

Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy



Stanovení indexu akutní toxicity látek na
Tubifex tubifex

Bakalářská práce

2007

Petra Vodičková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. M. Tichého, DrSc. a školitele – garanta doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc.), a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5.6.2007



.....
podpis

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. M. Tichému, DrSc. A školiteli -
garantovi

doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc. za zadání tématu, podporu a rady při
vypracování této bakalářské práce.

Děkuji Ing. I. Hanzlíkové a R. Uzlové za jejich ochotu a pomoc
během vypracovávání této práce na SZÚ.

OBSAH

OBSAH	4
Seznam častěji použitých zkratek	6
1. ÚVOD	7
1.1. Alternativní metody testování toxicity	7
1.1.1. Význam alternativních metod	7
1.1.2. Metoda QSAR	7
1.1.3. Historie vývoje QSAR	8
1.2. Směsi dvou látek	9
1.3. Molární zlomek	10
1.4. <i>Tubifex tubifex</i>	10
1.4.1. Systematické zařazení	10
1.4.2. Charakteristika řádu máloštětinatců	10
1.4.3. Charakteristika rodu Tubificidae	11
1.5. Cíle a obsah práce	12
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
2.1. Použité pomůcky a chemikálie	13
2.1.1. Testované chemikálie	13
2.1.2. Ostatní chemikálie	13
2.1.3. Testovaný objekt	13
2.1.4. Laboratorní sklo	13
2.1.5. Laboratorní přístroje	14
2.2. Postup při stanovení EC50	14
2.2.1. Příprava roztoků zkoumaných látek a jejich směsí	14
2.2.2. Příprava roztoků referenční látky	14
2.2.3. Postup při měření	15
2.2.4. Vyhodnocení a výpočty	16
3. VÝSLEDKY A DISKUSE	17
3.1. Diskuse	17
3.2. Výsledky	17
3.2.1. Dusičnan olovnatý	18
3.2.2. Dusičnan zinečnatý	20
3.2.3. Dusičnan kademnatý	22
3.2.4. Průměrné hodnoty EC50 jednotlivých dusičnanů	23

3.2.5. Směsi	24
3.2.5.1. Směs $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	24
3.2.5.2. Směs $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	27
3.2.5.3. Směs $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	29
4. ZÁVĚR	31
Použitá literatura	32

Seznam častěji použitých zkratk

BA	Biologická aktivita
EC50	Efektivní koncentrace, při které reaguje 50% jedinců
EC50_n	Normovaná efektivní koncentrace
QSAR	(Quantitative Structure-Activity Relationship) Kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností xenobiotik.
<i>R</i>	Molární zlomek
<i>R_n</i>	Normovaný molární zlomek
<i>m</i>	Hmotnost (g)
<i>c</i>	Koncentrace (mol/l)
<i>M_r</i>	Relativní molekulová hmotnost
<i>n</i>	Látkové množství (mol)

1. ÚVOD

1.1. Alternativní metody testování toxicity

1.1.1. Význam alternativních metod

Ke snaze o vytvoření nových, alternativních metod, vede potřeba otestovat všechny existující a člověku známe chemické látky. Je potřeba určit jejich biologickou účinnost a fyzikální a chemické vlastnosti. Toto je dáno novou chemickou legislativou REACH (Restriction, Evaluation and Authorization of Chemicals), která v Evropské Unii vstoupila v platnost v roce 2006. Dosavadní známé a běžně používané metody jsou příliš náročné, finančně i časově. Dalším důvodem, který je v legislativě také nový, je omezení pokusů na obratlovcích. Pro splnění všech legislativních požadavků byl zřízen ECVAM (European Centre for Validation of Alternative Methods). Jak již z názvu vyplývá, centrum zajišťuje především validaci alternativních metod.

Mezi alternativní metody, které mohou vyhovovat všem legislativním a vědeckým požadavkům patří především metody *in vitro* (metody na tkáních, tkáňových řezech, buňkách), metody *in silico* a metody na nižších organizmech jako jsou bakterie, dafnie, červi.

Metody *in silico* jsou metody, kdy se vlastnosti látek odhadují výpočtem pomocí modelů, které byly vytvořeny na počítačích. Slouží k odhadu toxických indexů EC50, ED50, LD50, LC50 a dále karcinogenního indexu, indexu dráždivosti, NOEL atd. Používají se pro odhad konkrétního účinku dané látky na konkrétní testovací objekt. Mezi tyto metody patří modely (rovnice) QSAR (Quantitative Structure - Activity Relationships).¹

1.1.2. Metoda QSAR

Metodu QSAR lze nejpřesněji definovat jako analýzu dat o biologických a chemických vlastnostech řady xenobiotik pomocí metody matematické statistiky. Jak je již z názvu patrné, jedná se o vztah mezi strukturou látky a její biologickou aktivitou. Struktura však v tomto případě neznamená pouze uspořádání atomů v molekule, ale i všechny vlastnosti, charakteristiky a konstanty, které z této struktury vyplývají. Biologická aktivita znamená velikost biologického účinku, kterou látka za určitých podmínek vyvolá.

Hlavním cílem analýzy QSAR je zobecňování informací o vztazích mezi chemickými a biologickými vlastnostmi jednotlivých xenobiotik. Toto zobecnění se vyjadřuje matematickou rovnicí. Rovnice se využívá pro odhad účinností nových, dosud netestovaných látek.²

$$BA = f(X_i) \quad (1)$$

Kde **BA** značí biologickou aktivitu a X_i je vlastnost látky *i*. Funkce **f** může být např. rovnice přímky, paraboly apod.

1.1.3. Historie vývoje QSAR

Pokusy o nalezení vztahu mezi biologickou účinností a chemickou strukturou sahají do hluboké minulosti, ale k největšímu pokroku v tomto směru došlo v posledních 30 až 40 letech.

Jako první pokus o co nejrychlejší odhad nebezpečnosti chemické látky, je třeba zmínit práci Crum - Browna a Frazera z roku 1869. Napsali: "...Nemůže být žádná rozumná námitka proti tomu, že existuje vztah mezi fyziologickým účinkem látky a jejím chemickým složením a konstitucí...". Dále jako první postulovali vztah $BA = f(X_i)$.²

Za první model typu QSAR je považován model, který nezávisle na sobě vytvořili na přelomu století Meyer a Overton. Pozorovali, že většina organických látek přechází při narkotickém účinku přes membrány buněk a výsledná narkotická účinnost koreluje s rozdělovacím koeficientem látek mezi olej a vodu.

