

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Možnosti odhalování toxických látek ve vzorcích tkání

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Alexandr Popkov, Ph.D.

Zpracovala: Jana Hlásková

Datum odevzdání práce: 23.5.2008

Abstrakt

The development of humankind depends on human activities; especially changes in the environment are of huge impacts. It is not feasible to test an influence of new environmental factors (pollution, changes of landscapes, etc.) on human beings directly. However, it is more feasible to explore other animal species who live in the affected ecosystems and who were influenced by these ecosystem changes. For example, evolutionary pressure of high radiation background to lower consumption of polyphenolic precursors for biosynthesis of pigments in favour of their consumption for radio protective utilisation in a bird population was described in the literature. The aim of this thesis was to carry out a quantitative analysis of soil samples and to plan further study of polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in food chains. The soil sample was extracted and the extract was analyzed by combination of gas chromatography and mass spectrometry. The results of studies of polycyclic aromatic hydrocarbons amount in soil were evaluated, following investigation of accumulation of these compounds in the next level of the food chain was planned and possible danger of higher occurrence in human food, having negative influence on human health, was assessed. I assume that this study could contribute to further thinking of how to lower the amount of xenobiotics in the environment where not only humans but also animals, which can also suffer, live. I would suggest stricter implementation of the EU legislative REACH and its strict following at dealing with chemical materials in order to eliminate the negative impact on ecosystems.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Možnosti odhalování toxických látek ve vzorcích tkání jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne: 23. května 2008

Jana Hlásková
podpis studenta

Poděkování:

Děkuji především vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Alexandru Popkovovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, trpělivost a ochotu vynaloženou v průběhu práce. Též bych chtěla poděkovat paní Ing. Kamile Růžičkové za její pomoc při zpracování vzorku zeminy a jejího vyhodnocení. Poděkování patří i panu RNDr. Jiřímu Šebestiánovi, CSc. za přístup k jeho fotodokumentaci.

Obsah:

ÚVOD

1. SOUČASNÝ STAV	8
1.1 ÚPRAVY BŘEHŮ A JEJICH VLIV NA PTACTVO- MÁ PŘEDCHOZÍ STUDIE	8
1.2 VLIV CHEMICKÉHO ZNEČIŠŤOVÁNÍ	11
1.2.1 DDT	11
1.2.2 Aldrin	11
1.3 PTACTVO A RADIACE	13
1.3.1 Vlastnosti některých radioizotopů jódu a cesia	13
1.3.2 Radiace a anitioxidanty u volně žijících ptáků	15
1.4 HROMADĚNÍ ŠKODLIVIN V POTRAVĚ	19
1.4.1 Žížaly:	19
1.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	21
1.5.1 Analytické využití	24
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	27
2.1 CÍL PRÁCE	27
2.2 HYPOTÉZA	27
3. METODIKA	28
3.1 VLASTNÍ ČINNOST: EXTRAKCE ZE ZEMINY, STANOVENÍ POLYARMÁTŮ (PAU)	28
4. VÝSLEDKY	31
5. DISKUZE:	34
6. ZÁVĚR:	38
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
8. KLÍČOVÁ SLOVA	42
9. PŘÍLOHY:	44

Úvod:

Vývoj lidské společnosti závisí na aktivitách člověka, obzvlášť velké dopady mají zásahy do životního prostředí. Není praktické zkoumat vliv nových činitelů životního prostředí (znečištění, změny krajiny atd.) na člověka, nýbrž je vhodnější prozkoumat jiné druhy živočichů, kteří žijí v pozmeněném prostředí a byli ovlivněni těmito změnami ekologického systému. Může se stát, že některé druhy se sníženou odolností vůči nastávajícím změnám mohou vymírat nebo kvalita jejich života se může snížit v důsledku zdravotních a jiných změn. Výsledky studií se posléze vyhodnotí a vytipují se činitelé, které mohou mít negativní vliv na člověka. Tyto činitelé se cíleně prozkoumají již ve vztahu k člověku. Jako součást metodické přípravy k vypracování bakalářské práce jsem použila živočišný model (stěhovavé ptactvo) pro vyhodnocení vlivu vážného narušení životního prostředí na stav populace a její vývoj. Bylo známo, že se chystá betonování a upravování břehů řek Malše a Vltavy v rámci protipovodňových opatření. Ornitologové předpokládali, že tyto úpravy povedou ke vzniku překážek pro migraci stěhovavých ptáků, což negativně ovlivní jejich populaci.¹ Z citované zprávy jsem měla k dispozici fotografickou dokumentaci pořízenou před zásahem do ekosystémů. Vyfotila jsem stejné části břehů Malše 11. dubna 2007 v pokročilejším stádiu zásahů. Porovnáním stavu migračních cest před a po zásahu jsem dospěla k závěru, že obvyklé chování stěhovavých ptáků bude do velké míry narušeno vlivem provedených změn. Následná pozorování ornitologů tento předpoklad potvrdila.² Vybrané páry fotografií jsou níže popsány v této práci.

Podobná zjištění francouzských autorů o vlivu radiačního zatížení ptačí populace na její odolnost vůči dalším negativním vlivům životního prostředí³, mě vedla k rozhodnutí, zabývat se experimentálním studiem živočišného modelu přenosu antropogenních karcinogenů na začátku potravinového řetězce. Motivací byla snaha přispět k pochopení faktorů ovlivňujících akumulaci karcinogenů v těle člověka. Podobným způsobem se dají řešit i problémy toxikologické. Pro vlastní experimentální projekt jsem zvolila palčivý problém přenosu polyaromatických uhlovodíků v potravinovém řetězci, jak člověka, tak i dalších zvířat; jmenovitě stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorku zeminy, která se nachází na

začátku potravinového řetězce, jakožto součást potravy žížal. Stanovení se provedlo pomocí kombinace extrakce, chromatografického rozdělení a hmotnostně-spektrometrického kvantitativního měření. Vlastní výsledky studií obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v půdě se vyhodnotily, naplánoval se navazující výzkum akumulace těchto látek v dalším stupni potravinového řetězce a posoudila se nebezpečnost zvýšeného výskytu polycyklických aromatických uhlovodíků v lidské potravě, což může mít negativní vliv na zdraví člověka.

1. Současný stav

1.1 Úpravy břehů a jejich vliv na ptactvo- má předchozí studie

Moje předchozí studie vycházela z vlivů prostředí na ptactvo žijící na břehu řeky Malše (viz obr. 1. , obr. 2. , obr. 3. , obr. 4. , obr. 5.). Dalo by se říct, že naše příroda začíná být obrázkem člověka a jeho tvorby než přirozeným prostředím, v němž by zvířata žila bez jakéhokoliv vlivu na jejich zdraví. U nás jsou sice vytyčené chráněné krajiny a oblasti, ale položme si otázku, jestli lidé musí zasahovat do přirozených teritorií ptactva. Já si myslím, že ne, a že by šlo zachovat vzácné ekosystémy. Naše populace je ale zvyklá na určitou životní úroveň, která spočívá třeba v budování betonových břehů z prostého důvodu pohodlnosti a také zachování lidského obydlí. V třetím tisíciletí se čím dál tím více objevují povodně, a proto lidé začínají břehy upravovat.



Obr.1. Průběh konání stavby

Foto: Jana Hlásková



Obr. 2. Zde je zásah do přírody člověkem a jeho těžkou technikou, která sice vytvořila moc pěkně vypadající a čisté břehy, ale na druhé straně to ohrozilo život všech žijících živočišných tvorů. Mně osobně se ale tento zásah líbí, protože to promenádu velice provzdušnilo a zkulturnilo.

Foto: Jana Hlásková



Obr. 3. Příroda nedotčená člověkem. Zde nebyla provedena protipovodňová opatření. Můžeme zde shlédnout břehy pokryté narostlým křovím. Tato fotka byla pořízena na podzim roku 2005.

Foto: RNDr. Jiří Sebastian, CSc.



Obr. 4. Práce dělníků při úpravách břehů. Jsou tu k vidění označené stromy, které se musely vykácet. Vidíme, jak vypadala cesta po které mohli chodit lidé okolo řeky.

Foto: Jana Hlásková

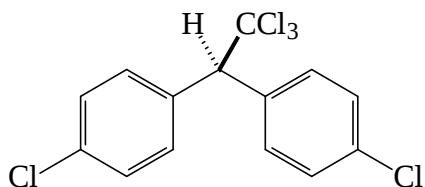


Obr. 5. Dnes už pouze nádherné zpevněné kamenné hráze, okolo kterých se vztyčují stromy, které jsou upravené do určitého tvaru. Také můžeme vidět procházející se lidi po asfaltové pěšině.

Foto: Jana Hlásková

1.2 Vliv chemického znečišťování

1.2.1 DDT



Látku DDT⁵ syntetizoval v roce 1874 německý chemik Othmar Zeidler v rámci své doktorské disertační práce v laboratořích Prof. Adolfa von Baeyera na Universitě ve Štrasburku. Insekticidní vlastnosti DDT byly objeveny až mnohem později a to v laboratořích společnosti Geigy AG roce 1939.

