Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí

Studium toxicity PFAS s využitím řas

Study of PFAS toxicity using algae

Diplomová práce

Zpracovala: Bc. Johana Kašparová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Michaela Hegrová Helusová

Praha, 2024

Poděkování

Velké poděkování patří hlavně mé konzultantce Mgr. Michaele Hegrové Helusové za její laskavost, trpělivost a podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu mého výzkumu v laboratořích a psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat Ivanu Titovovi za pomoc při statistickém zpracování dat. Ráda bych své poděkování věnovala vedoucímu své diplomové práce panu prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D., který mi byl po celou dobu psaní ochoten poskytovat přínosné informace, zkušenosti a díky němu jsem získala nové obzory v oboru ekotoxikologie. Chtěla bych také poděkovat svým kolegům a kolegyním na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, kteří mi vždy ochotně pomohli a bez kterých bych byla v laboratoři ztracená. Na závěr patří velké poděkování mé rodině a přátelům, díky kterým jsem během svého studia neklesala na mysli a byla neustále motivována k úspěšnému dokončení.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Předložená tištěná verze diplomové práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze 2024 Bc. Johana Kašparová

Abstrakt

PFAS (z angl. perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances) jsou syntetické perfluorované a polyfluorované alkylové sloučeniny. Existuje až několik tisíc sloučenin PFAS a vyskytují ve všech biosférách Země. Tyto látky vzbuzují obavy, jelikož byla u nich prokázaná toxicita, a to již před řadou let. I přes tato fakta jsou skoro všechny PFAS stále na trhu.

V této práci byla hodnocena toxicita u tří látek, které jsou zakázané PFOS (perfluorooktansulfonátová kyselina, z angl. Perfluorooctanesulfonic acid), PFOA (perfluorooktanová kyselina, z angl. Perfluorooctanoic acid) a PFHxS (perfluorhexansulfonová kyselina, z angl. Perfluorohexanesulfonic acid) a u dvou látek, které jsou stále na trhu GenX (HFPO-DA, hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina, z angl. Hexafluoropropylene oxide dimer acid) a PFHxA (undekanfluorhexanová kyselina, z angl. Undecanfluorohexanoic acid). Toxické účinky těchto látek byly testovány na řase *Pseudokirchneriella subcapitata* pomocí testu inhibice růstu a FDA testu. Tyto testy byly vybrány z důvodu toho, aby bylo zjištěno, zda test FDA lze k testování toxicity PFAS na *P. subcapita* používat jako alternativní test inhibice růstu.

U standardizovaného testu inhibice růstu byl měřen fluorescenční signál chlorofylu (biomasa-chlorofyl) a u testu s FDA byl sledován fluorescenční signál barviva fluorescein diacetát (FDA, viabilita-FDA). Získané hodnoty z měření fluorescenčních signálů byly vztaženy k hodnotám kontroly.

Na základě těchto testů a statistického zhodnocení byla prokázána toxicita u všech sledovaných látek. Dle obou testů měla PFOS největší negativní účinky na *P. subcapitata* a nejmenší měly PFHxA a PFHxS, u kterých byly naměřené hodnoty nejvíce podobné hodnotám kontroly. Během sledování toxicity u všech látek došlo k zajímavému zjištění a sice k signifikantním rozdílům mezi výsledky obou testů. Například u PFOA test inhibice růstu zaznamenal zvýšení počtu buněk, ale FDA test ukázal opačný efekt. Výsledky naznačují, že důvodem tohoto jevu bylo narušení funkce intracelulárních esteráz buněk řas, které jsou k funkci FDA pro označení živých buněk nezbytné. Tudíž u těchto látek FDA test neodpovídal vždy skutečnému obsahu živých buněk, ale odpovídal snížení metabolické aktivity.

Díky této diplomové práci byla zjištěna další data vypovídající o toxicitě PFAS na *P. subcapitata* a zároveň bylo otevřeno téma k dalšímu výzkumu, jakým způsobem PFAS ovlivňují funkci intracelulárních esteráz.

Klíčová slova: PFOS, PFOA, GenX, PFHxA, PHHxS, řasy

Abstract

PFAS (perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances) are synthetic perfluorinated and polyfluorinated alkyl compounds. There are up to several thousand PFAS compounds and they are found in every biosphere of the Earth. These substances are of concern as they have been shown to be toxic for many years. Despite these facts, almost all PFAS are still on the market.

In this paper, toxicity was assessed for three substances that are banned PFOS (Perfluorooctanesulfonic acid), PFOA (Perfluorooctanoic acid) and PFHxS (Perfluorohexanesulfonic acid) and for two substances that are still on the market GenX (HFPO-DA, Hexafluoropropylene oxide dimer acid) and PFHxA (Undecanfluorohexanoic acid). The toxicity of these substances was tested in the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* using the growth inhibition test and the FDA test. These tests were chosen to determine whether the FDA test could be used as an alternative growth inhibition test to test the toxicity of PFAS on *P. subcapita*.

In the standardized growth inhibition assay, the chlorophyll fluorescence signal (biomass-chlorophyll) was measured, and in the FDA assay, the fluorescence signal of the fluorescein diacetate dye (FDA, viability-FDA) was monitored. The obtained values from the fluorescence signal measurements were referenced to the control values.

On the basis of these tests and statistical evaluation, toxicity was demonstrated for all substances tested. According to both tests, PFOS had the greatest negative effects on *P. subcapitata* and PFHxA and PFHxS had the least negative effects, with measured values most similar to those of the control. During the toxicity monitoring of all substances, an interesting finding was that there were significant differences between the results of the two tests. For example, for PFOA, the growth inhibition test showed an increase in cell number, but the FDA test showed the opposite effect. The results suggest that the reason for this phenomenon was due to the disruption of the function of the intracellular esterases of algal cells, which are essential to the FDA function of labeling living cells. Thus, for these substances, the FDA test did not always correspond to the actual content of living cells, but corresponded to a reduction in metabolic activity.

Through this thesis work, additional data was found that was indicative of the toxicity of PFAS on *P. subcapitata* and also opened up the topic for further research on how PFAS affect the function of intracellular esterases.

Key words: PFOS, PFOA, GenX, PFHxA, PHHxS, algae

Seznam použitých zkratek

ANOVA	Test analýzy rozptylu, z angl. Analysis of Variance
BAF	bioakumulační faktor
BBM	médium ke kultivaci řas, z angl. Bold´s Basal medium
C9-14 PFCA	perfluorované karboxylové kyseliny a jejich soli a prekurzory
CFDA	karboxyfluorescein diacetát
CFDA-AM	karboxyfluorecein diacetát acetoxymethylester
DuPont	společnost vyrábějící PFAS látky, E.l. du Pont de Nemours and Company
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC_{50}	koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců, z angl. Half maximal effective concentration
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky, z angl. European Chemicals Agency
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí, z angl. Environmental Protection Agency
UNEP	Program OSN pro životní prostředí, z angl. United Nations Environment Programme
EU	Evropská unie
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství, z angl. Food and Agriculture Organization of United Nations
FDA	fluoresceindiacetát
GenX (HFPO-DA)	hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina, z angl. Hexafluoropropylene oxide dimer acid
ILO	Mezinárodní organizace práce, z angl. International Labour Organization
IOMC	Meziorganizační program pro správné nakládání s chemikáliemi, z angl. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals
LC_{50}	koncentrace, při které právě 50 % jedinců zemře, z angl. Lethal Concentration
LD_{50}	dávka, při které právě 50 % jedinců zemře, z angl. Lethal Dose

LOEC	nejnižší koncentrace pozorovaného účinku, z angl. Lowest Observed Effect Concentration
MetOH	metanol
NOEC	žádný pozorovaný účinek u koncentrace, z angl. No Observed Effect Concentration
OD	optická densita
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, z angl. Organization for Economic Cooperation and Development
OSN	Organizace spojených národů
PFAS	perflurované a polyfluorované alkylové látky, z angl. per- and polyfluoroalkyl substances
PFBA	perfluorbutanová kyselina, z angl. Perfluorobutanoic acid
PFBS	perfluorbutansulfonová kyselina, z angl. Perfluorobutane sulfonic acid
PFCA	perflorkarboxylové kyseliny, z angl. Perfluoroalkyl carboxylic acids
PFHpA	perfluorheptanová kyselina, z angl. Perfluoroheptanoic acid
PFHxA	pentadecafluoroktanová kyselina, z angl. Undecanfluorohexanoic acid
PFHxS	perfluorhexansulfonová kyselina, z angl. Perfluorohexanesulfonic acid
PFOA	perfluorooktanová kyselina, z angl. Perfluorooctanoic acid
PFOS	perfluorooktansulfonátová kyselina, z angl. Perfluorooctanesulfonic acid
PI	propidium jodid
POPs	perzistentní organické polutanty, z angl. Persistent Organic Pollutants
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
REACH	registrace, hodnocení, autorizace a chemické restrikce; z angl. Registration, evaluation, authorisation, restriction chemicals
RFU	Relativní jednotky fluorescence, z angl. relative fluorescence units
ROS	Reaktivní formy kyslíku, z angl. reactive oxygen species
SOC	organický uhlík v půdě, z angl. soil organic carbon
SOD	superoxid dismutáza

SVHC	Seznam látek vzbuzující velmi velké obavy, z angl. Substances of very high concern
UNDP	Rozvojový program OSN, z angl. United Nations of Development Programme
UNEP	Program OSN pro životní prostředí, z angl. United Nations Environment Programme
UNIDO	Organizace OSN pro průmyslový rozvoj, z angl. United Nations Industrial Develompment Organization
UNITAR	Institut školení a výzkumu Organizace spojených národů, z angl.United Nations Institute of Training and Research
USD	americký dolar, z angl. United States dollar
WHO	Světová zdravotnická organizace, z angl. World Health Organization

Obsah

1 Úvod 11

2 Perfluorované a polyfluorované alkylové látky (PFAS) 13

2.1 Základní charakteristika látek PFAS 13

2.2 Historie PFAS 15

2.3 Dopady PFAS na životní prostředí 16

2.3.1 PFAS v životním prostředí 16

2.3.2 Expozice v živočišné říši 16

2.3.3 Toxické účinky v živočišné říši 16

2.3.4 Expozice v rostlinné říši 17

2.3.5 Toxické účinky na rostlinnou říši 18

2.4 Regulace PFAS v Evropské unii 19

2.4.1 Globálně regulované PFAS 20

2.4.2 Restrikce REACH 20

2.4.3 Látky PFAS vzbuzující velmi velké obavy podle nařízení REACH 20

2.4.4 Hodnocení látek podle nařízení REACH 21

2.4.5 Limity PFAS v pitné vodě 21

3 Ekotoxikologické testy s využitím řas 22

3.1 Ekotoxikologické (bio)testy 22

3.1.1 Mezinárodní organizace a jejich normy v ekotoxikologickém testování 23

3.2 Testování toxicity na nižších rostlinách 25

4 Cíl práce a hypotézy 28

5 Materiály a metodika 29

5.1 Chemikálie 29

5.2 Přístroje a pomůcky 30

5.3 Kultivace řas *P. subcapitata* kmen č.433 31

5.4 Růstová křivka 33

5.5 Zjištění korelace mezi počtem buněk a změřenou fluorescencí chlorofylu 34

5.6 Testování použití dalších fluorescenčních barviv k určení viability 35
5.6.1 Propidium jodid (PI) 35
5.6.2 Karboxyfluorescein diacetát acetoxymethylester (CFDA-AM) 36
5.6.3 Fluorescein diacetát (FDA) 37
5.7 Testování adsorpce PFAS na povrch jamek 96 jamkové mikrodestičky 38
5.8 Testování toxického vlivu PFAS na *P. subcapitata* kmen č.433 39
6 Výsledky a diskuse 42
6.1 Testování růstové křivky 42
6.2 Korelace mezi počtem buněk a změřenou fluorescencí chlorofylu 44
6.3 Výsledky z testování fluorescenčních barviv 45
6.3.1 Propidium jodid (PI) 45
6.3.2 Karboxyfluorescein diacetát acetoxymethylester (CFDA-AM) 47
6.3.3 Fluorescein diacetát (FDA) 47
6.4 Výsledky z testování adsorpce PFAS na povrch jamek 96 jamkové mikrodestičky 49
6.5 Testování toxického vlivu PFAS pomocí testů růstové inhibice a FDA testu 50
na *P. subcapitata* 50
6.5.1 Testování toxicity PFOS 50
6.5.2 Testování toxicity PFOA 53
6.5.3 Testování toxicity GenX (HFPO-DA) 55
6.5.4 Testování toxicity PFHxA 56
6.5.5 Testování toxicity PFHxS 58
7 Závěr 60
8 Použitá literatura 61
Seznam obrázků, tabulek a grafů 75

1 Úvod

Perfluorované a polyfluorované alkylové látky (PFAS, z angl. perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances) jsou synteticky vyrobené organické polutanty. Jedná se o jedny z nejhorších látek, které si kdy lidská společnost mohla vytvořit, jelikož se v přírodě žádným způsobem nerozkládají. Proto jsou také známé pod názvem „věčné chemikálie“, což vypovídá o jejich perzistenci a kumulaci. PFAS se šíří napříč celou planetou a je možné je detekovat dokonce i na Antarktidě (Gao et al., 2020).

Tyto látky jsou také silně bioakumulující a existují data, která potvrzují jejich výskyt v mateřském mléce a krvi člověka (Göckener et al., 2020; Macheka-Tendenguwo et al., 2018). PFAS se začaly vyrábět v druhé polovině 20. století kvůli hydrofobním a lipofobním vlastnostem, které našly uplatnění v mnoha odvětvích. PFAS se staly hlavní součástí výroby teflonu a následně byly používány v textilním a obalovém průmyslu.

Od začátku 21. století jsou k dispozici podložená fakta o toxických účincích jak na rostlinách, tak živočiších, a i přesto je většina těchto látek stále na trhu.

Tato diplomová práce má za cíl poskytnout poznatky o toxicitě na řasách, konkrétně na řase *Pseudokirchneriella subcapitata* (synonymum: *Raphidocelis subcapitata*). Řasy zastupují celkově rostlinnou říši, a pokud je u řas prokázána toxicita, s velkou pravděpodobností budou PFAS toxické i pro vyšší rostliny. Zároveň jsou řasy na začátku trofického řetězce a mohou se tak PFAS kumulovat do vyšších trofických úrovní.

K zjištění toxického vlivu PFAS na řasu byl použit test růstové inhibice a FDA (fluorescein diacetát) test. Tyto testy byly vybrány z důvodu toho, aby se zjistilo, zda FDA test lze k testování toxicity PFAS na *P. subcapita* používat jako standardizovaný test inhibice růstu. K testování byly vybrány látky PFOS (perfluorooktansulfonátová kyselina, z angl. Perfluorooctanesulfonic acid), PFOA (perfluorooktanová kyselina, z angl. Perfluorooctanoic acid), PFHxS (perfluorhexansulfonová kyselina, z angl. Perfluorohexanesulfonic acid), GenX (HFPO-DA, hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina, z angl. Hexafluoropropylene oxide dimer acid) a PFHxA (undekanfluorhexanová kyselina, z angl. Undecanfluorohexanoic acid). Důvod tohoto výběru bylo porovnání zakázaných látek (PFOS, PFOA, PFHxS) s látkami povolenými (GenX, PFHxA).

V teoretické části bylo záměrem seznámit čtenáře s PFAS, kde jsou popsány jejich základní chemické vlastnosti, historie a jaké mají dopady na životní prostředí. V této části jsou také uvedeny informace týkající se regulací PFAS na mezinárodní úrovni. Dále byly popsány ekotoxikologické testy, zejména testování toxických chemických látek na nižších rostlinách.

Praktická část se zabývá testováním toxických účinků PFAS na řase *P. subcapitata* kmen č. 433. Nejprve jsou popsané postupy, které bylo před samotným testováním toxicity nezbytné učinit. Tím je na mysli kultivace řas, růstová křivka, testování fluorescenčních barviv, testování adsorpce PFAS na povrch 96 jamkové destičky apod. Až poté jsou popsány metody k zjištění toxického vlivu PFAS na řasu. Na závěr byly všechny zjištěné výsledky interpretovány a vyexportovány do sloupcových grafů se statistickým vyhodnocením. Všechny získané výsledky byly také diskutovány s jinými studiemi týkajících se testování toxicity PFAS. Nedílnou součástí této diplomové práce bylo celkově zefektivnit metodiku testování. Tím je myšleno snížit spotřebu chemických látek a materiálů a zvýšit počet dat získaných v jednu dobu.

2 Perfluorované a polyfluorované alkylové látky (PFAS)

2.1 Základní charakteristika látek PFAS

PFAS jsou látky, které byly v druhé polovině minulého století synteticky vytvořené (Sinclair et al., 2020). Podle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, z angl. Organization for Economic Cooperation and Development) se uznává téměř 5000 sloučenin PFAS (Lein, 2023).

PFAS látky se seskupují do dvou hlavních širokých kategorií, a to na nepolymerní a polymerní molekuly. Nepolymerní PFAS se ještě dělí na dvě skupiny perfluoralkylové a polyfluoralkylové látky. Nepolymerní perfluoralkylové látky mají hydrofobní uhlíkový řetězec, který je zcela fluorován s výjimkou terminálního konce, kde je vázán sulfonát (SO_3^-), fosfát (OPO_3^-) anebo karboxylát (COO^-). Tato skupina je ještě rozdělena do dalších podskupin, kde můžeme nalézt jedny z nejznámějších perfluorovaných kyselin, jako jsou například PFOS a PFOA.

Skupina zahrnující nepolymerní polyfluoralkylové látky je charakterizována molekulami, kde atomy uhlíku jsou částečně fluorovány a vázány na atomy kyslíku nebo vodíku. Jedním z příkladů jsou fluortelomer alkoholy (Panieri et al., 2022).

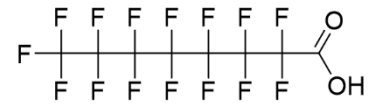
Polymerní PFAS zahrnují fluorpolymery, kde všechny atomy vodíku uhlíkového řetězce jsou nahrazeny atomy fluoru. Dále zahrnují fluorované polymery s postranním řetězcem, jako jsou například fluorované akrylátové polymery a nakonec perfluorpolyethery, což jsou látky, v jejichž hlavním řetězci jsou obsaženy atomy kyslíku.

PFAS můžeme také klasifikovat podle délky uhlíkového řetězce, který se pohybuje v rozmezí C_4-C_{17}. Krátké řetězce mají méně jak 5 uhlíků a dlouhé více jak 5 uhlíků (Panieri et al., 2022).

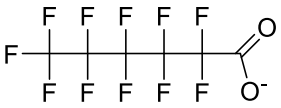
Právě silná vazba mezi fluorem a uhlíkem stojí za stabilitou PFAS. Látky PFAS jsou také hydrofobní a oleofobní. Kvůli těmto vlastnostem jsou PFAS prakticky nedegradovatelné, a tedy v životním prostředí perzistentní (Al Amin et al., 2020). Právě proto můžeme znát tyto látky i pod názvem „Věčné chemikálie“ (Samora, 2023). Tyto látky jsou bohužel v životním prostředí všudypřítomné, a to hlavně kvůli častému používání v průmyslu. Příklady využití PFAS jsou v odolnosti vůči vodě u outdoorového oblečení, koberců a kůže. V odolnosti proti mastnotě mají využití v potravinářském průmyslu. Dále se aplikují do leštidel na podlahy, lyžařských vosků, insekticidních přípravků. Nakonec najdou i své zastoupení pro galvanické pokovování, elektronické leptací lázně, letecké hydraulické kapaliny a hasicí pěny (Renner, 2001). V poslední době jsou PFAS celosvětově velmi diskutovaným tématem, jelikož byl u nich prokázaný toxický vliv na živočichy včetně člověka (Sinclair et al., 2020).

Tabulka 1: Dělení PFAS do základních kategorií dle ***(Mueller R., 2020; Panieri et al., 2022)***

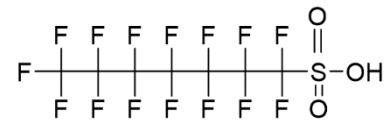
Nepolymerní			
Perfluorované		Polyfluorované	
Perfluoroalkylové kyseliny (PFAAs)	PFBS, PFOS, PFHxS	Fluorotelomerové sloučeniny (FT)	6:2 FTO, 8:2 FTI
Perfluoralkansulfonové kyseliny a sulfonáty (PFSAs)	PFOSI	Perfluoroalkanové sulfoamidové sloučeniny	FOSE
Perfluoralkansulfonové kyseliny (PFSIAs)	PFBA, PFHxA, PFOA		
Perfluorkarboxylové kyseliny a karboxyláty (PFCAs)	C8-PFPA		
Perfluoralkylfosfonové kyseliny (PFPAs)	C8/C8-PFPiA		
Perfluoralkylfosfinové kyseliny (PFPIAs)			
Perfluoralkyletherové kyseliny (PFEAs)	GenX, F-53B		
Perfluoralkansulfonové amidy (FASA)	FOSA		
Perfluoralkansulfonové fluoridy (PASFs)	PBSF		
Perfluoralkylové jodidy (PFAIs)	PFHxI		
Perfluoralkanoyl fluoridy (PAFs)	POF		
Perfluoralkylaldehydy (PFALs)	PFNAL		
Polymerní			
Fluoropolymery	PFA, ETFE, PTFE		
Fluorované polymery s bočním řetězcem	Fluorovaný uretan, akrylát		
Perfluoropolyethery (PFPEs)	PFPE-BP		



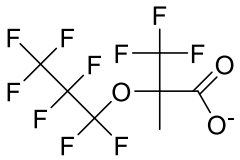
PFOA



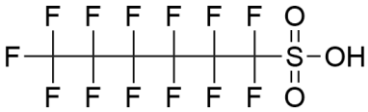
PFHxA



PFOS



GenX



PFHxS

Obrázek 1: vlevo Molekulární struktura PFOA (perfluorooktanová kyselina), PFOS (perfluorooktansulfonová kyselina) ***(Panieri et al., 2022)****, PFHxS (perfluorhexansulfonová kyselina)* ***(Z. Zhao et al., 2022)****, vpravo PFHxA (pentadecafluoroktanová kyselina) a HFPO-DA též GenX (hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina)* ***(Peng et al., 2024)***

2.2 Historie PFAS

PFAS látky se začaly komerčně využívat ve 40. letech 20 století. Nejčastěji byly používány při výrobě nepřilnavého kuchyňského nádobí, ke zpracování textilního materiálu, ve vojenském průmyslu a také v protipožárních
prostředcích (Gaber et al., 2023).

První záznamy velkovýroby PFAS jsou ze dvou velkých amerických společností 3M Comporation a E.l. du Pont de Nemours and Company (DuPont), které jsou výrobci teflonu. Obě firmy už měly od roku 1976 povědomí o toxických účincích per- a polyfluorovaných alkylových látek, a i přesto je dál používaly během výroby a tuto informaci tajily ještě další desetiletí před veřejností. Během výroby se vypouštěly PFAS do okolních řek ve státě Západní Virginie, kde společnosti působily, a tak se postupně šířily do všech sfér životního prostředí.

V roce 1998 byla na společnost DuPont podána žaloba za vypuštění až 7 000 tun kalu s obsahem PFOA do řeky Ohio, která protéká pozemkem žalobce. Kvůli tomuto činu přišel žalobce o veškerý svůj dobytek, který pil vodu z kontaminované řeky. Dále byly opatřeny důkazy proti společnostem 3M a DuPont, za již zmíněné povědomí o toxických účincích per- a polyfluorovaných látek bez informovanosti veřejnosti (Gaber et al., 2023).

Na základě těchto faktů podala Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA, z angl. Environmental Protection Agency) žalobu na DuPont za porušení Zákona o kontrole toxických látek §8(e) (EPA, 1991).
Za nezveřejnění toxických účinků týkajících se PFOA dostala DuPont pokutu ve výši 10,25 milionů USD a 6,2 milionů USD na doplňkové ekologické projekty vztahující se k životnímu (Gaber et al., 2023).

Mezi lety 2004-2005 se ve městě Parkersburg v Západní Virginii uskutečnila první hromadná žaloba pod názvem „Leach vs. E.l. du Pont de Nemours & Co“, které se zúčastnilo 80 000 členů. Dne 28. února 2005 se výše zmíněná společnost DuPont vyrovnala s hromadnou žalobou částkou v hodnotě 70 milionů USD, z nichž 20 mil USD bylo uplatněno pro další projekty týkající se komunitního zdraví, vzdělávání a s výhledem na následující zaplacení epidemiologické studie. Dohoda také vyžadovala od obžalovaných nainstalování nejmodernějších technologií pro čištění PFAS v šesti vodárenských čtvrtích a soukromých studních ve městě Parkersburg (Konwinski & Ope, 2022). Aby bylo možné podávat i individuální žádosti o újmě na zdraví kvůli expozici PFOA, bylo potřeba realizovat epidemiologickou studii. Soudem bylo nařízeno společnosti DuPont tuto studii proplatit, a tak byl zřízen vědecký panel C8, který podchycoval a realizoval celkový výzkum. Tato studie trvala od roku 2004 do roku 2012, kdy během let 2005-2006 bylo odebráno 69 000 vzorků od obyvatel Ohio Valley. Dalších 6 let trvala analýza vzorků v laboratořích. Panel v roce 2012 prokázal

souvislost mezi přítomností PFOA v organismu a vysokým cholesterolem, rakovinou ledvin a varlat, s vysokým krevním tlakem během těhotenství, ulcerózní kolitidou a onemocněním štítné žlázy (Steenland et al., 2020).