Přelomovou prací je práce Fergusona, který použil jako první představy termodynamiky v biologii a toxikologii.³ Shrnul, že molární toxická koncentrace látky je určena rovnovážným rozdělením látky mezi biofází (místo kde dochází k účinku) a okolní fází, kde je koncentrace látky měřena. Použil rovnici klasické termodynamiky:

$$\ln a = (\Delta G - \Delta G^\circ)/RT \quad (2)$$

$$a = f \cdot c \quad (3)$$

kde ΔG a ΔG° jsou změny Gibbsovy energie měřené a ve standardním stavu, **R** je univerzální plynová konstanta, **T** je teplota, **a** aktivita látky, **f** aktivitní koeficient a **c** je molární koncentrace látky. Jestliže se mezi koncentracemi látky v biofází a ve vodné fázi ustaví rovnováha, je snaha látky opustit každou z nich stejná, protože chemický potenciál je v obou fázích stejný.

$$\mu_b = \mu_{ex} \quad (4)$$

za rovnovážného stavu dále platí

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a \quad (5)$$

kde μ_0 je chemický potenciál látky v čistém stavu. Rovnice popisující vztah mezi biologickou účinností a chemickou strukturou má pak tvar

$$c_i = k \cdot X_i^m \quad (6)$$

kde c_i je koncentrace i -té látky, vyvolávající standardní velikost účinku (př. ED50), X_i je strukturální parametr látky (fyzikálně - chemická vlastnost) a k a m jsou konstanty pro sledovaný účinek a látku. Při analýze QSAR se využívá logaritmická forma této rovnice

$$\log c_i = m \cdot \log X_i + \log k \quad (7)$$

Na přelomu 50. a 60. let minulého století byly publikovány první práce, které prezentovaly moderní modely analýzy QSAR. Byl to především Hanschův model s rozdělovacím koeficientem látek mezi n - oktanol a vodu⁴ a Zahradníková $\alpha\beta$ - rovnice.⁵

Od začátku 70. let minulého století bylo uspořádáno množství konferencí zabývajících se problematikou QSAR. Historicky první setkání odborníků a vědců se uskutečnilo v Praze, bylo to takzvané *1. evropské QSAR symposium*. V dnešní době vycházejí také dva vědecké časopisy zaměřené pouze na problematiku QSAR. Jsou to *QCS - QSAR* a *QSAR and SAR in Environmental Research*.¹

1.2. Směsi dvou látek

V případě, že dochází k testování látek ve směsích, musíme počítat s tím, že se tyto směsi budou chovat jinak a budou mít jinou velikost účinku, než látky samotné. Ovlivněním v sérii příbuzných látek ve směsi se zabýval Konemann. Podle něho je společný účinek směsí chemikálií, stanovený jako akutní toxicita, aditivní pro všechny koncentrace, jestliže se jedná o látky, které vyhovují společné rovnici QSAR.

Látky se mohou ovlivňovat různými způsoby, jsou to:

- vliv jedné z látek na vstřebávání, distribuci nebo vylučování látky druhé.
- vliv jedné látky na biotransformaci látky druhé v organismu
- fyzikální vliv jedné látky na druhou během společného působení.

1.3. Molární zlomek

Složení směsi může být vyjádřeno tak, že se pro každou složku směsi udá molární zlomek $R_{(i)}$. Tato veličina je definována výrazem:

$$R_{(i)} = c_{(i)} / \sum c_{(i)} \quad (8)$$

Jako poměr koncentrace $c_{(i)}$ složky i k celkové koncentraci složek ve směsi.^{6, 7, 8, 9}

1.4. *Tubifex tubifex*

1.4.1. Systematické zařazení^{10, 11}

Systematické zařazení: Říše ANIMALIA

Podříše POLYCYTOZOA

Vývojová větev PROTOSTOMIA

Kmen ANNELIDA

Třída OLIGOCHAETA

Řád CLITELLATA

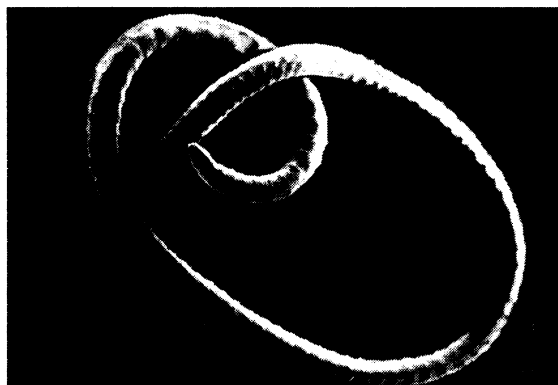
Rod TUBIFICIDAE

Druh TUBIFEX

1.4.2. Charakteristika řádu máloštětinatců

Tubifex tubifex nebo-li česky nitěnky větší se schématicky zařazují do výše zmíněných skupin. Patří tedy do řádu máloštětinatců, přesněji jsou to sladkovodní máloštětinatci. Na každém článku mají 8 štětin. U pohlavně dospělých jedinců najdeme v přední části těla opasek. Opasek je důležitý při páření jedinců rozmnožujících se pohlavně. Slouží k přenosu spermií.

Máloštětinatý červ rodu Tubificidae.¹²



Obr. 1

Nervová soustava je žebříčkovitá a je uložena na břišní straně těla. Její hlavní část je uložena v přední části těla a je tvořena párem nadhltanových a podhltanových zauzlin. V každém článku najdeme další, vedlejší párové zauzliny, které jsou vzájemně pospojovány a tvoří tak již zmíněnou žebříčkovitou nervovou soustavu.

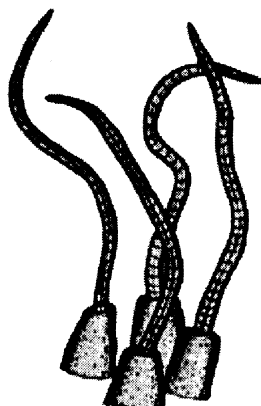
Cévní soustava máloštětinatců je uzavřená, jejím základem je pulzující hřbetní a břišní céva. V předních člancích těla jsou obloukovité laterální cévy, které spojují hřbetní a břišní cévy a jsou rozšířené v pomocná čili auxiliární srdce. Těla těchto živočichů jsou díky přítomnosti červeného krevního barviva hemoglobinu zbarvena červeně. Máloštětinatci dýchají celým povrchem těla a krev je okysličována v husté síti kožních vlasečnic. Vylučovací soustavu tvoří metanefridie, ty se opakují v každém článku těla s výjimkou přední části. Začínají obrvenou nálevkou, která přechází v dlouhý kanálek. Tento kanálek prostupuje na svém počátku tělní přepážkou jednoho článku a vyústuje v článku následujícím.