V roce 1940 látku patentovali ve Švýcarsku jako prostředek sloužící proti obtížnému hmyzu. Průmyslová výroba se zahájila v roce 1942. Na trhu byla pod označením Gesarol (pro ochranu rostlin) a Neocid (pro ochranu zdraví lidí). Za velmi krátkou dobu našla široké uplatnění a nabyla velkého ekonomického významu.

Na bojištích 2. světové války armády USA a Velké Británie používaly DDT jako vysoce účinný insekticid proti vši šatní a komárům. Zabránily tak vzniku epidemií nemocí, jejichž zárodky jsou těmito druhy hmyzu přenášeny. V té době se již označovala tato látka zkratkou DDT. Od roku 1945 se DDT používal celosvětově a je v současné době považován za první moderní syntetický insekticid. DDT v poměrně krátké době zachránil mnoho životů před malárií, kterou přenášeli komáři. Ti se samozřejmě tímto pesticidem hubili. DDT se také používal na hubení mandelinky bramborové a dalších škůdců v rostlinné výrobě, v ovocnářství a zelinářství i v lesním hospodářství. Koncem období DDT byla kniha Rachel Carsonové: *Silent Spring* (Mlčící jaro), vydaná v roce 1962 ve Spojených státech. Autorka knihy obvinila DDT ze zničujících účinků na přírodu a životní prostředí. Odezva veřejného mínění na tuhle knihu byla obrovská. Přispěla k zákazu používání DDT.⁵

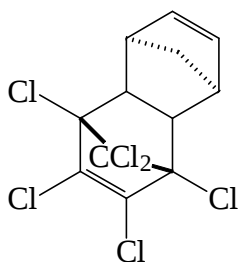
Na hmyz DDT působí jako nervový jed. DDT je lidský karcinogen, může způsobit rakovinu jater, dočasné poškození nervového systému, poškozuje reprodukční

systém. Většina pesticidů na základě DDT byla v Evropě zakázána. DDT je velmi nebezpečný pro ekosystémy. Tento pesticid ničí komáry a jejich larvy i ostatní živočichy dokonce poškozuje i člověka. DDT bylo hodně využíváno v zemědělství, hlavně pro hubení škůdců. Do těla savců se dostává potravinovým řetězcem a pak se zde usazuje. U DDT se objevila takzvaná kumulativní toxicita, což znamená, že se příznaky otravy objeví až po dosažení určité koncentrace v těle živočicha či člověka. Naše společnost může být této působení pesticidu vystavena například kontaminovaným jídlem, či z kontaminovaných živočichů, při požívání plodin, které rostly v kontaminované půdě.

U nás a v mnoha jiných zemích DDT je zakázán od roku 1974. DDT se ukládá v tukách.

Biologové z oxfordské univerzity zjistili, že DDT může mít určitý vliv na skořápky ptactva. Studovali vejčka, která byla vystavena DDT a našli ztenčené skořápky. Snadno praskají, když pták sedí na vejcích a mláďata se nevylíhnou nebo zemrou. Některé druhy ptáků - například orli bělohlaví, sokoli stěhovaví a kondori kalifornští - to přivedlo prakticky na pokraj vyhubení. Také se zjistilo, že DDT má značný vliv na jejich zdravotní stav.⁶

1.2.2 Aldrin ($C_{12}H_8Cl_6$)



V minulosti se používal jako insekticid pro plodiny jako brambory, řepu, obiloviny, cukrovou třtinu, bavlnu, kukuřici. Také se využíval na ochranu dřeva proti termitům. V současné době se kvůli jeho toxicitě nepoužívá. Jeho výroba je zakázána v celé Evropské Unii a v některých dalších zemích. Stále se ale používá v některých rozvojových zemích. V ČR aldrin a jeho produkty rozpadu se mohou nacházet v půdě,

ještě tam přetrvávají z doby kdy se používal. Také proto může být přítomen v surovinách dovezených ze zemí kde jeho použití stále ještě zakázáno nebylo. Jeho výskyt může být i v textilní surovině.

Rozklad aldrinu

Rozklad aldrinu urychluje sluneční světlo a bakterie, jejichž účinkem se rozloží na dieldrin. Dieldrin je velmi toxická látka pro vodní organismy a ptactvo. V půdě se může nacházet roky. Nejvíce ohrožen tímto produktem rozkladu je vodní hmyz. Aldrin je velmi toxický pro člověka, právě díky tomu, že se v lidském těle rozkládá na dieldrin, který přímo vykazuje toxické působení. Příznaky otravy aldrinem jsou následující: bolesti hlavy, závratě, celková malátnost, nechutenství a zvracení, křeče. Aldrin s dieldrinem a endrinem (a dalšími produkty rozkladu) může při dlouhodobé expozici vyvolat rakovinu jater.⁷

1.3 Ptactvo a radiace

Studuji obor aplikovaná radiobiologie a toxikologie a mimo jiné se v tomto oboru zabývám studiem radiační zátěže na člověka, například v důsledku uniku radioaktivních látek z jaderných elektráren. To se nestává často, v jaderných elektrárnách je dobře vyškolený personál. Před 20 lety se stala jaderná havárie Černobylské elektrárny. Mělo to strašlivé dopady jak na lidskou populaci, tak stejný dopad na krajinu a v ní žijící zvířata včetně ptactva. Jak lidé tak i zvířata jsou ohroženi vlivem záření. U člověka jsou nejvíce prostudovány vlivy záření. Mezi nejdůležitější účinky patří:

Akutní nemoc z ozáření (ANO) – ta se většinou projevuje již po ozáření dávkou od 1Gy, zde asi nejvíc je způsobeno ohrožení krvetvorných orgánů. Vyšší dávky záření způsobí střevní nemoci a to se projevuje drastickými změnami ve sliznicích epitelu, v případě přežívání (7-10 dní) dojde k odezvě v nervové tkáni a to se projeví jako psychická dezorientace, dále pohybové poruchy, křeče a následuje smrt.

Akutní lokální změny – projeví se po ozáření časně a to ve změnách na kůži.

Nenádorové poškození – to vzniká dlouhodobou expozicí, může to být chronický zánět kůže.

Zhoubné nádory – mohou být vyvolány i opakovanými malými dávkami záření.

Genetické změny – jsou to pozdní účinky, které postihují potomstvo. Projevují se buď poruchou zárodku nebo potratem nebo narozením dítěte s genetickou vývojovou vadou, většinou s Downovou nemocí.

Takový má vliv radiace na člověka.⁸ Teď bych chtěla popsat vliv radiace na ptactvo.

Po černobylské havárii uplynulo už téměř dvacet let, ale stále je kladeno mnoho otázek, které se týkají zdraví a životního prostředí. Při explozi reaktoru se udělal velký radioaktivní oblak a ten kontaminoval velkou část Evropy a to radioaktivním materiálem, jako jsou radionuklidy jódu a cesia. Radioaktivní ^{131}I se především zabudovává ve štítné žláze, má poločas rozpadu 8 dní. Radioaktivní ^{137}Cs , má poločas rozpadu 30 let a ještě v mnoha částech Evropy stále je významným radionuklidem v životním prostředí. Následkem černobylského výbuchu došlo ke zvýšení četnosti rakoviny štítné žlázy u dětí, dále leukémii a dalším nádorovým onemocněním. Zvířata byla též poškožována a to tak, že radiací byla kontaminována půda, takže třeba i rostliny, kterými se zvířata živí obsahovaly radionuklidy, houby a bobulky obsahovaly vysoké koncentrace radionuklidů.⁹

1.3.1 Vlastnosti některých radioizotopů jódu a cesia

Při nehodách reaktoru se velmi lehce dostanou do půdy, v půdě se vstřebají do rostlin. Rostliny se pak stanou potravou skotu, krávy začnou produkovat kontaminované mléko a následně poté požitím mléka člověkem se ^{131}I a ^{137}Cs dostane do lidského organismu. Vzhledem ke specifickému vychytávání jódu ve štítné žláze se stane kritickým orgánem pro akutní (hypofunkci) i pozdní účinky ozáření (nádory).

Stroncium ^{90}Sr

To se dostává podobně k člověku navíc s kontaminovanou vodou, která odtéká do vodních toků a moří, přes plankton, který se metabolizuje v organismu ryb, ty pak představují riziko pro člověka.

Jód ^{131}I a další izotopy

Je to jak γ - a β - zářič. Jeho poločas rozpadu je 8,05 dne. Po černobylské havárii se velmi zvýšilo onemocnění štítné žlázy u dětí v podobě autoimunitní tyreoiditidy nejen vlivem ^{131}I , ale také působením nadměrné jodové profylaxe. Poté se u dětí ze zamořených oblastí v Ukrajině a Bělorusku vyskytovalo 80 onemocnění štítné žlázy na 1 milion dětí za 1 rok, zejména karcinomy. U většinové dětské populace nevystavené nadměrné zátěži radioizotopy je 1 karcinom na 1 milion dětí za rok.