Díky této studii byla 3 500 obyvatelům se zdravotními následky přiznána částka v hodnotě 670,7 milionů USD (Gaber et al., 2023).

2.3 Dopady PFAS na životní prostředí

2.3.1 PFAS v životním prostředí

PFAS se vyskytují ve všech sférách Země. Dokonce již existují data o jejich výskytu na Antarktidě (Casal et al., 2017; Gao et al., 2020). PFAS jsou známé tím, že jsou velmi bioakumulativní, a proto se vyskytují prakticky ve všech živých organismech. Výjimkou není ani lidská populace, u které jsou PFAS detekovány v krvi a mateřském mléce (Göckener et al., 2020; Macheka-Tendenguwo et al., 2018). V nedávné studii od Nguyen a kol. byla dokonce poprvé indikována expozice PFAS v lidské populaci Papuy-Nové Guineje (Nguyen et al., 2023).

2.3.2 Expozice v živočišné říši

PFAS vstupují do životního prostředí především z průmyslových výrob. Vyskytují se v povrchových, tak v podzemních vodách, v půdě a také v ovzduší, kdy se následně kumulují do bioty. K expozici PFAS u živočichů 1. řádu (býložravci) dochází přes potravní řetězec, a to požitím vody a rostlinné stravy (Adu et al., 2023). U vodních organismů dochází také k expozici PFAS samotným přechodem z okolní vody čili i skrze kůži, žábry apod. (Smith et al., 2016). U živočichů 2. řádu (masožravci, všežravci) pak dochází k expozici i přes požití býložravců (Sunderland et al., 2019).

První zpráva, která informovala o přítomnosti PFAS u celosvětově volně žijících zvířat, byla vydaná v roce 2001(Giesy & Kannan, 2001).

2.3.3 Toxické účinky v živočišné říši

Z mnoha odborných studií vyplývá, že PFAS mají toxický vliv na živočichy. U živočichů způsobuje expozice PFAS oxidační stres, mění aktivitu GSH (glutathionu), GST (glutathion S-transferázy), SOD (superoxidu dismutázy) a způsobuje peroxidace lipidů. Dále způsobuje poškození DNA, jako například fragmentaci DNA řetězců (Ma et al., 2022).

Z testování toxického účinku látky GenX na potkanech se projevil významný vliv u samic, kterým se snížil obsah hormonů štítné žlázy a lipidů v mateřském mléce. Také se u nich zvýšila hmotnost jater během gravidity. Během experimentu se rovněž prokázala nižší tělesná hmotnost u samic a nižší hmotnost samičích reprodukčních tkání (Conley et al., 2019).

Ve studii od Seacat a kol. se testoval na opicích (*Macaca fasicularis*) toxický účinek PFOS. Byla zjištěna akumulace látky převážně v játrech, kde také narušuje jejich celkovou funkci. Dále snižuje koncentraci cholesterolu v krvi, zvyšuje hmotnost jater, ale celkovou tělesnou hmotnost snižuje (Seacat et al., 2002).

Existují také experimentální studie, jejichž výsledky naznačují, že PFAS mohou mít vliv na řídnutí ptačích vaječných skořápek a celkově snížení úspěšnosti líhnutí u volně žijících ptáků (Groffen et al., 2019).

Nakonec epidemiologické studie potvrdily negativní účinky PFAS na lidské tělo. Dochází ke změně funkcí štítné žlázy a imunity, k onemocnění jater a ledvin, dysregulaci lipidů a inzulínu, neplodnosti a rakovině (Fenton et al., 2021).

2.3.4 Expozice v rostlinné říši

Cesty expozice do rostlin vedou převážně skrze kořeny a foliární absorpcí z atmosféry (Collins & Finnegan, 2010). Na tkáňové úrovni jsou tedy PFAS transportovány do kořenové kůry. Následně přecházejí látky na buněčnou úroveň, kde se akumulují v buněčných membránách, organelách kořenových buněk a v mezibuněčném prostoru (P. Li et al., 2020).

Celkově polutanty, a tedy i PFAS, vstupují do rostlin zejména pomocí tzv. pasivního transportu skrze kořeny. Jedná se o samovolný přenos látek bez spotřeby chemické energie prostřednictvím kanálů a přenašečových proteinů. V kořenech, které jsou vystaveny kontaminovanému půdnímu prostředí, se zpočátku velmi rychle zvyšuje koncentrace polutantů, která se postupně ustálí a příjem látek je takřka konstantní. U pasivního transportu záleží i na tvaru, délce a celkové ploše kořene (Jarošová, 2009). Kromě pasivního přenosu může někdy docházet i k aktivnímu přenosu. Díky přítomným transportním proteinům a iontovým kanálkům v membránách kořenových buněk se aktivně pumpují živiny z prostředí do buněk rostlin proti jejich koncentračnímu gradientu. Je dokázáno, že přes tento mechanismus se také některé molekuly PFAS dostávají do těl rostlin. Po příjmu PFAS do kořenů vstupují do xylému a jsou transportovány do výhonků (Adu et al., 2023).

Existují různé faktory, které ovlivňují expozici PFAS u rostlin. Jedním z nich je délka uhlíkového řetězce dané molekuly PFAS. Čím kratší je řetězec, tím je predisponovanější k příjmu a akumulaci rostlinami. Dále záleží na obsahu proteinů a lipidů v kořenech rostlin. Proteiny napomáhají k transportu PFAS do rostlin (Wang et al., 2020). Oproti tomu lipidy spíše příjem PFAS do rostlin inhibují (Wen et al., 2016). Dalším faktorem je teplota, kdy se zvyšující teplotou se zvyšuje příjem PFAS. Je to dáno tím, že celkově při vyšších teplotách (např. 30 °C) mají rostliny vyšší účinnost ve fotosyntéze, transpiraci, tak i v rychlejší difúzi živin. V jedné studii byl testován vliv teploty při příjmu PFCA (perfluorkarboxylové kyseliny, z angl.

Perfluoroalkyl carboxylic acids) pšenicí setou (*Triticum aesitivum*) a bylo zjištěno, že při vyšších teplotách se zvýšila koncentrace PFCA (H. Zhao et al., 2016). Posledním důležitým faktorem pro příjem PFAS rostlinami je organický uhlík v půdě (SOC), který snižuje biologickou dostupnost PFAS pro rostliny. Se zvyšujícím se obsahem SOC se zvyšuje adsopce PFAS na půdní částice a snižuje se tak koncentrace PFAS ve vodě půdních pórů (Adu et al., 2023). Ačkoliv již existují studie, které se zabývají příjmem a transportem PFAS do rostlin, stále jsou velké mezery ve znalostech ohledně tohoto výzkumu (Wang et al., 2020).

2.3.5 Toxické účinky na rostlinnou říši

PFAS mají toxické účinky i na rostliny, což může negativně ovlivnit celkový ekosystém a jeho potravní řetězec. Tyto látky mohou způsobovat zpomalení rychlosti klíčení semen, změnu délky kořenů, inhibici růstu do výšky, snížení počtu listů, a tedy celkové snížení množství biomasy. U rostlin dochází k narušení jejich fyziologie, biochemických procesů a k změně genetické informace (Adu et al., 2023).

Toxické účinky samozřejmě závisí na koncentraci PFAS. Například u pšenice seté (*T. aestivum*) se obsah chlorofylu snižuje při vysoké koncentraci PFOS (200 mg/l), ale při nižší koncentraci (5 mg/l) se obsah zvyšuje (Qu et al., 2010). Pokud je tedy pšenice v kontaktu s nižší koncentrací PFAS (v řádu ng/l až 5 mg/l) může docházet i k stimulaci jejího růstu. Naopak kontakt s vysokými koncentracemi (≥ 100 mg/l) způsobuje inhibici růstu (Zhou et al., 2016). Toxické účinky PFAS se na rostlinách projevují v koncentracích spíše až na úrovni g/l, což se naštěstí perfluorované látky v takové koncentraci v životním prostředí nevyskytují (Brusseau et al., 2020).

Toxické účinky PFAS se mohou u rostlin lišit, a tedy záleží na druhu rostlin, koncentraci a době expozice danou PFAS (Sharma et al., 2020). Dle Pietrini a kol. například bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) při expozici PFAS nevykazovala významné změny jak na morfologické, tak biochemické úrovni (Pietrini et al., 2024).

2.3.5.1 Toxické účinky na úrovni rostlinné buňky

PFAS mají toxické účinky nejen na morfologii těla rostlin, ale i na morfologii rostlinné buňky. PFAS jsou schopné deformovat tvar buňky, narušují strukturu mitochondrií, vnitřní kristy mitochondrií a také devastují buněčné stěny, což má za následek propustnost buňky (Tang et al., 2020).

Při expozici polutantů mají rostliny přirozenou funkci detoxikace, při které dochází ke zvyšování hladiny oxidačního stresu, díky němuž vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), jako je superoxid, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál (Huang et al., 2021). Rostliny se oxidačnímu stresu brání antioxidačními enzymy. Mezi nejdůležitějšími z nich patří kataláza

(CAT), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion reduktáza (GR) a SOD (Matoušková et al., 2014). I tyto enzymy jsou ovlivňovány PFAS a může tak docházet k snížení jejich aktivity (Huang et al., 2021). Když se v rostlinné buňce zvýší oxidační stres a sníží aktivita antioxidačních enzymů, dochází k poškození také rostlinných složek jako jsou proteiny, buněčná stěna i genetická informace (Karamat et al., 2024; Wielsøe et al., 2015).

PFAS mají vliv i na obsah chlorofylu v rostlinách. Záleží ale na koncentraci, které jsou rostliny vystavené. V jedné ze studií od Omagamre a kolektivu zaznamenali u sóji luštinaté (*Glycine max*.) zvýšení obsahu chlorofylu při vystavení se PFBA (perfluorbutanová kyselina, z angl. Perfluorobutanoic acid) o koncentraci ≤ 100 ng/l. U vyšších koncentrací 100 µg/l až 1 mg/l už byl naopak detekován pokles obsahu chlorofylu (Omagamre et al., 2022). Expozice PFAS také ovlivňuje proteiny, které jsou zapojeny do fotosyntézy. Dle (Li et al., 2021) bylo zjištěno, že při expozici PFOA a GenX nad 100 ng/l se změnil obsah fotosyntetických proteinů u řasy *Chlorella pyrenoidosa*. U Proteinů Lhca1, Lhcb4 a Lhcb5 se výrazně snížil jejich obsah, a to způsobovalo řase neschopnost zachytávat světlo. Na druhé straně byl rovněž u GenX prokázaný vliv na proteiny D1, CP43 a CP47, u kterých podporoval jejich syntézu a transport elektronů (Li et al., 2022; Li et al., 2021).

Tyto věčné chemikálie tedy ovlivňují fotosyntetický systém, který je závislý na obsahu chlorofylu a proteinů v rostlinách. Také ale ovlivňují i fixaci uhlíku, syntézu adenosintrifosfátu (ATP), cyklus trikarboxylových kyselin (TCA) a metabolismus sacharidů (Ebinezer et al., 2022; Li et al., 2020).

PFAS u některých druhů rostlin také ovlivňují produkci metabolitů. Například u salátu setého (*Lactuca sativa*) byla prokázaná snížená produkce aminokyselin, lipidů a mastných kyselin. Naopak u purinových nukleosidů se produkce zvýšila (Li et al., 2022). Biosyntéza polyfenolu (antioxidant podílející se na segregaci nebo inhibici ROS a aktivaci antioxidačních enzymů v rostlinách) byla zvýšena v listech salátu setého (de Araújo et al., 2021).

Dle studie od Guoa kol. u PFAS způsobují i poruchy přenosu signálu a inhibují obsah fytohormonů (Guo et al., 2020).

PFAS také způsobují narušení exprese mnoha genů v rostlinách. Ke změnám dochází hlavně u genů transportních, u genů reagující na nedostatek železa a u genů souvisejících s oxidativním stresem (Tang et al., 2020). PFAS jsou také schopny ovlivnit funkci genů, které se zapojují do biosyntézy amidů a peptidů, cytoamidů a cukrů (Adu et al., 2023).

2.4 Regulace PFAS v Evropské unii

Vzhledem k perzistentním a toxickým účinkům PFAS se začínají tyto látky postupně regulovat, jak v Evropské unii (EU), tak globálně. První zmínka o regulaci PFAS byla v roce

2009 v mezinárodní Stockholmské úmluvě o perzistentních organických polutantech. Právní předpisy o chemických látkách v EU zajišťuje Evropská agentura pro chemické látky (ECHA), která byla založena v roce 2007. Tato agentura je zodpovědná za směrnici REACH, jejíž zkratka nese hlavní pilíře, a to registrace, hodnocení, autorizace a chemické restrikce (Brabcova et al., 2022).

2.4.1 Globálně regulované PFAS

Díky mezinárodní Stockholmské úmluvě jsou PFAS regulovány po celém světě. První regulace nastala již ve zmíněném roce 2009, kdy byla vyloučena z používání látka PFOS a její deriváty (S.-4/17 UNEP, 2009). Další PFAS, která je díky úmluvě eliminována, je PFOA a její soli (S.-9/12 UNEP, 2019). Od roku 2020 už je podle nařízení EU o perzistentních organických polutantech (POPs) tato látka úplně zakázána (Annex I.(EU), 2020). Stockholmská úmluva dále zahrnuje od roku 2022 PFHxS a její deriváty. Následně byla tato látka přidána do nařízení EU o POPs, které vyšlo v platnost 28. srpna 2023 (S.-4/17 UNEP, 2009)(SC-10/13, 2022).

Je samozřejmostí, že se dále zvažují další PFAS, které by se měly regulovat, a to například PFCA C_9-C_{21} s dlouhým řetězcem (UNEP, 2022).

2.4.2 Restrikce REACH

Chemická politika EU omezila od roku 2023 PFCA C_9-C_{14} a jejich soli a prekurzory (Nařízení komise (EU), 2021). Další nařízení Evropské komise, které bylo schváleno 19.9. 2024 omezuje distribuci PFHxA a její deriváty od roku 2026 (Nařízení komise (EU), 2024). Evropské státy jako Německo, Dánsko, Nizozemsko, Švédsko a Norsko navrhují další omezení, které by pokrývalo širokou škálu PFAS. Tento návrh byl předložen v roce 2023 agentuře ECHA, kdy ho momentálně vědecké výbory hodnotí (ECHA, 2023).

Dalším představeným návrhem od ECHA je omezení celkového používání PFAS v hasicích pěnách, jelikož nejsou zahrnuty v univerzálním omezení PFAS navrženém pěti vnitrostátními orgány. V blízké době by měl být tento návrh ratifikován (ECHA, 2022).

2.4.3 Látky PFAS vzbuzující velmi velké obavy podle nařízení REACH

Nařízení REACH má pod sebou seznam látek, které vzbuzují mimořádné obavy o dopadech na životní prostředí. Tento seznam je známý pod zkratkou SVHC z angl. „Substances of very high concern“. Zda látky patří na seznam SVHC, je identifikováno dle jejich perzistence, mobility a toxických účinků na živé organismy a rostliny.

V letech 2019, 2020 a 2023, byly určeny 3 skupiny PFAS, které vyvolávají velmi velké obavy pro životní prostředí.

Jedná se o skupiny:

- kyselina perfluoroheptanová (PFHpA, z angl. Perfluoroheptanoic acid) a její soli
- kyselina perfluorobutansulfonová (PFBS, z angl. Perfluorobutane sulfonic acid) a její soli
- kyselina 2,3,3,3-tetrafluor-2-(heptafluoropropoxy) propionová, její soli a její acylhalogenidy (GenX, (HFPO-DA))

U těchto látek byla prokázána karcinogenita, mutagenita, reprotoxicita, perzistentní a bioakumulativní vlastnost (ECHA, 2019; Soloneski & Larramendy, 2016)

2.4.4 Hodnocení látek podle nařízení REACH

Od roku 2014 prověřovala Evropská komise údaje o PFAS, které jsou obsažené v registrační databázi Evropské agentury pro chemické látky. Na základě prověřených údajů se začaly koordinovat a regulovat skupiny PFAS. Kvůli velkému počtu, který činí více jak 10 000 PFAS na trhu EU, bylo zatím realizovatelné regulovat skupiny PFAS s nejvyšší naléhavostí. Jelikož je velice časově náročné postupně regulovat látku po látce, Evropská komise se zavazuje k postupnému vyřazení všech PFAS. Výjimky jejich používání budou pouze v sektorech, kde jsou nenahraditelné a pro společnost důležité (ECHA, 2023).

2.4.5 Limity PFAS v pitné vodě

Vzhledem k toxickým účinkům těchto látek se začaly sledovat jejich koncentrace v pitné vodě a zavedly se limity, u kterých se považuje voda za zdravotně nezávadnou. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) je doporučeným limitem pro PFOA a PFOS 100 ng/l a pro celkové PFAS 500 ng/l v pitné vodě. Jedná se o takové limity, které jsou ještě přijatelné vůči lidskému zdraví a lze jich spolehlivě dosáhnout (Southerland & Birnbaum, 2023). Na základě tohoto doporučení zavedla v roce 2021 EU ve Směrnici o jakosti vody určené k lidské spotřebě limity PFAS, které také činí 500 ng/l. Dalším záměrem této směrnice je do roku 2024 vypracovat technické pokyny k monitorování a četnosti odběrů vzorků PFAS. Nakonec do roku 2026 mají členské státy EU přijmout veškerá nezbytná opatření k udržení požadovaných limitů (Evropský parlament a Rada Evropské unie, 2020).

Na základě studie od Dvořákové byly zjištěny hodnoty PFAS v pitné vodě v ČR. Celková koncentrace PFAS u nás v pitné vodě dosahují průměrně 23,9 ng/l. Tento výsledek tedy znamená, že se koncentrace PFAS ve vodě u nás pohybuje velmi nízko pod evropským limitem a zdravotní riziko je opravdu velmi nízké (Dvorakova et al., 2023).

3 Ekotoxikologické testy s využitím řas

Ekotoxikologie se skládá ze dvou termínů, a to z ekologie a toxikologie. Ekologie je obor zabývající se interakcemi mezi organismy a jejich prostředním na všech úrovních, a tedy od individuálního organismu až po ekosystém. (Underwood et al., 2000).

Toxikologie je věda, která zkoumá účinky chemických látek na různých typech organismů. Věnuje se biochemickým a fyziologickým procesům způsobeným danou chemickou látkou, expozici a celkově chemickým látkám a jejich zařazení do chemických tříd. (Chapman, 2002).

Cílem vědního oboru ekotoxikologie je tedy porozumět a predikovat environmentální dopady chemických látek na celkový ekosystém za reálných podmínek (Chapman, 2002). Ekotoxikologické testy hodnotí toxicitu jedné sloučeniny nebo komplexní směsi. Díky těmto testům můžeme zjistit účinky různých kombinací sloučenin a jejich biologickou dostupnost v životním prostředí (Cleuvers, 2003). Také se vyhodnocují účinky metabolitů a produktů rozkladu, protože některé sloučeniny se po příjmu organismy nebo rostlinami metabolizují na látky, které jsou toxické nebo toxičtější než původní výchozí látka (Albert & Bloem, 2023). Ekotoxikologické testy se provádí v laboratoři (*in vitro*). Jejich cílem je zjistit vztah mezi dávkou chemické látky a odpovědí daného organismu za laboratorních podmínek. Testy probíhají i ve složitějších terénních ekosystémech (*in situ*), které jsou určeny pro přesnější stanovení dopadu testované chemické látky (Chapman, 1995).

Ekotoxikologické testy se hlavně používají ke stanovení akutní toxicity chemických látek a směsí v životním prostředí (Kašpar, 2015). Dále se díky nim stanovují limity chemických látek v pitných, podzemních, povrchových a odpadních vodách, při kterých ještě nedochází k toxickým účinkům. Posuzují se například také rizika u průmyslových odpadů a kalů, jaká je jejich kategorie a jak nebezpečné jsou pro životní prostředí (Mantis et al., 2005; Wolska et al., 2007) V neposlední řadě se posuzují rizika chemických látek (například pesticidů) v půdách (Albert & Bloem, 2023).

Dále se práce bude věnovat rozdělení a druhům ekotoxikologických testů. Podkapitola o testování toxicity chemických látek na bezcévných rostlinách bude více do detailu, protože právě tento typ testování byl použit v praktické části k zjištění akutní toxicity PFAS u řasy *P. subcapitata.*

3.1 Ekotoxikologické (bio)testy

V oboru ekotoxikologie se k určování toxicity chemických látek pro organismus používají takzvané bio-testy. Tyto testy nám prokazují u chemických znečišťujících látek jejich

biologickou dostupnost a jejich poškozování na celulární, orgánové i organismální úrovni u testovaného organismu (EPA, 1994).

Bio-testy se rozdělují podle určitých charakteristik a jednou z nich je typ matrice, kterému je organismus vystaven. Testovanou matricí může být voda, půda, vzduch, sediment nebo odpad. V matrici se měří koncentrace polutantu a jeho účinky na organismy, které mohou být letální, subletální nebo nepříznivé (Valavanidis, 2015).

Další charakteristikou testů je doba expozice chemické znečišťující látky. Jedná se to testy akutní, subakutní a chronické toxicity (Chinedu et al., 2015).

Akutní testy se vyznačují vystavením se vysoké dávce za krátkou dobou, která se pohybuje od 24 po 96 hodin. (Abdollahi, 2014). U tohoto typu testu se zjišťuje mortalita a změny v chovaní u testovaných jedinců (Chinedu et al., 2015). Nejčastěji se u akutních testů zjišťuje hodnota LD_{50} (Lethal dose 50 %) nebo LC_{50} (Lethal concentration 50 %), což se jedná o takovou dávku nebo koncentraci látky, kdy zemře právě 50 % jedinců z testované skupiny jedinců (Valavanidis, 2015). Dále se analyzuje hodnota LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) a NOEC (No Observed Effect Concentration). LOEC je nejnižší koncentrace, při které už jsou pozorovány negativní účinky, a NOEC je taková koncentrace, při které ještě nejsou pozorovány žádné účinky na sledovaný druh (EPA, 1994).

Subakutní testy se prakticky od akutních testů neodlišují, pouze délkou expozice, která se pohybuje od jednoho týdne až po měsíc (Chinedu et al., 2015; Deng et al., 2013).

Testy chronické toxicity jsou charakterizovány opakovaným podáváním nízké dávky chemické látky po významnou část života testovanému organismu. Záleží na průměrné délce života organismu a po jaké době už jsou detekovatelné toxické účinky. Pokud se testuje reprodukční toxicita, záleží také na reprodukčních cyklech. Během testů chronické toxicity se stanovuje infertilita, karcinogenita, mutagenita a teratogenita (Abdollahi, 2014).

Toxikologické testy se také dělí dle trofické úrovně na producenty, konzumenty a dekompozitory. Díky testování všech těchto úrovní se získá celkový obraz o potenciálních toxických účincích v celém ekosystému (Kienle et al., 2013). Na základě těchto trofických úrovní se testy mohou ještě detailněji rozdělit, a to podle druhu testovaného organismu. Jedná se o testy bakteriální, testy na nižších a vyšších rostlinách, testy na bezobratlých organismech a na obratlovcích (EPA, 1994; Grande et al., 2007).

3.1.1 Mezinárodní organizace a jejich normy v ekotoxikologickém testování

Od 80. a 90. let 20. století se začaly postupně vyvíjet národní a mezinárodní organizace, zejména v USA, evropských zemích a Japonsku, které se zaměřují na regulaci testování

toxických látek v prostředí. Tyto organizace stanovují metody a pokyny pro ekotoxikologické testování, které využívají různé sektory, jako například vědecké ústavy a analytická zařízení.

Kvůli přibývajícím toxickým látkám v životním prostředí začalo docházet čím dál tím více k environmentálním problémům. Na základě toho byla v roce 1995 založena Mezinárodní organizace pro správné nakládání s chemikáliemi (IOMC- Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals), jejíž misí je zvyšovat bezpečnost před chemickými látkami. Realizování a založení IOMC se zúčastnily mezinárodní organizace FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations), UNEP (United Nations Environment Programme), UNIDO (United Nations Industrial Develompment Organization), ILO (International Labour Organization), UNDP (United Nations of Development Programme), UNITAR (United Nations Institute of Training and Research), WHO (World Health Organization), Světová banka a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development. Hlavním mechanismem IOMC je zodpovědné, usnadněné a bezpečné nakládání s chemikáliemi na mezinárodních událostech (Scholz et al., 2013)

OECD zastupuje 34 průmyslových zemí v Evropě, Asii, Severní a Jižní Americe. Posláním této organizace je diskutovat, regulovat, řešit a koordinovat spolu s politickým sektorem mezinárodní problémy týkající se obchodu, životního prostředí, bezpečnosti spotřebitelů a pracovníků v zařízeních (Valavanidis, 2015).

V 80. letech OECD začala propagovat testovací pokyny (Sbírka mezinárodně schválených a přijatých metod pro testování ekotoxicity), které může používat průmysl a nezávislé laboratoře k určování bezpečnosti chemických látek a chemických přípravků, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií. Tento přehled je základním pilířem pro testování toxikologie a ekotoxikologie na mezinárodní úrovni. Obsahem této sbírky jsou stručné popisy principů a praktické aspekty nejdůležitějších zkušebních pokynů pro testování toxicity na vodních a suchozemských organismech (Valavanidis, 2015; Scholz et al., 2013).

