Věstník MŽP ČR, částka 1/2017

Specializované mapy s odborným obsahem (Nmap)

Data o potenciálních biologických efektech emergentních látek v environmentálních směsích

Název organizace: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí RECETOX

Číslo projektu TA ČR: TB030MZP001

Název projektu TA ČR: Emergentní polutanty ve složkách životního prostředí (EMERTOX)

Řešitelský tým projektu:

doc. Ing. Branislav Vrana, Ph.D.

prof. RNDr. Jana Klánová, Ph.D.

doc. RNDr. Pavel Čupr, Ph.D.

RNDr. Roman Prokeš, Ph.D.

RNDr. Jana Borůvková, Ph.D.

Ing. Jitka Bečanová, Ph.D.

Foppe Smedes

doc. Mgr. Klára Hilscherová, Ph.D.

Mgr. Jiří Novák, Ph.D.

Mgr. RNDr. Michal Bittner, Ph.D.

Mgr. Ondřej Sáňka, Ph.D.

Ing. Šimon Vojta, Ph.D.

RNDr. Ondřej Mikeš, PhD.

Mgr. Anežka Sharma

Mgr. Katarína Bányiová

Ing. Kateřina Šebková, Ph.D.

Mgr. Jakub Urík

Ing. Barbora Feixová

EPIS

Výše uvedení členové týmu jsou z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí RECETOX, Přírodovědecké fakulty MU - tedy z řešitelského pracoviště projektu.

Předkládaný soubor specializovaných map s odborným obsahem je jedním z výsledků projektu “Emergentní polutanty ve složkách životního prostředí” č. TB030MZP001 podpořeného programem BETA Technologické agentury České republiky.

Citace:

Hilscherová, K., Čupr, P., Novák, J., Bittner, M., Sáňka, O., Vrana, B., Sharma, A., Bányiová, K., Prokeš, R., Borůvková, J., Bečanová, J., Smedes, F., Vojta, Š., Mikeš, O., Šebková, K., Urík, J., Feixová, B., Klánová, J., 2016. Specializované mapy s odborným obsahem (Nmap). Data o potenciálních biologických efektech emergentních látek v environmentálních směsích. Masarykova univerzita, RECETOX. RECETOX REPORT No. 601. Listopad 2016.

OBSAH

1 Úvod

2 Mapové listy

2.1 Prostorová a časová variabilita potenciálních biologických efektů v dnových sedimentech řeky Moravy a jejího přítoku Dřevnice na Zlínsku

2.2 Sezonalita potenciálních biologických efektů v povrchové a komunální odpadní vodě a v sedimentech v aglomeraci města Brna

2.3 Toxicita dioxinového typu a estrogenita v povrchové vodě v pramenných oblastech (horních tocích) řek

2.4 Estrogenita ve stojatých vodách s masovým rozvojem vodního květu sinic

2.5 Potenciální biologické efekty ve vdechnutelné frakci vzdušného aerosolu (PM10) a plynné frakci volného ovzduší z oblastí s různými zdroji znečištění

2.6 Potenciální biologické efekty ve velikostních frakcích vzdušného aerosolu na lokalitách v Jihomoravském kraji s různými zdroji znečištění

2.7 Potenciální biologické efekty vzorků vnitřního prostředí

Seznam odborných podkladů

1 ÚVOD

Předkládaný soubor specializovaných map s odborným obsahem je jedním z výstupů projektu “Emergentní polutanty ve složkách životního prostředí ”, č. TB030MZP001 podpořeného

programem BETA Technologické agentury České republiky.

Při sledování environmentálních směsí zahrnujících řadu emergentních polutantů je velmi vhodné doplnit chemickou analýzu, tedy kvantitativní stanovení vybraných polutantů, také toxikologickými analýzami charakterizujícími toxický potenciál přítomných polutantů. Hlavním cílem tohoto souboru map je vizualizovat informace o potenciálních biologických efektech směsí látek ve vybraných složkách prostředí. V průběhu řešení projektu byly zpracovány soubory map, které prezentují pilotní data o kontaminaci prostředí hodnocené pomocí toxikologických metod. Byly připraveny mapy ze studií výskytu specifického toxického potenciálu ve vodním prostředí, v ovzduší a ve vnitřním prostředí budov. Vzorky pro toxikologické analýzy byly odebrány, zpracovány a extrahovány vždy paralelně se vzorky pro chemické analýzy, ovšem bez přídavku interních standardů, které by mohly interferovat se sledovanými biologickými aktivitami. Podrobnosti k odběru a zpracování vzorků jsou uvedeny u jednotlivých studií.