Jako prevence se podává jodid draselný, který zvyšuje poměr stabilního versus radioaktivního jódu v potravě a snižuje množství radioaktivního jódu, který se dostane do štítné žlázy.¹⁰

1.3.2 Radiace a antioxidanty u volně žijících ptáků

Celosvětově tisíce kilometrů čtverečních země jsou kontaminovány radiací, jakožto výsledek černobylské katastrofy. Též existují znatelné rozdíly v okolní radiaci mnohých oblastech, které ukazují nezanedbatelné úrovně.

Radiace a antioxidanty se navzájem ovlivňují v metabolických pochodech. Nedostatek antioxidantů jako jsou karotenoidy a vitamíny A, E, může zvýšit poškození DNA způsobené volnými radikály vznikajícími pod vlivem ionizujícího záření; z toho vyplývá pokles antioxidantů v přítomnosti velkých úrovní radiace. Tato redukce antioxidantů je jedním z faktorů odpovídajících za nárůst úrovní mutací živočichů žijících v radioaktivně kontaminovaných oblastech kolem Černobylu.

Antioxidanty jsou důležitými biochemikáliemi, které poskytují DNA a dalším molekulám ochranu proti volným radikálům v důsledku působení zvýšené úrovně radiace. Tak jako před 20 lety s tím měli zkušenosti záchranáři a lidé likvidující následky Černobylské katastrofy, u nichž nacházely velice nízké hladiny antioxidantů, což je výsledkem spotřeby antioxidantů pro vychytávání volných radikálů. Před začátkem migrace ptactva může nastat situace, kdy vítr přenáší z havarovaného reaktoru větší množství radionuklidů a antioxidanty ptáků se spotřebovávají více. Druhy ptactva migrujícího přes okolí Černobylu budou trpět nižší úrovní antioxidantů, než ty co

nemigrují přes zamořené oblasti. V literatuře se uvádí tři odlišné důvody způsobující redukci úrovní antioxidantů u volně žijících organismů.

- 1) extrémní fyzická aktivita spojována s dlouhými migračními vzdálenostmi,
- 2) množství antioxidantů ve vejcích,
- 3) množství antioxidantů v signálech používaných pro sexuální komunikaci (zabarvení peří).

Množství antioxidantů ve vejcích

Samičky bezobratlých, ryby, ptáci, ukládají velké množství antioxidantů do svých vajec. Antioxidanty hrají významnou roli v reprodukci během vývoje embrya a v sezeních mladých. Toto období se hodně spojuje s vzrůstajícím stresem ke kterému jsou embrya velmi citlivé. Samičky ukládají velké množství antioxidantů málo rozpustných ve vodě, jako jsou karotenoidy a vitamíny A, E, do svých vajíček, srovnatelně se zbývajícím zásobou ve vlastním těle. Experimentálně dodaný karotenoid ukázal, že schopnost snášet vejce samic racků je limitována dostupností karotenoidů. Rozsáhlá studie koncentrace antioxidantů u volně žijících ptáků v okolí Černobylu ukázala, že reziduální koncentrace po započtení vnější radiační úrovně je poměrná relativní velikostí vajec. U samic ptáků, které jsou vystaveny radiaci, se zvyšuje poměr velikosti vajec k velikosti těla.

Zabarvení peří

Barevné sexuální signály jsou založeny na karotenoidech. Karotenoidy mohou být syntetizovány řasami, bakteriemi, houbami, rostlinami. Ptáci nejsou schopni sami připravit karotenoidy a ukládají do peří karotenoidy získané potravou. V okolí Černobylu bylo sledováno složení peří hnízdícího ptactva všech druhů, některé bylo zabarvené žlutě, oranžově, červeně a to vše bylo způsobené karotenoidy. Deriváty melaninu jsou zodpovědné za hnědé, černé nebo červenohnědé pigmenty.³

Ptačí druhy se liší v reakci na radiaci. Pokles hustoty jejich populace je souvislý s množstvím radiace v prostředí. Nejvýznamnější pokles populace souvisel s úrovní radiace a byl zaznamenán u druhů s barvou opeření vycházející z karotenoidů, velkými

vajíčky v porovnání k tělesné hmotnosti a velkou vzdáleností migrace a rozptylu. Všechny tyto vyjmenované faktory souvisí s přítomností antioxidantu. Z toho vyplývá, že snížené množství antioxidantu zřejmě urychluje pokles populace vystavené radiaci. Karotenoidová báze zbarvení se běžně vyskytuje u řady zvířat včetně ptactva. Zvířata nemohou syntetizovat karotenoidy, proto karotenoidy potřebné pro zbarvení či fyziologické procesy musejí být přijímány potravou. Oproti ptákům mohou zvířata produkovat jiný typ barviv, jako jsou například barviva na bázi melaninů. Ptáci s karotenoidovou bází opeření přesunují velké množství karotenoidů do peří, a to i přestože musí zabezpečit i jiné využití těchto látek. Zjištěno bylo, že druhy s karotenoidovou bází zabarvení peří, avšak nikoli druhy s melaninovou bází zabarvení peří, měly největší úbytek hojnosti populace v souvislosti se vzrůstající úrovní radiace. Nejjednodušším vysvětlením bylo, že ptáci ve vysoce kontaminovaných oblastech trpí ztrátou antioxidantů, včetně karotenoidů.

Studie vlaštovek z Černobylu ukázaly, že volné a uložené antioxidanty, včetně karotenoidů, byly redukovány o více než polovinu jejich původní úrovně z nekontaminovaného kontrolního prostředí. To se projevilo na zabarvení opeření u migrujících vlaštovek několik měsíců po opuštění hnízdiště. Rozdíl v množství antioxidantů v kontaminovaném a nekontaminovaném prostředí možná vznikl z důvodu rozdílného využití a dostupnosti antioxidantů nebo obou těchto faktorů. U antioxidantů v játrech byl rozdíl hladin karotenoidů dán rozdílem v pohlaví. U ostatních karotenoidů nebyl rozdíl daný pohlavím mezi Černobylem a kontrolním prostředím prokázán.

Pokud by se dostupnost měnila v závislosti na prostředí, pak bychom očekávali rozdíly hladin antioxidantů u obou pohlaví.

Moller et al. analyzoval zdroj poklesu populace vlaštovek na Ukrajině před a po černobylské katastrofě. Protože míra reprodukce a dožití se dospělosti u vlaštovek v kontaminované oblasti neumožňuje udržení stabilní populace musí být udržena pouze migrací ze sousedících nekontaminovaných oblastí. Tato odchylka roste signifikantně pro ptactvo z Černobylu po katastrofě v roce 1986, zatímco před rokem 1986 nebyl žádný rozdíl mezi populací z Černobylu a kontrolním prostředím.

Ptačí vejce obsahují velké množství antioxidantů (vitamíny A a E, ale také karotenoidy), které dávají vaječným žloutkům jejich charakteristickou barvu. Tyto antioxidanty na mateřském základě poskytují embryu důležitou ochranu před volnými radikály před, během a po vylíhnutí. Zjištěno bylo, že rozdíly v poměrné velikosti vajec různých druhů ptáků vysvětlují mezidruhové rozdíly ve vztahu k hojnosti potravy a úrovni radiace. Neprokázal se však obdobný vliv u věku při první reprodukci, velikosti hnízda, maximálního počtu hnízdění za rok a míry přežití. Ptáci investují velké množství antioxidantů do produkce vajíčka, mohou tak vyčerpat zásoby v těle. Tyto samice musí takto získat velmi kvalitní potravu, aby mohly produkovat vajíčka s normální hladinou antioxidantů. Pokud jsou u ptáků vystavených radiaci hladiny cirkulujících a uložených antioxidantů výrazně sníženy, tak jak to ukazuje studie na vlaštovkách, produkce relativně velkých vajec v poměru k velikosti těla způsobí větší omezení v dostupnosti antioxidantu.

Blount a kol. při studiu schopnosti kladení vajíček u racků ukazuje, že ptačí samičky v silně kontaminovaných oblastech budou mít větší spotřebu karotenoidů, zejména pokud snáší relativně velká vajíčka. Při působení radiace lze předpokládat, že index tělesné hmotnosti bude klesat s hojností ptactva. Větší druhy mají menší ztráty, než druhy menší. Malé druhy ptactva mají relativně rychlejší metabolismus než větší druhy (Smidt-Nielsen 1984), takže během normálního metabolismu produkují větší množství volných radikálů. Relativně menší zásoby antioxidantů u malých druhů tak činí tyto druhy citlivějšími k poklesu antioxidantů zvláště pokud jsou vystaveny radiaci, která urychlí spotřebu antioxidantů. Navíc větší druhy ptactva obývají výrazně větší prostor než druhy menší. Z toho tedy vyplývá, že větší druhy budou obývat prostor s více úrovněmi radiace než druhy menší. Vzhledem k enormnímu množství úrovní radiace kolem Černobylu (Shestopalov 1996) budou větší druhy obývat častěji než druhy nekontaminované prostory než druhy menší.