EPA byla založena v roce 1970 ve Spojených státech amerických. Jejím heslem je „chránit lidské zdraví a životní prostředí“. Hlavní úlohou EPA je implementovat a prosazovat národní zákony v životním prostředí. Dále je sledovat informace o životním prostředí a zásadní environmentální ukazatele. V neposlední řádě se EPA podílí i na základních aplikovaných výzkumech z hlediska toxikologie a prostředí (Union of Concerned Scientists, 2008).

Ze začátku ekotoxikologického testování si každá vyspělá země vyvíjela vlastní postup pro testování toxicity a začal tak vznikat zmatek v regulacích mezinárodního obchodu s chemikáliemi a v testovacích metodách. V posledních dvou dekádách se však všechny vzniklé metody pro testování toxicity zharmonizovaly na základě ukazatelů OECD norem.

Právě EPA ještě s dalšími vládními agenturami spolupracuje s OECD, které vytvářejí standardní pokyny pro testování, minimalizují použití laboratorních pokusných zvířat, ulehčují práci výrobcům chemikálií a snižují spotřebu zdrojů potřebné pro vědecké účely. Standardní testy toxicity také umožňují a usnadňují spolupráci mezi všemi zeměmi (Valavanidis, 2015).

Příklady ekotoxikologických testů dle OECD norem:

- Test No. 201. Growth Inhibition Test in Alga and Cyanobacteria (OECD, 2006)
- Test No. 202. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test (OECD, 2004)
- Test No. 203 Fish, Acute Toxicity Test (OECD, 2019)
- Test No. 237 Honey bee (Apis mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure (OECD, 2013b)
- Test No. 208 Terrestrial Plants, Growth Test (OECD, 2006a)
- Test No. 231. Amphibian metamorphosis assay (OECD, 2009)
- Test No. 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD, 2013a)

3.2 Testování toxicity na nižších rostlinách

V předchozí podkapitole bylo popsané rozdělení (bio) testů dle různých charakteristik a mezinárodních standardizovaných metod pro testování toxicity chemických látek. Pro posouzení toxického účinku chemických látek na organismy se aplikují testy na nižších rostlinách, kdy se jedná hlavně o řasy. Nejčastěji používanou řasou je *Desmodesmus subspicatus nebo P. subcapitata* (The British Standards Institution, 2012). Dle Anexe 2 z Testu číslo 201 se tyto řasy lehce kultivují v různých mediích a jejich kmeny lze snadno sehnat ze sbírek kultur autotrofních organismů. Dále se buňky těchto řas vyskytují solitérně, a tudíž je možné měřit jejich hustotu pomocí automatického počítadla buněk nebo mikroskopu (OECD, 2006).
Na řasách se nejčastěji testuje inhibice fotosyntézy, růstová inhibice, obsah chlorofylu, obsah proteinů a aminokyselin, akumulace chemické látky v řase, citlivost na toxiny, stanovení ROS a exprese genů (Li et al., 2021; Liu et al., 2022; Mitchell et al., 2011).

Test inhibice fotosyntézy (Photosyntetic Inhibition Test)

Tento test využívá k detekci toxicity měření fluorescence chlorofylu v buňkách řas. Pokud je testovaná látka pro řasu toxická, mění se parametry fotosyntetické fluorescence. Používaným parametrem pro zhodnocení fytosyntetické fluorescence je tak zvaný kvantový výtěžek fotosystému II (F_v/F_m), kdy F_m nám značí maximální možnou fluorescenci a F_v variabilní fluorescenci, což je rozdíl mezi maximální a minimální fluorescencí (Gu et al., 2022; Kitajima & Butler, 1975). Dalším měřeným parametrem je primární index absorpce světla PI_{ABS}, který je

citlivý na různé typy stresu a používá se zejména pro srovnání primárních fotochemických reakcí (Martinazzo et al., 2012). To znamená, že při snižování fluorescence chlorofylu dochází u rostlin i k oxidativnímu stresu, který je také měřitelný.

U tohoto testu mohou někdy vznikat i problémy s nedostatečnou citlivostí pro detekci komplexní toxicity polutantů ve vodě, a tudíž lze tento test použít jen na některé druhy látek (Gu et al., 2022).

Test inhibice růstu řas (Algal Growth Inhibition Test)

Během tohoto testu se řasa vystaví chemické látce o různých koncentracích po určitou dobu a za definovaných podmínek. Růst řas se porovnává s kontrolou, kterou je řasa v růstovém mediu bez testované chemické látky.

Roztoky testované látky se aplikují do baněk a přidávají se živiny spolu s inokulem řas. Takto připravené roztoky se inkubují při konstantní teplotě s nepřetržitým světlem po dobu 72 hodin. Poté se porovnává počet buněk v roztocích testované látky s počtem buněk v kontrolním roztoku. Počet buněk na mililitr lze změřit elektronickým počítadlem buněk nebo hemocytometrem. Pokud dochází u řas k inhibici jejich růstu, pak můžeme tuto látku považovat za toxickou. Místo baněk lze použít i 24 nebo 96 jamkové mikrodestičky, kde se objemy roztoků pohybují v mikrolitrech. Na základě toho je snížená spotřeba chemických látek a použitého materiálu. Testování je efektivnější i díky tomu, že lze v mikrodestičkách měřit i více koncentrací zkoušené látky v jeden okamžik (Environmental Protection Series, 2007).

Test bio akumulace (Bioaccumulation Test)

Pojem bioakumulace definuje přijímaní, skladování a kumulování anorganických a organických látek v tělech organismů z jejich prostředí (Braunbeck et al., 1998) Při testování bioakumulace se měří nárůsty koncentrace cizorodých látek v organismech v důsledku expozice prostředí (Stein, 2012). Biosorpční kapacita řas je ovlivněna fyzikálně-chemickými faktory, zejména teplotou, druhem a koncentrací exponované látky, pH a hmotností biomasy řas (Pace et al., 2024). U tohoto typu testu se zjišťuje bioakumulační faktor (BAF), který se počítá jako poměr koncentrace cizorodé látky v organismu ku její koncentraci v prostředí (Weisbrod et al., 2009).

Test viability řas (Viability Test)

U testování životaschopnosti buněk se používají metody mikroskopie, cytometrie a průtoková cytometrie. Díky těmto metodám můžeme rozdělit a rozeznat živé a mrtvé buňky (Kummrow et al., 2013; Wang et al., 2023a).

Mikroskopická analýza je spojená s barvením buněk, kdy se používají fluorescenční barviva jako fluorescein diacetát, tak reaktivní jako trypanová modř nebo neutralní červeň (Liu et al., 2019). Mikroskopie je všestrannější technikou pro testování viability jednotlivých buněk, zejména adherentně rostoucích. Průtoková cytometrie však nabízí vysokorychlostní kvantitativní multiparametrovou analýzu buněk v suspenzi (Kummrow et al., 2013).

Během průtokové cytometrie je svedena suspenze buněk do tenkého proudu, který je ozařován laserem. Průchodem buňky dochází k rozptylu světla a k emisi fluorescenčního záření. Tyto světelné signály jsou snímány detektory a následně jsou převedeny do počítače, kde jsou analyzovány. U průtokové cytometrie se používají fluorescenční činidla, jako jsou barviva pro životaschopnost, fluorescenčně konjugované protilátky, iontová indikátorová barviva apod. (McKinnon, 2018)

V cytometrických metodách se sleduje životaschopnost buněk pomocí fluorescenčních barviv, která buď obarvují živé nebo mrtvé buňky. Pro spolehlivost tohoto způsobu testování je důležité vybrat vhodné barvivo a postup barvení, aby intenzita fluorescence obarvených buněk byla vysoká. Tyto testy obvykle probíhají ve více jamkových destičkách. Tento typ testu je použit v praktické části pro zjištění životaschopnosti buněk *P. Subcapitata* (Wang et al., 2023a).

Test exprese genů (Gene Expression Assay)

Testování genové exprese analyzuje jednotlivé geny, skupiny genů nebo celý genom v buňce či v tkáni (Kirby et al., 2007). Genom obsahuje velké množství genů, které mají mnoho různých drah. Každá toxická látka může ovlivňovat jinou dráhu a jiným způsobem. Na základě informací z tohoto typu testování můžeme určit mnoho účinků testované látky, ať už se jedná o změnu syntézy proteinů nebo například funkce enzymů apod. (Kirby et al., 2007; Snell et al., 2003). Příkladem metody pro testovaní genové exprese je qPCR nebo Microarrays. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce, též známá pod zkratkou qPCR, je metoda, při které se kvantifikují transkripty mRNA (ribonukleová kyselina, z angl. messenger Ribonucleic acis) vybraného genu (Derveaux et al., 2010; Volland et al., 2016). Microarrays je jedna z nejnovějších technologií v testování genové exprese. Tento typ testu umožňuje sledovat paralelně tisíce genů (Brazma & Vilo, 2000).

4 Cíl práce a hypotézy

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zminiatiruzovat a zoptimalizovat metodiku testování toxického vlivu PFAS, konkrétně PFOS, PFOA, GenX, PFHxA, PFHxS na řase *P. subcapitata.* Záměrem bylo tedy zefektivnit spotřebu chemických látek a materiálu a aby oba toxikologické testy byly proveditelné v 96 jamkové mikrodestičce. Nejen, že díky tomu je možné snížit spotřebu chemických látek, ale také lze změřit několik paralel o různých koncentracích PFAS najednou.

Dalším cílem bylo zjistit, zda lze sledovat viabilitu i pomocí fluorescenčního barviva a zda by byl daný test srovnatelný se standardizovaným testem růstové inhibice. Pro zjištění viability byla nejprve stanovena růstová křivka a korelace mezi počtem buněk a změřenou fluorescencí chlorofylu. Dále bylo nezbytné vybrat vhodné fluorescenční barvivo, na základě jehož fluorescence by bylo možné rozeznat živé a mrtvé buňky a zároveň mělo dostatečný fluorescenční signál.

V této práci bylo také záměrem celkově poukázat na důležitost testování toxicity PFAS na nižších rostlinách, protože jsou citlivé na znečišťující látky a reprezentují celou rostlinou říši (Hsieh et al., 2006). Pokud jsou PFAS toxické pro rostliny, pak ohrožují celý ekosystém a je na místě tyto látky co nejvíce regulovat.

Hypotézy:

PFAS inhibují růst řasy *P. subcapitata*.

FDA test je rovněž použitelný jako standardizovaný test inhibice růstu k zjištění toxického vlivu PFAS na *P. subcapitata*.

Testy pro zjištění toxicity PFAS na *P. subcapitata* je možné miniatiruzovat a optimalizovat.

5 Materiály a metodika

Jednobuněčná řasa *P. subcapitata* kmen č. 433 (synonymum: *R. subcapitata*)

5.1 Chemikálie

Příprava BBM média

$NaNo_3$	dusičnan sodný	VWR chemicals, Belgie
$CaCl_2 * 2H_2O$	chlorid vápenatý dihydrát	Sigma-Aldrich, Německo
$MgSO_4 * 7H_2O$	síran hořečnatý	Lach-Ner s.r.o., Česko
K_2HPO_4	hydrofosforečnan draselný	Lach-Ner s.r.o., Česko
KH_2PO_4	dihydrofosforečnan draselný	Lach-Ner s.r.o., Česko
NaCl	chlorid sodný	Carl Roth, Německo

Roztok EDTA:

$NaFeO_2$	železitan sodný	Sigma-Aldrich, Německo
KOH	hydroxid draselný	Penta, Česko

Trace Metals Solution:

$ZnSO_4 * 7H_2O$	síran zinečnatý heptahydrát	Sigma-Aldrich, Německo
$MnCl_2 * 4H_2O$	chlorid manganatý tetrahydrát	Erba Lachema, Česko
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	molybdenan sodný dihydrát	HiChem spol s.r.o., Česko
$CuSO_4 * 5H_2O$	síran měďnatý heptahydrát	Penta, Česko
$Co(NO_3)_2 * 6H_2O$	dusičnan kobelnatý hexahydrát	HiChem, Česko

Acidified Iron Solution:

$FeSO_4 * 7H_2O$	síran železnatý heptahydrát	Lach-Ner s.r.o., Česko
H_2SO_4 95 %	kyselina sírová	VWR chemicals, Francie

Příprava standardů PFAS

PFOS	perfluorooktansulfonátová kyselina	SynQuest Labs., Inc., USA
PFOA	perfluorooktanová kyselina	Merc spol. s.r.o., Česko
GenX	hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina	SynQuest Labs., Inc., USA
PFHxA	pentadecafluoroktanová kyselina	SynQuest Labs., Inc., USA
PFHxS	perfluorhexansulfonová kyselina	SynQuest Labs., Inc., USA
MetOH	metanol	Lach-Ner s.r.o., Česko

Tabulka 2: Souhrn certifikovaných sloučenin PFAS použité v této studii

Název	Zkratka	Vzorec	Číslo CAS	Molární hmotnost (g/mol)
Perfluorooktansulfonová kyselina	PFOS	$C_8F_{17}KO_3S$	2795-39-3	538.22
Perfluorooktanová kyselina	PFOA	$C_8HF_{15}O_2$	335-67-1	414.07
Perfluorhexanová kyselina	PFHxA	$C_6HF_{11}O_2$	307-24-4	314.05
Perfluorhexansulfonová kyselina	PFHxS	$C_6F_{13}O_3S$	3871-99-6	438.20
Hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina	HFPO-DA (GenX)	$C_6HF_{11}O_3$	13,252-13-6	330.05

Fluorescenční barviva

CFDA-AM	karboxyfluorecein diacetát acetoxymethylester	Sigma-Aldrich, Německo
FDA	fluorescein diacetát	Sigma-Aldrich, Německo
PI	propidium jodid	Sigma-Aldrich, Německo

5.2 Přístroje a pomůcky

Přístroje

Analytická váha AE 240	Mettler Toledo GmbH, Německo
Centrifuga EBA 20	Hettich Zentrifugen, Německo
Mini centrifuga	Phoenix, Česko
Magnetická míchačka VELP	Scientifica Srl, Itálie
Vortex MX-S, DLAB	Scientific Inc., USA
Mikroskop	Optika, Itálie
Laboratorní třepačka LT3	Verkon, Česko
Buněčný inkubator	Lovibond, Německo
Thermoblok	Bioer, Japonsko
Očkovací box HBB 2448	Holten Laminar Air, Indie
Laboratorní ultrazvuková vana K-12	Kraintek, Česko

Multifunkční modulární reader Infinite 200Pro	Tecan, Rakousko
Kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 HPLC systém spojený s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Sciex 4500	Shimadzu, Japonsko

Laboratorní pomůcky

Kádinky	
Lahve s modrým šroubovacím uzávěrem, čirá 100 ml, 500 ml, 1000 ml	
Laboratorní lžičky	
Laboratorní vaničky	
Navažovací lodička	
Pipetovací špičky D200, D1000,	Diamond Tipack, Gilson, Francie
Pipetovací špičky 10 ul Neptune	Schoeller Pharma Praha, Česko
Automatická pipeta P100, P200, P1000, P10	Gilson, Francie
Multikanálová-automatická pipeta P300	Gilson, Francie
Pipetovací přístroj pro skleněné a plastové pipety od 1 do 100 ml	Gilson, Francie
Mikrotitrační destičky 96 jamek Thermoscientific 130188	Thermo Fisher Scientific, Korea
Mikrotitrační destičky 24 jamek zjistit Cellstar	Dialab spol. s.r.o., Česko
Mikrozkumavky 1,5 ml	Biologix, Čína
Mikrozkumavky 5 ml	Avantor, USA
Centrifugační zkumavky 15 ml	JET Biofil, Čína
Bürkerova počítací komůrka	Marienfeld, Německo
Alobal	
Krabička s uzávěrem pro inkubaci ve tmě	

5.3 Kultivace řas *P. subcapitata* kmen č.433

Aby bylo možné začít s praktickou částí, bylo potřeba zvolit vhodnou řasu k testování toxických účinků PFAS. Byla zvolena *P. subcapitata*, jelikož je to řasa, která se hojně používá k testování toxicity dle mezinárodních norem a je citlivá na perzistentní látky, jako jsou právě PFAS (Hsieh et al., 2006; Nguyen et al., 2024; OECD, 2006).

Inokulum řasy *P. subcapitata* kmen č.433 bylo pořízeno v Centru ALGATECH, které spadá pod Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Ke kultivaci bylo vybráno BBM médium (Bold´s Basal medium), které je bohaté na živiny a převážně se používá ke kultivaci mikrořas. Významně ovlivňuje rychlost klíčení a růst různých

druhů řas (Agrawal & Sarma, 1982). Médium typicky zahrnuje základní makro a mikroprvky, organické sloučeniny a vitamíny, které jsou klíčové k vývoji buněk (Sudheer et al., 2022).

Médium bylo připravené podle článku Bold Basal Medium Recipe (2019) , vysterilizováno autoklávováním (teplota 121 °C, tlak 101,3 kPa, 20 min) a poté uskladněno v temném prostředí při 4 °C.

Udržování kultury

Za sterilních podmínek bylo do sterilní 100 ml Erlenmeyerovy baňky aplikován 1 ml inokula řas (kmen č. 433) a 9 ml BBM. Takto připravená suspenze byla inkubována při 22 ± 1 °C pod světlem o intenzitě 4000 lux na kontinuální třepačce LT3 s intenzitou 8 (Environment Canada EPS 1/RM/25, 2007). Podmínky inkubace byly převzaty z OECD normy 201 (OECD, 2006)). Po 7 dnech byly řasy přepasážovány (1 ml narostlé suspenze buněk a 9 ml BBM média), aby byl zajištěn jejich nepřetržitý růst.

Obrázek 2: Kultivace řas

Obrázek 3: Očkovací box Holten Laminar Air HBB 2448

5.4 Růstová křivka

Experiment toxicity PFAS je možný provádět v exponenciální fázi růstu (rychlost růstu řas je stálá). Tato fáze se dá zjistit pomocí růstové křivky.

Nejprve byla spočítána koncentrace řas v suspenzi pomocí Bürkerovy tabulky pod mikroskopem (zvětšení 10× 0,25). Na základě zjištěné koncentrace byla z této suspenze za sterilních podmínek připravena suspenze buněk o koncentraci 10 000 buněk/ml v objemu 20 ml BBM do Erlenmeyerovy baňky. Koncentrace buněk řas byla zvolena dle diplomové práce od Hájkové (Hajková, 2010). Baňka byla inkubována při 22 ± 1 °C pod světlem o intenzitě 4000 lux na kontinuální třepačce LT3 s intenzitou 8 po dobu 10 dnů (Environment Canada EPS 1/RM/25, 2007). V čase nula a následně každých 24 hodin bylo odebíráno 0,5 ml suspenze pro měření optické density (OD). Měření probíhalo v 96 jamkové mikrodestičce, která byla poté vložena do multifunkčního modulárního readeru a byla změřena absorbance při vlnové délce 680 nm. Hodnoty absorbance byly zlogaritmovány a vynásobeny číslem 1000, aby hodnoty nevycházely v mínusu, a ze změřených hodnot byl vytvořen graf růstové křivky. Lineární část křivky byla proložena přímkou lineární regrese, kde směrnice přímky odpovídá růstové rychlosti.

Následně bylo zjištěno, zda se růstová rychlost liší, pokud řasy porostou ve třech různých nádobách. Byl sledován růst v baňce, v 24 a 96 jamkových mikrodestičkách.

Za sterilních podmínek byly připraveny dvě suspenze buněk o koncentracích 10 000 buněk/ml a 50 000 buněk/ml v objemu 20 ml BBM. Na základě výsledků (6.1.)

z předchozího měření růstové křivky bylo rozhodnuto pokračovat s koncentrací 10 000 buněk/ml a zároveň otestovat koncentraci 50 000 buněk/ml, což je nejvyšší doporučená koncentrace pro řasu *P. subcapitata* dle OECD normy č. 201 (OECD, 2006). Z těchto dvou suspenzí byly zaočkovány řasy do dvou Erlenmeyerových baněk (c= 10 000 buněk/ml a 50 000 buněk/ml) po 10 ml. Suspenze byly rovněž aplikovány do 24 jamkové mikrodestičky (do každé jamky 1 ml suspenze, do krajních jamek 1 ml BBM) a 96 jamkové mikrodestičky (do 6 jamek 200 ml suspenze a 200 ml BBM). Pokud byly některé jamky prázdné, byly doplněny vodou, aby bylo zabráněno nadměrnému odpařování z testovaných jamek. Všechny nádoby byly inkubovány při 22 ± 1 °C pod světlem o intenzitě 4000 lux na kontinuální třepačce LT3 s intenzitou 8 (Environment Canada EPS 1/RM/25, 2007).

OD byla změřena v čase t = 0 při vlnové délce 680 nm a následně každých 20 až 24 hodin po dobu jednoho týdne. Doba měření byla zkrácena na základě hodnot z předchozího testu, kdy 8-10 den už exponenciální růst klesal. Změřené hodnoty absorbance byly vyhodnoceny stejným způsobem jako u předchozího testu.

5.5 Zjištění korelace mezi počtem buněk a změřenou fluorescencí chlorofylu

K testování toxicity PFAS na řase *P. subcapitata.* je nutné sledovat růst biomasy. Sledovat nárůst lze pomocí počítání buněk v počítací komůrce nebo pomocí automatického počítadla buněk . Zároveň lze použít i fluorescenční signál chlorofylu, pokud se prokáže korelace mezi signálem chlorofylu a počtem buněk (OECD, 2006). Poslední zmíněná metoda je rychlá, jednoduchá, ekonomická a nejvhodnější pro použití v mikrotitrační destičce. Proto byla v této práci použita. Pro určení počtu buněk pomocí intenzity fluorescenčního signálu chlorofylu bylo potřeba zjistit, jaký signál odpovídá danému počtu buněk. Díky tomu je následně možné rozlišit, zda řasy při expozici PFAS rostou nebo ne.

Nejprve byla pomocí Bürkerovy počítací komůrky spočítána suspenze buněk, ze které byla připravena suspenze o koncentraci 10 milionů buněk/ml o objemu 1,2 ml. Z této suspenze byla vytvořena ředící řada o daných koncentracích viz Tabulka 3. Každá koncentrace udává jasný počet buněk v jamce. Z takto připravených zkumavek bylo aplikováno 40 µl suspenze + 160 µl BBM do jamek 96 jamkové mikrodestičky. V jedné jamce bylo celkově 200 µl a každá koncentrace buněk byla změřena v 6 opakování na jamku. Jako kontrola blank sloužilo 200 µl čistého BBM. Po napipetování roztoků do destičky byla změřena fluorescence chlorofylu na přístroji Tecan Infinite Pro reader (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Celý tento experiment byl proveden třikrát. Z průměrů získaných hodnot byl vytvořen Graf 5 (viz Výsledky). Z hodnot byl spočítán korelační koeficient.

Tabulka 3: Počet buněk v jamce na základě koncentrace buněk/ml a ředění s BBM

Koncentrace buněk/ml	10000000	5000000	250000	1250000	625000	312500	156250	78125	39063	19531	9766
Počet buněk v jamce	400000	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	781	391

5.6 Testování použití dalších fluorescenčních barviv k určení viability

Sledování nárůstu viability pomocí signálu chlorofylu nedokáže spolehlivě detekovat počty buněk nižší než zhruba 1500 (viz výsledky 6.2.). Otázkou bylo, zda by bylo možné počty buněk nižší než 1500 detekovat jinak. A zároveň zda by bylo možné detekovat, jestli nízké hodnoty signálu chlorofylu jsou způsobeny inhibovanými buňkami, nebo zda jsou buňky již mrtvé.

Procentuální obsah živých buněk řas je možné sledovat pomocí fluorometrických metod, které nám diferencují živé a mrtvé buňky pomocí fluorescenčních barviv (Yewalkar et al., 2019). V této podkapitole je testováno nejvhodnější fluorescenční barvivo pro měření životaschopnosti *P. subcapitata*. Byla otestována tři barviva. V každém testu s fluorescenčním barvivem bylo potřeba nejdříve zjistit, zda dané barvivo buňky označuje, v jaké koncentraci se má použít a jaký počet buněk je potřeba pro dostatečný fluorescenční signál.

5.6.1 Propidium jodid (PI)

Tento typ barviva neprochází skrz neporušenou buněčnou membránu kvůli své polární povaze. Ve chvíli, kdy buňka zemře, tak se i její membrána naruší a PI je schopen vstoupit do buňky, kde se interkaluje mezi páry bází nukleových kyselin a tím dojde k emisi fluorescenčního záření. PI tedy označuje buňky, které jsou mrtvé (Rioboo et al., 2009; Xiao et al., 2011).

Postup testu s PI

Nejprve byly spočítány buňky *P. subcapitata* v suspenzi, ze které byla následně připravena suspenze o koncentraci 1 milion buněk/ml (počet buněk alespoň 4 miliony). Tato suspenze byla rozdělena do dvou zkumavek, které byly označeny na „mrtvé“ a „živé“. Zkumavky s označením „mrtvé“ byly inkubovány na 30 min do termobloku při teplotě 100 °C, aby došlo k usmrcení buněk.

Byly připraveny dva roztoky s barvivem PI o koncentracích 20 µg/ml a 6 µg/ml ve 2 ml a byly uloženy do tmy (Hu et al., 2020; Yewalkar et al., 2019).

