.<sup>4</sup>, Zukal, J.<sup>5</sup>, Zejda, J.<sup>5</sup>, Sebestiánová, N.<sup>6</sup>, Kubištová, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno; Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno; Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
Department of Biochemistry and Biophysics, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno; Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
Department of Public Health and Forensic Medicine; Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Regional Hygiene Station Brno; Czech Republic

<sup>5</sup> Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>6</sup>Pragolab, Brno

## SUMMARY

Bioindicators of animal origin are an effective tool for the monitoring of environmental contamination of agrarian ecosystems which are known to contain considerably higher concentrations of some organic pollutants than other matrices, such as air, water, or soil. Small terrestrial mammals are also used in the monitoring of terrestrial ecosystems in some countries. The major objective of this study was to test the suitability of small terrestrial mammals for chemical monitoring. Considering the nutrition habits and lipid content in the skin and other tissues, the following species were selected: a) small terrestrial mammals - field vole (*Microtus arvalis*), bank vole (*Clethrionomys glareolus*), wood mouse (*Apodemus flavicollis*), and yellow necked mouse (*Apodemus sylvaticus*); b) game animals – hare (*Lepus europaeus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*); c) others - pheasant (*Phasianus colchicus*), carp (*Cyprinus carpio*), bee (*Apis mellifera*). The animals were collected in defined localities in South and Mid Moravia. Concentrations of PCB congeners were determined in the skin, muscles, and liver, or, in some cases, in composite samples of the digestive tract. It is concluded that small terrestrial mammals are a suitable bioindicator for the assessment of contamination rate in both smaller localities and larger areas.

**KEYWORDS:** bioindicators, agrarian ecosystems, game animal, small terrestrial mammals, PCBs, assessment of contamination.

## INTRODUCTION

The evaluation of an ecosystem relies on a number of factors. In order to understand causal links between the occurrence and behaviour of individual species and connections between morphological features, physiological processes and population dynamics of animals and plants, scientists have employed the methodology of biological indication and attempted to gain information about a particular factor by monitoring its effects in living organisms. According to Nováková [1], the bioindication methods are being increasingly used in ecological monitoring.

The main advantage of bioindication used to follow changes in the environment during traditional biological and ecological monitoring is that the sampling method is relatively simple. However, traditional biological monitoring cannot be applied if the samples to be taken are not homogeneous.

Systematic monitoring of the ecotoxicological impairments in ecosystems is carried out on suitable living objects (vegetable and animal species), whose response to harmful substances observed in the environment is similar to that of crops, domestic animals and humans.

Some of the most important properties required for test species are listed below:

- abundant occurrence in all kinds of habitat;
- stability of basic physiological parameters and of morphological features with limited ecological plasticity, related to the conditions of natural habitats;

- prompt response to anthropogenic factors and processes in ecosystems;
- tolerance of the above factor, i.e. resistance to long-term and intensive effects of a particular pollutant;
- fast metabolism, so that the effect of pollutants can be observed even at their trace concentrations
- long lifespan  $\Rightarrow$  to reveal consequences of chronic exposure
- fast reproduction (fast sequence of generations): for early detection of genetic changes, inherited defects and deformities  $\Rightarrow$  to reveal the effect of a pollutant on several generations of the same population;
- animals  $\Rightarrow$  must be located in a site of small size, then the variations can be related to the particular ecosystem;
- easy accessibility  $\Rightarrow$  consistency of batch examinations;
- attachment to a group of species with known basic physiological, biometric and population values;
- unaffected by crop growing and animal farming.

The best animal bioindicators are the following species: brown hare, roe deer, pheasant, common partridge, wild ducks and small rodents [2]. The examination of blood performed in some of the test organisms is very useful particularly for the determination of stress imposed on an organism [3].

The ecosystem under the stress imposed by indicator congeners of PCB was the subject of a number of detailed environmental studies conducted particularly on wild animals. Generally, most studies published in the available literature were conducted on roe deer and otters. The most common pollutants found were PCB congeners 138, 153 and 180, that also occurred in the highest concentrations [4, 5]. A comprehensive study conducted on foxes, which died of natural causes or were killed in a hunt, was published in Italy. PCB congeners 138, 153 and 180 accounted for 64% of the total sum of PCBs and their levels ranged from 1.0 to 2.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (calculated on fat) [6].

Wild game is a suitable animal bioindicator, which can be used to determine contamination in any ecosystem. When assessing external influences causing the contamination of game we must consider pollution monitoring performed in the area of former factories that produced commercial PCB mixtures. One example of such a contaminated environment is the area around the chemical plant Chemko Strážské in the Slovak Republic, where PCB mixtures with trade names Delor 103, Delor 106, Hydolor and Delotherm were produced [7]. Wild game is the most vulnerable species to be affected by the pollution of the ecosystem caused by extremely high contamination of air, soil and vegetation by xenobiotics. The levels of PCBs in serum, tissues and parenchymatous

organs of game was monitored in the experimental site "Orlová" located in the grounds of Chemko Strážské, where in the period from 1959 to 1984 the products containing PCBs were manufactured. One of the goals of the study was to reveal waste sites that were established illegally in the past. In 1997 the PCB concentrations detected in pheasants living in this area exceeded the permissible limit. As a result, the monitoring of these pollutants in predators of small animals such as stray cats and foxes was also initiated. The results of two years' monitoring have shown that PCBs are still present in the area, although the plant ceased the production in 1984. The highest concentrations of PCB congeners were detected in predators (stray cat, fox). An extremely high level of PCB 138 (14.7 mg/kg) – one hundred times above the permissible limit - was detected in a stray cat. The permissible limit for PCB 138 (according to regulations of the Ministry of Labour of the Slovak Republic and of the Ministry of Agriculture of the Slovak Republic No. 981/1996-100 - Food Code of the Slovak Republic) is 0.20 mg/kg.

A relatively high level of occurrence of PCBs was also detected in pheasants with the highest value of PCB 180 being 3.39 mg/kg (the permissible limit for PCB 180 was 0.15 mg/kg). The PCB levels in hares and wild boars were not as high as in pheasants; concentrations of PCB 153 and PCB 180 congeners in these animals were just above the permissible limit. For roe deer only one single detected value exceeded the permissible limit, while in deer the limit was not exceeded in any case. In 1998 the PCB levels found in the liver and muscles of all monitored wild animals were above the permissible limit. According to the authors this was probably caused by a high level of ground water in 1998 that flushed out persistent xenobiotic substances from illegal waste sites up to the surface. The highest PCB levels were found in animals occurring in the close vicinity of a factory site used for the transportation of commercial mixtures containing PCBs. Interestingly, PCB levels in muscles were higher than those in the liver of all species examined [8]. The results obtained during the monitoring of 30 different wild animals (hares, pheasants, wild boars, roe deer, deer) carried out between 1995 and 2000 showed that both maximum and average levels of PCBs were highest in pheasants; this trend applies particularly to PCB 153 (its average concentration was 8.53 mg/kg, its maximum concentration was 28.53 mg/kg). The highest concentration was 142 times higher than the permissible limit. It should be noted that the level of PCB 28 was relatively high and probably resulted from secondary contamination originating from the environment. The authors compared this result with the maximum value detected in pheasants in the Czech Republic in 1998 (1.79 mg/kg, calculated on fat). In spite of high levels of PCB138, PCB 153 and PCB 180 found in monitored animals the state of health of game living in the vicinity of Chemko Strážské was good [7]. To prevent negative consequences of the PCB production, barriers were built up in order to divert wild animals into



a neighbouring environment. Game is regularly examined for PCBs and the potential PCB sources in the area of the former production plant are controlled and isolated whenever possible [8].

The pollution of agricultural ecosystems can be monitored using animal bioindicators in which the levels of pollutants may be significantly higher in comparison with the levels currently detected in air, water and soil. Accumulation coefficient  $K_c$  [9] must be determined for all bioindicators employed in the monitoring as well as in the search for pollution sources.

Small terrestrial mammals can be used as bioindicators of ecotoxicological burden. The major benefit is that analyses of relatively large sets of animals yield factual information on the area under study. It has been recommended to prefer those animals which feed on plants, such as species of the genera *Microtus*, *Clethrionomys*, and *Apodemus* [1].

Studies focused on the concentration of PCB in tissues of small terrestrial mammals are rather rare and all contain only data on sum of PCB lacking congener analyses. Results of comprehensive ecotoxicological studies of the effects of PCB on mice, published by other authors, who used white footed mice (*Peromyscus leucopus*), indicate that this species is a suitable bioindicator [10; 11].

## MATERIAL AND METHODS

The game animals and small terrestrial mammals (localities Velká Losenice, Staré Město) to be analysed for PCB were collected in 1996 to 1998. The game animals were trapped and prepared for analyses with specialists of the University of Veterinary Sciences Brno. The small terrestrial mammals were trapped and prepared for analyses on contract with the specialist of the Institute of Landscape Ecology of the Czech Academy of Sciences, Brno. Catches were collected at 24-h intervals, transported to the laboratory and stored at  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  until dissection. Species and gender were identified and sexual activity was determined by dissection [2].

Kidneys, livers, muscles, skins, and the rest of the digestive tract were collected separately. Individual samples were too small and the content of lipids too low for separate analyses. Therefore, composite samples were prepared and PCB were determined in the skin, muscles, digestive tract and/or livers. Kidney samples were unusable owing to their small size and low weight.

### Chemicals

Anhydrous sodium sulphate (analytical grade), heated in a muffle furnace at  $650\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 4 h; Florisil 60/100 mesh, cleaned and heated at  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; aluminium oxide (chromatography grade), cleaned and heated at  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; before use, the sorbents were activated in a hot-air oven at  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The activated sorbents can be stored in brown wide-neck bottles in a desiccator for 3 days; n-hexane, residue analysis grade; petroleum ether (analytical grade, boiling point  $40\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), additionally distilled twice in a ground-glass apparatus; diethyl ether, analytical grade, bidistilled, peroxide-free and dried over anhydrous sodium sulphate; acetone, (residue analysis grade); sulphuric acid 96 % (Suprapur, Merck); n-hexane, isooctane (SupraSolv; Merck), elution mixtures n-hexane-diethyl ether (94:6), n-hexane – acetone (94:6).

Standard PCB congener mixture in isooctane with a concentration of  $10\text{ }\mu\text{g}$  of each congener per 1 ml (Pro-mochem, Germany); standard PCB congener mixture in n-hexane with a concentration of  $100\text{ }\mu\text{g}$  of each congener per 1 ml (J.T.Baker); reference material of Dr. Ehrenstorfer company (Lard with Pesticides and PCBs, R 900100; NIST, standard reference material 2974 Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue).

### Preanalytical procedures

Lipid content was determined gravimetrically. Homogenized samples were dried with anhydrous sodium sulphate and lipids were extracted continuously with diethylether for 6 hours. The solvent was evaporated and the extracted lipids were weighed and expressed in g per 100 g of tissue. Lipids to be analysed for PCB were extracted in the same way, except for the solvent which was a 94 : 6 mixture of n-hexane : diethylether.

PCB indicator congeners were determined using the Standard Operation Procedures of the Laboratory of Organic Pollutants, which are included in the Laboratory Manual: animal tissues were homogenized, ground with dried anhydrous sodium sulphate, sonicated and extracted three times with cold petroleum ether/diethyl ether (96:4). The extracts were pooled after reducing their volume to 1 ml in a rotary vacuum evaporator, and cleaned on a column of Florisil. The volume of the cleaned extract was reduced to 1 ml and the extract was prepared for High Resolution Gas Chromatography with Electron Capture Detector (HRGC/ECD). All measurements were done in three duplicates.

### Analytical methods

Gas chromatograph, Hewlett-Packard 5890 Series II with ECD  $^{63}\text{Ni}$  (USA); capillary column HP 5 (60 x 0.25 mm, film thickness  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ); 5 % phenylmethylsilicone; split/ splitless injector (150s); temperature  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , injector volume  $0.1\text{ }\mu\text{l}$  "hot needle" technique. Carrier gas: helium - linear speed  $16.5\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ; temperature programme:  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min followed by an increase at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  and at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min; detector  $^{63}\text{Ni}$  ECD, temperature  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pressure programming: constant flow at  $1.0\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Quantitative assessment was carried out using the external standard method (absolute calibration) within the linear range of the detector. Regarding the wide range of

concentrations of the analytes under study to be expected in real samples, a calibration range of 0.1 to 500 ng per 1 ml of the standard working solutions was chosen corresponding to 0.1 to 500 pg in the injected volume of 0.1 µl. Under the conditions of our analyses, the following detection limits (µg per ml) for ECD were defined: PCB 28 – 0.01; PCB 52 – 0.01; PCB 101 – 0.02; PCB 138 – 0.02; PCB 153 – 0.02; PCB 180 – 0.02.

## RESULTS AND DISCUSSION

For purposes of greater clarity, the results obtained in our study are summarized in tables and depicted in figures. The basic statistical parameters (median, range and SD) are introduced for each PCB congener. Table 1 shows that the lowest concentrations were found for PCB 101 and that in most cases the findings were below the detection limit. PCB 28 and PCB 52 were mainly detected from a group of low-chlorinated PCBs. The concentrations detected indicate that atmospheric deposition also contributed significantly to pollution. Increased levels of PCB 28 and PCB 52 congeners are typical of this site, which was highly conta-

minated by both analytes in the past. The matrices examined came from the region where Delor 106 (a commercial product containing PCBs, which was manufactured in the former Czechoslovakia) had been used for the production of paints and varnishes before 1986. Our findings can be compared with the data published in Slovakia on the monitoring of the surroundings of Chemko Strážské where commercial products containing PCBs (Delors) were manufactured [7, 8].

The mean as well as individual concentrations of high-chlorinated PCBs, such as PCB 118, 138, 153 and 180, did not reach or exceed the permissible limit valid for game in the Czech Republic. However, the occurrence rate of these congeners is alarming. If we compare our data to those reported by the State Veterinary Administration of the Czech Republic it is obvious that our findings are higher than the average values nationwide. On the contrary, some of the individual concentrations of indicator PCB congeners found in game living in different sites of the Czech Republic are orders of magnitude higher. The permissible limit from 2000 to 2001 for game was exceeded only three times.

TABLE 1 - Basic statistical parameters of PCBs in bioindicator samples [µg/kg f.c.] (n=25).

PCBs congeners		hare muscle	hare liver	roe deer muscle	roe deer liver	fallow deer muscle	fallow deer liver
28	mean	6.4	6.9	4.9	7.2	9.4	13.3
	median	5.8	7.1	4.8	7.0	8.9	12.8
	range	2.2-9.6	1.9-9.0	1.8-6.6	3.5-10.2	6.6-14.8	9.1-18.6
	SD	0.7	0.8	0.5	0.8	0.9	0.6
52	mean	1.9	4.3	3.4	3.9	4.0	5.2
	median	2.0	4.1	3.2	4.0	3.7	5.5
	range	1.0-4.3	2.2-6.0	1.9-5.3	2.8-6.9	1.7-5.8	3.2-7.4
	SD	0.5	0.8	0.7	0.3	0.8	0.4
101	mean	<1	1.1	<1	1.0	2.2	3.9
	median	<1	1.0	<1	1.4	2.6	4.1
	range	x	1.0-1.8	x	<1-1.6	0.9-3.2	2.8-5.4
	SD	x	0.6	x	0.3	0.5	0.8
118	mean	1.0	2.9	2.2	5.3	2.9	8.8
	median	1.2	2.8	2.4	5.0	3.2	9.0
	range	<1-2.2	<1-4.0	1.0-4.2	3.8-7.1	1.7-5.2	7.3-10.9
	SD	0.8	0.7	0.9	0.6	0.5	0.8
138	mean	24.1	34.7	17.9	33.2	18.4	39.3
	median	23.8	35.3	18.2	31.9	17.9	40.6
	range	18.9-29.8	30.6-40.4	12.9-22.7	26.6-37.4	10.2-20.8	30.6-45.9
	SD	0.9	1.2	1.3	1.5	1.5	1.3
153	mean	15.6	18.7	15.2	22.3	14.8	20.4
	median	16.2	19.3	14.9	22.9	15.3	20.8
	range	10.7-21.0	14.6-21.5	10.2-17.9	18.4-27.8	9.9-19.8	12.7-26.4
	SD	1.0	1.2	1.3	1.5	1.0	1.1
180	mean	4.9	8.3	6.9	10.4	5.1	7.4
	median	5.2	7.8	7.3	10.9	4.8	7.0
	range	3.0-7.3	6.1-10.2	4.9-8.6	7.9-13.8	2.6-7.7	4.7-8.8
	SD	1.0	0.9	0.9	1.3	1.4	1.4

x – not evaluated; SD – standard deviation; n – number of samples



TABLE 2 - Basic statistical parameters of PCBs in bioindicator samples [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  f.c.] (n=18).