Z výsledků studie vyplývají následující.

Za prvé očekáváme, že jedinci v okolí Černobylu s opeřením zabarveným barvivy na bázi karotenoidů budou mít světlejší zabarvení peří než jedinci z kontrolních oblastí v Ukrajině.

Za druhé očekáváme, že po období, kdy se obvykle zásoby antioxidantů pro stěhovavé ptactvo obnovují, budou mít druhy v okolí Černobylu výrazně nižší množství antioxidantů v těle, zatímco druhy v kontrolních oblastech nikoliv.

Za třetí očekáváme, že množství antioxidantů ve vajíčkách nakladených v okolí Černobylu bude oproti kontrolní skupině sníženo. Moller, Surai & Mousseau (2005) skutečně dokazují, že množství antioxidantů ve vajíčkách vlaštovek z Černobylu bylo výrazně sníženo.

Alternativní verze: protože dostupnost antioxidantů může omezovat produkci vajíček u ptáků, naznačujeme, že ptáci z vysoce kontaminovaných oblastí mohou redukovat velikost vajíček, aby přežili nižší dostupnosti antioxidantů. Další možností je redukce objemu hnízdiště, jak to bylo zaznamenáno pro vlaštovky z Černobylu (Moller a kol. 2005).

I když byla tato studie zaměřena na zvířata žijící v radioaktivním prostředí jako je Černobyl a střediska pro nukleární pokusy, může být zdrojem informací i pro jinde žijící živočichy. V přírodě totiž dochází také ke kolísání hladin radioaktivity v důsledku velkého množství radioaktivních izotopů zejména v horských oblastech. Dosud neexistují studie zabývající se biologickými důsledky takového kolísání radioaktivity v přírodě.

Ptačí druhy se liší různou mírou vnímavosti radiace. To odráží vztah mezi hojností ptactva a úrovní radiace. Míra vnímavosti radiace souvisí s charakteristikami ptactva spojenými s využitím antioxidantu: karotenoidová báze opeření, vzdálenost letu za potravou, a to do určité vzdálenosti, velikost vajíček. Tato zjištění dokazují, že antioxidanty hrají klíčovou roli pro určování mezidruhových rozdílů v odolnosti k působení radioaktivní kontaminace.³

1.4 Hromadění škodlivin v potravě

Jedním z živočichů, které jsou bezprostředně vystaveny působení půdních xenobiotiků je žížala. Žížala byla zvolena jako modelový živočich pro studium přenosu polyaromatických uhlovodíků z půdy do organismu pomocí GC-MS.

1.4.1 Žížaly:

Řadíme mezi kroužkovce. Mají bledé až načervenalé tělo. Jejich tělo je složeno z nestejných článků. Články jsou rozděleny vnitřními přepážkami. Rozdíly jsou mezi prvním a posledním článkem. První článek slouží k orientaci. Trávicí trubice žížal probíhá od hlavového konce až po vylučovací otvor. Podél trávicí trubice vede nervová páska, která v přední části přechází do jednoduché mozkové zauzliny. Cévní soustavu tvoří dvě cévy hřbetní a břišní. Dýchají celým svým povrchem těla. Mají pokožku která obsahuje slizové buňky, ty vylučují sliz. Ten napomáhá pohybům žížaly společně se štětini. ¹¹ Žížaly nejsou chráněny proti účinkům ultrafialového slunečního záření, a díky tomu se objevují na zemském povrchu jen za deštivého počasí. Každá žížala má ve svém těle uloženy samičí a samčí pohlavní orgány. Žížala je hermafrodit tedy obojetník. Ona se ale sama nemůže oplodnit musí si najít dalšího jedince k sobě aby si s ním vyměnila genetickou informaci. K páření dochází zejména v noci na povrchu země.

Žížala se živí zemí. Rozdrť ji svými svalnatým žaludkem, stráví a zbytek pak vyloučí z těla ven se svým trusem. Nejlépe se žížalám daří v půdě pod trávničky, kde jich je asi v jednom krychlovém metru až pět set současně.

Vysoká hojnost žížal v zemi je zárukou velmi dobré úrody. ¹²

Žížaly přispívají svojí činností k vytváření humusu, jsou užitečné ke kypření půdy a ke kompostování. Tím zvyšují úrodnost půdy. Půdu obracejí, provrtávají ji chodbami a hnojí svými výkaly. Pokusy se prokázalo, že z půdy ze které byly odstraněny, se zmenšil výnos pšenice o 50%.

Dospělá žížala se pozná, když má vyvinutý opasek. Žížaly vylézají ven při dešti (jim se zaplavují chodbičky a žížaly by se mohly utopit), dále půda obsahuje málo kyslíku a žížaly se dusí, ale když vylezou na povrch hrozí jim nebezpečí predátorů. ¹¹

Tělesné rozměry obvykle do 30cm někdy i více. Žížala má hodně nepřátel a to zejména v denní době například ptáci, oni opatrně krácejí po zemi a hledají žížaly, které se pohybují těsně pod povrchem půdy. Stačí jen jediný úder zobákem a žížala je lapena. Ta se ale nevzdá tak snadno. To díky štětinám ty jí napomáhají dostat se rychle ven a zpět pod zem. Velkým silným žížalám se to někdy podaří. Někdy ale část těla žížaly zůstane ptákovi v zobáku, když se žížala přetrhne z opaskem tak má štěstí, protože jí zase ta

utržená část naroste, ale když je žížala přetržená uprostřed tak vždy zahyne.¹³ Žížalami se neživí jen ptactvo ale také ježci, jezevci a krtci. Krtek je největším nepřítelem žížal a to z toho důvodu, že žije stejně jako oni pod zemí. Je prokázáno, že krtek sní až padesát žížal za den, a v zimě dokonce ještě mnohem více.¹²

Žížaly tvoří základ potravních řetězců, jsou totiž potravou různých druhů ptactva jako jsou například špačci, drozdi, racci, vrány a červenky. Největší hrozby pro žížaly je použití chemikálií a to jako postřik v zemědělství či únik chemikálií z továren.¹⁴ Nejen žížaly jsou ohroženi ale i zvířata která se jimi živí. Je to ptactvo které má potom špatné opeření nebo mohou vznikat vady orgánů. Pro udržení nebo zvětšování úrovně populace žížal v půdě je třeba výrazně omezit použití chemikálií v zemědělství a lesnictví, případně se mu úplně vyhnout.



Obr.1. Žížala¹⁵

Žížaly se dělí do tří skupin podle způsobu jejich života:

a) První skupina (velké, tmavě zbarvené). Oni budují chodbičky do kterých si zatahují potravu z půdy.

b) Druhé jsou středně velké, šedé nebo bělavé oni se zavrtávají nanejvýš 30cm do země, živí se odumřelými kořínky.

c) Do třetí skupiny se řadí žížala hnojná, která žije ve vrstvě opadanky a živí se tlejícími rostlinnými zbytky. Tato žížala má rychlejší metabolismus, než žížala půdní,

protože v padance je větší teplota než v nitru půdy. Žížala hnojní má výhodu, že nemusí potravu vyhledávat, má kolem sebe nadbytek potravy.

Žížala je hodně prospěšná v zahrádkářství pro výrobu vermikompostu (trus žížal), který se používá jako kvalitní hnojivo. Tradičním rekreačním využitím žížal je rybaření. Zápach žížaly hnojní přitahuje lépe ryby než zápach žížaly obecné.

Žížala obecná vylézá v noci na povrch a tady hledá odumřelé části rostlin, a pak je zatahuje do svých chodbiček. Od žížaly hnojní se liší tím, že nesnáší pobyt ve vodě. Díky tomu jí můžeme vidět za deště na povrchu půdy.¹⁶

Půda je základní složkou potravního řetězce. Je složena ze dvou složek: neživé a živé složky. Mezi neživé části půdy se řadí částice jílu, hlíny, v některých půdách i písku a větší či menší kamínky. Podle převládajících pevných částic půdy se dělí půdy na různé druhy: písčité, hlinité a jílovité. Každá z nich jinak propouští vodu a jinak obdělává. Všechny složky půdy se navzájem ovlivňují a dodávají půdě úrodnost. Je to schopnost půdy poskytovat rostlinám dostatek živin, vody a vzduchu. Člověk záměrně úrodnost půdy zvyšuje a to tak že ji vhodně obdělává, hnojí ji a zavlažuje. Úrodnost půdy v okolí obydlí umožňuje kvalitní život v prostředí s dostatkem trávy, zahrad a lesů.

