

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv pesticidů na hematologický a biochemický profil
ryb**

Vedoucí diplomové práce:
prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc.

Autor diplomové práce:
Hynek Dort

2009

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Vliv pesticidů na hematologický a biochemický profil ryb,, vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....

Hynek Dort

V Českých Budějovicích 23.4. 2009

Děkuji vedoucí diplomové práce prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc. a konzultantovi Ing. Josefu Velíškovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc, které mi s ochotou poskytovali v průběhu vypracování celé diplomové práce.

Děkuji též všem pracovníkům VÚRH JU ve Vodňanech, kteří mi umožnili a pomohli vypracovat tuto práci.

Obsah

OBSAH.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	6
2.1. PESTICIDY.....	6
2.1.1. Klasifikace.....	6
2.1.2. Použití.....	7
2.1.3. Výskyt.....	7
2.1.4. Vlastnosti.....	8
2.2. TRIAZINY.....	10
2.2.1. Metribuzin.....	12
2.3. PYRETHROIDY.....	14
2.3.1. Bifenthrin.....	16
3. METODIKA.....	17
3.1. TEST AKUTNÍ TOXICITY NA RYBÁCH.....	17
3.1.1. Princip a podmínky testu.....	18
3.1.2. Pokusné ryby.....	19
3.1.3. Pracovní postup.....	19
3.1.4. Předběžný test.....	19
3.1.5. Základní test.....	20
3.1.6. Platnost testu (validace)	20
3.1.7. Vyhodnocení testu	21
3.2. BIOCHEMICKÉ A HEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KRVE.....	21
3.2.1. Odběr krve.....	21
3.2.2. Stanovení biochemických ukazatelů.....	22
3.2.3. Stanovení hematologických ukazatelů.....	24
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	27
4.1. SENCOR 70 WG.....	27
4.1.1. Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG.....	27
4.1.2. Stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného.....	30
4.2. TALSTAR 10 EC.....	38
4.2.1. Stanovení 96hLC 50 Talstaru 10 EC.....	38
4.2.2. Stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného.....	41
5. ZÁVĚR.....	45
6. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	46
7. PŘÍLOHY.....	52
7.1. PODKLADOVÉ TABULKY PRŮBĚHU PŘEDBĚŽNÝCH A ZÁKLADNÍCH TESTŮ TOXICITY.....	52

1. Úvod

Růst spotřeby pesticidů v moderním světě budí stále větší obavy z vážného znečištění prostředí, k němuž jejich používáním dochází. Pesticidy v minulosti zaujímaly významné místo v pořadí příčin havarijních úhynů ryb, příkladem je úhyn ryb na Balatonu v roce 1995 (Nemcsok et al. 1999).

Problémy životního prostředí, jeho ochrany a tvorby, se stále naléhavěji dostávají do popředí zájmu celé společnosti. Voda a organismy v ní žijící tvoří jeden ze základních komponentů životního prostředí. Voda jako životní prostředí ryb je však stále více vystavována antropogenním vlivům a její parametry se z hlediska života rybích společenstev stávají neuspokojivé. Proto poznání souvislostí mezi formováním vodního prostředí, antropogenním působením na jeho kvalitu, ekologické vztahy fauny k prostředí a ochranou tohoto nezastupitelného prvku je dnes aktuálním úkolem pro hydrobiologii a ichtyologii.

V souvislosti se vstupem do Evropské Unie došlo ke změnám v procesu registrace pesticidních přípravků. Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě přípravků pro necílové organismy a předpokládaná koncentrace účinné látky v ekosystému. Do skupiny necílových vodních organismů patří rovněž ryby, vodní bezobratlí a řasy (Rauscherová et al. 1999). Ryby představují největší a také nejvýznamnější skupinu obratlovců žijících ve vodním prostředí. Jsou zde konečným článkem potravního řetězce a současně hospodářsky významnými vodními organismy. Právě proto je prvořadá pozornost vodní toxikologie věnována rybám.

2. Literární přehled

2.1. Pesticidy

2.1.1. Klasifikace

Pesticidy jsou biocidní látky používané na ochranu užitkových rostlin v zemědělství a lesnictví, proti plevelům, houbám a živočišným škůdcům. Pesticidy našly uplatnění i ve vodním hospodářství, slouží např.: k likvidaci některých vodních rostlin, k redukci zooplanktonu v případě ohrožení ryb kyslíkovým deficitem, k likvidaci dravých buchanek před vysazením váčkového plůdku kapra a k antiparazitárnímu ošetření kaprovitých ryb (Pitter 1999).

Jde o velmi početnou skupinu látek, které se dělí podle biologické účinnosti a podle chemického typu účinné látky. Podle biologické účinnosti se dělí na několik skupin:

- insekticidy (prostředky k hubení hmyzu)
- herbicidy (prostředky proti plevelům)
- fungicidy (prostředky proti škodlivým parazitickým houbám)

Některé látky mohou vykazovat současně i více specifických účinků (Pitter 1999).

Podle působení na ošetřovaný organismus lze pesticidy rozdělit (Pitter 1999):

- kontaktně (dotykově) působící, které zůstávají na povrchu
- systémově působící (systémové), které pronikají do organismu živočichů nebo rostlin, včetně kořenového systému

Každý pesticid je identifikován obecným názvem (common name), obchodním názvem (trade name), chemickým vzorcem a strukturním vzorcem. Nejdůležitější je obecný název (common name), který má mezinárodní platnost, protože názvosloví hotových přípravků je nepřehledné (obchodní název se může měnit podle výrobce) a chemický název je často velmi složitý. Obecným názvem bývá často zkratka (např.: DDT, HCH). Ministerstvo zemědělství vydává pravidelně seznam povolených přípravků na ochranu rostlin (Pitter 1999).

Pesticidy mohou být anorganické nebo organické povahy. Aktivní anorganickou složkou může být Cu, Hg, As, Pb, F, polysulfidy a elementární síra. převládají však látky organické (Pitter 1999).

Organické pesticidy lze rozdělit do několika skupin, z nichž nejdůležitější jsou organochlorové (chlororganické) a organofosforové pesticidy. Z ostatních skupin organických látek lze jmenovat karbamáty, heterocyklické sloučeniny (triaziny),

fenoxyalifatické kyseliny, deriváty močoviny, deriváty triazinů, deriváty fenolů aj. (Pitter 1999).

2.1.2. Použití

Pesticidy se používají ve formě postřiků, poprašků nebo aerosolů. Nejvýznamnější je splach pesticidů z polí a plodin a transport větrem při leteckém postřiku. Dalším zdrojem jsou průmyslové odpadní vody z jejich výroby, vody z mytí a vyplachování použitého strojního rozstřikovacího zařízení a přímá aplikace ve vodním hospodářství (např.: při chovu ryb). Většina pesticidů je aplikována sezónně (Pitter 1999).

Mnohé pesticidy jsou ve vodě jen málo rozpustné a musí se upravovat přidávkem rozpouštědel, emulgátorů nebo dispergátorů. Hotové přípravky jsou pak často směsí vlastní účinné látky a dalších přísad, které rovněž kontaminují prostředí společně s vlastní aktivní látkou (Pitter 1999).

2.1.3. Výskyt

Pesticidy mohou být přítomny ve vodách buď rozpuštěné nebo nerozpuštěné. Ze značné části mohou být sorbovány na nerozpuštěných látkách minerální i organické povahy. Proto jejich stanovení jenom ve vodě není postačující pro odpovědné hodnocení celkového znečištění vodního prostředí. Je nezbytná analýza sedimentů, kalů a půdy (Pitter 1999).

Pro průkaznost pesticidů je vedle vzorku vody důležitý také vzorek bahna (asi 1 kg) a vzorek ryb (rovněž asi 1 kg). Vzorky ryb a bahna mohou být zmrazené při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jen v případě organofosfátů je třeba vzorky neprodleně dodat do laboratoře, protože organofosfáty se rychle rozkládají (Hartman et al. 1998).

Vzhledem ke své nebezpečnosti vyžadují pesticidy cílené sledování, i když jejich stanovení ve vodách je náročné. Do podzemních vod pronikají pesticidy jen v omezené míře, protože se silně sorbují v půdě. Prokazatelné jsou v podzemní vodě tehdy, když sorpční kapacita půdy je nedostatečná. Proto se pesticidy vyskytují zejména v povrchových vodách. Lze prokázat především biochemicky stabilní organochlorové a triazinové pesticidy. Málo stálé organofosforové pesticidy se zjišťují jen v ojedinělých případech (Pitter 1999).

Souhrnně lze říci, že koncentrace pesticidů kolísá ve vodách ve větším koncentračním rozmezí. Jde o koncentrace pod mezí stanovitelnosti až po koncentrace

ve stovkách ng.l^{-1} . Nejčastěji jde o koncentrace v jednotkách až desítkách ng.l^{-1} (Pitter 1999).

2.1.4. Vlastnosti

Vzhledem k velmi rozdílné chemické struktuře pesticidů a nejednotnému složení se údaje o jejich rozpustnosti značně různí. Nejméně rozpustné jsou organochlorové látky (např.: pro DDT uvádí Pitter (1999) hodnoty rozpustnosti od $1,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ až do $100 \mu\text{g.l}^{-1}$. Naproti tomu značně rozpustné jsou organofosforové pesticidy, u nichž uvádí hodnotu rozpustnosti až $1\,000 \text{mg.l}^{-1}$.

Pesticidy mohou ve vodách podléhat chemickému, fotochemickému nebo biologickému rozkladu. Z chemických procesů zde probíhá zejména hydrolyza, a to u organofosforových sloučenin. V případě fotolýzy (má obvykle radikálový charakter) jde hlavně o izomeraci, epoxidaci a aromatickou substituci (Pitter 1999).

Biologická roztažitelnost a tím i jejich odstranitelnost z vody a půdy závisí na jejich struktuře. Biologicky těžko roztažitelné jsou především organochlorové pesticidy, relativně i triaziny a některé deriváty močoviny. Snadněji se biologicky rozkládají např.: deriváty kyseliny fenoxycetové, karbamáty a organofosforové sloučeniny (poměrně snadno probíhá jejich inaktivace biologickou hydrolyzou (Pitter 1999).

Chlorované pesticidy (zejména polycyklické) vynikají velkou chemickou a biochemickou stálostí, a tak setrvávají v prostředí po velmi dlouhou dobu. Proto je snaha jejich používání co nejvíce omezit. Avšak i když aplikace některých organochlorových pesticidů je již několik let zakázána, stále se ve vodním prostředí vyskytují (Pitter 1999).

Snížení koncentrace pesticidů ve vodě může být kromě jejich rozkladu způsobeno i pouhou sorpcí na nerozpuštěných látkách, sedimentech a kumulací v biomase (zejména v tukových tkáních). Zejména málo polární organochlorové pesticidy jsou nebezpečné svou vysokou akumulací schopností ve tkáních organismů, což se projevuje především u ryb. Z ekotoxikologického hlediska mohou pesticidy ve vyšších koncentracích porušit biologickou rovnováhu v tocích tím, že toxicky působí na některé složky vodní biocenózy, zejména na ryby a zooplankton (Pitter 1999).

Pesticidy jsou považovány za vážné kontaminanty ve vodním prostředí, které škodlivě působí na všechny vodní organismy, obzvláště na ryby (Verma et al. 1982). Draz et al. (1993) uvádí přímý vliv pesticidů na růstové poměry rybích druhů. Pesticidy jsou také častými příčinami otrav ryb, tak jak to dokazuje úhyn úhořů na Balatonu v

roce 1995 (Nemesok et al. 1999). V nižších koncentracích nemusí mít vždy bezprostřední vliv na rybí obsádku, ale mohou dlouhodobě negativně ovlivňovat nejranější vývojová stadia ryb (Svobodová et al. 2007).

S pesticidními přípravky se do recipientů dostává vedle účinné látky řada vedlejších komponentů, které bývají často pro ryby toxičtější než vlastní účinná látka. Příkladem je herbicidní přípravek Roundup, jehož hodnota LC_{50} v průběhu 48 hodinového působení je pro pstruha duhového $0,012 \text{ ml.l}^{-1}$. Účinnou látkou přípravku Roundup je glyfosát. Letální koncentrace (48h LC_{50}) glyfosátu je pro pstruha duhového v rozmezí $0,6 - 1,0 \text{ ml.l}^{-1}$. Podobně je tomu i u některých herbicidů na bázi MCPA (2-methyl-4-chlorfenoxycetové kyseliny), jejíž hodnota 48h LC_{50} je pro pstruha duhového 331 mg.l^{-1} , kdežto 48h LC_{50} Dikotexu 40 je pro pstruha duhového $0,09 \text{ ml.l}^{-1}$ a Dikotexu P 91 mg.l^{-1} (Svobodová et al. 1987).

Koncentrace toxických látek dosahuje vyšších hodnot u bentosu než u planktonu, a tudíž i u ryb bentonofágních než u ryb planktonofágních, u starších jedinců a dále ve vodách tekoucích než stojatých (Hartman et al. 1998).

Při vniknutí pesticidů do vodního prostředí podléhá účinná látka chemickému a biologickému rozkladu. V některých případech mohou být rozkladné produkty pro ryby toxičtější než původní látka. Například při biologické oxidaci parathionu vzniká toxičtější paraoxon, rozkladem trichlorfonu vzniká toxičtější dichlorvos. Z toho je patrné, že důkaz nepřítomnosti určitého pesticidu ve vodě ještě neznamená, že voda neobsahuje škodlivé produkty jeho rozkladu (Svobodová et al. 1987).

Lidská populace je vystavena působení pesticidů prostřednictvím pitné vody a konzumovaného jídla včetně ryb (Hayes 1982). V uplynulých letech způsobilo rozsáhlé požívání pesticidů řadu problémů, které souvisí s jejich škodlivým efektem na vodní ekosystém a lidské zdraví (Hanke et al. 1983). Člověk stojí na konci potravních řetězců, a je proto kumulací jedů velmi ohrožen (Hartman et al. 1998).

Pesticidy zaujímaly přední místo v pořadí příčin intoxikací ryb (Svobodová et al. 1987). Mimo to mohou nepříznivě ovlivňovat samočisticí schopnost vody, její pachy a chuť. V případě proniknutí do pitné vody ohrožují i zdraví obyvatelstva. Některé pesticidy jsou i pro člověka značně toxické, popř. karcinogenní např.: DDT, HCH. (Pitter 1999).

Vedle přímé toxicity se v některých případech může nepříznivě projevit i odčerpání kyslíku z vody při jejich rozkladu (Hartman et al. 1998).

Dalším nepřímým, ale velmi závažným následkem kontaminace vodního prostředí pesticidy je snížení nebo úplná likvidace přirozené potravní základny ryb. Organismy tvořící přirozenou potravní základnu jsou v řadě případů ve srovnání s rybami řádově citlivější. Jako příklad lze uvést pesticidy na bázi organických sloučenin fosforu, u nichž hodnota LC_{50} zjištěná v průběhu testu akutní toxicity je pro kapra obecného 0,545 ml na 1 litr Soldepu; 0,028 ml.l⁻¹ Decemtionu EC 20; 66,8 mg.l⁻¹ Decemtionu DP 50 a pro perloočku *Daphnia magna* 0,2 – 1,5.10⁻⁶ ml.l⁻¹ Soldepu; 4,2.10⁻⁵ ml.l⁻¹ Decemtionu EC 20; 0,025 mg.l⁻¹ Decemtionu DP 50. Z hygienickopotravinařského hlediska se znečištění recipientů pesticidy negativně odráží ve zhoršené kvalitě rybiho masa, zapříčiněné přítomností reziduí pesticidů (Svobodová et al. 1987).

2.2. Triaziny

Herbicidní vlastnosti triazinů byly objeveny švýcarskou společností J. R. Geigy Ltd. v roce 1952 (Kearney and Kaufmann 1975).

Triaziny jsou perzistentní půdní herbicidy, které při aplikaci ve větších koncentracích (5 – 20 kg.ha⁻¹) působí jako totální herbicidy použitelné na průmyslových prostranstvích, cestách apod., avšak v menších koncentracích (1 – 4 kg.ha⁻¹) jimi lze selektivně hubit řadu klíčících plevelů např.: ve fazolích, kukuřici, chřestu a jahodách a kolem ovocných keřů (Martin and Worthing 1974).

