

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

---



**VLIV PESTICIDU NA BÁZI TRIAZINŮ NA RYBY**

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce:  
Ing. Josef Velíšek, Ph.D.

Autor diplomové práce:  
Bc. Vratislav Malý

---

## **Influence of Triazine Based Pesticide on Fish**

Influence of triazine based pesticide (Sencor 70 WG - active substance metribuzine) was assessed via biochemical and hematological blood profile determination of experimental fish. As experimental fish we used common carp (*Cyprinus carpio L.*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Before rating the Sencor 70 WG pesticide influence on biochemical and hematological blood profile we accomplished a preliminary test to determine a concentration range and after that a basic acute toxicity test to determine 96hLC50 value. Both fish samples fingerlings were used for performing the tests. After 96hLC50 determination two groups of experimental fish (aged 1-2 years) were under this concentration and one control group without the substance. The test was processed according to the OECD methodology No. 203. Fish dissection was performed after the test. The increased amount of phlegm of water consistency on the body surface was found out. The fish were of dark colour in contrast with the control group. The ventricle was larger and containing transudate. An outstanding vascular profusion of internal organs in the ventricle was found out.

Biochemical profile of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimental group under 96 hour acute operation of pesticide Sencor 70 WG ( $89,3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) proved significant lowering ( $p<0,01$ ) of total proteins (TP), triglycerides (TRIG), aspartate aminotransferase (AST), ammonia ( $\text{NH}_3$ ), alkaline phosphatase (ALP) and  $\text{Ca}^{2+}$  in the blood plasma in contrast with the control group. Hematological profile of the same group proved significant lowering ( $p<0,05$ ) of the number of erythrocytes (Er), haematocrit (PCV), and significant increase ( $p<0,05$ ) of erythrocyte haemoglobin (MCH) value in contrast with the control group.

Biochemical profile of the common carp (*Cyprinus carpio L.*) experimental group under 96 hour acute operation of pesticide Sencor 70 WG ( $250,2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) proved significant lowering ( $p<0,01$ ) of total proteins (TP), triglycerides (TRIG), lactate dehydrogenase (LDH),  $\text{Ca}^{2+}$  and inorganic phosphate (PHOS) and significant increase ( $p<0,01$ ) of glucose (GLU) and ammonia ( $\text{NH}_3$ ) concentration in the blood plasma in contrast with the control group. Hematological profile of the same group proved signifi-

cant lowering ( $p < 0,01$ ) of the haematocrit (PCV), erythrocyte haemoglobin (MCH), mean erythrocyte volume (MCV) and number of leukocytes (Leuko) in contrast with the control group.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma “Vliv pesticidu na bázi triazinů na ryby“ vypracoval 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 diplomové 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, 26. května 2008

Bc. Vratislav Malý

.....

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

<b>OBSAH :</b>		str.
	Úvod	1
<b>1.</b>	<b>Současný stav</b>	<b>2</b>
1.1	Zdroje znečištění vodního prostředí	4
1.2	Pesticidy	4
1.2.1	Mechanismus účinku pesticidů	7
1.3	Degradace	8
1.3.1	Mikrobiální degradace	9
1.4	Herbicidy	10
1.4.1	Rozdělení herbicidů	10
1.5	Fyzikálně chemické vlastnosti pesticidů	13
1.6	Degradace atrazinu	16
1.7	Triaziny	16
1.8	Popis přípravku Sencor 70 WG	17
1.8.1	Vlastnosti metribuzinu	19
1.8.2	Toxikologické efekty	20
1.8.3	Ekologické efekty	22
1.8.4	Degradace v prostředí	23
1.9	Faktory ovlivňující toxicitu látek, přípravků a odpadních vod pro ryby a vodní bezobratlé	24
1.9.1	Biochemický profil ryb po působení cizorodých látek	25
1.9.2	Hematologický profil ryb po působení cizorodých látek	26
<b>2.</b>	<b>Cíle práce a hypotézy</b>	<b>28</b>
2.1	Cíl práce	28
2.2	Hypotéza	28
<b>3.</b>	<b>Materiál a metodika práce</b>	<b>29</b>
3.1	Test akutní toxicity na rybách	29
3.1.1	Princip testu	30
3.1.2	Podmínky testu	30

3.1.3	Experimentální materiál	31
3.1.4	Pracovní postup	32
3.1.4.1	Předběžný test	32
3.1.4.2	Základní test	32
3.2	Biochemické a hematologické vyšetření krve	33
3.2.1	Odběr krve	34
3.2.2	Stanovení biochemických ukazatelů	37
3.2.3	Stanovení hematologických ukazatelů	40
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b>	<b>44</b>
4.1.1	Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG pro pstruha duhového	44
4.1.2	Test stanovení biochemického a hematologického profilu u pstruha duhového	45
4.1.3	Vyhodnocení testů akutní toxicity LC 50 za 96 hodin u pstruha duhového	46
4.1.4	Stanovení biochemického profilu krevní plazmy pstruha duhového	47
4.1.5	Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy pstruha duhového	49
4.1.6	Stanovení hematologického profilu pstruha duhového	53
4.1.7	Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na hematologické ukazatele pstruha duhového	53
<b>4.2</b>	<b>Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)</b>	<b>56</b>
4.2.1	Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG pro kapra obecného	56
4.2.2	Test stanovení biochemického a hematologického profilu kapra obecného	56
4.2.3	Vyhodnocení testů akutní toxicity LC 50 za 96 hodin u kapra obecného	57
4.2.4	Stanovení biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného	58

4.2.5	Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy kapra obecného	59
4.2.6	Stanovení hematologického profilu kapra obecného	63
4.2.7	Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na hematologické ukazatele kapra obecného	64
<b>5</b>	<b>Diskuse</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Pstruh duhový</b>	<b>67</b>
5.1.1	Chování ryb v průběhu testu	67
5.1.2	Biochemický profil krve pstruha duhového	67
5.1.3	Hematologický profil krve pstruha duhového	68
5.1.4	Pitva ryb	68
<b>5.2</b>	<b>Kapr obecný</b>	<b>69</b>
5.2.1	Chování ryb v průběhu testu	69
5.2.2	Hematologický profil krve kapra obecného	70
5.2.3	Biochemický profil krve kapra obecného	70
5.2.4	Triaziny v prostředí	71
<b>6.</b>	<b>Závěr</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Přehled použité literatury</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>Klíčová slova</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>Přílohy</b>	<b>82</b>



## Úvod

Růst spotřeby pesticidů v moderním světě budí stále větší obavy z vážného znečištění prostředí, k němuž jejich používáním dochází.

Ideální chemický pesticid by měl být vysoce toxický pro cílového škůdce, neměl by být perzistentnější než je nezbytně nutné pro zasažení cílového objektu, a neměl by jinak ovlivňovat ekosystém.

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 organizmy a předkládaná 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 toxicologie věnována rybám (Hartman et al., 1988).

Cílem předkládané práce bylo stanovit akutní toxicitu a vliv metribuzinu na biochemický a hematologický profil krve ryb. Tyto výsledky jsou součástí hodnocení vlastností ekotoxicity pesticidních přípravků.

## 1. SOUČASNÝ STAV

Aplikace pesticidních přípravků představuje celosvětově jeden z významných faktorů intenzifikace zemědělské produkce. Eliminace či potlačení škodlivých činitelů jako jsou hmyzí škůdci, plevele, mikroskopické vláknité houby (plísně) apod. umožňuje nejenom dosažení dobrých výnosů a omezení ztrát při skladování, ale v řadě případů použití těchto přípravků pozitivně ovlivňuje i kvalitativní parametry (např. nutriční, technologické, senzorické) zemědělských plodin. Ve specifických případech je přímá aplikace pesticidních přípravků nezbytná i v živočišné výrobě.

Na rozdíl od pesticidů staré generace např. organochlorových (látky typu DDT, aldrin, heptachlor apod.), které se vyznačovaly vysokou perzistencí v životním prostředí a u nichž, díky jejich značné afinitě k tukové složce živých organismů, docházelo ke kumulaci v potravních řetězcích, tzv. „moderní“, v současnosti rozsáhle používané pesticidy, po splnění své ochranné funkce podléhají vlivem různých fyzikálně-chemických či biochemických faktorů řadě změn, které vesměs vedou k postupnému poklesu mateřských reziduí. K jejich kumulaci v potravním řetězci tak nedochází.

Pro povolení použití (registraci) pesticidních přípravků musí výrobce předložit rozsáhlou dokumentaci zahrnující mimo jiné údaje o:

- dynamice reziduí po aplikaci včetně jejich typických hladin v době sklizně (průměr, medián),
- charakterizaci změn aktivní složky v životním prostředí,
- toxikologická data získaná při pokusech se zvířaty,
- údaje o ekotoxicitě atd.

Hodnocení nových, ale i již dříve povolených přípravků (na základě aktualizovaných dat), probíhá na mezinárodní úrovni za účasti expertů v příslušných oblastech.

V rostlinné výrobě jsou pesticidní přípravky často aplikovány do půdy (pre-emergentně) či na listovou plochu (post-emergentně). Pokud jde o pesticidy se systémovými účinky, dochází k jejich penetraci kutikulou listů či příjmu kořenovým systémem a poté jsou v rostlině translokovány (distribuce v plodině může být nerovnoměrná, nicméně rezidua se mohou nacházet i v částech, na které nebyl pesticid bezprostředně aplikován). Naopak tzv. kontaktní pesticidy jsou lokalizovány na povrchu rostliny jako

depozit, k jejich translokaci do neošetřených částí nedochází, v některých případech lze pozorovat jen postupnou penetraci kutikulou do podpovrchových částí.

Ačkoli se pesticidy aplikují dle zásad tzv. Správné zemědělské praxe (GAP), nelze vyloučit zasažení i jiných necílových organismů či kontaminaci jednotlivých složek životního prostředí. Odhaduje se například, že 65% přípravku použitého k ošetření ovocných stromů postřikem zasáhne listovou plochu, 25% půdu a 10% se již během aplikace uvolní (odpaří) do atmosféry. Tyto poměry závisí rovněž na dalších faktorech jako je hustota porostu, ale také velikost částic/kapének nebo velikost průtoku daného prostředku z ústí rozprašovacího zařízení, způsob aplikace, počasí aj.

Pesticidní přípravky se vyrábějí v různých formách (např. rozpustný prášek, emulgovatelný prášek, smočitelný prášek, granule apod.), které podmiňují způsob aplikace. Ta se provádí obvykle postřikem rostlin nebo ošetřením rostlin nebo půdy poprachy. Jak bylo naznačeno, dochází během rozprašování přípravků (kapalných nebo pevných) ke kontaminaci atmosféry a molekuly pesticidu se následně mohou vázat na pevné částice rozptýlené v atmosféře. Sorbované na tuhé atmosférické částice nebo ve formě par (záleží na hodnotách tlaku nasycených par) jsou dále transportovány do více či méně vzdálených lokalit. Kromě fyzikálně-chemických vlastností je přestup pesticidů do jednotlivých složek životního prostředí často ovlivněn řadou faktorů, jako je teplota, dešťové srážky, rychlost větru, druh půdy apod. Například působením deště se mohou rezidua polárních pesticidů dostávat z nadzemních částí rostlin do půdy. Odtud mohou být pesticidy následně transportovány dále do podzemních i povrchových vod a deponovány v říčních sedimentech. Stejným způsobem se mohou do prostředí dostávat pesticidy aplikované přímo do půdy (např. pre-emergentní herbicidy).

Kontaminace říčních sedimentů pesticidy závisí na dalších faktorech, jako je například průtok vody, charakter dna, teplota, obsah aktivního kyslíku aj. V půdě může docházet k sorpci pesticidů na půdní částice (záleží na složení půdy, fyzikálně-chemických vlastnostech pesticidu - hodnotách půdního adsorpčního koeficientu  $K_{oc}$  (viz kapitola 1.5 Fyzikálně chemické vlastnosti pesticidů), struktuře pesticidu, přítomnosti polárních funkčních skupin apod.), což omezuje možnosti odbourání pesticidů chemickými procesy (oxidace, redukce) nebo působením mikroorganismů.

K adsorpci pesticidů může docházet prostřednictvím van der Waalsových sil, vodíkových vazeb, tvorbou komplexů (např. mezi ionty  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Al}^{3+}$  a atomy kyslíku nebo síry obsažených v molekule organofosfátů) (Hajšlová et al., 2004).

### 1.1 Zdroje znečištění vodního prostředí

Významnou složkou ekologických systémů je vodní prostředí, především povrchové vody, jejichž znečištění se projevuje především poškozením ryb a ostatních vodních organismů (Svobodová et al., 1987).

Znečištění povrchových vod lze rozdělit takto:

- *bodové znečištění*, kdy se odpadní vody, výjimečně i pevné odpady, dostávají v úzce lokalizovaném prostoru do povrchových vod a mění jejich kvalitu (např. vyústění průmyslových odpadních vod do recipientu),
- *plošné znečištění* nastává jako důsledek odtoku atmosférických srážek v podobě povrchových vod z velkých ploch,
- *trvalé nebo dlouhodobé znečištění* lze definovat jako opakující se znečištění, obvykle ze stejného zdroje, povrchových vod a měnící trvale jejich kvalitu,
- *havarijní znečištění* je možné charakterizovat jako náhlé, nepředvídané a obvykle krátkodobé a přechodné zhoršení jakosti vody v toku nebo nádrži (Svobodová et al., 1987).