Žížaly žijí převážně v zásaditých až neutrálních půdách. Kyselé půdy jim vůbec nevyhovují.¹⁷

1.5 Hmotnostní spektrometrie

Tato metoda je založena na ionizaci molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů. Tímto způsobem vzniklé molekulové ionty a fragmenty, se separují dle poměru hmotnosti k náboji m/e . Když ionty dopadnou na detektor je určeno jejich množství. Hmotnostní spektrum tvoří závislost četnosti jednotlivých iontů na poměru m/e .

Instrumentace

Spektrometr hmotnostní je složen ze třech částí a to z ionizační komory (iontový zdroj), dále disperzního prvku (separátor, analyzátor) a detektoru. Dalšími součástmi spektrometru je dávkovací zařízení, iontová optika, registrační zařízení, řídicí počítač.

Iontový zdroj

Tady se tvoří kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty a jejich fragmenty. Nárazem elektronů dochází k ionizaci nebo taky působením elektrostatického pole nebo chemickou ionizací.

V případě ionizace nárazem elektronů iontový zdroj je tvořen komůrkou, v níž ve vakuu protéká proud elektronů mezi rozžhavenou katodou a anodou o energii 10-70 eV. Když elektron dopadne tak vyrazí molekuly látky, většinou jen jeden elektron a vznikne molekulový ion-radikál:



Obdobným způsobem vznikají záporně nabitě ion - radikály v případě spekter záporných iontů.

Pokud má vzniklý molekulový ion nadbytek vnitřní energie, kterou získal z ionizačního zdroje, tak se rozpadne za vzniku kladně nabitého ionizačního fragmentu a neutrální částice. Rozpad trvá tak dlouho, dokud vzniklý fragment obsahuje přebytek energie převyšující energii některé z přítomných vazeb.

Separace iontů (disperzní prvek)- iontová past

Z ionizační komory částice vstupují do elektrostatického urychlovače iontů a z něho pak dále pokračují do separátoru iontů, zde dochází k rozdělení iontů podle jejich poměru m/e . Za tímto účelem se využívají interakce iontů s magnetickým a elektrickým polem.

A) Analyzátor magnetický:

Tady je postup rozdělení iontů v homogenním magnetickém poli. Toto už je mnohokrát osvědčený postup. Ionty z iontového zdroje se urychlují elektrickým polem a když projdou štěrbinou tak prochází částice homogenním magnetickým polem. Na nabitou částici v magnetickém poli působí dostředivá síla, která je úměrná intenzitě tohoto pole a proto dochází k zakřivení drah letících částic. Při určité konstantní hodnotě intenzity magnetického pole a urychlujícího napětí máme poloměr zakřivení dráhy přímo úměrný efektivní hmotnosti částice. Při těchto podmínkách projdou výstupní štěrbinou analyzátoru jen ionty s jedinou určitou hodnotou m/e . Jiné ionty zůstávají odcloněny. Hmotnostní spektrum se získá měřením, které probíhá postupně v určitém rozsahu intenzit magnetického pole. Výše uvedené uspořádání nazýváme jednoduchou fokusací.

B) Analyzátor s dvojitou fokusací

K vývoji přístrojů s dvojitou fokusací vedla snaha o zvýšení rozlišovací schopnosti. Však nevýhodou jednoduché fokusace je skutečnost, že pokud máme ionty o stejné efektivní hmotnosti tak mohou mít různou energii, tím pádem se tedy neumožňuje dosažení vysoké rozlišovací schopnosti analyzátoru. Cílem proto je získat jako první částice o stejné energii a ty poté separovat. Aby tohoto cíle bylo dosaženo, tak používáme elektrostatický sektor, předřazený magnetickému separátoru. Elektrostatický sektor tvoří dvě zakřivené kovové desky, které mají na sobě elektromagnetický potenciál a které fungují jako válcový kondenzátor s nehomogenním elektrickým polem. Na výstupní štěrbinu elektrostatického sektoru jsou fokusovány ionty které mají různé efektivní hmotnosti, ale shodují se v kinetické energii (ostatní ionty jsou zachyceny okraje štěrbin). Svazek iontů o stejné kinetické energii vstupuje do magnetického sektoru, ten separuje ionty o stejné kinetické energii a totiž dává spektrum o vyšším rozlišení. Zařízení které využívají kombinace elektrického a magnetického sektoru označujeme za přístroje s dvojitou fokusací.¹⁸

1.5.1 Analytické využití

Hmotnostní spektrometrie se často využívá ve strukturní analýze. Rozborem hmotnostního spektra se získává podstatná informace o funkčních skupinách v molekule

analyzované látky. V tomto spektru jsou obsaženy linie o určité efektivní hmotnosti, které jsou charakteristické pro jednotlivé skupiny a to v důsledku jejich specifické separace.

Hmotnostní spektrometrie je významná i v kvantitativní analýze, zejména pro organické látky. V kvantitativní analýze, hmotnostní spektrometrie funguje na skutečnosti, že existuje lineární vztah mezi iontovým proudem (což je tedy relativní intenzita linie příslušného iontového fragmentu) a koncentrací látky, při níž se iontové proudy jednotlivých složek se vzájemně neovlivňují. Velmi významnou aplikací je když se spojí hmotnostní spektroskopie s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, zde hmotnostní spektrometr slouží jako detektor pro stanovení látek, již rozdělených chromatografií. Složka která byla oddělená ze směsi v chromatografu, vstupuje do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Jednotlivé sloučeniny se identifikují pomocí hmotnostního spektra. Kritériem jsou většinou hmotnosti nejvíce přítomných iontů. Většinou jde o sloučeniny, jejichž spektra jsou obsažena v databázi přístroje (katalog obsahuje přes 20000 sloučenin). Předběžné přiřazení struktury i u složitějších molekul se dosti zjednodušilo použitím rozsáhlejších seznamů látek.

Kombinace chromatografického rozdělení detekce pomocí hmotnostního spektrometru je dnes jedna z nejcitlivějších metod.¹⁸

Vybrané PAU

Naftalen

Je to látka s účinkem hořlavým, těkavým, je to látka toxická, která má slabé narkotické účinky. Jeho molekula je složena ze dvou benzenových jader. Naftalen se získává z černouhelného dehtu. Používá se jako insekticid, dezinfekce, je obsažen v deodorantech. V domácnosti lidé naftalen používají jako vykuřovací prostředek, protože ničí larvy molů.

Toxicita naftalenu: U lidí, kteří jsou vystaveni velkému množství jeho účinků, může dojít až ke zničení červených krvinek. Projevem příznaků je většinou únava, nechutenství, nervozita a zvracení.¹⁹

Fenantren $C_{14}H_{10}$

Získává se z dehtu, používá se k výrobě barviv.²⁰ Je vysoce toxický pro vodní organismy.²¹

Benzo(a)pyren

Je jeden z nejtoxičtějších PAU. Může být vdechnut, prostupuje pokožkou do organismu.

Vliv na zdraví člověka: ohrožení zdravého vývoje plodu, riziko onemocnění rakovinou, podráždění až popálení kůže, opakované expozice způsobují ztenčení a popraskání pokožky.²² Zdrojem benzo(a)pyrenu jsou cigarety. Jedna vykouřená cigareta vnese do kuřáka přibližně 25 ng této látky.²³

2. Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Srovnání postupů pro analýzu obsahu vzorků tkání a vyhodnocení jejich užitečnosti pro různé toxikologické aplikace.

2.2 Hypotéza

Předpokládám, že nejlepší výsledky poskytne kombinace extrakce na pevné fázi a následující on-line spojení chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie.

3. Metodika

Extrakce a měření obsahu toxických látek ve vzorku zeminy bylo provedeno formou aktivní účasti na výzkumu na specializovaném pracovišti vybaveném chromatografem a hmotnostním spektrometrem.

3.1 Vlastní činnost: *Extrakce ze zeminy, stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU)*

Protokol

Téma: Hmotností spektrometrie

Úkol: Extrakce ze zeminy, stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) pomocí hmotnostní spektrometrie

Vzorek: Zemina (odebraná z blízkosti u silnice)

Pomůcky:

- lžička,
- erlenmeyerova baňka,
- odměrný válec,
- kádinka,
- nálevka,
- baňka srdcovitá,
- mikrostříkačka Hamilton,
- vialka

Používané přístroje a zařízení:

- analytické váhy Sartorius (Německo)
- vakuová odparka Heidolph –Laborota 4000 (Německo)
- třepačka Shaker R 5 (Česká republika)
- ultrazvuk,
- GCQ Finnigan (USA)

Činidla:

- Dichlormethan Merk (Německo)
- Toulén Fluka (Švýcarsko)
- Síran sodný bezvodý (vyžíhaný)
- Standard PAH – Mix 9 (Dr.Ehrenstorfer GmbH) koncentrace 10ng/μl

Postup:

Nejprve byl navážen na analytických vahách vzorek zeminy, k vzorku přilít dichlormethan 25 ml a to celé se promíchalo. Poté dáno na 10minut do ultrazvukové lázně. Potom byla připravena nálevka a srdcovka. Obsah baňky byl přelit přes nálevku se síranem sodným pro odstranění zbytkové vody.