PCBs congeners		pheasant muscle	pheasant liver	dead bees	carp muscle	Carp soft roe
28	mean	3.6	9.8	4.2	8.0	10.1
	median	2.9	10.6	3.8	7.7	9.6
	range	1.6-7.2	6.9-14.6	2.6-6.3	5.9-10.0	8.3-12.5
	SD	1.3	1.6	1.1	0.9	0.7
52	mean	2.1	2.9	1.9	2.5	3.4
	median	2.2	3.3	1.7	2.7	3.0
	range	1.0-3.8	1.7-5.9	1.0-2.6	1.3-3.9	2.2-5.0
	SD	0.5	0.6	0.5	1.0	0.7
101	mean	1.7	3.0	<1	1.6	2.0
	median	1.6	3.2	<1	1.8	2.0
	range	1.1-4.0	2.2-6.2	x	1.0-2.4	1.0-2.9
	SD	0.5	0.8	x	0.6	0.8
118	mean	1.9	3.9	1.0	12.8	17.6
	median	2.3	4.4	1.4	11.9	16.8
	range	1-5.6	2.8-7.6	<1-1.9	7.7-14.8	12.6-19.9
	SD	0.8	0.9	0.5	0.8	0.8
138	mean	19.6	32.5	20.9	82.4	78.5
	median	21.4	31.9	19.7	80.6	79.2
	range	13.5-30.2	25.0-43.1	13.5-26.8	65.7-94.8	63.3-90.8
	SD	1.3	1.8	0.8	1.1	0.5
153	mean	10.7	19.9	8.4	14.3	15.5
	median	11.7	19.0	7.7	12.9	14.8
	range	7.7-14.8	10.3-26.2	5.4-11.7	9.2-18.3	10.7-18.4
	SD	0.8	1.3	1.3	0.9	0.8
180	mean	9.6	13.0	6.3	4.3	3.3
	median	10.6	13.3	5.9	4.0	3.5
	range	6.9-15.0	9.8-16.6	2.9-8.6	2.5-6.3	2.3-6.9
	SD	0.8	0.7	0.8	0.5	0.4

x – not evaluated; SD – standard deviation; n – number of samples

Table 2 presents the concentrations of indicator PCB congeners in bioindicators of other animal origin. It provides the PCB concentrations found in the tissues of pheasants, in the bodies of dead bees and in carp muscles and milt. Samples of all these matrices were taken at the same site as those described in Table 1. Obviously, the trend of the results is similar to that found in the bioindicators of the first group of animals. Therefore, it may also be assumed that in this case the pollution originated from a contaminated region (reclaimed and illegal waste sites with disposed waste and paints) and also from secondary contamination arising from atmospheric transfer. The lowest concentrations were found for PCB 101 and 118 (bodies of dead bees), while the highest concentrations were detected in matrices originating from carp. The amounts of these PCBs detected in single carp muscles and milt were 94.8 and 90.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of fat content (f.c.), respectively.

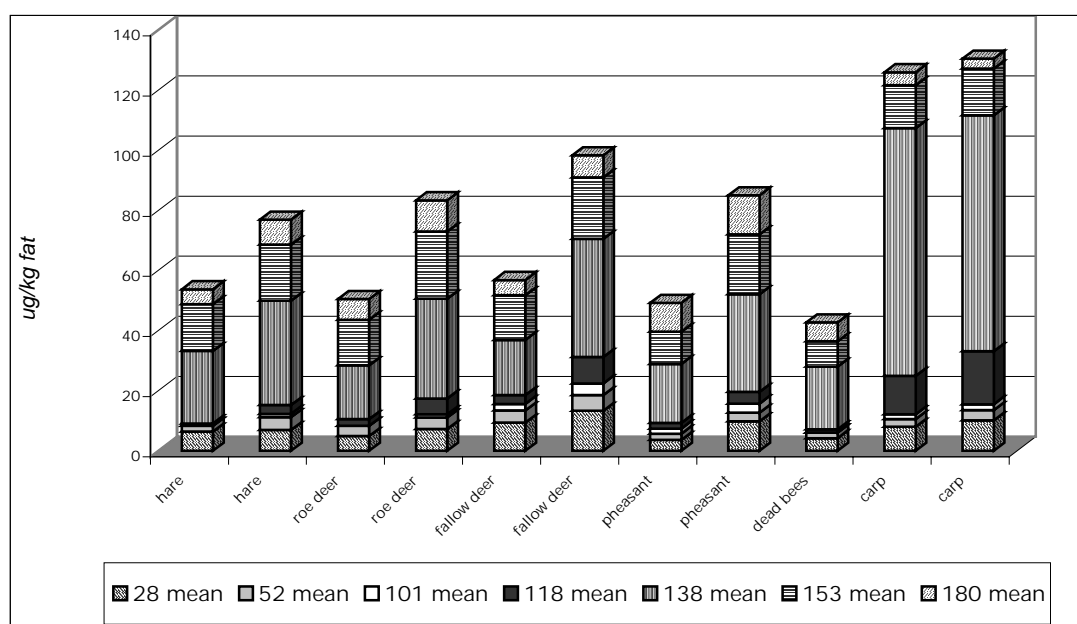
Table 3 provides an overview of the findings determined in small ground-living animals. In addition to the

data obtained in the contaminated site at Staré Město, it contains the levels of pollutants found at the Velká Losenice site, that is considered to be a “clean site” of the Czech Republic. These data show that there were no significant differences in the concentrations of the analytes monitored. Furthermore, the results prove unambiguously that small ground-living mammals belong to a group of bioindicators that are closely related to the particular site and can reliably indicate the strain on the particular ecosystem. This gives us a clear signal of the presence of a source of contamination, that also occurred at this “clean site”. This was probably a former waste site established in the past by an industrial or agricultural plant, which used commercial products containing PCBs. If we compare our results with the data published worldwide, it is obvious that the levels of analytes monitored in particular matrices were similar; the only differences occurred in the pollutant levels in muscles. However, this may be connected to the age and weight of single strains of mice. It was not clear from the literature how old the respective animals were [3, 12].

TABLE 3 - Basic statistical parameters of PCBs in mice samples [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  f.c.].

PCBs congeners		Locality - Velká Losenice (n=15)			Locality - Staré Město (n=15)		
		skin	liver	muscle	skin	liver	muscle
28	mean	1.6	3.5	1.4	2.8	4.2	1.9
	median	1.9	3.7	1.6	3.1	4.0	2.2
	range	<1-2.2	2.3-4.9	1.0-2.2	2.0-4.2	2.8-6.2	<1-3.2
	SD	0.4	0.6	0.5	0.8	0.5	0.7
52	mean	1.3	1.9	1.3	1.5	2.3	1.3
	median	1.1	2.1	1.5	1.6	2.6	1.5
	range	<1-1.7	1.1-3.3	1.0-2.1	<1-1.9	1.9-6.0	<1-2.6
	SD	0.3	0.6	0.4	0.3	0.6	0.3
101	mean	2.0	2.9	1.6	1.2	2.5	2.2
	median	2.3	3.0	1.5	1.4	2.9	2.0
	range	1.3-2.9	1.8-4.1	<1-2.6	<1-1.7	1.4-4.7	1.2-4.4
	SD	0.7	0.6	0.3	0.2	0.8	0.9
118	mean	4.3	6.3	2.4	3.6	7.0	4.1
	median	4.0	6.0	2.9	2.9	7.4	4.4
	range	2.9-5.1	5.0-7.4	1.8-3.3	1.7-5.2	3.7-9.2	2.8-7.3
	SD	0.6	0.6	0.8	1.1	0.9	0.8
138	mean	12.9	23.5	8.9	15.4	25.6	10.3
	median	13.3	24.1	8.9	14.9	25.9	11.2
	range	11.2-17.4	18.9-31.3	6.7-12.1	11.8-19.6	19.1-32.3	6.9-13.6
	SD	0.9	0.7	0.8	0.6	0.8	0.9
153	mean	10.8	16.8	6.5	9.8	18.2	7.5
	median	10.7	17.2	7.0	9.2	19.3	7.7
	range	9.5-13.1	12.8-20.9	3.8-10.9	7.8-10.9	10.7-24.5	4.8-9.3
	SD	0.9	1.4	1.0	0.9	1.5	1.0
180	mean	6.9	11.2	2.9	6.3	13.4	4.4
	median	6.3	10.6	3.1	6.7	14.1	4.3
	range	5.2-8.7	8.1-14.7	1.7-6.2	5.0-7.9	8.2-19.7	2.9-8.3
	SD	0.6	0.8	0.8	0.6	0.9	0.9

x – not evaluated; SD – standard deviation; n – number of samples

FIGURE 1 - Concentrations of all indicator PCB congeners ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  of f.c.).

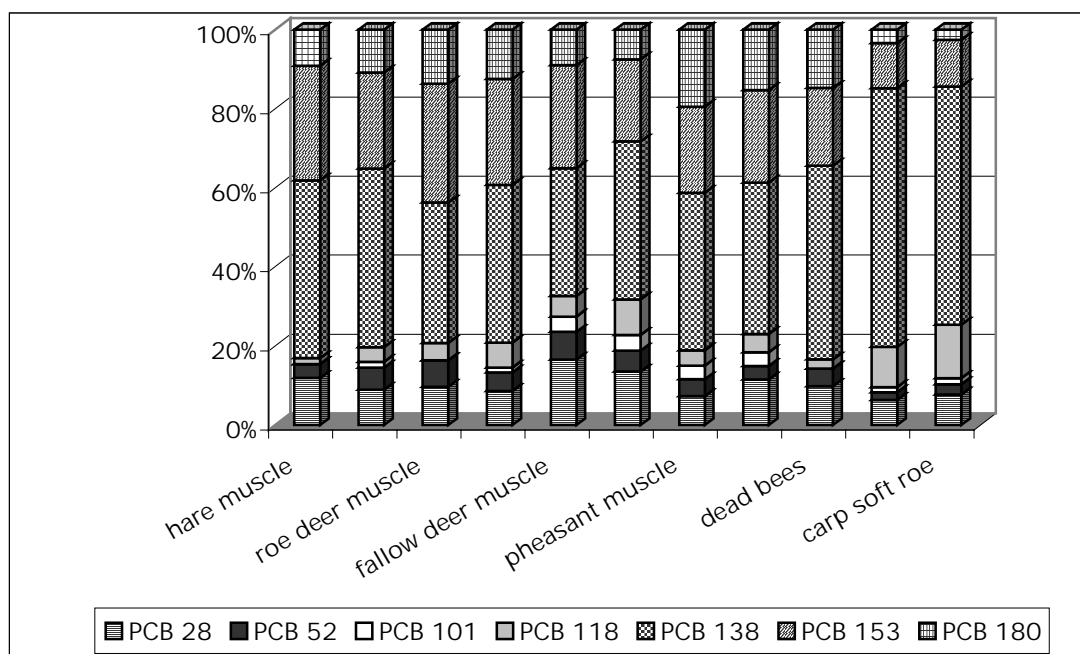


FIGURE 2 - Contents of individual PCB congeners by percentage in all the materials monitored.

For better clarity, Fig.1 shows the concentrations of all indicator PCB congeners ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  of f.c.) detected in the matrices specified above. From the results, it is obvious that in all the materials the highest concentrations were found for PCB 138 and 153; high values were also found for PCB 28 and 180. Fig. 2 depicts the contents of individual PCB congeners by percentage in all the materials monitored. The columns in the Fig. are arranged in a manner, that for each animal strain the first column indicates the muscles and the second, the liver (or the milt, for carp). The figure also shows that the hydrosphere, for which the sediment was the most contaminated, contains PCB 138 as the most common pollutant.

In our research we addressed the problem of using game and small ground-living mammals to evaluate the levels of contamination by organic pollutants, particularly by PCB. During the experimental monitoring the question emerged as to whether it was at all necessary to observe the provisions of Act No. 246/1992 Coll. relating to the Protection of Animals against Maltreatment and related regulations and guidelines as amended. Provided that the treatment of small ground-living mammals captured for the purpose of research is classified as an experiment, the following laws and regulations which define the conditions and rules for using wild animals in experiments, must be observed: Act No. 246/1992 Coll. relating to the Protection of Animals against Maltreatment as amended by Act No. 162/1993 Coll., Act No. 193/1994 Coll., Act No. 243/1997 Coll., and by Constitutional Court Verdict

No. 30/1998 Coll., Regulation on the Breeding and Use of Laboratory Animals No. 311/1997 Coll., the Veterinary Care Act and amendments to related laws (Veterinary Care Act) No. 166/1999 Coll., Act No. 114/1992 Coll. concerning the Protection of Nature and Landscape and related laws as amended, Regulation No. 395/1992 Coll., which implements certain provisions of the Act concerning the Protection of Nature and Landscape, Act No. 16/1997 Coll. relating to the conditions of the import and export of endangered wild animal and plant species and other measures for the protection of these species as amended, Regulation No. 82/1997 Coll., which implements certain provisions concerning the conditions of the import and export of endangered wild animal and plant species and other measures for the protection of these species.

## CONCLUSIONS

Indicator PCB congeners were monitored in the matrices of selected bioindicators of animal origin, that occurred in the site where Delor 106 was used during the manufacture of paints and varnishes from 1970 to 1985 and where there was a factory for the preparation of pre-coated gravel using a technological procedure requiring Delor 103. It was shown that game, small ground-living mammals, fish and the bodies of dead bees can be employed as sensitive indicators of the pollution in a particular ecosystem. The lowest concentrations of PCBs were found for PCB 101 and 118, while the highest concentra-

tions were detected for PCB 138 in all the mentioned materials. In terms of absolute values the highest concentrations of PCB congeners were found for the following matrices: PCB 28 – 18.6 µg/kg f.c. (fallow deer liver), PCB 52 – 7.4 µg/kg f.c. (fallow deer liver), PCB 101 – 6.2 µg/kg f.c. (pheasant liver), PCB 138 – 94.8 µg/kg f.c. (carp muscle), PCB 153 – 27.8 µg/kg f.c. (roe deer liver), PCB 180 – 19.7 µg/kg (mouse liver). On the basis of our study it can be concluded that all the tested bioindicators of animal origin can be used for evaluating the level of contamination in various ecosystems.

### ACKNOWLEDGEMENT

Financial support of this work from Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, project CEZ:16/98 Nr. MSM 16270004.