Triaziny jsou inhibitory fotosyntézy. Primárním místem účinku je inhibice Hillovy reakce fotosyntetického elektronového přenosu. Triaziny silně inhibují Hillovu reakci v izolovaných chloroplastech (Corbett 1974).

Triaziny jsou přijímány kořeny vzcházejících plevelů a způsobují jejich žloutnutí a hynutí. Pronikají jen nepatrně do nižších vrstev půdy, protože jsou málo rozpustné ve vodě a na hluboko kořenící plodiny, např.: ovocné stromy nebo keře mají jen malý vliv (Cremlyn 1985).

Řada odrůd kukuřice a cukrové třtiny je k herbicidním účinkům některých triazinů rezistentní. Uvedené rostliny totiž obsahují enzym, který tyto chemikálie v jejich tkáních enzymovou hydrolýzou detoxikuje. Produkty enzymové hydrolýzy nejsou herbicidní, takže tyto triaziny jsou cennými prostředky k ochraně uvedených plodin před zaplevelením (Metcalf 1971).

Pro specifické účely byla vyvinuta řada triazinů, ve kterých je chlorový atom v poloze 2 nahrazen methylthio- skupinou (např.: prometryne) (Martin et Worthing).

Triazinové herbicidy se připravují reakcí kyanurchloridu s příslušnými nukleofilními činidly. Chlorové atomy lze nahradit jen postupně, neboť po nahrazení jednoho se náhrada zbývajících stává stále obtížnější (Harris et al. 1968). Další herbicidní *s*-triaziny byly získány náhradou chlorového atomu v poloze 2 ve sloučenině methoxyskupinou, jako příklad lze uvést prometon, který se používá jako totální herbicid. Substituce chloru v poloze 2 jinou skupinou než methoxy- nebo methylthio- neposkytuje účinné herbicidy (Wain 1965).

Triaziny se adsorbují na půdních minerálech, čímž se jejich koncentrace v půdním roztoku zmenšuje. Z půdního roztoku jsou snadno přijímány kořeny rostlin, přičemž 2-chlortriaziny jsou ve vodě obvykle méně rozpustné než 2-methylthiotriaziny a methoxytriaziny (Kearney and Kaufmann 1975).

Triaziny jsou metabolizovány v rostlinách i v půdě, a to jak chemickými, tak mikrobiálními pochody. Po přidání simazinu značeného v posranním řetězci ^{14}C k výživnému roztoku, v němž je pěstována kukuřice, bavlník nebo sojový bob, se zjistilo, že rostliny uvolňují značné množství $^{14}\text{CO}_2$ a identifikovány byly N-dealkylační metabolity. N-dealkylace byla zjištěna jak u citlivých, tak u rezistentních rostlin a je základním odbourávacím mechanismem. Monodealkylové triaziny si zachovávají svou fytotoxicitu, ale stávají se neúčinnými, je-li 2-chlorskupina hydrolyzována na hydroxyskupinu. V rostlinách byla pozorována i hydrolyza 2-methylthiotriazinů a 2-methoxytriazinů. V půdách podléhají triaziny rovněž N-dealkylaci a substituent v poloze 2 hydrolyze. Volné aminoskupiny jsou pak dále nahrazeny hydroxyskupinami a nakonec dochází ke štěpení triazinového kruhu za vzniku oxidu uhličitého. Některé půdní mikroorganismy jsou schopné využívat triaziny jako zdroj uhlíku a dusíku. Meziproduktem štěpení kruhu mohou být i biguanidiny, které mohou vzniknout hydrolytickým odštěpením uhlíku v poloze 2 ve formě oxidu uhličitého. Biguanidin pak podléhá další hydrolyze (Kearney and Kaufmann 1975).

V některých případech dochází k modifikaci postranního řetězce, např.: metabolismus Aqualinu v bahně a ve vodě probíhá jako hydrolyza a dealkylace. Mezi degradačními produkty nebyly nalezeny ani sulfoxidy, ani sulfony a ve vodních rostlinách nebyly již za dva týdny po ošetření prokazatelné žádné produkty odbourávání (Roberts 1974).

Přípravky na bázi triazinů jsou pro ryby středně až silně jedovaté. Klinické příznaky intoxikace ryb těmito přípravky se projevují převážně útlumovými fázemi. Charakteristickým příznakem intoxikace ryb je tvorba transudátu v dutině tělní a

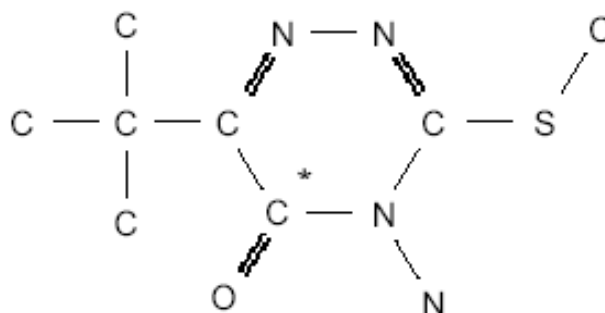
v trávícím ústrojí. Přítomnost transudátu vyvolává viditelné zvětšení tělní dutiny, u plůdku pstruha duhového může docházet v některých případech až k ruptuře tělní stěny (Svobodová et al. 2007). Hematologickým vyšetřením 2 letých kaprů držených v koncentracích 0,5-1 mg.l⁻¹ atrazinu byly zjištěny změny svědčící o snížení nescifické odolnosti organismu. Negativní vlastností triazinových herbicidů je jejich velmi nízká biologická rozložitelnost a tím dlouhodobé přetrvávání reziduí ve vodním prostředí (Svobodová et al. 1987).

Pitter (1999) uvádí, že z triazinových herbicidů dominoval v letech 1995 až 1996 v povrchové vodě Labe, Vltavy a Želivky jednoznačně atrazin s koncentračním rozmezím od 50 ng.l⁻¹ do 500 ng.l⁻¹. Projevuje se sezónní aplikace tohoto herbicidu s maximálními nálezy v letních měsících. Dále bylo zjištěno, že koncentrace triazinů v pražské pitné vodě se v letech 1995/1996 obvykle pohybovaly v rozmezí asi od 50 ng.l⁻¹ do 100 ng.l⁻¹. V současné době jsou ve vodním prostředí nejčastěji zjišťovány koncentrace simazinu (0,06 μg.l⁻¹) a terbutrynu (0,02 μg.l⁻¹) (VÚRH JU et ČHMÚ).

2.2.1. Metribuzin

Metribuzin (C₈H₁₄N₄OS) je pesticid na bázi triazinů. Chemický vzorec: 4-amino-6-(1,1-dimethylthio-3-(methylthio)1,2,4-triazin-5(4H)-one (EC/AC 1986).

Obr.č.1: Strukturální vzorec metribuzinu (OEHHA 1999)



Metribuzin je herbicid určený na ochranu různých zemědělských plodin. V Kanadě bylo v 90. letech každoročně použito množství mezi 100 až 500 tun (EC/AC 1986). Je široce používán hlavně v USA a Kanadě. Metribuzin se zařadil na 17. místo v pořadí nejpoužívanějších herbicidů aplikovaných na hlavní zemědělské plodiny v USA v roce 1995, když bylo použito 700 tun tohoto přípravku na 2,4 milionu hektarů

zemědělsky využívané plochy (Anderson and Magleby 1997). Nejvyšší koncentrace metribuzinu se používají při ošetřování sojových bobů, naopak menší množství jsou aplikována na pšenici, brambory a cukrovou třtinu (Pauli et al. 1990).

Metribuzin, podobně jako jiné herbicidy na bázi triazinů je náchylný k odtoku do povrchových vod, díky jeho fyzikálním a chemickým vlastnostem: rozpustnost ve vodě = 1,220 mg.l⁻¹; tlak vodní páry < 1,3 mPa (Pauli et al. 1990). Pauli et al. (1990) také prokázal, že metribuzin může dosahovat velmi vysokých koncentrací v povrchovém odtoku vody, a to až 390 g.l⁻¹. Ačkoli skutečně naměřené environmentální koncentrace metribuzinu ve vodě jsou většinou menší než 25 µg.l⁻¹ (Battaglin et al. 2001).

Z půdy bývá odstraněn především mikrobiálními procesy. Nejrychleji je odbouráván z půdy houbou *Cunninghamella echinulata*, která je zodpovědná za jeho deaminaci (Pritchard 1986). Metribuzin je také mírně absorbován půdou s vysokým obsahem jílovitých částic nebo půdou organicky zatíženou. Absorbce však klesá se zvyšujícím se pH půdy. Množství metribuzinu, které se dostává do podzemní vody je inverzní funkcí k organickému zatížení půdy (EC/AC 1986).

Podle Mayera and Ellersiecka (1986) je metribuzin relativně málo toxický k rybám a vodním bezobratlým a toxické hodnoty pro vodní živočichy uvádějí nad 10 µg.l⁻¹ (EC₅₀). Nicméně Fairchild et al. (1998) uvádí, že metribuzin je extrémně toxický k 10 druhům blíže neurčených vodních makrofyt a řas při koncentracích dosahujících 14 až 152 µg.l⁻¹, přičemž průměrná hodnota toxicity vodních rostlin byla 31 µg.l⁻¹ a dále uvádí, že je jedovatější k vodním rostlinám než atrazin.

Ort et al. (1994) uvádí, že u ryb a vodních bezobratlých nebyly pozorovány žádné přímé ani nepřímé příznaky při působení metribuzinu v koncentracích do 7,1 µg.l⁻¹.

Metribuzin, stejně jako ostatní herbicidy na bázi triazinů narušuje fotosyntetické procesy široké palety rostlin tím, že blokuje fotosystem II Hillovy reakce (Pauli et al. 1990).

Poločas rozpadu metribuzinu v půdě se pohybuje mezi 2,5 až 4 měsíci a ve vodě trvá přibližně 7 dnů (RSCH 1988). Naopak Pauli et al. (1990) uvádí poločas rozpadu v půdě jen 30 dnů a ve vodě 5 dnů.

U metribuzinu nebyly zjištěny žádné prokazatelné karcinogenní nebo mutagenní účinky (Hayes et al. 1981).

2.3. Pyrethroidy

Pyrethriny jsou kontaktní insekticidy získané z květů rostliny *Chrysanthemum cinerariaefolium* a je používány již od dávných dob. Odrůda rostoucí v horských oblastech Keni poskytuje největší podíl aktivních složek a pěstuje se pro komerční účely také na Kavkaze, v Íránu, Japonsku, Ekvádoru a na Nové Guinei (Woods 1974). Výroba pyrethrinů se datuje přibližně od roku 1850. V roce 1965 činila světová produkce pyrethra přibližně 20 000 tun, z čehož na Keňu připadlo kolem 10 000 tun (Cremllyn 1985).

Význam pyrethrinů spočívá v jeho mimořádně rychlém omračujícím (knockdown) účinku na létající hmyz, projevujícím se během několika sekund a ve velmi malé toxicitě pro savce, která je dána jeho snadnou přeměnou na netoxické produkty. Na rozdíl od DDT není pyrethrum perzistentní a nezanechává toxická rezidua, čímž lze vysvětlit, proč tento insekticid nemá tendenci vést k vývoji rezistentních hmyzích populací. Pyrethriny se používají proti škůdcům v uskladněných potravinách, proti škůdcům v domácnosti i v průmyslu. Pyrethrové aerosolové spreje jsou pro bezpečné použití a rychlý účinek vynikajícími insekticidy pro použití v bytech (Martin and Worthing 1974).

Velkou nevýhodou pyrethrinů, zvláště jako prostředků proti zemědělským škůdcům, je právě jejich nedostatečná perzistence daná nestabilitou na vzduchu při osvětlení. Často se stává, že se hmyz po styku se subletální dávkou pyrethrinů zotaví, a proto se v praxi tyto látky většinou musí mísit s malým množstvím jiného insekticidu, aby bylo zaručeno, že nedojde k zotavení hmyzu (Cremllyn 1985). V posledních třiceti letech byly pyrethriny postupně nahrazovány jejich syntetické analogy - pyrethroidy, zejména vzhledem k jejich fotostabilitě. Rozpustnost pyrethroidů ve vodě je velmi nízká, naopak liposolubita je velmi vysoká. Přítomnost halogenů v některých pyrethroidech přispívá k větší perzistenci poskytující lepší reziduální aktivitu vůči hmyzu, ale také ke zvýšení potencionálního negativního účinku na životní prostředí (Bradbury and Coast 1989; Yildirim et al. 2006).

Pyrethroidy je podle Hayese (1994) možné rozdělit podle jejich chemické struktury a mechanismu účinku na dva typy:

- Pyrethroidy prvního typu (neobsahují α -kyano skupinu, např.: permethrin) reverzibilně blokuji sodíkové kanály nervových vláken a tím prodlužují fázi jejich depolarizace, a to se nakonec projeví jako tremor.

- Pyrethroidy druhého typu (obsahují α -kyano 3 fenoxibenzylovou skupinu, např.: cypermethrin, deltamethrin, fenvalerát) reverzibilně blokují sodíkové kanály nervových vláken a také ovlivňují GABA receptory v nervových vláknech

Pyrethroidy se všeobecně vyznačují nízkou toxicitou pro savce, ale vysokou toxicitou pro hmyz a ryby. Primárně bývá zasažen nervový systém, o čemž svědčí i rozsáhlé poškození nervové tkáně prokázané histologickými studiemi. Schopnost hmyzu zotavit se po styku se subletální dávkou pyrethroidů je způsobena rychlou enzymovou detoxikací *in vivo*, pravděpodobně účinkem různých mikrosomálních oxidáz (Jacobson and Crosby 1971).

Pyrethroidy působí jak na periferní, tak na centrální nervový systém, kde vyvolávají opakované depolarizace následované křečemi zasaženého hmyzu. Při aplikaci větších koncentrací pyrethroidů dochází k zablokování vedení nervových vzruchů (Corbett 1974).

Pyrethroidy jsou velmi toxické pro ryby (hodnota LC_{50} je obecně pod $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), a proto je velmi nebezpečné jejich použití v blízkosti vodních toků (Bradbury and Coast 1989b).

V chovech ryb jsou pyrethroidy (především na bázi deltamethrinu) používány ve skandinávských zemích proti parazitárním onemocněním vyvolaných *Lepeophtheirus salmonis* ve farmových chovech lososovitých druhů ryb (Noga 1996).

Klinické příznaky otravy ryb pyrethroidy nejsou specifické. Zjišťovány jsou poruchy dýchání, případně „taneční pohyby“. Z patologickoanatomických změn vystupuje do popředí přítomnost malého množství transudátu v dutině tělní (Sobodová et al. 2007).

Insekticidní účinnost pyrethroidů je větší při nižších teplotách (negativní teplotní koeficient). Blokující účinek pyrethroidů na nervové vedení při negativním teplotním koeficientu je pravděpodobně způsoben rychlejší detoxikací při vyšších teplotách. Toto blokování je primární příčinou insekticidní účinnosti pyrethroidů (Corbett 1974).

Pyrethroidy jsou jedinými insekticidy, které se komerčně formulují se synergickými látkami, protože zvyšují účinek insekticidu během jeho omezené životnosti. Mechanismus účinku synergických látek pravděpodobně spočívá v inhibici oxidáz, které se podílejí na detoxikaci aktivní látky. Synergické látky na bázi methyldioxyfenylových derivátů jsou metabolizovány oxidačními pochody, které

jsou stejné jako ty, jež tvoří součást odbourávacího procesu pyrethroidů. Enzymový systém je přijímá jako náhražku za pyrethroidy a tím je inhibován metabolismus insekticidně účinné látky (Martin 1973).

Obavy vyvolává potencionální riziko pro vodní organismy (zvláště pro ryby), vzhledem k jejich toxicitě prokázané ve standardních laboratorních testech. Situace v přírodních podmínkách je odlišná od uměle udržovaných konstantních podmínek během laboratorních testů. Důležitým faktorem je rychlá absorpce pyrethroidů na sediment, organický materiál a rostliny, která výrazně snižuje biologickou dostupnost pesticidů a tím i riziko pro vodní organismy (Hill et al. 1994).