Máloštětinatci jsou hermafrodité a rozmnožují se pohlavně i nepohlavně. Každý jedinec má vždy pouze jeden pár samčích a jeden pár samičích pohlavních žláz. K nepohlavnímu rozmnožování dochází především u vodních máloštětinatců a tedy u nitěnek.^{10, 11}

1.4.3. Charakteristika rodu Tubificidae

Nítěnkovití se vyskytují téměř výlučně v nejvrchnějších vrstvách dna vod, zvláště je-li kryto nánosem bahna. Některé druhy žijí zavrtány přední částí těla do bahna a jejich zadní část vyčnívá ven z vody a zadečkem vykonává vlnivý pohyb, kterým ve vodě vytvářejí vír a to jim umožňuje dýchání i ve vodách s nižším obsahem kyslíku (Obr. 2). Potravou jim nejčastěji bývá hmota dna vod s ústrojnými zbytky.

Vlnivý pohyb červu rodu Tubificidae.¹³



Obr. 2

Jejich tělo je nitkovité, složené ze stejnocenných článků a nejčastěji asi 10 až 20 mm dlouhé. Nitěnky se rozmnožují nepohlavně. Při rozmnožování u nich dochází k rozpadu těla na tělní fragmenty, které dorůstají v nové jedince. Tomuto způsobu nepohlavního rozmnožování se říká fisiparie. Poškozené i odtržené části těla se mohou dobře a rychle regenerovat. V některých případech mohou vzniknout i nadbytečné regeneráty, třeba zdvojená zadní část těla.^{10, 11}

Nitěnky jsou ideální pro použití na alternativní testování, protože patří mezi nižší živočichy a naprosto tedy vyhovují programu 3R. Jediná jejich nevýhoda je, že je dosud nedokážeme chovat.

1.5. Cíle a obsah práce

Cílem této bakalářské práce je využití alternativních metod testování toxicity, metod QSAR a testu *Tubifex tubifex*, pro stanovení akutní toxicity anorganických solí a jejich směsí.

Práce doplní informace o údajích o akutní toxicitě anorganických látek. Údaje budou dále využity k navržení predikčního modelu typu QSAR, který by pomohl odhadnout akutní toxicitu směsí.

Bude změřena akutní toxicita dusičnanu olovnatého, dusičnanu kademnatého, dusičnanu zinečnatého a jejich směsí.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité pomůcky a chemikálie

2.1.1. Testované chemikálie

K testování byly použity dusičnany a to; dusičnan olovnatý, dusičnan kademnatý a dusičnan zinečnatý (Tab. 1). Dále byl testován jejich účinek v binárních směsích.

Tab. 1

Vybrané údaje o testovaných látkách

název	vzorec	výrobce	M_r	čistota
Dusičnan olovnatý	$Pb(NO_3)_2$	Fluka	331,20	99%
Dusičnan zinečnatý	$Zn(NO_3)_2$	Fluka	297,48	99%
Dusičnan kademnatý	$Cd(NO_3)_2$	Fluka	308,47	99%

2.1.2. Ostatní chemikálie

Jako referenční látka pro stanovení EC50 byl použit dihydrát chloridu manganatého $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck).¹⁴

2.1.3. Testovaný objekt

Pokusný červ, nitěnka větší *Tubifex tubifex*, zakoupený v akvaristice.

2.1.4. Laboratorní sklo

Kádinka	250ml	2ks
Kádinka	25ml	6ks
Odměrná baňka	25ml	2ks
Petriho miska	Ø 150mm	1ks
Petriho miska	Ø 80mm	1ks
Petriho miska	Ø 40mm	15ks
Pinzeta kosmetická		1ks
Špičky		2ks

2.1.5. Laboratorní přístroje

Analytické váhy		1ks
Pipeta automatická	10ml	1ks
Pipeta automatická	5ml	1ks
Stopky		1ks

2.2. Postup při stanovování EC50

2.2.1. Příprava roztoků zkoumaných látek a jejich směsí

Byl navážen přesně 1,000 g dusičnanu olovnatého, zinečnatého nebo kademnatého, který byl následně rozpuštěn v destilované vodě a v odměrné baňce doplněn na objem 25 ml . Takto byl připraven roztok o základní koncentraci. Tento vzorek byl dále ředěn v poměru 15 : 4 (vzorek : voda), až bylo připraveno potřebné množství roztoků o nižších koncentracích. Obvykle bylo připraveno 4 - 6 roztoků.

Při přípravě směsí bylo naváženo přesné množství obou látek. Navážka byla přepočítána na koncentrace pomocí molárního zlomku. Množství obou bylo smícháno, rozpuštěno v destilované vodě a v odměrné baňce doplněno na objem 25 ml. Takto byl připraven roztok o základní koncentraci.