### 1.2 Pesticidy

Podle mezinárodní definice formulované komisí Kodex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission - CAC) se jako pesticidy označují všechny sloučeniny nebo jejich směsi, určené pro prevenci, zničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých organismů (t.j. nežádoucích rostlin, mikroorganismů či živočichů) během produkce, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv a dále látky aplikované u zvířat proti ektoparazitům. Termín „pesticidy“ zahrnuje též sloučeniny používané jako desikanty, regulátory či stimulanty růstu a inhibitory klíčení

aplikované na plodiny před nebo po jejich sklizni (Drápal et al., 2005).

Evropská unie ve svých legislativních odkazech používá širší termín „prostředky na ochranu rostlin a biocidy“.

**Prostředky na ochranu rostlin** jsou definovány jako produkty chemické či biologické povahy určené pro:

- ochranu rostlin nebo rostlinných produktů proti škodlivým organismům,
- ovlivnění životních procesů v rostlinách mechanismy jinými než působí nutriety (sem spadají např. regulátory růstu),
- zajištění údržnosti rostlinných produktů,
- zničení nežádoucích rostlin či jejich částí,
- kontrolu / prevenci nežádoucího růstu rostlin.

**Biocidy** zahrnují široké spektrum produktů určených v rámci dané aplikace proti různým cílovým organismům, jde zejména o:

- látky s dezinfekčním účinkem (proti bakteriím, virům),
- látky s konzervačním účinkem (proti plísním, hmyzu),
- insekticidy pro komunální hygienu (proti hmyzu - mouchám, komárům, mravencům),
- rodenticidy (proti myším, potkanům),
- látky zabraňující usazování organismů (zejména řas) na površích předmětů (Drápal et al., 2005).

### *Rezidua pesticidů*

Jako rezidua pesticidů se označují zbytková množství pesticidů (aktivních složek pesticidních přípravků) a jejich metabolitů a rozkladných nebo reakčních produktů, v potravinách, zemědělských plodinách nebo krmivech (Drápal et al., 2005).

V ČR je rozhodnutí o registraci přípravků na ochranu rostlin upraveno zákonem č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči. Posouzení přípravku včetně jeho použití z hlediska ochrany zdraví lidí zajišťuje Ministerstvo zdravotnictví ČR. Výsledkem tohoto

posouzení je posudek přípravku, který je podkladem pro rozhodnutí o jeho registraci. Posouzení přípravku koordinuje rostlinolékařská správa s MZ ČR v rámci řízení o jeho registraci.

Základní normou ČR v oblasti potravin je zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů. Klíčovou právní normou pro oblast pesticidů je vyhláška č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách. Novelizaci přináší vyhláška č. 68/2005 Sb. MLR (maximální limit reziduí) pro rezidua pesticidů v potravinách rostlinného původu jsou uvedeny v příloze č. 3, v příloze č. 4 jsou pak uvedeny MLR pro potraviny živočišného původu. Hodnoty MLR jsou ve velké míře harmonizované s legislativními předpisy EU.

Další významnou normou v této oblasti je zákon č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, ve znění pozdějších předpisů (Drápal et al., 2005).

#### *Maximální limit reziduí*

Maximální limit reziduí (MLR) pesticidů je nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidů (vyjádřené v  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), které je výsledkem použití pesticidních přípravků v souladu se správnou zemědělskou praxí, při ochraně rostlin během vegetace a skladování, nebo je výsledkem kontaminace životního prostředí dnes již nepoužívanými pesticidy. Je nutné zdůraznit, že MLR není toxikologický referenční bod a jeho mírné překročení neznamena bezprostřední ohrožení zdraví konzumenta. Rizikové koncentrace, které by vyvolaly symptomy akutní otravy či vedly v případě dlouhodobého přívodu k chronické intoxikaci, jsou vyšší. Jde o kritérium významné pro kontrolu dodržování příslušných předpisů pro aplikaci pesticidů a jedním z významných aspektů vyplývajících ze zavedení MLR je podpora hlavně mezinárodního obchodování se zemědělskými komoditami.

### *Dělení pesticidů (Zapletal et al., 2001)*

Podle určení k hubení určitého škůdce pesticidy dělíme na:

- akaricidy - přípravky určené k hubení roztočů,
- algicidy - přípravky určené k hubení řas,
- arborocidy - pesticidy určené k hubení stromů a keřů,
- avicidy - přípravky určené k hubení ptáků,
- fungicidy - prostředky určené k ochraně před houbovými chorobami,
- herbicidy - pesticidy určené k hubení rostlin,
- insekticidy - přípravky určené k hubení hmyzu (dezinsekce),
- molluskocidy - prostředky určené k hubení měkkýšů,
- piscicidy - přípravky určené k hubení ryb,
- rodenticidy - přípravky určené k hubení hlodavců (deratizace).

Podle způsobu aplikace:

- postřiky, aerosoly,
- fumiganty (páry nebo plyny),
- popraše,
- pevné a tekuté nástrahy,
- mořidla,
- nátěry a impregnace.

Podle původu:

- přírodního původu,
- syntetické látky,
- biopreparáty.

#### ***1.2.1 Mechanismus účinku pesticidů***

Jako pesticidy jsou používány látky různé chemické povahy. Tím je do značné míry určen i způsob, jakým ovlivňují cílového činitele (hmyz, plevel atd.).

V případě insekticidů se jedná především o narušení přenosu signálů mezi ner-

vovými centry - např. látky ze skupiny organofosfátů a karbamátů inhibují enzym acetylcholinesterázu fosforylací. Neurotoxické účinky vykazují rovněž syntetické pyrethroidy a klasické organochlorové insekticidy (DDT apod.). Uplatňují se i další mechanismy, např. látky ze skupiny benzoylmočovin (diflubenzuron, flufenoxuron atd.) fungují jako inhibitory syntézy chitinu, čímž znemožňují výstavbu kutikuly hmyzu.

Podstata účinku fungicidů spočívá např. v inhibici enzymů obsahujících v molekule sulfhydrylové skupiny (např. látky ze skupiny ftalimidů– captan, folpet). Naopak velice často používané sloučeniny ze skupiny benzimidazolů (např. thiabendazol) narušují syntézu DNA.

U herbicidů existují různé mechanismy působení na cílové činitele. Jedná se o katalýzu tvorby hydroperoxidů mastných kyselin v buněčných membránách a v důsledku toho přerušení fotosyntézy. Takto působí např. desikanty patřící mezi kvartérní amoniové sloučeniny – diquat, paraquat, které se aplikují za účelem likvidace nadzemních částí rostlin a usnadnění plodin. Naproti tomu látky ze skupiny triazinů (atrazin, prometryn) a fenylmočovin (diuron, metoxuron) blokují transport elektronů při fotosyntéze, inhibují tzv. Hillovu reakci. Herbicidní účinek některých ostatních látek spočívá v zamezení klíčení semen plevelných rostlin (nitroaniliny) nebo narušování metabolismu nukleových kyselin, které vedou k zastavení růstu cílových plevelů (fenoxyalkanové kyseliny – dichlorprop, deriváty benzoové kyseliny – dicamba) Hajšlová et al., 2004).

### **1.3. Degradace**

Jak již bylo zmíněno, „moderní“ pesticidy se po aplikaci rozkládají účinkem řady fyzikálněchemických faktorů jako je sluneční záření (fotolýza), vyšší teplota (vypařování) či vlhkost (hydrolýza), které přispívají k postupnému poklesu reziduí. Významným degradačním mechanismem je též oxidace vzdušným kyslíkem. V exponovaných rostlinách a živočiších (cílových i necílových organismech) běžně dochází k postupné biotransformaci reziduí pesticidů, která je součástí detoxifikačních pochodů. Vznikající produkty se tak mohou nacházet i v potravinách a za určitých okolností je nutné je sledovat.

Zejména obratlovci a z nich především ptáci a savci disponují aktivními enzy-



movými systémy schopnými xenobiotika účinně metabolizovat. Biotransformační fáze I typicky zahrnuje změny enzymově katalyzované hydrolázami a oxidázami, při kterých jsou do molekuly mateřské sloučeniny buď nově zavedeny polární funkční skupiny anebo odštěpením části původní molekuly se takovéto skupiny odkryjí. Vznikající primární metabolity často dále vstupují do sekundárních reakcí fáze II, kde dochází k jejich konjugaci s malými polárními endogenními molekulami za vzniku produktů, které lze snadno z organismu vyloučit. Typ vznikajících sekundárních metabolitů je charakteristický pro jednotlivé druhy organismů, např. u savců, ptáků a některých ryb dochází ke konjugaci především s glukuronovou kyselinou (u ryb připadá v úvahu též konjugace s glycinem), zatímco u bezobratlých živočichů a také u rostlin jsou dominantní produkty konjugace s glukózou. Zatímco u vyšších organismů jsou tvořící se metabolity transportovány v krevním řečišti a posléze vylučovány, u rostlin se předpokládá, že takovéto „odpadní“ produkty jsou ukládány do ligninových struktur. Tato rezidua jsou téměř bez výjimek biologicky nedostupná (Drápal et al., 2005).

### ***1.3.1 Mikrobiální degradace***

Řada biotransformací, které v konečné fázi vedou až k eliminaci pesticidů ze životního prostředí, je důsledkem působení mikroorganismů. Pesticidy mohou vstupovat do běžných metabolických dějů probíhajících v mikrobiální buňce (kometabolismus) nebo mohou být pro daný mikroorganismus substrátem (tj. zdrojem uhlíku a dusíku). Zejména bakterie se významně podílejí na odbourání látek kontaminujících životní prostředí. Například bakterie rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium* nebo *Serratia* způsobují degradaci reziduí hexachlorcyklohexanu a dalších chlorovaných organických látek (např. DDT) přítomných ve vodě a půdě. Bakterie rodu *Pseudomonas* umožňují také degradaci jiných než pouze organochlorových pesticidů – například kmen *Pseudomonas putida* vede k úplné eliminaci insekticidu ethoprophosu z půdy. *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas paucimobilis* umožňují transformaci fungicidu iprodionu v půdě za vzniku 3,5-dichloranilinu. Také karbamátové pesticidy mohou být eliminovány působením mikroorganismů – například aldicarb je účinně degradován působením bakterií rodu *Methylosinus*.

Aby mohly být cizorodé látky účinně degradovány, musí mít mikroorganismy zajištěny optimální podmínky pro svou činnost (především vhodnou teplotu a pH). Například bakterie *Pseudomonas putida* vyžadují pH prostředí 6-8 a teplotu 20-35 °C. Aktivita tohoto kmene klesá již při poklesu pH prostředí na hodnotu 5. Tyto skutečnosti musí být brány v potaz při úvahách o využití mikroorganismů k odbourání xenobiotik z prostředí.

## **1.4 Herbicidy**

Jako herbicidy jsou označovány látky, které jsou určeny k ničení nebo potlačování růstu plevelů a nežádoucích rostlin (Zapletal et al., 2001).

Specifickou rizikovost látek označují standardní věty, jejichž seznam - tzv seznam R vět, je uveden v příloze č. 5 k vyhlášce č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a přípravcích, která se týkají klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků (Svobodová et al., 2004).

Herbicidy se označují pomocí „R“ vět, které popisují nebezpečné vlastnosti dané látky nebo přípravku, a „S“ vět, které jsou uváděny s příslušným číselným kódem a uvádí text opatření, jenž je třeba provádět v případě nehody při manipulaci nebo práci s danou látkou nebo přípravkem.

### **1.4.1 Rozdělení herbicidů**

I. dle rozsahu a záběru účinků

- a) totální (neselektivní) herbicidy, které ničí veškeré rostliny, se kterými se dostanou do kontaktu,
- b) selektivní herbicidy, které jsou účinné jen vůči určitým druhům rostlin.

II. dle období aplikace

- a) preemergentní aplikace - před vzejitím rostliny,
- b) postemergentní aplikace - po vzejití rostliny.

### III. dle způsobu aplikace

- a) aplikované na povrch rostliny - na list,
- b) aplikované na půdu.

### IV. dle fyziologického působení

- a) kontaktní - působí dotykem, srážejí bílkoviny a fungují jako plazmatické jedy,
- b) systémové.

### V. dle chemického složení

- a) anorganické,
- b) organické.

Do skupiny herbicidů se zařazují i defoliační a desikační prostředky, které se využívají k řízenému přerušení vegetace. Zvláštní skupinou pak jsou arboricidy, které jsou určeny k ničení porostů keřů a stromů (Zapletal et al., 2001).

Herbicidy registrované v České republice zařazené do jednotlivých skupin podle chemické struktury (Zapletal et al., 2001):

- deriváty fenoxymastných kyselin - selektivní herbicidy středně až málo toxické,
- deriváty močoviny - chemicky stabilní, málo toxické,
- triazinové herbicidy - selektivní herbicidy,
- karbamáty a thiokarbamáty - mají methemoglobinizační účinek,
- bipyridily - herbicidy s desifikačním a defoliačním účinkem,
- amidy, aniliny, nitrily - pro užitková zvířata málo toxické,
- anorganické herbicidy a ostatní skupiny - např. síran amonný.

Tab. 1: Rozdělení herbicidů podle použití, mobility a chemické struktury.