### REFERENCES

- [1] Nováková E.: Use of mammals and birds in landscape ecology. *Lesnictví*, 16, p. 1031 - 1040 (1970)
- [2] Nováková E., Paukert J.: Regional station "GEMS" 1. Vol. Institute of hydrometeorology Prague. p. 142 – 148 (1972)
- [3] Šťastný K., Šolc J.: In Bioindication at a level of populations and biogeozones 2 (Bioindication 5) KTB Martin-Luther-University, Scientific contributions. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wissenschaftliche Beiträge, 28 (P 12), p. 68 (1980)
- [4] Kruuk H., Conroy J. W. H.: Concentration of some organochlorines in otters (*Lutra lutra* L.) in Scotland: implications for population. *Environ. Pollut.*, 9: 165 (1996)
- [5] Bruun M., Georgii S., Bachaur G., Elmadfa I.: Wild animals as indicators of environmental contamination – prevalence of radionuclides, polychlor biphenyls, organochlorine pesticides in roe deer and foxes in Hessen. *Tierärztliche-Umschau*, 46: 549 (1991)
- [6] Corsolini S., Focardi S., Kannan K., Tanabe S., Tatsukawa R.: Isomer specific analysis of polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8 tetrachlordibenzo-p-dioxin equivalents (TEQs) in red fox and human adipose tissue from central Italy. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 61 (1991)
- [7] Ciberej J., Bilá A., Breyll I.: Information about monitoring of PCB in wild animals living at the territory of Chemko Strážské plant. In: Conference about environmental problems on the occasion of awarding the Certificate of Environmental management system according to STN EN ISO 14001. Proceedings Stážské 7.9.1999. p. 16-21 (1999)
- [8] Ciberej J., Breyll L., Kováč G.: Influence of the environment on the state of health of wild animals living at the territory of Chemko Strážské plant. In: Conference about environmental problems on the occasion of awarding the Certificate of Environmental management system according to STN EN ISO 14001. Proceedings Stážské 7.9.1999. p. 43-45 (1999)
- [9] Adams W. J., Kimerle, R. A., Barwett, I.W.: Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 26, p. 1864 (1992)
- [10] Bejček V.: Influence of forestry recultivation of dumps after open-cast coalmining of brown coal on small mammals communities. *Reports of District Museum in Most*. 3, p. 117 - 131 (1981)
- [11] Dykijová D. a kol.: Methods for study of ecosystems. Akademia Praha, 690 pp. (1989)
- [12] Kočan A., Petrik J., Jursa S., Drobna B., Chovancová J., Suchánek P.: PCB production in Slovakia and environmental contaminations. In Proceeding of the 2<sup>nd</sup> PCB workshop "Recent advances in the environmental toxicology and health effects of PCBs (Emphasis on the latest advances and the perspective of Central and Eastern Europe)", book of abstracts, May 2002, p. 10, RECETOX Brno (2002)

Received for publication: July 13, 2002  
Accepted for publication: December 16, 2002

### CORRESPONDING AUTHOR

**M. Vávrová**  
University of Veterinary and Pharmaceutical  
Sciences Brno  
Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology  
Department of Veterinary Ecology and  
Environmental Protection  
Palackého 1-3  
612 42 Brno - CZECH REPUBLIC  
e-mail: vavrovam@vfu.cz

# **Příloha B3:**

VÁVROVÁ, M.; KOŘÍNEK, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E.  
Plant bioindicators as a tool for evaluation of agrarian ecosystems. *Fresenius  
Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 2, p. 219-226. ISSN: 1018- 4619.

# PLANT BIOINDICATORS AS A TOOL FOR EVALUATION OF AGRARIAN ECOSYSTEMS

Vávrová, M.<sup>1</sup>, Šucman, E.<sup>2</sup>, Zlámalová Gargošová, H.<sup>1</sup>, Kořínek, P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Biochemistry and Biophysics, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Regional Hygienic Station Brno; Czech Republic

## SUMMARY

Concentrations of indicator PCB congeners were determined in plant samples collected in an area where a paint factory using PCBs as primary materials had operated in the seventies and eighties. The sampling sites included recultivated legal waste dumps and places of cleared illegal waste dumps. In addition to alfalfa, rape, and cereals, included among the EPA bioindicators, stinging nettle, corn camomile, saltweed, and bindweed were sampled as typical representatives of dump vegetation. Further, the contamination of browsing plants which forms a food basket basis for game animals, was evaluated. Results of HRGC/ECD analyses unambiguously demonstrated that failure in safe disposal of waste materials containing PCBs can result in a significant contamination of all compartments of the ecosystem, in particular of the hydrosphere and pedosphere. Some species of dump vegetation (stinging nettle, corn, camomile, saltweed) have proved to be excellent bioindicators, particularly for areas where cultured plants are not available.

**KEYWORDS:** Agrarian ecosystem, plant bioindicators, dump vegetation, cultured plants, browsing plants, polychlorinated biphenyls indicator congeners, high resolution gas chromatography/electron capture detector analysis.

## INTRODUCTION

Bioindicators rank with matrices in which concentrations of organic pollutants may considerably exceed those found in air, water, sediments, or soil. Bioindicators, which are frequently used in monitoring studies and screenings, should allow selective and specific determination of contaminants not only in all compartments of the environment, but also in all links of food chains of species

living in the area under study. Contaminants detectable by use of bioindicators include also PCB indicator congeners 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, which rank with priority pollutants monitored in the Czech Republic [1]. Plant bioindicators are used in the Czech Republic in environmental studies of agrarian ecosystems where they can yield information for both conventional monitoring and biomonitoring. The most frequently used plant species are alfalfa, cereals, and oil plants [2]. Of great importance is the source of contamination. Monitoring of PCBs can often identify long-distance transmission as one of the contamination sources. Airborne volatile PCBs can originate from various sources including agricultural production [3]. Thus, PCBs penetrate into plant tissues and influence the contamination level. Papers dealing with the contamination of crops by xenobiotics are rather scarce. Most of the respective investigations were carried out in fodder plants and were oriented rather on effects of feeding of contaminated crops to farm animals [4]. No detailed studies concerning the use of plant bioindicators were found in available literature.

Game species are often used in the assessment of environmental pollution of agrarian ecosystems, because they consume a variety of plant species including both those typical of dump vegetation and cultured crops, such as alfalfa, fodder plants, cereals, and oil plants. Part of their food basket is also leafage of various bushes growing on balks and/or game refuges. Such plants are called here browsing plants. Knowledge of the level of contamination of this link of the food chain is, therefore, necessary for studies of transfer of xenobiotic [4, 5]. Comprehensive studies of plant contamination were completed in Moravian areas affected by disastrous floods in 1997 and 1998. Effects of floods on the contamination of soil and vegetation by persistent organic substances are summarized in the „Report on the 1998 Monitoring Results - Hazardous Substances within Food Chains and Influenc-

ing Imputes published by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic in 1998 [6]. A similar study was focused on the passage of contaminants from plants into tissues of wild animals [7,8].

There is not a lot of information in the literature available, dealing with a contamination of plant material and/or soil by PCBs. Various studies published till now are focused on biodegradability effects and/or transfer of such contaminants from lower to higher links of food chain. The effects of the phytogetic surfactant soya lecithin on the aerobic biodegradation of PCBs spiked into a synthetic soil were studied. Soil was spiked with both biphenyl (4 g/kg) and Fenclor 42 (1 mg/kg) and treated in aerobic batch slurry-phase microcosms (17.5 % w/v). In the presence of soya lecithin, a higher availability of biphenyl- and chlorobenzoic acid – degrading bacteria and higher PCB biodegradation and dechlorination yields were observed; the effects increased proportionally with the concentration of the soya lecithin applied. A significant decrease of soil ecotoxicity was also revealed in soya lecithin supplemented microcosms [9]. Another study was focused on accumulation of soil originated PCBs in plants [10]. The present study concerns PCB accumulation in soil at two depths as well as in *Taraxacum officinale* plants. An analysis of the distribution of different groups of PCB congeners in plant and soil material revealed the highest content of hexa and hepta chlorinated biphenyls fractions. Statistical test of pair comparison has revealed significant differences in accumulation rates for the following pairs: pentachlorinated congeners are accumulated at a higher rate than tetrachlorinated ones and hexachlorinated congeners are accumulated at a higher rate than pentachlorinated ones. This phenomenon occurs in the area of railway junctions (areas heavily polluted with oil derivatives).

## MATERIAL AND METHODS

Plant samples including alfalfa, cereals, oil plants and dump vegetation, were collected from recultivated waste dumps and old neglected dumps of a paint-producing factory in the Middle Moravian region and tested for the content of indicator PCB congeners. Browsing plants constituting the main component of a food basket of game animals were collected in the same area. Samples were collected five times during the *April - August* using standard procedures used in the Czech Republic within the monitoring of environmental pollution. For each species, 3000 g of plant mass was collected as a composite sample. The mass was homogenized and 300 g were taken as a laboratory sample. Five aliquots of approx. 50 g were analyzed and the results were expressed as means of the 5 concurrent analyses.

### Chemicals

Solvents: n-hexane, residue analysis grade; petroleum benzene, boiling range 40-60°C; diethyl ether, analytical

grade, bidistilled, peroxide – free; acetone, residue analysis grade; n-hexane, isooctane (SupraSolv; Merck), elution mixture n-hexane – acetone; sulphuric acid 96 % (Suprapur Merck); anhydrous sodium sulphate, analytical grade, annealed in a muffle furnace at 650°C for 4 h; Florisil, 60/100 mesh, cleaned and annealed at 600°C, aluminium oxide, chromatography grade, cleaned and annealed at 400°C (before use, the sorbents were activated in a hot-air drier at 130°C; SPE with C<sub>18</sub> and Florisil; standard PCB congener mixture in isooctane with a concentration of 10 µg of each congener per 1 ml (Promochem, Germany), standard PCB congener mixture in n-hexane with a concentration of 100 µg of each congener per 1 ml (J.T.Baker, Holland). Analytical standards for PCBs (congeners No. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Germany). The concentration of PCBs in the working solution (test mixture) was 0.2 µg/ml.

### Preanalytical procedures

PCBs were separated by fivefold extraction (50g dry plant material) with 70 ml n-hexane-acetone (94+6) mixture under intensive shaking for 20 minutes. Pooled extracts were concentrated to the volume of 10 ml and then cleaned by acid hydrolysis with conc. sulfuric acid (96–98 %) at the ratio 10+1. Organic extract was quantitatively transferred in to vacuum rotary evaporator, evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of n-hexane. this solution was cleaned by SPE in columns with C<sub>18</sub> and Florisil packing.

### Analytical methods

PCBs were identified and quantified by HRGC/ECD using two different packings to confirm the result; columns HP 5 and HP 17 (length 60 m, 0.25 mm i.d.) film thickness 0.2 µm “hot needle” technique. Carrier gas: helium-linear speed 16.5 cm/s; temperature program 40°C for 5 min followed by increase at 30°C to 180°C and at 2°C/min to 280°C and 280 °C for 10 min; detector <sup>63</sup>Ni ECD, temperature 300°C. Quantitative assessment was carried out using the external standard method (absolute calibration) within the linear range of the detector. Working characteristics: detection limits for all PCB congeners were 1 ng/kg, relative standard deviations (%) were PCB 28 (15), PCB 52 (22), PCB 101 (18), PCB 118 (15), PCB 138 (20), PCB 153 (20) ad PCB 180 (15).

The estimate of the detection limits was defined as a treble value of RSD for concentration approaching zero. RSD for the concentration 0.05 µg/ml was lower than 8% for any of the congeners. Principles of QA/QC and GLP were adhered to throughout sample processing and analyses.

## RESULTS AND DISCUSSION

Unlike animal bioindicators, analyses of most of the plant indicators are used in ecosystem evaluation studies rather as a complementary. Nevertheless, they should be



used within comprehensive evaluations of ecosystem pollution, because they can yield valuable information on impacts of ambient air concentrations as well as in extreme situations, such as flood.

Plant species used within our study for the assessment of ecosystem pollution were divided into two groups. The first one includes typical dump species (stinging nettle, saltweed, bindweed, grass, corn camomile) and the other, cultured crops (sunflower, rape, wheat, alfalfa) included in the Czech Republic and also by EPA among bioindicators.

Table 1 presents concentration ranges for PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180 found in typical plant bioindicators. In the sunflower concentrations of PCB 28, 118, 138, 180 were found to be below the limits of detection, while concentrations of PCB 52 and 101 gave evidence rather for secondary contamination from low chlorinated PCBs. Very similar trend was demonstrated in rape and wheat. In alfalfa the concentrations of PCBs 101 and 118 were below the detection limit and those of the remaining indicator congeners were rather low. This tendency is in line with results of various monitoring programs of the Ministry of Agriculture and Ministry of Environment of the Czech Republic.

**TABLE 1**  
Content of PCB indicator congeners in plant bioindicators: cultured plants [ $\mu\text{g}/\text{kg d.m.}$ ] (n = 22).

PCB congeners		sunflower	rape	wheat	alfalfa
28	mean	<1	2.9	1.3	1.3
	median	<1	3.4	1.5	1.6
	range	x	2.1-5.0	<1-2.1	1.0-2.1
	SD	x	0.4	0.6	0.7
52	mean	1.5	1.1	1.0	1.3
	median	1.6	1.2	1.0	1.2
	range	1.0-2.0	1.1-1.5	<1-1.1	1.2-1.4
	SD	0.6	0.3	0.2	0.3
101	mean	1.0	1.0	1.0	<1
	median	1.0	1.0	1.0	<1
	range	<1-1.2	<1-1.1	<1-1.1	x
	SD	0.2	0.1	0.1	x
118	mean	<1	1.3	<1	<1
	median	<1	1.4	<1	<1
	range	x	<1-1.9	x	x
	SD	x	0.5	x	x
138	mean	<1	1.1	1.9	3.0
	median	<1	1.2	2.0	2.9
	range	x	<1-1.2	<1-3.0	1.9-4.2
	SD	x	0.3	1.1	1.3
153	mean	<1	<1	1.7	2.2
	median	<1	<1	1.5	2.3
	range	x	x	<1-2.1	2.0-2.6
	SD	x	x	0.5	0.4
180	mean	<1	<1	<1	1.0
	median	<1	<1	<1	1.0
	range	x	x	x	<1-1.2
	SD	x	x	x	0.3

x - not evaluated

SD - standard deviation



**TABLE 2**  
Content of PCB indicator congeners in plant bioindicators: dump vegetation [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m.] (n = 19).

PCB congeners		stinging nettle	orache	camomile	grass	bindweed
28	mean	1.9	2.6	2.4	2.7	2.2
	median	2.0	2.9	2.6	2.5	2.1
	range	1.2–3.2	2.1-3.6	1.9-3.2	1.8-3.3	1.0-3.0
	SD	1.1	0.9	0.6	0.8	1.0
52	mean	1.5	1.0	1.5	1.5	1.5
	median	1.4	1.1	1.3	1.4	1.6
	range	1.0-2.2	<1-1.5	1.1-2.2	1.2-2.1	1.0-2.3
	SD	1.0	0.3	0.6	0.6	0.9
101	mean	<1	<1	1,0	<1	<1
	median	<1	<1	1,0	<1	<1
	range	x	x	<1-1,2	x	x
	SD	x	x	0,1	x	x
118	mean	1.0	<1	1,0	<1	<1
	median	1.0	<1	1,0	<1	<1
	range	<1-1.1	x	<1-1.2	x	x
	SD	0.1	x	0.2	x	x
138	mean	4.5	2.9	2.6	4.1	2.7
	median	4.2	3.0	2.7	3.9	2.8
	range	2.2-8.3	2.0-5.2	2.2-3.8	2.7-7.2	1.0-5.1
	RSD	1.6	1.0	0.6	2.1	1.3
153	mean	3.4	3.2	2.7	3.9	2.8
	median	3.5	3.3	2.9	3.6	2.7
	range	1.6-7.2	2.2-7.6	1.9-5.6	1.8-5.5	1.0-3.8
	SD	1.5	1.9	1.2	0.9	0.8
180	mean	2.1	1.0	1.6	1.5	1.0
	median	1.9	1.0	1.4	1.7	1.1
	range	1.0-3.9	<1-1.4	1.1-2.2	1.2-2.4	<1-1.3
	RSD	0.8	0.2	0.5	0.6	0.2

x - not evaluated; SD - standard deviation

The highest individual value of 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  was found for PCB 138 (alfalfa). All concentrations corresponded to background values established in the Czech Republic within the program „Assessment of the State of Environment“. Very low concentrations were found in cereals. The highest value of 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (PCB 138) was demonstrated in a single sample (wheat). Similar concentrations were also found in samples of sunflower and rape. Mean value for concentrations in rape was somewhat higher with the maximum of 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for PCB 28 in one sample. In this case, the contamination was due rather to the ambient air burden of the respective agrarian ecosystem.