Zobrazovaná data o potenciálních biologických efektech směsí polutantů v odebraných vzorcích v jednotlivých studiích zahrnují vždy sadu vybraných toxických potenciálů relevantních pro daný typ prostředí. Narušení signálování buněčných receptorů, na něž se zaměřuje tento soubor map (estrogenní, androgenní, aryl-hydrokarbonový, thyroidní), hraje zásadní roli v celé řadě škodlivých účinků emergentních polutantů, zejména v endokrinní disrupci (Janošek et al., 2006; Kortenkamp et al., 2012). K charakterizaci specifického toxického potenciálu byly využity zejména biotesty zaměřené na estrogenní a antiestrogenní aktivitu, androgenní a antiandrogenní aktivitu a toxicitu dioxinového typu zprostředkovanou aryl-hydrokarbonovým receptorem. Tyto biotesty byly vybrány z toho důvodu, že detekují polutanty s často diskutovanými mechanismy účinku (Janošek et al., 2006; Kortenkamp et al., 2012). S ohledem na rostoucí počet emergentních polutantů, které mohou působit i jinými mechanismy účinku, byla sada biotestů pro studie zatížení vnitřního prostředí rozšířena o biotesty pro hodnocení thyroidní aktivity a biotest pro hodnocení cytotoxicity vzorků na buňkách dýchací soustavy.

Detekce uvedených potenciálních biologických efektů probíhá s využitím biotestů založených na luminometrickém stanovení reportérového genu luciferázy exprimované po aktivaci příslušného receptoru v transgenních buněčných liniích. Prvním krokem hodnocení účinků vzorků je test cytotoxicity a stanovení netoxické koncentrace pro buněčné modely (Brack et al., 2016) k testování specifických účinků. Hodnocení toxicity dioxinového typu je prováděno za využití buněčné linie AZ-AHR připravené z lidské buněčné linie jaterního karcinomu HepG2 transfekcí genem pro luciferázu pod kontrolou aryl-hydrokarbonového receptoru (Novotna et al., 2011). Alternativně je také používána buněčná linie H4IIE-luc, což je buněčná linie připravená z linie potkaního hepatomu H4IIE transfekcí genem pro luciferázu (Érseková et al., 2014). Tento gen je pod kontrolou arylhydrokarbonového receptoru (AhR), měříme tedy aktivitu látek zprostředkovanou tímto receptorem, také nazývanou toxicita dioxinového typu. Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity vzorků je prováděno za využití buněčné linie HeLa9903 připravené z lidské buněčné linie karcinomu děložního čípku HeLa transfekcí genem pro luciferázu pod kontrolou estrogenního receptoru (OECD, 2012). Alternativně je také používána buněčná linie MVLN připravená z lidské buněčné linie prsního karcinomu MCF-7 transfekcí genem pro luciferázu (Érseková et al., 2014). Hodnocení androgenní a antiandrogenní aktivity vzorků je prováděno za využití buněčné linie MDA-kb2 připravené z lidské buněčné linie prsního karcinomu MDA-MB-453 transfekcí genem pro luciferázu pod kontrolou androgenního a glukokortikoidního receptoru (Neale et al., 2015). Pro odlišení androgenní aktivity od možné glukokortikoidní aktivity je potenciální androgenní aktivita potlačena přidáním antiandrogenní látky flutamidu. Vhodné je i využití transgenního kvasinkového modelu Saccharomyces cerevisiae, kde gen pro luciferázu je pod kontrolou androgenního receptoru (Leskinen et al., 2005). Hodnocení thyroidní aktivity vzorků je prováděno za využití buněčné linie PZ-TR připravené z lidské buněčné linie jaterního karcinomu

HepG2 transfekcí genem pro luciferázu, jehož exprese je řízena thyroidním receptorem (Illés et al., 2015). Ve studiích zaměřených na akvatické prostředí byla cytotoxicita podrobně hodnocena pomocí luminometrického stanovení životaschopnosti buněk rekombinantních kvasinek Saccharomyces cerevisiae po expozici testovaným vzorkům (Leskinen et al., 2005). Pro detailní hodnocení cytotoxického potenciálu vzorků z vnitřního prostředí byla využita buněčná linie lidského bronchiálního epitelu BEAS-2B (Ovrevik et al., 2010).

Principem biodetekce za použití uvedených transgenních buněčných linií je stanovení aktivity reportérové luciferázy po aktivaci příslušného receptoru. Kvantifikace celkového potenciálu směsi přítomných polutantů působit sledovaným mechanismem účinku se provádí vyjádřením v ekvivalentech koncentrace modelové látky. Například při hodnocení estrogenity (linie HeLa9903 nebo MVLN) je modelovým estrogenem 17β-estradiol a množství látek ve vzorku působících estrogenním mechanismem účinku se vyjadřuje v ekvivalentech koncentrace této látky, např. v ng/l EEQ (EEQ - 17β-estradiol ekvivalent), která by způsobila stejný účinek jako testovaný vzorek. Analogicky to platí i pro ostatní typy mechanismů účinku. Androgenita vzorku se vyjadřuje v ekvivalentech koncentrace modelového androgenu dihydrotestosteronu (linie MDA-kb2). Toxicita dioxinového typu vzorku se vyjadřuje v ekvivalentech koncentrace modelové látky 2,3,7,8tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD), tedy v tzv. toxických ekvivalentech (BIOTEQ). Thyroidní aktivita vzorku se vyjadřuje v ekvivalentech koncentrace modelového thyroidního hormonu trijodtyroninu (T3).

