

Universita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Analytické Chemie



## Souhrn disertační práce

**STUDIE A OVĚŘENÍ VZORKOVACÍCH METOD PRO  
PERSISTENTNÍ ORGANICKÉ LÁTKY**

**METODOLOGIE DATOVÉ ANALÝZY PRO POP**

Ing. Tomáš Ocelka

Praha 2010



## OBSAH

Kapitola	Strana
<b>OBSAH</b> .....	<b>3</b>
<b>1 ÚVOD/TEORIE</b> .....	<b>5</b>
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>7</b>
<b>A. Semipermeabilní membrány (SPMD)</b> .....	<b>7</b>
<b>B. Biotické organismy; biotesty</b> .....	<b>8</b>
<b>C. Vzorkovací protokol</b> .....	<b>8</b>
<b>D. Analytické metody</b> .....	<b>9</b>
<b>E. Statistické a gnostické metody</b> .....	<b>9</b>
<b>F. Aplikace</b> .....	<b>11</b>
<b>3 REFERENCES</b> .....	<b>18</b>



## 1 ÚVOD/TEORIE

Úvodní a teoretická část této práce je věnována problematice persistentních organických látek (POP), které v současnosti nabývají významu jak v oblasti ochrany životního prostředí a lidského zdraví. V této části je popsána problematika polychlorovaných bifenylnů (PCB), polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F), pesticidů (OCP), hexachlorbenzenu (HCB) a polybromovaných difenyletherů (PBDE), s ohledem na jejich persistenci, bio-akumulaci, bio-konztraci (s efektem biomagnifikace) a také dálkový přenos<sup>1-7</sup>. Dále je zmínka k rámcovým úmluvám o trvalém monitorování a snižování škodlivých látek; zejména Stockholmské konvenci (SK), která byla ratifikována i Českou republikou a vešla v platnost 17. května 2004. Tato úmluva se dotýká těchto látek: pesticidů (aldrin, endrin, dieldrin, chlordan, DDT, heptachlor, mirex, toxafen, HCB), průmyslových látek (PCB) a vedlejších produktů některých chemických procesů (PCDD/F). Práce se také dotýká těchto látek (mimo seznam SK): polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), polybromovaných difenyletherů (PBDE), lindanu a chlorovaných fenolů.

V důsledku širokého použití některých pesticidů, jsou detailně uvedeny informace o směsích p,p'-DDT/o,p'-DDT a jejich metabolitech<sup>8-13</sup>, a to také v podmínkách České republiky<sup>14</sup>. Další diskutovanou skupinu tvoří pesticidy typu HCH<sup>15</sup>; novou diskutovanou skupinou představují zpomalovače hoření (PBDE), a to přesto, že nejsou uvedeny na důležitém seznamu UNEP 12 nedůležitějších látek<sup>16-19</sup>. Jsou zmíněny jejich specifické vlastnosti<sup>20-25</sup>, spolu s jejich toxicitou<sup>26-27</sup>. Jsou také zmíněny endokrinní látky (EDC) a jejich vlastnosti<sup>20-22, 24</sup>. Dále je diskutována biologická dostupnost vybraných POP, v závislosti na jejich chemických a strukturálních vlastnostech<sup>7, 28-35</sup>. Mezi vlastnostmi, které jsou pro POP charakteristické (např. vznik tumorů, toxicita na plod, narušení hormonální rovnováhy<sup>25, 36-40</sup>), jsou také zmíněny neurotoxické účinky PBDE, které jsou podobné, stejně jako pro PCBs<sup>41-42</sup>.

Dále, jako nedílná součást inventarizace a regulačních opatření, je diskutována nutnost zajištění kvality analytických dat, zejména s ohledem na vzorkování. Výskyt POP ve složkách ŽP je spojen se skutečností, že jejich obsah je zpravidla ve velmi nízkých koncentračních úrovních. Pro jejich vzorkování ve vodách jsou zmíněny aspekty bodových i pasivních vzorkovacích technik<sup>43-53</sup>, stejně jako metodiky biotických organismů (BMO)<sup>54-64</sup> nebo sedimentů<sup>65-71</sup>. Použití BMO je spojeno s hodnocením letálních dávek, které také vychází z nativní vlastnosti gnostických metod<sup>72-84</sup>, jak bylo dříve demonstrováno v různých studiích; některé z nich byly postaveny na porovnání PS a BMOs<sup>85-86</sup>. V návaznosti na výsledky, jsou diskutovány obecné zákonitosti *in-situ* pasivního vzorkování, které mají v současnosti velké perspektivy pro monitorování ovzduší a vody, díky mnohým výjimečným vlastnostem oproti konvenčním metodám bodového odběru<sup>69, 87-96</sup>. Dále jsou popsány aplikace SPMD pro sledované látky a jejich směsi; také pro velmi nízké koncentrace, jejichž identifikace je usnadněna akumulací v čase; dále je zmíněna použitelnost SPMD pro *in-vivo* bioassay testy<sup>97-102</sup>, stejně jako testy toxicity<sup>85-86, 103-104</sup> na izolovaných extraktech po expozici SPMD. Některé z těchto testů byly použity v rámci aplikací v rámci této disertace, na základě různých publikovaných aplikací<sup>78, 105-111</sup>.