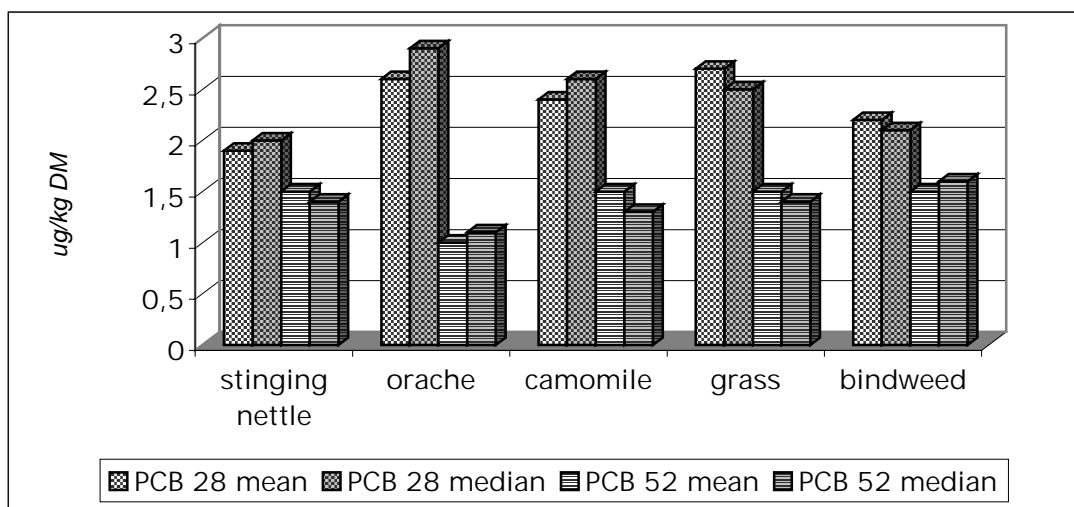
Such contamination could not have originated from the waste dump of the paint-producing factory, where higher-chlorinated PCBs were used. Secondary airborne contamination was more likely in this case.

Higher PCB concentrations were demonstrated in dump plants of which 5 species were sampled and analyzed. The samples given in Table 2 were collected from a waste dump of a paint-producing factory. Table 2 shows that the concentrations of any indicator congeners were markedly higher in the species typical for the lower level of the vegetation. The higher concentrations of PCBs 138 and 153 found in grass can be attributed to elution of intact paints from the dump. The rather high concentration of PCB 28 indicates that secondary contamination should also be considered. Similar tendencies were observed also in other species of dump vegetation (bindweed, saltweed, corn, camomile). The highest mean concentrations (for about 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for PCB 138 and 7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for PCB 153) were found in stinging nettle – the species which proved to be very useful also in the assessment of pollution of agricultural ecosystems due to long-lasting floods.

**TABLE 3**  
**Content of PCB indicator congeners in plants bioindicators: browsing plants [µg/kg d.m.] (n=12).**

PCBs congeners		grassland	browsing plants I	browsing plants II	browsing plants III
28	mean	2.2	1.4	1.7	1.9
	median	2.3	1.5	1.6	1.8
	range	1.5-3	1.1-2.1	1-1.9	1.1-2.3
	SD	0.7	0.6	0.4	0.5
52	mean	1.2	1.0	1.2	1.1
	median	1.1	1.2	1.1	1.0
	range	<1-1.6	<1-1.7	<1-1.5	<1-1.4
	SD	0.5	0.4	0.4	0.3
101	mean	1.1	<1	<1	1.0
	median	1.0	<1	<1	1.2
	range	<1-1.4	x	x	x
	SD	0.3	x	x	x
118	mean	1.9	1.3	1.3	1.4
	median	1.7	1.4	1.3	1.6
	range	1.3-2	1-1.9	1.2-1.6	1.1-2
	SD	0.4	0.6	0.2	0.5
138	mean	3.2	3.7	4.9	5.2
	median	3.0	3.9	4.5	5.1
	range	1.9-5	2.2-4.8	3.7-6.2	3.5-7.4
	SD	0.7	0.9	1.1	1.2
153	mean	2.4	2.3	2.7	2.5
	median	2.2	2.5	2.6	2.7
	range	1.7-3.2	1.8-3.1	1.9-2.9	1.9-3.5
	SD	1.1	0.8	0.6	0.9
180	mean	1.7	1.8	1.8	1.9
	median	1.6	1.6	1.7	1.8
	range	1.1-2.6	1.2-2.4	1.0-2.1	1.1-2.2
	SD	1.0	0.9	0.6	0.7

x - not evaluated  
 SD - standard deviation



**FIGURE 1 - Concentration of low-chlorinated PCBs in dump vegetation.**

In the Table 3, concentrations of PCBs congeners are given which were found in the browsing plants. These plants constitute according to the game-keepers main components of a food basket of game animals. Results in the Table III show that contamination of these materials could be both due to atmospheric deposition and sources from recultivated and/or illegal dumps located in this region. Nevertheless it can be stated, that the values are not enormous high compared to other findings which were presented from various regions in the Czech Republic.

The mean and median values for concentrations of PCB 28 and PCB 52 congeners in dump vegetation bioindicators may be seen on Fig.1. These results could be probably explained as an evidence for secondary contamination due to existing ambient air levels.

Fig. 2 show mean medians concentrations for PCB congeners 138 and 153 in dump vegetation bioindicators. Samples shown on Fig. 2 were collected from a waste dump that belongs to a paint producing factory. Both PCB congeners given in Fig. 2 formed a part of paints produced.

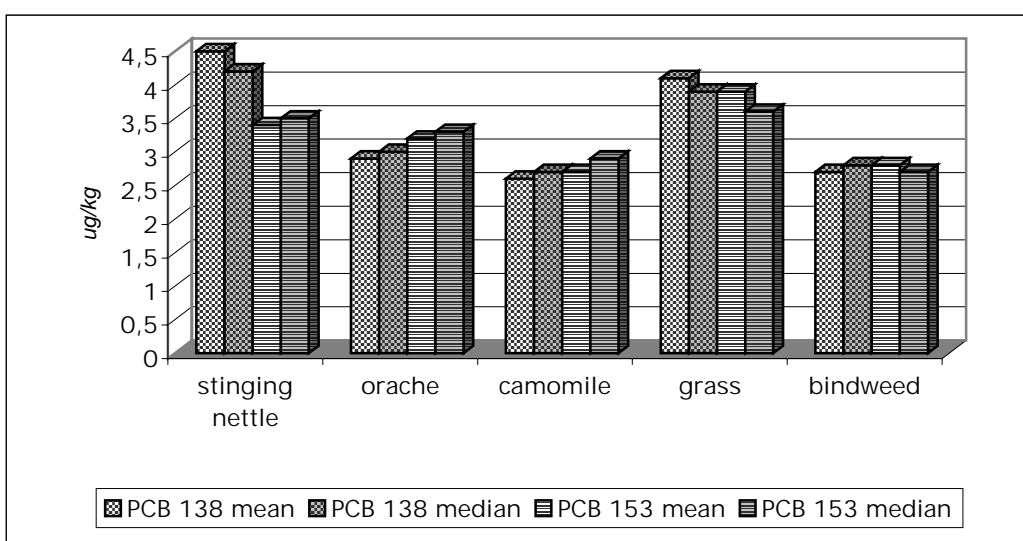


FIGURE 2 - Concentration of high-chlorinated PCBs in dump vegetation.

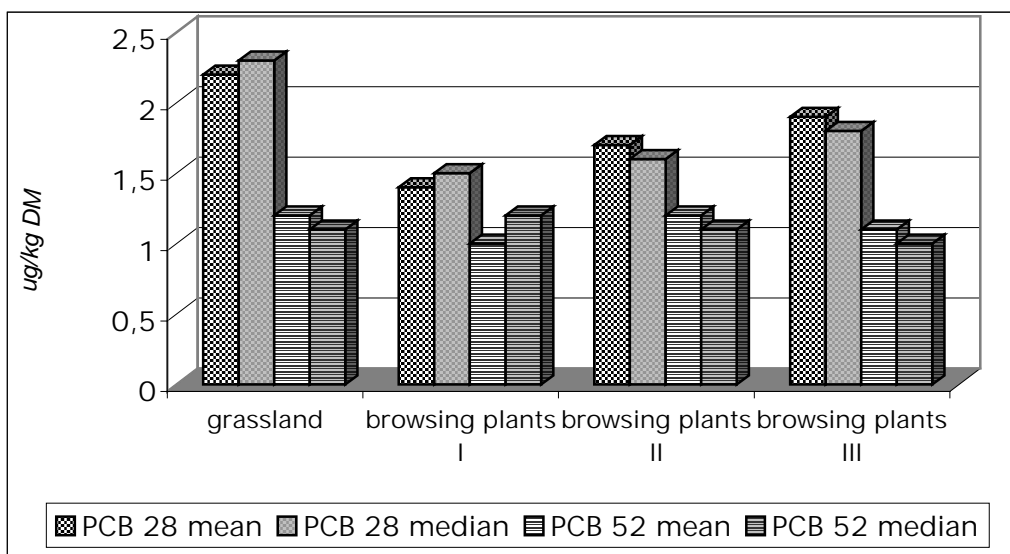


FIGURE 3 - Concentration of low-chlorinated PCBs in browsing plants.

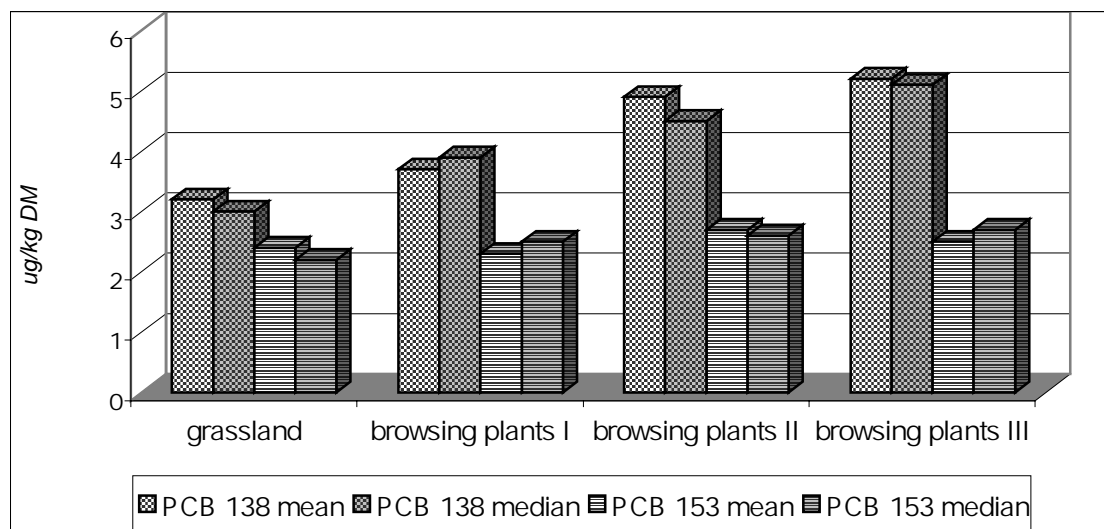


FIGURE 4 - Concentration of high-chlorinated PCBs in browsing plants.

Fig. 3 shows results for most important lower-chlorinated PCBs (PCB 28 and PCB 52). It may be seen that higher concentrations were found for both mean and median values of PCB 28 in all matrices taken into consideration. Among the higher-chlorinated PCBs the congeners PCB 138 and PCB 153 were chosen (see Fig. 4.) Again it could be seen that no substantial differences between mean and median values were found.

Our results are difficult to compare with those published abroad, because plant bioindicators have seldom been analyzed for purposes of comprehensive evaluation. It must be stressed, however, that they are indispensable for the assessment of agrarian ecosystems.

## CONCLUSION

Several types of plant bioindicators that may provide valuable information for the assessment of contamination of agrarian ecosystems by xenobiotics of the PCB type were tested. For this purpose, dump vegetation and selected cultured species were analyzed. Plant bioindicators including alfalfa, cereals, oil plants, and dump vegetation were collected at sites of recultivated or illegal dumps in an area where paints containing higher-chlorinated PCBs (Czechoslovak commercial product Delor 106) paints were manufactured up to 1984. At the same time browsing plants were evaluated. Analyses by HRGC/ECD demonstrated the presence of indicator congeners except for PCBs 101 and 118 in all the samples tested. Homogenates of dump vegetation contained especially the congeners 138 and 153 originating without doubt from uncontrolled wastes of PCB-containing paints (stinging nettle: individual value PCB 138 up to 8.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , PCB 153 up to 7.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

grass: individual value PCB 138 up to 7.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , PCB 153 up to 5.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; bindweed: individual value PCB 138 up to 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The concentrations of the lower – chlorinated PCBs 28 and 53 reached up to 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the contamination was probably due to atmospheric levels.

## ACKNOWLEDGEMENT

Financial support of this work from Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, project CEZ:16/98 Nr. MSM16270004, is greatly acknowledged.

## REFERENCES

- [1] Zima S., Vávrová M.: Project Monitoring of Food Chains (Transfer study "Feedstuff – Animal"). University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, 65 s. (1994).
- [2] Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Report on the 1998 monitoring results – hazardous substances within food chains and influencing inputs, Praha 1999, 47 pp. (1999).
- [3] Oehme M., Haugen J. E., Schlabach M.: Seasonal changes and relations between levels of organochlorines in arctic ambient air: first result of an all - zears – round monitoring program at Ny-Alesund, Svalbard, Norway. Environmental Science and Technology, 30:7, 2294 – 2304 (1996).
- [4] Zima S., Vávrová M.: Organic pollutants in environmental bioindicators. Ecology&Life., 1/1997, p. 28 – 29 (1997).
- [5] Samuillah Z.: Global environment monitoring system. Biological monitoring of environmental contaminants. University of London, Technical report (1990).

- [6] Ministry of Agriculture of the Czech republic. Report on the 1998 monitoring results – hazardous substances within food chains and influencing inputs, Praha 1999, 49 pp.
- [7] Vávrová M. et al: The use of bioindicators in assessment of ecosystems in flooded areas: The seventh Symposium on the chemistry and fate of modern pesticides. September 1999, Lawrence, Kansas USA.
- [8] Vávrová M., Kořínek P., Zima S., Gargošová H., Sebestiánová N.: Organic pollutants in matrices from flooded areas of Moravia. Deauville conference 1998, 6<sup>th</sup> SAS Symposium on analytical Sciences, June 1998, Valencia, Spain, p.44 (1998).
- [9] Fava F, Di Gioia D.: Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificially contaminated soil. *Biotechnol Bioeng.* 20; 72 (2):1 – 9 (2001)
- [10] Malawska M, Wilkomirski B.: Accumulation rate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in dandelion (*Taraxacum officinale*) in the conditions of soil contamination with oil derivatives. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*; 52 (2):295 – 311 (2001).

---

Received for publication: July 13, 2002

Accepted for publication: December 17, 2002

---

#### CORRESPONDING AUTHOR

---

**M. Vávrová**

University of Veterinary and Pharmaceutical  
Sciences Brno

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology

Department of Veterinary Ecology and  
Environmental Protection

Palackého 1-3

612 42 Brno - CZECH REPUBLIC

e-mail: vavrovam@vfu.cz

# **Příloha B4:**

VÁVROVÁ, M.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUCMAN, E. Impact of Environmental Pollution on Contamination of Locally Grown Roughage. *Acta Veterianria Brno*, 2002, vol. 71, p. 389-400.