	<b>HERBICIDY</b>	
aplikované na list, systémové či translokované	fosfonoaminokyseliny	glufosinát, glyfosát
	deriváty benzoové kyseliny	dicamba, hlorfenpropmethyl, 2,3,6-TBA (2,3,6 - trichlorbenzoová kyselina)
	chlorované alifatické kyseliny	dalapon
	estery oxyfenoxykyselin	cyklxidim, diclofop-methyl, haloxyfop-methyl
	fenoxyalkanové kyseliny	2,4-D (2,4-dichlorfenoxy octová kyselina), dichlorprop,mecoprop, MCPA (4-chlor-2-methylfenoxy)octová kys., MCPB (4-chlor-o-tolyloxy máselná kys.), silvex
	kvarterní amoniové sloučeniny	paraquat, diquat
aplikované na list, kontaktní	benzotrily	bromoxynil, dichlobenil, ionoxynil
	benzothiadiazily	bentazon
	karbaniláty	fenmedifam
	cyklohexenony	cykloksidim, kletodim, sethoxydim
	dinitrofenoly	dinoseb
	difenyletery	acifluorfen, laktofen, nitrofen, oxyfluorfen
aplikované do půdy	acetanilidy	alachlor, butachlor, metolachlor, propachlor
	amidy a anilidy	difenamid, naptalam, propanid, propanil
	karbaniláty a karbamáty	asulam, barban, bendiocarb, chlorpropham, propham
	dinitroaniliny	benefin, trifluralin
	pyridazinony a pyridinony	amitrol, dimethazon, fluridon, oxadiazon, pyrazon
	pyridinokyseliny a pikolinové kyseliny	fluroxypyr, clopyralid, picloram, triclopyr
	fenylmočoviny nebo jiné substituované močoviny	diuron, fenuron, chlorbromuron, isoproturon, linuron, metoxuron, monolinuron, siduron
	sulfonylmočoviny	amidosulfuron, chlorsulfuron, nikosulfuron, primisulfuron-methyl, prosulfuron, rimsulfuron, tribenuron, trisulfuron- methyl
	thiokarbamáty	butylát, cykloát, molinát, trifencarb

	HERBICIDY	
aplikované do půdy	triaziny	ametryn, atrazin, desmetryn, cyanazin, prometon, prometryn, propazin, simazin, terbuthylazin, terbutryn
	uracily	bromacil, lenacil, terbacil

### 1.5 Fyzikálně chemické vlastnosti pesticidů (Hajšlová et al., 2004)

Vzhledem ke své chemické odlišnosti vykazují pesticidy různé fyzikálně-chemické vlastnosti. K predikci chování reziduí pesticidů v různých biologických systémech se využívají následující parametry (konkrétní hodnoty některých fyzikálně-chemických vlastností vybraných zástupců klasických i moderních pesticidů jsou pak uvedeny v Tabulce 2).

#### *Rozpustnost ve vodě*

Obecně lze říci, že sloučeniny dobře rozpustné ve vodě jsou snáze biodegradovatelné (podléhají např. oxidačním reakcím, hydrolýze). Takové látky se rovněž poměrně snadno odstraňují z povrchu rostlin omytím. Na druhou stranu mohou snadno přecházet do vodních toků nebo zdrojů pitné vody, ze kterých se vzhledem k nižší těkavosti, jen obtížně uvolňují do atmosféry.

#### *Rozdělovací koeficient oktanol-voda (Kow)*

Tento parametr vyjadřuje afinitu rezidua k tukům. Lze říci, že látky s vysokou hodnotou Kow (např. klasické organochlorové pesticidy) se snadno kumulují v tukové složce živých organismů. Jako látky snadno rozpustné v tucích se považují sloučeniny s hodnotami pKow (-log Kow) vyšší než 4. Na základě velikosti rozdělovacího koeficientu lze také odhadnout v jakých částech rostlin nebo zemědělských produktů budou lokalizována rezidua sledovaných pesticidů (dá se očekávat, že pesticidy s vyššími hodnotami pKow budou přítomny v povrchové voskové vrstvě jablek atd.).

### *Tlak nasycených par*

Hodnota tohoto parametru je důležitá při hodnocení způsobu atmosferického transportu reziduí. Předpokládá se, že látky s hodnotami tlaku nasycených par nižšími než  $1 \cdot 10^{-7}$  mPa jsou asociovány s pevnými částicemi, v opačném případě se nacházejí ve formě par. Rovněž během technologických operací (sušení, pečení, mletí) lze očekávat, že látky vyznačující se vyššími hodnotami tlaku nasycených par, budou mít tendenci uvolňovat se z upravované potraviny (velikost těchto ztrát rovněž závisí na druhu potraviny).

### *Disociační konstanta $K_a$*

Součástí molekuly řady pesticidů jsou ionizovatelné skupiny. Stupeň disociace, který se vyjadřuje disociační konstantou  $K_a$ , se promítá v chování pesticidu v daném prostředí (např. určuje rozsah fotolýzy, vypařování z vodného prostředí, solubilizaci, ovlivňuje schopnost sorpce na sedimenty atd.). Disociační konstanta se také vyjadřuje jako záporný dekadický logaritmus ( $pK_a = -\log K_a$ ).

### *Biokoncentrační faktor $BCF$*

Biokoncentrační faktor vyjadřuje míru přechodu rezidua pesticidu z vodného prostředí a biokoncentraci v určitém organismu. Udává se pro hydrofobní pesticidy a stanovuje se jako poměr rovnovážných koncentrací rezidua v organismu a vodě.

### *Půdní adsorpční koeficient $KOC$*

Tento parametr vyjadřuje schopnost pesticidu vázat se na půdní částice a charakterizuje tak míru perzistence rezidua v půdním prostředí. Vyšší hodnoty  $KOC$  jsou charakteristické pro látky silně vázané (absorbované nebo adsorbované), v důsledku čehož jsou obtížně biodegradovatelné. Látky vázané na půdní částice se velmi málo vypařují a uvolňují do vodného prostředí.

Tab. 2. Přehled fyzikálně chemických vlastností vybraných pesticidů (Hajšlová et al., 2004).

Pesticid	Rozpustnost ve vodě (mg.dm <sup>-3</sup> )	Tlak nasycených par (mPa)	pK <sub>ow</sub>	K <sub>oc</sub>	Poločas v půdě (dny)	log BCF (ryby)
<b>Klasické organochlorové sloučeniny</b>						
aldrin	2,70.10 <sup>-2</sup> (20)	1,00.10 <sup>-2</sup>	6,50	6,70.10 <sup>3</sup>	53	4,029
dieldrin	1,90.10 <sup>-1</sup> (20)	4,00.10 <sup>-1</sup>	4,30	x	2550	4,100
p,p'-DDT	1,70.10 <sup>-3</sup> (20)	1,50.10 <sup>-1</sup>	6,00	2,40.10 <sup>5</sup>	700-5000	4,468
p,p'-DDE	1,30.10 <sup>-3</sup> (20)	1,80.10 <sup>-2</sup>	5,80	1,00.10 <sup>6</sup>	x	4,342
HCB	5,00.10 <sup>-3</sup> (20)	2,50.10 <sup>0</sup>	5,30	1,40.10 <sup>4</sup>	1300	4,342
lindan	7,40.10 <sup>0</sup> (20)	3,00.10 <sup>0</sup>	3,60	1,00.10 <sup>3</sup>	400	2,505
toxafen	8,90.10 <sup>-4</sup> (20)	8,90.10 <sup>-1</sup>	4,80	1,00.10 <sup>3</sup>	300-5000	4,522
<b>Moderní pesticidy</b>						
Pesticid	Rozpustnost ve vodě (mg.dm <sup>-3</sup> )	Tlak nasycených par (mPa)	pK <sub>ow</sub>	K <sub>oc</sub>	Poločas v půdě (dny)	
acefát	790 000 (20)	0,226 (24)	- 0,89	x	2	
aldicarb	4,9 (20)	13 (20)	0,05	x	x	
atrazin	33 (25)	0,0385 (25)	2,50	39-173	41	
benzyl	4 (25)	<5.10 <sup>-3</sup> (25)	1,37	1900	19	
captan	3,3 (25)	<1,3 (25)	2,79	x	1	
carbaryl	120 (20)	0,041 (23,5)	1,59	x	7-14	
carbendazim	29 (24)	0,09 (20)	1,38	200-250	6-12	
deltamethrin	<0,0002 (25)	0,000012 (25)	4,60	4,6.10 <sup>5</sup>	<23	
diazinon	60 (20)	12(25)	3,30	332	11-21	
dimethoát	230 (20)	0,25 (25)	0,70	16-51	2-4	
fenitrothion	21 (20)	15 (20)	3,43	x	12-28	
chlorpyrifos	0,4 (25)	2,7 (25)	4,70	1250	7-15	
iprodion	13 (20)	0,0005 (25)	3,00	373	20-160	
parathion	11 (20)	0,89 (20)	3,83	x	x	
phosalon	3,05 (25)	<0,06 (25)	4,01	x	1-4	
pirimifos-methyl	9,9 (30)	2 (20)	4,20	x	3,5-2,5	

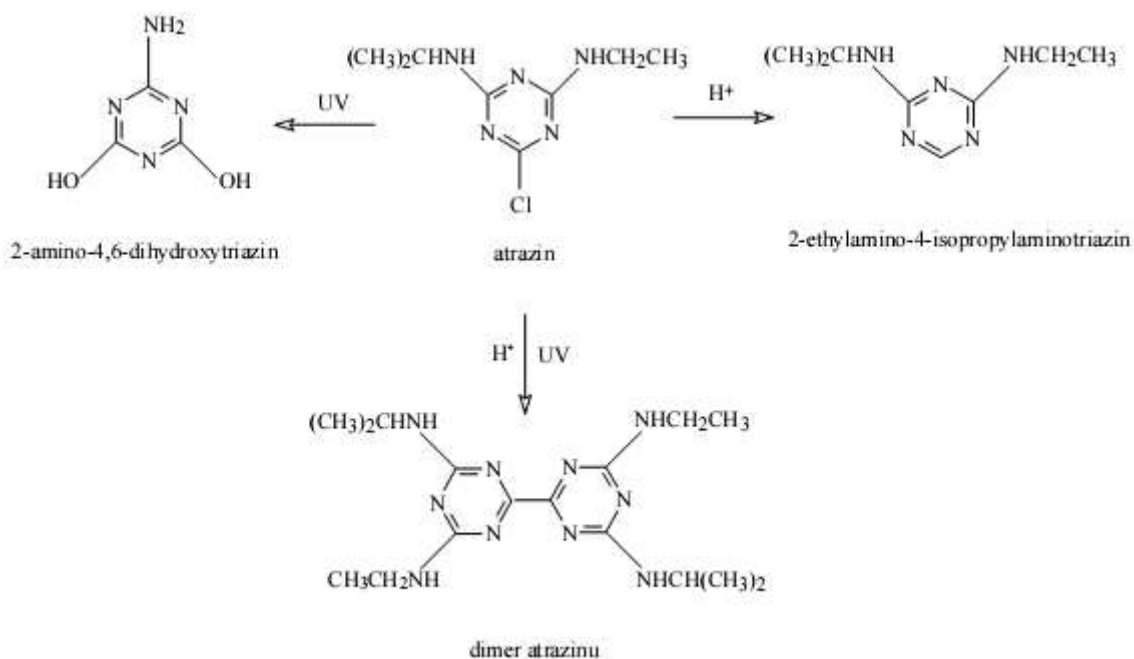
Pesticid	Rozpustnost ve vodě (mg.dm <sup>-3</sup> )	Tlak nasycených par (mPa)	pK <sub>ow</sub>	K <sub>oc</sub>	Poločas v půdě (dny)	log BCF (ryby)
tolyfluanid	0,9 (20)	0,2 (20)	3,90	x	2-11	
vinclozolin	2,6 (20)	0,13 (20)	3,00	100-735	x	

číslo v závorce udává teplotu v °C, x - hodnota nebyla uvedena

### 1.6 Degradace atrazinu

V případě triazinů (atrazin, cyanazin, terbutryn) dochází ve vodním prostředí účinkem UV záření k odštěpení postranních alkylových řetězců z triazinového kruhu za vzniku hydroxytriazinu a kyseliny kyanurové jako hlavních degradačních produktů (Obr.1). Kromě toho dochází působením volných radikálů k tvorbě dimerů mateřských sloučenin.

Obr. 1 Atrazin a jeho degradační produkty.



### 1.7 Triaziny

Triaziny jsou jedněmi z nejstarších herbicidů, s počátkem výzkumu svých herbi-



cidních účinků už v 50. letech 20. století. Skupina triazinů je charakteristická heterocyklickou strukturou, složenou z uhlíku a dusíku. Většina triazinů, kromě metribuzinu, má symetrickou stavbu se záměnou některých atomů uhlíku za atomy dusíku. Mechanismus účinků spočívá v blokování elektronu při fotosyntéze.

Obr. 2: Strukturální vzorce triazinů.



Tři izomery triazinu se odlišují umístěním svých atomů dusíku a jsou nazývány 1,2,3-triazin, 1,2,4-triazin a 1,3,5-triazin. K nejnámějším a nejpoužívanějším ze skupiny triazinů patří atrazin, simazin, cyanazin, hexazinon, terbutryn, prometryn, propazin, metribuzin a ametryn.