Extrakce byla opakována ještě dvakrát.

Baňka s roztokem byla dána do vakuové odparky, kde byl vzorek odpařen do sucha. Odpařený vzorek byl naředěn 500 μl toluenu.

Vzorek byl analyzován pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Výsledky analýz byly použity při výpočtu koncentrací. Analýzy byly provedeny na přístroji GCQ Finnigan za následujících podmínek: délka kolony 30m, vnitřní průměr 0,25mm, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25μm, teplotní program: počáteční teplota kolony 60 °C a dále stoupala rychlostí 4 °C/min na 200 °C, 20 min 200 °C, celková doba analýzy byla 45minut. Teplota nástřiku 250 °C, teplota iontového zdroje 200 °C.

Analýza se dělala pomocí metody MS/MS, je to metoda velmi citlivá a selektivní. Ty sloužily k potvrzení analytu. Nutné bylo k tomuto provedení tří kroků - izolaci rodičovského iontu, disociaci iontu a analýzu produktů disociace. Izolace se dělala metodou hmotově selektivní nestability (kombinací RF a stejnosměrného napětí se dosahovalo stavu, kdy byly všechny ionty nestabilní, kromě iontu o vybrané hodnotě). Vybraný iont se disocioval, tak že se srazil tento iont s molekulami helia. Důsledkem toho byla přenosem kinetické energii nejprve zvýšena rezonanční excitace, musí však být

taková hodnota exitačního napětí R_f , aby nedocházelo ke ztrátám iontů rezonančním vypuzením. Analýza dceřiných iontů se prováděla stejně jako v prvním stupni MS analýzy. MS/MS umožňovala vyšší citlivost analýzy.

4. Výsledky

Vyhodnocení:

Navážka vzorku 4,9222g

Výpočet se prováděl pomocí vnějšího standardu PAH – Mix 9, koncentrace 10ng/μl

Ukázka výpočtu naftalenu - jednoho z nejméně obsažených PAU:

$$\frac{A_x}{A_{st}} \times C_{st} = \text{výsledek v ng/}\mu\text{l}$$

$$\frac{(\text{plocha vzorku})}{(\text{plocha standardu})} = \text{výsledek v ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Převod na ng/kg: } \frac{\text{výsledek ng/}\mu\text{l} \times 500 \times 1000}{\text{navážka}} = \text{výsledek v ng/kg}$$

$$\text{Převod na mg/kg: } \frac{\text{výsledek v ng/kg}}{1\,000\,000} = \text{výsledek mg/kg}$$

$$\frac{26244,33}{1449223} = 0,018109 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$0,018109 \times 500 = 9,054621 \text{ ng}$$

$$9,054621 : 4,9222 = 1,8395476 \text{ ng}$$

$$1,8395476 \times 1000 = 1839,5476 \text{ ng/kg}$$

$$1839,5476 : 1\,000\,000 = 0,018395 = 0,02 \text{ mg/kg}$$

2. Ukázka výpočtu fenantrenu:

$$\frac{A_x}{A_{st}} \times C_{st} = \text{výsledek v ng/}\mu\text{l}$$

$$\frac{(\text{plocha vzorku})}{(\text{plocha standardu})} = \text{výsledek v ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Převod na ng/kg: } \frac{\text{výsledek ng/}\mu\text{l} \times 500 \times 1000}{\text{navážka}} = \text{výsledek v ng/kg}$$

$$\text{Převod na mg/kg: } \frac{\text{výsledek v ng/kg}}{1\,000\,000} = \text{výsledek mg/kg}$$

$$\frac{9382611}{5590823} = 1,6782164 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$1,6782164 \times 500 = 839,10822 \text{ ng}$$

$$839,10822 \times 1000 = 839\,108,22 \text{ ng}$$

$$839,10822 : 4,9222 = 170,47422 \text{ ng}$$

$$170,47422 \times 1000 = 170\,474,22 \text{ ng/kg}$$

$$170\,474,22 : 1\,000\,000 = 0,17047 = 0,17 \text{ mg/kg}$$

Tab. 1. Výsledky výpočtů

	standard	vzorek	mg/kg
naftalen	1449223	26244,33	0,02
acenaftylen	2160099	14928,84	0,01
acenaften	3324535	415861,4	0,13
fluoren	4513684	719273,7	0,16
fenantren	5590823	9382611	1,70
anthracen	5532955	2013329	0,37
fluoranthén	9682879	30756271	3,23
pyren	9843805	28671520	2,96
benz(a)anthracen	12053789	29548665	2,49
chrysen	12467296	33435485	2,72
benzo(b)fluoranthén	13300719	53070472	4,05
benzo(k)fluoranthén	13234227	15125468	1,16
benzo(a)pyren	11981809	31647698	2,68
indeno(1,2,3-c,d)pyren	10234435	24917914	2,47
dibenzo(a,h)anthracen	13407455	9699977	0,73
benzo(g,h,i)perylene	10142368	19103113	1,91
Celkem			26,81

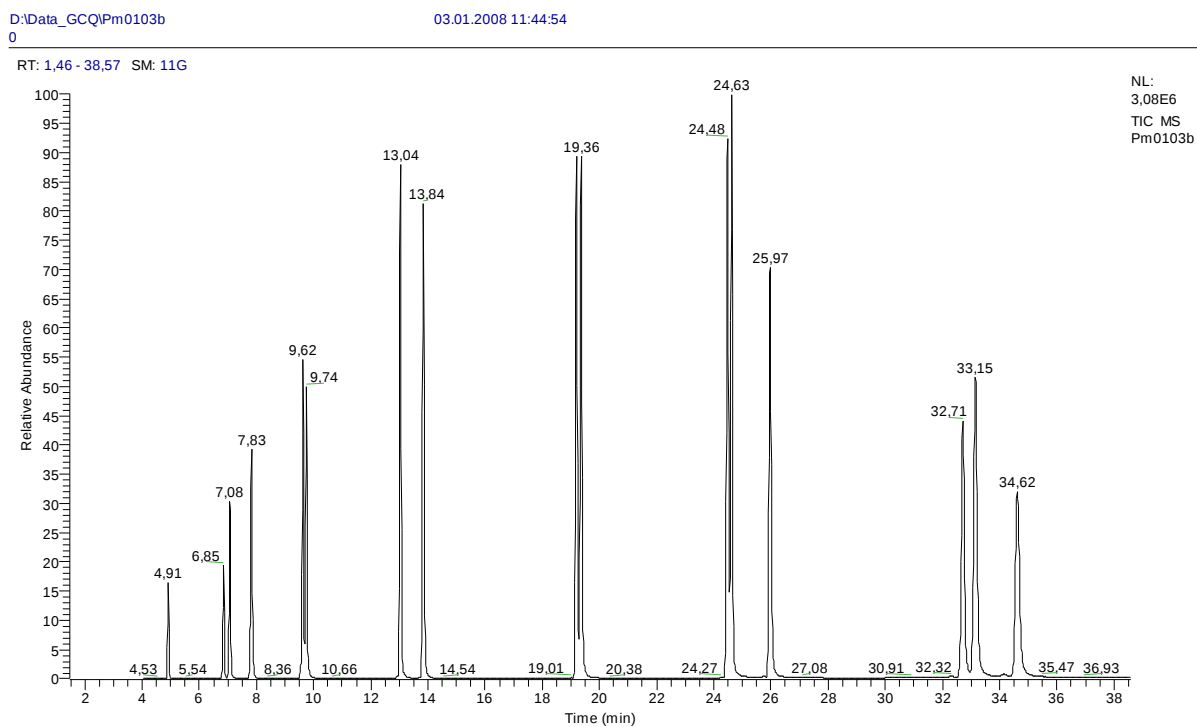
26,81 mg/kg je koncentrace PAU ve vzorku

5. Diskuze:

Půda hraje zásadní roli ve stabilitě ekosystémů. Pro analýzu půdy, byla odebrána zemina u klidné silnice v místě, kde se nacházejí vysokoškolské koleje. Analýza byla zaměřena pouze na stanovení PAU v zemině. Ve vzorku byla nalezena široká škála PAU jejichž jednotlivá množství jsou popsána v tabulce. Fyzikální, chemické a toxikologické vlastnosti PAU jsou následně popsány na příkladě naftalenu, fenantrenu, benzo(a)pyrenu. Pro přesnější stanovení jednotlivých polyaromatických uhlovodíků bylo rozhodnuto nejprve prozkoumat chromatografické vlastnosti jednotlivých PAU (Obr. 1 - 3) a zvolit v jejich hmotnostních spektrech charakteristické signály vhodné ke kvantitativnímu stanovení ve vzorcích obsahujících velké množství nečistot. Pro každou látku bylo zvoleno časové rozmezí, kdy v celkovém hmotnostním spektru byl zaznamenáván charakteristický signál jenom této látky. Přístroj byl naprogramován, tak aby ve vhodnou dobu přepínal nastavení na další PAU. Tento postup umožnil získat výsledný chromatogram s podstatně lepším poměrem signál/šum. Jelikož intenzita signálu v hmotnostním spektru přímo nesouvisí s koncentrací látky v iontovém zdroji, byla provedena kalibrace na všechny standardy PAU. Podobný postup umožňuje rozlišit při aplikaci kombinace chromatografie a hmotnostní spektrometrie látky, jejichž chromatografické vlastnosti jsou téměř stejné.²⁴ Pro ilustraci klasického hmotnostního spektra na obrázku 4 je uvedeno spektrum fenantrenu.