Ze zkumavek „živé“ a „mrtvé“ (c = 1 milion buněk/ml) byla vytvořena ředící řada o koncentracích 500 000, 50 000, 5000 a 500 buněk/ml (Tabulka 4). Takto připravené suspenze

byly napipetovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermoscientific 130188 do každé jamky po 100 µl a následně byly přidány roztoky PI, do každé jamky 100 µl. Konečnými koncentracemi PI roztoku v jamkách byly 10 µg/ml, 3 µg/ml. Do dvou řad destičky bylo do každé jamky přidáno 100 µl suspenze o daných koncentracích + 100 µl BBM, což sloužilo jako negativní kontrola. Mikrodestička byla poté inkubována 30 min ve tmě při pokojové teplotě. Poté byla změřena fluorescence propidium jodidu (excitace: 535 nm, emise: 615 nm) a fluorescence chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Signál fluorescence chlorofylu byl měřen kvůli kontrole správného naředění buněk řas a zda samotný PI neovlivňuje fluorescenční signál chlorofylu. Test byl 3× zopakován, všechny kombinace koncentrací buněk a PI byly měřeny v duplikátu.

Tabulka 4: Ředící řada koncentrací suspenze řas

Koncentrace buněk/ml	1 mil/ml	500 000/ml	50 000/ml	5 000/ml	500/ml
Počet buněk v jamce	100 000	50 000	5 000	500	50

5.6.2 Karboxyfluorescein diacetát acetoxymethylester (CFDA-AM)

Karboxyfluorescein diacetát (CFDA) je nepolární a nefluorescenční látka, která volně vstupuje do buněk, kde je hydrolyzována intracelulárními esterázami na fluorescenční fluorescein. CFDA barví živé buňky, protože oproti mrtvým buňkám vykazují metabolickou aktivitu, a tudíž i funkci esteráz (Jochem, 1999; Pinillos & Cuevas, 2008). CFDA má silné negativní náboje, což mu umožňuje se dobře udržet v buňce. CFDA má také deriváty a jedním z nich, který se hojně využívá, je CFDA-AM. Tento derivát je elektricky neutrální a je možné ho ve fluorometrických metodách aplikovat v nižších koncentracích než samotný CFDA (Gorokhova et al., 2012).

Potup testu CFDA-AM

Na začátku testu byly spočítány buňky v suspenzi *P. subcapitata*, ze které byly následně připraveny 3 ml suspenze o koncentraci 1 milion buněk/ml. Z takto připravené suspenze byla napipetována ředící řada o koncentracích 500 000, 50 000, 5000 a 500 buněk/ml do zkumavek (Tabulka 4). Následně byly tyto koncentrace aplikovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermoscientific 130188 (do každé jamky 100 µl).

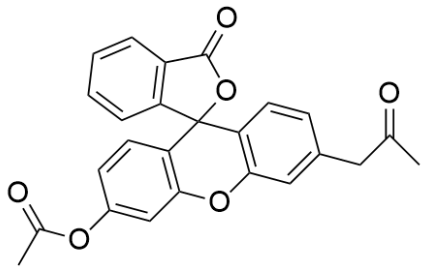
Barvivo CFDA-AM bylo naředěno do dvou 3ml zásobních roztoků o koncentracích 40 µM a 8 µM, které byly poté aplikovány do mikrodestičky v objemu 100 µl na jamku. Výsledná koncentrace CFDA-AM v jamce byla 20 µM, resp. 4 µM (Debenest et al., 2010; Machado & Soares, 2013).

Jako negativní kontrola byla 100 µl suspenze řas o daných koncentracích + 100 µl BBM. Takto připravená mikrodestička byla na 30 minut při pokojové teplotě inkubována ve tmě. Na konci

testu byl změřen fluorescenční signál CFDA-AM (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) a chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Fluorescenční signál chlorofylu byl měřen ze stejných důvodů jako u předchozího testování barviva PI. Test byl 3× zopakován, všechny kombinace koncentrací buněk a CFDA-AM byly měřeny v duplikátu.

5.6.3 Fluorescein diacetát (FDA)

FDA je fluorochrom s lipofilní povahou, který funguje na stejném principu jako CFDA. FDA je vhodné barvivo pro hodnocení metabolických aktivit buněk řas, protože má vysokou penetrabilitu, vynikající citlivost a efektivně barví jak prokaryotické, tak eukaryotické buňy řas. (Brookes et al., 2000). Účinnost FDA se může u jednotlivých druhů řas lišit, proto je nezbytné individuálně tuto látku otestovat (Yewalkar et al., 2019).



Obrázek 4: Molekulární struktura FDA (fluorescein diacetát)

Postup testu FDA

Nejprve byly spočítány buňky v suspenzi *P. subcapitata,* ze které byla následně připravena suspenze o koncentraci 1 milion buněk/ml v 3 ml. Barvivo bylo naředěné do tří zkumavek o koncentracích 20 µM, 40 µM, 80 µM ve 3 ml a byly uloženy do tmy (Debenest et al., 2010; Machado & Soares, 2013). Jejich následná koncentrace v jamkách pak bude 10 µM, 20 µM a 40 µM, jelikož polovina roztoku v jamce bude suspenze buněk a druhá roztok FDA.

Z připravené zkumavky se suspenzí buněk o koncentraci 1 milion buněk/ml byla vytvořena ředící řada o koncentracích viz Tabulka 4 v předchozí kapitole. Takto připravené roztoky byly napipetovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermoscientific 130188 (do každé jamky 100 µl). K buňkám byl přidán roztok barviva (do každé jamky 100 µl). Jako negativní kontrola byla 100 µl suspenze řas o daných koncentracích + 100 µl BBM. Takto připravená destička byla inkubována ve tmě po dobu 30 min za pokojové teploty. Poté byla změřena fluorescence FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) a chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Fluorescenční signál chlorofylu byl měřen ze stejných důvodů jako u předchozích testů barviv.

Tento test byl zopakován 2× a všechny koncentrace buněk byly měřeny v duplikátu. Výsledky tohoto testu ukazují, že FDA vykazuje dostatečný signál k měření viability *P. subcapitata* (viz výsledky 6.3.3.). Dále bylo potřebné zjistit, zda je FDA dostatečně selektivní a lze na základě jeho fluorescenčního signálu odlišit živé buňky.

V dalším testu byla připravena suspenze o koncentraci 50 tisíc buněk/ml ve 4 ml. Tato koncentrace buněk řas byla zvolena na základě výsledků z předchozího experimentu, kdy byl signál FDA při koncentraci 50000 buněk/ml dostatečný pro kvantifikaci. Zároveň se dle standardizovaného testu č. 201 jedná se o nejvyšší možnou použitelnou koncentraci buněk pro *P. subcapitata* (OECD, 2006). Z této suspenze byly odebrány 2 ml do zkumavek s označením „mrtvé“ a byly vloženy na 15 min do termobloku o teplotě 100 °C, aby došlo k usmrcení buněk.

Poté byly smíchány živé a mrtvé buňky do zkumavek na 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % a 0 %, kdy 100 % znamená pouze živé buňky, 80 % znamená 80 % živých buněk + 20 % mrtvých buněk apod. Zkumavka s označením 0 % obsahovala pouze mrtvé buňky (Tabulka 5).

Tabulka 5: Smíchání živých a mrtvých buněk, 100 % živých buněk, 0 % mrtvých buněk

Koncentrace řas	50000 buněk/ml	50000 buněk/ml	50000 buněk/ml	50000 buněk/ml	50000 buněk/ml	50000 buněk/ml
Obsah živých buněk	100%	80%	60%	40%	20%	0%

Následně byl připraven roztok FDA v objemu 3 ml o koncentraci 40 µM a uchován ve tmě. Koncentrace 40 µM, která odpovídá koncentraci 20 µM v jamce, byla zvolena na základě výsledků předchozího experimentu.

Připravené roztoky o různých poměrech živých a mrtvých buněk byly aplikovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermoscientific 130188 (do každé jamky 100 µl). Do dvou řádků mikrodestičky byl k suspenzi přidán roztok FDA (do každé jamky 100 µl). Na základě tohoto ředění byla konečná koncentrace FDA v jamce 20 µM. Do dalších dvou řádků bylo do jamek přidáno čisté BBM (do každé jamky 100 µl), které sloužilo jako negativní kontrola. Kontrola blank FDA (roztok FDA + BBM v jamce o objemu 200 µl) byla pro jamky se suspenzí s FDA. Kontrola blank BBM (samotné BBM v jamce o objemu 200 µl) byla pro jamky se suspenzí s BBM. Mikrodestička byla inkubována ve tmě na 30 min při pokojové teplotě. Po půl hodině byla změřena fluorescence FDA a chlorofylu (obojí excitace: 485 nm, emise: 520 nm). Test byl 2× zopakován a všechny koncentrace buněk v poměru živých a mrtvých byly měřeny v duplikátu, aby byla prokázána jeho validita.

5.7 Testování adsorpce PFAS na povrch jamek 96 jamkové mikrodestičky

Před testováním toxicity PFAS na řasách bylo potřeba zjistit, zda se použité PFAS adsorbují na stěny polystyrenových jamek použité 96 jamkové destičky. Je důležité znát, zda

koncentrace PFAS bude v jamce po celou dobu experimentu stejná, nebo se sníží právě kvůli adsorpci. Proto byla adsorpce PFAS otestována podle následujícího postupu.

Postup testování adsorpce:

Nejprve byly naředěny zásobní roztoky (PFOA, GenX, PFOS) o koncentracích 10 000 µg/ml a 1000 µg/ml. Tyto roztoky byly použity k naředění roztoků (0,1 µg/ml; 1 µg/ml a 50 µg/ml), které byly aplikovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermoscientific 130188 po 100 µl do jamky (každá koncentrace měla 5 paralel). K ředění bylo použito BBM (do jamky 100 µl).

Po napipetování byla mikrodestička inkubována při pokojové teplotě 3 dny. Mezitím byly připraveny standardní roztoky, které sloužily jako porovnání s koncentracemi roztoků, které byly 3 dny inkubovány v mikrodestičce. Ke stanovení koncentrací sloužila kalibrační řada PFOA, GenX a PFOS o koncentracích 0,1; 0,5; 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 a 200 ng/ml.

Po 3 dnech byly roztoky z jamek destičky naředěny, a to z 0,1 µg/ml na 10 ng/ml, z 1 µg/ml na 100 ng/ml a z 50 µg/ml na 200 ng/ml. Roztoky byly naředěny na tyto koncentrace, jelikož přístroj, ve kterém byly PFAS následně detekovány, má rozsah měření koncentrací pouze v hodnotách 1–200 ng/ml.

PFOA, GenX a PFOS byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí (Kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 HPLC systém spojený s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Sciex 4500). K separaci byla použita kolona Angilent EclipsePlus C18 (3x 50 mm; 1,8 µm). V detekci PFAS byly použity dvě mobilní fáze (A:5 mM octan amonný v mili-Q vodě, B:100 % MetOH). Gradientová eluce byla upravena následovně:

Tabulka 6: Hodnoty gradientové eluce pro detekci PFAS

čas (min)	% fáze B
0,01	20
0,5	20
4	60
15	100
22	100
25	20

5.8 Testování toxického vlivu PFAS na *P. subcapitata* kmen č.433

Před tímto experimentem byly nejprve připraveny standardní roztoky látek PFOA, GenX, PFOS, PFHxA a PFHxS o koncentracích 100 000 µg/ml, 75 000 µg/ml, 50 000 µg/ml, 25 000 µg/ml, 10 000 µg/ml, 5 000 µg/ml, 1000 µg/ml a 100 µg/ml rozpuštěné v čistém metanolu.

První den bylo do 100 ml sterilní baňky zaočkováno 10 000 buněk/ml v 10 ml BBM, která pak byla umístěna do inkubátoru na 4 dny při 22 ± 1 °C pod světlem o intenzitě 4000 lux na kontinuální třepačce LT3 s intenzitou 8. Po čtyřech dnech, kdy už řasy byly v exponenciální fázi růstu, byly spočítány buňky v suspenzi, ze které byla následně připravena suspenze o koncentraci 20 000 buněk/ml v 20 ml. Poté byly naředěny roztoky daných testovaných PFAS ze standardů o koncentracích 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml a 0,1 µg/ml v BBM do mikrozkumavek tak, aby koncentrace rozpouštědla (v našem případě metanolu) nepřesáhla 0,2 % objemu roztoku.

Pro testování byla také připravena pozitivní, negativní a solvent kontrola. Pozitivní kontrolu představoval roztok 20 µm/l dichlorfenolu v BBM + suspenze buněk 20 000 buněk/ml. Dichlorfenol je používán dle norem a pro řasy je extrémně toxický. Negativní kontrolou byl roztok suspenze buněk + BBM, který nám ukazuje, zda při daných podmínkách řasy v BBM mediu rostou. Jako solvent kontrola byl roztok 0,2 % MetOH (látky PFAS jsou v něm rozpuštěné) v BBM + suspenze buněk. Díky solvent kontrole lze zjistit, zda samotné rozpouštědlo nemá vliv na řasy.

Takto připravené roztoky byly napipetovány do 96 jamkové mikrodestičky Thermo Scientific 130188. Nejprve byla do destičky napipetována suspenze řas v objemu 100 µl a poté k nim byly aplikovány roztoky testované látky o daných koncentracích také v objemu 100 µl. Konečná koncentrace řas v jamce byla 10 000 buněk/ml čili 2000 buněk v jamce. Výslednými koncentracemi PFAS v destičce byly 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml a 0,1 µg/ml. Do jamek pozitivní kontroly bylo aplikováno 100 µl roztoku dichlorfenolu (20 µg/ml) + 100 µl suspenze a do jamek negativní kontroly
100 µl suspenze + 100 µl BBM. Jamky solvent kontroly obsahovaly 100 µl 0,2 % MetOH rozpuštěného v BBM +100 µl suspenze. Prázdné jamky byly doplněny 200 µl BBM.

Následně byla mikrodestička vložena do multifunkčního modulárního readeru Infinite 200Pro, kde byl změřen počáteční fluorescenční signál chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Poté byla mikrodestička inkubována při 22 ± 1 °C pod světlem o intenzitě 4000 lux na kontinuální třepačce LT3 s intenzitou 8 po dobu 72 hodin.

Po uplynutí 72 hodin byl znovu změřen fluorescenční signál chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).

K testování viability pomocí FDA byl připraven roztok FDA o koncentraci 400 µM a objemu 1,5 ml (60 µl 10 mM FDA + 1440 µl BBM) (viz 6.3.3.). Do všech jamek bylo přidáno 10 µl FDA roztoku, i do jamek pouze s BBM. Tyto jamky sloužily jako blank kontrola. Konečná koncentrace FDA v jamce činila 20 µM. Roztoky v jamkách byly promíchány a následně inkubovány ve tmě po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla změřena fluorescence FDA

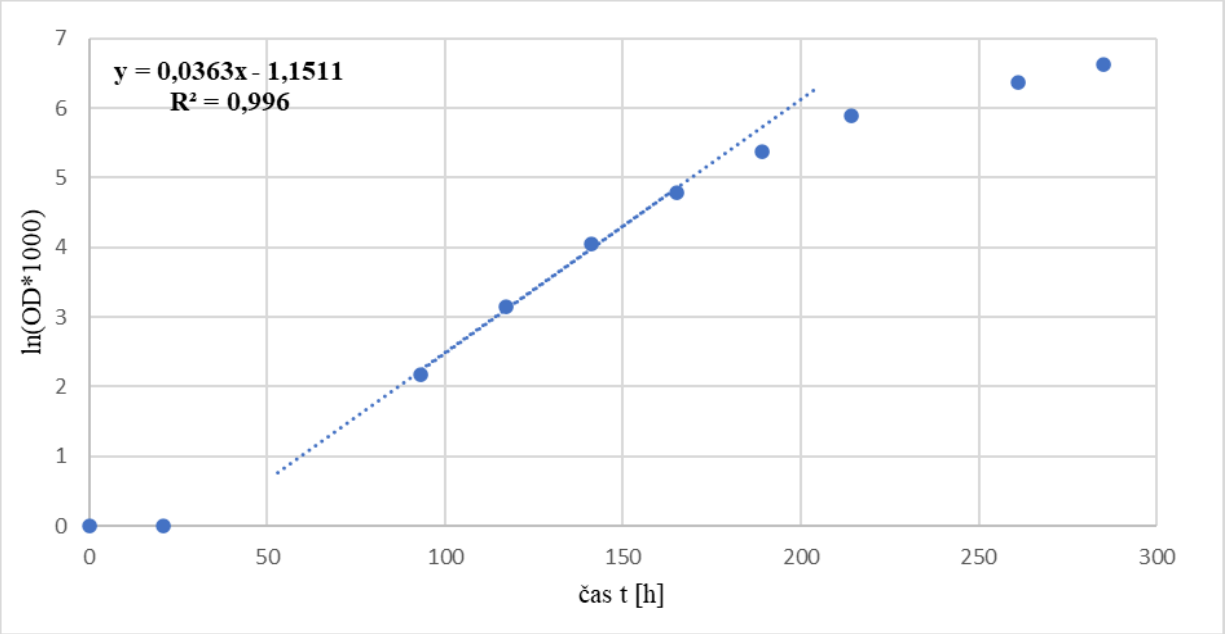
(excitace: 485 nm, emise: 520 nm). Všechny změřené hodnoty fluorescenčního signálu (relativní jednotky fluorescence- RFU, z angl. relative fluorescence units) byly zprůměrovány a byla spočítána jejich směrodatná odchylka (SD). Z RFU chlorofylu (biomasa-chlorofyl) byl spočítán procentuální obsah biomasy řas v jamkách s koncentracemi PFAS ku solvent kontrole a z RFU FDA (viabilita-FDA) byl spočítán procentuální obsah živých buněk. Hodnoty procentuálního obsahu biomasa-chlorofyl a viabilita-FDA byly spolu s koncentracemi PFAS (µg/ml) vyneseny do sloupcových grafů, které byly vytvořeny v programu Microsoft Excel (MS Office 365). Každá látka (PFOA, PFOS, GenX, PFHxA, PFHxS) byla změřena v 6 opakování na jamku a celý experiment byl s každou látkou
zopakován 3×, tudíž se od každé změřené koncentrace PFAS získalo 18 paralel.

Také byla provedena statistická analýza pomocí třícestné analýzy rozptylu (ANOVA), zahrnující faktory polutantu, ošetření (přidání určité koncentrace polutantu či solvent kontroly) a typu toxikologického testu (FDA test a test inhibice růstu). Pro ověření předpokladů analýzy rozptylu byly použity Shapirův-Wilkův test pro ověření normality a Levenův test shody rozptylů. K identifikaci nejnižších koncentrací pozorovaného účinku (LOEC) byla provedena mnohonásobná porovnání vůči solvent kontrole pomocí Dunnettova testu. Tento test umožnil analyzovat každou úroveň faktoru ošetření vůči solvent kontrole samostatně pro jednotlivé polutanty a testy. Dále byl v rámci této analýzy testován rozdíl mezi výsledky dvou toxikologických testů pro jednotlivé interakce faktorů polutant a ošetření. Pro kontrolu chyby 1. druhu při vícenásobném testování byla použita Bonferroniho korekce. Statistická analýza byla provedena v softwaru R (verze 4.4.1).

6 Výsledky a diskuse

6.1 Testování růstové křivky

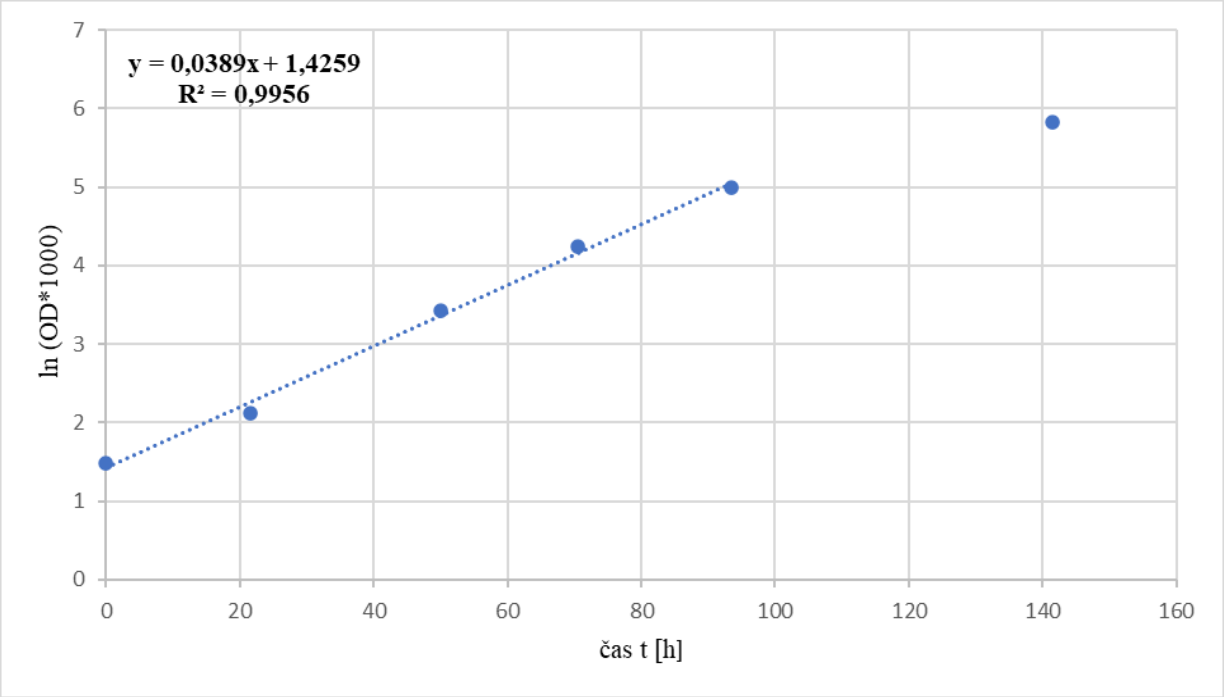
Jak už bylo zmíněno v metodické části, bylo potřeba před samotným testováním toxicity polutantů na řasách zjistit jejich fázi exponenciálního růstu, kdy rychlost růstu je stálá.
Z grafu lze vypozorovat, že 4.-7. den se růstová rychlost ustálila a po 7. dni začala rychlost klesat. Tudíž testování toxicity PFAS na *P. subcapitata* by mělo probíhat 4.-7. den jejího růstu



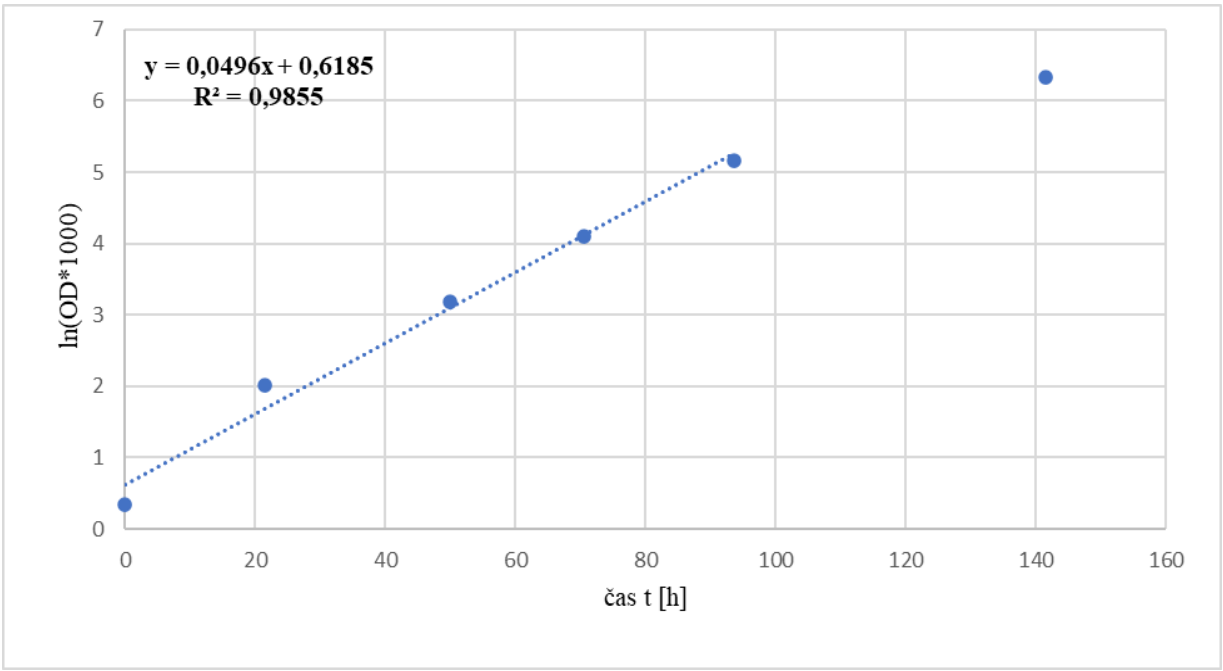
Graf 1: Růstová křivka proložená křivkou lineární regrese v exponenciální fázi růstu P. subcapitata kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), baňka 1. test, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm

Následně bylo zjištěno, zda se bude lišit růstová rychlost, pokud řasy porostou ve třech různých nádobách. Byl sledován růst v baňce (10 ml suspenze) , v 24 (1 ml suspenze v jamce a 96 (200 µl suspenze v jamce) jamkových mikrodestičkách.