Antagonistické účinky vzorků se stanovují tak, že společně s testovaným vzorkem jsou buňky ko-exponovány i střední efektivní koncentrací (EC_{50}, tedy koncentrace látky vyvolávající 50% účinek) modelové látky příslušné pro daný typ mechanismu účinku. Například při stanovování antiestrogenní aktivity vzorku je modelovým estrogenem již zmíněný 17β-estradiol, který se přidává k testovanému vzorku v koncentraci odpovídající hodnotě EC_{50}. Antiestrogenní efekt je pak vyjádřen jako index antiestrogenity, což je inverzní hodnota koncentrace vzorku vyvolávající specifickou míru poklesu aktivity oproti tomuto přidanému modelovému estrogenu. Optimální je vyjadřovat tyto koncentrace na úrovni střední antagonistické koncentrace (IC_{50} pro antagonistický účinek). Bohužel komplexní environmentální vzorky často vykazují významnou odpověď v biotestech, která ale nedosahuje úrovně 50% odpovědi proti standardní modelové látce. V případě, že účinky byly statisticky významné, ale antagonistický účinek většiny vzorků nedosáhl hodnoty IC_{50}, by účinky u většiny vzorků nebyly kvantifikovány. V tomto případě se pro kvantifikaci antagonistických účinků zpravidla používá koncentrace způsobující 20 nebo 25% účinek (IC_{20} či IC_{25}), kterého dosáhla velká část vzorků, a tudíž umožňuje dobrou kvantifikaci biologických potenciálů a jejich srovnání mezi různými lokalitami. Stejný přístup se využívá i při hodnocení antiandrogenity a cytotoxicity, kde hodnotíme index antiandrogenity a index cytotoxicity. Vyšší hodnoty těchto indexů tedy indikují vyšší specifický toxický potenciál. Případně lze screeningová data pro relativní srovnání mezi lokalitami vyjádřit jako velikost antagonistického účinku určité koncentrace vzorku v procentech. Tohoto přístupu bylo využito v první uvedené studii, kde antiandrogenní aktivita vzorků sedimentu byla vyjádřena jako procentuální inhibice odpovědi standardního androgenu. V případě studie se vzorky vzduchu a prachu z vnitřního prostředí byly antiestrogenita a antiandrogenita vyjádřeny v ekvivalentech koncentrace specifických inhibitorů dané signální dráhy, standardního antiestrogenu fulvestrantu a standardního antiandrogenu flutamidu.

U map jsou specifikovány limity kvantifikace (LOQ) zobrazovaného potenciálního biologického efektu. Hodnoty pod limitem kvantifikace jsou v grafech vykresleny šedou barvou na úrovni LOQ/2.

2 MAPOVÉ LISTY

Předkládaný soubor map obsahuje série studií zaměřených na různé složky prostředí. Celkově jsou zahrnuty výsledky ze sedmi studií, čtyři z nich jsou zaměřeny na akvatické prostředí, dvě na vnější ovzduší a jedna na vnitřní prostředí budov.

Čtyři studie přinášejí data o potenciálních biologických efektech látek v environmentálních směsích z různých typů akvatických ekosystémů. V mapách jsou prezentována data ohledně kontaminace vody (vzorkované i pomocí pasivních vzorkovačů) a sedimentů jako důležitých sledovaných matric z hlediska výskytu emergentních polutantů.

Uživatelem těchto výsledků je nejen odborná veřejnost, ale také státní a regionální správa včetně odborů MŽP, které mohou výsledky uplatnit k plnění povinnosti ČR v rámci mezinárodních úmluv. Další cílovou skupinou uživatelů jsou i firmy a instituce zabývající se kvalitou a znečištěním vnitřního a vnějšího prostředí a vodního ekosystému. V podmínkách ČR jsou to zejména zdravotní ústavy, místní samosprávy, hygienické stanice a společnosti zodpovědné za kvalitu a hygienický stav užívaných staveb, dále pak státní podniky Povodí a Český hydrometeorologický ústav.

2.1 PROSTOROVÁ A ČASOVÁ VARIABILITA POTENCIÁLNÍCH BIOLOGICKÝCH EFEKTŮ V DNOVÝCH SEDIMENTECH ŘEKY MORAVY A JEJÍHO PŘÍTOKU DŘEVNICE NA ZLÍNSKU

Tato studie podrobně charakterizuje specifické toxické potenciály kontaminantů říčních sedimentů. Popisuje sezónní a prostorovou variabilitu kontaminace sedimentů látkami s dioxinovým a endokrinně-disruptivním potenciálem v reprezentativní průmyslové oblasti. Sedimenty byly vzorkovány v měsíčním intervalu (28 dní) od července 2007 do července 2008 na pěti lokalitách v jihovýchodní části České republiky. Vybrána byla řeka Morava a její přítok Dřevnice, jejichž voda i sediment jsou historicky zatížené okolní intenzivní hospodářskou a průmyslovou činností. Lokalita Bělov (BE) leží na řece Moravě nad soutokem s řekou Dřevnicí. Lokalita Malenovice (MA) leží na řece Dřevnici a je zatížena průmyslovými a komunálními odpadními vodami z aglomerace Zlína a Otrokovic. Profil Spytihněv (SP) je lokalizován pod soutokem řeky Moravy s řekou Dřevnice. Lokality Čerťák (CE) a Čerťák - mrtvé rameno (CR) leží dále po toku řeky Moravy a byly vybrány tak, aby na nich bylo možné provést srovnání znečištění v říčním korytu aktivního toku a jeho slepých ramenech. Lokality MA, SP, CE a CR jsou po proudu od komunálních čistíren odpadních vod. Oproti tomu lokalita BE se nachází po proudu od malých měst a vesnic bez čistíren odpadních vod.