Pro praktické aplikace této práce byly diskutovány aspekty pasivního vzorkování, zejména s ohledem na použití SPMD. Jako zvláštní případ je diskutována aplikace pro redukce tuku v různých vzorcích<sup>112-117</sup>. Bodové vzorkování je zmiňováno jako kvalitního základ pro přijetí standardizovaných metod<sup>118-119</sup>, s cílem uplatnění pro pasivní vzorkování. Výběr pasivních vzorkovačů je postaven na rozdělovacím koeficientu oktanol-voda  $K_{OW}$ , což je také hlavní

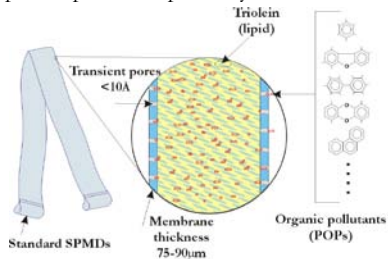
parametr pro určení skupiny sledovaných látek<sup>64, 83, 120-126</sup>. Stručně je diskutován vývoj SPMDs<sup>77, 84, 127-128</sup>, které vedl k rutinnímu používání 97-99% čistého trioletu jako absorpčního média, naplněného do membrány nízké hustoty (LDPE)<sup>81, 83</sup>; byly také zmíněny první aplikace<sup>129-131</sup>, jež vedly k patentové ochraně<sup>79-80, 132-138</sup>. V návaznosti na tuto techniku jsou popsány základní praktické charakteristiky aplikace SPMD<sup>139-140</sup>, jako nástroje pro určení časově vážené koncentrace (TWA)<sup>65, 67-71, 90, 96, 141-142</sup>. Jsou také zmíněny výhody oproti bodovým, vycházející z akumulace kontaminantu v SPMD. Tímto dochází k eliminaci episodických výkyvů v krátkém čase; je také zmíněna aplikovatelnost SPMD pro velmi nízké koncentrační úrovně pro glaciální a minerální vody<sup>83, 121</sup>. Tato metoda je také spojena s možností aplikací pro toxikologická hodnocení extraktů, stejně jako pro hodnocení fyzikálně-chemických vlastností; metodika je aplikovatelná zejména pro vodní ekosystémy<sup>80, 143-144</sup>. Standardizace a prvky QA/QC (zejména jako mezilaboratorní porovnání) jsou zmíněny jako velmi důležité aspekty pro nejbližší vývoj a praktické aplikace<sup>145-150</sup>.

Nakonec, je diskutována nutnost vyhodnocení naměřených dat z oblasti POP, pomocí komplexních statistických i alternativních metodik: exploratorní a marginální statistická analýza, <sup>85-86, 103-104, 151-152</sup>, transformace, následována analýzou hlavních komponent (PCA), faktorovou analýzou (FA), analýzou shluků (CLU)<sup>153-154</sup>, odhalující vzájemné vztahy mezi jednotlivými proměnnými a pozorováními. Je vysvětlen základní koncept praktické, statistické analýzy<sup>152, 155-156</sup>. Pro komplexní vyhodnocení jednorozměrných a vícerozměrných dat, která je právě charakteristická pro POP, je vyjádřena potřeba robustnosti použitých metod; zejména, pokud klasické statistické metody nevykazují normálně rozdělená data. Jsou zmíněny nutné podmínky Centrálního limitního teorému, které předpokládají nahodilost, nezávislost a stacionární podmínky<sup>22, 157-166</sup>, vedoucí v současnosti k aplikaci apriorních modelů rozdělení. V případě, že nejsou naplněny podmínky normality datových souborů, což je častým případem malých souborů dat bez normálního rozdělení, jsou zdůrazněny důvody pro přijetí gnostických přístupů<sup>167-170</sup>, které v současnosti mají vlastní teoretický základ, procedury a také realizované aplikace v jiných oborech<sup>139-140, 171-176</sup>. Základní popis gnostické teorie je částečně uveden v rámci této disertace; detailní popis je možné nalézt v literatuře<sup>153-154, 167-170, 177</sup>; tyto aplikace zpřístupňují použití této metody pro environmentální data<sup>139, 172</sup>.

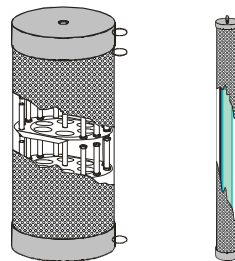
## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### A. Semipermeabilní membrány (SPMD)

Pro všechny experimentální aplikace bylo ověřeno a použito následujících membrán (SPMD): polopropustná membrána z materiálu LDPE (polyetylen nízké hustoty), naplněné 1 ml syntetického lipidu – triolein, což je přírodní triglycerid (1,2,3-tri-[cis-9-octacenoyl]glycerol) vysoké čistoty (>97%), který v SPMD vytváří tenkou absorpční vrstvu. Membrána má tyto parametry: šířka 2.5 cm (plochá, uzavřená), celková délka 91 cm, s tloušťkou stěny 75 -90 $\mu$ m, celková vzorkovací plocha okolo 460 cm<sup>2</sup>, celková hmotnost okolo 4.5 g. Schematické znázornění SPMD je uvedeno na obrázku 1. K transportu kontaminantu dochází přes póry membrány, které odpovídají přibližnému specifickému rozměru 10<sup>-9</sup>m (podobně, jako je tomu u biomembrán, které mají velikost 9.8 10<sup>-9</sup>m)<sup>153-154, 177</sup>. Jejich použití je konfrontováno s nestandardními PS, přes jejich relativně široké použití a snahy kalibrace pro různé látky<sup>121, 124-125, 178-179</sup>. Na druhé straně, použití zkrácených membrán je výhodné pro separaci organických látek od většiny tukové matrice<sup>180-181</sup>. Obrázek 2 uvádí celkové vzorkovací uspořádání pro vzorkování v povrchové a podzemní vodě. Pro podzemní vody byl ochranný koš vyvinut pro použití dvou SPMD (např. jedné SPMD pro chemické látky a jedné SPMD pro toxicitu). Vývoj koše pro podzemní vody spadá do koncepční práce v rámci této disertace a je předmětem podání patentové přihlášky.