**Impact of Environmental Pollution on Contamination of Locally Grown Roughage**M.VÁVROVÁ<sup>1</sup>, H. ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ<sup>1</sup>, E. ŠUCMAN<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection and <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Received October 31, 2001

Accepted June 19, 2002

**Abstract**Vávrová M., H. Zlámalová Gargošová, E. Šucman: *Impact of Environmental Pollution on Contamination of Locally Grown Roughage*. Acta Vet. Brno 2002, 71: 389-400.

Contamination of ration components and roughage fed to dairy cows and finishing bulls in two different agricultural ecosystems in the district of Uherské Hradiště (localities Buchlovice and Stupava) was monitored. Whereas the site Buchlovice was characterised by intensive agricultural production, the site Stupava was located in the protective zone of the Koryčany water reservoir and ecological agriculture was practised in a part of this area. Materials used for analyses included irrigation water, grass growth, haylage, wheat, roughage, preserved feeds and trough samples of feed. Samples of alfalfa and clover were also collected as ration components and bioindicators of plant origin. From each sample kind and/or sampling site 15 samples were collected. In addition to feeds, bovine milk and beef liver and muscle (*m. longissimus dorsi*) samples were analysed (10 samples of animal material). Emissions were measured by the mobile laboratory of Regional Hygienic Services, Brno, allowing the determination of SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, O<sub>3</sub>, fly ash. The samples were analysed for polychlorinated biphenyls (PCB) by high resolution gas chromatography with electron capture detection. Also tested for PCB residues were milk and tissue samples collected from dairy cows and bulls. The concentrations of indicator PCB congeners did not exceed the safety limit in any of the sampling areas (mean concentrations of PCB in feed between 1-2 µg·kg<sup>-1</sup>; mean concentration of PCB and animal tissues between 2-9 µg·kg<sup>-1</sup>). Calculation of the transfer coefficient Q proved to be a suitable tool for the assessment of residue transfer (dairy cows 0.2-1.0; bulls 0.3-1.0). Feed was identified as an important contamination source for animal tissues and milk.

*Polychlorinated biphenyls, agricultural ecosystem, transfer coefficient Q, food chains*

Like other ecosystems, the agricultural ecosystem is exposed to the action of contaminating xenobiotics. In accordance with the world-wide tendencies, criteria for the assessment of the burden by xenobiotics are currently tightened in the Czech Republic to prevent possible damage to human and animal health. Also significant are the effects of pollutants on ecological aspects of the agricultural landscape.

In addition to some extrinsic factors of agricultural ecosystems, the transfer of chemical xenobiotics in food chains depends also on intrinsic factors of the agricultural production. The extrinsic factors include the pollution of air, dry and wet emissions, and surface water; the intrinsic factors are associated with biological, physical, chemical and biological characteristics of soil, with the technology of agricultural production, and with zoohygienic conditions. The intrinsic factors become more significant in areas with intensive agricultural production, in which ecological dysbalance of the agricultural ecosystem often develops. Its major cause are high concentration of farm animals, inadequate handling of wastes from animal production, and excessive use of fertilisers. Such activities result in a complex soil devastation, biological dysbalance in farm animal herds, and penetration of contaminants into feeds and subsequently into raw materials and foods of plant and animal origin (Zima et al. 1994).

**Address for correspondence:**

Doc. RNDr. M. Vávrová, CSc.  
Dept. of Veterinary Ecology and Environmental Protection  
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences  
Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

Phone: +420 54156 2572  
Fax: +420 5 4156 2569  
E-mail: vavrovam@vfu.cz  
<http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>

The individual elements of the food chain can be contaminated by inorganic or organic chemicals. Of the latter, monitoring concentrates particularly on polychlorinated biphenyls (PCB) and polyaromatic condensed hydrocarbons (PAH).

PCB represent a mixture of congeners the concentrations of which in tested materials may differ from each other by several orders of magnitude. Approximately 150 congeners can be detected in environmental samples. Investigations in agricultural ecosystems usually concentrate on seven indicator congeners (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180). Reviews completed in several countries indicate that approximately 2% of the total amount of PCB have penetrated into the environment; expressed in absolute values it is approximately  $10 \times 10^9$  kg. Considering their physical and chemical characteristics, i.e. low water solubility, long persistence in the environment, and high resistance to chemical degradation, it is understandable that high accumulation of PCB was repeatedly demonstrated in food chains of various animal species (Elliott et al. 1991; O'Connor et al. 1990). These authors used monitoring data for the assessment of the occurrence of organochlorine chemicals in porcine and bovine tissues in 1991 through 1997. The most marked decrease by up to 17% was observed for the concentrations of PCB 153, HCB,  $\alpha$ -HCH, and p,p'-DDE in the samples collected from cattle and the authors suggested the use of monitoring data for risk assessment (Glynn et al. 2000). PCB metabolism and burden in lactating dairy cows fed naturally contaminated feeds for four months were investigated by Thomas et al. (1999). Daily intake (mg/day) was found to represent 0.9 to 1.5% of the total burden for the persistent congener PCB 153 and up to 43% of the total burden for readily metabolised congeners (PCB 52). Balance studies demonstrated that PCB was metabolised completely, while other congeners passed into milk and were demonstrable in milk products. Ciberej et al. (1999) found increased concentrations of PCB, including the congener 28, in tissues of wild animals living in the contaminated area around the chemical factory Chemko Strážske (Slovakia) where a PCB-containing product had been manufactured in the past and attributed them to secondary contamination from the earlier heavily polluted ecosystem. Because of existing industrial production in the region, ecosystem in the sampling site was under long-term load of both commercial mixtures (Delor 103 and Delor 106). Taking into account this fact one can explain observed concentration of indicators congeners which are part of both mixtures. Ciberej et al. (1999) have published similar findings.

Monitoring of concentrations of selected analytes in all ecoblocks of the production of foods of plant and animal origin is necessary for comprehensive assessment of food chain contamination. As far as beef is concerned, the extrinsic factors to be monitored include air contamination, composition of imissions, and contamination of drinking and irrigation water, roughage, and feed supplements. Similarly, the intrinsic factors to be monitored include soil, animal wastes, barn indoor environment, and animal body fluids and tissues (Zima et al. 1994; Vávrová et al. 1999).

Transfer studies in defined agrarian ecosystems allow the identification of the most critical element of the food chain. Of particular importance are data on the feed  $\rightarrow$  tissue transfer. Best suited for their assessment is the transfer coefficient Q calculated as the ratio between mean mass of the analyte in animal tissues and its concentration in plant mass. This calculation allows monitoring of penetration of xenobiotics into the food chain and is also useful for pilot studies that should precede implementation of more extensive monitoring programmes (Kolektiv 1998; Kolektiv 1999).

#### Materials and Methods

Two sampling sites in the district of Uherské Hradiště were selected for the monitoring of dynamics of organic pollutants in an agricultural ecosystem. Whereas the site Buchlovice was characterised by intensive agricultural production, the site Stupava was located in the protective zone of the Koryčany water reservoir and ecological agriculture was practised in a part of this area.



Materials for analyses included irrigation water, grass growth, haylage, wheat, roughage, trough samples of feed and preserved feeds. Samples of alfalfa and clover were also collected as ration components and bioindicators of plant origin. From each sample kind and/or sampling site 10 samples were collected.

The collected samples were analysed for indicator PCB congeners. The relevance of such analyses resulted from the fact that the area under study harboured recultivated dumps of wastes from a paint manufacturing factory where Delor 106 (a commercial PCB-containing product manufactured in Slovakia) had been used up to the end of 1987.

In addition to feeds, bovine milk and beef liver and muscle (*m. longissimus dorsi*) samples were analysed. Two litre volumes of milk samples were collected at the morning milking. The weight of animal tissue samples ranged between 450 and 600 g. The interval between sampling and analyses never exceeded 12 h and the samples were stored in a refrigerator during this period. Standard operation procedures (SOP), which are a part of the laboratory's quality manual (Vávrová 1999a) were strictly adhered to.

PCB, separated from 1 litre of water sample each by triple extraction with hexane (50, 30, and 30 ml, respectively) were cleaned in an aluminium oxide column and subsequently with sulphuric acid. The cleaned samples were condensed in a rotary vacuum evaporator and the residue was diluted in 1 ml of isooctane. Results of analyses of plant materials were converted to 85% dry matter. Dried, approximately 30-g samples were extracted four times with 70-ml volumes of a hexane-acetone mixture (94 : 6) and further processed as described for water samples. Milk samples were processed as follows: volumes of 200 ml were heated to 40 °C and milk fat was separated by low-temperature centrifugation at 6 000 rpm for 15 min. The separated fat layer was triturated with anhydrous sodium sulphate and extracted with petroleum ether-diethylether mixture (96 : 4). The extraction was enhanced by sonication. The solvent was removed in a rotary vacuum evaporator and 100 to 200 mg of the residue was weighed for clean up in a florisil column. The clean-up procedure was completed with sulphuric acid. Samples of animal tissues were homogenised, triturated with anhydrous sodium sulphate and extracted three times with petroleum ether- diethylether mixture (96 : 4). The extraction was enhanced by sonication. Clean up was carried out as described for milk samples. Residues obtained by extraction of the milk and tissue samples were dissolved in isooctane. All the samples were measured in duplicates. Means of 15 analyses of water or plant material samples and 10 analyses of animal material samples are given in the tables.

PCB were determined by high resolution gas chromatography (chromatograph HP 5890, Series II) with electron capture detection using the following parameters: capillary column HP 5, column length 60 m, column inside diameter 0.25 µm; film thickness 0.2 µm, split/splitless injector, injection temperature 250 °C; temperature mode 40 °C for 40 min, increase to 180 °C at 30 °C per min and to 280 °C at 2 °C per min, and hold at 280 °C for 10 min; detector 63Ni ECD, detector temperature 300 °C; constant flow at 1.0 m per min. Standards supplied by Dr. Ehrenstorfer (Germany) were used for congener identification. QA/QC conditions were assured by use of certified reference materials CRM Dr. Ehrenstorfer (Germany) containing the analytes under study in freeze-dried bovine liver tissue, freeze-dried beef, and bovine fat. Moreover, national reference materials tested for worthiness by the National Reference Laboratory at the Institute of Chemical Technology in Prague were used. The detection limit for PCB congeners was 1 µg·kg<sup>-1</sup>. Arbitrary values of 0.5 µg·kg<sup>-1</sup> were substituted for concentrations below the detection limit in the calculations of means.

Imissions were measured by the mobile laboratory of Regional Hygienic Services, Brno, allowing the determination of SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, O<sub>3</sub>, fly ash and recording of air temperature and atmospheric pressure.

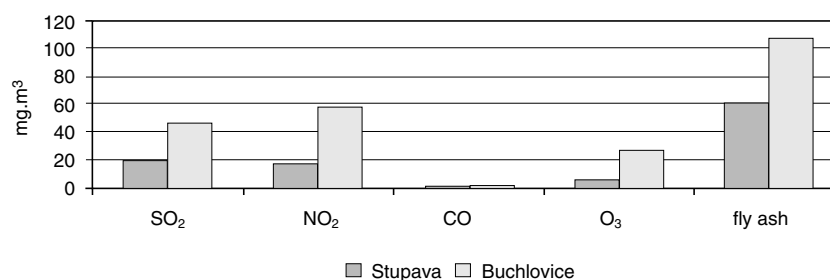


Fig. 1. Imission burden in the district of Uherské Hradiště (mg·m<sup>-3</sup>)

## Results and Discussion

Dynamics of penetration of PCB into the food chain were investigated in the district of Uherské Hradiště, in which the pollution of the agricultural ecosystem by organics had been monitored for a long period. Two sampling sites were selected to avoid effects of bioclimatological factors. One of them was on the windward side of a paint producing

Table 1  
Mean concentrations of PCB indicator congeners in irrigation water (ng.l<sup>-1</sup>) and grass growth (µg.kg<sup>-1</sup> 85% dry matter)

PCB congeners		Sampling site			
		Boršice u Buchlovic		Stupava	
		Irrigation water	Grass growth	Irrigation water	Grass growth
28	mean	1	3	1	2
	median	1	3	1	2
	range	< 1-3	< 1-5	< 1-2	< 1-4
52	mean	< 1	1	< 1	< 1
	median		2		
	range		1-3		
101	mean	1	1	< 1	< 1
	median	***	**		
	range	< 1-2	< 1-3		
118	mean	1	1	< 1	< 1
	median	1	2		
	range	< 1-3	< 1-4		
138	mean	10	3	5	1
	median	12	4	6	2
	range	8-16	1-6	1-8	< 1-3
153	mean	12	3	3	2
	median	11	4	3	2
	range	4-18	1-6	1-5	1-4
180	mean	8	2	2	1
	median	7	3	2	1
	range	2-10	1-4	1-3	1-2

factory in which the PCB-containing product Delor had been used up to the end of 1987; the other sampling site, located near the Chřiby highlands, met the requirements put on ecological agricultural production.

Data characterising the pollution rate in the area under study in terms of imissions are shown in Fig. 1. Data on concentrations of SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, O<sub>3</sub> and fly ash indicate that the imission burden in the area under study was not extremely high. Ambient temperature and atmospheric pressure at the time of sampling were 9 °C and 1002 kPa at the site Buchlovice and 7 °C and 997 kPa at the site Stupava. It should be pointed out that the data reflect momentary situations and apply to the time of the measurement only. Measurements repeated at short intervals several times a day would be necessary to obtain actual background values.

Basic statistical parameters (mean, median, range) for PCB congeners in irrigation water and grass growth are given in Table 1. The results indicate that sum concentration did not exceed 50 ng.l<sup>-1</sup>, which is the value laid down as the limit for drinking water. Also concentrations of the individual indicator congeners in grass growth were rather low at both the sampling sites. Concentrations below the detection limit were found for some of them.

Table 2 shows means, medians and ranges for PCB congeners in feed components intended for the nutrition of dairy cows and finishing bulls at the site Buchlovice. It can be seen that the findings were below the detection limit in some of the analysed matrices. This applied particularly for the low-chlorinated congeners (PCB 52, 101, and 118). Generally, all the concentrations were low and did not exceed background values for the Czech Republic.

Table 2  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85% dry matter) in feed components for finishing bulls and dairy cows – locality Buchlovice

PCB congeners		Corn silage	Beet top silage	Clover	Alfalfa	Straw	Wheat
28	mean	3	3	2	1	2	1
	median	3	2	3	2	2	1
	range	1-7	1-7	1-6	1-5	1-4	<1-2
52	mean	2	2	2	1	1	<1
	median	2	1	2	2	<1	<1
	range	1-4	1-4	1-3	1-3	<1-1	<1
101	mean	1	1	1	1	<1	<1
	median	1	1	<1	<1		
	range	<1-2	<1-3	<1-2	<1-2		
118	mean	1	1	1	1	1	<1
	median	1	1	1	1	<1	<1
	range	<1-1	<1-1	<1-3	<1-2	<1-1	<1-1
138	mean	3	4	3	2	2	2
	median	4	5	4	4	3	3
	range	2-6	3-7	1-9	2-5	1-6	1-6
153	mean	2	3	2	2	3	2
	median	3	3	2	3	3	2
	range	2-6	2-4	1-4	1-5	2-8	1-4
180	mean	2	2	1	1	1	1
	median	2	2	2	1	2	1
	range	1-5	<1-6	1-4	1-3	<1-5	<1-1

Tables 3 and 4 show basic statistical parameters for PCB congeners found in animal tissues and milk at the site Buchlovice. The data indicate that, like in the environmental samples, the concentrations did not differ from background values for the Czech Republic. Those of some congeners, particularly 101 and 118, were undetectable.