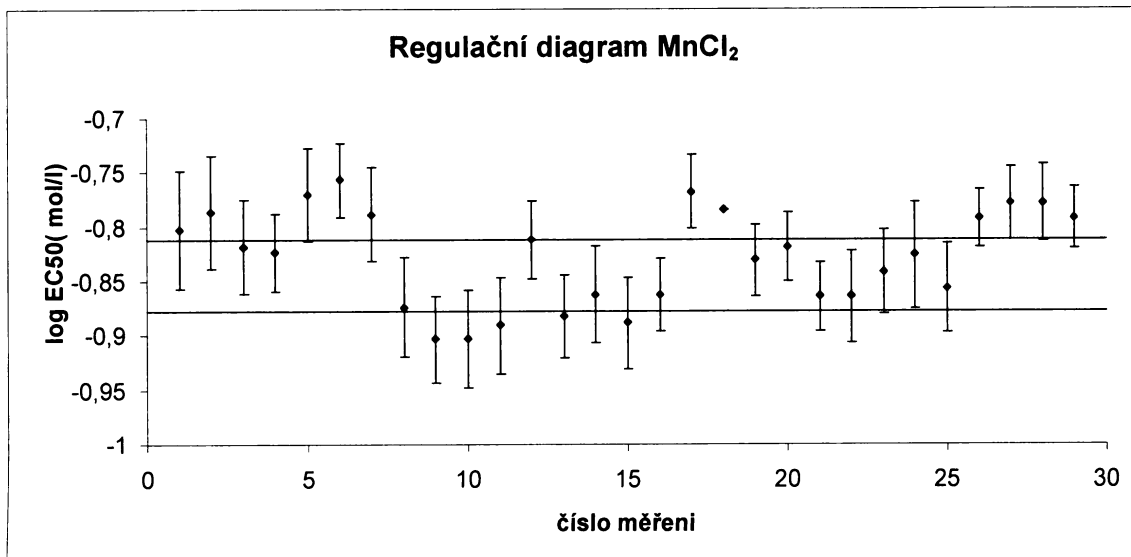
Vzorek byl dále naředěn v poměru 15 : 4 (vzorek : voda), až bylo připraveno potřebné množství roztoků o nižších koncentracích.

2.2.2. Příprava roztoků referenční látky

Ve 25 ml destilované vody bylo rozpuštěno přesné množství chloridu manganatého $MnCl_2 \cdot 2H_2O$. Takto získaný roztok byl naředěn tak, jak je popsáno v předchozím odstavci. Pouze poměr vzorek:voda se každé měření lišil. Byly připraveny čtyři roztoky o různých koncentracích.

Z vypočítaných hodnot EC50 byl postupně sestavován regulační diagram pro tuto referenční látku. Jednalo se o graf závislosti odchylek hodnot EC50 od střední hodnoty EC50, která byla stanovována v průběhu několika měsíců, na čase (obr. 3). Střední hodnota EC50 pro referenční látku, je hodnota stanovovaná dlouhodobě a je to hodnota s horní a dolní mezí.

Regulační diagram MnCl_2



Obr. 3

2.2.3. Postup při měření¹⁴

Stanovování probíhalo za laboratorní teploty. Bylo k němu potřeba: kolonie nitěnek *Tubifex tubifex*, pitná voda, Petriho misky o různém průměru, pinzeta a stopky.

Z kolonie nitěnek byla část oddělena a přemístěna do větší Petriho misky s vodou. Do menší Petriho misky bylo odpipetováno dostatečné množství vzorku o základní koncentraci. Dále bylo vybráno šest středních a přibližně stejně velkých nitěnek, které byly vloženy do Petriho misky se vzorkem. Zde proběhla expozice, a po uplynutí přesně tří minut, byl zaznamenán počet nehybných jedinců. Tento údaj byl použit pro výpočet akutní toxicity, který byl vyjádřený pomocí EC_{50} .¹⁵

Použité nitěny byly vyřazeny. Takto se postupovalo při každé koncentraci a všechny koncentrace byly proměřeny třikrát. Poslední použitou koncentrací byla taková koncentrace, při které již nebyla vyvolána žádná zástava pohybu nitěnek.

2.2.4. Vyhodnocení a výpočty

Z hodnot, které byly získány experimentálním testem na nitěnkách, vypočítáme EC50 podle vztahu:

$$\log EC50 = \log D_a + d \cdot (f + 1) \quad (9)$$

Kombinace údajů o nehybných nitěnkách u čtyř po sobě jdoucích koncentracích jsou tabelovány. Jednotlivým kombinacím je v tabulce přiřazena konstanta f . D_a označuje nejnižší koncentraci ze čtveřice, pro kterou byla v tabulce nalezena hodnota konstanty f .

Konstantu d vypočítáme ze vztahu:

$$d = \log R \quad (10)$$

kde R je poměr mezi dvěma po sobě následujícími koncentracemi (R je vždy větší než 1 → poměr koncentrací vždy vyšší/nížší).

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ pro 95% je pro hladinu významnosti dán vztahem:

$$L_{1,2} = \log EC50 \pm 2 \cdot \sigma_f \cdot d \quad (11)$$

Kde σ_f je tabelovaná hodnota odchylky, která přísluší dané konstantě f .¹⁵

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Diskuse

Analýza metodou QSAR vychází ze znalosti struktury látky, která je popsána pomocí molekulových deskriptorů. V případě binárních směsí se jedná také o popis pomocí deskriptorů složení směsí. Jednou z charakteristik složení směsí je molární zlomek složky v roztoku směsi. Ten byl také v této práci použit k popisu složení směsi. V závislosti na molárním zlomku byla do grafu vynášena akutní toxicita, vyjádřená jako log EC50.

Zkoumala se aditivnost účinků látek působících ve směsích. Jako první byly analyzovány jednotlivé látky a byla tak zjištěna velikost jejich účinku. Velikosti těchto účinků pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tabulkách 2, 3 a 4 a znázorněny na obrázcích 5, 6 a 7.

Dále byly připraveny binární směsi těchto látek. Byly naměřeny EC50 těchto směsí a poté byl vypočítán normovaný molární zlomek a normovaná EC50 (jsou uvedeny v tabulkách 6, 8 a 10.). Nakonec byly hodnoty vyneseny do grafu.

Na obrázku 8 je znázorněna závislost normované EC50, měřená ve směsi dusičnanů kademnatého a olovnatého, na normovaném molárním zlomku dusičnanu kademnatého. Z grafu je vidět, že se toxické účinky těchto látek ve směsi inhibují. K inhibici dochází i ve směsi dusičnanu olovnatého a dusičnanu zinečnatého, jak je patrné z obrázku 10. Po vynesení závislosti normované EC50 na normovaném molárním zlomku dusičnanu kademnatého, ve směsi dusičnanu kademnatého a dusičnanu zinečnatého, bylo zjištěno, že se velikost jejich toxického účinku až do hodnoty normovaného molárního zlomku $R_n = 0,35$ potencuje a dále je pravděpodobně aditivní.

3.2. Výsledky

Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2 až 10 a na obrázcích 5 až 10.