Obrázek 1 Schematické zobrazení SPMD



Obrázek 2 Uspořádání vzorkování pomocí SPMD – pro vzorkování povrchových (vlevo) a podzemních vod (vpravo)

Na základě modelů pro chemickou expozici SPMD stanovené látky, je její okolní koncentrace odhadnuta následovně:

$$C_{w,i} = C_{s,i} V_S / R_{s,i} t \quad \text{Eq. 1}$$

Člen  $R_{s,i}$  je rychlost vzorkování látky  $i$  a je koncepčním propojením klasické extrakce a pasivního vzorkování pomocí SPMD. Rychlost vzorkování je udáván v L.d<sup>-1</sup>, což může být interpretováno jako objem vody (L), dialyzován za den pro danou látku ( $i$ ) a čas ( $t$ ); nalezené množství látky v SPMD je  $C_{s,i}$ , celkový objem SPMD je  $V_S$ . Rychlosti vzorkování jsou základem pro odhad koncentrace okolní koncentrace  $C_{w,i}$ . Tyto byly použity z různých publikačních zdrojů od různých autorů pro dané látky: PAU<sup>120, 122</sup>, PCDD/F<sup>132, 137, 182-195</sup>, PCB<sup>73, 121, 137, 193, 195-201</sup>, pesticidy<sup>137, 195-196, 201-203</sup>. Výpočty byly také převzaty z podobných aplikací<sup>121, 199, 204-205</sup>. V pozdější fázi aplikací bylo použito přístupu výpočtu pomocí referenčních látek PRC

(Performance Reference Compounds); jde o metodu, kdy se do SPMD před jejich aplikací přidávají různé interní standardy (označené PRC), které mají podobné vlastnosti stanovovaných látek, ale nejsou buď v ŽP přítomny nebo nejsou předmětem zájmu. Vzájemné porovnání jejich obsahů před a po expozici je určitou kalibrací *in-situ*<sup>127, 137, 183, 190, 206-209</sup>. Obecné předpoklady použití byly adaptovány do podmínek vlastních aplikací<sup>81, 121, 189, 210-211</sup>.

### B. Biotické organismy, biotesty

Biotické organismy, *Dreissena polymorpha* byly použity pro srovnání s SPMD; před vlastními aplikacemi byly přechovávány v čisté vodě, s pískovým ložem. Při aplikacích byly umístěny v polypropylenových koších, v počtu 100 kusů/koš a upevněny na stejné místo jako SPMD.

Pro vyhodnocení toxicity bylo použito dialyzátů z SPMD po expozici při různých aplikacích<sup>79</sup>: čistírna odpadních vod Ostrava, velmi čistá prostředí<sup>144, 212-213</sup>. Výběr příslušných testů byl proveden s ohledem na jejich citlivost k určitým skupinám POP. Toxikologická odezva byla odvozena z parametru EC<sub>50</sub>, vyjádřena jako  $V_{TOX}$  – jde o parametr, který byl vyvinut během prvních aplikací<sup>107</sup>. Mezi testy byly nejčastěji použity následující<sup>79, 101, 104, 107, 110-111, 144, 213-215</sup>: bakterie *Vibrio-fischeri*, řasy *Daphnia pulex*, ryby *Oncorhynchus mykiss*, testy na řasách *Scenedesmus subspicatus* a/nebo *Selenastrum capricornutum*. Testy na bioluminiscenčních bakteriích byly převzaty ze standardních testů (ISO 11348)<sup>79, 216</sup>.

### C. Vzorkovací protokol

Vývoj a přijetí standardního protokolu pro vzorkování, manipulaci a následnou analýzu bylo hlavní podmínkou porovnatelnosti a kvality výsledků<sup>217</sup>; mnohé z prvků jakosti byly řešeny v rámci této disertace a byly také nakonec využity pro rutinní aplikace a akreditaci. Přehled jednotlivých prvků je uveden níže a je možno je vnímat jako doporučení pro různé aplikace.

Pořadí	Operace	Popis/Požadavky/Blank (frekvence) místo/projekt/šarže/sada *)= je-li aplikovatelné
1	Výroba SPMD	Definované vlastní podmínky QA/QC/FaBl (0/1*/1*/0)
1	Uchování	--/vzduchotěsná nádoba, okolo -10°C/PrBl (0/1*/1*/0)
2	Transport	--/vzduchotěsná nádoba, ≈0 °C/TrBl (1/1*/0/0)
2	Manipulace před/po expozici	Umístění/vyjmutí SPMD do/z držáku/krátký čas/FaBl (1/1*/0/0)
2	Expozice	Do doby 30 dnů/bezpečnost místa, teplotní záznam/Bez použití blanků
3	Vnější očista	Odstranění všech nečistot/promytí vodou, krátký čas/ReBl (0/1*/0/0)
4a	Dialýza	250 ml rozpouštědla, 2x opakování/24h pro každé rozp./FaBl*, PrBl (0/1*/1*/0)
5	Operace s dialyzátem (chem. par.) Operace s dialyzátem (biotesty)	Slití rozpouštědel/spikování pomocí izotopických metod/viz 4a Slití rozpouštědel/bez spikování, použití alikvotního podílu/ viz 4a
6	Čištění	Odstranění nečistot, oligomerů/v rámci analytické metody/viz 4a + ReBl (0/0/0/1)
7	Frakcionace (chem. par/immunoassay)	Izolace analytických frakcí/v rámci analytických metod/viz 6