Ve Spojených státech amerických byl atrazin široce používaným herbicidem po několik desetiletí. Mezi lety 1966 – 1981 bylo v USA zaznamenáno 66 případů otrav atrazinem u exponovaných pracovníků a po rozsáhlé dermální expozici bylo zaznamenáno jedno úmrtí. Atrazin má dráždivé účinky na kůži, může způsobit její zčervenání, vyrážku, otok, dráždí oči, způsobuje bolesti na hrudi, nauseu. Atrazin je velmi perzistentní v prostředí díky své rezistenci k abiotické hydrolyze a přímé fotolýze ve vodním prostředí. Je mírně toxický pro vodní živočichy a jeho 96hLC50 pro pstruha duhového je 5,3 mg.l<sup>-1</sup> (Wexler et al. 2005).

### 1.8 Popis přípravku Sencor 70 WG

Sencor 70 WG je selektivní postřikový herbicid ve formě dispergovatelného granulátu k hubení plevelů v porostech brambor, hrachu, rajčat a vojtěšky.

Sencor 70 WG je listový a půdní herbicid. V případě, že plevelé teprve klíčí, působí vý-

hradně prostřednictvím půdy. Při aplikaci na vzešlé plevele se navíc plně uplatní působení listovou plochou. Herbicidní účinek přípravku trvá až 12 týdnů, podle druhu půdy, půdní vlhkosti a teploty. Přípravek má široké spektrum účinnosti, spolehlivě hubí dvou-  
děložné a také jednoděložné plevele. Přehled citlivých, méně citlivých a nedostatečně hubených druhů plevelů shrnují následující tabulky č. 3,4,5.

Tab. 3: Citlivé plevele vůči Sencoru 70 WG.

Český název	Latinský název
bažanka roční	<i>Mercurialis annua</i>
heřmánky	<i>Matricaria</i>
hluchavky	<i>Lamium</i>
hořčice rolní	<i>Sinapis arvensis</i>
chrpa modrák	<i>Centaurea cyanos</i>
kokoška pastušší tobolka	<i>Capsella bursa-pastoris</i>
konopice polní	<i>Galeopsis tetrahit</i>
lebedy	<i>Atriplex</i>
lilek černý	<i>Solanum nigrum</i>
lipnice roční	<i>Poa annua</i>
mák vlčí	<i>Papaver rhoeas</i>
merlík bílý	<i>Chenopodium album</i>
mléče	<i>Sonchus</i>
pěťour malouborný	<i>Galinsoga parviflora Cav</i>
ptačinec žabinec	<i>Stellaria media</i>
rdesno červivec	<i>Persicaria maculata</i>
rdesno ptačí	<i>Polygonum aviculare</i>
rozrazilý	<i>Veronica</i>
ředkev ohnice	<i>Raphanus raphanistrum</i>
violka rolní	<i>Viola arvensis</i>
zemědým lékařský	<i>Fumaria officinalis</i>

Tab. 4: Méně citlivé plevele vůči Sencoru 70 WG.

Český název	Latinský název
ježatka kuří noha	<i>Echinochloa crus-galli</i>
laskavce	<i>Amaranthus</i>
pohanka svlačcovitá	<i>Fagopyrum convolvulus</i>
rdesno blešník	<i>Persicaria lapathifolia</i>

Tab. 5: Nedostatečně hubené plevely přípravkem Sencor 70 WG.

Český název	Latinský název
svízel přítula	<i>Galium aparine</i>
pcháč oset	<i>Cirsium arvense</i>
pýr plazivý	<i>Elytrigia repens</i>

Přehled registrovaného použití přípravku Sencor 70 WG na kulturní plodiny ukazuje tabulka číslo 6.

Tab. 6: Přehled registrovaného použití přípravku Sencor 70 WG (Anonym1).

Plodina	Plevel	Dávka (4l vody / 100 m <sup>2</sup> )	Způsob
brambor	dvouděložné	5 – 15 g	preemergentně
brambor	dvouděložné	5 g	postemergentně
hrách	jednoděložné	3 – 4 g	preemergentně
rajče výsadby	dvouděložné	5 g	postemergentně
rajče výsevy	dvouděložné	3 g	postemergentně
vojtěška	jednoděložné	7,5 10 g	postemergentně

Účinnou látkou zkoumaného přípravku Sencor 70 WG je metribuzin.

Obsah účinné látky - metribuzin 70 %

### 1.8.1 Vlastnosti metribuzinu

Metribuzin je bílá krystalická látka, páchnoucí po síře.

Chemický název: 4-amino-6-*terc*-butyl-3-(methylsulfanyl)-1,2,4-triazin-5(4*H*)-one

Molární hmotnost: 214,29

Rozpustnost ve vodě: 1050 mg.l<sup>-1</sup>

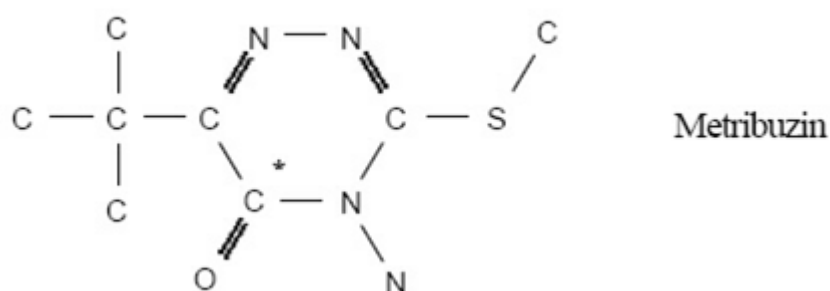
Rozpustnost v dalších rozpouštědlech: Mírně se rozpouští v aromatických a chlorovaných uhlovodíkových rozpouštědlech, zahrnujíc dimethyl formamid, cyklohexan, methanol, benzen, ethanol, xylen a kerosen.

Bod tání: 125 -126,5 °C

Tlak odpařování: 0,058 mPa při 20 °C

Log  $P_{ow}$  = 1,6 při 20 °C a pH 5,6

Obr.3: Strukturální vzorec metribuzinu.



Metribuzin je selektivní herbicid z rodiny triazinů, který inhibuje fotosyntézu citlivých rostlinných druhů. Je používán ke kontrole plevelů. Je k dispozici jako kapalný roztok, ve vodě rozpustné granule či jako suché přípravky k rozptýlu (Anonym 2).

### ***1.8.2 Toxikologické efekty***

#### ***Akutní toxicita***

Metribuzin je mírně toxický při požití, s udávanou orální LD50 1090 - 2300 mg.kg<sup>-1</sup> pro krysy, 700 mg.kg<sup>-1</sup> pro myši a 245 - 274 mg.kg<sup>-1</sup> pro prasata guinejská (Kidd et al., 1991). Je prakticky netoxický dermálně s dermální LD50 20 000 mg.kg<sup>-1</sup> pro králíka. (Kidd et al., 1991). Čtyřhodinová letální koncentrace LC50 pro krysy je větší než 0,65 mg.l<sup>-1</sup> což indikuje mírnou toxicitu inhalační cestou. U metribuzinu se neprokázalo, že dráždí kůži a oči krys, králíků, prasat guinejských nebo lidí (DuPont, 1991). Při vysoké akutní expozici krys metribuzinem se projevilo omráčení (stupor) a namahavé dýchání. U přeživších krys došlo k postupnému uzdravení bez trvalých následků (Gosselin et al., 1984).

### *Chronická toxicita*

U psů, kterým bylo do krmení přidáváno  $12,5 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  po tři měsíce, nebyly sledovány žádné škodlivé efekty (Gosselin et al., 1984). Žádný efekt také nebyl pozorován při podávání dávky  $2,5 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  po dobu 3 měsíců, nicméně dávky 25 a  $75 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  způsobily zvětšení jater a štítné žlázy (Gosselin et al., 1984). U dvouleté studie, kde byl metribuzin podáván v krmení krysám a psům, nebyly pozorovány žádné efekty u dávek  $5 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  u krys a  $2,5 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  u psů. Naproti tomu v jiné dvouleté studii, kde bylo psům podáváno  $37,5 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  metribuzinu způsobilo snížení přírůstku, zvýšený mortality, poškození jater a ledvin (EPA, 1988).

### *Reproduktivní efekty*

Metribuzin nezpůsobuje efekty poškozující reprodukci. Gravidním samicím králíka byl podáván technický metribuzin, v dávkách 15, 45 a  $135 \text{ mg.kg}^{-1}$ , zaváděný žaludeční sondou po dobu 6 dní z celkových 18 dnů gravidity. U dávky  $45 \text{ mg.kg}^{-1}$  nebyly u samic pozorovány žádné škodlivé účinky, ovšem u dávky  $135 \text{ mg.kg}^{-1}$  došlo ke snížení porodní váhy mláďat. U plodů pak nebyly pozorovány žádné účinky ani u jedné z podávaných dávek (EPA, 1988). Žádný škodlivý účinek na reprodukci nebyl pozorován u tří generační studie, kde bylo krysám podáváno  $15 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  (DuPont, 1991, ACGIH, 1991).

### *Teratogenní efekty*

Byla pozorována snížená porodní váha u krys při dávkách  $70 \text{ mg/kg/den}$  a opožděný vývoj při dávkách  $200 \text{ mg.kg.den}^{-1}$ . U metribuzinu se neprokázala teratogenní aktivita u králíky při dávkách  $85 \text{ mg.kg.den}^{-1}$ , nicméně klesla porodní váha u potomstva (WSSA, 1994). Tyto údaje napovídají, že metribuzin za normálních okolností pravděpodobně nezpůsobí teratogenní efekty ani u lidí.

### *Mutagenní efekty*

Testy na živých zvířatech a tkáňových kulturách ukázaly, že metribuzin nemá mutagenní účinky (Gosselin et al., 1984).

### *Karcinogenní účinky*

Dosud se neobjevily žádné náznaky karcinogenních efektů u krys, kterým bylo v krmivu podáváno  $15 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  po dobu 2 let, ani u myší při dávce  $380 \text{ mg.kg.den}^{-1}$  po dobu 2 let (DuPont, 1991). Tyto údaje ukazují, že metribuzin nemá karcinogenní účinky.

### *Orgánová toxicita*

U studií s použitím vysokých dávek metribuzinu se objevuje útlum centrálního nervového systému. Další studie pak indikují, že cílovým orgánem je štítná žláza a játra.

### *Osud v těle*

Potom, co je metribuzin absorbován je rychle distribuován do těla a nezměněný vylučován močí. U savců je 90% metribuzinu vyloučeno během prvních 96 hodin a to močí a výkaly ( Kidd et al., 1991).

### **1.8.3 Ekologické efekty**

#### *Toxický vliv na ptáky*

Metribuzin je mírně toxický pro ptáky. Akutní orální LD50 je  $100 - 200 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro křepelku viržinskou (*Colinus virginianus*), kachnu divokou (*Anas platyrhynchos*) a křepelku japonskou (*Coturnix japonica*) (Kidd et al., 1991). Udávané 5 až 8 denní krmné hodnoty LC50 pro tyto druhy jsou všechny vyšší než  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  (WSSA, 1994).

#### *Toxický vliv na vodní organismy*

Metribuzin je mírně toxický pro ryby. U pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) činí 96 hodinová LC50  $64 - 76 \text{ mg.l}^{-1}$ , u slunečnice velkoploutvé (*Lepomis macrochirus*)  $80 \text{ mg.l}^{-1}$  a okolo  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  u karase stříbřitého (*Carassius auratus*) (Kidd et al., 1991) U hrotnatky velké (*Daphnia magna*) činí 48 hodinová LC50  $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$  (WSSA, 1994).

### *Toxický vliv na další organismy*

Metribuzin je netoxický vůči včelám. Metribuzin může být fytotoxický na necílové rostlinné druhy ( Kidd et al., 1991, WSSA, 1994).

### **1.8.4 Degradace v prostředí**

#### *Degradace v půdě a povrchových vodách*

Metribuzin je mírně perzistentní v půdním prostředí (Wauchope et al., 1992). Poločas rozpadu se různí podle typu půdy a klimatických podmínek. Poločas rozpadu v půdě činí od 30 do 120 dní, reprezentativní hodnota je přibližně 60 dní. Metribuzin je jen slabě vázán na půdu a je dobře rozpustný ve vodě, což mu dává potenciál na vyluhování v mnoha typech půd (Wauchope et al., 1992). Pohyblivost v půdě je ovlivněna mnoha faktory: množství půdního organického materiálu, velikosti půdních částic pórovitost půdy a srážky.

Princip degradace metribuzinu z půdy je na bázi mikrobiální degradace. Metribuzin je odbouráván pomocí deaminace plísňí *Cunninghamella echinulata*.

#### *Degradace ve vodě*

Poločas rozpadu v rybniční vodě je 7 dní (Kidd et al., 1991). Pokud je metribuzin nacházen ve vodě, pak je to spíše ve vodním sloupci než v sedimentu, hlavně kvůli nízké vázací schopnosti k půdě a vysoké rozpustnosti ve vodě.

#### *Degradace ve vegetaci*

Pokud je aplikován postemergentně je metribuzin absorbován přes listy, hlavní cesta vstupu je však přes kořenový systém. Z kořenů postupuje nahoru, koncentruje se v kořenech, stoncích a listech. V rostlinách necitlivých k metribuzinu dochází k deaminizaci na lépe rozpustné konjugáty, zatímco v citlivých rostlinách není metribuzin metabolizován a přerušuje fotosyntézu v chloroplastech (WSSA, 1994).