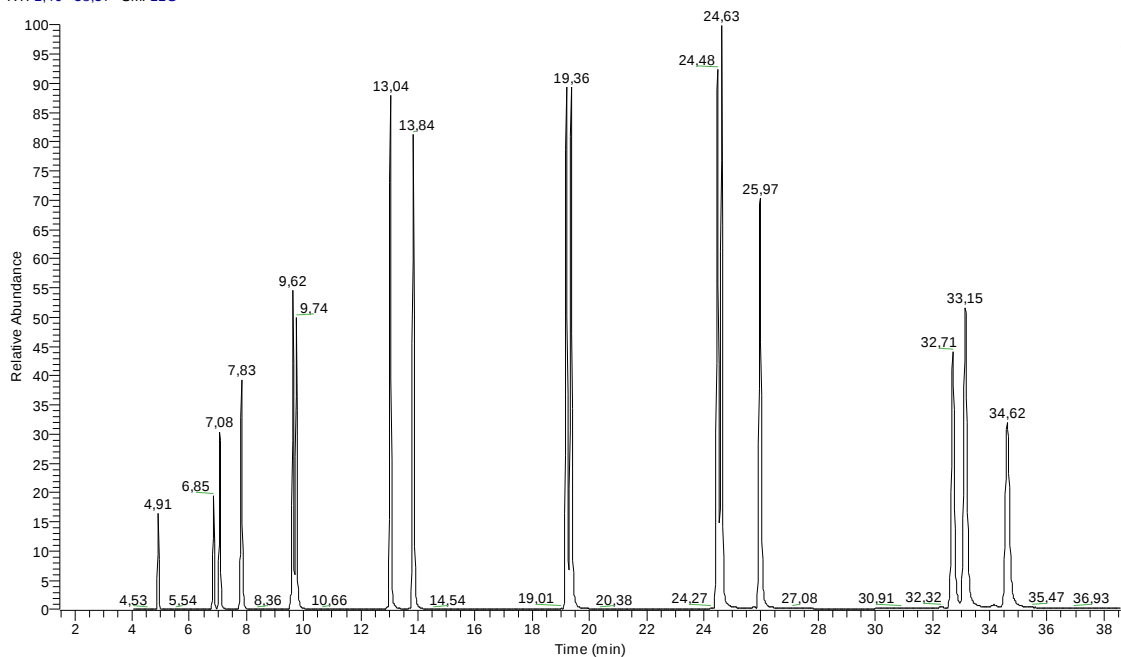
Měření ukázalo že v půdě se ve vyšších koncentracích nacházejí tyto PAU: fenantren, fluoranthen, pyren, benz(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthen, benzo(a)pyren, indeno(1,2,3-c,d)pyren. Jejich toxicita však není stejná. Dle publikovaných údajů nejvyšší toxicitu mezi těmito hojně zastoupenými látkami má benzo(a)pyren, je nejvíce toxický pro člověka.²² Lze předpokládat, že všechny PAU se účinně přenášejí v potravinovém řetězci své rozpustnosti v tucích a že zvýšená koncentrace benzo(a)pyrenu se může vyskytnout u drůbeže která se živí mimo jiné žížalami a pak se kontaminace PAU může následně dostat do těla člověka. Je plánován navazující výzkum zaměřený na zjištění koncentrace PAU v těle žížal; v případě jestli se prokáže

účinný přenos PAU z půdy do žížal bude zapotřebí vyšetřit drůbež a následně konzumenty drůbežího masa. Podobný ne-li ještě větší dopad může mít přenos PAU z půdy přes žížaly do organismu volně žijícího ptactva vzhledem k většímu podílu žížal v jejich stravě.



Obr. 1: Chromatografický záznam standardu PAH – Mix 9 o koncentraci 10ng/μl, stanovován metodou GC-MS/MS.

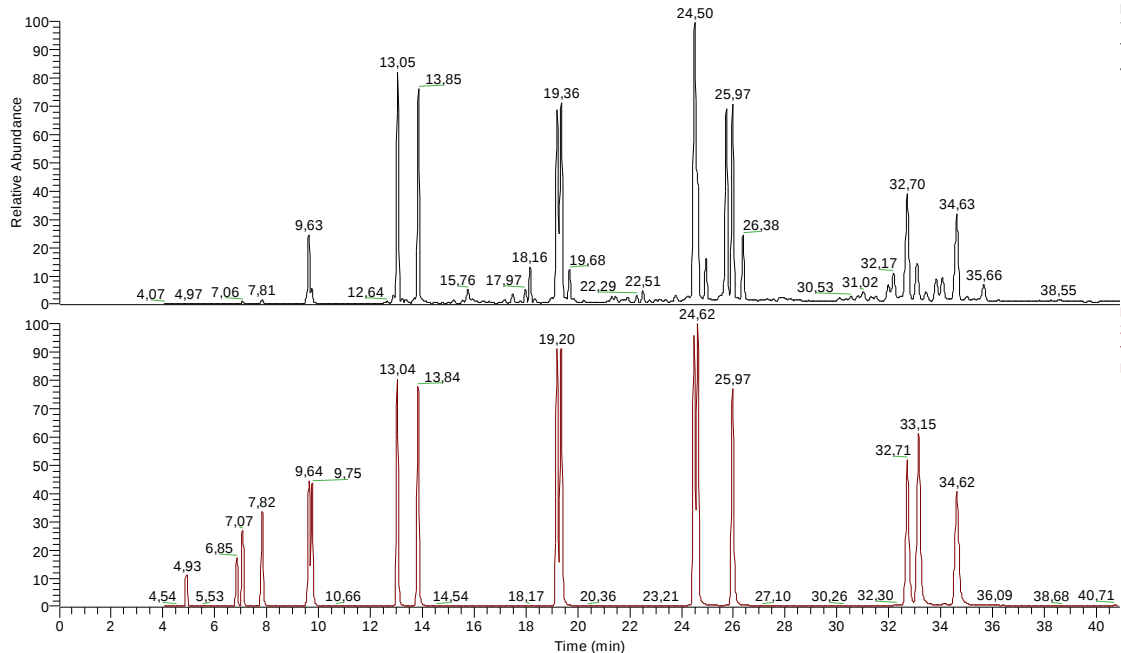
RT: 1.46 - 38.57 SM: 11G



NL:
3.08E6
TIC MS
Pm0103b

Obr. 2: Chromatografický záznam vzorku zeminy, stanovována metodou GC-MS/MS.

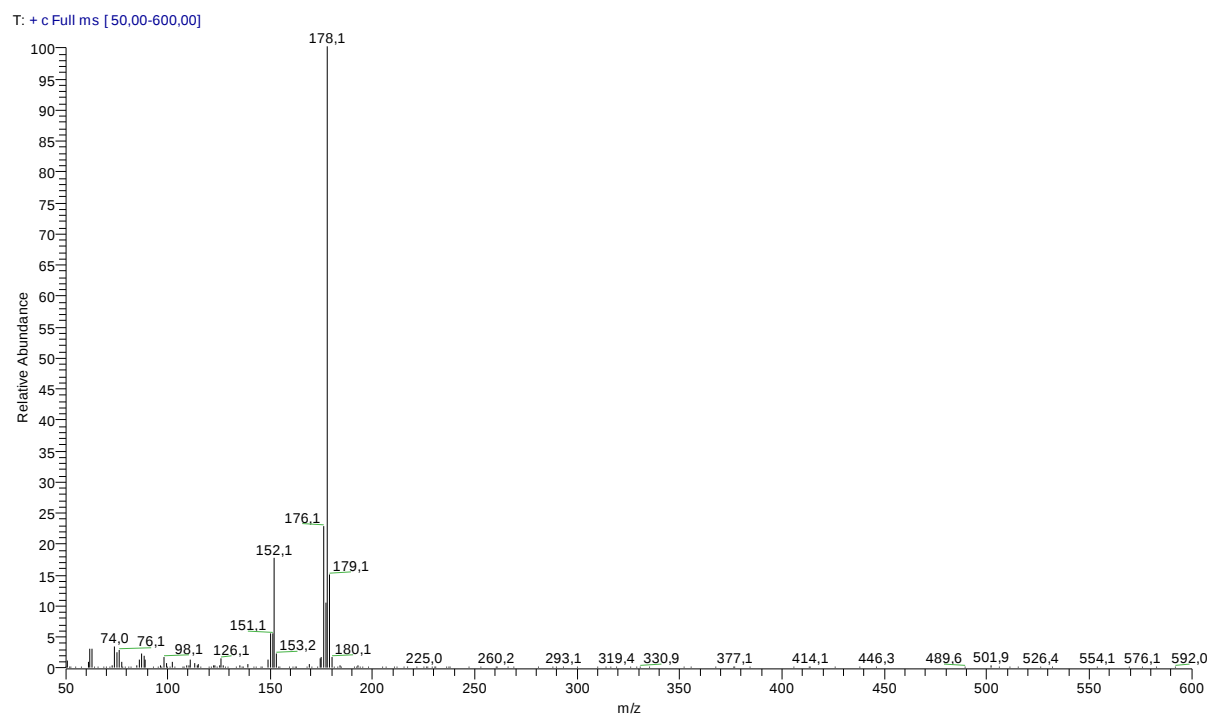
RT: 0.00 - 40.89 SM: 11B



NL:
7.37E6
TIC MS
Jana20

NL:
2.37E6
TIC MS
Pm0103b

Obr. 3. Oba předešlé chromatogramy spektra dohromady.