2.3.1. Bifenthrin

Bifenthrin je syntetický pyrethroid. Bifenthrin je kontaktní insekticid, používaný k ochraně plodin (vinná réva, chmel, řepka, hořčice, pšenice, brambory, cukrová řepa, hrách). Bifenthrin má některé strukturální podobnosti s cypermethrinem, tetramethrinem a permethrinem, ale je charakterizován větší světelnou stálostí a insekticidní aktivitou. Ovlivňuje nervovou soustavu hmyzu a způsobuje jeho ochrnutí (Exttoxnet 1995).

Bifenthrin ($C_{23}H_{22}CCF_3O_2$) je světle hnědá látka s aromatickým zápachem. Chemický vzorec je: 2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate.

Je rozpustný v methylchloridu, chloroformu, acetonu, toluenu a v éterech a je málo rozpustný v methanolu (Patty 2001).

přípravků včetně pesticidů. Tyto testy mají rovněž velký význam při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách. Při hodnocení akutní toxicity chemických látek se zjišťují hodnoty LC50 (letální koncentrace pro 50% testovacích organismů-v testech na rybách) (SVOBODOVÁ et al. 2000).

Stanovené hodnoty 96hLC50 umožňují zařadit testované pesticidy do tříd toxicity. Hodnocení chemických látek a přípravků včetně pesticidů se v současné době provádí podle Zákona č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích. Testované látky a přípravky se označují z hlediska speciálních rizik následujícími **R větami** (Svobodová et al. 2003):

R50: vysoce toxické pro vodní organismy $LC(EC, IC)_{50} \leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$

R51: toxické pro vodní organismy $1 \text{ mg.l}^{-1} < LC(EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$

R52: škodlivé pro vodní organismy $10 \text{ mg.l}^{-1} < LC(EC, IC)_{50} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$

R53: může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí $LC(EC, IC)_{50} > 100 \text{ mg.l}^{-1}$

Při provádění testů toxicity na rybách byly dodrženy zásady zákona č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a vyhlášky Mze ČR č. 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby bylo provedeno podle standardně operačního postupu SOP 01, který vychází z normativních postupů ČSN EN ISO 7346-2 „Jakost vod-Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby/*Brachydanio rerio* Hamilton Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ Část 2: Obnovovací metoda” OECD 203 „Fish Acute Toxicity Test”.

3.1.1. Princip a podmínky testu

Ryby byly vystaveny po dobu 96 hodin různým koncentracím pesticidů Sencor 70 WG a Talstar 10 EC rozpuštěných ve standardně připravené ředící vodě, současně byly nasazeny ryby do ředící vody bez testované látky - kontrola.

V průběhu testu se kontroloval stav a chování ryb a byli odlovováni uhynulí jedinci. V časovém úseku 24, 48, 72 a 96 hodin se zaznamenávaly celkové počty uhynulých ryb, teplota, pH, procentické nasycení vody kyslíkem v jednotlivých

koncentracích a v kontrolním akváriu. Z těchto hodnot se stanoví střední letální koncentrace LC50 v časovém úseku 96 hodin (96hLC50) (SVOBODOVÁ et al. 2000).

Ryby byly po dobu 96 hodin testovány ve 20 l akváriích o průměrné teplotě vody 18 °C. Byla použita vodovodní voda, která byla aerací zbavena chloru. Po dobu pokusu byl nastaven světelný režim s 12 hodinovým osvětlením. Během testu ryby nebyly krmeny a dostatek kyslíku byl zajištěn provzdušňováním vody.

3.1.2. Pokusné ryby

Jako pokusná ryba byl použit kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) stejného původu. Ryby byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu.

Ke stanovení 96hLC50 Sencoru 70 WG byly použity ryby s průměrnou hmotností 21,9 g (5 - 33,1 g) a s průměrnou celkovou délkou těla 123 mm (95 - 138 mm).

Ke stanovení 96hLC50 Talstaru 10 EC byly použity ryby s průměrnou hmotností $15,3 \pm 4,57$ a s průměrnou celkovou délkou těla $75 \pm 5,34$ mm.

3.1.3. Pracovní postup

Adaptace ryb: Před testem byly ryby aklimatizovány 7 dnů v ředící vodě se stejným osvětlením a teplotou jako při vlastním testu.

Příprava koncentrační řady: Pro Sencor 70 WG je v mg.l⁻¹, pro Talstar 10 EC je v µg.l⁻¹ (při testování látky o neznámé toxicitě se rozsah koncentrací pro základní test stanoví na základě výsledků předběžného testu). Testovaný vzorek byl dávkován formou roztoku do jednotlivých testovacích akvárií.

3.1.4. Předběžný test

Předběžný test se skládal ze 6 koncentrací testované látky (předkládaných v širokém rozmezí) a kontroly. U přípravku Sencor 70 WG v koncentracích: 0,1 mg.l⁻¹; 10 mg.l⁻¹; 50 mg.l⁻¹; 100 mg.l⁻¹; 200 mg.l⁻¹; 300 mg.l⁻¹. U přípravku Talstar 10 EC v koncentracích: 5 µg.l⁻¹; 10 µg.l⁻¹; 20 µg.l⁻¹; 50 µg.l⁻¹; 100 µg.l⁻¹; 500 µg.l⁻¹; 1000 µg.l⁻¹. Do jednotlivých koncentrací testované látky a kontroly bylo nasazeno 5 ks náhodně vybraných ryb. Na začátku testu a dále ve 24 hodinových intervalech byla měřena teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 48 hodinách byly ryby přeloveny do čerstvě připravených roztoků testované látky. V průběhu testu bylo sledováno a zaznamenáváno chování ryb a jejich mortalita. Po ukončení testu byla změřena celková

délka těla a váha u 10 % testovaných ryb a byla zaznamenána do pracovního protokolu. Na základě výsledků tohoto testu byla stanovena koncentrační řada pro základní test.

3.1.5. Základní test

Základní test se skládal ze 6 různých koncentrací testované látky (v rozmezí stanoveném v předběžném testu) a kontroly. U přípravku Sencor 70 WG v koncentracích: 100 mg.l⁻¹; 150 mg.l⁻¹; 200 mg.l⁻¹; 230 mg.l⁻¹; 260 mg.l⁻¹; 300 mg.l⁻¹. U přípravku Talstar 10 EC v koncentracích: 20 µg.l⁻¹; 40 µg.l⁻¹; 60 µg.l⁻¹; 80 µg.l⁻¹; 100 µg.l⁻¹; 120 µg.l⁻¹; 140 µg.l⁻¹.

Do připravených koncentrací a kontroly bylo nasazeno po 10 kusech náhodně vybraných ryb. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech byla měřena teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 48 hodinových intervalech byly ryby přeloveny do čerstvě připravených roztoků testované látky. V průběhu testu bylo sledováno a zaznamenáváno chování ryb a jejich mortalita. Po ukončení testu se změřila celková délka těla a váha u 10 % testovaných ryb.

V průběhu testu část ryb uhynula. Po ukončení testu byli jedinci, kteří přežili (s výjimkou ryb v kontrolní skupině), usmrceni oxidem uhličitým vyrobeným v sifonové láhvi. Usmrcení bylo provedeno bezprostředně po skončení testu osobou způsobilou podle § 17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

3.1.6. Platnost testu (validace)

podle Svobodové et al. (2000)

Výsledky se považují za platné, jestliže jsou splněna následující kritéria:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích a v kontrole během celého testu nepoklesla pod 60 % nasycení
- koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace
- mortalita kontrolních ryb nepřekročila 10 %
- zjištěná hodnota 24hLC50 standardu je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard

3.1.7. Vyhodnocení testu

V průběhu testu byla sledována a zaznamenávána mortalita ryb a výsledky byly vyhodnoceny probitovou analýzou. Nedílnou součástí bylo samozřejmě využití výpočetní techniky (Program Eko-Tox 5.1).

3.2. Biochemické a hematologické vyšetření krve

Pro stanovení biochemického a hematologického profilu krve kapra obecného po působení pesticidů Sencor 70 WG a Talstar 10 EC byly ryby vystaveny 96 hodinovému působení 96hLC50 (Sencor 70 WG: 250,2 mg.l⁻¹, Talstar 10 EC: 57,5 µg.l⁻¹). Hodnoty 96hLC50 byly stanoveny akutními testy toxicity. Testy byly prováděny ve 3 akváriích (1 kontrola, 2 experimentální s testovanou látkou) o objemu 200 l.

Pro stanovení biochemického a hematologického profilu krve kapra obecného bylo testováno 20 kusů kontrolních ryb a 40 kusů pokusných ryb.

Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech byla měřena teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 24 hodinových intervalech byly ryby přeloveny do čerstvě připravených roztoků testované látky. V průběhu testu byla sledována a zaznamenávána mortalita a chování ryb. Po 96 hodinách byl proveden odběr krve pro stanovení biochemického a hematologického profilu krve u 15 kusů kontrolních a 15 kusů pokusných ryb. Po ukončení testu se změřila celková délka těla a váha testovaných ryb.

Ryby použité ke stanovení hematologického a biochemického profilu krevní plazmy po expozici Sencoru 70 WG měly průměrnou hmotnost 480,67 g (265 - 695 g) a průměrnou celkovou délku těla 307 mm (28 - 340 mm).

Ryby použité ke stanovení hematologického a biochemického profilu krevní plazmy po expozici Talstaru 10 EC měly průměrnou hmotnost 832,5 ± 167,89 g a průměrnou celkovou délku těla 366,25 ± 19,88 mm.

3.2.1. Odběr krve

Nejvhodnější metodou odběru krve u ryb s vyšší hmotností je punkcí ocasních cév pomocí heparinizované injekční jehly o průsvitu do 0,5 mm. Při heparinizaci je nutné dbát na to, aby heparin vytvořil pouze jemný film na vnitřní stěně jehly (Svobodová et al. 1986).

Vlastní odběr krve byl proveden tak, že ryba byla po vylovení z vody rychle fixována čtvercem papírové vaty za její hřbetní část. Ventrální část trupu byla volně

přístupná. Na ventrální straně ocasního násadce, kaudálně od báze řitní ploutve byla stržena nepárová šupina. Po osušení místa se byla zavedena ve střední rovině, asi 1 cm kaudálně od řitní ploutve, kraniodorzálním směrem pod úhlem 45° injekční jehla pevně nasazená na kónus heparinizované jednorázové injekční stříkačky (obr. č. 3). Jehla byla zavedena pomalu mírným tlakem, jímž byl překonán odpor okolní svaloviny. Takto při šetrném postupu došlo nejprve k nabodnutí ocasní žíly, což se projevilo únikem krve z kónusu jehly do stříkačky. Při rychlejším postupu hrot jehly projede zpravidla žílou, ale i tepnou a narazí na tvrdou překážku obratlového těla. V tomto případě se jehla mírně povytáhne a odebírá se krev z tepny nebo žíly, což není snadné vždy odlišit (Doubek et al. 2003).

Ke stabilizaci krve byl použit vodný roztok sodné soli heparinu (Heparin SPOFA inj.). Pro stabilizaci 1ml krve ryb stačí 0,01 ml (1 kapka) vodného roztoku heparinu.

Odebraná krev byla odstředována v chlazené odstředivce po dobu 10 minut. Po centrifugaci nesrážlivé krve a následné separaci plazmy byla separovaná plazma uložena v mrazícím boxu při teplotě - 85°C.

Obr. č. 3: Odběr krve punkcí ocasních cév



3.2.2. Stanovení biochemických ukazatelů

Ukazatele v krevní plazmě byly stanoveny biochemickým analyzátozem krve typu VETTEST 8008 od firmy Medisoft international LTD. Pracuje na principu suché chemické technologie a kolorimetrické reakci (6 zdrojů světla o různé vlnové délce). K analýze je třeba 0,075 ml plazmy. Analyzátor řídí počítač. Analýza probíhá na selektivních testovacích discích (multi-layer film slides, Kodak) s laserovým čtením bar - kódů. Celkem lze stanovit 21 biochemických parametrů krve u 27 druhů zvířat. Současně lze stanovit 1 - 12 biochemických parametrů za 9 minut.

K interpretaci výsledků byly použity následující biochemické ukazatele a hodnoty které jsou považovány za fyziologické u kapra (Svobodové et al. 1986):

Glukóza (GLU)

Koncentrace glukózy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2 - 5 mmol.l⁻¹.

Celkové bílkoviny (TP)

Koncentrace celkových bílkovin v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu

20 - 40 g.l⁻¹.

Triglyceridy (TRIG)

Koncentrace triglyceridů v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1 - 4 mmol.l⁻¹.

Amoniak (NH₃)

Hladina amoniaku v krevní plazmě ryb je velmi variabilní, je silně ovlivněna působením různých endogenních a exogenních faktorů. Koncentrace amoniaku v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 200 - 800 μmol.l⁻¹.

Alanin aminotransferáza (ALT)

Aktivita alanin aminotransferázy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu

0,05 - 0,32 μkat.l⁻¹.

Aspartát aminotransferáza (AST)

Aktivita aspartát aminotransferázy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu

0,25 - 3,50 μkat.l⁻¹.

Laktát dehydrogenáza (LDH)

Aktivita laktát dehydrogenázy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu

2,25 - 4,50 μkat.l⁻¹.

Dále byly použity biochemické ukazatele u kterých nebyly stanoveny normály:

Kreatin kináza (CK)

Aktivita kreatin kinázy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 9,8 – 60,2 μkat.l⁻¹.

Alkalická fosfatáza (ALP)

Koncentrace alkalické fosfatázy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 0,15 – 5,1 μkat.l⁻¹.

Anorganický fosfát (PHOS)

Koncentrace anorganického fosfátu v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1,01 – 2,51 mmol.l⁻¹.

Kalcium (Ca²⁺)

Koncentrace kalcia v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2,0 – 16,1 mmol.l⁻¹.

Biochemické ukazatele v krevní plazmě byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistika 8.0.

3.2.3. Stanovení hematologických ukazatelů

3.2.3.1. Stanovení počtu erytrocytů

Stanovení počtu erytrocytů (Er) u ryb se provádí v heparinizované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1: 200. K ředění krve se používá tzv. baničkové metody dle Bürkera. Pipetou se naplní počítací Bürkerova komůrka naředěnou krví. Erytrocyty se počítají ve 20 velkých čtvercích. Počítá se při 200násobném zvětšení. Při počítání se postupuje tak, že se počítají všechny erytrocyty uvnitř čtverců, aniž se dotýkají některé z jejich stran. Z erytrocytů, které se dotýkají stran se počítají jen ty, které se dotýkají pravé a horní strany buď uvnitř nebo vně. Celkové napočítané množství erytrocytů se násobí číslem 0,01 a výsledný počet je množství erytrocytů udávané v $T.l^{-1}$. Počet erytrocytů se u kapra pohybuje v rozmezí 1,1 – 1,8 $T.l^{-1}$ (Svobodové et al. 1986).

3.2.3.2. Stanovení koncentrace hemoglobinu

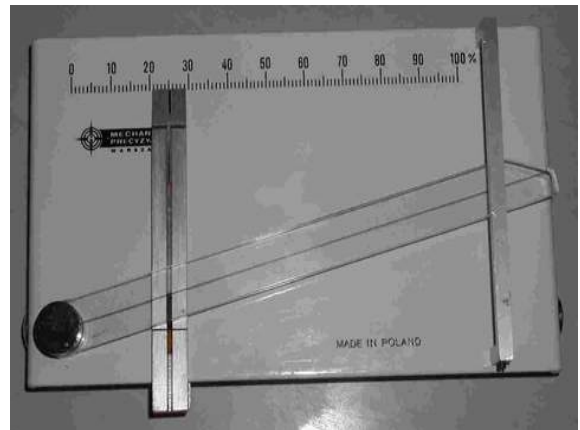
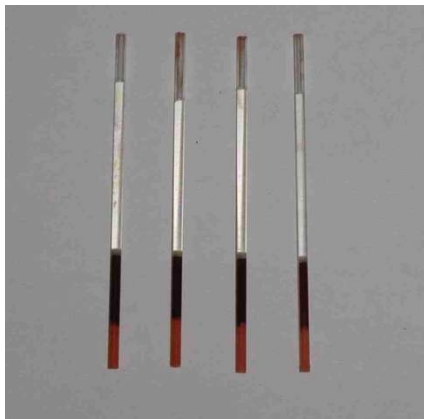
Ke stanovení koncentrace hemoglobinu (Hb) v krvi ryb je používána fotometrická kyanohemiglobinová metoda. Princip metody spočívá v tom, že pomocí transformačního roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a přemění se na stálý kyanohemiglobin, který se stanoví fotometricky. Jako transformační roztok byl použit roztok dle van Kampena a Zijlstra. Koncentrace hemoglobinu v krvi kapra se pohybuje v rozsahu 60 - 100 $g.l^{-1}$ (Svobodové et al. 1986).