## **1.9 Faktory ovlivňující toxicitu látek, přípravků a odpadních vod pro ryby a vodní bezobratlé (Svobodová et al., 2003)**

### *Charakter látky, přípravku a odpadní vody:*

Sloučeniny určitého prvku rozpustné ve vodě jsou pro ryby toxicitější než sloučeniny téhož prvku ve vodě méně rozpustné. U pesticidních přípravků záleží celková toxicita na toxicitě účinné látky, na jejím obsahu v přípravku a dále na toxicitě vedlejších komponentů obsažených v preparátu. U pesticidů, tenzidů a dalších průmyslových preparátů se mohou výrobky stejného určení a označení od různých firem nebo různé šarže výrobků od jedné firmy lišit ve svých toxikologických vlastnostech.

### *Citlivost ryb*

Velmi citlivá k cizorodým látkám a přípravkům je skupina ryb lososovitých, podstatně odolnější jsou ryby kaprovité. Také mladší ročníky jsou ve srovnání se staršími ročníky ryb citlivější k toxickým látkám. Citlivost ryb je také ovlivněna jejich zdravotním stavem a kondicí. Zvýšenou citlivost k cizorodým látkám a ke stresům je možno pozorovat zejména u raného plůdku po nakrmení. Také roční období ovlivňuje citlivost ryb (zejména teplomilných) k toxikantům a ke stresům. Všeobecně je možné říci, že po přezimování je citlivost ryb nejvyšší. Je to dáno nejen úbytkem zásobních látek v období komorování, ale i špatnou kondicí a zhoršeným zdravotním stavem v jarním období.

### *Charakter vodního prostředí*

Nejvýraznějším faktorem v tomto směru je teplota. Všeobecně je možno říci, že čím vyšší teplota, tím vyšší je toxicita látek a přípravků. Dalším faktorem je hodnota pH. Největší ovlivnění je asi u amoniaku a amonných solí, kde s rostoucí hodnotou pH vody vzrůstá velmi silně toxicita amoniaku pro ryby. Naopak u kyanidů a sulfanu se jejich toxicita pro ryby se zvyšující se hodnotou pH vody snižuje.

Všeobecným faktorem ovlivňující toxicitu látek a přípravků pro ryby je koncentrace kyslíku ve vodě. Při deficitním kyslíkovém stavu se toxicita všech látek a přípravků zvyšuje.



### ***1.9.1 Biochemický profil ryb po působení cizorodých látek***

Změny hodnot biochemických ukazatelů lze pozorovat jak po akutním, tak po dlouhodobém působení cizorodých látek. Účinky cizorodých látek na biochemický profil krve, dalších tělních tekutin a tkání ryb lze charakterizovat následujícím způsobem (Svobodová a Máchová, 2003):

**specifický účinek jednotlivých cizorodých látek.** Typickým příkladem je snížení aktivity acetylcholinesterázy v mozku a v krvi po působení organofosfátů. Stejný účinek vykazují karbamáty a také některé skupiny cyanotoxinů. Podobně úzce specifický účinek vykazuje olovo, které inhibuje syntézu hemu ve třech krocích. V prvním kroku inhibuje ALA-dehydratázu a následkem toho je po krátkodobém či dlouhodobém účinku olova prokazováno zvýšené množství kyseliny 5-aminolevulové (ALA) v krevní plazmě nebo v moči. Velmi specifickým parametrem (biomarkerem) působení polyaromatických uhlovodíků (PAH) je 1-hydroxypyren stanovovaný ve žluči. Jedná se o konečný metabolit polycyklických aromatických uhlovodíků, vznikající v játrech v procesu detoxikace. 1-hydroxypyren je v podstatě konjugát, který se vylučuje žlučí. Při otravě ryb volným amoniakem a po autointoxikaci se stanovuje amoniak v krevní plazmě ryb, neboť dochází k pěti až desetinásobnému zvýšení obsahu ve srovnání s fyziologickými hodnotami.

**Specifický účinek skupiny cizorodých látek** na určitý biochemický parametr (biochemický marker). Jedná se ve většině případů o biochemické markery podílející se na detoxikaci cizorodých látek. Příkladem jsou metallothioneiny, které zastávají významnou funkci detoxikace v procesu metabolismu toxických kovů. Základními detoxikačními markery v metabolismu organických polutantů je cytochrom P450 a konjugační enzymy např. glutathion-S-transferáza (GST). Cytochrom P450 působí v první fázi a konjugační enzymy v druhé fázi detoxikace řady organických polutantů (PCB, dioxiny, dibenzofurany, PAH, organochlorové pesticidy aj.). Jak metallothioneiny, tak cytochrom P450 a konjugační enzymy, mají rovněž funkci indikační a stanovují se v játrech. Velmi frekventovaným biochemickým markerem je v současné době vitello-

genin stanovovaný v krevní plazmě a v játrech samců. Indikuje kontaminaci xenoestrogenními látkami (PCB, PAH, DDT a jeho metabolity, zejména DDE, ftaláty, tributylcín, aj. degradační produkty tenzidů). Xenoestrogenní látky indukují v játrech samců tvorbu vitellogeninu.

**Nespecifický účinek cizorodých látek** na biochemický profil krve ryb. Změny hodnot biochemických parametrů jsou zjišťovány především po akutním působení polutantů. V první fázi působení dochází k primární stresové odezvě charakterizované především změnami v hormonální aktivitě (např. zvýšení koncentrace kortizolu v krevní plazmě). Následuje sekundární stresová reakce, ve které dochází především k významnému zvýšení koncentrace plazmatické glukózy. Tato reakce je doprovázena dalšími změnami např. v hodnotách laktátu, laktát dehydrogenázy a celkových bílkovin v krevní plazmě. Poškození parenchymatických orgánů (zejména jater) cizorodými látkami je charakterizováno zvýšenou aktivitou enzymů v krevní plazmě. Při poškození permeability buněk těchto tkání dochází k uvolnění enzymů, zejména transamináz alanin aminotransferáza a aspartát aminotransferáza do plazmy. Podobně při poškození svaloviny (zejména při křečích) dochází k uvolňování kreatinkinázy do krevní plazmy. Většina cizorodých látek zasahuje i do metabolismu elektrolytů a to může mít za následek např. významné snížení koncentrace vápníku a zvýšení koncentrace fosforu v krevní plazmě ryb po působení sloučenin kadmia.

### ***1.9.2 Hematologický profil ryb po působení cizorodých látek***

Změny hodnot hematologických ukazatelů lze pozorovat především po akutním působení cizorodých látek. S výjimkou některých hemolytických jedů (např. saponiny) a dusitanů se jedná ve většině případů o **nespecifické změny**. Pozorované změny v červeném krevním obrazu lze charakterizovat následujícím způsobem (Svobodová a Máchová, 2003):

- zvýšení množství hemoglobinu, počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty po otravě kovy ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , organické sloučeniny cínu,

sloučeniny kadmia). Tyto změny jsou odezvou na stres organismu vyvolaný cizorodými látkami (mobilizace rezerv) (Svobodová et al., 1992).

- snížení množství hemoglobinu, počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty po otravě některými pesticidy zejména na bázi triazinů, diazinů, organofosfátu diazinonu, pyrethroidů. Jedná se o přípravky, které významně narušují orgány hemopoetického systému ryb (Svobodová et al., 1992).
- zvětšení středního objemu erytrocytu (MCV), hematokritové hodnoty a snížení střední barevné koncentrace (MCHC) po otravě některými pesticidy na bázi organofosfátů. Řada autorů předpokládá, že zjištěné změny jsou výsledkem poruchy permeability buněčné membrány erytrocytů (Svobodová et al., 1992).

Nejzávažnější změnou v bílém krevním obrazu ryb po akutním působení převážné většiny cizorodých látek je snížení počtu leukocytů a změny v jejich diferenciálním počtu. Tyto změny jsou charakterizovány lymfopenií (nízkým počtem lymfocytů) a neutrofilii (vysokým počtem neutrofilních granulocytů, zejména zvýšeným zastoupením juvenilních forem neutrofilních granulocytů). Snížení počtu leukocytů a zejména lymfocytů má za následek snížení nespecifické odolnosti ryb. Nález vysokého procenta juvenilních forem neutrofilních granulocytů (buněk myeloidní řady) svědčí o stimulaci jejich tvorby v průběhu akutní otravy. Změny podobného charakteru byly zjištěny i u ryb, vystavených dlouhodobému působení cizorodých látek (Svobodová a Máchová, 2003).

Pokud jde o *specifické působení* cizorodých látek na hematologický profil ryb, typickým představitelem jsou dusitany, které vyvolávají methemoglobinemii. Kritická hodnota zastoupení methemoglobinu s anoxií centrální nervové soustavy a úhynem u savců je maximálně 50 % z celkového hemoglobinu. Naproti tomu u ryb se tato kritická hodnota pohybuje kolem 80 – 85 % (Svobodová a Máchová, 2003).

## **2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem práce je posoudit účinky a toxicitu pesticidu na bázi triazinu s účinnou látkou metribuzin na kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Vliv metribuzinu na kapra obecného a pstruha duhového byl posuzován pomocí hematologického a biochemického profilu krve.

### **2.2 Hypotéza**

Pesticidy na bázi triazinů mají toxický efekt na necílové organismy.

### 3. MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

Pro stanovení akutní toxicity přípravku Sencor 70 WG s účinnou látkou metri-buzin [4-amino-6-*tert*-butyl-3-(methythio)-1,2,4-triazin-5-one] pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) byla použita metoda testů akutní toxicity pro ryby (OECD č. 203).

Pro stanovení vlivu přípravku Sencor 70 WG na biochemický a hematologický profil krve kapra obecného a pstruha duhového byly ryby vystaveny 96hLC50. Biochemické ukazatele v krevní plazmě byly stanoveny biochemickým analyzátozem typu VETTEST 8008.

Pokusy byly prováděny v akvaristické místnosti, toxikologické laboratoři, laboratoři biochemie a ichtyopathologie na oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém JU ve Vodňanech.

#### 3.1 Test akutní toxicity na rybách

Testy toxicity na organizmech vodního prostředí mají svou nezastupitelnou úlohu při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků včetně pesticidů. Tyto testy mají rovněž velký význam při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách. Snahou ekotoxikologie je hodnotit potencionální nebezpečí pro vodní ekosystém jako celek. Prakticky to znamená 4 úrovně studovaného ekosystému, a to bakterie, řasy, bezobratlí a ryby. K hodnocení ekotoxikologického rizika chemických látek a přípravků včetně pesticidních látek jsou vyžadovány výsledky testů akutní toxicity na řasách, dafniích a rybách. Při hodnocení akutní toxicity chemických látek se zjišťují hodnoty LC50 (letální koncentrace pro 50% testovaných ryb - v testech na rybách), hodnoty EC50 (efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn či imobilizaci testovacích organismů v testech na zooplanktonu) a hodnoty IC50 (inhibiční koncentrace způsobující 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou v testech na zelených řasách, případně na hořčici bílé nebo okřehku) (Svobodová et al., 1995; 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**:

**R50: vysoce toxické pro vodní organismy** LC(EC, IC)50 < 1 mg.l<sup>-1</sup>

**R51: toxické pro vodní organismy** 1 mg.l<sup>-1</sup> < LC(EC, IC)50 < 10 mg.l<sup>-1</sup>

**R52: škodlivé pro vodní organismy** 10 mg.l<sup>-1</sup> < LC(EC, IC)50 < 100 mg.l<sup>-1</sup>

**R53: vyvolávající dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí** 100 mg.l<sup>-1</sup> < LC(EC, IC)50 (Svobodová et al., 2000).

Při provádění testů toxicity na rybách je nutné dodržovat 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.

### **3.1.1 Princip testu:**

Ryby se vystaví po dobu 96 hodin různým koncentracím pesticidu Sencor 70 WG rozpuštěného ve standardně připravené ředící vodě, současně se nasadí ryby do ředící vody bez testované látky - kontrola.

V průběhu testu se kontroluje stav a chování ryb a odlovují se uhynulí jedinci. V časovém úseku 24, 48, 72 a 96 hodin se zaznamenají 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).

### **3.1.2 Podmínky testu :**

Teplota: u pstruha duhového - průměrná teplotě 16 °C

u kapra obecného - průměrná teplota 18 °C

Délka expozice: 96 hodin

Osvětlení: 12 hodin denně

Počet testovaných ryb: předběžný test - 3 kusy Pd<sub>1/2</sub> a 5 kusů K<sub>1</sub> v každé koncentraci

základní test - 10 kusů Pd<sub>1/2</sub> a 10 kusů K<sub>1</sub> v každé koncentraci

Pd<sub>1/2</sub> - pstruh duhový, stáří mezi 1 a 2 lety

K<sub>1</sub> – kapr obecný, stáří 1 rok

Ředící voda: vodovodní, která je zbavena chloru probubláváním vzduchem.

Akutní test toxicity na rybách: bez krmení, se vzduchováním, nasycení vody kyslíkem nekleslo pod 60 %, poměr hladiny vody k objemu roztoku je 800 cm<sup>2</sup> na deset litrů roztoku.

### **3.1.3 Experimentální materiál:**

Testované ryby: pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.). Ryby byly vybrány z populace jednotného původu, homogenní, dobrého zdravotního stavu.

#### *Pstruh duhový (Oncorhynchus mykiss)*

Ryby použité ke stanovení LC 50 za 96 hod. Sencoru 70 WG byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 17,61 g (13,2 - 19,3 g), průměrná celková délka těla 128 mm (105 – 142 mm).