Pořadí	Operace	Popis/Požadavky/Blank (frekvence) místo/projekt/šarže/sada *)= je-li aplikovatelné
8	Zakoncentrování	10 $\mu$ l/rozpuštědlo nonan/viz 6
9	Chemická analýza	Kvantifikace/v rámci analytické metody/viz 6
10	Immunoassay/bioassay	Toxikologická odezva/v rámci analytické metody/viz 6
11	Datová analýza, reporting	Okolní koncentrace pomocí Rs/PRCs; PCA, FA, GA/příprava dat/vyhodnocení QA/QC, vyhodnocení blanků
SP	Vzorkovací plán	Nutno zpracovat pro každý projekt zvlášť/viz 11 /viz 11

Tabulka 1 Zkrácený protokol pro manipulaci, vzorkování a analýzu SPMD

#### D. Analytické metody

Stanovení PAU bylo prováděno pomocí metody HPLC-FLD v kombinaci s GC/MS/MS. Parametry PCDD/F, PCB a OCP byly analyzovány metodou GC/MS/MS na instrumentaci GCQ nebo PolarisQ (Thermoquest). Metody čištění a optimalizace MS/MS byly vyvinuty a popsány v minulosti<sup>218</sup>. Použité metody byly akreditovány dle ČSN EN ISO/IEC 17025.

#### E. Statistické a gnostické metody

V této disertaci naměřená data vykazovala specifické znaky, které jsou společné pro ultrastopové analýzy: některé z měřených parametrů byly velmi *nizké* nebo byly *pod mezí detekce*, vyžadující následné cenzorování. Rozsahy dat byly spíše malé (jen zřídka opakovatelná měření na jednom místě v daném čase), distribuce dat byla zřídka *normální* nebo *log-normální*, data se také vyznačovala *polymodalitou (nehomogenitou)*, byla sešikmena. Proto datové analýzy vyžadovaly použití exaktních, robustních a spolehlivých postupů – od transformace po vyhodnocení relevantních kvantitativních charakteristik, jak také uvádí různé publikované zdroje<sup>103, 139-140, 153-154</sup>. Na rozdíl od statistických postupů, byly použity postupy gnostické<sup>103, 139-140</sup>, v minulosti již aplikované<sup>219-221</sup>; tato metoda má rigidní základ a z prvních aplikací ukazuje zajímavý potenciál pro použití v oblasti životního prostředí<sup>85, 103-104, 139</sup>.

Pro statistické metody, prvním krokem byla exploratorní analýza datového souboru, popisující distribuci dat. Z různých parametrů šikmosti, špičatosti a grafických charakteristik (jádrového odhadu, histogramů, grafů symetrie, polosumy, krabicových, kvantilových a rankitových Q-Q grafů) byly hodnoceny znaky normality. Test Jarque-Berra ( $\alpha = 0.05$ ) byl použit jako první test normality sledovaného parametru. Jako transformace byla použita metoda Box-Cox<sup>153-154, 166, 222</sup>, jako jedna z nejčastěji aplikovaných metod. Po transformaci dat byly aplikovány vícerozměrné metody.

*Analýza hlavních komponent (PCA)*, byla aplikována pro zjednodušení datové matrice původních proměnných do nové sady latentních proměnných, nazvaných hlavní komponenty; velký počet proměnných je charakteristický pro POP, kde počet původních proměnných nezřídka přesahoval 100 (kongenery PCB a PCDD/F). Počet důležitých hlavních komponent byl určen pomocí Cattellova scree grafu.

*Faktorová analýza (FA)*, byla aplikována za účelem určení základních latentních proměnných, určující datovou strukturu. Analýza byla založena na korelační matici a získané faktory byly podrobeny *faktorové rotaci* Varimax, která umožňuje snadnější interpretaci faktorů, postihující

maximální proměnlivost souboru tím, že minimalizuje počet znaků, jež vykazují vysokou zátěž faktoru.

*Shluková analýza (CA)*, byla použita jako určitá exploratorní, vícerozměrná datová analýza, řešící klasifikaci parametrů a pozorování. Metoda obsahuje klasifikační proceduru, která je založena na měření vzdálenosti mezi objekty, podle čehož se pak rozlišují shluky podobnosti. Podobnost v tomto případě je určena pomocí Euklidovských vzdáleností. Tato analýza byla použita komplementárně k metodám PCA a FA.

*Gnostická analýza (GA)* – díky silnému matematickému základu této metody<sup>139-140</sup> byly v rámci této práce provedeny analýzy<sup>85-86, 103-104</sup>, které byly dále rozpracovány do praktického guide<sup>223</sup>. Hlavním úkolem v rámci této práce bylo přinést alternativu statistickým metodám, postavenou na robustním základě a pro menší soubory dat. V současnosti jsou jednotlivé knihovny přeneseny systému open-source, jazyka R<sup>224</sup>.

Rozdíly mezi statistickým a gnostickým přístupem jsou shrnuty v tabulce 2.