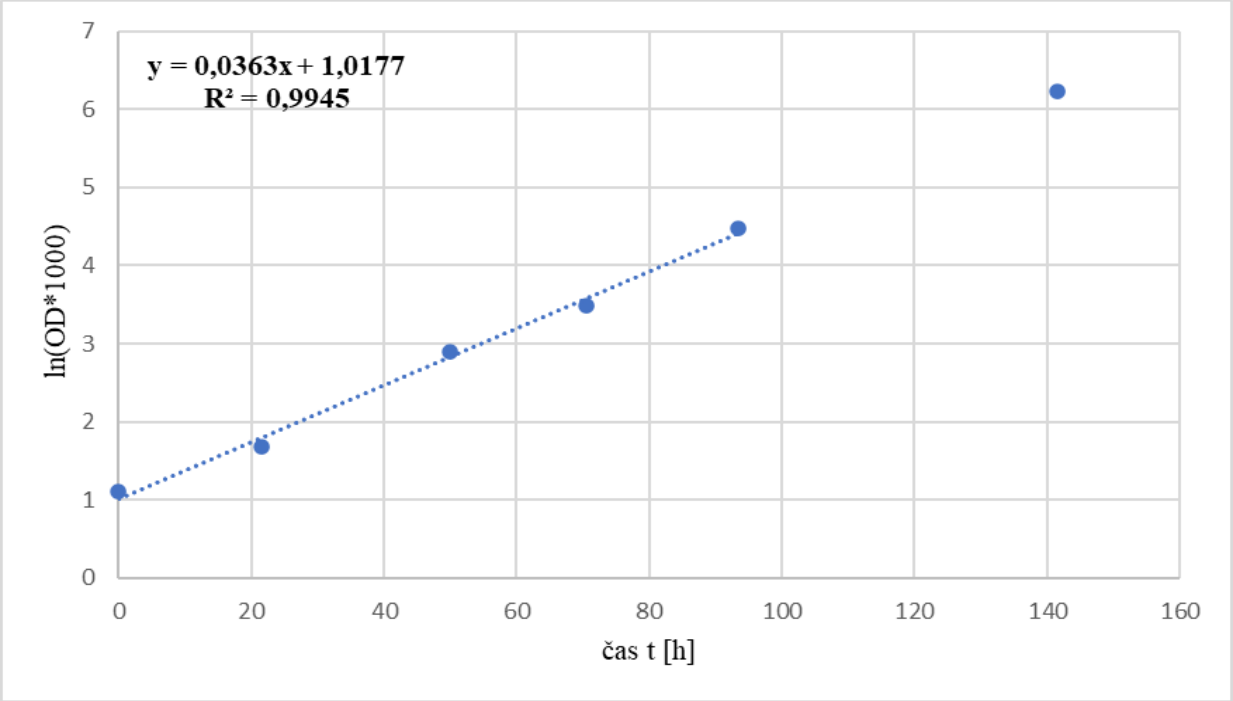
Růstová rychlost koncentrace buněk 10 000 buněk/ml u baňky a 96 jamkové destičky vyšla podobně, u 24 jamkové byla rychlost vyšší. Tímto pokusem byla potvrzena možnost inkubovat řasy i v 96 jamkové mikrodestičce, čímž se ušetří na spotřebě chemikálií.



Graf 2: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi růstu P. subcapitata kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), 96 jamková mikrodestička, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm



Graf 3: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi P. subcapitata kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), 24 jamková mikrodestička, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm



Graf 4: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi P. subcapitata kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), baňka 2. test, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm

U koncentrace 50 000 buněk/ml byly velké rozdíly v růstových rychlostech mezi nádobami (baňka, 24 a 96 jamková destička), a proto bylo rozhodnuto s touto koncentrací nepokračovat.

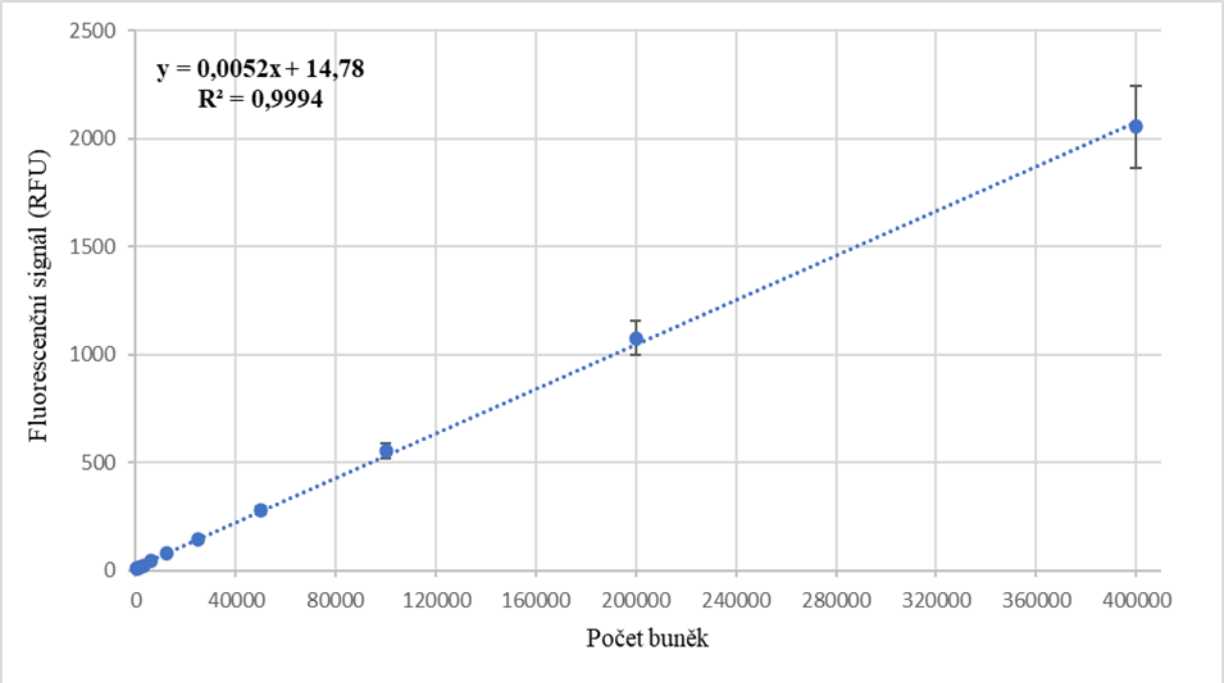
6.2 Korelace mezi počtem buněk a změřenou fluorescencí chlorofylu

Hodnoty průměrů fluorescenčního signálu chlorofylu byly vyneseny na osu y a počty buněk řas na osu x do Grafu 5. Lze pozorovat lineární závislost fluorescenčního signálu na počtu buněk. Díky zjištění lineární závislosti je možné použít hodnoty signálu chlorofylu ke sledování biomasy.

Jak lze vidět v Tabulce 7, fluorescenční signál chlorofylu byl už dostatečně vysoký při počtu 1562 buněk v jamce 96 jamkové mikrodestičky. Na základě toho bylo rozhodnuto aplikovat 2 000 buněk v 200 µl do jamky (c =10 000 buněk/ml) při testování toxicity PFAS.

Tabulka 7: Počet buněk v jamce na základě koncentrace buněk/ml a ředění s BBM, průměry hodnot fluorescenčních signálů (RFU, relative fluorescence units) změřeny u daných počtů buněk v jamce

Koncentrace buněk/ml	10000000	5000000	250000	1250000	625000	312500	156250	78125	39063	19531	9766
Počet buněk v jamce	400000	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	781	391
Průměr RFU	2054,5	1076,75	555,625	277,5	144,25	80,875	41,25	22,75	14,375	9,5	7,25
Směrodatná odchylka	192,4034	80,144	34,801	15,62	17	4,856	1,802	0,763	1,527	0,577	0,289

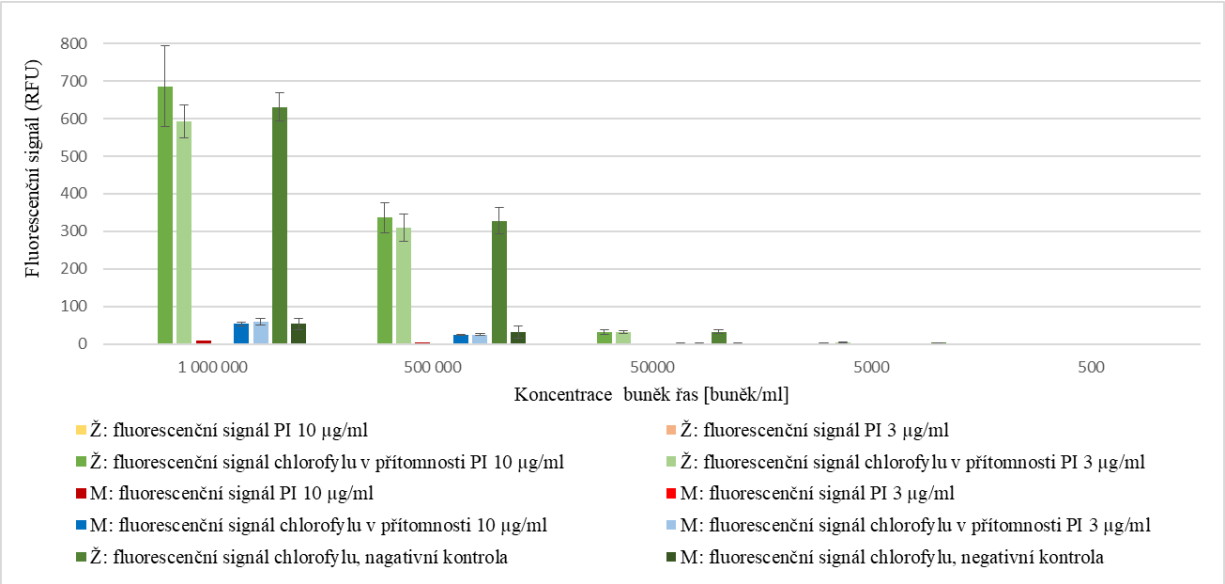


Graf 5: Závislost fluorescenčního signálu chlorofylu (RFU) změřeného při vlnových délkách excitace: 430 nm, emise: 670 nm na počtu buněk P. subcapitata. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 6 nezávislých paralel.

6.3 Výsledky z testování fluorescenčních barviv

6.3.1 Propidium jodid (PI)

Na Grafu 6 lze pozorovat, že fluorescenční signál PI (10 µg/ml, 3 µg/ml) nebyl u živých ani mrtvých buněk detekován, oproti fluorescenčnímu signálu chlorofylu, jehož intenzita byla u živých buněk vysoká. Pokud by barvivo PI fungovalo, byl by jeho fluorescenční signál pozorovatelný u mrtvých buněk. Na základě tohoto testu bylo rozhodnuto, že PI není vhodné barvivo pro další testování.

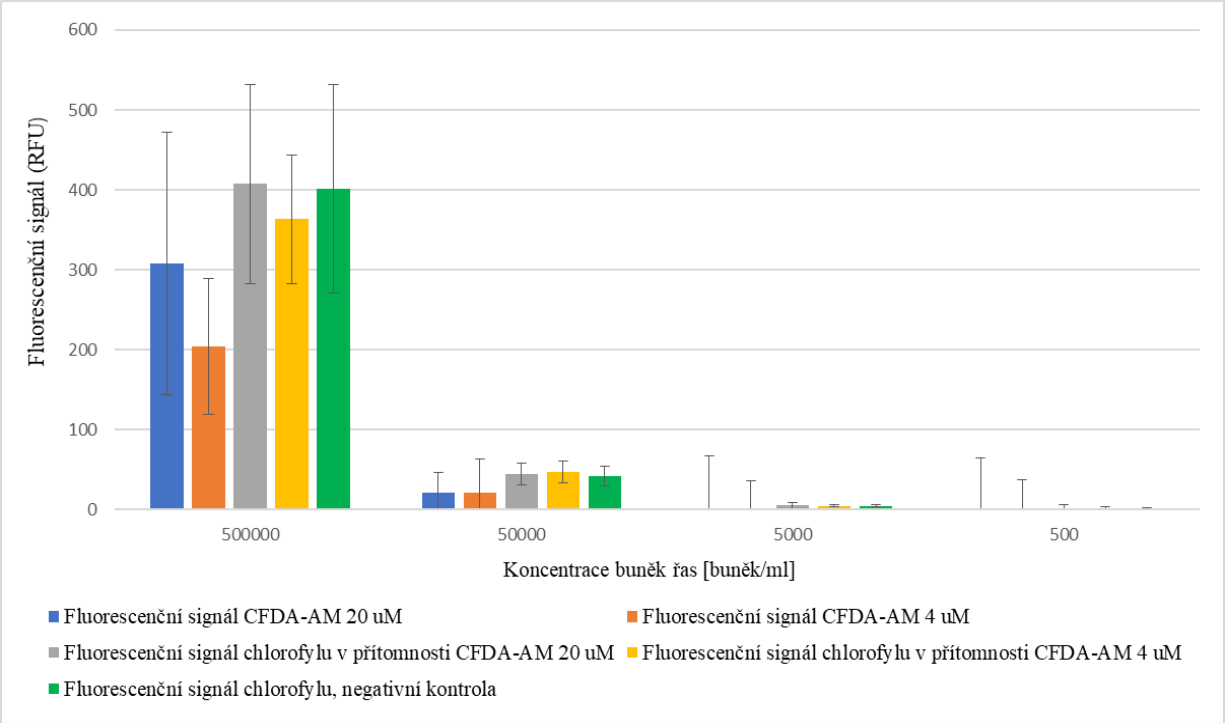


Graf 6: Výsledky testování fluorescenčního signálu PI o koncentracích 10 µg/ml a 3 µg/ml (excitace: 535 nm, emise: 615 nm) u živých (Ž) a mrtvých (M) buněk o daných koncentracích a porovnání s fluorescenčním signálem chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 6 nezávislých paralel. Pro kontrolu, zda samotný PI neovlivňuje signál chlorofylu, je změřen i fluorescenční signál chlorofylu v přítomnosti PI. Negativní kontrola: suspenze buněk o daných koncentracích s BBM.

Například ve studii od Hu a kol., barvení buněk řas pomocí PI při testování toxicity PFOA fungovalo, jelikož PI poskytoval fluorescenční signál o mrtvých buňkách (Hu et al., 2020). Oproti této diplomové práci ale použili jinou řasu (*C. pyrenoidosa*) a jiné kultivační médium. V další studii, kde také použili PI k barvení mrtvých buněk řas, použili také jiné druhy řas (*C. pyrenoidosa, Synechococcus* 7002) a jiné kultivační medium (Yewalkar et al., 2019).

6.3.2 Karboxyfluorescein diacetát acetoxymethylester (CFDA-AM)

Naměřené hodnoty (viz kapitola 5.6.2.) fluorescenčního signálu CFDA-AM byly vyneseny do Grafu 7, ve kterém lze pozorovat, že RFU CFDA-AM byl nedostatečný, protože v koncentracích nižších než 500 000 buněk/ml dosahoval nízkých hodnot signálu. V následných experimentech, kde se budou počty buněk pohybovat v řádech deseti tisíců buněk/ml, by nebylo použitelné. Z této podstaty je barvivo CFDA-AM k testování viability *P. subcapitata* nevyhovující.

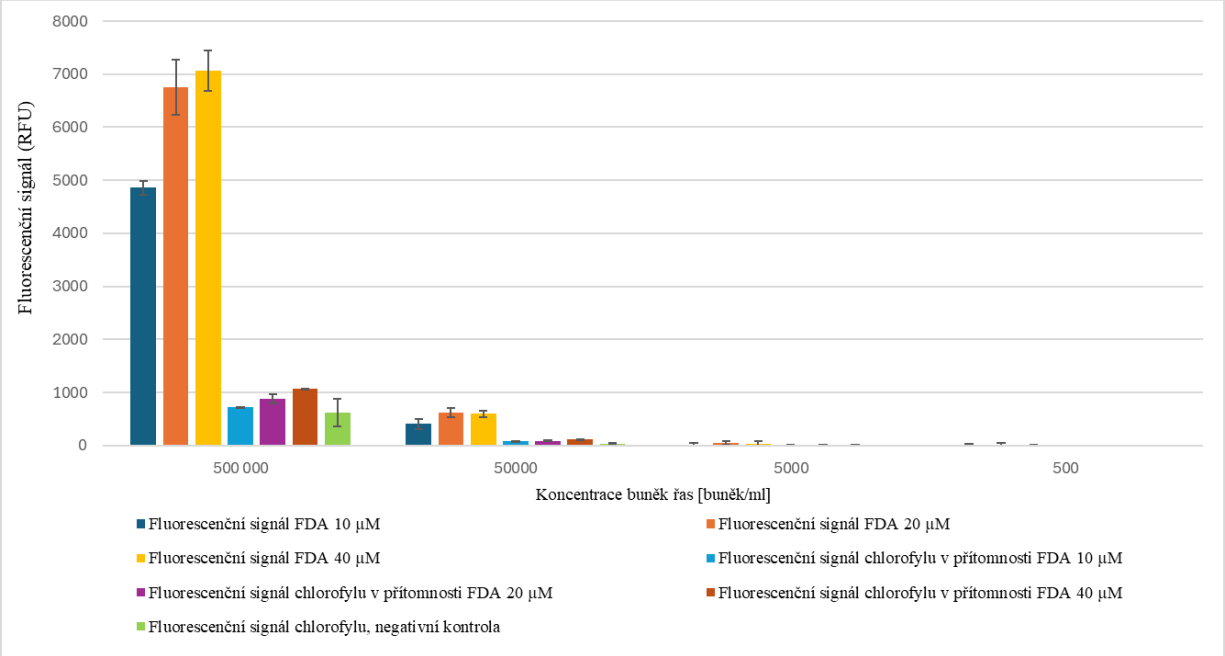


Graf 7: Výsledky testování fluorescenčního signálu CFDA-AM o koncentracích 20 µM a 4 µM (excitace: excitace: 485 nm, emise: 535 nm) u daných koncentrací buněk řas a porovnání s fluorescenčním signálem chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 6 nezávislých paralel. Pro kontrolu, zda samotný CFDA-AM neovlivňuje signál chlorofylu, je změřen i fluorescenční signál chlorofylu v přítomnosti CFDA-AM. Negativní kontrola: suspenze buněk o daných koncentracích s BBM.

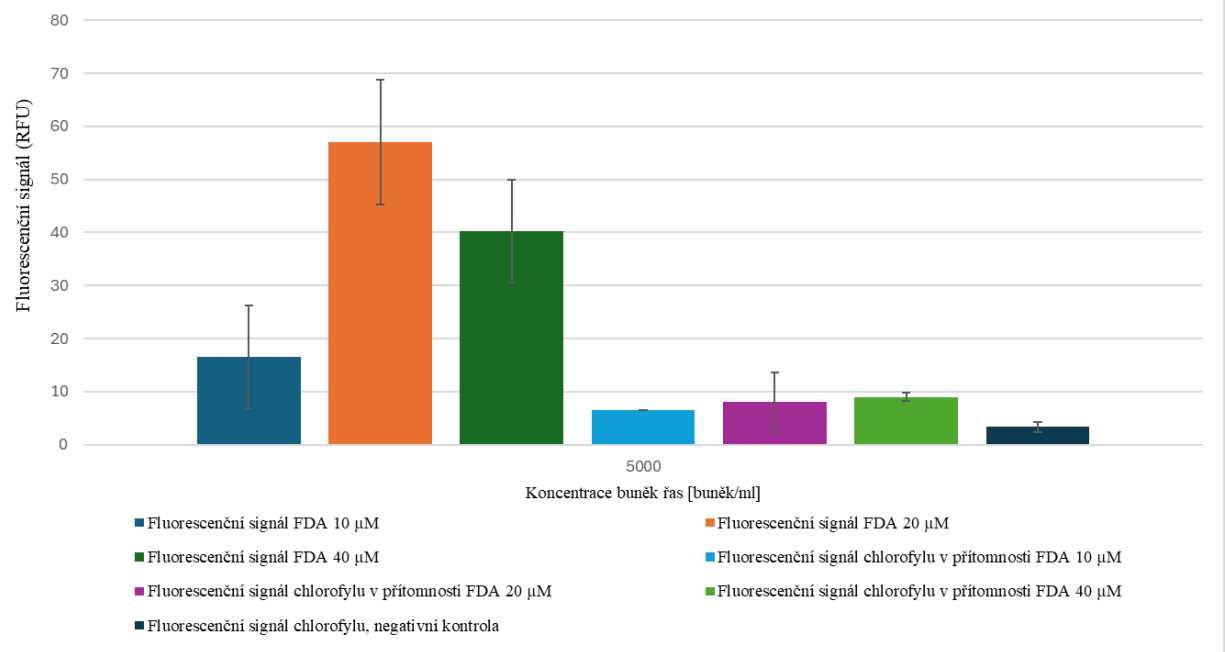
6.3.3 Fluorescein diacetát (FDA)

Z testování fluorescenčního signálu FDA bylo zjištěno, že při koncentracích 20 µM a 40 µM měl FDA dostatečně vysoký signál na to, aby bylo možné změřit počet živých buněk (Graf 8). K následujícímu testování vhodnosti použití FDA pro sledování toxicity PFAS byla vybrána koncentrace 20 µM. Z Grafu 8 lze také vypozorovat, že fluorescenční signál u koncentrace 50 000 buněk/ml byl dostatečně vysoký pro detekci živých buněk. To bylo důležité zjištění, jelikož při takové koncentraci se buňky řas pohybovaly během testování toxicity

PFAS. Dále bylo zjištěno, že oproti samotnému fluorescenčnímu signálu chlorofylu je fluorescenční signál FDA mnohem citlivější.

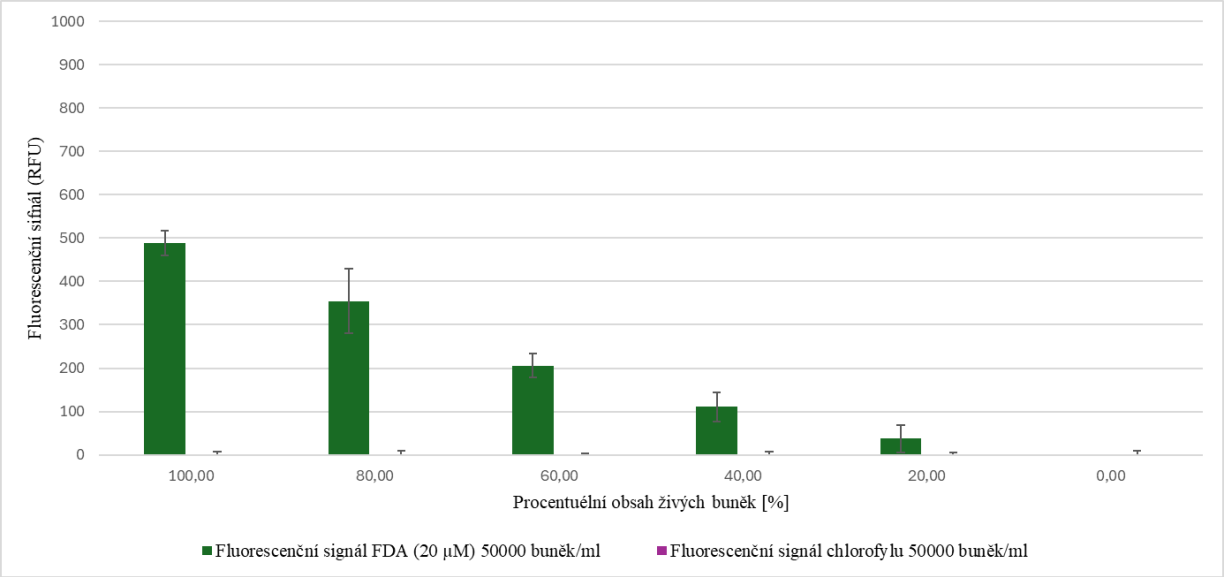


Graf 8: Výsledky testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) o koncentracích 10 µM, 20 µM a 40 µM při daných koncentracích buněk řas a porovnání s fluorescenčním signálem chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku ze 4 nezávislých paralel. Pro kontrolu, zda samotný FDA neovlivňuje signál chlorofylu, je změřen i fluorescenční signál chlorofylu v přítomnosti FDA. Negativní kontrola: suspenze buněk o daných koncentracích s BBM.



Graf 9: Výsledky testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) o koncentracích 10 µM, 20 µM a 40 µM při koncentraci 5 000 buněk/ml a porovnání s fluorescenčním signálem chlorofylu (excitace: 430 nm, emise: 670 nm). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku ze 4 nezávislých paralel. Pro kontrolu, zda samotný FDA neovlivňuje signál chlorofylu, je změřen i fluorescenční signál chlorofylu v přítomnosti FDA. Negativní kontrola: suspenze buněk o daných koncentracích s BBM. Přiblížení hodnot fluorescenčních signálů při koncentraci 5 000 buněk/ml z předchozího Grafu 8.

Z testování, zda FDA dostatečně odlišuje živé buňky od mrtvých na základě jeho fluorescenčního signálu, byl ze získaných hodnot vytvořen Graf 10, ze kterého lze vyvodit, že RFU je u 100 % živých buněk dostatečně vysoký, a tudíž odlišitelný od signálu mrtvých buněk, který je nulový. Fluorescenční signál chlorofylu je při těchto vlnových délkách emise a excitace také nulový, a tudíž bylo potvrzeno, že fluorescenční signál FDA není ovlivněn fluorescencí chlorofylu.