Ke stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy pstruha duhového po působení Sencoru 70 WG byly použity ryby o průměrné hmotnosti 290,33 g (270 - 325 g) a průměrné celkové délky těla 308 mm (290 - 331 mm).

#### *Kapr obecný (Cyprinus carpio L.)*

Ryby použité ke stanovení LC 50 za 96 hod. Sencoru 70 WG k testu byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 21,9 g (5,0 - 33,1 g), průměrná celková délka těla 123 mm (95 - 138 mm).

Ke stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného po působení Sencoru 70 WG byly použity ryby o průměrné hmotnosti 480,67 g (265 - 695 g) a průměrné celkové délky těla 307 mm (280 - 340 mm).

### **3.1.4 Pracovní postup:**

Adaptace ryb: před testem byly ryby aklimatizovány 7 dnů v ředící vodě, v teplotě a osvětlení jako při vlastním testu. Ryby nebyly krmeny 24 hodin před zahájením testu.

Příprava koncentrační řady: pro Sencor 70 WG je  $\text{mg.l}^{-1}$  (při testování látky o neznámé toxicitě se rozsah koncentrací pro základní test stanoví na základě výsledků předběžného testu). Testovaný vzorek se dávkuje formou roztoku do jednotlivých testovacích nádob. Množství testovaného roztoku je minimálně 200 ml na jedince, nebo 1g hmotnosti testovaných ryb na 1 litr roztoku.

#### **3.1.4.1 Předběžný test**

Předběžný test sestává ze 7 koncentrací testované látky, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací testované látky se nasadilo 3 ks  $\text{Pd}_{1/2}$  resp. 5 ks  $\text{K}_1$ . Stejným způsobem se nasadila kontrola. Testovací látka se dávkovala ve formě roztoku, podrobný rozpis přípravy zásobních roztoků a jejich dávkování je uvedeno v pracovním protokolu. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 48 hodinách se ryby přelovily do čerstvě připravených a vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Po ukončení testu se změřila délka těla (od tlamy ke kořenu ocasu) a váha u 10 % k testu použitých ryb a zaznamenala se do pracovního protokolu. Na základě výsledků tohoto testu byla stanovena koncentrační řada pro základní test.

#### **3.1.4.2 Základní test**

Základní test sestával ze 7 různých koncentrací testované látky v rozmezí stanoveném v předběžném testu. Příprava koncentrační řady byla provedena stejným způsobem jako v předběžném testu. Do připravených koncentrací o objemu 20 litrů se nasadily po 10 ks  $\text{Pd}_{1/2}$  resp. 10 kusech  $\text{K}_1$  a stejným způsobem se připravila kontrola. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 48 hodinových intervalech se ryby přelovily do čerstvě připravených



a vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Po ukončení testu se změřila délka těla (od tlamy ke kořenu ocasu) a váha u 10 % k testu použitých ryb a zaznamenala se do pracovního protokolu.

Postup a způsob usmrcování testovacích ryb po ukončení testu: po ukončení testu jsou jedinci, kteří přežijí (s výjimkou ryb v kontrolní skupině), usmrceni oxidem uhlíčitým vyrobeným v sifonové láhvi. Usmrcení je provedeno bezprostředně po skončení testu osobou způsobilou podle § 17 zákona ČR č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

#### *Platnost testu (validace)*

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,
- část kontrolních ryb, vykazujících nezvyklé chování nepřekročila 10 % nebo u jedné ryby na nádrž, pokud je použito méně než 10 kusů ryb.

#### *Vyhodnocení testu*

V průběhu testu byla sledována a zaznamenává mortalita (viz tabulka v Příloze č. 1,3,5,7) ryb a výsledky byly vyhodnoceny probitovou analýzou s využitím výpočetní techniky (Program Eko - Tox 5.1).

### **3.2 Biochemické a hematologické vyšetření krve**

Hodnoty jednotlivých biochemických a hematologických ukazatelů ryb jsou silně ovlivňovány endogenními a exogenními faktory. Aby byl vyloučen vliv stresu při odběru, tak odběr krve pro hematologické a biochemické vyšetření se provádí zásadně bezprostředně po vylovení ryb z vodního prostředí, ve kterém jsou chovány. Základním

kritériem pro volbu odběrové metody jsou velikostní rozměry ryb, nároky na množství krve a v neposlední řadě i další osud ryb, odlovovaných pro různá vyšetření (Svobodová et al., 1986).

#### *Průběh testu pro biochemické a hematologické vyšetření krve*

Pro stanovení biochemického a hematologického profilu krve pstruha duhového a kapra obecného po působení pesticidu na bázi triazinů Sencor 70 WG byly ryby vystaveny 96 hodinovému působení 96hLC50 (pro pstruha 89,3 mg.l<sup>-1</sup> a kapra 250,2 mg.l<sup>-1</sup>). Hodnota 96hLC50 byla stanovena akutním testem toxicity.

Test byl proveden ve 3 akváriích (1 kontrolní a 2 pokus) o objemu 200 litrů. Do testu bylo nasazeno 20 kusů kontrolních ryb a 40 kusů ryb pokusných.

Ke stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného byly použity ryby o průměrné hmotnosti 480,67 g (265 - 695 g) a průměrné celkové délky těla 307 mm (280 - 340 mm).

Pro stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy pstruha duhového byly použity ryby o průměrné hmotnosti 290,33 g (270 - 325 g) a průměrné celkové délky těla 308 mm (290 - 331 mm).

Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 24 hodinových intervalech se ryby přelovily do čerstvě připravených a vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu testu se sledovala a zaznamenávala 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 délka těla (od tlamy ke kořenu ocasu) a váha použitých ryb v testu.

#### **3.2.1 Odběr krve**

U většiny ryb je krve objektivně tak málo (1 - 2 % hmotnosti), že i minimální reprezentativní krevní volumen k vyšetření lze hledat jen v centrálním úseku cirkulačního ústrojí, tj. v srdci. Získání potřebného množství krve umožňuje metoda krevního náběru vnější punkcí srdce pomocí heparinizované injekční jehly o průsvitu do 0,5 mm.

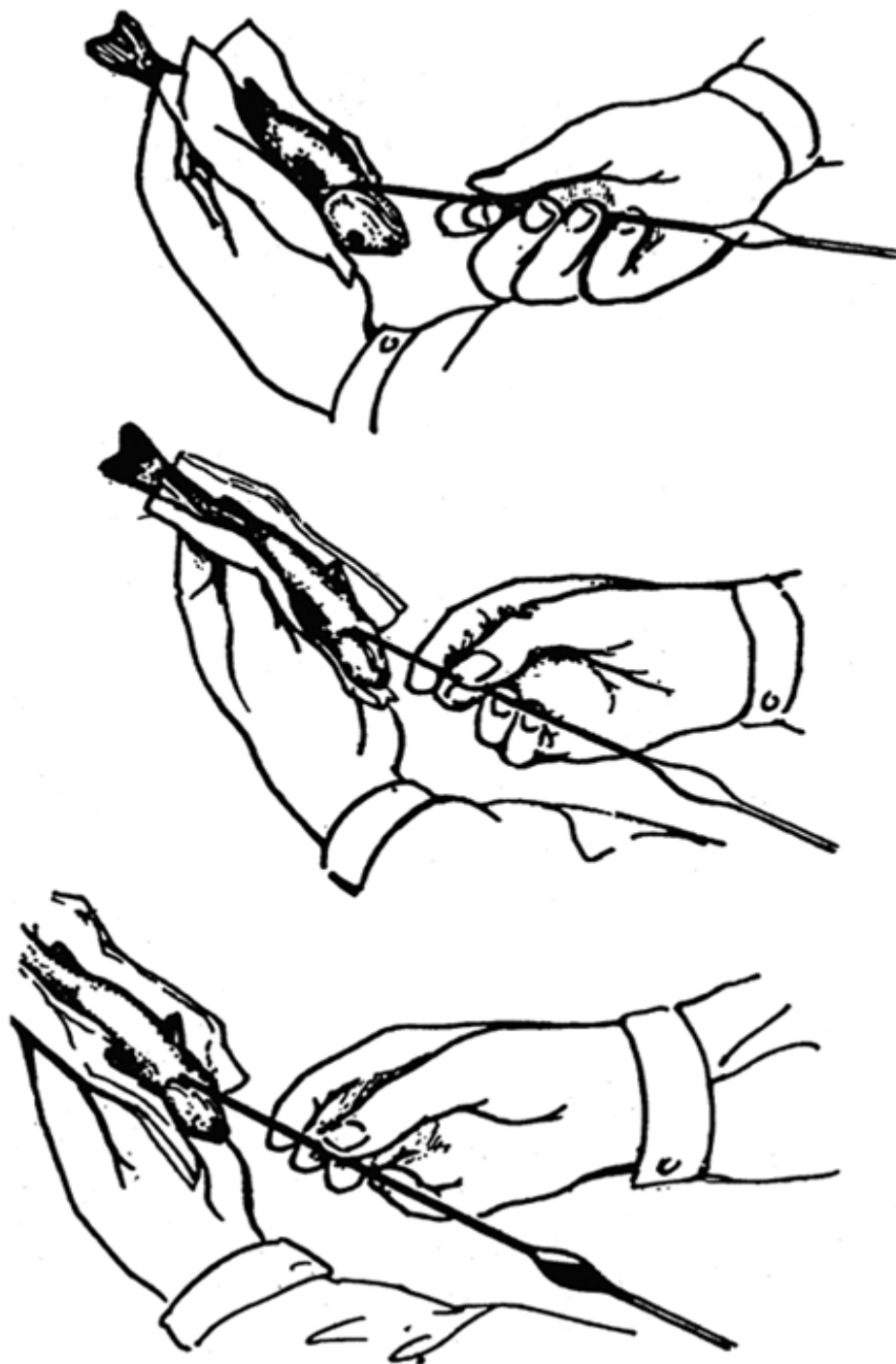
Při heparinizaci je nutné dbát na to, aby heparin vytvořil pouze jemný film na vnitřních stěnách jehly.

Vlastní náběh krve byl proveden tak, že se ryba po vylovení z vody rychle fixuje čtvercem papírové vaty za její hřbetní část. Ventrální část trupu musí být volně přístupná. V této poloze se pak prsty jedné ruky fixuje po celou dobu odběrového zákroku. Poté se druhou rukou otře krajina srdeční smotkem papírové vaty do sucha. Ryba fixována v poloze hlavou dolů se pozvedne do úrovně očí a druhou rukou se nasadí hrot jehly pod úhlem asi 60° k podélně ose těla cca 1 - 2 mm kraniálně od středového místa, jež je průsečíkem podélné roviny těla a spojnicí kraniálních okrajů báze obou prsních ploutví. U kapřího plůdku je v tomto bodu patrné tzv. „stigma“ v podobě mělké a zpravidla pigmentované prohlubně kůže o průměru do 1 mm. Poté se energickým vpichem zavede hrot jehly přes tělní stěnu do osrdečníku a dále do srdce (obr. 4). Spolehlivým dokladem nabodnutí některé ze srdečních dutin je, že se v jehle objeví krev. Nedojde-li k samovolné náplni krví hned v počáteční fázi protnutí stěny této tělní dutiny, je to zpravidla tím, že hrot jehly byl zaveden příliš hluboko do osrdečnickové dutiny a popřípadě až do její protější stěny. V takovém případě je nutno hrot jehly lehce povytáhnout zpět a případným mírným pootočením zajistit volný průchod krve jehlou. Pro dosažení některé ze srdečních dutin stačí zavést hrot jehly 3 - 4 mm hluboko pod kůži v místě vpichu. Jakmile se v ústí jehly objeví krev jehlu pustíme, čímž zaujme vlivem převážení konusu šikmou polohu a v té pak necháme samovolně odkapat potřebné množství krve do zkumavek typu Eppendorf s víčkem, které jsou pro další manipulaci s krví ryb mimořádně vhodné (Svobodová et al., 1986).

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

Odebraná krev byla odstředěna v chlazené odstředivce. Po centrifugaci krve a uložena v mrazicím boxu při teplotě - 85°C.

Obr. 4: Odběr krve punkcí ze srdce.



### 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 0,75 ml krve. 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 tzv. normály u kapra, podle Svobodové et al.(1986).

#### *Glukóza (GLU)*

Glukóza je hlavní zdroj energie. Zvýšená koncentrace glukózy v krvi je u ryb indikátorem stresu, nádoru dřeně nadledvin. Výrazné snížení glukózy indikuje akutní selhání jater a to tím že dojde k náhlému vyčerpání glykogenu.

Koncentrace glukózy v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2 - 5 mmol.l<sup>-1</sup>.

#### *Celkové bílkoviny (TP)*

Koncentrace celkové bílkoviny v plazmě zahrnuje všechny bílkoviny, které se nacházejí ve vodné fázi krve. U zdravého organismu tvoří hlavní jednoduchou složku albumin (ALB) a zbývající proteiny jsou alfa, beta a gama globuliny. Stanovením je sledováno poškození funkce ledvin a jater, je jedním z ukazatelů kondice ryb. Zvýšení TP indikuje poškození plazmatických buněk ledvin a jater. Snížení indikuje dlouhodobě probíhající infekci, silné vnitřní krvácení.

Koncentrace celkových bílkovin v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 20 - 40 g.l<sup>-1</sup>.