3.2.3.3. Stanovení hematokritové hodnoty

Hematokritová hodnota (PCV) vyjadřuje objem erytrocytů k celkovému objemu krve. Ke stanovení hematokritových hodnot se používají heparinizované kapilárky o délce 7,5 cm. Čerstvě odebraná krev se nasaje do kapilárek do 2/3 výšky a čistý konec se utěsní pomocí speciální modelovací hmoty. Pak se kapilárky vloží do hematokritové odstředivky a odstředí se po dobu 3 minut. Po odstředění se pomocí posuvného měřítka s noniem odečtou procenta hematokritu. Zjištěná hodnota v procentech se

vynásobí koeficientem 0,01 a výsledná hodnota je hodnota PCV v l.l⁻¹. Hematokritová hodnota v krvi kapra se pohybuje v rozsahu 0,28 - 0,40 l.l⁻¹ (Svobodové et al. 1986).

Obr. č. 4: Kapilárky s krví po odstředění a měření hematokritu pomocí posuvného měřítka



3.2.3.4. Stanovení středního objemu erytrocytů

Hodnota středního objemu erytrocytu (MCV) se vypočítá z hematokritové hodnoty (PCV) udané v l.l⁻¹ a počtu erytrocytů (Er) v T.l⁻¹ dle následujícího vzorce:

$$\text{MCV} = \frac{\text{PCV} \cdot 1\,000}{\text{Er}}$$

Hodnota středního objemu erytrocytu udávaná ve fentolitrech (fl) se pohybuje u kapra v rozmezí 200 – 300 fl a u pstruha duhového v rozmezí 350 – 400 fl (Svobodová et al. 1986).

3.2.3.5. Stanovení střední barevné koncentrace

Střední barevná koncentrace (MCHC) vyjadřuje koncentraci hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytu. Vypočítá se z hodnoty hemoglobinu (Hb) v g.l⁻¹ a z hematokritové hodnoty (PCV) v l.l⁻¹ dle následujícího vzorce:

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb}}{\text{PCV}}$$

Hodnota střední barevné koncentrace se pohybuje u kapra v rozmezí 200 – 260 g.l⁻¹ a u pstruhů duhových v rozmezí 170 – 200 g.l⁻¹ (Svobodová et al. 1986).

3.2.3.6. Stanovení hemoglobinu erytrocytu

Hodnota hemoglobin erytrocytu (MCH) vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých erytrocytech a udává se v pikogramech (pg). Vypočítává se z hodnoty hemoglobinu (Hb) v g.l⁻¹ a z počtu erytrocytů (Er) v T.l⁻¹ dle následujícího vzorce:

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb}}{\text{Er}}$$

Hodnota hemoglobin erytrocytu se pohybuje u kapra v rozmezí 50 – 60 pg (Svobodová et al. 1986).

3.2.3.7. Stanovení počtu leukocytů

Stanovení počtu leukocytů (Leuko) u ryb se provádí v heparinizované krvi ředěné roztokem dle Procházky a Škroba v poměru 1: 200. K ředění krve se používá tzv. baničkové metody dle Bürkera. Pipetou se naplní počítací Bürkerova komůrka naředěnou krví. Leukocyty se počítají ve 100 velkých čtvercích. Počítá se při 200násobném zvětšení. Při počítání se postupuje tak, že se počítají všechny leukocyty uvnitř čtverců, aniž se dotýkají některé z jejich stran. Z leukocytů, které se dotýkají stran se počítají jen ty, které se dotýkají pravé a horní strany buď uvnitř nebo vně. Celkové napočítané množství leukocytů ve 100 velkých čtvercích je počet leukocytů udávaný v G.l⁻¹. Počet leukocytů se u kapra pohybuje v rozmezí 10 – 80 G.l⁻¹ (Svobodová et al. 1986).

4. Výsledky a diskuse

V této kapitole jsou vyhodnoceny testy akutní toxicity pesticidů na bázi triazinů (Sencor 70 WG) a na bázi pyrethroidů (Talstar 10 EC) pro kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) v časovém úseku 96 hodin. Zároveň tato část obsahuje vyhodnocení vlivu těchto pesticidů na biochemický a hematologický profil krve pokusných ryb.

4.1. Sencor 70 WG

4.1.1. Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG

Ryby použité v průběhu předběžného testu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o plůdek kapra obecného, jehož celková délka těla se pohybovala v rozmezí od 95 mm do 138 mm (ø 123 mm). Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí od 5 g do 30 g (ø 21,9 g).

Teplota vody během předběžného testu se pohybovala mezi 17,4 – 18,9 °C, pH bylo 7,38 – 7,97 a nasycení vody kyslíkem mezi 92 - 99 %. Údaje o předběžném testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 1). Fyzikálně chemické vlastnosti vody během předběžného testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 2).

Ryby použité v průběhu základního testu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o plůdek kapra obecného, jehož celková délka těla se pohybovala v rozmezí od 105 mm do 148 mm (ø 129 mm). Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí od 6 g do 32,1 g (ø 22,27 g).

Teplota vody během základního testu se pohybovala mezi 17,8 – 19,5 °C, pH bylo 7,50 – 8,03 a nasycení vody kyslíkem mezi 87 - 100 %. Údaje o základním testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 3). Fyzikálně chemické vlastnosti vody během předběžného testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 4).

Tabulka č. 9: Test akutní toxicity 96hLC50 u kapra obecného po působení Sencoru 70 WG

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Mortalita (%)
Kontrola	0
100	0
150	0
200	0
230	10
260	50
300	100

Výsledkem akutního testu toxicity je hodnota 96hLC 50 pro Sencor 70 WG.

96hLC 50 = 250,2 mg.l⁻¹ s 95% intervalem spolehlivosti (-19,5; +18,1)

96hLC 0 = 203,3 mg.l⁻¹

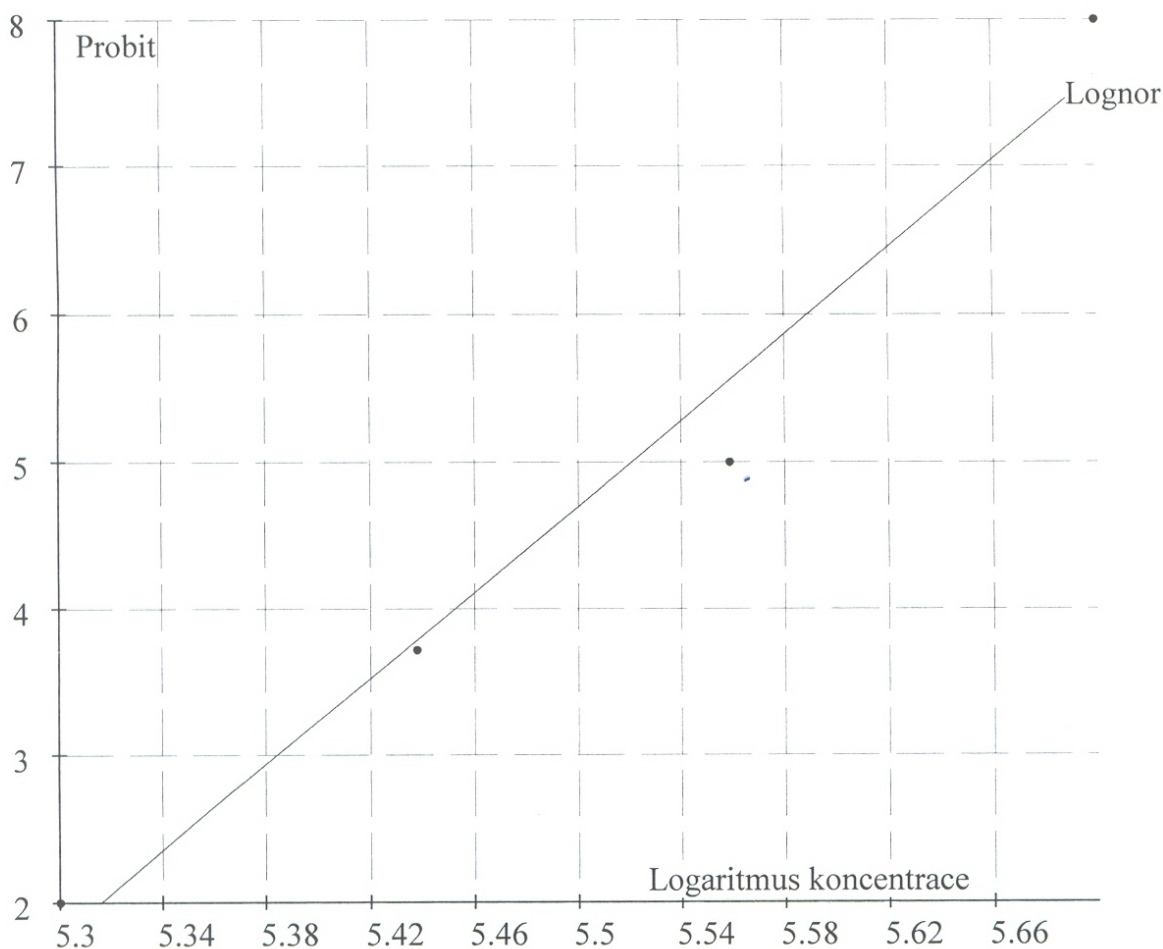
96hLC 100 = 308,0 mg.l⁻¹

Na základě zjištěné hodnoty 96hLC50 (250,2 mg.l⁻¹) může být přípravek Sencor 70 WG zařazen do skupiny látek, které mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí: riziková věta R 53 uvádí, že hodnoty 96hLC50 jsou větší než 100 mg.l⁻¹. Hodnota 96hLC50 pro Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) odpovídá hodnotě 175,14 mg.l⁻¹ metribuzinu.

Mayer and Ellersieck (1986), Munn et al. (2006) uvádějí hodnotu LC50 64 – 76 mg.l⁻¹ metribuzinu pro pstruha duhového. Velíšek et al. (2008) udává pro pstruha duhového hodnotu 96hLC50 62,51 mg.l⁻¹metribuzinu. Fairchild and Sappington (2002) stanovili hodnotu 96hLC50 76 mg.l⁻¹metribuzinu pro ryby.

Hodnota 96hLC50 metribuzinu pro kapra, stanovená v tomto pokusu, se rozchází s hodnotami, které uvádějí jiní autoři. Rozdílné hodnoty jsou způsobeny vyšší citlivostí lososovitých ryb k pesticidům na bázi triazinů.

Obr.č. 5: Test akutní toxicity Sencoru 70 WG za 96 hodin

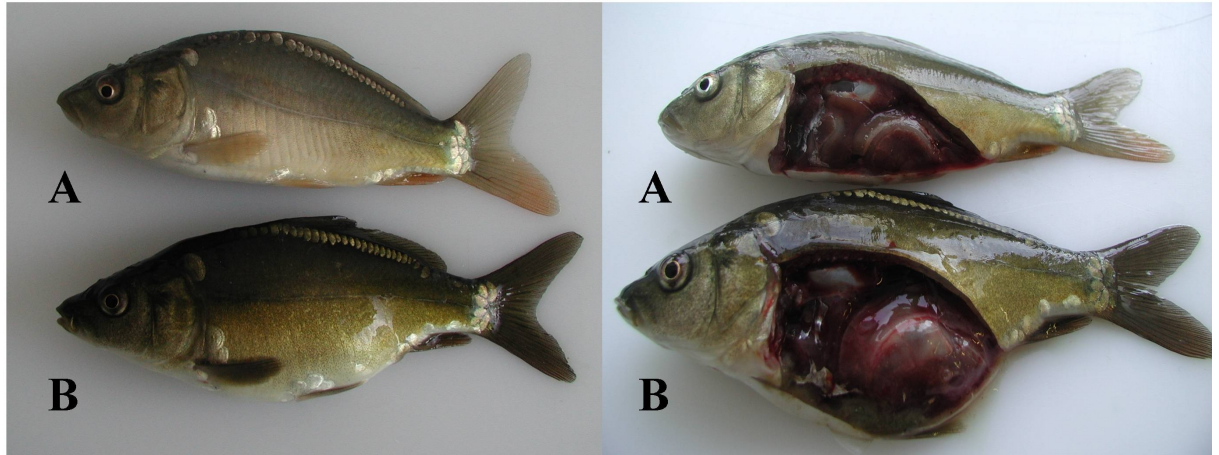


V průběhu testu byla po působení metribuzinu pozorována u všech kaprů zvýšená intenzita dýchání, ztráta koordinací a pohybu. Ryby ležely na dně, pohybovali se v kruhu a po chvíli byla zaznamenána krátká excitační fáze (křeče). Podobné příznaky chování byly pozorovány u *Carassius auratus* po akutní expozici atrazinu ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) (Saglio and Trijasse 1998).

Po ukončení testu akutní toxicity byla provedena pitva ryb. Výsledky pitvy jsou znázorněny na obr.č. 5. Pitva odhalila zvýšenou tvorbu hlenu vodnaté konzistence na povrchu těla a kůže byla tmavě zbarvená. Ryby měly zvětšenou dutinu tělní, která obsahovala transudát. V dutině tělní byl zjištěn výraznější nástřik cév vnitřních orgánů. Svobodová et Pečená (1988), Velišek et al. (2008) pozorovali transudát v tělní dutině pstruha duhového po akutní expozici pesticidů na bázi triazinů. Zvýšení eliminace proteinů nastalo pravděpodobně v důsledku poškození ledvinových tubulárních buněk, které bylo zjištěno při histopatologickém vyšetření ledvin. Následkem toho byla zjištěna

hypoproteinémie u kapra obecného (z $42,13 \pm 4,53 \text{ g.l}^{-1}$ na $34,07 \pm 5,05 \text{ g.l}^{-1}$) v krevní plazmě, která způsobila generaci transudátu v dutině tělní.

Obr. č. 6: Kapr obecný: A - kontrolní ryba, B – ryba s typickými příznaky působení triazinů (zvětšení tělních dutin a přítomnost transudátu).



4.1.2. Stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného

Ryby použité pro stanovení biochemického a hematologického profilu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o násadu kapra obecného, jehož celková délka těla se pohybovala v rozmezí od 280 mm do 340 mm (\bar{x} 307 mm). Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí od 265 g do 695 g (\bar{x} 480,67 g).

Studie toxicity pesticidů na bázi triazinů naznačují, že mohou vyvolat morfologické, biochemické a fyziologické změny na rybách (Saglio and Trijasse 1998, Reddy et al. 1992, Davies et al. 1994).