Vzorkovací tyčí byl odebrán vždy jen povrchový sediment (max. 10 cm) ve vzdálenosti cca 1 až 2 m od břehu řeky. Reprezentativní vzorky říčních sedimentů z každé lokality byly připraveny smícháním pěti až osmi dílčích vzorků odebraných na rozloze cca 4 m^2. Po převezení vzorků do laboratoře byly ze sedimentů odebrány kusy materiálů větší než 1 cm a sedimenty byly lyofilizovány. Suché vzorky sedimentů byly následně homogenizovány, pomlety, prosety (2mm síto) a uskladněny při -20 °C. Pro testování vzorků sedimentů v biotestech bylo použito 20 g lyofilizovaného sedimentu, který byl extrahován 1 hodinu dichlormethanem (DCM) pomocí automatizovaného Soxhletova extraktoru (B-811 Büchi, Švýcarsko). Extrakty byly ošetřeny práškovou aktivní mědí pro odstranění síry a zkoncentrovány pomocí proudu dusíku. Část extraktu byla převedena do ethanolu (EtOH) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Pro testování připravených vzorků byly v této studii použity tři linie savčích buněk s transfekovaným luciferázovým genem. Toxicita dioxinového typu byla stanovená pomocí in vitro biotestu na buněčné linii H4IIE-luc. Estrogenita byla stanovená pomocí in vitro biotestu na buněčné linii MVLN. Androgenita a antiandrogenita byly stanoveny pomocí in vitro biotestu na buněčné linii MDA-kb2. Výsledky této studie jsou prezentovány v mapách 1 - 5.

2.2 SEZONALITA POTENCIÁLNÍCH BIOLOGICKÝCH EFEKTŮ V POVRCHOVÉ A KOMUNÁLNÍ ODPADNÍ VODĚ A V SEDIMENTECH V AGLOMERACI MĚSTA BRNA

Tato dvouletá studie charakterizuje trendy a variabilitu znečištění v povodí dvou řek v oblasti s řadou průmyslových činností. Vzorky byly odebírány v druhé největší městské aglomeraci (Brno) v České republice. Město Brno s 400 000 obyvateli se rozkládá v povodí řek Svratky a Svitavy. Čistírna odpadních vod (ČOV) v Brně-Modřicích slouží k čistění odpadních vod přiváděných systémem kanalizačních stok z města Brna a ve stále větší míře prostřednictvím soustavy čerpacích stanic i z širokého okolí Brna. Bylo vybráno 9 vzorkovacích lokalit na třech řekách Svratka, Svitava a Bobrava. Vzorkovací místa na řece Svratce byla nad Brnem v městské části Kníničky pod přehradou (lokalita 1) a pod Brnem před soutokem s řekou Svitavou (lokalita 2). Na řece Svitavě byla vzorkovací místa Bílovice nad Svitavou (malé město nad Brnem, lokalita 3), pod Brnem pak před soutokem s řekou Svratkou (lokalita 4). Další odběrová místa byla na přítoku (lokalita 5) a odtoku (lokalita 6) odpadních vod na ČOV Modřice, která se nachází pod soutokem řeky Svratky a Svitavy. Sedimenty nebyly na lokalitě 5 (přítok odpadních vod na ČOV) vzorkovány, lokalita 6 byla v případě odběru sedimentů umístěna v řece Svratce pod výpustí odpadních vod. Třetí vzorkovanou řekou byla Bobrava (lokalita 9), která se vlévá do Svratky pod čistírnou odpadních vod. Další dvě odběrová místa byla dále po proudu na řece Svratce pod soutokem s řekou Bobravou v blízkosti menších měst Rajhradice (lokalita 7) a Židlochovice (lokalita 8).