#### *Triglyceridy (TRIG)*

Triglyceridy bývají přítomny v předkládaném krmivu a jsou také syntetizovány v játrech, převážně z karbohydrátů poskytujících sekundární zdroj energie. Jsou sklado-

vány v tukové tkáni. Stanovením TRIG zjišťujeme abnormality v metabolismu tuků.

Koncentrace triglyceridů v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1 - 4 mmol.l<sup>-1</sup>.

#### *Amoniak (NH<sub>3</sub>)*

Amoniak je katabolický produkt trávení a metabolismu bílkovin u ryb a je extrémně toxický. V játrech je detoxikován vazbou na kyselinu alfa-ketoglutarovou, za vzniku kyseliny glutamové a glutaminu. Ty jsou krevní cestou odváděny do žaber, kde se desaminací uvolní amoniak a ten je vylučován žábry. Kyselina alfa-ketoglutarová se vrací do jater. Hladina amoniaku v krevní plazmě ryb je velmi variabilní, je silně ovlivněna působením různých endogenních a exogenních faktorů. Navíc v důsledku vysoké aktivity proteolytických enzymů u ryb dochází k rychlému postmortálnímu uvolňování amoniaku v krvi.

Koncentrace amoniaku v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 200 - 800 μmol.l<sup>-1</sup>.

#### *Alanin aminotransferáza (ALT)*

Dříve známá jako glutamát pyruvát transamináza (GPT). Enzym specifický pro játra. ALT je cytoplasmatický enzym lokalizovaný především v jaterní buňce, do krevního oběhu je vyplaven při zvýšení permeability hepatocytární membrány. Stanovením ALT je sledováno poškození jater. Zvýšení hladiny ALT indikuje toxické poškození jater a akutní a subakutní nekrózu jater a metabolické vady s participací jater.

Koncentrace alanin aminotransferázi v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 0,05 - 0,32 μkal.l<sup>-1</sup>.

#### *Aspartát aminotransferáza (AST)*

Dříve známá jako glutamát oxaloacetáttransamináza (GOT). AST se nachází v mitochondriích (70%) a cytoplasmatické tekutině (30%) uvnitř buněk. Enzym AST se vyskytuje v řadě orgánů: játrech, kosterním svalstvu, ledvinách a v erytrocytech. Nejaktivnější je tento enzym v játrech a svalových buňkách. Cytoplasmatický isoenzym AST

je do krevního oběhu vyplaven při zvýšení permeability hepatocytární membrány, zatímco uvolnění mitochondriálního AST provází hepatocelulární nekrózu. Stanovením AST indikuje diagnózu onemocnění jater a kosterní svaloviny. Pro poruchy jater sám o sobě není specifický, ale je charakteristický pro diagnostiku svalové tkáně.

Koncentrace aspartát aminotransferázi v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 0,25 - 3,50  $\mu\text{kal.l}^{-1}$ .

#### *Laktát dehydrogenáza (LDH)*

Laktát dehydrogenáza je všudypřítomný cytoplazmatický enzym, který není pro jaterní parenchym specifický, je však důležitý při diferenciální diagnostice poškození jater. Stanovením LDH je sledováno poškození jater, kosterní a srdeční svaloviny a některých nádorových onemocnění. Zvýšení LDH 10 až 20krát (s tím že  $\text{LDH} > \text{AST} > \text{ALT}$ ) indikuje akutní selhání jater, hepatodystrofii a toxické poškození jater.

Koncentrace laktát dehydrogenázi v krevní plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2,25 - 4,50  $\mu\text{kal.l}^{-1}$ .

Dále byly použity biochemické ukazatele u kterých nebyly stanoveny normály.

#### *Kreatin kináza (CK)*

Maximální koncentrace CK je dosaženo 6 hodin po poškození tkáně. Poločas odbourání je cca 15 hodin. U ryb ve špatné kondici nastává zvýšení až za 8 – 16 hodin, s maximem za 24 hodin. CK je indikátor poškození svaloviny (zhmoždění svalů, progresivní svalové dystrofie, hemofilie) a velké tělesné námahy a intoxikace

#### *Alkalická fosfatáza (ALP)*

Podstatná část jaterní ALP se nachází v buněčných membránách výstelky žlučových cest. Nejvyšší koncentrace jsou nalézány v ledvinách, mukóze tenkého střeva a osteoblastech. Stanovení ALP indikuje nemoci jater zahrnující biliární systém. Zvýšení hodnoty ALP může způsobit podávání léků (antibiotik, anabolik, kolchicinu), naopak snížení můžou působit fluoridy, fenylalanin, cystein. Zvýšení ALP indikuje poškození jater, choroby kostí - rachitidu (vzestup ALP se projeví před klinickou manifestací), os-

teomalacii; poruchy metabolismu fosforu. Snížení indikuje toxické poškození jater chlo-  
rovanými uhlovodíky, dlouhodobé hladovění, anémii.

#### *Anorganický fosfát (PHOS)*

Fosfor je prvek, který hraje hlavní roli jako metabolický prostředník a je součástí nukleových kyselin, fosfolipidů a nukleotidů. Fosfáty jsou také důležitou součástí pufrujících systémů uvnitř tkáňových tekutin. PHOS je důležitý indikátor těžkého poškození ledvin.

#### *Kalcium ( $Ca^{2+}$ )*

Kalcium je esenciální prvek, který je součástí mnoha tělních systémů. Tyto zahrnují skelet, enzymatickou aktivitu, svalový metabolismus, srážení krve a osmoregulaci. V krvi je kalcium v ionizované a na bílkovinu vázané formě. V plazmě je 40 – 45% vápníku vázáno na bílkoviny, 50% ionizovaného a 5 – 10% v komplexu s kyselinami. Ionizované Ca má význam hlavně pro neuromuskulární dráždění. Snížení vápníku má za následek vyšší dráždivost a zároveň snížení síly svalové kontrakce. Vyšetření vápníku v plazmě patří mezi základní vyšetření při onemocnění kostního systému. Je třeba si uvědomit, že hladina celkového kalcia nemusí být ještě změněna, přitom biologicky aktivní forma ionizovaného vápníku  $Ca^{2+}$  již změněna je. Snížení vápníku indikuje osteomalacii, osteoblastický tumor, defekty metabolismu Ca.

Biochemické ukazatele v krevní plazmě byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistika 8.0 analýzou variance (ANOVA - Tuckey test).

### **3.2.3 Stanovení hematologických ukazatelů**

#### *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 počít-



tání 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  $T.l^{-1}$  (Svobodová et al., 1986).

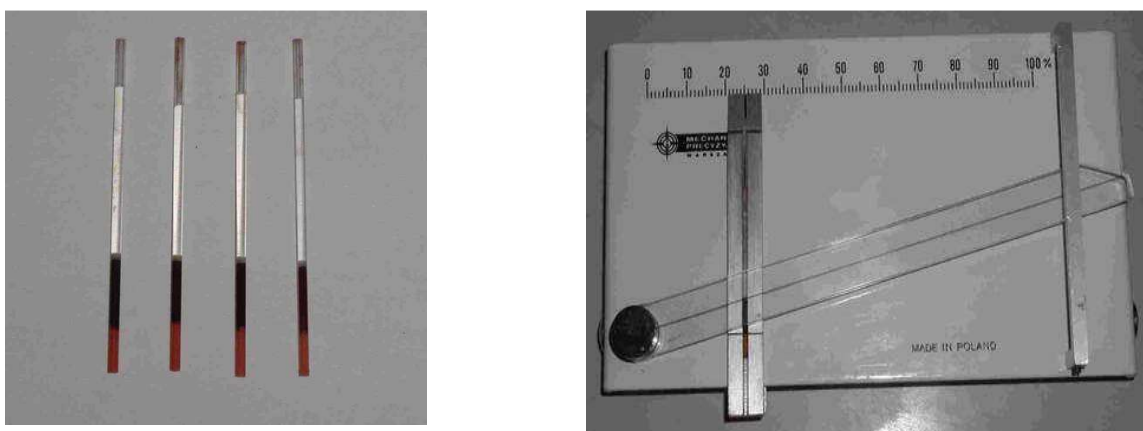
#### *Stanovení koncentrace hemoglobinu*

Ke stanovení koncentrace hemoglobinu (Hb) v krvi ryb je používána fotometrická kyanohemoglobinová metoda. Princip metody spočívá v tom, že pomocí transformačního roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a přemění se na stálý kyanohemoglobin, 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  $g.l^{-1}$  (Svobodová et al., 1986).

#### *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  $l.l^{-1}$  (Svobodová et al., 1986).

Obr. 5: Kapilárky s krví po odstředění a měření hematokritu pomocí posuvného měřítka.



#### *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:

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

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

#### *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:

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

Hodnota střední barevné koncentrace se pohybuje u kapa v rozmezí 200 – 260

$\text{g.l}^{-1}$  a u pstruhů duhových v rozmezí 170 – 200  $\text{g.l}^{-1}$  (Svobodová et al., 1986).

#### *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  $\text{g.l}^{-1}$  a z počtu erytrocytů (Er) v  $\text{T.l}^{-1}$  dle následujícího vzorce:

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

Hodnota hemoglobin erytrocytu se pohybuje u kapra v rozmezí 50 – 60 pg a u pstruhů duhových v rozmezí 65 – 75 pg (Svobodová et al., 1986).

#### *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 200 násobném 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  $\text{G.l}^{-1}$ . Počet leukocytů se u kapra pohybuje v rozmezí 10 – 80  $\text{G.l}^{-1}$  a u pstruha duhového v rozmezí 10 – 60  $\text{G.l}^{-1}$  (Svobodová et al., 1986).

Hematologické ukazatele ryb byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistika 8.0 analýzou variance (ANOVA - Tuckey test).

## 4. VÝSLEDKY

V kapitole výsledky jsou stanoveny a vyhodnoceny testy akutní toxicity pesticidu na bázi triazinů Sencor 70 WG pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) v časovém úseku 96 hodin a stanoven a vyhodnocen vliv pesticidu na biochemický a hematologický profil krve. Výsledky jsou součástí výzkumného záměru MSM 6007665809.

Výsledky a diskuse je rozdělena na dvě části a to část pstruha duhového a na část kapra obecného.

### 4.1 Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)

#### 4.1.1 Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG pro pstruha duhového

##### *Předběžný test:*

Pro předběžný test akutní toxicity byly použity koncentrace Sencoru 70 WG: 0,05 mg.l<sup>-1</sup>; 0,1 mg.l<sup>-1</sup>; 1 mg.l<sup>-1</sup>; 10 mg.l<sup>-1</sup>; 50 mg.l<sup>-1</sup>; 100 mg.l<sup>-1</sup>; 200 mg.l<sup>-1</sup>.

V každé koncentraci a kontrole byly použity 3 ks Pd<sub>1/2</sub>.

Ryby použité k předběžnému testu byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 16,22 g (10,87 – 28,46 g), průměrná celková délka těla 133 mm (93 – 148 mm). Teplota vody při testu byla 14,8 – 16,3 °C, pH 7,70 – 8,60, nasycení vody kyslíkem 83 - 100 %. Podmínky v průběhu testu jsou znázorněny v příloze tab. č. 1 a 2.

##### *Základní test:*

Pro základní test akutní toxicity byly použity koncentrace Sencoru 70 WG: 50 mg.l<sup>-1</sup>; 70 mg.l<sup>-1</sup>; 100 mg.l<sup>-1</sup>; 120 mg.l<sup>-1</sup>; 150 mg.l<sup>-1</sup>; 180 mg.l<sup>-1</sup>; 200 mg.l<sup>-1</sup>.

V každé koncentraci a kontrole bylo nasazeno 10 ks Pd<sub>1/2</sub>.

Ryby použité k testu byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 17,61 g (13,2 - 19,3 g), průměrná celková délka těla 128 mm (105 – 142 mm).

Teplota vody při testu byla 15,9 – 16,2°C, pH 7,86 – 8,24, nasycení vody kyslíkem 89 - 99 %. Podmínky v průběhu testu jsou znázorněny v příloze tab. č. 3 a 4.

#### **4.1.2 Test stanovení biochemického a hematologického profilu u pstruha duhového**

Pro test stanovení biochemického a hematologického profilu u pstruha duhového byla použita koncentrace 96hLC50 Sencoru 70 WG získaná v základním testu.

K pokusům stanovení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemický a hematologický profil byli použiti pstruzi o průměrné hmotnosti 290,33 g (270 - 325 g) a průměrné celkové délky těla 308 mm (290 - 330 mm).

Teplota vody při testu byla 15,7 – 16,2 °C, pH 7,96 – 8,26, nasycení vody kyslíkem 88 - 98 %.

Obr. 6 Akutní test se pstruhy duhovými (*Oncorhynchus mykiss*).



#### 4.1.3 Vyhodnocení testů akutní toxicity LC 50 za 96 hodin u pstruha duhového

Mortalitu pokusných ryb zobrazuje následující tabulka. V kontrolní skupině k úhynu nedošlo.

Koncentrace mg.l <sup>-1</sup>	Mortalita %
Kontrola	0
50	0
70	30
100	40
120	90
150	100
180	100
200	100

Výsledky byly vyhodnoceny probitovou analýzou v programu Eko – Tox 5.1.