4.1.2.1. Stanovení biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného

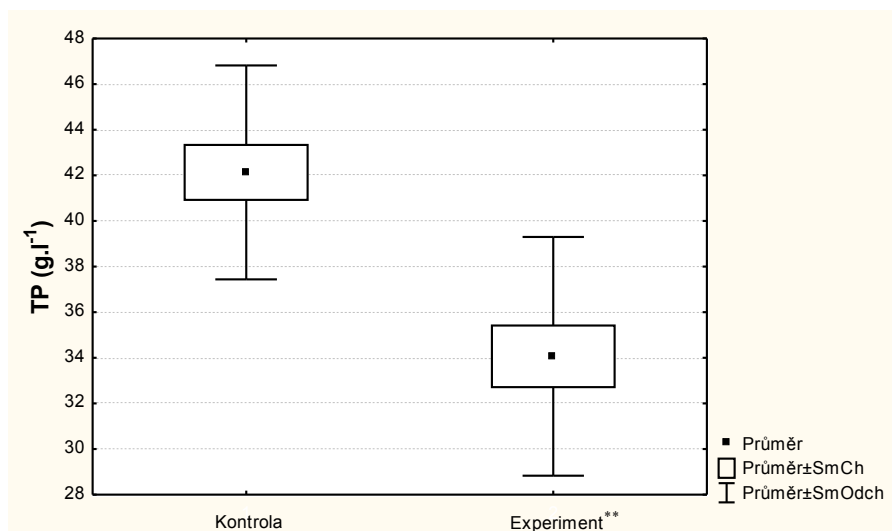
Na základě vyšetření biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného v kontrolní a pokusné skupině bylo zjištěno po působení pesticidního přípravku Sencor 70 WG signifikantní ($p < 0,01$) snížení hodnot celkových bílkovin, triglyceridů, laktát dehydrogenázy a anorganického fosfátu.

Tabulka č. 10: Vliv přípravku Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krve kapra obecného po expozici 96hLC 50

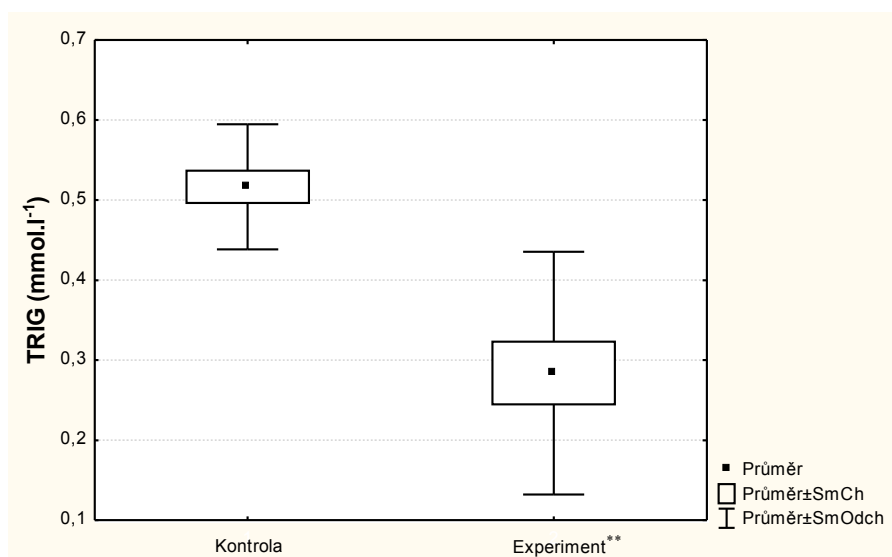
Ukazatel	Kontrola $x \pm SD$ (n = 15)	Experiment $x \pm SD$ (n = 15)
TP (g.l ⁻¹)	42,13 ± 4,53 ^a	34,07 ± 5,05 ^b
TRIG (mmol.l ⁻¹)	0,52 ± 0,08 ^a	0,28 ± 0,15 ^b
GLU (mmol.l ⁻¹)	4,87 ± 0,79 ^a	23,99 ± 5,59 ^b
NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	292,20 ± 109,19 ^a	462,33 ± 85,55 ^b
AST (μkat.l ⁻¹)	2,11 ± 1,02 ^a	1,51 ± 0,51 ^a
ALT (μkat.l ⁻¹)	0,47 ± 0,13 ^a	0,40 ± 0,09 ^a
LDH (μkat.l ⁻¹)	6,14 ± 1,20 ^a	4,37 ± 1,38 ^b
ALP (μkat.l ⁻¹)	0,20 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,06 ^a
CK (μkat.l ⁻¹)	14,35 ± 0,72 ^a	13,94 ± 0,58 ^a
PHOS (mmol.l ⁻¹)	1,94 ± 0,33 ^a	1,01 ± 0,24 ^b
Ca ²⁺ (mmol.l ⁻¹)	2,26 ± 0,04 ^a	2,40 ± 0,15 ^b

Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA $p < 0,01$).

Graf č. 1: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na hladinu celkových bílkovin v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)



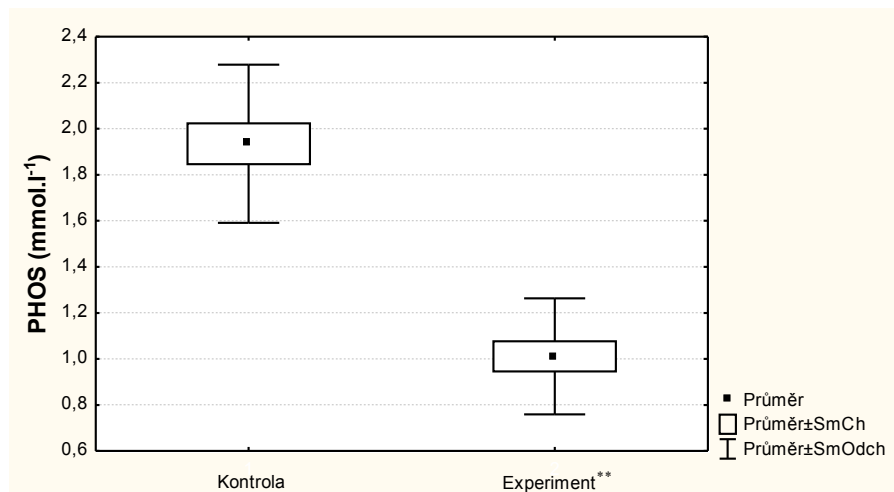
Graf č. 2: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na hladinu triglyceridů v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)



Graf č. 3: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na aktivitu laktát dehydrogenázy v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)

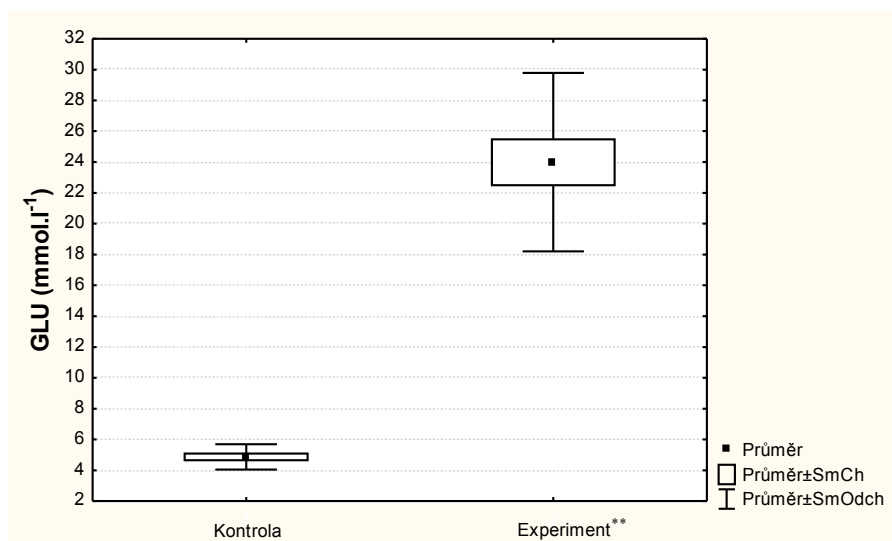


Graf č. 4: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na koncentraci anorganického fosfátu v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)

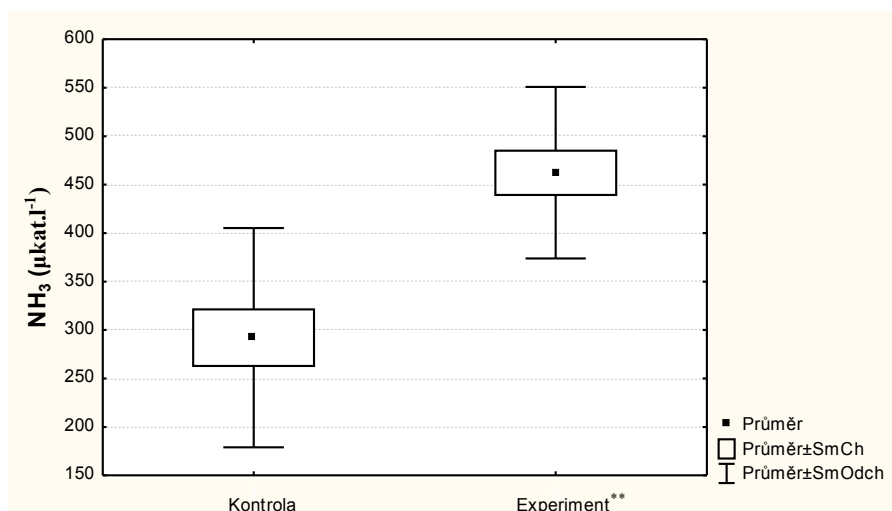


Naopak signifikantní ($p < 0,01$) zvýšení hodnot bylo zjištěno u glukózy, amoniaku a vápenných iontů.

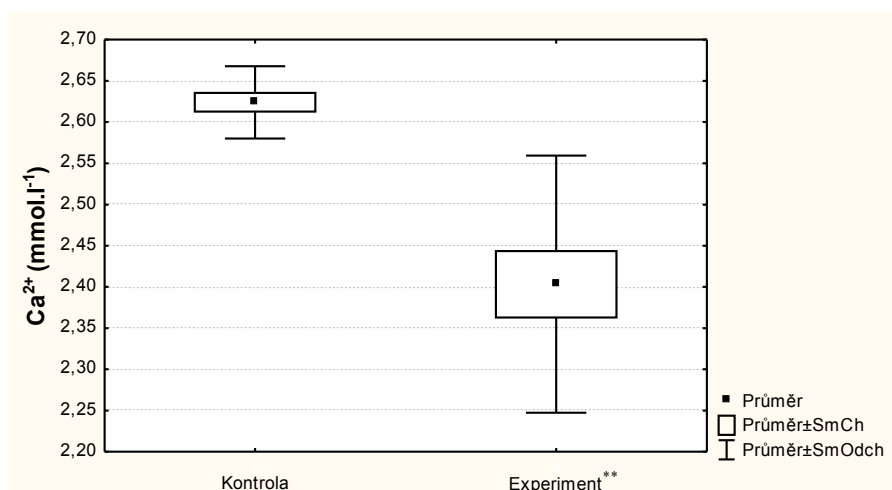
Graf č. 5: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na koncentraci glukózy v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)



Graf č. 6: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na koncentraci amoniaku v krvi kapra obecného (statistická významnost * $p < 0,01$)



Graf č. 7: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na koncentraci vápníkových iontů v krvi kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)



U aspartát aminotransferázy, alanin aminotransferázy, alkalické fosfatázy a kreatin kinázy nebyla prokázána signifikantní rozdílnost mezi oběma skupinami.

Zvýšení koncentrace amoniaku v krvi ukazuje na zvýšený katabolismus bílkovin, a nebo na poruchu vylučování amoniaku. Zvýšení koncentrace glukózy je způsobeno odezvou testovaných ryb na metabolický stres. Snížení koncentrace laktát dehydrogenázy ukazuje na metabolické změny tj.: katabolismus glykogenu a glukózy a posun směrem k tvorbě laktátu u stresovaných ryb, především ve svalovině. Tato zjištění se shodují s výsledky Mekkawy et al. (1996), který pozoroval značný nárůst v koncentraci hladiny glukózy a signifikantní snížení celkových proteinů u *Oreochromis niloticus* a *Chrysichthyes auratus* po akutní expozici 3 mg.l⁻¹ atrazinu. Davies et al. (1994) pozoroval snížení celkových proteinů u pstruha duhového po akutní expozici 50 μg.l⁻¹ atrazinu. Prasad et Reddy (1994) pozorovali zvýšené množství vápníkových iontů u *Tilapia mossambica* po akutní expozici atrazinu.

4.1.2.2. Stanovení hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného

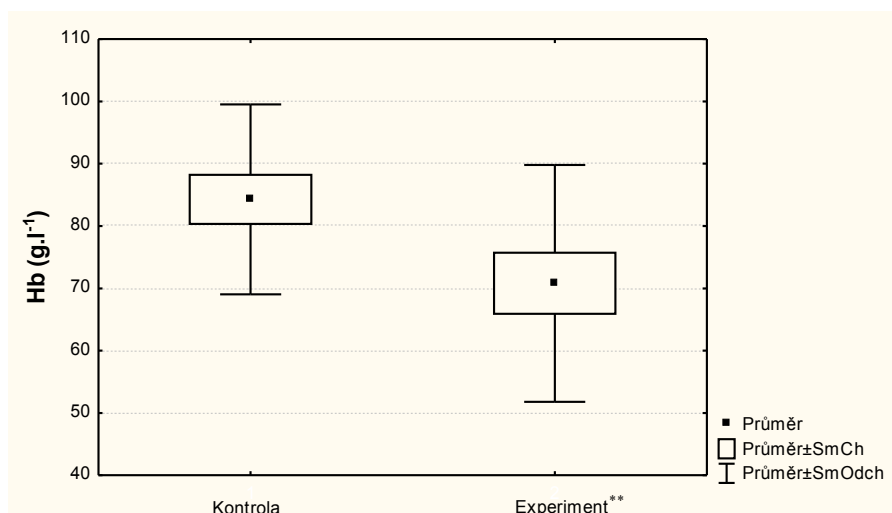
Na základě vyšetření hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného v kontrolní a pokusné skupině bylo zjištěno po působení pesticidního přípravku Sencor 70 WG signifikantní snížení ($p < 0,01$) hodnot hemoglobinu, hematokritové hodnoty, středního objemu erytrocytu a počtu leukocytů.

Tabulka č. 11: Vliv přípravku Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krve kapra obecného po expozici 96hLC 50

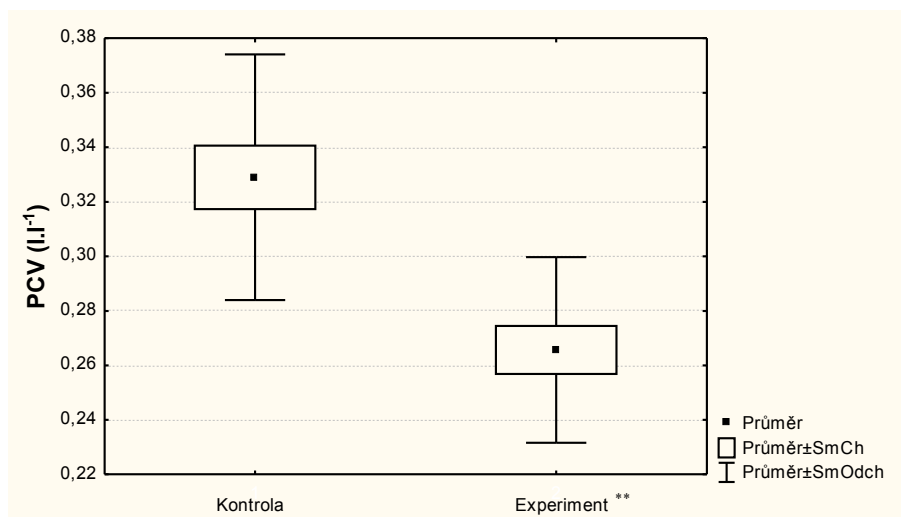
Ukazatel	Kontrola $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)	Experiment $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)
Er ($T.l^{-1}$)	$1,78 \pm 0,36^a$	$1,64 \pm 0,31^a$
Hb ($g.l^{-1}$)	$84,29 \pm 14,73^a$	$70,81 \pm 18,36^b$
PCV ($l.l^{-1}$)	$0,33 \pm 0,04^a$	$0,27 \pm 0,03^b$
MCV (fl)	$189,52 \pm 30,43^a$	$165,63 \pm 25,76^b$
MCH (pg)	$48,34 \pm 8,81^a$	$43,92 \pm 12,58^a$
MCHC ($g.l^{-1}$)	$255,94 \pm 27,17^a$	$269,34 \pm 67,12^a$
Leuko ($G.l^{-1}$)	$104,01 \pm 33,85^a$	$33,60 \pm 18,20^b$

Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA $p < 0,01$)