Problém/ aspekt	Přístup	
	Statistika	Gnostika
Velikost datového souboru	Velké soubory dat	Individuální data a malý soubor dat
Apriorně stanovený statistický model dat	Vyžadován	Není podmíněn. Datový model je použit z dat.
Hlavní teoretický základ	Aditivní míry přes algebru sigma	Neaditivní míry přes dvojí bi-algebru
Axiomatika	Formální, založena na centrálním limitním teorému	Nativní, založena na přírodních zákonitostech, vycházející z dat
Pojem pravděpodobnosti	Definován formálně	Odvozen matematicky z Clausiovy entropie dat
Pojem informace	Uveden formálně	Odvozen matematicky z Clausiovy entropie dat
Inherentní geometrie	Euklidovská	Riemannová, definovaná daty
Optimum kritéria odhadu	Formální (např. nejmenší čtverce nebo max. věrohodnost)	Minimální ztráta informace nebo zvýšení entropie je stanoven variačním principem
Variační charakteristiky	Neexistující	Variační teorémy pro chyby dat, informace a entropie
Meze datového nosiče	Nejednoznačné, v závislosti na subjektivních rozhodnutích	Stanoveny daty
Robustnost odhadu	V klasické metodice – neexistují V robustní metodice - dosažitelné pomocí superstruktur mimo rozsah základní teorie	Vychází ze základní teorie jako jeho inherentní a nativní charakter
Konvergence dvou teorií	Není známo	Dokázáno na velmi přesných datech
Vazba na existující teorie v přírodě	Nedefinováno	Ověření těsné vazby ke klasické termodynamice, relativistické mechanice; také i ke klasické i robustní statistice

*Tabulka 2 Základní srovnání statistického a gnostického přístupu*

## F. Aplikace

Experimentální práce, které byly provedeny v této práci, se dotýkají těchto aplikací: redukce tukové matrice za účelem zefektivnění analytického postupu stanovení POP<sup>225</sup>, pasivní vzorkování v čistém prostředí, s cílem určení geogenního pozadí (glaciální a minerální voda) a identifikace klíčových látek v pitné (minerální) vodě<sup>80, 136, 212, 226-228</sup>, průmyslové aplikace, zaměřené na hodnocení kontaminace v procesu čištění odpadních vod, také i sledování splachů kontaminace silnic, splachů kontaminace po povodních<sup>107, 135, 143, 213, 226, 229</sup>; nakonec monitorovací studie, zaměřené na kvalitu řek, mající mezinárodní význam z hlediska použité metodiky<sup>230-232</sup>, odkrývající postupy sledování interakce chemických parametrů a toxických účinků. Dále jako aplikace pro remediace, která byla spojena s identifikací zdrojů kontaminace podzemních vod (integrální čerpací testy (IPT))<sup>233</sup>. Pro svůj rozsah aplikace byly do práce vybrány jen charakteristické studie. V rámci všech studií byla data podrobena vhodné datové analýze: statistická (EDA, PCA, FA, CLU) a gnostická; censorování a interpretace LOD jsou řešeny mimo tuto práci<sup>234</sup>. Z různých aplikací je možné formulovat některé ze závěrů, které jsou ve zkrácené podobě uvedeny níže.

- 1) Metoda SPMD jako *nástroj pro redukcí tukové matrice* – tato metoda je aplikovatelná pro obsah tuku větší jako 1%(m/m), což odpovídá materiálům<sup>1</sup> jako jsou *krmné směsi* (premixy), *potraviny* (krmné oleje, vepřové sádlo, máslo, přírodní a sušená vejce, párky, salámy, čokoláda, šlehačka, sýr, hovězí a vepřové maso, ryby, drůbež, ledviny, játra, sušené mléko),  *lidský podkožní tuk*. Pro vybrané druhy byla výtěžnost (přidaných isotopicky značených standardů) v intervalu 70-95%. Toto je velmi dobrá shoda s dříve publikovanými daty<sup>120, 122</sup> a mezi jednotlivými druhy vzorků.
- 2) Při hodnocení *antropogenního pozadí v solném dole Wieliczka* – profil PAU i kvantitativní obsah odráží geogenní pozadí. Výsledek paralelních odběrů vykazuje RSD v intervalu 1 - 13% pro jednotlivé látky, který zahrnuje nejistotu vzorkování i analytického zpracování. Z profilu sledovaných PAU byly nalezeny jen čtyři látky. Zejména ty, které mají 3 aromatická jádra; ze skupiny, které má 4-aromatická jádra byl identifikován pouze pyren. Nebyly identifikovány žádné z karcinogenních PAU, jako benzo(a)pyren. Koncentrační úrovně byly velmi nízké (pro nejčistší profil F-II): fenantren (0,25 ng/l), antracen (0,03 ng/l), fluoranten (0,18 ng/l) a pyren (0,18 ng/l). Naproti tomu, byly nalezeny dobře měřitelné koncentrace PCB, s profilem málo rozdílným od profilu technických směsí (Z-25 a FII). Pro každý vzorek byly octaCB izomery detekovány jako poslední přítomnou skupinou (bez Nona- a DekaCB). Nejbližší je tento otisk charakteristický pro Delor 106 (s dominancí Hexa-CB). Detekovatelné koncentrace byly nalezeny okolo 5- 80 pg/l v sumě všech detekovatelných PCB.

Pro *hodnocení výskytu POP v minerálních vodách Poděbradka*, úrovně kontaminace jsou také velmi malé, pokud byly výsledky srovnány s jinými studiemi a limitními hodnotami pro pitnou vodu. Tabulka 3 uvádí sumární výsledky PAU, PCB a vybraných OCP; tyto hodnoty jsou uvedeny jako přibližné, jelikož mnohé z nalezených hodnot byly nalezeny pod mezí detekce použitých metod.