Fig. 2 shows mean PCB congener concentrations in feed components harvested within the site Buchlovice. The highest concentration were found for the PCB congeners 153, 138, 180, and, like in Slovakia, 28. The findings can be attributed to secondary contamination from the ecosystem components. The concentrations of PCB congeners were rather low and it can be concluded that feed components produced at this site were free of excessive amounts of PCB.

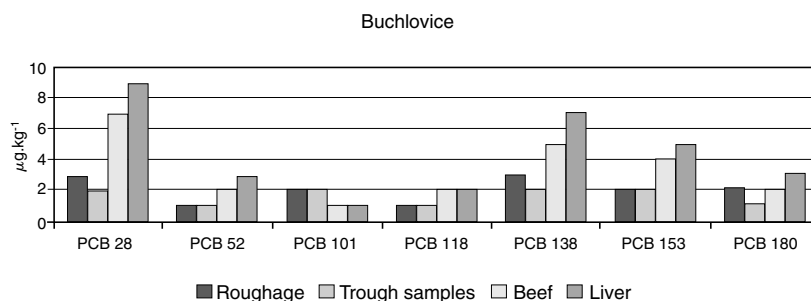


Fig. 2. Mean concentrations of PCB indicator congeners in feeds (85 % dry mass) and animal tissues – finishing bulls (fat)

Table 3  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85% dry matter) in roughage, trough samples, tissues of finishing bulls – locality Buchlovice

PCB congeners		Roughage	Trough samples	Beef	Liver
28	mean	3	2	4	6
	median	3	3	5	7
	range	2-7	2-6	3-9	3-11
52	mean	1	1	2	3
	median	1	1	3	3
	range	1-2	1-3	1-8	2-9
101	mean	2	2	1	1
	median	2	1	1	1
	range	1-3	<1-4	<1-1	<1-2
118	mean	1	1	1	2
	median	2	1	2	2
	range	<1-3	<1-1	1-3	1-3
138	mean	4	3	5	8
	median	5	5	5	9
	range	1-10	2-9	3-10	2-14
153	mean	3	3	4	9
	median	4	4	5	8
	range	2-7	2-8	4-10	3-13
180	mean	2	2	2	3
	median	2	2	3	3
	range	<1-4	1-4	1-6	1-6

Fig. 3 shows mean PCB congener concentrations in feed for and tissues and milk of dairy cows in the site Buchlovice. Again, the highest values were obtained for the congeners 28, 138, 153, and 180. The highest mean concentrations were found in liver samples. Safety limits were not exceeded in any of the analysed matrices and the concentrations were at the level of values commonly found in the Czech Republic.

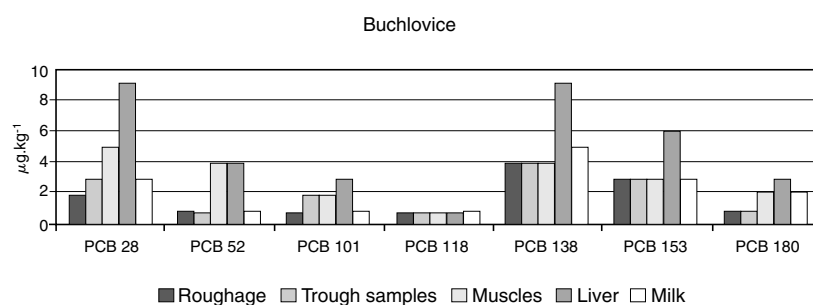


Fig. 3. Mean concentrations of PCB indicators congeners in feeds (85 % dry mass) and animal tissues (fat) and milk – dairy cows (fat)

Table 4  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85% dry matter) in roughage, trough samples, tissues and milk of dairy cows – locality Buchlovice

PCB congeners		Roughage	Trough samples	Beef	Liver	Milk
28	mean	2	3	4	7	3
	median	3	2	4	8	3
	range	<1-6	1-6	1-10	3-16	1-10
52	mean	1	1	2	3	1
	median	1	1	3	3	1
	range	<1-1	<1-1	<1-5	1-5	<1-1
101	mean	1	1	1	2	1
	median	<1	1	1	1	1
	range	<1-1	<1-2	<1-1	<1-3	<1-2
118	mean	1	1	1	1	1
	median	1	1	1	1	1
	range	<1-3	<1-2	<1-2	<1-3	<1-2
138	mean	4	4	7	9	5
	median	4	5	8	10	5
	range	1-11	2-8	5-14	4-18	2-9
153	mean	3	3	5	9	3
	median	5	4	6	10	3
	range	1-7	2-5	2-9	4-14	1-8
180	mean	1	1	2	3	2
	median	2	2	3	4	2
	range	1-4	1-5	1-4	1-7	1-6

Means, medians and ranges of PCB concentrations in components of feeds intended for finishing bulls and dairy cows at the site Stupava are shown in Table 5. Concentrations below the detection limit were found in all the analysed matrices for PCB 101 and 118, in alfalfa and wheat for PCB 28 and 52, and in all the analysed matrices except for silages for

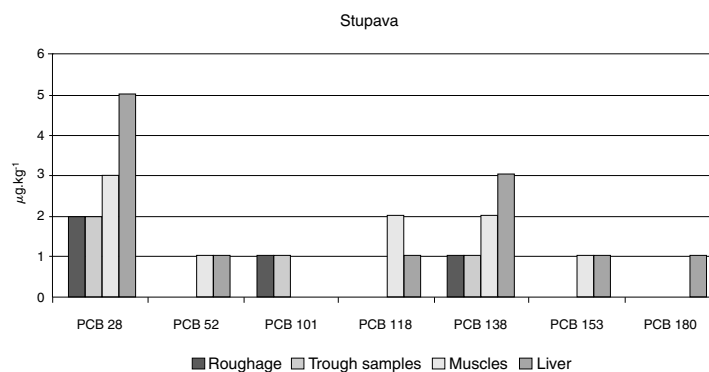


Fig. 4. Mean concentrations of PCB indicator congeners in feeds (85 % dry mass) and animal tissues – finishing bulls (fat)

Table 5  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85% dry matter) in feed components for finishing bulls and dairy cows – locality Stupava

PCB congeners		Corn silage	Beet top silage	Clover	Alfalfa	Straw	Wheat
28	mean	1	2	1	<1	1	<1
	median	1	1	2		1	
	range	<1-2	1-4	<1-5		<1-3	
52	mean	1	1	1	<1	1	<1
	median	1	2	1		2	
	range	<1-2	1-4	1-2		<1-3	
101	mean	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	median	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	range	<1	<1	<1	<1	<1	<1
118	mean	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	median	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	range	<1	<1	<1	<1	<1	<1
138	mean	1	2	1	1	1	1
	median	2	3	2	2	1	1
	range	1-4	1-9	1-5	1-3	1-2	1-2
153	mean	2	1	1	1	1	1
	median	3	2	2	2	1	2
	range	1-8	1-7	1-5	1-7	1-4	1-4
180	mean	1	1	<1	<1	<1	<1
	median	1	1				
	range	1-3	1-2				

PCB 180. It can be concluded from the data that the contamination of the components was too low to influence noticeably the concentrations of the congeners under study in rations for finishing bulls and dairy cows.

Basic statistic parameters for PCB congeners found in finishing bulls and dairy cows at the site Stupava are shown in Tables 6 and 7. Many findings, particularly in roughage and trough samples of feed, were below the detection limit. The concentrations did not exceed  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in any of the materials and feeding of low-contaminated feed did not result in an increase of PCB concentrations in tissues.

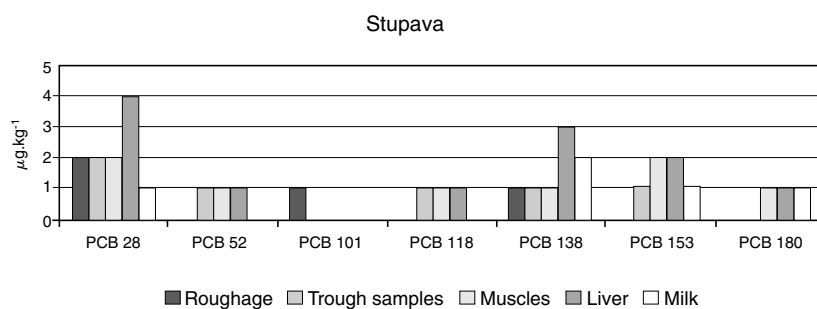


Fig. 5. Mean concentrations of PCB indicators congeners in feeds (85 % dry mass) and animal tissues (fat) and milk – dairy cows (fat)

Table 6  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85% dry matter) in roughage, trough samples, tissues of finishing bulls – locality Stupava

PCB congeners		Roughage	Trough samples	Beef	Liver
28	mean	2	2	3	5
	median	2	3	4	4
	range	1-4	1-5	1-7	1-7
52	mean			1	1
	median	<1	<1	2	1
	range			<1-5	<1-3
101	mean				
	median	<1	<1	<1	<1
	range				
118	mean			1	1
	median	<1	<1	1	1
	range			1-4	1-3
138	mean	1	1	1	3
	median	2	2	2	4
	range	1-4	<1-6	<1-5	1-7
153	mean	1	1	2	2
	median	2	2	1	2
	range	1-5	1-3	1-4	1-4
180	mean			1	1
	median	<1	<1	1	2
	range			1-3	1-3

Fig. 4 shows mean PCB congener concentrations in feeds for and tissues of finishing bulls reared in the ecosystem Stupava. Like at the site Buchlovice, the highest concentrations were found for PCB 28 and 138. The former were probably due to secondary contamination from the ecosystem. The remaining values were very low and did not reach background values for the Czech Republic in many cases.

Mean PCB congener concentrations found in the ration for and tissues and milk of dairy cows at the site Stupava are given in Fig. 5. Even here, the concentrations were very low and generally lower than at the site Buchlovice. Like in the preceding figures, the highest concentrations were found for the congeners PCB 28, 138, and 153. The safety limits were not exceeded in any of the analysed matrices. Because of existing industrial production in the region, ecosystem in the sampling sites was under long-term load of both commercial mixtures (Delor 103 and Delor 106). Taking into account this fact one can explain observed

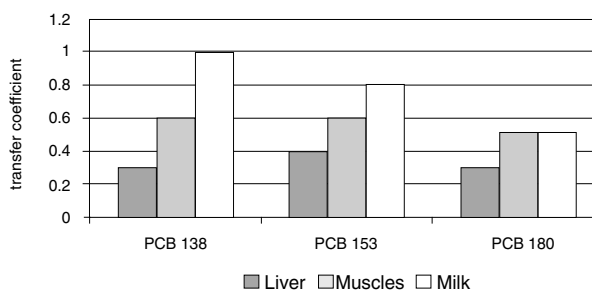


Fig. 6. Transfer coefficient Q of indicator congeners for dairy cows

Table 7  
Basic statistical parameters for concentrations of PCB congeners ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  85 % dry matter) in roughage, trough samples, tissues and milk of dairy cows – locality Stupava

PCB		Roughage	Trough samples	Beef	Liver	Milk
28	mean	2	2	2	4	1
	median	1	1	2	3	1
	range	<1-4	<1-4	1-5	1-7	<1-3
52	mean	1	<1	1	1	<1
	median	1		1	1	
	range	1-3		<1-2	<1-3	
101	mean	<1	<1	<1	<1	<1
	median					
	range					
118	mean	<1	<1	1	1	<1
	median			1	2	
	range			1-4	1-3	
138	mean	1	1	4	3	2
	median	2	2	4	4	3
	range	1-5	1-3	1-9	1-8	1-7
153	mean	1	1	2	2	1
	median	2	2	2	3	2
	range	1-4	1-4	1-7	1-8	1-7
180	mean	<1	<1	2	3	2
	median			1	2	1
	range			1-4	1-4	1-3

concentration of indicator congeners which are part of both mixtures. Ciberej et al. (1999) have published similar findings.

The most effective method for the assessment of transfer of xenobiotics from feeds into animal tissues is the calculation of the transfer coefficient  $Q$ . The method is particularly suitable for the assessment of organic pollutant burden in cattle in which the ration contains a high proportion of locally grown roughage. Published data indicate that calculation of the transfer coefficient  $Q$  allows the assessment of transfer of pollutants from feeds into animal tissues. Values  $Q > 0.1$  are indicative of significant passage from feeds into animal tissues

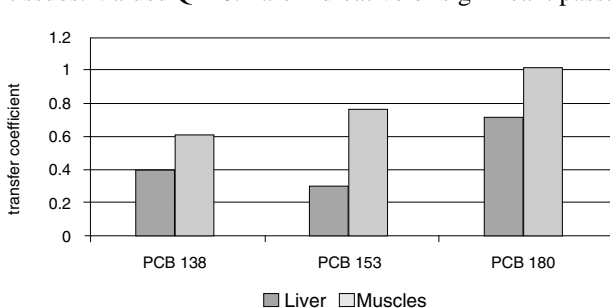


Fig. 7. Transfer coefficient  $Q$  of indicator congeners for bulls

and identify the feed as the most probable source of xenobiotics present in animal tissues. Only data from the more polluted sampling site were used for the assessment, because values near the analytical limit would introduce a serious numerical error into the calculation.

This applies particularly to indicator PCB congeners which were found at concentrations



below the analytical limit not only in irrigation water and grass growth, but also in plant products, above all in straw and wheat at the sampling site Buchlovice and in several other feed components at the site Stupava.

Since many of the findings were below the detection limit, the transfer coefficient  $Q$  was calculated only for data obtained at the site Buchlovice. Fig. 6 shows  $Q$  coefficients for dairy cows calculated using results of analyses of trough samples of feed. It is evident that all the analytes, except for PCB 118, passed from feed into hepatic and muscular tissues and milk. In spite of the low concentrations, feed can be regarded as one of the identified contamination sources and must be included among other possible sources in any comprehensive assessment. The  $Q$  coefficient for finishing bulls is shown in Fig. 7. Again, the passage of PCB congeners from feeds into animal tissues was demonstrated and feeds were identified as one of the possible contamination sources.

Similar results were obtained in fattening bulls in which  $Q \leq 0.1$  only for PCB congeners 101 and 180 were found. These results are significant if we assume that the indicator PCB congeners are released stepwise from depot fat tissues. Calculations dealing with comparable ecosystem were not found in the available literature.

It can be concluded that the concentrations of organic pollutants were below the hygienic limit in most samples of animal tissues and milk analysed within our study. It must be pointed out, however, that monitoring of the transfer coefficient  $Q$  is necessary even in such situations, because accumulation of a larger number of various xenobiotics can affect not only hygienic quality, but also safety of foods.

In the food chain dynamics of contaminants was assessed using results of analyses for indicator PCB congeners of compound rations for dairy cows and fattening bulls, irrigation water and grass growth which constitutes a part of rations consumed by farm and, above all, wild animals. The latter are also used in ecosystems as biological indicators of plant origin.

Values of the transfer coefficient  $Q$  were used to assess the dynamics of transfer of the analytes under study from feeds into animal tissues. The transfer was apparent particularly in organic pollutants. Transfer studies are necessary for the assessment of public health hazards because their results can justify measures aimed at minimisation of xenobiotic burden in the food chain.