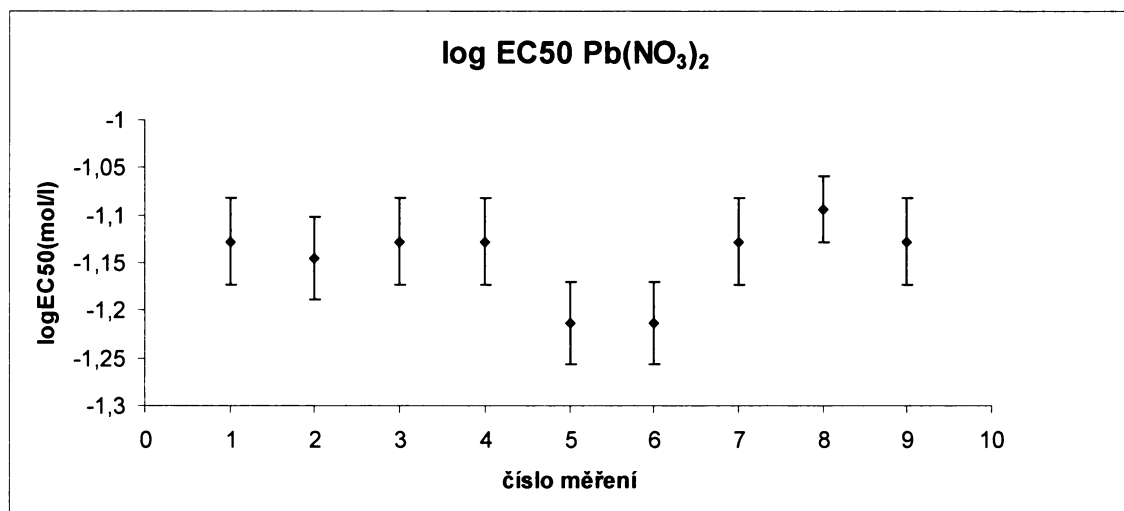
3.2.1 Dusičnan olovnatý

Byl navážen přesně 1,000 g dusičnanu olovnatého a roztoky byly nařaděny v poměru 15 : 4. Hodnoty log EC50 jsou uvedeny v tabulce 2 a na obrázku 5.

Tab. 2

c (mol/l)	log EC50 pro 1. měření (mol/l)	log EC50 pro 2. měření (mol/l)	log EC50 pro 3. měření (mol/l)
0,120	-1,128 ± 0,046	-1,145 ± 0,043	-1,128 ± 0,046
0,094			
0,075			
0,059			
0,046			
0,120	-1,128 ± 0,046	-1,214 ± 0,043	-1,214 ± 0,043
0,094			
0,075			
0,059			
0,046			
0,120	-1,128 ± 0,046	-1,094 ± 0,034	-1,128 ± 0,046
0,094			
0,075			
0,059			
0,046			

Graf velikosti akutní toxicity dusičnanu olovnatého



Obr. 5

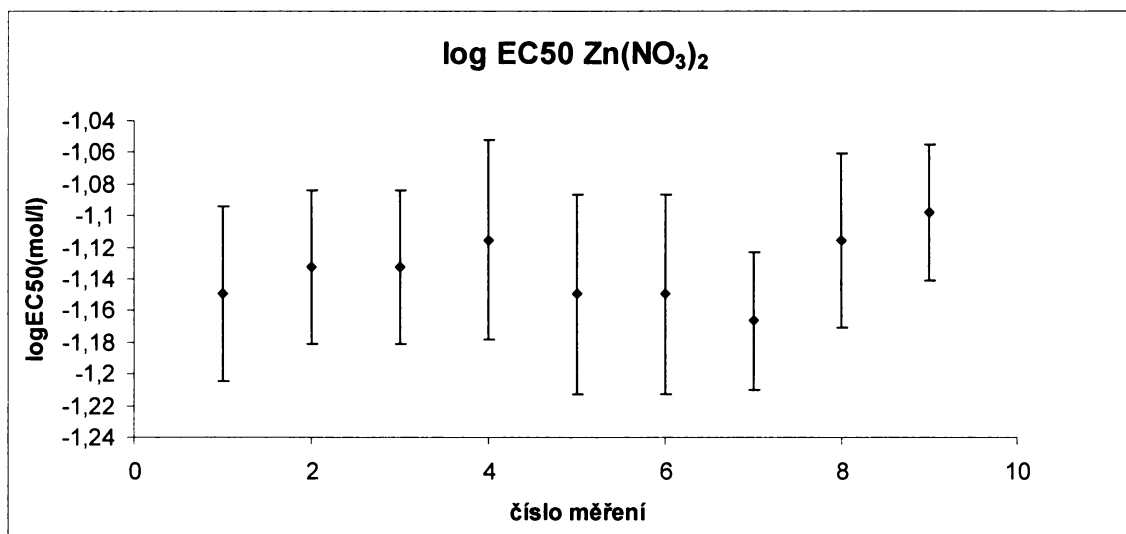
3.2.2. Dusičnan zinečnatý

Byl navážen přesně 1,000 g dusičnanu zinečnatého a roztoky byly naředěny v poměru 15 : 4. Hodnoty log EC50 jsou uvedeny v tabulce 3 a na obrázku 6.

Tab. 3

c (mol/l)	log EC50 pro 1. měření (mol/l)	log EC50 pro 2. měření (mol/l)	log EC50 pro 3. měření (mol/l)
0,133	$-1,150 \pm 0,055$	$-1,132 \pm 0,048$	$-1,132 \pm 0,048$
0,105			
0,083			
0,066			
0,052			
0,133	$-1,115 \pm 0,063$	$-1,150 \pm 0,063$	$-1,150 \pm 0,063$
0,105			
0,083			
0,066			
0,052			
0,133	$-1,167 \pm 0,043$	$-1,115 \pm 0,055$	$-1,098 \pm 0,043$
0,105			
0,083			
0,066			
0,052			