Vzorkování probíhalo v letech 2007 - 2008, vždy na jaře a na podzim. Pro hodnocení úrovně znečištění byly odebírány dva typy vzorků: voda a sediment. Sediment se odebíral vzorkovací tyčí. Použit byl jen povrchový sediment (5-10 cm) odebraný ve vzdálenosti cca 1 až 2 m od břehu řeky. Ze sedimentů byly odebrány větší kusy materiálů jako dřevo, listí, kameny větší než 1cm a sedimenty byly lyofilizovány. Suché vzorky sedimentů byly následně homogenizovány, pomlety a prosety (2mm síto). Pro testování vzorků sedimentů v biotestech bylo použito 5 g lyofilizovaného sedimentu, který byl extrahován hexan: acetonem (3:1) automatickým Soxhletovým extraktorem (B-811 Büchi, Švýcarsko). Na získání vzorků vody byly použity dva typy pasivních vzorkovačů: s polopropustnou membránou (SPMD) pro hydrofobní kontaminanty a vzorkovače POCIS pro polární a hydrofilní sloučeniny. Vzorkování probíhalo dle metody Grabic et al. (2010). Vzorkovače byly umístěny v hloubce 0,5-1 m po dobu 21-28 dní. Po ukončení vzorkovací doby byly membrány až do analýzy skladovány v uzavřených nádobách v mrazničce při teplotě -18 °C. K eluci látek ze vzorkovače SPMD byl použit hexan a z POCIS kombinace rozpouštědel dichlormethan:methanol:toluen (8:1:1). Extrakty byly zkoncentrovány pomocí proudu dusíku. Část každého extraktu byla převedena do DMSO pro testování in vitro. Toxicita dioxinového typu byla stanovena pomocí in vitro biotestu na buněčné linii H4IIE-luc, antiestrogenita na buněčné linii MVLN, antiandrogenita na buněčné linii MDA-kb2. Cytotoxicita byla podrobně hodnocena pomocí luminometrického stanovení životaschopnosti buněk rekombinantních kvasinek Saccharomyces cerevisiae exponovaných testovaným vzorkům (Leskinen et al., 2005). Vzorkovací rychlosti SPMD pro výpočet navzorkovaného množství vody byly vypočítány pomocí 4 provozních referenčních látek (d_{10}-acenaften, d_{10}-fluoren, d_{10}-fenantren, d_{12}-chrysen). Potřebné hodnoty rozdělovacích koeficientů látek v systému vzorkovač SPMD-voda byly odhadnuty z hodnot rozdělovacího koeficientu oktanol-voda metodou podle Huckins a kol. (2006). Na základě kvalifikovaného předpokladu, že akumulace látek se sledovanými účinky do vzorkovače POCIS je během celé doby jejich expozice časově integrativní (tj. v případě konstantní koncentrace ve vodě roste koncentrace ve vzorkovači lineárně v čase) (Alvarez et al., 2007), jsou výsledky normalizovány a vyjádřeny jako potenciální biologické efekty látek akumulovaných za 21 dní expozice. Normalizace byla provedena s cílem zjednodušit srovnatelnost výsledků mezi různými lokalitami. Výsledky hodnocení potenciálních biologických efektů z této studie jsou prezentovány v mapách č. 6 - 18.

2.3 TOXICITA DIOXINOVÉHO TYPU A ESTROGENITA V POVRCHOVÉ VODĚ V PRAMENNÝCH OBLASTECH (HORNÍCH TOCÍCH) ŘEK

Pro zhodnocení specifických toxických potenciálů v povrchové vodě v pramenných oblastech řek bylo vybráno sedm horních toků (Tichá Orlice, Jizerka, Boberský potok, Mže, Volyňka, Volarský potok, Živný potok). Na nich byl sledován vliv prvních obcí s čistírnami odpadních vod (Králíky, Jilemnice, Cvikov, Tachov, Vimperk, Volary a Prachatice). Všechny vybrané lokality se nacházejí v relativně čistých oblastech bez průmyslového zatížení. Sledované obce mají cca 1900 - 13000 obyvatel a objem vody vypouštěné z čistíren odpadních vod představoval na jednotlivých horních tocích v průměru 4 - 30 % objemu vody v recipientu. Na získání vzorků vody byly použity pasivní vzorkovače POCIS pro polární a hydrofilní sloučeniny. Jeden vzorkovač POCIS-Pest a jeden POCIS-Pharm (Exposmeter AB, Švédsko) byl umístěn vždy 2 - 5 km proti proudu toku (zalesněná část bez antropogenního znečištění) od prvního sídla a komunální čistírny odpadních vod (ČOV) a druhá sada vzorkovačů byla umístěna 150 - 250 m pod ČOV. Všechny vzorkované oblasti byly v prostředí lesů, pastvin nebo přirozených či polopřirozených stanovišť. Většina ČOV pracovala na principu biologického čištění odpadních vod za pomoci aktivovaného kalu. Vzorkovací zařízení bylo ve vodním toku umístěno 16 - 23 dní během ledna nebo června 2008. Na přípravu extraktů z pasivních vzorkovačů typu POCIS-Pharm byl použit methanol a pro POCIS-Pest směs dichlormethan:methanol:toluen (8:1:1). Extrakty byly pro testování zakoncentrovány pomocí proudu dusíku.

Estrogenita v extraktech obou typů pasivních vzorkovačů vod POCIS (Pharm, Pest) z horních toků řek byla stanovena pomocí in vitro biotestu na buněčné linii MVLN a toxicita dioxinového typu byla stanovená pomocí in vitro biotestu na buněčné linii H4IIE-luc. Na základě kvalifikovaného předpokladu, že akumulace látek se sledovanými účinky do vzorkovače POCIS je během celé doby jejich expozice časově integrativní (tj. v případě konstantní koncentrace ve vodě roste koncentrace ve vzorkovači lineárně v čase) (Alvarez et al., 2007), jsou výsledky normalizovány a vyjádřeny jako potenciální biologické efekty látek akumulovaných za 20 dní expozice. Normalizace byla provedena s cílem zjednodušit srovnatelnost výsledků mezi různými lokalitami. Výsledky této studie zobrazené v mapách č. 19 - 21 uvádějí srovnání koncentrací estrogenního a dioxinového ekvivalentu v POCIS vzorkovačích exponovaných v horních tocích řek vždy nad obcí a pod obcí a čistírnou odpadních vod.