#### **Odráz znečištění agrárního ekosystému na kontaminaci objemných krmiv v něm produkovaných**

Byla sledována kontaminace součástí krmné dávky a objemových krmiv zkrmovaných dojnícím a býčkům ve dvou různých zemědělských ekosystémech v okrese Uherské Hradiště (lokality Buchlovice a Stupava). Zatímco pro Buchlovice je charakteristická intenzivní zemědělská produkce, Stupava je situována v ochranném pásmu vodní nádrže Koryčany. V části této oblasti je realizováno ekologické zemědělství. Materiály zvolené pro analýzy zahrnovaly závlahovou vodu, travní porost, senáž, pšenici, objemová krmiva, konzervovanou píci a žlabové vzorky krmiva. Byly rovněž shromažďovány vzorky vojtěšky a jetele jako součásti krmné dávky a rostlinné bioindikátory. Pro každý typ vzorků bylo v každé oblasti odebráno 15 vzorků. Navíc byly analyzovány vzorky mléka, jater a svaloviny (*m. longissimus dorsi*), vždy 10 vzorků každého živočišného materiálu. Imise byly měřeny v mobilní laboratoři Krajské hygienické stanice Brno, která umožňovala stanovení  $SO_2$ ,  $NO_x$ ,  $CO$ ,  $O_3$  a polétavého prachu. Ve vzorcích byly metodou vysokorozlišující plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu stanovovány polychlorované bifenyly (PCB). PCB byly stanovovány rovněž v mléce dojníc a v masě býčků. V žádné ze sledovaných oblastí nepřekročily nalezené koncentrace indikátorových kongenerů PCB hygienické bezpečnostní limity (průměrné koncentrace PCB v krmivu byly v rozmezí 1-2  $mg \cdot kg^{-1}$ , průměrné koncentrace PCB ve tkáních zvířat byly v rozmezí 2-9  $mg \cdot kg^{-1}$ ).

Vypočtené koeficienty přenosu Q (pro dojnice 0,2-1,0; pro býčky 0,3-1,0) se ukázaly jako vhodný nástroj pro posouzení přestupu residuí. Bylo prokázáno, že krmivo je důležitým zdrojem kontaminace živočišných tkání a mléka.

#### Acknowledgements

This study was supported by a grant from Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project J16/98:162700004).

#### References

- CIBEREJ, J, BÍLÁ, A, BREYL, I. 1999: Results of monitoring of PCB in the area of Chemko Strážské. (Conference proceedings.) Strážske 7.9.1999. p. 7-11
- ELLIOT SE, KENNEDY, SW, JEFFREY, D, SHUTT, L 1991: Polychlorinated biphenyl (PCB) effects on hepatic mixed function oxidases and porphyria in birds. *Comp Biochem Physiol* **990**:141-146
- GLYNN, AW, WERNROTH, L, ATUMA, S, LINDER, CE, NILSSON, I, DARNERUD PO 2000: PCB and chlorinated pesticide concentrations in swine and bovine adipose tissue in Sweden 1991-1997: spatial and temporal trends. *Sci Total Environ* **246**: 195-206
- KOLEKTIV 1998: Report on the monitoring results – hazardous substances within raw materials of animal origin and foodstuffs (Indoor publication) . Ministry of Agriculture of the Czech Republic, 64 p.
- KOLEKTIV 1999: Report on the monitoring results – hazardous substances within raw materials of animal origin and foodstuffs (Indoor publication). Ministry of Agriculture of the Czech Republic, 79 p.
- O'CONNOR, GA, KIEHL, D, EICEMAN, GA RYAN, JA 1990: Plant uptake of sludge-borne PCBs. *J Environ Qual* **19**: 113-119
- THOMAS, GO, SWEETMAN, AJ, JONES, K. 1999: Metabolism and body-burden of PCBs in lactating dairy cows. *Chemosphere* **39**: 1533-1544
- VÁVROVÁ, M, ZIMA, S, ŠUCMAN, E, NOVÁK, P 1999: Study of the dynamic of contaminants in food chains. Book of abstract of 1st North African and Middle Eastern Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, Hammamet, Tunisia, p. 43
- VÁVROVÁ, M, ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ H, SEBESTIÁNOVÁ, N: Quality manual of the Laboratory of Organic Pollutants, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology. Brno 1999 a, 65 p.
- ZIMA, S, VÁVROVÁ, M, ČELECHOVSKÁ, O 1994: The project Monitoring of Food Chains (A feed-to-animal transfer study). FVHE VFU Brno, 17 p.

# **Příloha B5:**

VÁVROVÁ, M.; ŠUCMAN, E.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.. The use of blood plasma as a suitable bioindicator to monitor the levels of PCBs in pig tissues. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 8, p. 876-882. ISSN: 1018- 4619.

# THE USE OF BLOOD PLASMA AS A SUITABLE BIOINDICATOR TO MONITOR THE LEVELS OF PCBs IN PIG TISSUES

M. Vávrová<sup>1</sup>, H. Zlámalová Gargošová<sup>1</sup>, E. Šucman<sup>2</sup> and S. Kráčmar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno; Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno; Czech Republic

<sup>3</sup>Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 13, 613 00 Brno; Czech Republic

## SUMMARY

This paper presents partial results of an experiment in which the levels of PCBs in tissues and blood plasma of pigs were monitored. The pigs were administered capsules consisting of commercial PCB-containing products dissolved in lard. Blood samples from pigs were taken in two weeks' intervals during a period of 26 weeks. The pigs were divided into three groups: Delor 103 group, Delor 106 group and a control group. In the Delor 103 group, the levels of low-chlorinated PCBs in pigs decreased while the levels of high-chlorinated PCBs increased. The ratio between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs in one experimental pig was 1:0.91 at the beginning of the experiment. In the 13<sup>th</sup> blood sample, the ratio was 1:2.62. The level of PCB 153 significantly increased while the levels of PCB 52 and PCB 101 decreased. For the Delor 106 group, the ratio (i.e. low-chlorinated vs. high-chlorinated PCBs) was 1:4.69 over the whole monitored period compared to 1:3.19 in control pigs. Furthermore, the total level of PCB congeners in the Delor 106 group was higher than that in the Delor 103 group. A level of contamination in tissues resulting from PCBs can therefore not only be assessed on the basis of the concentrations of PCBs in blood plasma.

**KEYWORDS:** pigs, oral application, blood plasma, Delor 103, Delor 106, control groups, indicator PCB congeners.

## INTRODUCTION

Compared with cattle, less attention with respect to contamination by PCBs has been paid to pigs, although they are the most common farm animals. This was probably due to the fact that the rearing period of pigs and therefore the exposition to pollution is shorter. This was

also the reason why pigs were subjected only to routine controls, provided that primary sources of contamination were eliminated [1]. However, some studies focussed on identifying the sources of PCBs in large-capacity farms in the Czech Republic. The levels of individual PCBs in pigs were investigated in a detailed study performed in the district of Hodonín in the Czech Republic [2]. The authors examined the levels of the most common congeners in materials such as drinking water, feeding mixtures, settled dust collected from stables, sewage sludge and dust collected from adjacent carriage roads. They evaluated the ratios between low-chlorinated and high-chlorinated PCBs but they did not test, however, human blood for these analytes. Moreover, food alone as a potential source of PCBs cannot be omitted. In 1995, the State Veterinary Administration (SVA) tested 101 samples of feeding mixtures for PCBs and found out that the levels of PCBs in 10.9% of the samples exceeded the permissible limit of 50 µg kg<sup>-1</sup> on dry matter basis [3]. According to the results of SVA for the year 2000, the levels of PCBs were below the maximum permissible limit in all domestic commodities of monitored animal food [4].

Blood is a biological material that can be used to evaluate the level of contamination in living animals, because it acts as a transporting medium and may therefore serve for the transport of lipophilic xenobiotics such as PCBs. Blood and the individual components of it, enable the transport and distribution of PCB congeners in tissues; PCBs are transported by the blood's transport system, which may also partially enhance their stability. In this respect, lipoprotein complexes, particularly those rich in lipids, represent an excellent system for the transport of PCBs into tissues [5].

For monitoring the PCB levels, blood was used in several studies which dealt with the effects produced by PCBs. The majority of these studies were performed only on laboratory animals. The main goal of an experiment

carried out on pigeons was to determine and identify respective transport systems [6]. The congener PCB 153 was almost always predominant. It follows from the above mentioned study, that individual fractions of blood (i.e. plasma and serum) contained different PCB congeners. Therefore, it can be concluded that individual fractions play an important role in the transport of lipophilic xenobiotics. The distribution of PCBs is more complex and cannot be explained only on the basis of their solubility in lipid components present in plasma fractions. It follows from the reported data that PCBs are bound to apolipoproteins and plasma proteins, which play an important role in their transport into tissues. Halogen substituted biphenyls are assumed to connect to hydrophobic sites of the blood proteins or blood cells rather than to specific sites of the proteins [7]. Whole blood or serum is mostly examined in order to assess contamination of human population by organochlorinated pollutants, originating from the working environment. On the other hand, plasma is usually tested in monitoring studies. A comparison of the levels of xenobiotics detected in different components of blood enables to assess the distribution of these xenobiotics. This topic was addressed in a study performed by Mes et al. [8], who found that the levels of most tri- and tetrachlorobiphenyls were higher in whole human blood than in the serum (only 25% of the total finding) or plasma (40%). The opposite distribution was found for high-chlorinated biphenyls (from hexa- to octachlorobiphenyls); their levels in plasma and serum ranged from 55 to 83%. Furthermore, the above mentioned authors reported that it was difficult, to evaluate the recovery of the PCB 153 congener in whole blood when the proteins did not precipitate during pre-analytical work-up performed before extraction. However, there is no other paper in the literature available that supports their finding. Another finding, which has not been confirmed yet, was published by Mes, Douglas and Bryce [9]. The authors related the decreased recovery of the congener PCB 153 to freshness of blood and claimed, that the recovery of this congener decreased by 50% when the tests were performed on blood samples stored in a freezer for one month. However, the authors provided no information about the temperature at which the blood samples were stored before performing the analysis.

## MATERIALS AND METHODS

In this study Czech white high-bred pigs were used. Before starting the experiment, the stable and an adjacent room for feed preparation were cleaned and disinfected. Only pigs which were used for our experiment housed in the stable. In accordance with the Czech legislation, a detailed plan concerning the setup of the experiment was developed. At the beginning of the experiment, the pigs weighed approximately 40 kg. They were orally administered gelatine capsules containing a technical mixture of the PCBs Delor 103 or Delor 106. The composition of

Delor 103 corresponds with Aroclor 1242 and this of Delor 106, with Aroclor 1260. The mixtures were dissolved in porcine lard at a concentration of  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . The experiment was carried out with 18 pigs, divided into three groups of 6 pigs: Delor 103 group, Delor 106 group and the control group. Only one capsule per animal was administered by using a special dosing device - such a device was used in order to ensure that the capsule was entirely swallowed by an animal. One week after administration of each PCBs dose, the blood samples were collected. Thus, blood sampling was carried out 13 times over the whole monitored period, in intervals of 14 days. For sampling, the usual glass syringes were used. Prior to analysis, the samples of blood plasma were stored in a freezer - in glass test tubes with grounded solid glass stopper. Some pigs died of pneumonia during the experiment.

The stable was located in a village, approximately 16 km away from the plant Colorlak where dyestuffs containing Delor 106 had been produced before 1986. Therefore, a possibility of a secondary contamination was considered, originating from the environment due to air-borne PCBs.

### Chemicals

Anhydrous sodium sulphate, analytical grade, was heated in a muffle furnace at  $650^\circ\text{C}$  for 4 h. Florisil 60/100 mesh was heated at  $550^\circ\text{C}$ . Prior to use, the sorbents were activated in a hot-air drier at  $130^\circ\text{C}$  (the activated sorbents can be stored in brown wide-neck bottles in a dessicator for 3 days). Hexane and methanol for the analysis of residues grade were used. Sulphuric acid 96% (Suprapur, Merck) was also applied.

The following standard materials were used: Standards PCB congener mixture in hexane with a concentration of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each congener (J.T.Baker, ULTRA Scientific JTB-0004A-4). Reference material of Dr. Ehrenstorfer GmbH (lard with pesticides and PCBs, No. 40410). Absolute Standards, Inc., Part # 92366, Lot # 120202, 7 components,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; Hamden CT. AccuStandard, Inc.; C-WHO-01 World Health Organisation, Congener Mix,  $2.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; New Haven CT.

### Extraction and clean up procedures

**Extraction of PCBs from blood plasma:** To a sample of plasma (5 ml) in a glass test tube, 3 ml of methanol was added and vigorously shaken for 1 min. After this, hexane was added (15 ml), followed again by vigorous shaking for five minutes. The hexane layer was quantitatively transferred into a clean test tube and the first purification using acid hydrolysis was performed (the ratio hexane/sulphuric acid was 10:1). The layers were separated and the hexane layer was filtered through a layer of anhydrous sodium sulphate. The concentrated extract was purified using column chromatography on Florisil. The analysis was performed on a gas chromatograph by employing the standards of Dr. Ehrenstorfer.

**TABLE 1 - Average levels of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs, after administration of Delor 103 [mg/kg].**

Pig No	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
1	0.081	0.034	0.225	0.325	0.365	0.537	0.095
2	0.084	0.040	0.256	0.301	0.390	0.542	0.091
3	0.083	0.051	0.294	0.340	0.369	0.551	0.105
4	0.072	0.068	0.270	0.344	0.367	0.493	0.091
5	0.072	0.047	0.283	0.337	0.366	0.528	0.101
average	0.078	0.048	0.266	0.329	0.371	0.530	0.097
mediane	0.081	0.047	0.270	0.337	0.367	0.537	0.095
SD	0.006	0.013	0.027	0.017	0.011	0.022	0.006

Legend: SD – standard deviation

### Analytical methods

Gas chromatograph, Hewlett-Packard 5890 Series II with ECD  $^{63}\text{Ni}$  (USA); capillary column HP 5 (60 x 0.25 mm, film thickness 0.2  $\mu\text{m}$ ); 5% phenylmethylsilicone; split/ splitless injector (150s); temperature 250° C, injector volume 0.1  $\mu\text{l}$  “hot needle” technique. Carrier gas: helium - linear speed 16.5  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; temperature programme: 40° C for 5 min followed by an increase at 30° C  $\cdot \text{min}^{-1}$  to 180° C and at 2° C  $\cdot \text{min}^{-1}$  to 280° C, and 280° C for 10 min; detector  $^{63}\text{Ni}$  ECD, temperature 300° C; pressure programming: constant flow at 1.0  $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ .

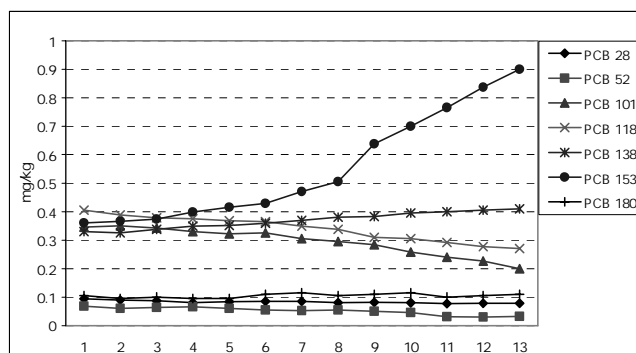
Quantitative assessment was carried out using the external standard method (absolute calibration) within the linear range of the detector. Regarding the wide range of concentrations of the analytes under study to be expected in real samples, a calibration range of 0.01 to 500  $\text{ng ml}^{-1}$  of the standard working solutions was chosen, corresponding to 0.01 to 500  $\mu\text{g}$  in the injected volume of 0.1  $\mu\text{l}$ . Under the conditions of our analyses, the following detection limits ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for ECD were defined: PCB 28 – 0.01; PCB 52 – 0.01; PCB 101 – 0.02; PCB 138 – 0.02; PCB 153 – 0.02; PCB 180 – 0.02.