Graf 10: Testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) u živých a mrtvých buněk a jejich porovnání. Testování fluorescenčního signálu chlorofylu měřeného při stejných vlnových délkách jako FDA. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku ze 4 nezávislých paralel

Již existují studie o použití barviva FDA. V některých studiích byla testována celková viabilita řas (Wang et al.,2023a; Yewalkar et al., 2019) a v některých pouze sledovali esterázovou aktivitu (Machado, 2013). V této práci bylo použito k sledování aktivity esteráz FDA jako ukazatel viability. Test FDA ještě nikdy nebyl použit ke sledování toxicity PFAS u řas.

6.4 Výsledky z testování adsorpce PFAS na povrch jamek 96 jamkové mikrodestičky

Ze změřených hodnot bylo zjištěno, že GenX a PFOA se na stěnu destiček neadsorbují vůbec čili jejich koncentrace v jamce byla i po 3 dnech inkubace stejná. U roztoku PFOS došlo ke změnám. Při koncentraci 0,1 µg/ml se veškerá látka PFOS naadsorbovala na stěnu destičky. U koncentrace 1 µg/ml se adsorbovalo 22,9 % PFOS a u koncentrace 50 µg/ml zůstala koncentrace v jamce stejná.

Adsorpce PFHxA a PFHxS nebyla testována, protože jejich uhlíkový řetězec je jen o dva uhlíky kratší oproti PFOS a PFOA, a proto předpokládáme, že jejich sorpce je podobná.

6.5 Testování toxického vlivu PFAS pomocí testů růstové inhibice a FDA testu na *P. subcapitata*.

Test třícestné analýzy rozptylu (ANOVA) vyhodnotil, že faktory polutant (druh testované PFAS) a ošetření (koncentrace testované látky a solvent kontrola) mají statisticky významný vliv na biomasu řas (biomasa-chlorofyl) a viabilitu (viabilita-FDA).(hladina významnosti $\alpha = 1$ %). Rovněž byla identifikována statisticky významná interakce mezi faktory toxikologický test, polutant a ošetření. Tyto výsledky naznačují, že jednotlivé polutanty vykazují rozdílný průběh toxicity u studovaného organismu mezi sebou. Výsledky z mnohonásobného porovnání jsou popsány v následujících podkapitolách.

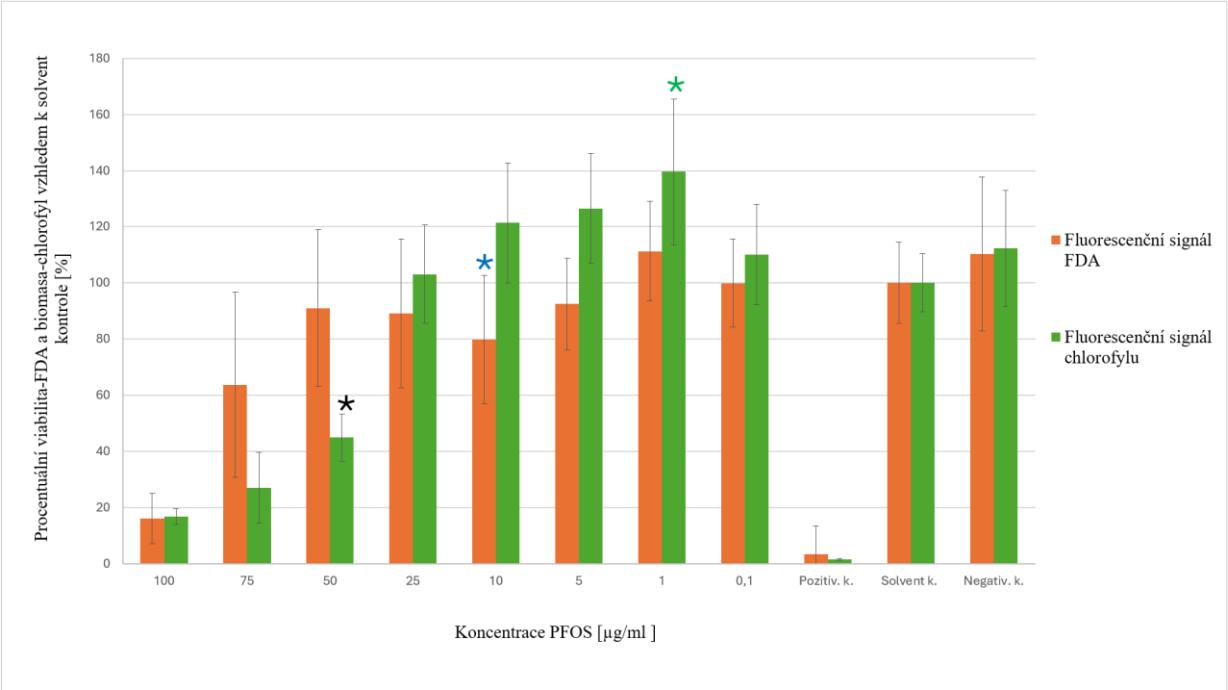
6.5.1 Testování toxicity PFOS

Vytvořené grafy vyobrazují výsledky z testu inhibice růstu a FDA testu, které byly použity u všech testovaných PFAS. V Grafu 11 je vyobrazen vliv PFOS na buňky řas a lze konstatovat, že PFOS má stimulační i toxický vliv na *P. subcapitata.* Fluorescenční signál FDA představuje procentuální viabilitu čili obsah živých buněk (viabilita-FDA), fluorescenční signál chlorofylu představuje procentuální biomasu řas (biomasa-chlorofyl) po 72 h expozici PFOS v porovnání se solvent kontrolou.

Dle testu mnohonásobného porovnávání (Dunnettův test) je vliv PFOS na řasu statisticky signifikantní vzhledem k solvent kontrole. Nejnižší koncentrace, u které je již detekován účinek (LOEC) během testování růstu, je 1 µg/ml (Tabulka-8). Při této koncentraci dochází vzhledem k solvent kontrole ke stimulaci růstu o 39,5 %. LOEC, u kterého dochází k inhibici růstu je 50 µg/ml. Čím vyšší je pak koncentrace PFOS, tím vyšší je inhibice růstu.
U FDA testu je detekován LOEC od 10 µg/ml (Tabulka-9). Oba tyto testy potvrdily toxický vliv PFOS na *P. subcapitata*.

V rámci sledování toxicity byla také vyhodnocena EC_{50}, kdy daná koncentrace má toxický vliv na 50 % testovaných jedinců. U testu inhibice růstu (biomasa-chlorofyl) byla EC_{50}= 5,7 µg/ml a u FDA testu (viabilita-FDA) EC_{50}= 4,6 µg/ml. Pomocí třícestné analýzy rozptylu byl také zjištěn rozdíl výsledků mezi oběma testy. U koncentrací 1-10 µg/ml byl ale potvrzen signifikantní rozdíl výsledků mezi použitými testy (Tabulka-10). Hodnoty fluorescenčního signálu chlorofylu, které udávají počet buněk ukazují, že oproti solvent kontrole došlo k nárůstu počtu buněk čili k stimulaci růstu. Výsledky z FDA testu ale mají opačný trend. Jako vysvětlení se nabízí, že PFOS narušuje funkci esteráz, které jsou esenciální k hydrolýze FDA, aby z něho vznikl fluorescenční fluorescein. Pokud jsou tedy esterázy narušeny, nelze pomocí FDA spolehlivě rozeznat živé buňky. Proto FDA test nevykazuje takové výsledky, které

by odpovídaly danému procentuálnímu obsahu živých buněk, ale odpovídá narušení metabolické aktivity.



Graf 11: Vliv PFOS na biomasu a viabilitu P. subcapitata. Fluorescenční signál FDA (oranžová barva) (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) představuje procentuální viabilitu FDA a fluorescenční signál chlorofylu (zelená barva) představuje procentuální obsah biomasy (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).) vztažené k solvent kontrole. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 18 nezávislých paralel. Solvent kontrola: suspenze buněk s 0,1 % MetOH. pozitivní kontrola: dichlorfenol (10 µm/l) v suspenzi buněk, negativní kontrola: suspenze buněk s BBM médiem. Hvězdičky označují LOEC pozitivního a negativního efektu: viabilita-FDA (neg. efekt- modrá, pozit. efekt-červená), biomasa-chlorofyl (neg. efekt- černá, pozit. efekt.-zelená)

Tabulka 8: Test inhibice růstu. Hodnoty LOEC (nejnižší koncentrace, při které je pozorován statisticky významný účinek) získané z Dunnettova testu

Dunnett test- inhibice/stimulace růstu- LOEC				
Polutant	Typ efektu	Expozice	Procentuální rozdíl vůči solvent kontrole [%]	P-hodnota
PFOS	Pozitivní efekt	1 µg/ml	+ 39,5	p<0,001
	Negativní efekt	50 µg/ml	-55,0	p<0,001
PFOA	Pozitivní efekt	5 µg/ml	+ 27,9	p<0,001
	Negativní efekt		0	
GenX	Pozitivní efekt	5 µg/ml	+ 23,7	0,001
	Negativní efekt		0	
PFHxA	Pozitivní efekt	1 µg/ml	+ 22,1	0,003
	Negativní efekt		0	
PFHxS	Pozitivní efekt	5 µg/ml	+ 23,6	0,001
	Negativní efekt		0	

Tabulka 9: FDA test. Hodnoty LOEC (nejnižší koncentrace, při které je pozorován statisticky významný účinek) získané z Dunnettova testu

Dunnett test- FDA test- LOEC				
Polutant	Typ efektu	Expozice	Procentuální rozdíl vůči solvent kontrole [%]	P-hodnota
PFOS	Pozitivní efekt		0	p<0,001
	Negativní efekt	10 µg/ml	-20,2	0,004
PFOA	Pozitivní efekt	0,1 µg/ml	+ 16,1	0,041
	Negativní efekt	25 µg/ml	-22,8	0,001
GenX	Pozitivní efekt		0	0,001
	Negativní efekt	75 µg/ml	-22,1	0,001
PFHxA	Pozitivní efekt	1 µg/ml	+ 25,5	p<0,001
	Negativní efekt	75 µg/ml	-21,44	0,002
PFHxS	Pozitivní efekt	1 µg/ml	+ 19,0	0,009
	Negativní efekt		0	

Tabulka 10: Koncentrace jednotlivých látek, při nichž byl zaznamenán rozdíl odpovědí mezi dvěma studovanými testy

Polutant	Vyšší odezva u FDA testu	Vyšší odezva u testu inhibice růstu
PFOS	50, 75 µg/ml	1 - 10 µg/ml
PFOA		10 - 100 µg/ml
GenX		10 - 100 µg/ml
PFHxA		10 - 100 µg/ml
PFHxS		10 - 100 µg/ml

Například ve studii od Wang a jeho kol. bylo tvrzeno, že barvivo FDA lze použít pro detekci živých buněk. Na základě předchozích výsledků v této diplomové práci je toto tvrzení rozporováno (Wang et al., 2023b).

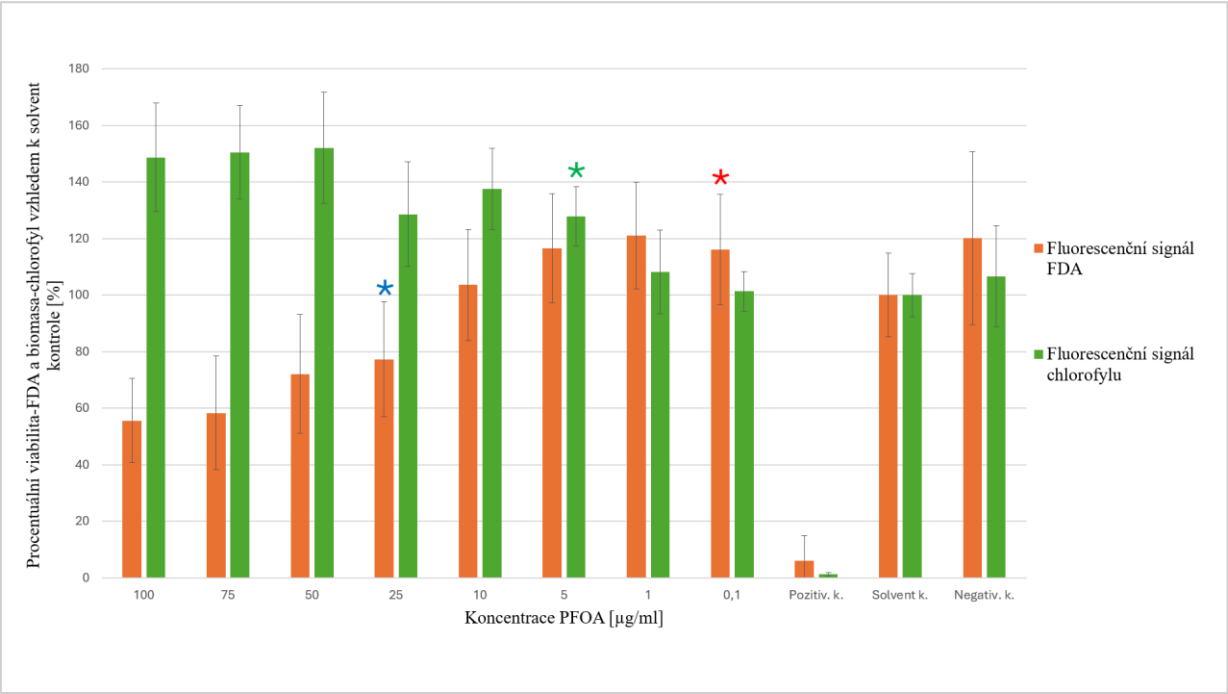
V nedávné studii od Pietropoli a kol. byly srovnávány toxické účinky PFAS u *Daphnia magna* a *P. subcapitata*. U *D. magma* byly sledovány toxické účinky pomocí testu OECD 202 (OECD, 2004) a u *P. subcapitata* byl použit test ke sledování toxicity OCSPP 850.4500 Algal toxicity (EPA, 2012). V tomto výzkumu byla zjištěna významně vyšší toxicita PFOS u řasy v porovnání s *D. magna*. U řasy byla změřena koncentrace $EC_{50,}$ která činila 29,11 µg/ml, což je vyšší hodnota oproti našemu EC_{50}. U *D. magna* byla EC_{50}=67,82 µg/ml (Pietropoli et al., 2024). V další studii, kde byly pozorovány toxické účinky PFOS na růstovou inhibici u *P. subcapitata* a *D. magna* byly hodnoty $EC_{50\ P.\ subcapitata}$ = *48*,2 µg/ml a $EC_{50\ D.\ magna}$ = 130 µg/ml (Boudreau et al., 2003). Ve studii od Rosal, kde byl také použit test růstové inhibice (OECD, 2006), byl pozorován toxický účinek PFOS na *P. subcapitata* a EC_{50} byla 48,2 µg/ml (Rosal et al., 2010). Mojiri a kol. zkoumal toxické účinky PFOS pomocí stejného testu jako v předchozích studiích na *Chlorella vulgaris* a *Scenedesmus obliquus*. Již při koncentracích 1-10,0 µg/ml byla u řas snížena viabilita (Mojiri et al., 2023).

Získané výsledky toxicity PFOS v této diplomové práci, tak výsledky z ostatních citovaných studií, demonstrují vysokou toxicitu PFOS pro jednobuněčné řasy. Jelikož řasy zaujímají klíčovou roli v trofických řetězcích, mohlo by jejich vyhynutí způsobit poškození sladkovodních ekosystémů (Pietropoli et al., 2024). Proto je relevantní, aby se koncentrace PFOS v těchto ekosystémech nezvyšovala. Momentálně se koncentrace PFOS v povrchových vodách pohybují v ng/l (ppt), což jsou oproti testovaným koncentracím velmi nízké. Samozřejmě se ale koncentrace liší vzhledem k různým oblastem. Ve studii, kde sledovali koncentraci PFOS v povrchových a podzemních vodách v Chorvatsku, detekovali PFOS při koncentracích 4,57 ± 0,21 ng/ml (Radetić et al., 2024). Studie od Zhang a kol. se zabývala monitorováním PFAS v čínských povrchových vodách, kde průměrná koncentrace oproti chorvatským vodám byla o dost vyšší. Nejvíce znečištěnou řekou byla Xiaoqing, kde hodnoty PFAS dosahovaly až 25, 4 ng/ml (Zhang et al., 2023).

6.5.2 Testování toxicity PFOA

Dle statistického zhodnocení je toxický vliv PFOA v porovnání se solvent kontrolou na řasu signifikantní. U testu inhibice růstu byla pomocí Dunnettova testu zjištěna LOEC = 5 µg/ml (Tabulka-8) s pozitivním efektem. V Grafu 12 lze pozorovat, že u koncentrací > 5 µg/ml dochází k stimulaci růstu řas. U koncentrací 50 µg/ml, 75 µg/ml a 100 µg/ml je dokonce procentuální obsah biomasy oproti solvent kontrole o cca 50 % vyšší, což značí nárůst počtu buněk. FDA test naopak vykazoval u vyšších koncentrací PFOA inhibiční účinky (LOEC= 25 µg/ml) (Tabulka-9).

Rozdílné výsledky mezi testy, byly u sledování toxicity PFOA ještě značnější než při testování PFOS. Tyto rozdíly ve výsledcích jednotlivých testů byly statisticky potvrzeny prostřednictvím analýzy rozptylu (ANOVA). U koncentrace 50 µg/ml byl rozdíl mezi hodnotami biomasa-chlorofyl a viabilita-FDA 80 % a u koncentrací 75 µg/ml a 100 µg/ml byl až 90 % (Tabulka-10). Tudíž na základě tohoto testování je znovu potvrzeno, že FDA test nevykazuje obsah živých buněk, ale u kolika % buněk řas došlo ke snížení esterázové aktivity.



Graf 12: Vliv PFOA na biomasu a viabilitu P. subcapitata. Fluorescenční signál FDA (oranžová barva) (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) představuje procentuální viabilitu FDA a fluorescenční signál chlorofylu (zelená barva) představuje procentuální obsah biomasy (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).) vztažené k solvent kontrole. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 18 nezávislých paralel. Solvent kontrola: suspenze buněk s 0,1 % MetOH, pozitivní kontrola: dichlorfenol (10 µm/l) v suspenzi buněk, negativní kontrola: suspenze buněk s BBM médiem. Hvězdičky označují LOEC pozitivního a negativního efektu: viabilita-FDA (neg. efekt- modrá, pozit. efekt-červená), biomasa-chlorofyl (neg. efekt- černá, pozit. efekt.-zelená)

Esterázy hrají významnou roli v metabolických procesech. Podílejí se zejména na degradaci proteinů a metabolismu lipidů, kde hydrolyzují estery karboxylových kyselin s dlouhým a krátkým řetězcem (Hermetter et al., 2001; Lockridge et al., 2018).

Ve studii od Machado a Soares, kde testovali toxický účinek mědi na *P. subcapitata,* nebylo barvivo FDA použito k rozeznání živých buněk, ale k zjištění esterázové aktivity řasy. Při vyšších koncentracích mědi se esterázová aktivita u řasy snížila, a tedy se i snížil fluorescenční signál FDA (Machado, 2013). Přitom závěry ve studiích od Yewalkar a kol. a Wang a kol. říkají, že lze pomocí barviva FDA rozeznat živé buňky (Wang et al., 2023b; Yewalkar et al., 2019) Pokud se ale snižuje esterázová aktivita, nemůže FDA správně rozeznat živé buňky. Proto jak studie od Machado a Soares, tak tato diplomová práce dokazuje, že FDA test lze použít pouze k testování metabolické aktivity.

U vyšších koncentrací PFOA pravděpodobně dochází u buněk řas ke snížení esterázové aktivity, ale zároveň lze dle fluorescenčního signálu chlorofylu pozorovat, že buňky rostou.

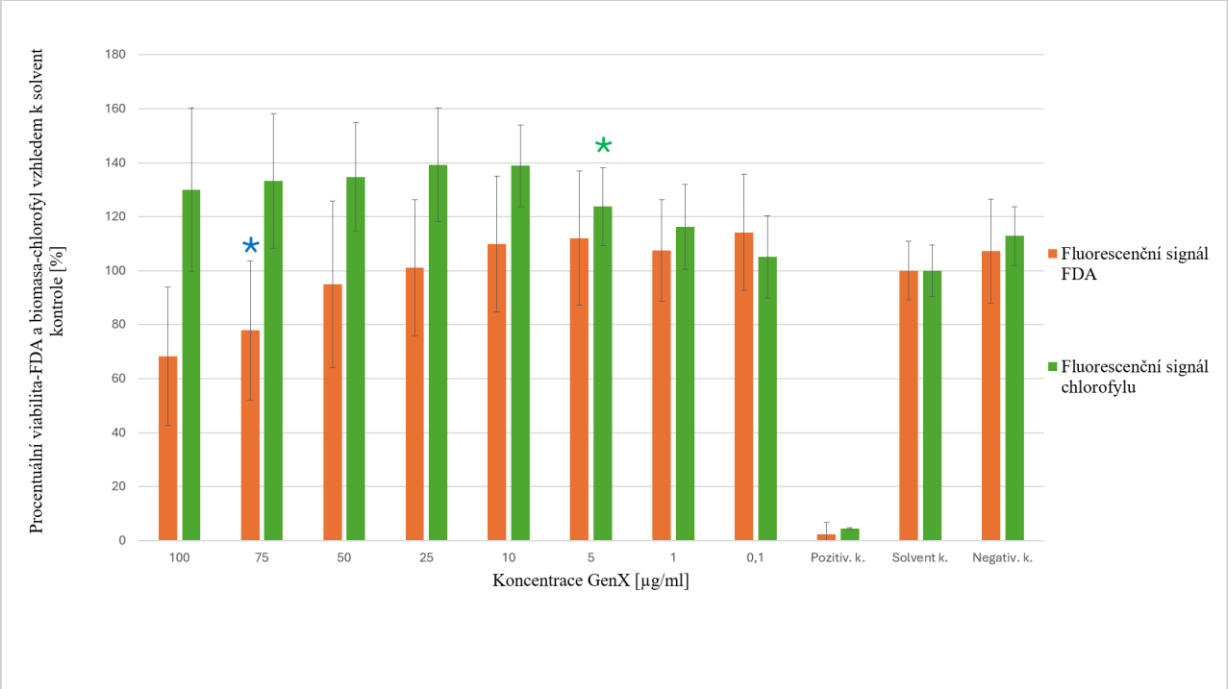
Odpovědí, proč buňky rostou i přes toxický vliv PFOA, může být takzvaná horméza. Jedná se biologický jev, kdy některé toxické látky mohou při nízkých koncentracích mít pozitivní účinky na organismy. Například se může jednat o příznivé působení stresu vznikající odezvou na toxické látky (Mattson, 2008).

6.5.3 Testování toxicity GenX (HFPO-DA)

Pomocí testu ANOVA a Dunnettova testu byl zjištěn statisticky významný toxický vliv GenX na *P. subcapitata*. vzhledem k solvent kontrole. Nejnižší koncentrace GenX, při které byl již detekován pozitivní efekt u testování inhibice růstu, byla 5 µg/ml (Tabulka-8) a u FDA testu byl signifikantní negativní efekt LOEC= 75 µg/ml (Tabulka-9).

Fluorescenční signál chlorofylu ukazuje zvýšený procentuální obsah biomasy, naopak fluorescenční signál FDA ukazuje opačný efekt. Tudíž buňky jsou stále živé, ale i zde můžeme předpokládat, že je u nich snížena esterázová aktivita, zejména u vyšších koncentrací 50 µg/ml, 75 µg/ml a 100 µg/ml.

Dle FDA testu lze předpokládat, že se u koncentrace 100 µg/ml snížila esterázová aktivita až o 32 %. Naproti tomu u testu inhibice růstu se obsah biomasy řas zvýšil o 30 %. Analýza rozptylu prokázala, že rozdíly ve výsledcích testů jsou statisticky významné při koncentracích 10 µg/ml a vyšších (Tabulka-10). Při vyšších koncentrací GenX docházelo k nárůstu tohoto rozdílu.



Graf 13: Vliv GenX na biomasu a viabilitu P. subcapitata. Fluorescenční signál FDA (oranžová barva) (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) představuje procentuální viabilitu FDA a fluorescenční signál chlorofylu (zelená barva) představuje procentuální obsah biomasy (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).) vztažené k solvent kontrole. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 18 nezávislých paralel. Solvent kontrola: suspenze buněk s 0,1 % MetOH, pozitivní kontrola: dichlorfenol (10 µm/l) v suspenzi buněk, negativní kontrola: suspenze buněk s BBM médiem. Hvězdičky označují LOEC pozitivního a negativního efektu: viabilita-FDA (neg. efekt- modrá, pozit. efekt-červená), biomasa-chlorofyl (neg. efekt- černá, pozit. efekt.-zelená)

Látka Gen-X byla vyvinuta společností DuPont v roce 2009, aby nahradila na trhu látku PFOA, u které byla zakázána distribuce (Heidari et al., 2021). Zda je ale GenX vůči životnímu prostředí šetrnější oproti PFOA mnoho studií vyvrací. Například v jednom výzkumu byly

testovány toxické účinky PFOA a GenX na *C. pyrenoidosa*. U řasy byla měřena inhibice růstu a obsah fotosyntetických pigmentů při expozici s látkami o koncentracích 100 ng/ml a 100 µg/ml. Po 12 dnech expozice PFOA (100 µg/ml) a GenX (100 µg/ml) byla buněčná hustota snížena o 15 % a 14,4 %. PFOA a GenX také redukovaly obsah fotosyntetických pigmentů Chla a Chlb.