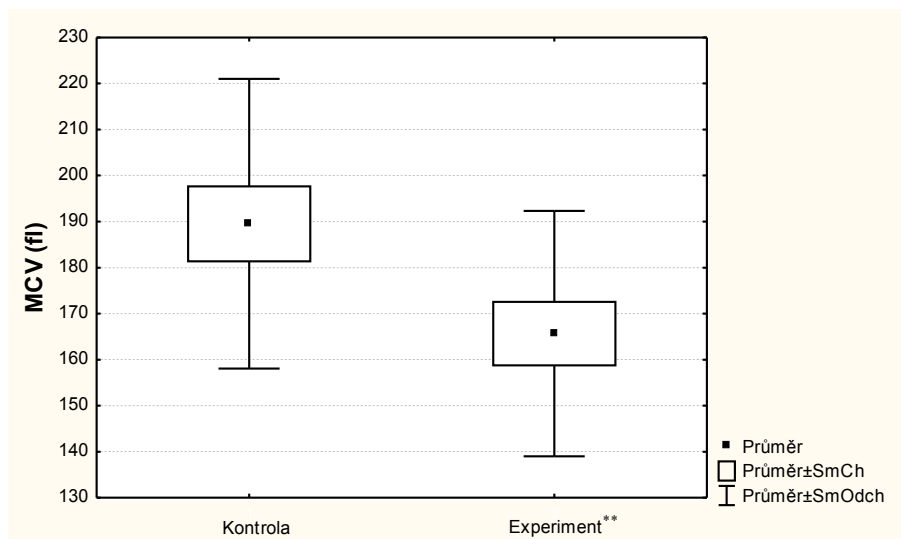
Graf č. 8: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG ($250,2 \text{ mg.l}^{-1}$) na koncentraci hemoglobinu kapra obecného (statistická významnost $**p < 0,01$)



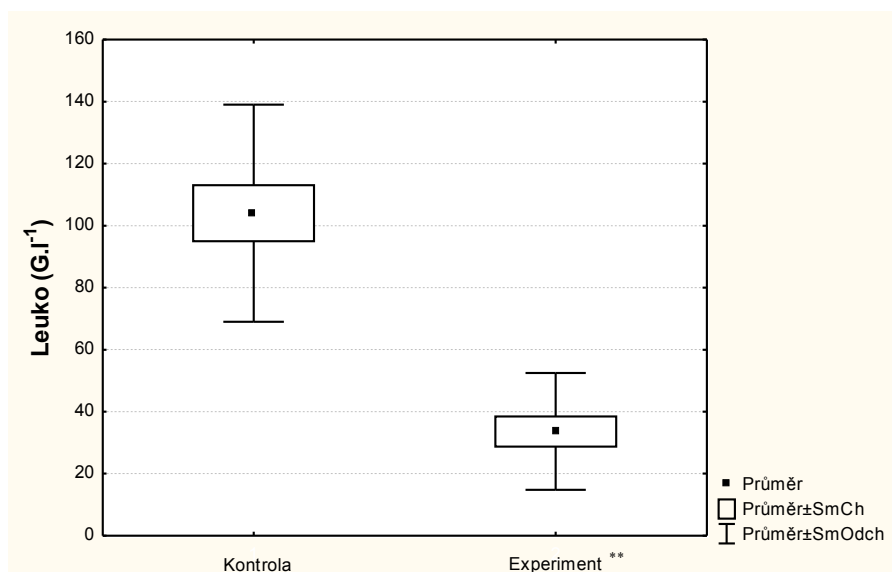
Graf č. 9: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG ($250,2 \text{ mg.l}^{-1}$) na hematokritovou hodnotu kapra obecného (statistická významnost $**p < 0,01$)



Graf č. 10: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na hodnotu středního objemu erytrocytu kapra obecného (statistická významnost ** $p < 0,01$)



Graf č. 11: Vliv akutní toxicity pesticidu Sencor 70 WG (250,2 mg.l⁻¹) na počet leukocytů kapra obecného (statistická významnost ****p<0,01**)



U počtu erytrocytů, hodnoty hemoglobin erytrocytu a střední barevné koncentrace nebyla prokázána signifikantní rozdílnost mezi oběma skupinami. Ve výsledcích hematologického krevního profilu se snížila nespecifická imunita. Podobné změny v hodnotě hematokritu, v počtu lymfocytů, monocytů a neutrofilních granulocytů následovaly u kapra po akutní otravě atrazinem (Svobodová et Pečená 1988).

4.2. Talstar 10 EC

4.2.1. Stanovení 96hLC 50 Talstaru 10 EC

Ryby použité v průběhu předběžného testu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o plůdek kapra obecného, jehož celková délka těla se pohybovala v rozmezí od 68 mm do 82 mm (\varnothing 75,2 mm). Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí od 9,2 g do 21,1 g (\varnothing 15,28g).

Teplota vody během předběžného testu se pohybovala mezi 19– 20 °C, pH bylo 7,62– 8,03 a nasycení vody kyslíkem mezi 83 - 98 %. Údaje o předběžném testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 5). Fyzikálně chemické vlastnosti vody během předběžného testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 6).

Ryby použité v průběhu základního testu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o plůdek kapra obecného, jehož celková délka těla se

pohybovala v rozmezí od 105 mm do 148 mm (\varnothing 129 mm). Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí od 12,3 g do 20,7 g (\varnothing 17,51 g).

Teplota vody během základního testu se pohybovala mezi 18,5 – 19,5 °C, pH bylo 7,55 – 7,89 a nasycení vody kyslíkem mezi 74 - 96 %. Údaje o základním testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 7). Fyzikálně chemické vlastnosti vody během předběžného testu jsou uvedeny v příloze (tab. č. 8).

Tabulka č. 12: Test akutní toxicity 96hLC50 u kapra obecného působení Talstaru 10 EC

Koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Mortalita (%)
Kontrola	0
20	0
40	10
60	40
80	80
100	90
120	100
140	100

Výsledkem akutního testu toxicity je hodnota 96hLC 50 pro Talstar 10 EC.

96hLC 50 = 57,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ s 95% intervalem spolehlivosti (-8,7; +7,6)

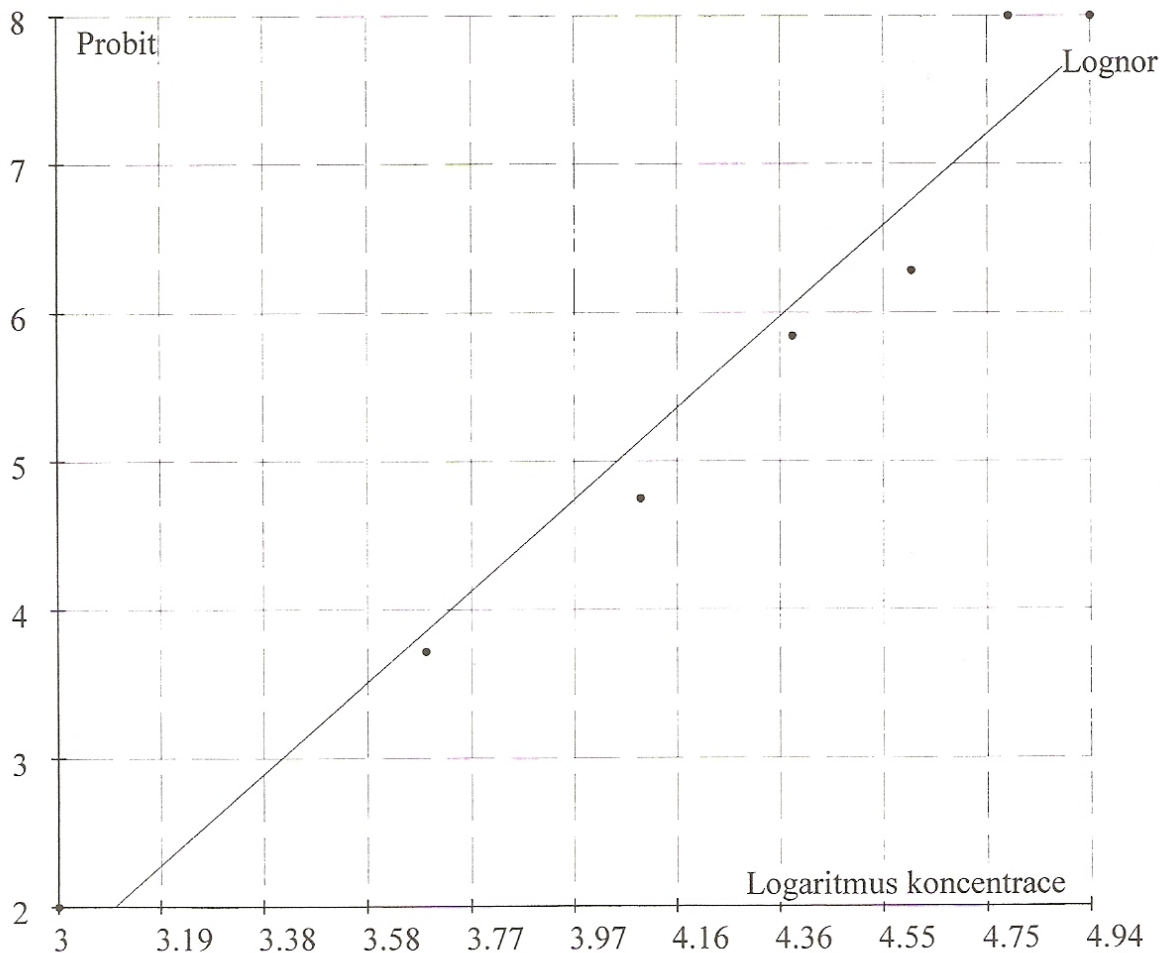
96hLC 0 = 22,3 $\mu\text{g.l}^{-1}$

96hLC 100 = 148,3 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Na základě zjištěné hodnoty 96hLC50 (57,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) může být přípravek Talstar 10 EC zařazen do skupiny látek, které jsou pro ryby vysoce toxické: riziková věta R 50 uvádí, že hodnoty 96hLC50 jsou menší než 1 mg.l⁻¹. Hodnota 96hLC50 pro Talstar 10 EC (57,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) odpovídá hodnotě 5,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ bifenthrinu. Liu et al. (2005) uvádí hodnotu 96hLC50 2,08 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro kapra a 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro tilapii. Bifenthrin je více toxický

při nižších teplotách a je více toxický k studenomilným rybám. Toxicita pyrethroidů je také ovlivněna hodnotou pH a tvrdostí vody (Mauck et al 1976).

Obr.č. 7: Test akutní toxicity Talstaru 10 EC za 96 hodin



Klinické příznaky sledované během působení bifenthrinu, se shodují s pozorováním jiných autorů při účincích pesticidů na bázi pyrethroidů (Prashanth et al. 2005; Velíšek et al. 2006).

Bradbury and Coats (1989) pozoroval příznaky otrav u ryb, které zahrnovali plavání u hladiny, hyperaktivitu, trhavé pohyby, křeče, apatii, zvýšenou tvorbu hlenu na žábřácích, změny na žábřácích, třesení hlavou. Subletální účinky pyrethroidů způsobují u ryb poškození žaber a změny v chování. Protože jsou pyrethroidy vysoce lipofilní, je velmi pravděpodobné, že jsou silně absorbovány žábry (Smith and Stratton 1986).

4.2.2. Stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného

Ryby použité pro stanovení biochemického a hematologického profilu byly homogenní a v dobrém zdravotním stavu. Jednalo se o násadu kapra obecného, jehož celková délka těla se pohybovala v rozmezí $366,25 \pm 19,88$ mm. Hmotnost ryb se pohybovala v rozmezí $832,5 \pm 167,89$ g.

Hematologický a biochemický profil krve, může poskytnout důležité informace o změnách uvnitř organismu (Masopust 2000).

Kapři vystavení účinkům Talstaru 10 EC ($57,5 \mu\text{g.l}^{-1}$) vykazovali prokazatelné změny v hematologickém a biochemickém krevním profilu.

4.2.2.1. Stanovení biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného

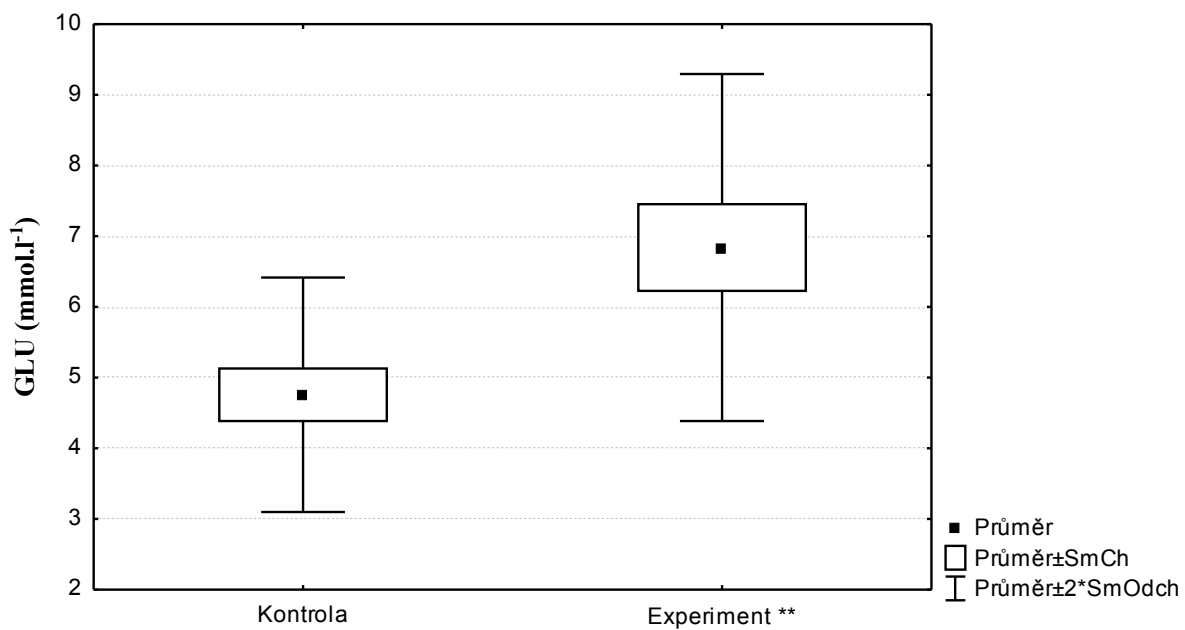
Na základě vyšetření biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného v kontrolní a pokusné skupině bylo zjištěno po působení pesticidního přípravku Talstar 10 EC signifikantní ($p < 0,01$) zvýšení hodnot u glukózy, amoniaku a aspartát aminotransferázy.