Obr. 4. Hmotnostní spektrum, fenantren

6. Závěr:

Přínos:

Na základě literárních pramenů, diskuzí s odborníky a předchozích vlastních výzkumných zkušeností jsem usoudila, že zvířecí modely jsou přínosným prostředkem pro studium vlivu negativních faktorů životního prostředí na zdravotní stav živočichů, včetně člověka. Pro modelové studium distribuce polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) v potravinovém řetězci jsem provedla experimentální stanovení koncentrací těchto škodlivin v půdě. Měření byla prováděna vysoce sofistikovanou kombinací kapalinové extrakce, plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a počítačové analýzy dat. Ze získaných výsledků (tabulka 1.) usuzuji, že v půdě se nachází tyto polycyklické aromatické uhlovodíky: acenaftýlen, acenaften, fluoren, fenantren, anthracen, fluoranthen, pyren, benz(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthen, benzo(k)fluoranthen, benzo(a)pyren, indeno(1,2,3-c,d)pyren, dibenzo(a,h)anthracen, benzo(g,h,i)perylene. PAU se do půdy mohou dostat při spalování materiálů, které obsahují uhlík a vodík, pokud není spalování dokonalé. Při spalování se absorbují na zrna sazí a prachových částic. Z publikovaných výsledků lze usoudit, že PAU jsou toxické pro živé organismy, mohou vyvolat rakovinu, poruchy reprodukce a mutace. Zřejmě největším environmentálním problémem PAU je jejich perzistence (schopnost odolávat přirozeným rozkladným procesům). Z analyzovaného vzorku zeminy lze usuzovat (a po opakovaném měření s jistotou prokázat), že jsou v půdě tyto PAU obsaženy a v případě přenosu v potravinovém řetězci mohou mít negativní vliv na člověka zejména svou karcinogenitou a mutagenitou.²² Podobné dopady se mohou objevovat i u dalších živočichů. Pro zkoumání dalších vzorků půdy a žížal nebylo dostatek financí, a díky tomu se od dalšího měření vzorků upustilo. Z provedeného měření se nedají dělat zevšeobecňující závěry, ale je to modelový experiment pro plánování dalšího výzkumu v podmínkách lepšího financování. Závěry by se mohly vyvozovat, až pokud by se prozkoumalo více vzorků zeminy a žížal a v nich by se prokázala akumulace PAU.

7. Seznam použité literatury

1 zpráva pana RNDr. Jiřího Šebestiána, CSc. pro městský úřad České Budějovice

2 RNDr. Jiří Sebastián, CSc. osobní sdělení

3 MØLLER, A. P. and MOUSSEAU T. A. Determinants of interspecific variation in population declines of birds after exposure to radiation at Chernobyl, *Journal of Applied Ekology* Oxford: 2007, roč. 44, s. 909–919. ISSN 0021-8901.

4 RNDr. Jiří Sebastián, CSc., fotodokumentace

5

http://www.toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=Web_Links&l_op=visit&lid=72 –, ověřeno 17. května 2008

6 <http://www.irz.cz/repository/latky/ddt.pdf>, ověřeno 17. května 2008

7 <http://www.irz.cz/latky/aldrin>, ověřeno 17. května 2008

8 PÖSCHL, M, Základy radioekologie, 1vyd. Mendelova zemědělská a lesnická universita v Brně, 2006. 116s., ISBN 80-7375-010-4.

9 KOLEKTIV of the Chernobyl Forum, (D. Kinley III, ed.): 2005. V českém překladu V. Sinkulové 2006, 1. vyd.: Dědictví Černobylu: Zdravotní, ekologické a sociálně-ekonomické dopady a Doporučení vládám Běloruska, Ruské federace a Ukrajiny. ČSVTS v koedici s Českou nukleární společností, Týn nad Vltavou, 2006. 51 s., ISBN 80-02-01806-0.

10 Kuna, P.: Studijní materiál KRT ZSF JU Č. Budějovice, 2006, 19s.

11 ČINOVSKÁ M.(ed.), Dětská ilustrovaná encyklopedie – Živý svět II, Praha: Slovart, 1995. 168s., ISBN 80-85871-07-6.

12 Encyklopedie zvířat, Nižší živočichové, 6.svazek, Praha: Grafia Press [200?]

13 HANZÁK J. et al., Světem zvířat V. díl (1 část), Bezobratlí, 1.vyd. Praha: Albatros, 1973. 321s

14 <http://zizala.navajo.cz/>, ověřeno 17. května 2008

15 <http://www.arikah.com/encyclopedia/Oligochaeta>, ověřeno 17. května 2008

16 MOTIČKA V., ROLLER Z., Svět zvířat X Bezobratlí (1), Praha: Albatros, 2001. 171s., ISBN 80-00-00884X.

17 <http://ireferaty.lidovky.cz/307/2277/Puda-pedosfera>, ověřeno 17. května 2008

18 Ing. Kamila Růžičková, osobní sdělení

19 <http://cs.wikipedia.org/wiki/Naftalen>, ověřeno 17. května 2008

20 <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/41425-fenanthren>, ověřeno 17. května 2008

21 <http://dugi.xf.cz/Chemie/Fenanthren.html>, ověřeno 17. května 2008

22 http://www.irz.cz/repository/latky/polycyklicke_aromaticke_uhlovodiky.pdf, ověřeno 17. května 2008

23 http://www.irz.cz/latky/polycyklicke_aromati, ověřeno 17. května 2008

24 ALEXANDER POPKOV, MILAN NA'DVORNI'K, PAVLA KRUŽBERSKA,
ANTONI'N LYČKA, SZABOLCS LEHEL, NICHOLAS GILLINGS J Label Compd
Radiopharm 2007; 50: 370–374.

25

<http://www.obrazky.cz/detail?id=eJyFzE0LgjAAgOH7/ofe2pyZukCiDzRCQiXoGGtOXTh1TjP/fXXo3P193o0KFoZFon1q2FYomkaU%0AtDELUQ%2B8D7CpA1ANQ7dGaJomSDWc9Qh5PiJWcYk0Ewz90GcBT0n0t/921SBrYFuOD/Bq6QKMyy8J%0ASUuuYSeY5rRnFWStREJvwteVHg%2B1zZ/ZDp%2BTC1ePrSroIVa7WWY6j620V/6tLQsHYNsHxPVxked3%0AjzvE85YuJW8OIEth%0A>, ověřeno 17. května 2008

8. Klíčová slova

DDT, HPLC-MS, extrakce dichlormethanem, akumulace polyaromátů v půdě, potravinový řetězec, nečistoty v ovzduší, ionizující záření, Černobyl, kontaminace půdy, únik škodlivin, výfukové plyny.

Seznam použitých zkratk:

GC-MS kombinace plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

MS/MS metoda, kdy se vybere iont v analyzátoru, ion se rozbije a znova se analyzuje

PAU polycyklické aromatické uhlovodíky

DDT dichlordifenyltrichlorethan

DNK Deoxyribonukleová kyselina

Vermikompost - trus žížal

9. Přílohy:

Obr. 1. Příprava rozpouštědla na extrakci PAU ze vzorku zeminy

Obr. 2. Filtrace extraktu přes vrstvu bezvodého síranu sodného

Obr. 3. Vakuové odpařování rozpouštědla z extraktu PAU.

Obr. 4. Finnigan GCQ GC/MS²⁵



Obr. 1. Příprava rozpouštědla na extrakci PAU ze vzorku zeminy

Foto: Jana Hlásková



Obr. 2. Filtrace extraktu přes vrstvu bezvodého síranu sodného

Foto: Jana Hlásková



Obr. 3. Vakuové odpařování rozpouštědla z extraktu PAU.

Foto: Jana Hlásková



Obr. 4. Finnigan GCQ GC/MS²⁵