---

<sup>1</sup> Po dobu používání metody bylo ověřeno na všech materiálech. V rámci této práce jsou ryby a nekroptické tkáně

S chemickými parametry, jako PAU, PCB a OCP byly stanoveny parametry toxicity *Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna* a *Vibrio fischeri*. Přes velmi malé koncentrační úrovně byla identifikována sekundární kontaminace PCB přes podloží. Odezvy použitých *bioassay* testů nebyly pozorovatelné u PAU nad 16 ng.l<sup>-1</sup>. Změny v koncentraci PCB od 22 do 168 pg.l<sup>-1</sup> vykazují změny toxicity a také u všech uvedených pesticidů. Hodnota koncentrace 470 pg.l<sup>-1</sup> HCH spolu s DDT v koncentraci 26.7 pg.l<sup>-1</sup> způsobily významný vliv na bakterie, zatímco koryši a řasy nevykazovaly jakoukoli citlivost na tyto koncentrační úrovně. Nejčastěji nalezeným kontaminantem z analyzovaných látek ze skupiny PAU byl fenantren s nejvyšší úrovní kontaminace 13.9 ng.l<sup>-1</sup> v místě Buda.

pg/L	Buda	Plazy	Malý Vestec	Poděbrady
Suma PAU	16159	4380	2807	179
Suma PCB	95	168	72	22
Suma HCH	220	140	220	470
HCB	7.9	8.3	8.3	2.2
Suma DDT	4.2	4.1	3.9	26.7

Tabulka 3 Koncentrace vybraných pesticidů (pg.l<sup>-1</sup>)

### 3) Porovnání SPMD a biotických vzorků

V důsledku minulého použití PCB, zejména v letech 1959 - 1984 v původním Československu<sup>15, 235-237</sup>, jsou tyto látky předmětem sledování a hodnocení prostorové a časové distribuce. K jejich změně distribuce také došlo pravděpodobně i vlivem minulých povodní. Kontaminace PCB<sup>238-240</sup> také odkrývá kontaminaci 2,3,7,8-TCDD v přítomnosti mono- a non-orto PCB<sup>53</sup>, jak bylo zjištěno v minulých monitorovacích studiích<sup>15, 241-242</sup>. Hodnocení kontaminace řek, půdy, pevných částic, sedimentů a fluvialních vrstev půdy byly již publikovány<sup>15, 226, 241-244</sup>, kontaminace vod pomocí PS prozatím nebyla zjišťována a publikována.

Z výsledků této studie bylo zjištěno že kontaminace řeky Labe má charakter technické směsi Delor 103, zatímco řeka Morava Delor 106. Celková kontaminace řeky Labe v porovnání s řekou Morava je přibližně 5x vyšší. Koncentrace non-orto a mono-orto PCB v *Dreissena polymorpha* jsou podstatně menší, než nálezy v řekách pomocí SPMD, zatímco 2,2'-di-orto-chlorované PCB jsou prakticky stejné. Dále byla zjištěna dominující akumulace tri-orto CB, stejně tak 2,6-di-orto- a tetra-orto-chlorovaného PCB. Toto je pravděpodobně dáno vysokou termodynamickou stabilitou a rigidní strukturou těchto látek (dihedrální úhel, vzájemně kolmá aromatická jádra, interní bariery rotace). Biotické organismy vykazují menší metabolickou schopnost pro výše chlorované PCB kongenery. Ukazuje se, že biotransformace jsou omezeny na kongenery v pozici atomu chlóru Tri- a Tetra-. Méně chlorované PCB ukazují větší schopnost biotransformace. Obecně se také ukazuje, že biokontaminace PCB ve vodních organismech koreluje se stupněm chlorace, stereochemií a také rozpustností v tucích.

### 4) Hodnocení POP v řekách České republiky

Systematické monitorování řek ČR pomocí skupiny PS<sup>2</sup> bylo realizováno od roku 2003, na

<sup>2</sup> SPMD (pro nepolární látky), DGT (pro kovy), POCIS (pro polární farmaceutika a pesticidy)

19 profilech (od roku 2007 na 21 profilech).

Jsou prezentovány časové i prostorové profily pro každou skupinu sledovaných látek. Pro statistické hodnocení bylo také ukázáno, že data nemají normální distribuci a vykazují odlehle výsledky. Z tohoto důvodu, jsou (za jednotlivé roky) níže uvedeny jak průměrné hodnoty, tak i mediány. Jsou diskutována data pro období let 2003-2007.

Pro PCB, nejvyšší koncentrace byly nalezeny na řece Bílina-Ústí n/L. ( $C_{\text{průměr/medián}} = 4155 / 3263$  pg/l), nejnižší v profilu Labe-Debrné ( $C_{\text{průměr/medián}} = 426 / 330$  pg/l); toto místo, může být považováno jako pozadí v rámci tohoto monitoringu.

Jako pravděpodobný zdroj kontaminace pocházejí ze starých depozic a průmyslu, v důsledku širokého použití v Československu<sup>15, 235-237</sup>. S ohledem na Delor 106 and Delor 103 – technické směsi, které byly v minulosti používány, je patrná změna izomerového vzoru po jednotlivých letech. Celkově, na základě celkových koncentrací v jednotlivých profilech isomery Tri- až Tetra-CB rostou (3-16%), zatímco Hexa-CB klesají (1-15%).

Kontaminace jednotlivých profilů jsou diskutovány detailně, např. profil Labe -Valy je pravděpodobně nejvíce ovlivněn kontaminací z Pardubice-Semtín, s dominantním obsahem Delor 103<sup>15</sup>. Dále však dochází ke změně profilu až k profilu Labe-Obříství, který je situován za Spolanou Neratovice. To znamená, že Spolana-Neratovice také přispívá k PCB kontaminaci a to zejména dominantním obsahem směsi Delor 106; je to nové zjištění, jelikož hlavní kontaminace byla z tohoto zdroje přisповána OCP a PCDD/Fs<sup>15, 51, 245</sup>.