Tabulka č. 13: Vliv přípravku Talstar 10 EC na biochemické ukazatele krve kapra obecného po expozici 96hLC 50

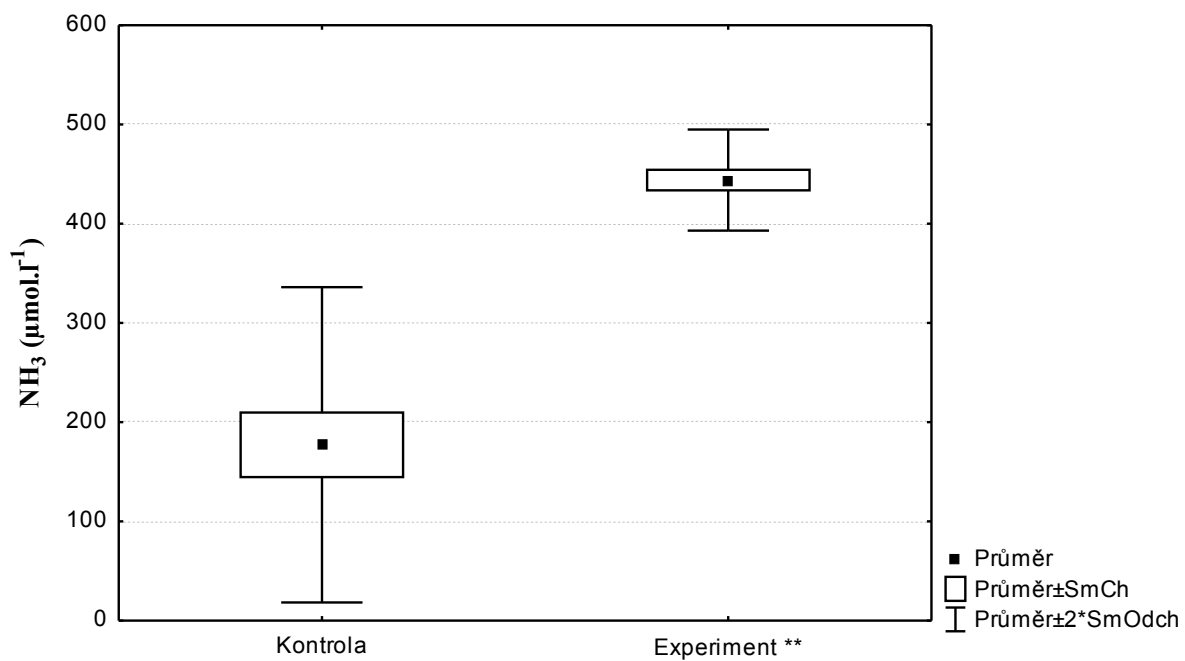
Ukazatel	Kontrola $x \pm \text{SD}$ (n = 15)	Experiment $x \pm \text{SD}$ (n = 15)
TP (g.l^{-1})	$35,70 \pm 4,08^a$	$34,64 \pm 4,62^a$
TRIG (mmol.l^{-1})	$1,91 \pm 0,37^a$	$1,83 \pm 0,36^a$
GLU (mmol.l^{-1})	$4,77 \pm 0,57^a$	$6,79 \pm 0,96^b$
NH_3 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	$176,17 \pm 71,43^a$	$446,67 \pm 35,02^b$
AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	$1,03 \pm 0,36^a$	$3,17 \pm 1,37^b$
ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	$0,39 \pm 0,09^a$	$0,43 \pm 0,13^a$
LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	$32,59 \pm 5,24^a$	$32,79 \pm 2,01^a$
ALP ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	$0,29 \pm 0,07^a$	$0,31 \pm 0,09^a$
CK ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	$13,21 \pm 0,83^a$	$15,25 \pm 0,94^a$
PHOS (mmol.l^{-1})	$1,78 \pm 0,75^a$	$1,67 \pm 0,74^a$
Ca^{2+} (mmol.l^{-1})	$2,56 \pm 0,18^a$	$2,59 \pm 0,75^a$

Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA $p < 0,01$).

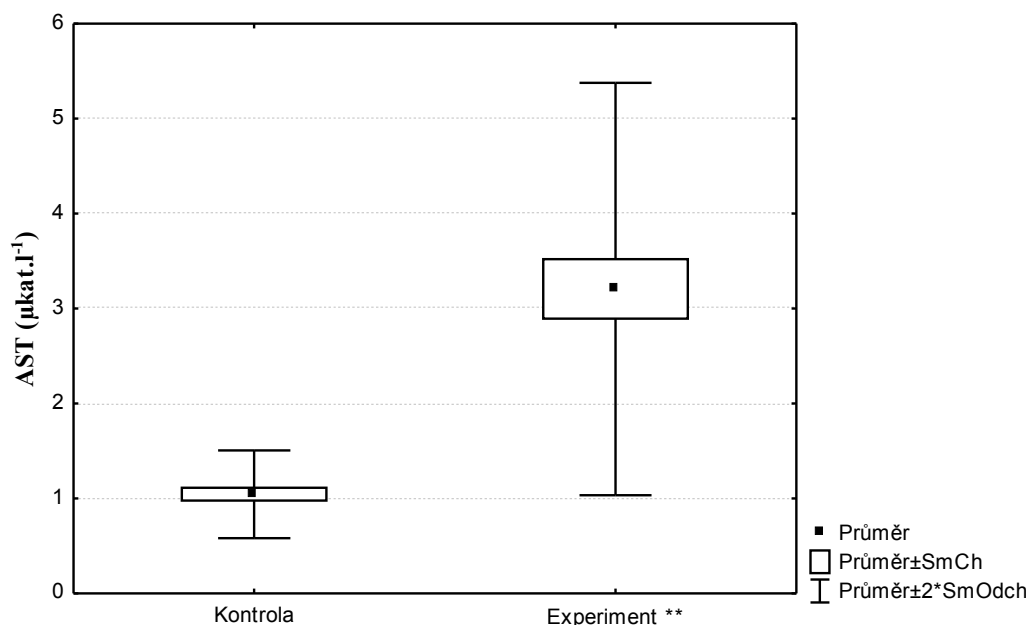
Graf č. 12: Vliv akutní toxicity pesticidu Talstar 10 EC ($57,5 \mu\text{g.l}^{-1}$) na koncentraci glukózy v krvi kapra obecného (statistická významnost $**p < 0,01$)



Graf č. 13: Vliv akutní toxicity pesticidu Talstar 10 EC (57,5 µg.l⁻¹) na koncentraci amoniaku v krvi kapra obecného (statistická významnost * $p < 0,01$)



Graf č. 14: Vliv akutní toxicity pesticidu Talstar 10 EC (57,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) na koncentraci aspartát aminotransferázy v krvi kapra obecného (statistická významnost $*p<0,01$)



U celkových bílkovin, triglyceridů, alanin aminotransferázy, laktát dehydrogenázy, alkalické fosfatázy, kreatin kinázy, anorganického fosfátu a vápenných iontů nebyla prokázána signifikantní rozdílnost mezi oběma skupinami.

Zvýšení hladiny glukózy v krvi je odezvou testovaných ryb k metabolickému stresu (Simon et al. 1983). Zvýšená koncentrace amoniaku organismů naznačuje jejich neschopnost převést toxický amoniak na méně škodlivé látky (Svoboda 2001). Signifikantní zvýšení aktivity hlavních enzymů, používaných pro tento účel označuje stres vzniklý tkáňovým poškozením (Svoboda 2001). Velíšek et al. (2006) pozoroval signifikantní ($p < 0,05$) zvýšení aspartát aminotransferázy u kapra po akutním působení deltamethrinu v koncentraci 3,25 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Bálint et al. (1995) pozoroval zvýšení hladiny glukózy u kapra po vystavení deltamethrinu.

4.2.2.2. Stanovení hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného

Tabulka č. 14: Vliv přípravku Talstar 10 EC na biochemické ukazatele krve kapra obecného po expozici 96hLC 50

Ukazatel	Kontrola x ± SD (n = 15)	Experiment x ± SD (n = 15)
Er (T.l ⁻¹)	1,68 ± 0,26 ^a	1,74 ± 0,30 ^a
Hb (g.l ⁻¹)	93,17 ± 15,36 ^a	95,31 ± 12,33 ^a
PCV (l.l ⁻¹)	0,36 ± 0,06 ^a	0,38 ± 0,05 ^a
MCV (fl)	236,20 ± 24,59 ^a	219,27 ± 24,59 ^a
MCH (pg)	58,77 ± 6,92 ^a	53,03 ± 5,46 ^a
MCHC (g.l ⁻¹)	256,74 ± 25,56 ^a	264,42 ± 32,04 ^a
Leuko (G.l ⁻¹)	8,19 ± 3,67 ^a	9,09 ± 5,70 ^a

Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA $p < 0,01$)

Na základě vyšetření hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného v kontrolní a pokusné skupině, nebyla po působení pesticidního přípravku Talstar 10 EC prokázána mezi oběma skupinami signifikantní rozdílnost v počtu erytrocytů, hemoglobinu, hematokritové hodnotě, středním objemu erytrocytu, hodnotě hemoglobin erytrocytu, střední barevné koncentraci a ani v počtu leukocytů.

Svobodová et al. (2003) uvádí výrazně nižší hodnoty RBC, Hb a PCV, ale žádné změny v bílém krevním obrazu, po akutním působení deltamethrinu. Sopinská and Guz (1998) pozorovali u kapra pokles celkového počtu leukocytů a počtu neutrofilních granulocytů, po akutním působení permethrinu.

5. Závěr

Cílem této práce bylo zhodnocení vlivu pesticidů na bázi pyrethroidů a triazinů na ryby. Toxicita byla stanovena na základě testů akutní toxicity a výsledků hematologického a biochemického vyšetření krevní plazmy. Testovány byly přípravky Sencor 70 WG (účinná látka metribuzin-70 %) a Talstar 10 EC (účinná látka bifenthrin-100 g.l⁻¹). Testy akutní toxicity byly provedeny standardními postupy u kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Hodnota 96hLC₅₀ pro přípravek Sencor 70 WG byla 250,2 mg.l⁻¹. Na základě zjištěných hodnot byl pesticidní přípravek Sencor 70 WG podle tzv. R-vět zařazen mezi skupinu látek, které mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.

Hodnota 96hLC₅₀ pro přípravek Talstar 10 EC byla 57,5 μg.l⁻¹. Na základě zjištěných hodnot byl pesticidní přípravek Talstar 10 EC podle tzv. R-vět zařazen mezi skupinu látek, které jsou vysoce toxické pro ryby.

Tato práce je příspěvkem k hodnocení toxického účinku testovaných pesticidů na necílové organismy.

Na základě údajů předložených v této práci, lze konstatovat, že existuje velmi malá pravděpodobnost přímého účinku pesticidních přípravků na ryby. Nebezpečí hrozí spíše při nezodpovědné aplikaci a nedodržení bezpečnostních zásad během manipulace s těmito prostředky.

Tato práce může také přispět k volbě vhodného pesticidu k ochraně vybraných polních plodin a k výběru pesticidních přípravků šetrnějších k životnímu prostředí.

6. Literární přehled

- ANDERSON, M., MAGLEBY, R. (1997): Agricultural resources and environmental indicators, 1996–97. USDA Economic Research Service Agricultural Handbook no. 712, Washington, DC, 116–134.
- BÁLINT, T., SZEGLETES, T., SZEGLETES, Z., HALASY, K., NEMCSO' K, J. (1995): Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.*, 33:279–295.
- BATTAGLIN, W. G., FURLONG, E. T., BURKHARDT, M. R. (2001): Concentration of selected sulfonylurea, sulfonamide, and imidazolinone herbicides, other pesticides, and nutrients in 71 streams, 5 reservoir outflows, and 25 wells in the Midwestern United States, (1998): US Geological Survey Water Resources Investigations Report 00-4225, Denver, CO
- BRADBURY, S. P., COATS, J. R. (1989): Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 108: 134-177.
- CORBETT, J. R. (1974): *The Biochemical Mode of Action of pesticides*. Academic Press, London, 330 p.
- CREMLYN, R. (1985): *Pesticides – Preparation and Mode of Action*. John Wiley and Sons, Chichester, 240 p.
- DAVIES, P. E., COOK, L. S. J., GOENARSO, D. (1994): Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1341 - 1354.
- DOUBEK, J., BOUDA, J., DOUBEK, M., FURLL, M., KNOTKOVÁ, Z., PEJŘILOVÁ, Z., PRAVDA, D., SCHEER, P., SVOBODOVÁ, Z., VODIČKA, R. (2003): Veterinární hematologie. Noviko a.s., Brno, pp. 381 – 405.
- DRAZ, A. A., SAMARA, I. A., EL-SARHA, A. I. (1993): Effects of chronic exposures to copper on production and total residues among tilapia species. *Bull. National Ins. Oceanograf. Fish.*, 19: 351 - 367.
- ENVIRONMENT CANADA/AGRICULTURE CANADA (EC/AC). Pesticide Registrant Survey, 1986 report. Commercial Chemicals Branch, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa (1987).
- ELLIOT, M., JANES, N. F. (1973): Chemistry of Natural Pyrethrins. In: *Pyrethrum, the Natural Insecticide* (J. E. Casida, Edit.). Academic Press, London, 56 p.

- EXTOXNET (1995). Bifenthrin, September 2002–last update. [Online]. Available at:
<http://extoxnet.orst.edu/pips/bifenthr.htm>
- FAIRCHILD, J. F., RUESSLER, D. S., CARLSON, A. R. (1998): Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17:1830–1834.
- FAIRCHILD, J.F., SAPPINGTON, L.C. (2002): Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 198-202.
- FECKO, A. (1999): Environmental Fate of Bifenthrin, December 28 1999- last update. [Online]. Available at: <http://www.pw.ucr.edu/textfiles/bifentn.pdf>
- HANKE, W., GLUTH, G., MULLER, R. (1983): Physiological changes in carps induced by pollution. *Ecotox. and Environ. Saf.*, 7: 229 -241.
- HARRIS, C. T., KAUFMANN, D. D., SHEETS, T. J., NASH, R. G., KEARNEY, P. C (1968): Behaviour and fate of s-triazines in soils. *Adv. Pest. Control. Res.*, 8: 1.
- HARTLEY, G. S., WEST, T. F. (1969): *Chemicals for Pest Control*. Pergamon Press, Oxford, 26 p.
- HARTMAN, P., PŘIKRYL, I., ŠTĚDRONSKÝ, E. (1998): *Hydrobiologie*, SZN Praha, 335 p.
- HAYES, A. W. (1994): *Principles and methods of toxicology*. New York, Raven Press, 1468 p.
- HAYES, R.H., LAMB, D.W., MALLICOUT, D.R. (1981): Metribuzin (R) (Sencor) oncogenicity study in mice: 80050. Unpublished study, MRID 00087795.
- HAYES, W. J. (1982): *Pesticides in man*. M. D., Ph.D Mt. Royal and Guilford Aves. Bullioner. USA. *Helogonder wiss.Meeresunters*, 20: 610 -619.
- HILL, R., SHAW, J. L., MAUND, S. J. (1994): *Review of aquatic field tests with pyrethroid insecticides*. Boca Raton, Lewis Publishers, 561p.
- HOAGLAND, K. D., DRENNER, R. W., SMITH, J. D., CROSS, D. R. (1993): Fresh-water community responses to mixture of agricultural pesticides-effects of atrazine and bifenthrin, *Environ. Tox. and Chem.*, 12: 627-637.
- JACOBSON, M., CROSBY, D. G. (1971): *Naturally Occurring Insecticides*. Dekker, New York, 137 – 176 pp.

- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR): Part II Toxicology. 1992. Bifenthrin. International Programme on Chemical Safety (IPCS), France pp.79-101.
- KEARNEY, P. C., KAUFMANN, D. D. (1975): Herbicides – Chemistry, Degradation and Mode of Action. Vol. I. 2., vyd. Dekker, New York, 533 p.
- LIU, T. L., WANG, Y. S., YEN, J. H. (2005): Separation of bifenthrin enantiomers by chiral HPLC and determination of their toxicity to aquatic organism. J Food Drug. Anal., 12:357–360.
- MARTIN, H., WORTHING, C. R. (1974): Pesticide Manual. 4. vyd. British Crop Protection Council., 395 p.
- MASOPUST, J. (2000): Clinical biochemistry. Karolinum, Praha, 832 p.
- MAUCK, W. L., OLSON, L. E., MARKING, L. L. (1976): Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 4:18–29.
- MAYER, F. L., ELLERSIECK, M. R. (1986): Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of fresh-water animals. US Fish and Wildlife Service Res. Publ.160, Washington, DC.
- MEKKAWY, A. A., HUSSAIN, S. Y., AHMED, S. M. (1996): Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on some blood constituents and protein electrophoretic patterns of *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. J Egypt Germ. Soc.Zool., 19:283–319.
- METCALF, R. L. (1971): The Chemistry and Biology of Pesticides. In: Pesticides in the Environment (R. White – Stevens, Edit.). Vol. I. Part 1. Dekker, New York.
- MUNN, M.D., GILLIOM, R.J., MORAN, P.W., NOWELL, L.H., 2006: Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms, 2nd Edition: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5148, 81 p.
- NEMCSOK, J., BALINT, T., FAZAKAS, J. (1999): The contribution of pyrethroid insecticide to the massive eel (*Anguilla anguilla*) devastation, Lake Balaton. Acta Biol. Hung., 50: 161-173.
- NOGA, E. J. (1996): Fish disease: diagnosis and treatment. St. Louis Mosby, 367p.
- OEHHA (1999): Public health goal for atrazine in drinking water. Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.