Graf velikosti akutní toxicity dusičnanu zinečnatého



Obr. 6

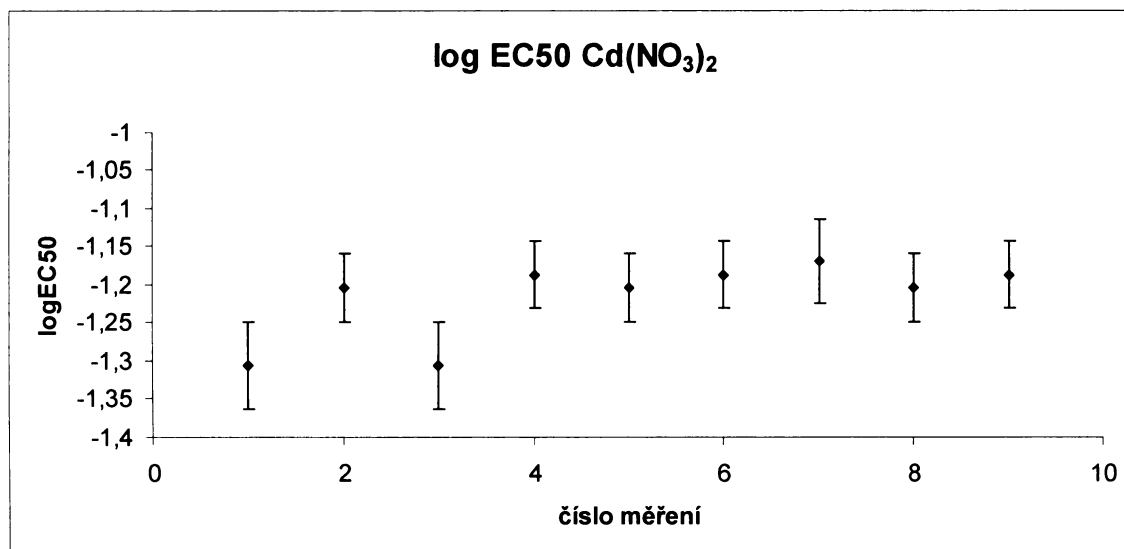
3.2.3. Dusičnan kademnatý

Byl navážen přesně 1,000 g dusičnanu kademnatého a roztoky byly naředěny v poměru 15 : 4. Hodnoty log EC50 jsou uvedeny v tabulce 4 a na obrázku 7.

Tab. 4

c (mol/l)	log EC50 pro 1. měření (mol/l)	log EC50 pro 2. měření (mol/l)	log EC50 pro 3. měření (mol/l)
0,127	-1,306 ± 0,057	-1,204 ± 0,046	-1,204 ± 0,046
0,100			
0,079			
0,063			
0,049			
0,127	-1,187 ± 0,043	-1,204 ± 0,046	-1,187 ± 0,043
0,100			
0,079			
0,063			
0,049			
0,127	-1,170 ± 0,055	-1,204 ± 0,046	-1,187 ± 0,043
0,100			
0,079			
0,063			
0,049			

Graf velikosti akutní toxicity dusičnanu kademnatého



Obr. 7

3.2.4. Průměrné hodnoty EC50 jednotlivých dusičnanů

Průměrné hodnoty EC50 byly pro jednotlivé dusičnany stanoveny takto:

- dusičnan olovnatý: $EC_{50} = 0,070 \pm 0,006$ mol/l
- dusičnan zinečnatý: $EC_{50} = 0,074 \pm 0,004$ mol/l
- dusičnan kademnatý: $EC_{50} = 0,060 \pm 0,005$ mol/l

Tyto údaje byly následně použity pro výpočet EC_{50_n} směsí.

3.2.5. Směsi

3.2.5.1. Směs $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty molárního zlomku R_{Cd} , koncentrace dusičnanu kademnatého a dusičnanu olovnatého v mol/l a přesná navážka dusičnanu kademnatého a dusičnanu olovnatého v gramech.

Tab. 5

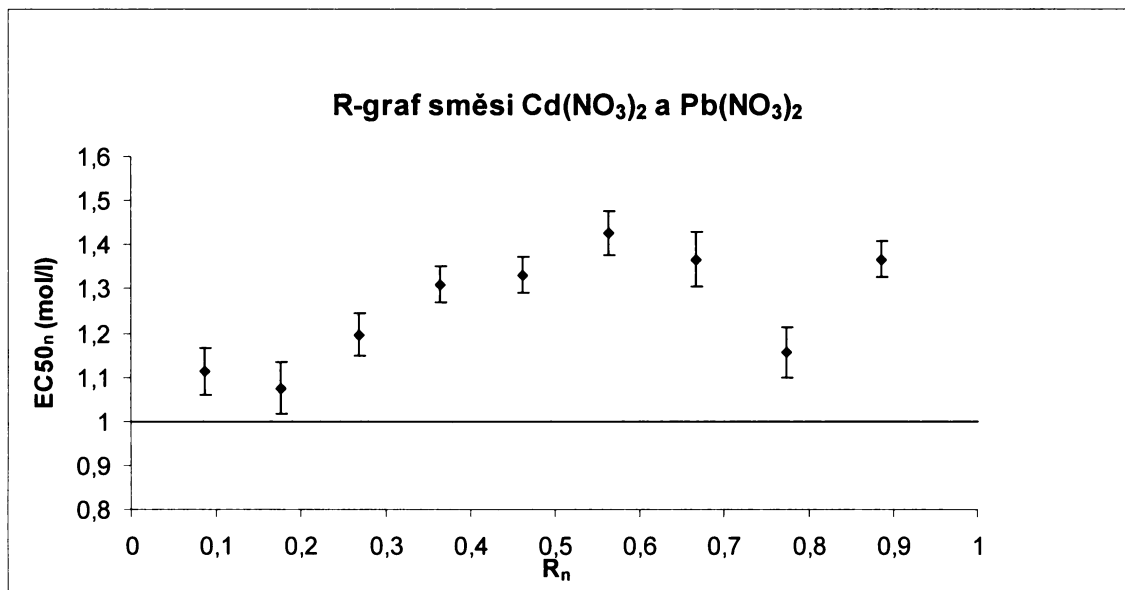
R_{Cd}	c $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	c $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
0,1	0,130	0,014	1,000	0,119
0,2	0,100	0,025	0,789	0,210
0,3	0,100	0,043	0,789	0,360
0,4	0,079	0,053	0,623	0,442
0,5	0,079	0,079	0,623	0,662
0,6	0,079	0,119	0,623	0,994
0,7	0,063	0,146	0,492	1,220
0,8	0,039	0,155	0,373	1,304
0,9	0,019	0,173	0,151	1,445

V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty molárních zlomků R_{Cd} , koncentrace směsi v mol/l, normované molární zlomky R_n a normovaná hodnota efektivní koncentrace 50 naměřená na *Tubifex tubifex*.