2.4 ESTROGENITA VE STOJATÝCH VODÁCH S MASOVÝM ROZVOJEM VODNÍHO KVĚTU SINIC

Tato dvouletá studie charakterizuje estrogenní aktivitu ve stojatých povrchových vodách, zahrnujících rybníky, přehrady i menší nádrže. Vzorky vody byly odebrány celkem z 20 lokalit s masovým rozvojem vodního květu sinic. Z toho 16 lokalit bylo v České republice, pět lokalit v Jihomoravském kraji (lokality 1-5) a jedenáct v Jihočeském kraji (lokality 6 a 11-20). Čtyři vodní nádrže/rybníky byly vzorkovány v Maďarsku (lokality 7-10). Každá odběrová lokalita reprezentovala samostatné vodní těleso - nádrž, přehradu či rybník. Jejich názvy a umístění jsou uvedeny v mapě č. 22. Odběry byly realizovány v letních měsících (konec července - září) roku 2013 a 2014. Na každé lokalitě bylo odebráno 2,5 litru vody do tmavých skleněných lahví, které byly transportovány v chladicím boxu do laboratoře, uloženy ve tmě při 4 °C a zpracovány do 24 hod. Vzorky byly centrifugovány při 3900 g a filtrovány přes 0,6µm papírové filtry k odstranění částic a buněk vodního květu. Vzorky byly zpracovány prostřednictvím extrakce na tuhou fázi (SPE). Byly použity C18 Oasis HLB kolony (1g, Waters, Milford, USA) prekondiciované 10 ml methanolu a 10 ml vody. Na kolonu byly aplikovány 2 litry vody, eluce byla provedena 20 ml methanolu a eluáty z kolony zakoncentrovány pro analýzy. V těchto vzorcích byla analyzována estrogenita pomocí in vitro transgenního buněčného modelu HeLa9903. Studie poukazuje na velmi častou přítomnost látek s

estrogenní aktivitou ve stojatých povrchových vodách.

Mapy č. 22 - 23

Tři studie přinášejí data o potenciálních biologických efektech látek v environmentálních směsích z vnějšího ovzduší a z vnitřního prostředí budov. V mapách jsou prezentována data popisující kontaminaci plynné a částicové frakce ovzduší a také prachu jako důležitých sledovaných matric z hlediska výskytu emergentních polutantů.

2.5 POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ EFEKTY VE VDECHNUTELNÉ FRAKCI VZDUŠNÉHO AEROSOLU (PM10) A PLYNNÉ FRAKCI VOLNÉHO OVZDUŠÍ Z OBLASTÍ S RŮZNÝMI ZDROJI ZNEČIŠTĚNÍ

Studie se zaměřila na vdechnutelnou frakci vzdušného aerosolu (PM10) a plynnou frakci volného ovzduší odebrané na osmi lokalitách v okolí Uherského Hradiště a šesti lokalitách v Neratovicích. Jako referenční lokalita sloužila observatoř v Košeticích. Zájmové regiony byly vybrány tak, aby zahrnovaly různorodé zdroje znečištění ovzduší. Hlavním zdrojem znečištění na observatoři Košetice bylo pravděpodobně zemědělství. Lokality v okolí Uherského Hradiště byly převážně zatíženy zdroji znečištění z dopravy a částečně též z chemického průmyslu (produkce barviv). V Neratovicích byl předpokládaným hlavním zdrojem znečištění chemický průmysl. Vzorky byly odebrány v letních měsících roku 2005 velkoobjemovými čerpadly s křemičitým filtrem (quartz filtr) a sorbentem PUF (polyuretanová pěna) pro odběr plynné a částicové frakce ovzduší po dobu 4-7 dnů. Odběr dvou typů matrice významně rozšiřuje spektrum navzorkovaných látek. Frakce PM10 obsahovala méně volatilní látky, které se mohou dostat do dýchací soustavy člověka spolu s vdechnutým aerosolem. Plynná frakce obsahovala převážně semivolatilní polutanty, které pronikají do dýchací soustavy přímo s vdechnutým vzduchem. Filtry s odebranými vzorky byly extrahovány dichlormethanem pomocí automatizovaného Soxhletova extraktoru (B-811 Büchi, Švýcarsko). Pro analýzu pomocí biotestů byly vzorky převedeny z dichlormethanu do dimethylsulfoxidu. Potenciální biologické efekty vzorků byly stanoveny s použitím sady tří biotestů. Antiandrogenita vzorků byla detekována pomocí transgenního kvasinkového modelu Saccharomyces cerevisiae (Leskinen et al., 2005), antiestrogenní potenciál pomocí lidské buněčné linie MVLN a toxicita dioxinového typu za použití in vitro biotestu na buněčné linii H4IIE-luc. Výsledky hodnocení potenciálních biologických efektů z této studie jsou prezentovány v mapách č. 24-27.