- ORT, M. P., FAIRCHILD, J. F., FINGER, S. E. (1994): Acute and chronic effects of four commercial herbicide formulations on *Ceriodaphnia dubia*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27: 103–106.
- PATTY, F.A. (2001): Industrial hygiene and toxicology, 5th ed, Clayton G. D. and Clayton F E. (ed), Wiley, New York.
- PAULI, B.D., KENT, R.A., WONG, M. P. (1990): Canadian water quality guidelines for metribuzin. Environment Canada Scientific Series 179, Ontario, Canada, 26 p.
- PITTER, P. (1999): Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT Praha, 568 p.
- PRASAD, T. A. V., REDDY, D. C. (1994): Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish *Tilapia mossambicus*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 28:313–316.
- PRASHANTH, M. S., DAVID, M., MATHED, S. G. (2005): Behavioural changes in freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to cypermethrin. J Environ. Biol., 26:141–144.
- PRITCHARD, P.H. (1986): Fate of pollutants. J. Water Pollut. Control Found., 58: 636-645.
- RAUSCHEROVÁ, Z., CHRUDINOVÁ, B., BÁRTOVÁ, B. (1999): Hodnocení rizik pro životní prostředí u přípravků na ochranu rostlin v procesu registrace. Sborník referátů z 9. konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH Vodňany, Aquachemie Ostrava, 35-40.
- REDDY, D. C., VIJAYAKUMARI, P., KALARANI, V., DAVIES, R. W. (1992): Changes in erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentrations of the herbicide diuron. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 49:730–737.
- ROBERTS, T. R. (1988): Proc. E. W. R. C. 4th Int. Symp. Aquat. Weeds, Wien 197. The Royal Society of Chemistry (RSCH). The agrochemicals handbook. 2nd edition (update 1 -April 1988). Nottingham.
- SAGLIO, P., TRIJASSE, S. (1998): Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 35:484–491.
- SIMON, L. M., NEMCSOK, J., BOROSS, L. (1983): Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Comp. Biochem. Physiol., 75C:167–169.
- SMITH, T. M., STRATTON, G. W. (1986): Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. Res. Rev. 97:93–119.

- SOPINSKA, A., GUZ, L. (1998): Influence of permethrin on phago-cytic activity of carp. *Med. Welt*, 54:126–128.
- SVOBODA, M. (2001): Stress in fish-review. *Bull. VÚRH JU Vodnany*, 37:169–191.
- SVOBODOVÁ, Z., GELNAROVÁ, J., JUSTÝN, J., KRAUPER, V., MÁCHOVÁ, J., SIMANOV, L., VALENTOVÁ, O., WOHLGEMUTH, E. (1987): *Toxikologie vodních živočichů*. SZN Praha, 231s.
- SVOBODOVÁ, Z., KOLÁŘOVÁ, J., NAVRÁTIL, S., VESELÝ, T., CHLOUPEK, P., TESARČÍK, J., ČÍTEK, J. (2007): *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. Informatorium Praha, 264 s.
- SVOBODOVÁ, Z., LUSKOVÁ, V., DRASTICHOVÁ, J., SVOBODA, M., ŽLÁBEK, V. (2003): Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta. Vet. Brno*, 72:79–85.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J., (2000): *Ekotoxikologie. Praktická cvičení, část I*. VFUT Brno, 70s.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VESELÝ, V., MODRÁ, H., SVOBODA, M. 2003: *Vetrinární toxikologie. Praktická cvičení část I*. VFUT Brno, 179 s.
- SVOBODOVÁ, Z., PEČENÁ, M. (1988): Changes in the red and white blood picture of carp after acute exposure to toxic substance. *Bull. VÚRH JU Vodnany*, 17:116–128.
- SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J., (1986): *Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb*. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 22, 36 s.
- United States Department of Agriculture (US DA), ARS Pesticide Properties Database on Bifenthrin.1995, May. [Online] Available at: <http://wizard.arsusda.gov/acsl/textfiles/BIFENTHRIN> [2002, June].
- US EPA, Environmental Fate Assessment for the Synthetic Pyrethroids: 1999, US EPA, [Online]. Available at: <http://www.epa.gov/oscpmont/sap/1999/february/pyreth>. [2002, June].
- VELÍŠEK, J., DOBŠÍKOVÁ, R., SVOBODOVÁ, Z., MODRÁ, H., LUSKOVÁ, V. (2006): Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76:992–998.
- VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ, Z., PIAČKOVÁ, V., NOVOTNÝ, L., BLÁHOVÁ, J., SUDOVOVÁ, E., MALÝ, V. (2008): Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Med. Czech*, 53:324–332.

- VERMA, S. R., BANSAL, S. K., DALELA, R. C. (1982): Bioassay trials with twenty three pesticides to a freshwater teleost, *Saccobranchnus fossils* .Water Research Journal, 16: 525 -529.
- WAIN, R. L. (1965): Chemistry and Crop Protection. RIC Lecture Ser., No 3.
- WOODS, A. (1974): Pest Control. McGraw-Hill, London 1974, 82p.
- Weed Science Society of America (WSSA). Herbicide handbook. 5th edition. Champaign, IL (1983).
- YILDIRIM, M. Z., BENLI, A. C. K., SELVI, M., OZKUL, A., ERKOC, F., KOCAK, O. (2006): Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings, Environ. Toxicol., 21:614–620.

7. Přílohy

7.1. Podkladové tabulky průběhu předběžných a základních testů toxicity

Tabulka č. 1: Předběžný test toxicity u kapra obecného pro přípravek Sencor 70 WG

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina								Velikost ryb	
	koncentrace mg.l ⁻¹	dávka do 20 l	zásobní roztok		26.3. 9 ⁰⁰	27.3. 9 ⁰⁰	28.3. 9 ⁰⁰	29.3. 9 ⁰⁰	30.3. 9 ⁰⁰	Σ	%	Hmotnost (g)	Délka těla (cm)	
			objem	č. zás. rozt.										
1	0,1	2	2 ml		0	0	0	0	0	0	0	25,0	13,2	
2	10,0	200	0,2 g		0	0	0	0	0	0	0	25,0	12,8	
3	50,0	1000	1,0 g		0	0	0	0	0	0	0	24,1	12,5	
4	100,0	2000	2,0 g		0	0	0	0	0	0	0	15,1	11,1	
5	200,0	4000	4,0 g		0	0	0	0	0	0	0	26,0	13,3	
6	300,0	6000	6,0 g		0	3	1	1	-	5	100	5,0	9,5	
K					0	0	0	0	0	0	0	33,1	13,8	

Tabulka č. 2: Podmínky v průběhu předběžného testu akutní toxicity u kapra obecného pro přípravek Sencor 70 WG

Číslo nádrže	Konc. mg.l ⁻¹	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		26.3. 9 ⁰⁰	27.3. 9 ⁰⁰	28.3. 9 ⁰⁰	28.3. 10 ⁰⁰	29.3. 9 ⁰⁰	30.3. 9 ⁰⁰	26.3. 9 ⁰⁰	27.3. 9 ⁰⁰	28.3. 9 ⁰⁰	28.3. 10 ⁰⁰	29.3. 9 ⁰⁰	30.3. 9 ⁰⁰	26.3. 9 ⁰⁰	27.3. 9 ⁰⁰	28.3. 9 ⁰⁰	28.3. 10 ⁰⁰	29.3. 9 ⁰⁰	30.3. 9 ⁰⁰
0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h		
1	0,1	18,3	17,5	17,8	18,7	18,8	18,9	94	93	98	96	98	98	7,65	7,75	7,96	7,89	7,86	7,94
2	10,0	17,6	17,4	17,6	18,6	18,6	18,8	96	97	97	96	97	97	7,64	7,87	7,98	7,90	7,93	7,94
3	50,0	18,2	17,4	17,7	18,7	18,7	18,8	95	92	98	99	96	96	7,60	7,92	7,97	7,96	7,94	7,92
4	100,0	18,6	17,5	17,9	18,6	18,8	18,9	98	95	98	98	98	98	7,60	7,93	7,96	7,96	7,95	7,93
5	200,0	18,5	17,6	17,9	18,6	18,9	18,8	97	98	97	98	99	99	7,58	7,90	7,93	7,93	7,94	7,94
6	300,0	18,2	17,6	17,9	18,6	-	-	99	97	99	99	-	-	7,62	7,93	7,93	7,96	-	-
K		18,1	17,7	18,0	18,9	18,8	18,8	90	92	98	96	98	99	7,70	7,38	7,96	7,89	7,92	7,89

Tabulka č. 3: Základní test toxicity u kapra obecného pro přípravek Sencor 70 WG

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina								Velikost ryb	
	koncentrace mg.l ⁻¹	dávka do 20 l	zásobní roztok		2.4. 9 ⁰⁰	3.4. 9 ⁰⁰	4.3. 9 ⁰⁰	5.4. 9 ⁰⁰	6.4. 9 ⁰⁰	Σ	%	Hmotnost (g)	Délka těla (cm)	
			objem	č. zás. rozt.										
1	100	2000	2,0 g		0	0	0	0	0	0	0	25,2	13,6	
2	150	3000	3,0 g		0	0	0	0	0	0	0	25,1	12,9	
3	200	4000	4,0 g		0	0	0	0	0	0	0	24,1	12,5	
4	230	4600	4,6 g		0	0	0	1	0	1	10	15,5	11,6	
5	260	5200	5,2 g		0	2	0	1	2	5	50	27,9	14,2	
6	300	6000	6,0 g		0	9	0	1	-	10	100	6,0	10,5	
K					0	0	0	0	0	0	0	32,1	14,8	

Tabulka č. 4: Podmínky v průběhu základního testu akutní toxicity u kapra obecného pro přípravek Sencor 70 WG

Číslo nádrže	Konc. mg.l ⁻¹	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		2.4. 9 ⁰⁰	3.4. 9 ⁰⁰	4.4. 9 ⁰⁰	4.4. 10 ⁰⁰	5.4. 9 ⁰⁰	6.4. 9 ⁰⁰	2.4. 9 ⁰⁰	3.4. 9 ⁰⁰	4.4. 9 ⁰⁰	4.4. 10 ⁰⁰	5.4. 9 ⁰⁰	6.4. 9 ⁰⁰	2.4. 9 ⁰⁰	3.4. 9 ⁰⁰	4.4. 9 ⁰⁰	4.4. 10 ⁰⁰	5.4. 9 ⁰⁰	6.4. 9 ⁰⁰
		0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h
1	100	17,8	18,8	18,8	18,6	18,7	19,4	90	93	94	93	96	90	7,68	7,81	7,76	7,69	8,01	7,94
2	150	17,9	18,6	18,7	18,6	18,7	19,3	91	94	93	94	97	90	7,66	7,81	7,79	7,66	7,94	8,03
3	200	17,9	18,8	18,8	18,6	18,6	19,3	93	91	90	95	98	90	7,60	7,81	7,80	7,60	7,86	8,01
4	230	17,9	18,8	18,8	18,6	18,7	19,3	94	90	89	96	97	90	7,58	7,73	7,70	7,57	7,89	7,95
5	260	17,8	18,7	18,9	18,6	18,6	19,5	98	90	89	90	98	91	7,57	7,70	7,68	7,54	7,68	7,97
6	300	17,9	18,8	18,8	18,6	-	-	100	97	96	96	-	-	7,53	7,76	7,72	7,50	-	-
K		18,3	18,9	18,9	18,6	18,9	19,5	89	87	98	95	98	88	7,82	7,66	7,71	7,66	7,73	7,83

Tabulka č. 5: Předběžný test toxicity u kapra obecného pro přípravek Talstar 10 EC

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina								Velikost ryb	
	Koncentrace $\mu\text{g.l}^{-1}$	Dávka do 20l	Zásobní roztok		4/9 9,00	5/9 9,00	6/9 9,00	7/9 9,00	Σ	%			Hmotnost g	Délka mm
			Objem ml	č.zás.rozt.										
1	5	100	0,1	1	0	0	0	0	0	0			18,3	77
2	10	200	0,2	1	0	0	0	0	0	0			21,1	82
3	20	400	0,4	1	0	0	0	0	0	0			9,2	68
4	50	1000	1,0	1	0	0	0	1	1	20			17,1	79
5	100	2000	2,0	1	1	4	-	-	5	100			10,7	70
6	500	10000	10,0	1	5	-	-	-	5	100				
7	1000	20000	20,0	1	4	1	-	-	5	100				
K					0	0	0	0	0	0				

Tabulka č. 6: Podmínky v průběhu předběžného testu akutní toxicity u kapra obecného pro přípravek Talstar 10 EC

Číslo nádrže	Konc.	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00	3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00	3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00
0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h		
1	5	19,5	20,0	20,0	19,0	19,0	19,0	96	98	91	88	84	84	7,78	7,94	7,91	7,87	7,97	7,99
2	10	19,5	20,0	20,0	19,0	19,0	19,0	95	98	90	87	84	84	7,70	7,92	7,92	7,88	7,98	7,99
3	20	19,5	20,0	20,0	19,0	19,0	19,0	94	97	91	87	83	84	7,81	7,91	7,92	7,90	7,99	7,99
4	50	19,5	20,0	20,0	19,0	19,0	19,0	89	98	89	86	84	84	7,80	7,90	7,91	7,89	7,96	7,97
5	100	19,5	20,0	20,0	19,0	19,0	19,0	90	93	86	87	85	80	7,67	7,68	7,73	7,62	7,63	7,63
6	500	19,5	20,0	20,0	-	-	-	87	83	84	-	-	-	7,91	7,98	8,05	-	-	-
7	1000	19,5	20,0	20,0	-	-	-	85	84	89	-	-	-	7,89	8,03	8,00	-	-	-
K																			

Tabulka č. 7: Základní test toxicity u kapra obecného pro přípravek Talstar 10 EC

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina								Velikost ryb	
	Koncentrace $\mu\text{g.l}^{-1}$	Dávka do 20l	Zásobní roztok		11/99,00	12/99,00	13/99,00	14/99,00	Σ	%			Hmotnost g	Délka mm
			Objem ml	č.zás.rozt.										
1	20	400	0,4	1	0	0	0	0	0	0			20,2	83
2	40	800	0,8	1	0	0	1	0	1,0	10			17,5	80
3	60	1200	1,2	1	0	2	1	1	4,0	40			20,7	77
4	80	1600	1,6	1	4	2	2	0	8,0	80			18,5	73
5	100	2000	2,0	1	6	3	0	0	9,0	90			12,3	69
6	120	2400	2,4	1	6	4	-	-	10	100			15,6	71
7	140	2800	2,8	1	8	2	-	-	10	100			17,8	81
K					0	0	0	0	0	0				

Tabulka č. 8: Podmínky v průběhu základního testu akutní toxicity u kapra obecného pro přípravek Talstar 10 EC

Číslo nádrže	Konc.	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00	3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00	3/9 9,00	4/9 8,00	5/9 8,00	5/9 10,30	6/9 9,00	7/9 9,00
0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h		
1	20	18,5	19,0	19,0	19,0	19,5	19,5	81	80	78	74	75	80	7,56	7,13	7,80	7,55	7,56	7,56
2	40	18,5	19,0	19,0	19,0	19,5	19,5	88	95	79	75	80	76	7,57	7,63	7,83	7,61	7,63	7,64
3	60	18,5	19,0	19,0	19,0	19,5	19,5	95	96	80	78	78	78	7,63	7,68	7,89	7,65	7,66	7,66
4	80	18,5	19,0	19,0	19,0	19,5	19,5	95	95	79	75	78	78	7,69	7,80	7,78	7,69	7,65	7,65
5	100	18,5	19,0	19,0	19,0	19,5	19,5	93	93	76	75	75	75	7,67	7,68	7,73	7,62	7,63	7,63
6	120	18,5	19,0	19,0	-	-	-	94	96	80	-	-	-	7,68	7,78	7,79	-	-	-
7	140	18,5	19,0	19,5	-	-	-	93	95	78	-	-	-	7,69	7,74	7,78	-	-	-
K		18,5	19,0	19,0	19,5	19,5	19,5	99	98	81	79	80	80	7,75	7,76	7,89	7,62	7,64	7,68