Tab. 6

R_{Cd}	c (mol/l)	R_n	$EC50_n$	R_{Cd}	c (mol/l)	R_n	$EC50_n$
0,1	0,144	0,087	1,113	0,6	0,191	0,562	1,426
	0,114				0,151		
	0,090				0,119		
	0,071				0,094		
	0,056				0,074		
0,2	0,125	0,176	1,074	0,7	0,059	0,666	1,366
	0,099				0,208		
	0,078				0,164		
	0,062				0,130		
	0,049				0,103		
0,3	0,143	0,268	1,195	0,8	0,081	0,773	1,157
	0,113				0,064		
	0,089				0,195		
	0,071				0,154		
	0,056				0,122		
0,4	0,132	0,363	1,309	0,9	0,096	0,885	1,367
	0,104				0,076		
	0,082				0,060		
	0,065				0,047		
	0,051				0,204		
0,5	0,158	0,461	1,331				
	0,125						
	0,099						
	0,078						
	0,062						

Graf závislosti normované EC50 na normovaném molárním zlomku ve směsi dusičnanu kadmnatého a olovnatého



Obr. 8

3.2.5.2 Směs $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$

V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty molárního zlomku R_{Cd} , koncentrace dusičnanu kadmnatého a dusičnanu zinečnatého v mol/l a přesná navážka dusičnanu kadmnatého a dusičnanu zinečnatého v gramech.

Tab. 7

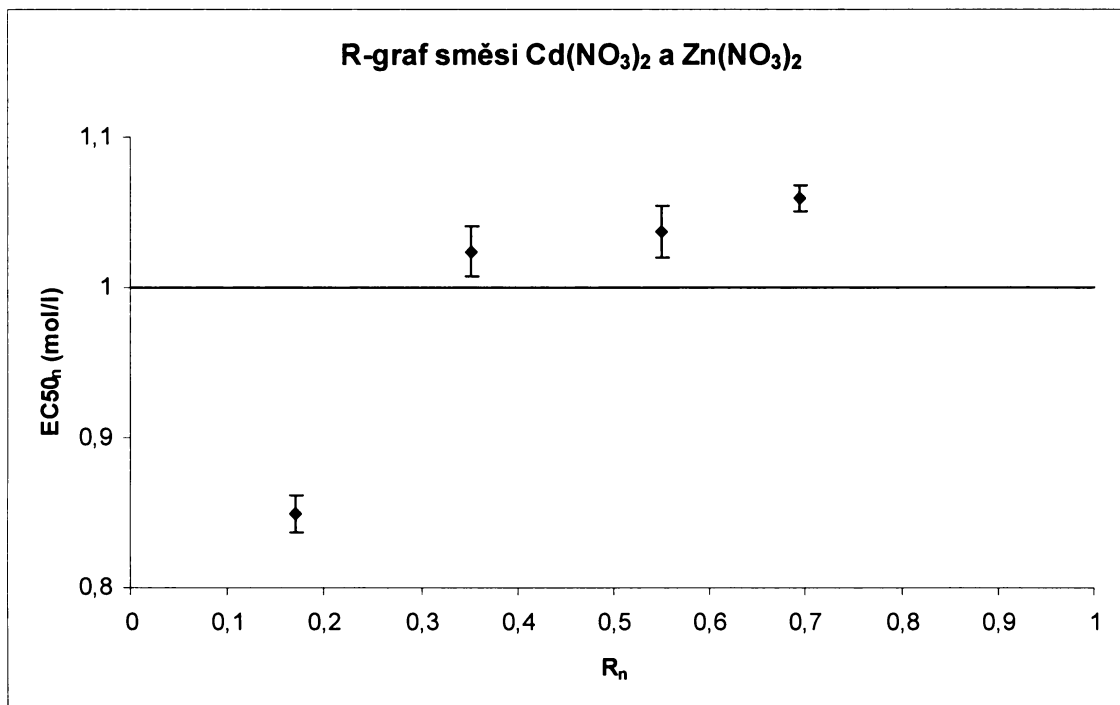
R_{Cd}	c $\text{CdNO}_3)_2$	c $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
0,2	0,100	0,025	0,789	0,188
0,4	0,079	0,053	0,623	0,397
0,6	0,063	0,094	0,492	0,704
0,8	0,024	0,097	0,189	0,730

V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty molárních zlomků R_{Cd} , koncentrace směsi v mol/l, normované molární zlomky R_n a normovaná hodnota efektivní koncentrace¹₅₀ naměřená na *Tubifex tubifex*.

Tab. 8

R_{Cd}	c (mol/l)	R_n	EC_{50_n}
0,2	0,125	0,170	0,849
	0,099		
	0,078		
	0,061		
	0,048		
0,4	0,132	0,352	1,024
	0,104		
	0,082		
	0,065		
	0,051		
0,6	0,156	0,550	1,037
	0,123		
	0,097		
	0,077		
	0,061		
	0,048		
0,8	0,122	0,693	1,059
	0,096		
	0,076		
	0,060		
	0,047		
	0,037		

Graf závislosti normované EC50 na normovaném molárním zlomku ve směsi dusičnanu kadmnatého a zinečnatého.



Obr. 9

3.2.5.3. Směs $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$

V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty molárního zlomku R_{Pb} , koncentrace dusičnanu olovnatého a dusičnanu zinečnatého v mol/l a přesná navážka dusičnanu olovnatého a dusičnanu zinečnatého v gramech.