### RESULTS AND DISCUSSION

In this work, the congeners 138, 153 and 180 belong to the group of high-chlorinated, while the congeners 28, 52 and 101, 118 are supposed to be low-chlorinated congeners. The following results were obtained during our experiment:

In the Delor 103 group, the level of low-chlorinated PCBs decreased during the monitored period while the level of high-chlorinated PCBs increased. According to the literature, this trend can be attributed to facilitated absorption of low-chlorinated PCBs in lipid components present in plasma fractions and to faster metabolic transformation. The calculated ratios between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs found in samples of blood plasma at the 1<sup>st</sup> and 13<sup>th</sup> collection are

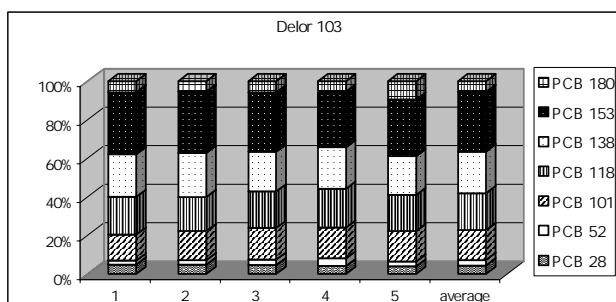
as follows (see Table 1, Fig.1): 1<sup>st</sup> collection – pig no.1 (1:0.91), pig no.2 (1:1.03), pig no.3 (1:0.97), pig no.4 (1:0.87), pig no.5 (1:0.88). For the 13<sup>th</sup> blood sampling, the ratio accordingly changed with increase of the level of high-chlorinated PCBs: pig no.1 (1:1.99), pig no.2 (1:2.48), pig no.3 (1:2.44), pig no.4 (1:2.46) and pig no.5 (1:2.62). This applies also for the ratio of 1:1.38, which was calculated from average concentrations of indicator PCB congeners over the monitored period. Table 1 presents average concentrations of indicator PCB congeners detected during the monitored period.



**FIGURE 1 - Dynamics of PCBs in blood plasma of pig No. 3 after administration of Delor 103.**

Figure 1 illustrates the dynamics of PCBs in blood plasma of pig no.3. It is shown, that the levels of low-chlorinated PCBs decreased during the experiment, while the levels of high-chlorinated PCBs, particularly PCB 153, increased significantly during a period of 26 weeks.

Figure 2 shows the levels of particular PCB congeners in pigs of the Delor 103 group during the monitored period, and provides a comparison between the levels of particular congeners and the total content of PCBs. It can be seen, that the level of congener PCB 153 increased significantly during the experiment, while the concentrations of the congeners PCB 52 and 101 decreased.



**FIGURE 2 - Proportional representation of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs from Delor 103 group [%]**

Table 2 presents average concentrations of indicator PCB congeners in blood samples from control pigs. Pigs in which the levels of PCBs were below the detection limit of  $0.001 \mu\text{g kg}^{-1}$  were excluded from evaluation. The ratio of low-chlorinated to high-chlorinated PCBs helped to determine, which commercial PCB-containing product was a primary source of contamination. The ratios for the control pigs were as follows: pig no.9 (the 9<sup>th</sup> sampling 1:3.03; the 13<sup>th</sup> sampling 1:2.72), pig no.11 (the 7<sup>th</sup> sampling 1:3.37; the 13<sup>th</sup> sampling 1:3.74). The ratio of 1:3.19 was calculated from the average concentrations of indicator PCB congeners determined in blood plasma during the experimental period. The mean concentration was calculated from two values found in two control pigs. Since the levels found in the remaining control pigs were below or at half of the detection limit, they were not considered. It can

be concluded from the results in Table 2, that the levels of PCBs in control pigs were within scale of  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . This indicates a 'background' level of contamination by PCBs which was probably caused by Delor 106, originating from a slight contamination of the stable (dust settled in the stable) and from slightly contaminated manger samples, where the roughage prepared in the particular agricultural ecosystem was placed. As already mentioned, the site was polluted by Delor 106 produced in the nearby dyestuff-producing plant Colorlak.

The following results concern the blood plasma of pigs after oral administration of Delor 106. In this case, the high-chlorinated PCB congeners predominate over low-chlorinated ones. To highlight the difference between the levels of PCBs in pigs 13–18 over the monitored period, we selected the results obtained for the 1<sup>st</sup> and the 13<sup>th</sup> sampling. The ratio between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs in individual pigs ranged from 1:2.23 to 1:7.11 for the first sampling and from 1:2.94 to 1:14.98 for the 13<sup>th</sup> sampling. The ratio (low-chlorinated PCBs to high-chlorinated PCBs) calculated on the basis of average values was 1:4.69. The average content of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs administered Delor 106 is introduced in Table 3. It can be seen from the results that the average content is significantly higher, particularly in the case of PCB 138 and PCB 153. Compared with Delor 103, Delor 106 was accumulated to a higher extent. This might reflect differences in chemical, biological and environmental properties of Delor 103 and Delor 106.

**TABLE 2**  
Average levels of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs, in the control group [ $\mu\text{g/kg}$ ]

Pig No	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
9	0.848	0.084	0.234	0.098	1.11	2.28	0.076
11	0.787	0.101	0.223	0.077	1.41	2.78	0.177
average	0.820	0.099	0.230	0.090	1.26	2.53	0.130

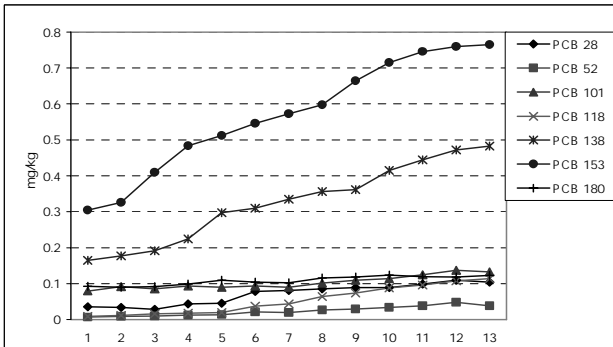
**TABLE 3 - Average levels of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs, after administration of Delor 106 [ $\mu\text{g/kg}$ ].**

Pig No	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
13	0.071	0.024	0.104	0.054	0.326	0.570	0.109
14	0.062	0.016	0.102	0.027	0.210	0.405	0.090
15	0.064	0.021	0.093	0.054	0.316	0.417	0.147
16	0.080	0.033	0.097	0.140	0.429	0.768	0.098
17	0.433	0.115	0.292	0.169	2.051	2.882	0.940
18	0.562	0.278	0.495	0.306	3.190	4.509	1.638
average	0.212	0.081	0.197	0.125	1.087	1.592	0.504
median	0.076	0.029	0.103	0.097	0.378	0.669	0.128
SD	0.225	0.103	0.165	0.105	1.243	1.713	0.647

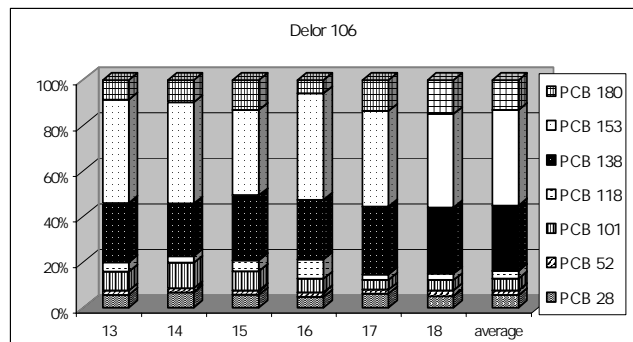
SD – standard deviation



Figure 3 illustrates the dynamics of PCBs in blood plasma of pig no.13 during the experimental monitoring; the levels of both congeners, PCB 138 and PCB 153, increased remarkably. These congeners represent the most common PCBs occurring in raw materials and in animal-based food contaminated by Delor 106. During the monitored period, the level of contamination in pigs after oral administration of Delor 106 was evaluated also on the basis of the levels of individual PCB congeners (in %).

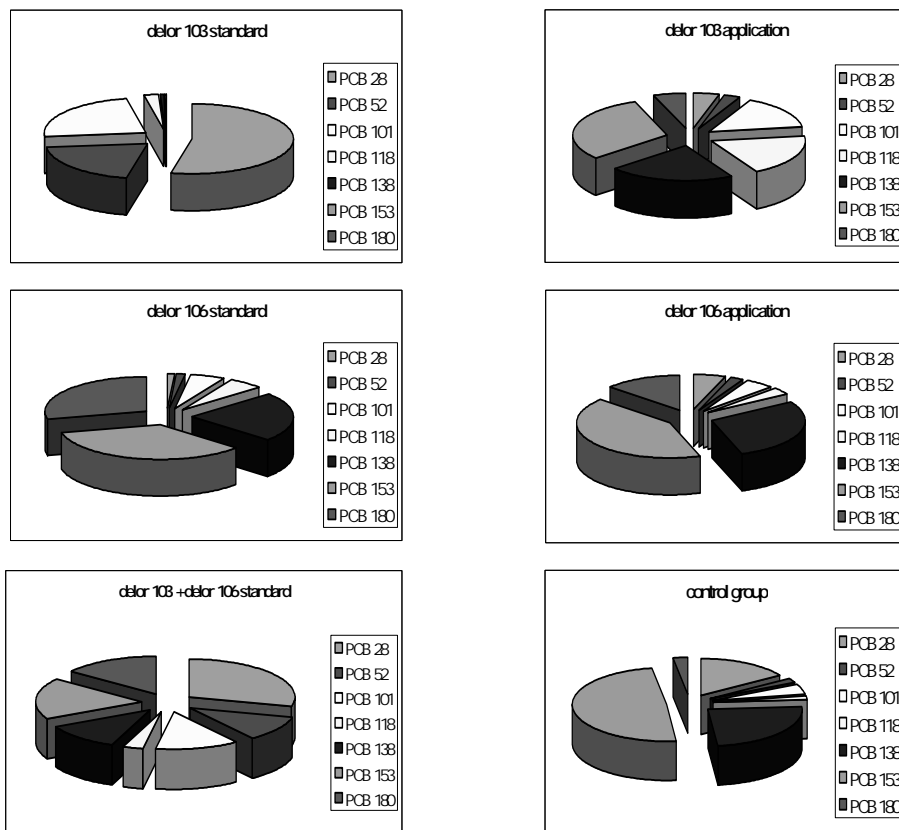


**FIGURE 3 - Dynamics of PCBs in blood plasma of pig No. 13 after administration of Delor 106.**



**FIGURE 4 - Proportional representation of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs from Delor 106 group [%].**

As can be seen in Figure 4, the congener PCB 153 predominated in all pigs, followed by PCB 138. On the other hand, the lowest levels (in %) were found for PCB 52 and PCB 118. This is the major difference between the effects produced by Delor 106 and Delor 103. The spectrum of PCB congeners corresponded well with the values found in tissues, organs and body fluids of farm animals during routine controls, reported in their bulletins by the State Veterinary Administration of the Czech Republic [10] and the Czech Agriculture and Food Inspection Authority of the Czech Republic [11].



**FIGURE 5 Comparison of Delor 103 and Delor 106 with indicator congeners detected in blood plasma.**



Figure 5 presents a comparison of Delor 103 and Delor 106 with indicator congeners found in blood plasma of pigs. The concentrations of PCBs in the commercial products Delor 103 and Delor 106, and in a Delor 103/Delor 106 mixture (1:1), are introduced on the left side, whereas the levels of indicator PCB congeners in blood plasma of pigs are provided on the right side. This graph illustrates that low-chlorinated PCBs in pigs underwent gradual transformation to high-chlorinated PCBs.

Analogous findings were reported by Slovak authors who addressed a similar problem [12]. In their systematic long-term study, commissioned by the management of Chemko Strážské, they detected an increased content of PCB 28 and PCB 52 in some matrices (game) collected at the site of Chemko Strážské. The authors claimed that the level of both congeners was still high, although the concentrations of all PCB congeners had been gradually decreasing over the years.

It is difficult to compare our results with data from literature, because the experiments reported by other authors were usually aimed at the dynamics of PCBs. The authors used contaminated feed [13] instead of a commercial product as in our experiment. Our main effort was to ensure that the experimental animal was contaminated with a definite dose of a commercial PCB-containing product. Furthermore, the above mentioned authors concluded that the decrease of PCB levels was caused by dilution resulting from the growth of pigs and showed, that some PCB congeners occurring in fat may undergo redistribution during an animal's life. The extent of redistribution was shown to be proportional to the number of chlorine atoms in the particular PCB and decreased with the solubility of a particular PCB in water.

## CONCLUSION

The levels of PCBs in blood plasma of pigs were determined after administering capsules containing the commercial products PCB Delor 103 and Delor 106, dissolved in lard. It was shown that the ratio between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs (calculated from average values) over the whole monitoring period in the Delor 103 group was 1:1.38. This confirms that low-chlorinated PCBs underwent metabolic transformation. Furthermore, the content of PCB 153 increased while the levels of PCB 52 and 101 decreased. In the Delor 106 group (except for the pigs no.17 and no.18), the high-chlorinated PCBs predominated; the ratio ranged from 1:2.23 to 1:7.11 for the 1<sup>st</sup> and from 1:2.94 to 1:14.98 for the 13<sup>th</sup> sampling. A level of contamination in tissues resulting from PCBs cannot be assessed only on the basis of the concentrations of PCBs in blood plasma. On the basis of our results, we

suggest to analyse blood plasma and biopsy samples of lard at the same time. This ensures that the ratio between the levels of PCBs in blood plasma and tissues will be correct, enabling to correlate the PCB levels in these two biological materials which in turn can be used afterwards as a possible material for monitoring.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic (CEZ: J16/98" 162700004).

## REFERENCES

- [1] Vávrová M. (1993): Polychlorinated biphenyls (PCB) in agrar ecosystem [Thesis], VŠVF, FVHE Brno, Vol. A 201 pp, Vol. B 600 pp.
- [2] Raszyk J., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Sabata V., Salava J., Palac J. (1996): Occurrence of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the stalls and out door environment in pig-fattening farms. *Vet. Med. (Praha)*, 41 : 165
- [3] Drápal J., Valcl O. (1996): Contamination of food chains by xenobiotics. Situation in 1995. *Inf. Bull. SVS ČR*, 5, 277 pp.
- [4] Internet: <http://svs.aquasoft.cz>
- [5] Zlámalová-Gargošová H. (2001): Distribution of polychlorinated biphenyls (PCB) in tissues of pigs [Thesis], VFU Brno, 134 pp.
- [6] Borlakoglu J.T., Welch V.A., Wilkins J.P., Dils R.R. (1990): Transport and cellular uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs)I. Association of individual PCB isomers and congeners with plasma lipoproteins and proteins in the pigeon. *Biochem. Pharmacol.*, 40 : 265
- [7] Matthews H.B., Surles J.R., Carver J.G., Anderson M.W. (1984): Halogenated biphenyl transport by blood components. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4 : 420
- [8] Mes J.L., Marchand D., Turton P., Lau Y., Ganz P.R. (1992): The determination of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbon residues in human blood, serum and plasma. A comparative study. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 48 : 175
- [9] Mes J., Douglas A.D., Bryce F. (1995): The elimination and estimated half-lives of specific polychlorinated biphenyl congeners from the blood of female monkeys after discontinuation of daily dosing with Aroclor 1254. *Chemosphere*, 30 : 789

- [10] Autors (2001) State Veterinary Administration of the Czech Republic. Praha 2001.
- [11] Autors (2001) Czech Agriculture and Food Inspection Authority. Annual Report.
- [12] Ciberej J., Bílá A., Breyl I. (1999): Information about monitoring of PCB in wild animals living at the territory of Chemko Strážske plant. In: Conference about environmental problems on the occasion of awarding the certificate of environmental management system according to STN EN ISO 14001. Proceeding Strážske, 7.9.1999, p. 16-21.
- [13] Ciberej J., Breyl I., Kováč G. (1999): Influence of the environment on the state of health of wild animals living at the territory of Chemko Strážske plant. In: Conference about environmental problems on the occasion of awarding the certificate of environmental management system according to STN EN ISO 14001. Proceeding Strážske, 7.9.1999, p. 43-45.

---

Received for publication: December 27, 2002

Accepted for publication: July 10, 2003

---

#### **CORRESPONDING AUTHOR**

---

**M. Vávrová**

Department of Veterinary Ecology  
and Environmental Protection  
Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology  
University of Veterinary and  
Pharmaceutical Sciences Brno  
Palackého 1-3  
612 42 Brno - CZECH REPUBLIC

e-mail: vavrovam@vfu.cz