2.6 POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ EFEKTY VE VELIKOSTNÍCH FRAKCÍCH VZDUŠNÉHO AEROSOLU NA LOKALITÁCH V JIHOMORAVSKÉM KRAJI S RŮZNÝMI ZDROJI ZNEČIŠTĚNÍ

Částice vzdušného aerosolu menší než 10 µm jsou sice schopny proniknout do dýchacího traktu, ale hloubka jejich průniku úzce souvisí s jejich aerodynamickým průměrem. Hrubé částice (2,5-10 µm) jsou zachyceny hlavně v horních cestách dýchacích a jsou následně z těla vyloučeny. Jemnější částice pronikají hlouběji až do oblasti výměny plynů, kde mohou do organizmu uvolnit potenciálně toxické látky. Velikost částic také úzce souvisí s procesem jejich vzniku a typem polutantů, které jsou s částicemi asociovány. Hrubé částice sestávají z velké části z minerálních komponent, naopak jemné obsahují velké množství uhlíku a často obsahují relativně velké množství organických polutantů.

V rozmezí července 2007 až února 2008 byl na šesti lokalitách v Jihomoravském kraji po dobu čtyř týdnů/lokalitu postupně proveden odběr vzorků vzdušného aerosolu kaskádovým impaktorem a plynné frakce středně-objemovým vzorkovačem na sorbent PUF (polyuretanová pěna). Umístění odběrových lokalit je vykresleno na mapě číslo 28. Lokality byly zvoleny tak, aby se lišily hlavními zdroji znečištění a aby zahrnovaly široké spektrum možných vlastností vzdušného aerosolu. Lokalita cementárna byla znečištěna produkcí cementu a spojenými spalovacími procesy. Hlavním

zdrojem znečištění na lokalitě kamenolom byla pravděpodobně těžká technika, na letišti v Tuřanech zemědělství a doprava, na městské lokalitě v Brně doprava a lokální topeniště, v Kyjově průmysl a na vesnici lokální topeniště. Na každé lokalitě byl odebrán aerosol v šesti velikostních frakcích (7,2-10 µm; 3-7,2 µm; 1,5-3 µm; 0,95-1,5 µm a 0,49-0,95 µm) a látky přítomné v plynné fázi. Filtry s odebranými vzorky byly extrahovány dichlormethanem pomocí automatizovaného Soxhletova extraktoru (B-811 Büchi, Švýcarsko). Pro analýzu pomocí biotestů byly vzorky převedeny z dichlormethanu do dimethylsulfoxidu. U vzorků byly zjištěny a v mapách jsou vykresleny toxicita dioxinového typu stanovená pomocí in vitro modelu H4IIE-luc, antiestrogenita (buněčná linie MVLN) a antiandrogenita (buněčná linie MDA-kb2). Výsledky ukazují výrazný vliv zdroje znečištění na distribuci polutantů mezi velikostní frakce vzdušného aerosolu.

Mapy č. 28 - 31

2.7 POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ EFEKTY VZORKŮ VNITŘNÍHO PROSTŘEDÍ

Tato studie byla zaměřena na vnitřní prostředí budov, kde tráví člověk většinu času. Pro vzorkování vnitřního prostředí bylo vybráno osm lokalit. Vzorkované lokality zahrnují přednáškové místnosti (lokalita 1, 2) a kancelářské prostory (lokalita 3, 4, 5) v areálu Univerzitního kampusu Masarykovy univerzity v Brně, pro charakterizaci expozice pracujícího člověka, který v těchto prostorách tráví významnou část dne. Dále pak bylo vzorkováno domácí prostředí v Brně (lokalita 7) a malých obcích Březině (u Křtin, lokalita 6) a Ivani (lokalita 8), odrážející expozici převážně žen na mateřské dovolené, dětí a dále pracujících lidí, kteří v domácím prostředí tráví značnou část času během dne. Do každé místnosti byly umístěny 2 nízko-objemové aktivní vzorkovače s křemičitým filtrem (quartz filtr) a sorbentem PUF (polyuretanová pěna) pro odběr plynné a částicové frakce ovzduší pro následnou toxikologickou a chemickou analýzu. V závěru kampaně byly odebrány prachové částice pomocí vysavače se speciálním filtrem. Jedná se o metodu, kdy prachové částice jsou zachytávány na vloženém křemenném filtru umístěném v hadici vysavače při vyvinutí podtlaku. Filtry byly extrahovány pomocí dichlormethanu a upraveny pro chemickou a toxikologickou analýzu. Vzorky pro toxikologickou analýzu byly převedeny do methanolu a použity do baterie toxikologických testů. V rámci této studie byla na osmi lokalitách sledována toxicita dioxinového typu, estrogenní aktivita, thyroidní aktivita, antiandrogenní a antiestrogenní aktivita a cytotoxicita v bronchiálních buňkách. Zjištěním potenciálních biologických efektů odebraných matric ve vnitřním prostředí a propojením této informace s kvantitativním stanovením polutantů je možné docílit komplexního pohledu na expozici člověka. Pro detailní hodnocení cytotoxického potenciálu vzorků z vnitřního prostředí byla využita buněčná linie lidského bronchiálního epitelu BEAS-2B (Ovrevik et al., 2010). Principem hodnocení cytotoxicity v těchto buňkách je fluorimetrické stanovení životaschopnosti buněk exponovaných testovaným vzorkům (Brack et al., 2016). Pro kvantifikaci detekované antiandrogenity a antiestrogenity byly v této studii nově využity modelové standardní látky se známým inhibičním/antagonistickým účinkem na signální dráhu androgenního resp. estrogenního receptoru. Antagonistický účinek vzorků tak bylo možné vyjádřit jako ekvivalentní koncentraci známého inhibitoru (antiestrogenu či antiandrogenu), která má stejné účinky jako směs látek ve studovaném vzorku. Antiestrogenní potenciál byl vyjádřen v ekvivalentní koncentraci standardního antiestrogenu fulvestrantu (ICI-182,780) a antiandrogenita v ekvivalentní koncentraci standardního antiandrogenu flutamidu. Tento přístup je stále častěji využíván v odborné literatuře, protože poskytuje řadu předností. Na rozdíl od indexů antagonistických účinků použitých v předchozích studiích umožňuje vyjádření účinků v ekvivalentech koncentrací standardních látek jednodušší porovnání absolutních hodnot účinku, protože dvojnásobná koncentrace ekvivalentu inhibitoru jednoznačně vyjadřuje dvojnásobný inhibiční účinek. Vyjádření inhibičního (antagonistického) účinku jako koncentrace standardního inhibitoru (antagonistické látky) tak umožňuje lepší porovnatelnost dat mezi studiemi využívajícími různé typy biotestů. Vyjádření účinku jako ekvivalentní koncentrace známého inhibitoru totiž může