Tab. 9

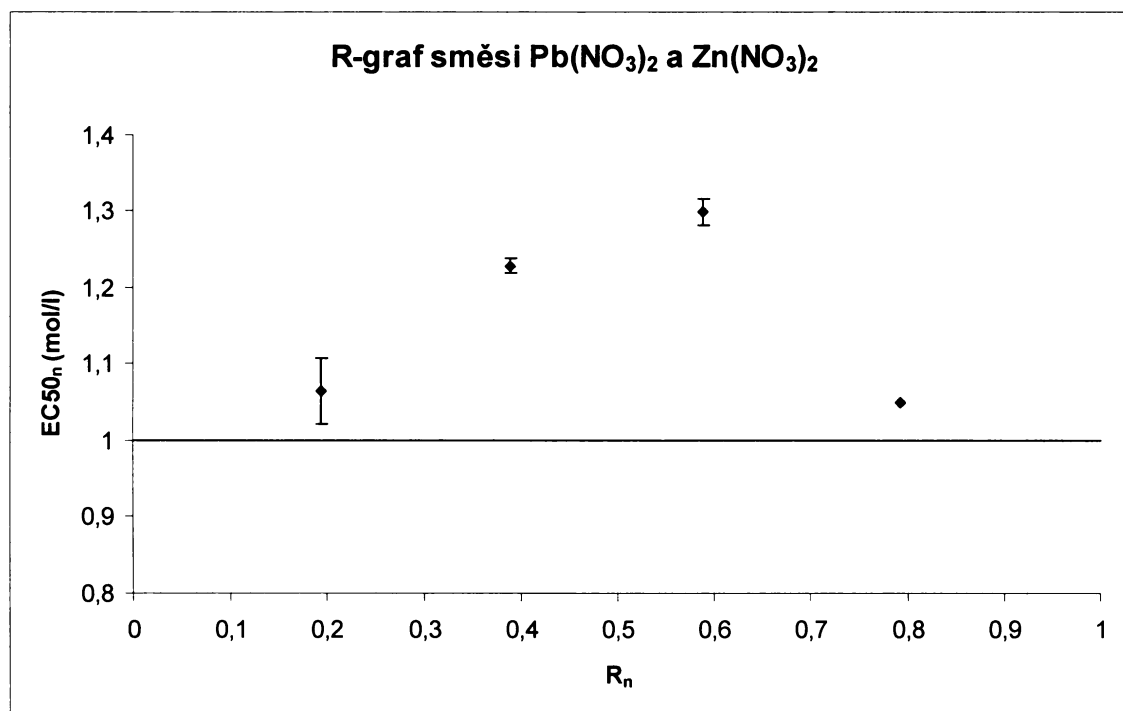
R_{Pb}	c $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	c $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	m $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
0,2	0,094	0,024	0,790	0,177
0,4	0,075	0,050	0,623	0,373
0,6	0,059	0,088	0,493	0,663
0,8	0,037	0,147	0,307	1,103

V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty molárních zlomků R_{Pb} , koncentrace směsi v mol/l, normované molární zlomky R_n a normovaná hodnota efektivní koncentrace 50 naměřená na *Tubifex tubifex*.

Tab. 10

R_{Pb}	c (mol/l)	R_n	EC_{50_n}
0,2	0,118	0,192	1,064
	0,093		
	0,074		
	0,058		
	0,046		
0,4	0,124	0,389	1,229
	0,098		
	0,077		
	0,061		
	0,048		
0,6	0,147	0,588	1,299
	0,116		
	0,091		
	0,072		
	0,057		
0,8	0,184	0,792	1,049
	0,145		
	0,114		
	0,090		
	0,071		
	0,056		

Graf závislosti normované EC50 na normovaném molárním zlomku ve směsi dusičnanu olovnatého a zinečnatého.



Obr. 10

4. ZÁVĚR

V této práci jsem se zaměřila na to, jak se mění účinek dusičnanu kademnatého, zinečnatého a olovnatého, působí-li samostatně nebo v binárních směsích. Průměrné hodnoty EC50 jednotlivých dusičnanů byly stanoveny:

- EC50 dusičnanu olovnatého = 0,070 mol/l
- EC50 dusičnanu zinečnatého = 0,074 mol/l
- EC50 dusičnanu kademnatého = 0,060 mol/l

Byli vypočítány normované molární zlomky a normované EC50. Normované EC50 byly vyneseny do grafu proti normovanému molárnímu zlomku. U směsí dusičnan kademnatý - dusičnan olovnatý a dusičnan olovnatý - dusičnan zinečnatý dochází k inhibici toxických účinků. U směsí dusičnan kademnatý - dusičnan zinečnatý se velikost toxického účinku do hodnoty $R_n = 0,35$ potencuje a dále je pravděpodobně aditivní.

Stanovením hodnot akutních toxicit pro jednotlivé dusičnany i jejich směsi jsem přispěla do databáze údajů o akutní toxicitě látek stanovených testem s červy *Tubifex tubifex*.

Použitá literatura

1. Tichý M., Alternativní metody testování toxicity látek a jejich směsí, Co a k čemu jsou alternativní metody in vitro a in silico, Sborník seminářů, str. 26-29, (2006).
2. Tichý M., Účinnost xenobiotik a chemická struktura, Avicem, Praha, (1983).
3. Ferguson J., Proc. Roy. Soc., Ser. B 127, 387, (1939).
4. Hermes J., Leeuwangh P., Much A., Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of chloro- and alkylnilines at an acute lethal toxicity level to the guppy(*Poecilia reticulata*). Ecotoxicol. Environ. Safety 8, 388-394, (1984).
5. Zahradník R., Influence of the Structure of Aliphatic Substituents on the Magnitude of Biological Effect of Substance. Arch. Int. Pharmacodyn, str. 311-329, (1962).
6. Tichý M., Cikrt M., Roth Z., QSAR Analysis in mixture toxicity assessment. SAR and QSAR Environ. Res, (1998).
7. Tichý M., Rucki M., Dohalský V., Composition deskriptor. Possible use in estimating acute toxicity of binary mixtures by QSAR analysis. International Symposium „Industrial Toxikology 1997“, Bratislava, (1997).
8. Rucki M., Tichý M., Feltl L., Odhad hazardu? – expozice směsím! Konference ERA 1997, Hodnocení rizik pro životní prostředí, „Od molekulární a buněčné úrovně po ekosystém“, Brno, (1997).
9. Roth Z., Tichý M., Rucki M., Analyse der nicht additiven Wechselwirkung der Mischung von zwei Substanzen. Biometrisches Seminar 1997, Universita fur Bodenkultur Wien, (1997).
10. Lang J., Pravda O., Doskočil J., Hůrka K., Zoologie 1. díl pro biologické fakulty, str. 165, (1974).
11. Kratochvíl J., Použitá zoologie 1 – Bezobratlí, str. 244, (1973)
12. Obrázek Tubifex tubifex, www.marlin.ac.uk, (2007)
13. Obrázek Tubifex tubifex, [http://www.miljolare.no/delt/bilder/dyr/limniske_tekningar/poj_limniske_tegninger2/tubifex2.jpg](http://www.miljolare.no/delt/bilder/dyr/limniske_teikningar/poj_limniske_tegninger2/tubifex2.jpg), (2007)
14. Tichý M., Rucki M., Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů Tubifex tubifex. Pracov. Lék. 48, No. 6, 225-230, (1996).
15. Weil C. S., Biometrics 8, str. 249-263, (1962).