U obou látek byl tedy prokázaný toxický vliv na *C. pyrenoidosa* (Y. Li et al., 2021c). Ve studii od Pietropoli a kol. byl také testovaný toxický vliv GenX na *P. subcapitata*. pomocí Akutního testu toxicity- OCSPP 850.4500, kdy hodnota EC_{50} GenX činila 996,2 µg/ml (Pietropoli et al., 2024).

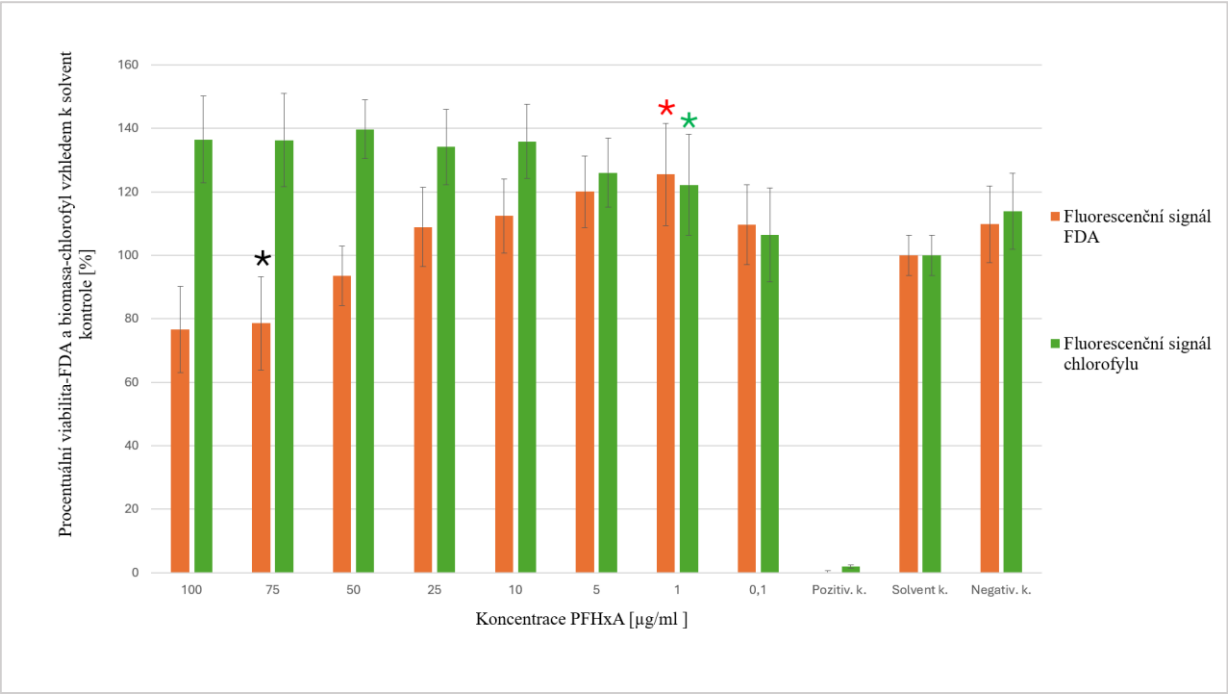
GenX je na seznamu SVHC, ale zatím pro něho neplatí žádné evropské restrikce i přesto, že jeho toxický vliv je obdobný jako u PFAS, které již zakázané jsou (ECHA, 2024).

6.5.4 Testování toxicity PFHxA

Předchozí studie, které testovaly toxicitu PFAS, se zaměřovaly především na sloučeniny s dlouhým uhlíkovým řetězcem (PFOS, PFOA), přičemž sloučeniny s krátkým uhlíkovým řetězcem, jako například PFHxA, se v životním prostředí také kumulují a údajů o jejich toxicitě je zatím málo (Reynaldo Patiño et al., 2023). Proto byly v této diplomové práci testovány i PFHxA a PFHxS.

V Grafu 14 lze pozorovat, že PFHxA stimulovala u řasy růst. Výsledky z testu inhibice růstu byly u všech koncentrací kromě 0,1 µg/ml statisticky významné v porovnání se solvent kontrolou a ukázaly stimulační růst buněk. Nejnižší hodnota, u které byl již detekován pozitivní účinek, byla tedy 1 µg/ml. U koncentrace 50 µg/ml se zvýšil počet buněk o 46 % v porovnání se solvent kontrolou.

U FDA testu byl statisticky významný rozdíl hodnot v porovnání se solvent kontrolou u koncentrací 1, 5, 75 a 100 µg/ml, tudíž se snížila esterázová aktivita. V Grafu 14 si můžeme všimnout, že u koncentrací 0,1; 10, 25 a 50 µg/ml je fluorescenční signál FDA blízko k signálu solvent kontroly. V těchto koncentracích také dochází již k zmiňovanému stimulačnímu růstu. Dle těchto výsledků jsou tyto koncentrace PFHxA pro *P. subcapitata* netoxické. Toto pozorování bylo následně potvrzeno analýzou rozptylu s použitím Bonferroniho korekce, která prokázala, že rozdíly vzhledem k solvent kontrole nejsou statisticky významné ($\alpha = 5$ %).



Graf 14: Vliv PFHxA na biomasu a viabilitu P. subcapitata. Fluorescenční signál FDA (oranžová barva) (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) představuje procentuální viabilitu FDA a fluorescenční signál chlorofylu (zelená barva) představuje procentuální obsah biomasy (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).) vztažené k solvent kontrole. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 18 nezávislých paralel. Solvent kontrola: suspenze buněk s 0,1 % MetOH, pozitivní kontrola: dichlorfenol (10 µm/l) v suspenzi buněk, negativní kontrola: suspenze buněk s BBM médiem. Hvězdičky označují LOEC pozitivního a negativního efektu: viabilita-FDA (neg. efekt- modrá, pozit. efekt-červená), biomasa-chlorofyl (neg. efekt- černá, pozit. efekt.-zelená)

Neinhibiční účinky PFHxA na růst řas potvrzuje také studie od Liu, kde zkoumali toxické účinky PFHxA na *S. obliquus.* Také ale zjistili účinek na buněčnou membránu, u které se zvýšila permeabilita, což může celkově ohrozit funkci a integritu buňky (Liu et al., 2008).

Toxické účinky PFHxA byly rovněž zaznamenány ve studii od Latala a kol., kde sledovali toxicitu PFHxA dle pokynů Evropského výboru pro normalizaci u třech druhů řas *C. vulgaris*, *Skeletonema marinoi* a *Geitlerinema amphibium*. Při sledování růstové inhibice měla PFHxA toxický vliv na všechny druhy řas. Nejvíce citlivá vůči PFHxA byla modrozelená řasa *G. amphibium* (Latała et al., 2009). V již zmíněné studii od Pietropoli a kol. byla také sledována toxicita PFHxA u *P. subcapitata,* kde bylo EC_{50}= 883 µg/ml, tudíž PFHxA měla toxický vliv na řasu až při vysokých koncentracích.

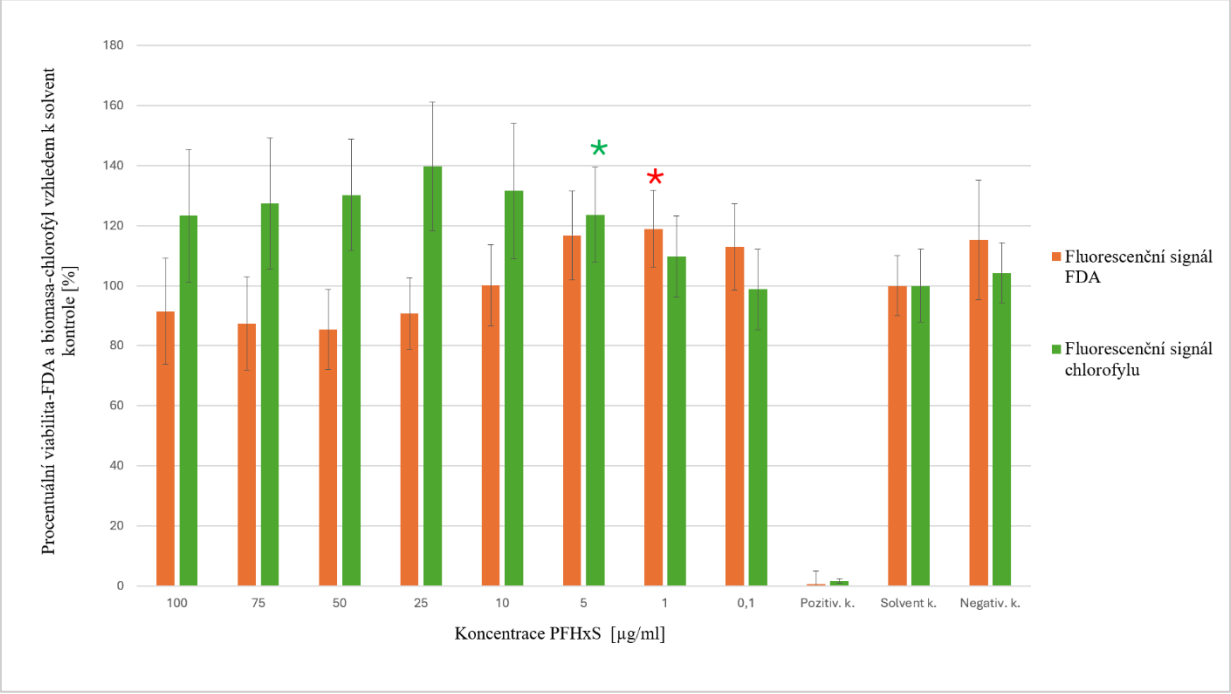
Produkce PFHxA je stále povolena, ale dne 19.9. 2024 bylo schváleno nařízení od Evropské komise týkající se její regulace. Od 10.10. 2026 se PFHxA nebude moct uvádět na trh a používat v koncentracích ≥ 25 ng/ml v textilním, papírenském, obuvnickém a kosmetickém průmyslu a ve směsích pro širokou veřejnost. Od 10.4. 2026 bude zakázané použití PFHxA o koncentraci ≥ 25 ng/ml v hasících pěnách (Nařízení komise (EU), 2024).

6.5.5 Testování toxicity PFHxS

Pomocí statistického zhodnocení třícestnou analýzou rozptylu a mnohonásobným porovnáním byl zjištěn toxický signifikantní vliv rovněž u látky PFHxS na *P. subcapitata*. Nejnižší koncentrace, u které byl zaznamenaný pozitivní efekt na růst řasy, je 5 µg/ml (Tabulka-8). V případě sledování vlivu PFHxS pomocí FDA testu, byl detekován LOEC u koncentrace 1 µg/ml také s pozitivním efektem (Tabulka-9).

V porovnání se solvent kontrolou jsou fluorescenční signály chlorofylu u řas v kontaktu s PFHxS vyšší. Například při koncentraci 25 µg/ml je signál chlorofylu až o 39,7 % vyšší. Naopak hodnoty získané FDA testem jsou velmi blízko ke 100 % čili k solvent kontrole. To také potvrzuje Dunnettův test, kdy je v FDA testu signifikantní hodnota pouze u koncentrace 1 µg/ml s mírným nárůstem viability (viabilita-FDA) přibližně o 20 %. V případě i této látky byl také zjištěn rozdíl mezi signály FDA a chlorofylu (Tabulka). Největší diference výsledků mezi testy je při koncentraci 25 µg/ml o 50 %, což lze i dobře vidět v Grafu 15.

Jelikož PFHxS má nejmenší efekt na aktivitu intracelulárních esteráz lze konstatovat, že PFHxS je oproti ostatním testovaným látkám nejméně toxický.



Graf 15: Vliv PFHxS na biomasu a viabilitu P. subcapitata. Fluorescenční signál FDA (oranžová barva) (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) představuje procentuální viabilitu FDA a fluorescenční signál chlorofylu (zelená barva) představuje procentuální obsah biomasy (excitace: 430 nm, emise: 670 nm).) vztažené k solvent kontrole. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 18 nezávislých paralel. Solvent kontrola: suspenze buněk s 0,1 % MetOH, pozitivní kontrola: dichlorfenol (10 µm/l) v suspenzi buněk, negativní kontrola: suspenze buněk s BBM médiem. Hvězdičky označují LOEC pozitivního a negativního efektu: viabilita-FDA (neg. efekt- modrá, pozit. efekt-červená), biomasa-chlorofyl (neg. efekt- černá, pozit. efekt.-zelená)

Studie, které se zabývaly PFHxS, sledovaly toxické účinky především na vodních organismech a lidském organismu, avšak na řasách jen velmi málo.

Jedna ale z mála studií, která se také zabývá toxicitou PFHxS vůči řasám, je disertační práce od Ihenyen. Její studie si kladla za cíl porovnat vliv PFOS a PFHxS na dvou druzích řas *Chlorella sorokiniana* a *Prymnesium parvum*. U *C. sorokiniana* nebyl diagnostikován významný vliv PFHxS na její růst, ale byl snížen obsah chlorofylu při koncentraci 100 µg/ml a sníženém množství živin. Expozice PFHxS také vyvolala významné zvýšení hladiny ROS, což vede k oxidativnímu stresu. U řasy *P. parvum.* byla potvrzena vyšší toxicita PFOS než PFHxS (Ihenyen, 2023).

PFHxS byla alternativou PFOS, protože má kratší uhlíkový řetězec a na základě tohoto faktu byla PFHxS považována za méně nebezpečnou vůči životnímu prostředí (Ihenyen, 2023).

Na základě výzkumů, které dosvědčily toxicitu PFHxS, byla nakonec také přidána na seznam POPs Stockholmské úmluvy, a tedy došlo k její regulaci (S.-10/13 UNEP, 2023).

7 Závěr

V této diplomové práci byla sledována toxicita PFOS, PFOA, GenX, PFHxA a PFHxS vůči řase *P. subcapitata* pomocí dvou testů, a to pomocí standardizovaného testu inhibice růstu a testu využívající FDA. Celková metodika testování byla úspěšně optimalizována a miniaturizována. Testování toxicity probíhalo v 96 jamkové destičce, což bylo pozitivní nejen pro nižší spotřebu všech použitých chemikálií, ale také pro rychlé a efektivní měření několika paralel najednou. U každé sledované látky bylo změřeno 18 paralel od každé testované koncentrace.

Test inhibice růstu se používá k testování toxických látek na řasách dle norem (OECD, 2006), ale testování viability pomocí barviva FDA není v normách zakotveno. Test FDA ještě nikdy nebyl použit k testování toxických účinků PFAS na řasách, a proto tato práce přináší z tohoto hlediska nové poznatky.

Během sledování toxicity PFAS bylo zjištěno, že FDA test nevypovídal o viabilitě, jelikož PFAS narušily funkci esteráz u *P. subcapitata* , a ty jsou pro detekci barviva FDA nepostradatelné. To znamená, že ale lze pomocí tohoto testu sledovat esterázovou aktivitu, která byla látkami PFAS ovlivněna.

Ze získaných výsledků byly prokázány největší toxické účinky PFOS na *P. subcapitata.* Nejmenší toxický vliv vykazovaly PFHxA a PFHxS.

Na základě těchto poznatků je možné na závěr konstatovat, že dle testu inhibice růstu měla pouze PFOS inhibiční účinky. Ostatní sledované látky vykazovaly u *P. subcapitata* stimulaci růstu. FDA test není stejně použitelný pro testování toxicity na *P. subcapitata* jako standardizovaný test inhibice růstu, nicméně tímto testem byly zaznamenány subletální toxické účinky. Tímto zjištěním se otevírá další téma sledování účinků PFAS na intracelulární esterázy.

8 Použitá literatura

Abdollahi M., Peyster d. A., Gad C. S., Greim H., Harper S., Moser C. V., Ray S., Tarazona J., & Wiegand J. T. (2014). Encyclopedia of toxikology, *Wexler Philip*, Ed.; 3rd ed. ISBN: 978-0-12-386455-0

Adu, O., Ma, X., & Sharma, V. K. (2023). Bioavailability, phytotoxicity and plant uptake of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A review. *Journal of Hazardous Materials*, *447*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130805

Agrawal, S. C., & Sarma, U. (1982). Effects of nutrients present in bold's basal medium on the green alga stigeoclonium pascheri. In *Folia Microbiol*, Vol. 27.

Al Amin, M., Sobhani, Z., Liu, Y., Dharmaraja, R., Chadalavada, S., Naidu, R., Chalker, J. M., & Fang, C. (2020). Recent advances in the analysis of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review. *Environmental Technology and Innovation*, *19*. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100879

Albert, S., & Bloem, E. (2023). Ecotoxicological methods to evaluate the toxicity of bio-based fertilizer application to agricultural soils – A review. *Science of the Total Environment*, *879*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163076

Annex I.(EU). (2020). Commission delegated regulation (EU) 2020/784 of 8 April 2020 amending Annex I to Regulation (EU) 2019/1021 of the European Parliament and of the Council as regards the listing of perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related compounds (Text with EEA relevance). *Official Journal of European Union*, 1–5.

Boudreau, T. M., Sibley, P. K., Mabury, S. A., Muir, D. G. C., & Solomon, K. R. (2003). Laboratory evaluation of the toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Selenastrum capricornutum, Chlorella vulgaris, Lemna gibba, Daphnia magna, and Daphnia pulicaria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *44*(3), 307–313. https://doi.org/10.1007/s00244-002-2102-6

Brabcova, K. , Fernandez, M. , Kleimark, J. , Schneider, J. , Wietor, J.-L. , Cingotti, N. , & De Boer, A. ,. (2022). Restrictions of PFHxA and PFAS in firefighting foams. *European Chemicals Agency*, *1 (3)*, 1–3. https://echa.europa.eu/documents/10162/28801697/pfas_flourine-free_alternatives_fire_fighting_en.pdf/d5b24e2a-d027-0168-cdd8-f723c675fa98

Brazma, A., & Vilo, J. (2000). Gene expression data analysis. *FEBS Letters*, *480*, 17–24.

Brookes, J. D., Geary, S. M., Ganf, G. G., & Burch, M. D. (2000). Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, *51*(8), 817–823. https://doi.org/10.1071/MF00048

Brusseau, M. L., Anderson, R. H., & Guo, B. (2020). PFAS concentrations in soils: Background levels versus contaminated sites. *Science of the Total Environment*, *740*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140017

Casal, P., Zhang, Y., Martin, J. W., Pizarro, M., Jiménez, B., & Dachs, J. (2017). Role of Snow Deposition of Perfluoroalkylated Substances at Coastal Livingston Island (Maritime Antarctica). *Environmental Science and Technology*, *51*(15), 8460–8470. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02521

Chapman, J. C. (1995). The role of ecotoxicity testing in assessing water quality. *Australian Journal of Ecology*, *20*, 20–27.

Chapman, P. M. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the "'eco'" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, *44*, 7–15. www.elsevier.com/locate/marpolbul

Chinedu, E., Arome, D., Ameh, F. S., & Jacob, D. L. (2015). An approach to acute, subacute, subchronic, and chronic toxicity assessment in animal models. *Toxicology International*, *22*(2), 83–87. https://doi.org/10.22506/ti/2015/v22/i2/137667

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, *142*(3), 185–194. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7

Collins, C. D., & Finnegan, E. (2010). Modeling the plant uptake of organic chemicals, including the soil - air - plant pathway. *Environmental Science and Technology*, *44*(3), 998–1003. https://doi.org/10.1021/es901941z

Conley, J. M., Lambright, C. S., Evans, N., Strynar, M. J., McCord, J., McIntyre, B. S., Travlos, G. S., Cardon, M. C., Medlock-Kakaley, E., Hartig, P. C., Wilson, V. S., & Gray, L. E. (2019). Adverse Maternal, Fetal, and Postnatal Effects of Hexafluoropropylene Oxide Dimer Acid (GenX) from Oral Gestational Exposure in Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives*, *127*(3), 1–13. https://doi.org/10.1289/EHP4372

de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, *338*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535

Debenest, T., Gagné, F., Petit, A. N., Kohli, M., Eullafroy, P., & Blaise, C. (2010). Monitoring of a flame retardant (tetrabromobisphenol A) toxicity on different microalgae assessed by flow cytometry. *Journal of Environmental Monitoring*, *12*(10), 1918–1923. https://doi.org/10.1039/c0em00105h

Deng, Y. xia, Cao, M., Shi, D. xia, Yin, Z. qiong, Jia, R. yong, Xu, J., Wang, C., Lv, C., Liang, X. xia, He, C. liang, Yang, Z. rong, & Zhao, J. (2013). Toxicological evaluation of neem (Azadirachta indica) oil: Acute and subacute toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *35*(2), 240–246. https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.12.015

Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, *50*(4), 227–230. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001

Dvorakova, D., Jurikova, M., Svobodova, V., Parizek, O., Kozisek, F., Kotal, F., Jeligova, H., Mayerova, L., & Pulkrabova, J. (2023). Complex monitoring of perfluoroalkyl substances (PFAS) from tap drinking water in the Czech Republic. *Water Research*, *247*. https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120764

Ebinezer, L. B., Battisti, I., Sharma, N., Ravazzolo, L., Ravi, L., Trentin, A. R., Barion, G., Panozzo, A., Dall'Acqua, S., Vamerali, T., Quaggiotti, S., Arrigoni, G., & Masi, A. (2022). Perfluorinated alkyl substances affect the growth, physiology and root proteome of hydroponically grown maize plants. *Journal of Hazardous Materials*, *438*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129512

ECHA. (2019). *MSC unanimously agrees that HFPO-DA is a substance of very high concern*. European Chemicals Agency Publications. https://echa.europa.eu/cs/registry-of-restriction-intentions/-/dislist/details/0b0236e18244cd73

ECHA. (2022). *Annex XV restriction report proposal for a restriction substance name (s): Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in firefighting foams*. https://www.actu-environnement.com/media/pdf/news-39204-rest-pfas-fff-axvreport-en.pdf

ECHA. (2023). Annex XV restriction report proposal for a restriction substance name (s): Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *European Chemicals Agency*, *2*. https://echa.europa.eu/documents/10162/1c480180-ece9-1bdd-1eb8-0f3f8e7c0c49

Environment Canda EPS 1/RM/25. (2007). Biological test method: Growth inhibition Test using a freshwater alga. *Environmental Protection Series*, *2*, 1–78.

Environmental protection series. (2007). *Biological test method: Growth inhibition test using a freshwater alga, 1/RM/25*.

EPA. (1991). Toxic Substances Control Act/ Section 8(e) Reporting Guide. *Office of Toxic Substances of Pesticides and Toxic Substances*, 1–122. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/1991guidance.pdf

EPA. (1994). Using toxicity tests in ecological risk assessment. *ECO Update*, *2 (1)*, 1–12.

EPA. (2008). Union of concerned scientists report part title: History and organization of the EPA report title: Interference at the EPA. *Interference at the EPA*, 1–10.

EPA. (2012). *Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4500: Algal Toxicity*. http://www.epa.gov/ocspp

Nařízení komise (EU). (2021). NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2021/1297 ze dne 4. srpna 2021, kterým se mění příloha XVII nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, pokud jde o perfluorkarboxylové kyseliny obsahující 9 až 14 atomů uhlíku v řetězci (C9-C14 PFCA), jejich soli a látky příbuzné C9-C14 PFCA (Text s významem pro EHP). *Ústřední Věstník Evropské Unie*, 1.

Evropský parlament a Rada Evropské unie. (2020). SMĚRNICE evropského parlamentu a rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepracované znění) (Text s významem pro EHP). *Ústřední věstník Evropské unie*.

Fenton, S. E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J. C., Lau, C., Ng, C., Smith, J. S., & Roberts, S. M. (2021). Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review: Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research. In *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40, 606–630). Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1002/etc.4890

Gaber, N., Bero, L., & Woodruff, T. J. (2023). The Devil they Knew: Chemical Documents Analysis of Industry Influence on PFAS Science. *Annals of Global Health*, *89*(1). https://doi.org/10.5334/aogh.4013

Gao, K., Miao, X., Fu, J., Chen, Y., Li, H., Pan, W., Fu, J., Zhang, Q., Zhang, A., & Jiang, G. (2020). Occurrence and trophic transfer of per- and polyfluoroalkyl substances in an Antarctic ecosystem. *Environmental Pollution*, *257*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113383

Giesy, J. P., & Kannan, K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental Science and Technology*, *35*(7), 1339–1342. https://doi.org/10.1021/es001834k

Göckener, B., Weber, T., Rüdel, H., Bücking, M., & Kolossa-Gehring, M. (2020). Human biomonitoring of per- and polyfluoroalkyl substances in German blood plasma samples from 1982 to 2019. *Environment International*, *145*. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106123

Gorokhova, E., Mattsson, L., & Sundström, A. M. (2012). A comparison of TO-PRO-1 iodide and 5-CFDA-AM staining methods for assessing viability of planktonic algae with epifluorescence microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, *89*(3), 216–221. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.005

Grande, R., Di Pietro, S., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Filareto, B., & Cellini, L. (2007). Bio-toxicological assays to test water and sediment quality. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *42*(1), 33–38. https://doi.org/10.1080/10934520601015446

Groffen, T., Lasters, R., Lopez-Antia, A., Prinsen, E., Bervoets, L., & Eens, M. (2019). Limited reproductive impairment in a passerine bird species exposed along a perfluoroalkyl acid (PFAA) pollution gradient. *Science of the Total Environment*, *652*, 718–728. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.273

Gu, M., Yin, G., Gan, T., Zhao, N., Qi, P., Chen, M., Ding, Z., Jia, R., Liu, J., Ma, M., Yang, R., Fang, L., & Liu, W. (2022). Construction of characterization parameters of algal photosynthetic inhibition method for detection of comprehensive toxicity in water. *Ecological Indicators*, *136*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108651

Guo, Q., He, Z., Liu, X., Liu, B., & Zhang, Y. (2020). High-throughput non-targeted metabolomics study of the effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the metabolic characteristics of A. thaliana leaves. *Science of the Total Environment*, *710*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135542

Hajková Tereza. (2010). *Využití řasových testů v ekotoxikologii* [Diplomová práce]. Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta.