do určité míry eliminovat rozdíly v citlivosti biotestů.

Mapy č. 32 – 44

SEZNAM ODBORNÝCH PODKLADŮ

Alvarez D.A., et al., 2007. Chapter 8 Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water: polar organic chemical integrative sampler (POCIS), in: R. Greenwood, G. Mills, B. Vrana (Eds.), Compr. Anal. Chem. Passiv. Sampl. Tech. Environ. Monit., Volume 48, Elsevier, pp. 171-197.

Brack, W. et al., 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments - An indepth overview. Science of the Total Environment, 544, pp.1073-1118.

Érseková, A. et al., 2014. Effect-based assessment of passive air samples from four countries in Eastern Europe. Environmental monitoring and assessment, 186(6), pp.3905-3916.

Grabic, R. et al., 2010. Passive sampling methods for monitoring endocrine disruptors in the Svratka and Svitava Rivers in the Czech Republic. Environ Toxicol Chem, 29, pp.550-5.

Huckins, J.N., Petty J.D. & Booij, K., 2006. Monitors of Organic Chemicals in the Environment: Semipermeable Membrane Devices, Springer, New York, USA.

Illés, P., Brtko, J. & Dvořák, Z., 2015. Development and Characterization of a Human Reporter Cell Line for the Assessment of Thyroid Receptor Transcriptional Activity: A Case of Organotin Endocrine Disruptors. Journal of agricultural and food chemistry, 63(31), pp.7074-83.

Jalova, V. et al., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. Environment international, 59, pp.372-83.

Janošek, J. et al., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors--Interactions, effects and in vitro assessment. Toxicology in Vitro, 20(1), pp.18-37.

Jarosova, B. et al., 2012. Changes in concentrations of hydrophilic organic contaminants and of endocrine-disrupting potential downstream of small communities located adjacent to headwaters. Environment International, 45(1), pp.22-31.

Kortenkamp, A. et al., 2012. STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS Final Report Project Contract Number SUMMARY OF THE STATE OF THE SCIENCE Revised version , 29 January 2012 1, Available at: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/annex1_summary_state_of_science.pdf [Accessed November 3, 2016].

Leskinen, P. et al., 2005. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. Chemosphere, 61(2), pp.259-266.

Macikova, P. et al., 2014. Longer-term and short-term variability in pollution of fluvial sediments by dioxin-like and endocrine disruptive compounds. Environmental Science

and Pollution Research, 21(7), pp.5007-5022.

Neale, P.A. et al., 2015. Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modeling. Environmental Science & Technology, 49(24), pp.14614-14624.

Novák, J. et al., 2009. Pollutants in particulate and gaseous fractions of ambient air interfere with multiple signaling pathways in vitro. Environment International, 35(1), pp.43-49.

Novák, J. et al., 2014. Composition and effects of inhalable size fractions of atmospheric aerosols in the polluted atmosphere. Part II. In vitro biological potencies. Environment international, 64, pp.64-70.

Novotna, A., Pavek, P. & Dvorak, Z., 2011. Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: Construction and characterization. Environmental Science and Technology, 45(23), pp.10133-10139.

OECD, 2012. Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists. OECD Publishing. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-455-performance-based-test-guideline-forstably-transfected-transactivation-in-vitro-assays-to-detect-estrogen-receptoragonists_9789264185388-en [Accessed November 3, 2016].

Ovrevik, J. et al., 2010. Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Toxicology and applied pharmacology, 242(3), pp.270-80.

EPIS