Co se týká kontaminace OCP, nejvíce kontaminovaným profilem byla identifikována řeka Bílina-Ústí ( $C_{\text{průměr/medián}} = 3939 / 2991$  pg/l) a Labe-Obříství ( $C_{\text{průměr/medián}} = 3892 / 3231$  pg/l), zatímco nejnižší koncentrace byly nalezeny v profilu Jizera-Předměřice ( $C_{\text{průměr/medián}} = 663$  pg/l). Jsou pozorovány změny v časových i místních trendech. S ohledem na plošné používání těchto látek v minulosti je identifikace jednotlivých zdrojů problematická. Jako výsledek z publikovaných dat<sup>244</sup> je evidentní poměrně dobrá shoda s nálezy pesticidů v půdě a v sedimentech, nalezených v hodnotách stovek ng/g<sup>44, 47, 49</sup>, také biotických organismech<sup>15, 241</sup>, a to i přesto, že nálezy SPMD vykazují pouze rozpuštěnou fázi, bez metabolické přeměny.

Z hlediska PCDD/F, nejvíce kontaminovaným profilem těmito látkami je Odra-Bohumín ( $C_{\text{průměr/medián}} = 3428 / 2152$  fg/l), což také koresponduje s nejvíce nalezenou kontaminací PAU pro tento profil ( $C_{\text{průměr/medián}} = 223 / 185$  ng/l). Tyto obsahy nejsou překvapivé, v důsledku existence zdrojů chemického, koksárenského a metalurgického průmyslu<sup>242</sup>. Nelze opomenout ani výstup z ČOV, který zpracovává vody z komunální i průmyslové sféry. Na druhé straně, pro případ PCDD/F) je nutno říci, že velký počet měření (84-100%) byl pod mezí detekce (LOD) přes cca měsíční akumulaci. Výjimkou jsou některé měřené isomery, jejichž hodnoty jsou nad LOD, zejména TCDD, TCDF, PeCDF (počet měření s LOD je v rozsahu 0-16%).

Z výsledků vypočítaných distribucí gnostických funkcí vyplývá, že hodnoty se odlišují jak z hlediska jejich střední hodnoty, také z hlediska jejich variability. Je zjevné, že distribuce nejsou normální (Gaussovy), oblasti jsou konečné, hustoty jsou symetrické, zejména pro PBDE, PAU a PCB. Zvláštní pozornost je věnována PBDE, kdy v důsledku vysoké variability dat bylo použito robustních (gnostických) postupů hodnocení. Tvar DF(PBDE) může je srovnatelný s PCDD/F, což predikuje podobné chování, např. při bioakumulaci, což také může vyplývat z jejich podobné molekulární struktury.

Obdobně, statistická EDA odhalila nenormální distribuci a asymetrickou hustotu pravděpodobnosti, což vedlo k použití transformace dat před MVDA. Data byla transformována Box-Cox metodou.

PCA byla aplikována na transformovaná data, jako rozlišení různých charakteristických vzorů, spolu s porovnáním biokonzentrace těchto parametrů v SPMD. Touto metodou byly zjištěny různé shluky, primárně PCB, dominujícími  $\Sigma$ Tri- $\Sigma$ TetraCB,  $\Sigma$ PBDE,  $\Sigma$ PAU, spolu s  $\Sigma$ TCDF a  $\Sigma$ PeCDF. Druhý shluk je tvořen výše chlorovanými CB, zejména ( $\Sigma$ Penta- $\Sigma$ OctaCB),  $\Sigma$ DDT (a jejich metabolitů) a také  $\Sigma$ HCH.

Robustně odhadnuté korelační koeficienty (gnostickou metodou)<sup>103, 139-140</sup> byly testovány pro statistickou významnost; výsledky poskytovaly podobné výsledky, avšak bez nutnosti transformace dat v případě gnostické metody. Ukázalo se také, že výběrem z obou přístupů se docílí nejlepších výsledků; použití gnostického přístupu je výhodné zejména, pokud výsledky neodpovídají normálnímu rozdělení a datové sady mají malý rozsah. V takových případech je také vhodné použít robustních korelací statistických (tj. Spearman, Kendall), resp. gnostických.

#### Identifikace endokrinních látek pomocí SPMD

Endokrinní látky (EDC) reprezentují skupinu různých látek, jako POP (PCB, PAU, OCP, PBDE), další průmyslově vznikající látky jako vedlejší produkty, jako PCDD/F) a také hormony. Tyto látky mohou způsobovat mnoho nepříznivých efektů ve vodním prostředí<sup>246-250</sup>; EDC působí přes tzv. nukleární receptory, nenukleární steroidní receptory, nesteroidní receptory, širotké receptory, enzymatické cesty, zahrnuté v steroidních biosyntézách a/nebo metabolismu, a početné mechanismy, které se soustřeďují do endokrinního a reprodukčního systému<sup>251-252</sup>.

Metoda SPMD ve standardním uspořádání byla použita pro identifikaci EDC, jako PAU, PCB, OCP, PBDEs, triclosanu (TCS) and methyltriclosanu (MeTCS); v paralelním uspořádání byly sledovány odezvy *in vitro*, vedoucí k odhalení cytotoxicity (Cyt 1/IC50), antiestrogenity (AES 1/IC50), antiandrogenity (AAND 1/IC50) a AhR-indukované aktivity (Bio-TEQ)<sup>253</sup>. Studie byla zaměřena na lokalitu v okolí Brna, s cílem sledování vlivu této lokality na kvalitu vody řek Svitava, Svatka, s hodnocením ČOV v Modřicích u Brna

Po diagnostice EDA, indikujících některé odlehle hodnoty a asymetrické, zešíkmené distribuce, byl proveden kombinovaný test šikmosti a špičatosti, vedoucí k statistickému testu  $21.13 > \chi^2(0.95, 2) = 5.992$  (PBDE). Tím normalita zamítnuta a data byla podrobena Box-Cox transformaci. Transformovaná data byla poté hodnocena vícerozměrnou analýzou: CLU, PCA a FA. Dendrogram CLU (Euklidovské vzdálenosti a Wardovy aglomerační metody) spolu s PCA je uveden na Grafu 1a-d.