Heidari, H., Abbas, T., Ok, Y. S., Tsang, D. C. W., Bhatnagar, A., & Khan, E. (2021). GenX is not always a better fluorinated organic compound than PFOA: A critical review on aqueous

phase treatability by adsorption and its associated cost. In *Water Research* (Vol. 205, pp. 1–17). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117683

Hermetter, A., Mayer, B., Scholze, H., Zenzmaier, E., & Graupner, M. (2001). Fluorescence spectroscopic studies on structure and function of lipolytic enzymes. *Department of Biochemistry and Food Chemistry, Technical University Graz*, 1–2.

Hsieh, S. H., Hsu, C. H., Tsai, D. Y., & Chen, C. Y. (2006). Quantitative structure-activity relationships for toxicity of nonpolar narcotic chemicals to Pseudokirchneriella subcapitata. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*(11), 2920–2926. https://doi.org/10.1897/06-127R.1

Hu, Y., Meng, F. L., Hu, Y. Y., Habibul, N., & Sheng, G. P. (2020). Concentration- and nutrient-dependent cellular responses of microalgae Chlorella pyrenoidosa to perfluorooctanoic acid. *Water Research*, *185*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116248

Huang, D., Xiao, R., Du, L., Zhang, G., Yin, L. S., Deng, R., & Wang, G. (2021). Phytoremediation of poly- and perfluoroalkyl substances: A review on aquatic plants, influencing factors, and phytotoxicity. In *Journal of Hazardous Materials*, 418. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126314

Ihenyen, E. H. (2023). Comparative study of the toxicity of Perfluorooctane sulfonic acid and Perfluorohexane sulfonic acid using algal and vertebrate models. *Dissertation, Environmental Toxicology Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University*. https://hdl.handle.net/2346/97372

Jarošová, A. (2009). Možné cesty vstupu ftalátů do rostlin. *Acta Univ. Agric. et Silvic .Mendel. Brun*, *LVIII (2)*, 299–302. https://acta.mendelu.cz/pdfs/acu/2010/02/32.pdf

Jochem F.J. (1999). Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with ¯uorescein diacetate. In *Marine Biology* (Vol. 135, pp. 721–728).

Karamat, A., Tehrani, R., Foster, G. D., & Van Aken, B. (2024). Plant responses to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): a molecular perspective. In *International Journal of Phytoremediation* (Vol. 26, pp. 219–227). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/15226514.2023.2232874

Kašpar Otakar. (2015). Ekotoxikologické hodnocení polymerů a biologicky aktivních látek v akvatickém prostředí [Disertační práce]. *Vysoké učení technické v Brně. Fakulta Chemická. http://hdl.handle.net/11012/64173*

Kienle, C., Langer-Jaesrich, M., Baumberger, D., Hohmann, D., Santiago, S., Köhler, H. R., Zürrer, D., & Gerhardt, A. (2013). Integrated toxicity evaluation of a pulp deposit using organisms of different trophic levels. *Journal of Soils and Sediments*, *13*(9), 1611–1625. https://doi.org/10.1007/s11368-013-0733-z

Kirby, J., Heath, P. R., Shaw, P. J., & Hamdy, F. C. (2007). Gene expression assays. In *Advances in Clinical Chemistry* , 44, 247–292). https://doi.org/10.1016/S0065-2423(07)44008-2

Kitajima, M., & Butler, W. L. (1975). Quenching of chlorophyl fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*, *376*, 105–115.

Konwinski, K. P. ;, & Ope, O. (2022). PFAS: The Impact of Forever Ptemicals. *ProQuest*, *51*, 32–41.

Kummrow, A., Frankowski, M., Bock, N., Werner, C., Dziekan, T., & Neukammer, J. (2013). Quantitative assessment of cell viability based on flow cytometry and microscopy. *Cytometry Part A*, *83 A*(2), 197–204. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22213

Latała, A., Nedzi, M., & Stepnowski, P. (2009). Acute toxicity assessment of perfluorinated carboxylic acids towards the Baltic microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *28*(2), 167–171. https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.010

Lein, P. J. (2023, April 11). PFAS: THE “new” forever chemicals. *UCDavis, Veterinary Medicine*, 1–12. https://leinlab.vetmed.ucdavis.edu/

Li, J., Sun, J., & Li, P. (2022). Exposure routes, bioaccumulation and toxic effects of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) on plants: A critical review. In *Environment International,* 158, 1–15). https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106891

Li, P., Oyang, X., Xie, X., Li, Z., Yang, H., Xi, J., Guo, Y., Tian, X., Liu, B., Li, J., & Xiao, Z. (2020). Phytotoxicity induced by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate via metabolomics. *Journal of Hazardous Materials*, *389*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121852

Li, Y., Liu, X., Zheng, X., Yang, M., Gao, X., Huang, J., Zhang, L., & Fan, Z. (2021a). Toxic effects and mechanisms of PFOA and its substitute GenX on the photosynthesis of Chlorella pyrenoidosa. *Science of the Total Environment*, *765*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144431

Liu, W., Chen, S., Quan, X., & Jin, Y. H. (2008). Toxic effect of serial perfluorosulfonic and perfluorocarboxylic acids on the membrane system of a freshwater alga measured by flow cytometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(7), 1597–1604. https://doi.org/10.1897/07-459.1

Liu, X., Zheng, X., Zhang, L., Li, J., Li, Y., Huang, H., & Fan, Z. (2022). Joint toxicity mechanisms of binary emerging PFAS mixture on algae (Chlorella pyrenoidosa) at environmental concentration. *Journal of Hazardous Materials*, *437*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129355

Liu, Y. C., Peng, S., Angelova, L., Nau, W. M., & Hennig, A. (2019). Label-free fluorescent kinase and phosphatase enzyme assays with supramolecular host-dye pairs. *ChemistryOpen*, *8*(11), 1350–1354. https://doi.org/10.1002/open.201900299

Lockridge, O., Quinn, D. M., & Radić, Z. (2018). Esterases. In *Comprehensive Toxicology, Third Edition: 1-15* 10, V10-277-V10-307). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.01970-X

Ma, T., Ye, C., Wang, T., Li, X., & Luo, Y. (2022). Toxicity of Per- and Polyfluoroalkyl substances to aquatic invertebrates, planktons, and Microorganisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(24), 1–20. https://doi.org/10.3390/ijerph192416729

Machado, M. D. , S. E. V. ,. (2013). Optimization of a microplate-based assay to assess esterase activity in the alga pseudokirchneriella subcapitata. *Water, Air, and Soil Pollution*, *224*(1), 1–11. https://doi.org/10.1007/s11270-012-1358-3

Macheka-Tendenguwo, L. R., Olowoyo, J. O., Mugivhisa, L. L., & Abafe, O. A. (2018). Per- and polyfluoroalkyl substances in human breast milk and current analytical methods. In *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 36064–36086. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3483-z

Mantis, I., Voutsa, D., & Samara, C. (2005). Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *62*(3), 397–407. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.010

Martinazzo, E. G., Ramm, A., & Bacarin, M. A. (2012). The chlorophyll a fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of Prunus persica. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *24*(4), 237–246. https://doi.org/10.1590/S1677-04202013005000001

Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., & Kizek, R. (2014). Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 2014, 3, 53—56

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, *7*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007

McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpim.40

Mitchell, R. J., Myers, A. L., Mabury, S. A., Solomon, K. R., & Sibley, P. K. (2011). Toxicity of fluorotelomer carboxylic acids to the algae Pseudokirchneriella subcapitata and Chlorella vulgaris, and the amphipod Hyalella azteca. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(8), 2260–2267. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.034

Mojiri, A., Nazari Vishkaei, M., Ansari, H. K., Vakili, M., Farraji, H., & Kasmuri, N. (2023). Toxicity effects of Perfluorooctanoic acid (PFOA) and Perfluorooctane sulfonate (PFOS) on two green microalgae species. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3). https://doi.org/10.3390/ijms24032446

Mueller R., S. K. E. (2020). Naming conventions for Per-and Polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Interstate Technology and Regulatory Council*, 1-4. https://pfas-1.itrcweb.org/

Nařízení komise (EU). (2024). Nařízení komise (EU) 2024/2462 ze dne 17. září 2024, kterým se mění příloha XVII nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, pokud jde o undekafluorhexanovou kyselinu (PFHxA), její soli a látky příbuzné PFHxA, (Text s významem pro EHP). http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1907/oj.

Nguyen, H. T. M., Nilsson, S., Mueller, A. A. R., Toms, L. M., Kennedy, C., Langguth, D., Hobson, P., & Mueller, J. F. (2023). First indication of perfluoroalkyl substances in human serum from Papua New Guinea. *Science of the Total Environment*, *870*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161749

Nguyen, T. V., Trang, P. N., & Kumar, A. (2024). Understanding PFAS toxicity through cell culture metabolomics: Current applications and future perspectives. In *Environment International* (Vol. 186). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108620

OECD. (2004). OECD Guideline for testing of chemicals- Daphnia sp., Acute immobilisation Test No. 202. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264069947-en

OECD. (2006a). OECD Guidelines for testing of chemicals- Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test No. 208. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264070066-en

OECD. (2006b). OECD Guidelines for the testing of chemicals- Freshwater alga and Cyanobacteria, growth Inhibition Test No. 201. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264069923-en

OECD. (2009). OECD Guideline for the testing of chemicals- The Amphibian metamorphosis Assay No. 231. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264076242-en

OECD. (2013a). OECD Guidelines for the testing of chemicals- Fish embryo acute toxicity (FET) test No. 236. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264203709-en

OECD. (2013b). OECD Guidelines for the testing of chemicals- Honey bee (Apis mellifera) larval toxicity test, single exposure No. 237. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264203723-en

OECD. (2019). Section 2 effects on biotic systems: Test Guideline No. 203 Fish, Acute toxicity testing. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264069961-en

Omagamre, E. W., Mansourian, Y., Liles, D., Tolosa, T., Zebelo, S. A., & Pitula, J. S. (2022). Perfluorobutanoic acid (PFBA) induces a non-enzymatic oxidative stress response in soybean (Glycine max L. Merr.). *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17). https://doi.org/10.3390/ijms23179934

Pace, A., Vaglica, A., Maccotta, A., & Savoca, D. (2024). The Origin of Phthalates in algae: Biosynthesis and environmental bioaccumulation. *Environments*, *11 (78)*, 1–16. https://doi.org/10.3390/environments11040078

Panieri, E., Baralic, K., Djukic-Cosic, D., Djordjevic, A. B., & Saso, L. (2022). PFAS Molecules: A Major concern for the human health and the environment. In *Toxics, 10 (44)*. https://doi.org/10.3390/toxics10020044

Peng, S. Y., Yang, Y. Di, Tian, R., & Lu, N. (2024). Critical new insights into the interactions of hexafluoropropylene oxide-dimer acid (GenX or HFPO-DA) with albumin at molecular and cellular levels. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *149*, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.02.011

Pietrini, F., Wyrwicka-Drewniak, A., Passatore, L., Nogués, I., Zacchini, M., & Donati, E. (2024). PFOA accumulation in the leaves of basil (Ocimum basilicum L.) and its effects on plant growth, oxidative status, and photosynthetic performance. *BMC Plant Biology*, *24*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05269-0

Pietropoli, E., Bardhi, A., Simonato, V., Zanella, M., Iori, S., Barbarossa, A., Giantin, M., Dacasto, M., De Liguoro, M., & Pauletto, M. (2024a). Comparative toxicity assessment of alternative versus legacy PFAS: Implications for two primary trophic levels in freshwater ecosystems. *Journal of Hazardous Materials*, *477*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135269

Pinillos, V., & Cuevas, J. (2008). Standardization of the flourochromatic reaction test to assess pollen viability. *Biotechnic and Histochemistry*, *83*(1), 15–21. https://doi.org/10.1080/10520290801987204

Qu, B., Zhao, H., & Zhou, J. (2010). Toxic effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on wheat (Triticum aestivum L.) plant. *Chemosphere*, *79*(5), 555–560. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.012

Radetić, L., Plantak, L., Loborec, J., & Grčić, I. (2024). Super-resistance of PFOS in water: Is it beatable? *Chemosphere*, *362*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142922

Renner Rebecca. (2001, April 1). Evidence of toxic effects and environmental impacts has sent researchers scrambling to obtain more data. *Environmental Science and Technology*, 154–160. https://pubs.acs.org/sharingguidelines

Reynaldo Patiño, A., Crago, J., Smith, E., Grace Olorunyomi, B., & Sheridan, M. (2023). Comparative toxicity of Perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) exposure using aquatic organisms.[A Dissertation], *Environmental Toxicology Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University*.

Rioboo, C., O'Connor, J. E., Prado, R., Herrero, C., & Cid, Á. (2009). Cell proliferation alterations in Chlorella cells under stress conditions. *Aquatic Toxicology*, *94*(3), 229–237. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.009

Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., & Petre, A. (2010). Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere*, *81*(2), 288–293. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.050

Scholz, S., Sela, E., Blaha, L., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., García-Franco, M., Guinea, J., Klüver, N., Schirmer, K., Tanneberger, K., Tobor-Kapłon, M., Witters, H., Belanger, S., Benfenati, E., Creton, S., Cronin, M. T. D., Eggen, R. I. L., Embry, M., Ekman, D., Winter, M. J. (2013). A European perspective on alternatives to animal testing for environmental

hazard identification and risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *67*(3), 506–530. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.10.003

Seacat, A. M., Thomford, P. J., Hansen, K. J., Olsen, G. W., Case, M. T., & Butenhoff, J. L. (2002). Subchronic toxicity studies on Perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences*, 249–264. https://academic.oup.com/toxsci/article/68/1/249/1613795

Sharma, N., Barion, G., Shrestha, I., Ebinezer, L. B., Trentin, A. R., Vamerali, T., Mezzalira, G., Masi, A., & Ghisi, R. (2020). Accumulation and effects of perfluoroalkyl substances in three hydroponically grown Salix L. species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *191*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110150

Sinclair, G. M., Long, S. M., & Jones, O. A. H. (2020). What are the effects of PFAS exposure at environmentally relevant concentrations? In *Chemosphere*, 258). https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127340

Smith, J., Beuthe, B., Dunk, M., Demeure, S., Carmona, J., Medve, A., Spence, M., Pancras, T., Schrauwen, G., Held, T., Baker, K., Ross, I., & Slenders, H. (2016). Environmental fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS). *Concawe*, *8/16*. https://www.concawe.eu/wp-content/uploads/rpt_16-8.pdf

Snell, T. W., Brogdon, S. E., & Morgan, M. B. (2003). Gene expression profiling in ecotoxicology. *Kluwer Academic Publishers*, *12*, 475–483.

Soloneski Sonia and Larramendy Marcelo. (2016). *Toxicology: New aspects to this scientific conundrum*. ItechOpen.

Southerland, E., & Birnbaum, L. S. (2023). What limits will the world health organization recommend for PFOA and PFOS in drinking water? In *Environmental Science and Technology*, 57, 7103–7105). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02260

Steenland, K., Fletcher, T., Stein, C. R., Bartell, S. M., Darrow, L., Lopez-Espinosa, M. J., Barry Ryan, P., & Savitz, D. A. (2020). Review: Evolution of evidence on PFOA and health following the assessments of the C8 Science Panel. In *Environment International*,145. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106125

Stein, K. F. (2012). Silent Spring (1962). In *Rachel Carson* (pp. 61–106). SensePublishers. https://doi.org/10.1007/978-94-6209-068-2_5

Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. (2021). Proposal to list long-chain perfluorocarboxylic acids, their salts and related compounds in Annexes A, B and/or C to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Note by the Secretariat. *UNEP*, */POPS/POPRC.17/7*, 1–45.

Sudheer, W. N., Praveen, N., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2022). Role of plant tissue culture medium components. In *Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends*, 51–83. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00012-6

Sunderland, E. M., Hu, X. C., Dassuncao, C., Tokranov, A. K., Wagner, C. C., & Allen, J. G. (2019). A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. In *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 29,131–147). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1

Tang, T., Liu, X., Wang, L., Zuh, A. A., Qiao, W., & Huang, J. (2020a). Uptake, translocation and toxicity of chlorinated polyfluoroalkyl ether potassium sulfonate (F53B) and chromium co-contamination in water spinach. *Environmental Pollution*, 266. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115385

Tang, T., Liu, X., Wang, L., Zuh, A. A., Qiao, W., & Huang, J. (2020b). Uptake, translocation and toxicity of chlorinated polyfluoroalkyl ether potassium sulfonate (F53B) and chromium co-contamination in water spinach (Ipomoea aquatica Forsk). *Environmental Pollution*, *266*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115385

The British Standards Institution. (2012). *BSI Standards Publication Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae (ISO 8692:2012)*. 1–30.

Underwood, A. J., Chapman, M. G., & Connell, S. D. (2000). Observations in ecology: you can't make progress on processes without understanding the patterns. In *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 250). www.elsevier.nl/locate/jembe

UNEP, S.-4/17. (2009). SC-4/17: Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride. *UNEP*, 1–4. https://www.informea.org/sites/default/files/decisions/stockholm/UNEP-POPS-COP.4-SC-4-17.English.pdf

UNEP, S.-9/12. (2019). SC-9/12: Listing of perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related compounds. *UNEP*. https://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP.9-SC-9-12.English.pdf

UNEP, S.-10/13. (2023). SC-10/13: Listing of perfluorohexane sulfonic acid (PFHxS), its salts and PFHxS-related compounds. *UNEP*, 1–1. https://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP.10-SC-10-13.English.pdf

Valavanidis Athanasios. (2015). Ecotoxicity test methods and ecological risk assessment. aquatic and terrestrial ecotoxicology tests under the guidelines of international organizations. *ResearchGate*, 1–29. www.chem-tox-ecotox.org

Volland, M., Blasco, J., Hampel, M., & San Pedro, R. (2016). Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study. *Aquat Toxicol*, 1–35. https://doi.org/10.1101/074542

Wang, D., de los Reyes, F. L., & Ducoste, J. J. (2023a). Microplate-Based Cell Viability Assay as a Cost-Effective Alternative to Flow Cytometry for Microalgae Analysis. *Environmental Science and Technology*, *57*(50), 21200–21211. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c05675

Wang, W., Rhodes, G., Ge, J., Yu, X., & Li, H. (2020). Uptake and accumulation of per- and polyfluoroalkyl substances in plants. *Chemosphere*, *261*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127584

Wang, Y., Zhai, W. dong, & Wu, C. (2023). Algal cell viability assessment: The role of environmental factors in phytoplankton population dynamics. *Marine Pollution Bulletin*, *189*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114743

Weisbrod, A. V., Woodburn, K. B., Koelmans, A. A., Parkerton, T. F., McElroy, A. E., & Borgå, K. (2009). Evaluation of bioaccumulation using in vivo laboratory and field studies. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *5*(4), 598–623. https://doi.org/10.1897/IEAM_2009-004.1

Wen, B., Wu, Y., Zhang, H., Liu, Y., Hu, X., Huang, H., & Zhang, S. (2016). The roles of protein and lipid in the accumulation and distribution of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in plants grown in biosolids-amended soils. *Environmental Pollution*, *216*, 682–688. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.032

Wielsøe, M., Long, M., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Perfluoroalkylated substances (PFAS) affect oxidative stress biomarkers in vitro. *Chemosphere*, *129*, 239–245. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.014

Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczyńska, A., & Namieśnik, J. (2007). Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and

problems. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *26*(4), 332–344. https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.11.012

Xiao, X., Han, Z. Y., Chen, Y. X., Liang, X. Q., Li, H., & Qian, Y. C. (2011). Optimization of FDA-PI method using flow cytometry to measure metabolic activity of the cyanobacteria, Microcystis aeruginosa. *Physics and Chemistry of the Earth*, *36*(9–11), 424–429. https://doi.org/10.1016/j.pce.2010.03.028

Yewalkar, S., Wu, T., Kuan, D., Wang, H., Li, D., Johnson, A., Posarac, D., Duff, S., & Bi, X. T. (2019a). Applicability of differential fluorescein diacetate and propidium iodide fluorescence staining for monitoring algal growth and viability. *Waste Disposal and Sustainable Energy*, *1*(3), 199–206. https://doi.org/10.1007/s42768-019-00014-y

Zhang, L., Wang, M., Zhang, M., & Yang, D. (2023). Per- and polyfluoroalkyl substances in Chinese surface waters: A review. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262, 1–10. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115178

Zhao, H., Qu, B., Guan, Y., Jiang, J., & Chen, X. (2016). Influence of salinity and temperature on uptake of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) by hydroponically grown wheat (Triticum aestivum L.). *SpringerPlus*, *5*, 1–8. https://doi.org/10.1186/s40064-016-2016-9

Zhao, Z., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Wang, J., & Lin, T. (2022). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in groundwater: current understandings and challenges to overcome. In *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 49513–49533. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s11356-022-20755-4

Zhou, L., Xia, M., Wang, L., & Mao, H. (2016). Toxic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA) on germination and seedling growth of wheat (Triticum aestivum L.). *Chemosphere*, *159*, 420–425. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.045

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: vlevo Molekulární struktura PFOA (perfluorooktanová kyselina), PFOS (perfluorooktansulfonová kyselina) (Panieri et al., 2022), PFHxS (perfluorhexansulfonová kyselina) (Z. Zhao et al., 2022), vpravo PFHxA (pentadecafluoroktanová kyselina) a HFPO-DA též GenX (hexafluorpropylenoxid-dimer kyselina) (Peng et al., 2024) 14

Obrázek 2: Kultivace řas 32

Obrázek 3: Očkovací box Holten Laminar Air HBB 2448 33

Obrázek 4: Molekulární struktura FDA (fluorescein diacetát) 37

Tabulka 1: Dělení PFAS do základních kategorií dle (Mueller R., 2020; Panieri et al., 2022) .. 14
Tabulka 2: Souhrn certifikovaných sloučenin PFAS použité v této studii 30
Tabulka 3: Počet buněk v jamce na základě koncentrace buněk/ml a ředění s BBM 35
Tabulka 4: Ředící řada koncentrací suspenze řas 36
Tabulka 5: Smíchání živých a mrtvých buněk, 100 % živých buněk, 0 % mrtvých buněk 38
Tabulka 6: Hodnoty gradientové eluce pro detekci PFAS 39
Tabulka 7: Počet buněk v jamce na základě koncentrace buněk/ml a ředění s BBM, průměry hodnot fluorescenčních signálů (RFU, relative fluorescence units) změřeny u daných počtů buněk v jamce ..... **Chyba! Záložka není definována.**
Tabulka 8: Test inhibice růstu. Hodnoty LOEC (nejnižší koncentrace, při které je pozorován statisticky významný účinek) získané z Dunnettova testu 51
Tabulka 9: FDA test. Hodnoty LOEC (nejnižší koncentrace, při které je pozorován statisticky významný účinek) získané z Dunnettova testu 52
Tabulka 10: Koncentrace jednotlivých látek, při nichž byl zaznamenán rozdíl odpovědí mezi dvěma studovanými testy 52

Graf 1: Růstová křivka proložená křivkou lineární regrese v exponenciální fázi růstu *P. subcapitata* kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), baňka 1. test, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm 42
Graf 2: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi růstu *P. subcapitata* kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), 96 jamková mikrodestička, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm 43
Graf 3: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi *P. subcapitata* kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), 24 jamková mikrodestička, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm 43
Graf 4: Růstová křivka proložená přímkou lineární regrese v exponenciální fázi *P. subcapitata* kmen č. 433 (10 000 buněk/ml), baňka 2. test, absorbance změřena při vlnové délce 680 nm 44
Graf 5: Závislost fluorescenčního signálu chlorofylu (RFU) změřeného při vlnových délkách excitace: 430 nm, emise: 670 nm na počtu buněk *P. subcapitata* 45
Graf 6: Výsledky testování fluorescenčního signálu PI o koncentracích 10 µg/ml a 3 µg/ml (excitace: 535 nm, emise: 615 nm) 46
Graf 7: Výsledky testování fluorescenčního signálu CFDA-AM o koncentracích 20 uM a 4 uM (excitace: excitace: 485 nm, emise: 535 nm) 47

Graf 8: Výsledky testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) o koncentracích 10 µM, 20 µM a 40 µM……48
Graf 9: Výsledky testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) o koncentracích 10 µM, 20 µM a 40 µM .Přiblížení hodnot fluorescenčních signálů při koncentraci 5 000 buněk/ml z předchozího Grafu 8……... 48
Graf 10: Testování fluorescenčního signálu FDA (excitace: 485 nm, emise: 535 nm) u živých a mrtvých buněk a jejich porovnání……49
Graf 11: Vliv PFOS na biomasu a viabilitu *P. subcapitata*……...51
Graf 12: Vliv PFOA na biomasu a viabilitu *P. subcapitata*…….....54
Graf 13: Vliv GenX na biomasu a viabilitu *P. subcapitata*……...55
Graf 14: Vliv PFHxA na biomasu a viabilitu *P. subcapitata*. ……...57
Graf 15: Vliv PFHxS na biomasu a viabilitu *P. subcapitata*…….……58