Ze všech dostupných korelací (S-Plus) byla použita sada následujících *neparametrických* metod (viz tabulka 4).

ID	Popis	Metoda
SP	Klasická statistika	Pearson
SK	Robustní statistika	Kendall
SS	Robustní statistika	Spearman
GN	Matematická gnostika	Kovanic

Tabulka 4 Přehled použitých metod korelace

Použití těchto metod sloužilo pro odhad příslušných korelačních koeficientů a vzájemných vztahů jednotlivých skupin parametrů. Vyhodnocení jednotlivých korelací udává tabulka 5. Důležitost použitých korelací je viditelná z uvedeného přehledu.

Method	SP	SK	SS	GN
SP	0	0.136	0.147	0.161
SK	0.136	0	0.084	0.087
SS	0.147	0.084	0	0.047
GN	0.161	0.087	0.047	0

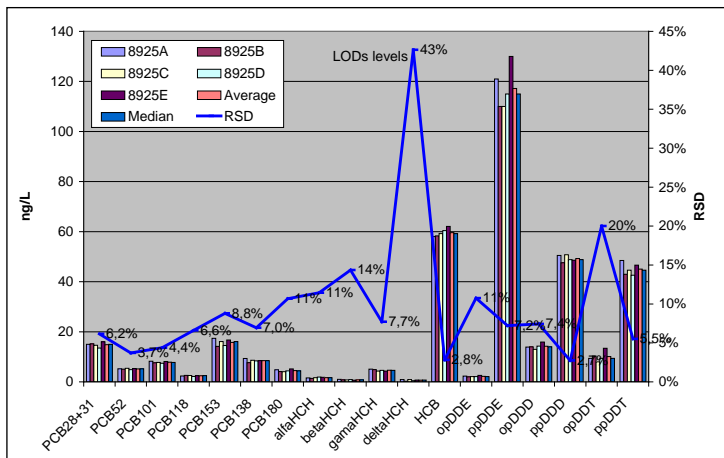
Tabulka 5 Srovnání jednotlivých korelačních koeficientů a příslušných metod

Z tohoto přehledu je patrné, že nejmenší rozdíly jsou mezi vektory Spearmanovy a gnostické korelace, což dokumentuje nejlepší shodu mezi těmito metodami. Obě metody jsou nejvýhodnější pro další vyhodnocení vzájemného vztahu dat. Kendalova (robustní statistická) metoda vykazuje také zajímavé výsledky. Nelze však opomenout fakt, že gnostická korelace je odhadnuta z gnostické distribuční funkce, což umožňuje použití censorovaných dat, které jsou pro POP významné. Klasická metoda Pearsonovy korelace, přes její nejčastější a implicitní použití, vykazuje nejméně robustní výsledky.

Specifické závěry je také možné uskutečnit pro použití regresních modelů, kde vedle statistických regresních modelů bylo použito modelu gnostického. Všechny metody byly realizovány metodou vážených nejmenších čtverců (WLS). Nejlepších výsledků bylo dosaženo gnostickou metodou ("gnostic") s  $R=0,986$  a  $STD = 0,0044$ , spolu s metodou "fair" s  $R = 0,979$  a  $STD = 0,0063$ . Jinou vhodnou metodou byla "Andrews" with  $R = 0,704$  a  $STD = 0,0063$ . Ve všech výsledcích je zřejmý opačný efekt PCB oproti PAU. Tato skutečnost je vysvětlitelná v důsledku seskupení jednotlivých parametrů a tím ztrátou informace, která je charakteristická nejen pro PCB, PAU, ale pro i jiné skupinové parametry. Je však velmi důležité, že gnostická metoda vykazuje velmi zajímavé výsledky a tak otevírá, z pohledu autora, velkou možnost pro aplikace a to nejen v oblasti ŽP. Její použití je korunováno zejména v případech malého rozsahu dat a tam, kde data z hlediska statisticky nevykazují normální distribuci.

Vyhodnocení opakovatelnosti

V rámci práce na všech studiích, byla aplikována řada QA/QC. Jedním z podstatných prvků je opakovatelnost, jak je příkladně uvedena v Grafu 2. Je zde uvedena opakovatelnost (v parametru RSD), z paralelní expozice pro parametry PCB, OCP.



Graf 2 výsledek paralelní expozice SPMD pro PCB a OCP

Povrchová voda, N=5, PCB je vyhodnocení v rozsahu indikátorových kongenerů

Detailní výsledky jsou k dispozici v digitální podobě, které jsou součástí zdrojových dat k této práci. Z validačního protokolu byla stanovena rozšířená nejistota v rozsahu 20-30%. Ze všech dat je patrná RSD v rozsahu 5-15%. Je potřeba zdůraznit, výsledky paralelní expozice zahrnují nejistotu vzorkování i analytického stanovení. Pro výjimečné případy, kde hodnoty se blíží limitě stanovitelnosti, je RSD v rozsahu 20-40%. Podobné výsledky byly získány pro parametry toxicity, v rozsahu RSD 5-25%.

Všechny uvedené výsledky potvrzují zajímavé možnosti aplikace SPMD, jako velmi kvalitních pasivních vzorkovačů, použitelných ve velmi širokém rozsahu koncentračních úrovní.