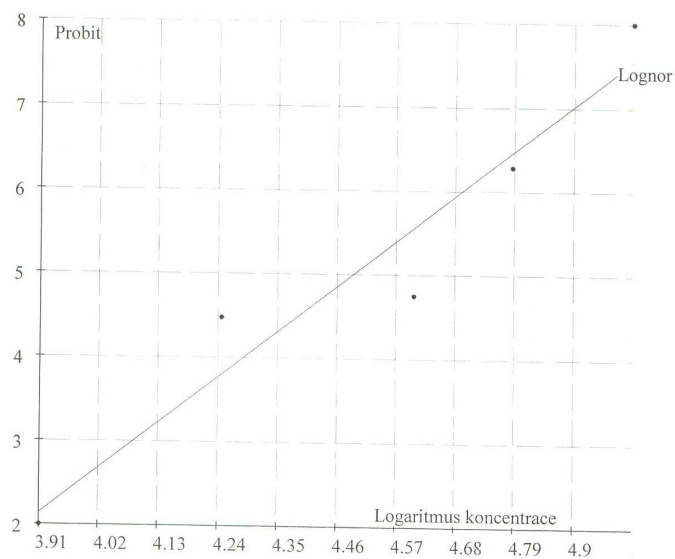
**96hLC 50 = 89,3 mg.l<sup>-1</sup> s 95% intervalem spolehlivosti (-18,5; +13,3)**

96hLC 0 = 48,6 mg.l<sup>-1</sup>

96hLC 100 = 164,1 mg.l<sup>-1</sup>

Výsledky základního testu pro pstruha duhového: 96hLC50 je 89,3 mg.l<sup>-1</sup> Sencoru 70 WG

Graf č. 1: Test akutní toxicity Sencoru 70 WG u pstruha duhového za 96 hodin.



Změny v chování ryb po působení přípravku na bázi triazinů nastávají již hodinu po započítí testu. Ryby ztrácejí koordinaci pohybů, objevují se trhavé pohyby, výjezdy k hladině a převracení na bok. Následuje velmi dlouhá fáze útlumu, zpomalují se dýchací pohyby skřelí, ryba leží na boku a následně hyne.

Obr. 7: Pstruh duhový: horní kontrolní ryba, spodní ryba - kde byla diagnostikovány typické příznaky triazinů.



#### ***4.1.4 Stanovení biochemického profilu krevní plazmy pstruha duhového***

Po ukončení testu akutní toxicity byl proveden test stanovení biochemického a hematologického profilu krve skupiny pstruhů kontrolních (15 kusů) a skupiny pstruhů pokusných (15 kusů). Pokusná skupina byla vystavena 96 hodinovému působení pesticidu na bázi triazinů Sencor 70 WG v koncentraci  $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Po 96 hodinovém působení byl proveden odběr krve kontrolní a pokusné skupiny ryb. Po ukončení testu stanovení biochemického a hematologického profilu krve byla provedena pitva ryb. Výsledky pitvy jsou znázorněny na obrázku č. 7. Bylo zjištěno zvýšené zahlenění povrchu těla hlenem vodnaté konzistence, ryby měly tmavou barvu oproti kontrolní skupině. Tělní dutina byla zvětšená a obsahovala transudát. V dutině tělní byl zjištěn výraznější nástřik cév vnitřních orgánů.

K pokusům stanovení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemický a hematologický profil krve byly použity pstruzi o průměrné hmotnosti 290,33 g (270 - 325 g) a průměrné celkové délky těla 308 mm (290 - 330 mm). Teplota vody při testu byla 14,1

– 14,4 °C, pH 7,96 – 8,24, nasycení vody kyslíkem 94 - 99 %.

Obr. 8: Průběh testu.



Průběh testu stanovení biochemického a hematologického profilu pstruha duhového je zobrazen na obrázcích 8 a 9.

Obr. 9: Odběr krve kardiální punkcí.





Tab. 7: Vliv pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy u pstruha duhového.

Ukazatel	Kontrola $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)	Experiment $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)
TP (g.l <sup>-1</sup> )	48,40 ± 4,90 <sup>a</sup>	24,40 ± 9,73 <sup>b</sup>
TRIG (mmol.l <sup>-1</sup> )	0,60 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,13 <sup>b</sup>
GLU (mmol.l <sup>-1</sup> )	3,97 ± 0,67 <sup>a</sup>	4,69 ± 2,67 <sup>a</sup>
NH <sub>3</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )	807,67 ± 100,88 <sup>a</sup>	560,53 ± 71,07 <sup>b</sup>
AST (μkat.l <sup>-1</sup> )	5,33 ± 1,39 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,94 <sup>b</sup>
ALT (μkat.l <sup>-1</sup> )	0,28 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,56 ± 2,58 <sup>a</sup>
LDH (μkat.l <sup>-1</sup> )	31,09 ± 4,89 <sup>a</sup>	32,16 ± 3,31 <sup>a</sup>
ALP (μkat.l <sup>-1</sup> )	0,94 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,17 <sup>b</sup>
CK (μkat.l <sup>-1</sup> )	23,48 ± 5,16 <sup>a</sup>	25,20 ± 4,83 <sup>a</sup>
PHOS (mmol.l <sup>-1</sup> )	4,31 ± 0,59 <sup>a</sup>	3,97 ± 1,04 <sup>a</sup>
Ca <sup>2+</sup> (mmol.l <sup>-1</sup> )	3,11 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,39 <sup>b</sup>

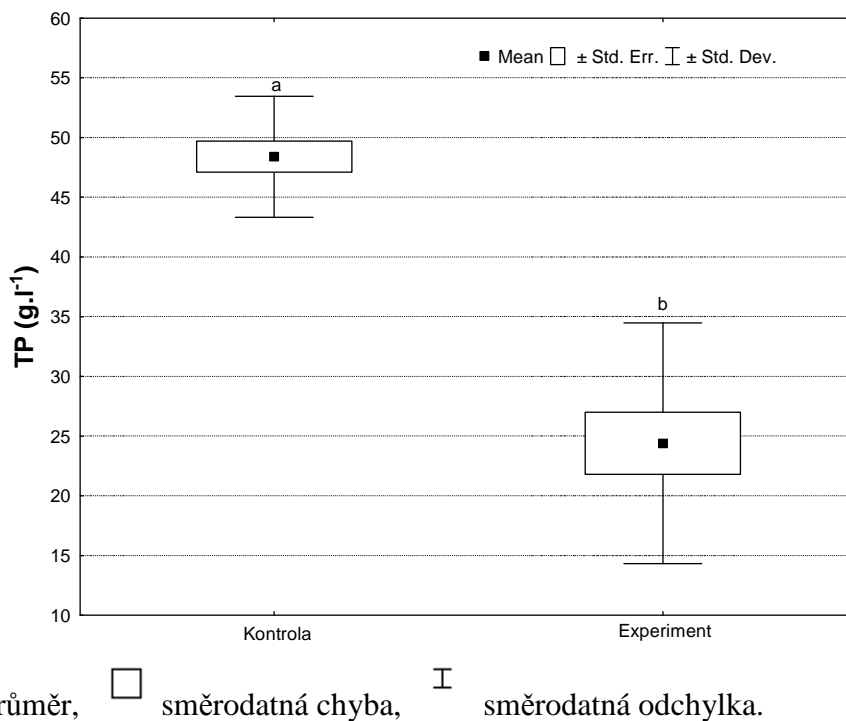
Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA  $p < 0,01$ ).

#### 4.1.5 Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy pstruha duhového

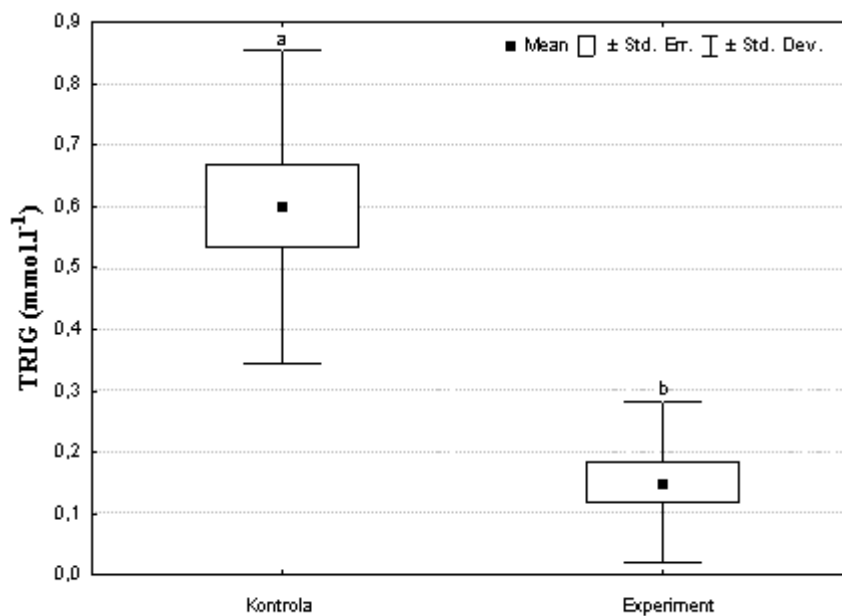
Výsledky biochemického profilu krve kontrolních a pokusných pstruhů duhových jsou znázorněny v tabulce č.7. U experimentální skupiny pstruhů duhových, která byla vystavena akutnímu působení pesticidního přípravku na bázi metribuzinu došlo k signifikantnímu snížení ( $p < 0,01$ ) celkových bílkovin (Graf č.2), triglyceridů (Graf č. 3), aspartát aminotransferázy (Graf č. 4), amoniaku (Graf č. 5), alkalické fosfatázy (Graf č. 6) a kalcia (Graf č. 7) v krevní plazmě oproti kontrolní skupině.

U ostatních sledovaných ukazatelů (GLU, ALT, LDH, CK, PHOS) nebyly zaznamenány mezi skupinou kontrolních a pokusných ryb statisticky významné rozdíly.

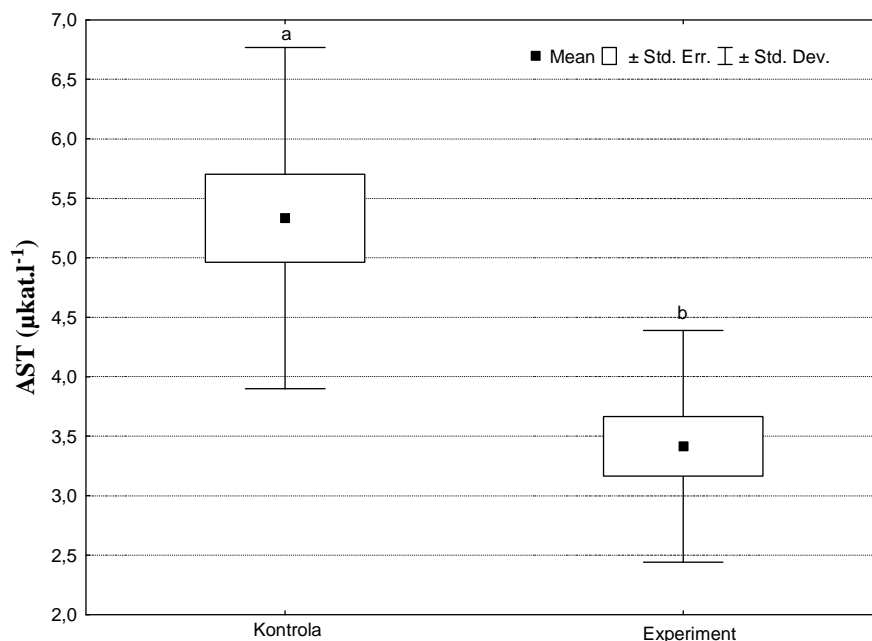
Graf 2: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (89,3 mg.l<sup>-1</sup>) na hladinu celkových bílkovin v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



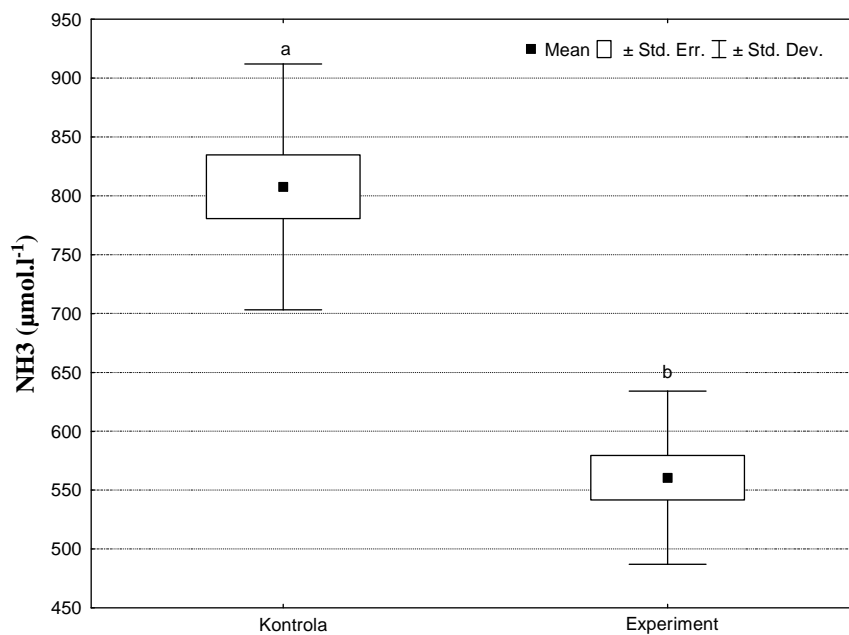
Graf 3: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (89,3 mg.l<sup>-1</sup>) na hladinu triglyceridů v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



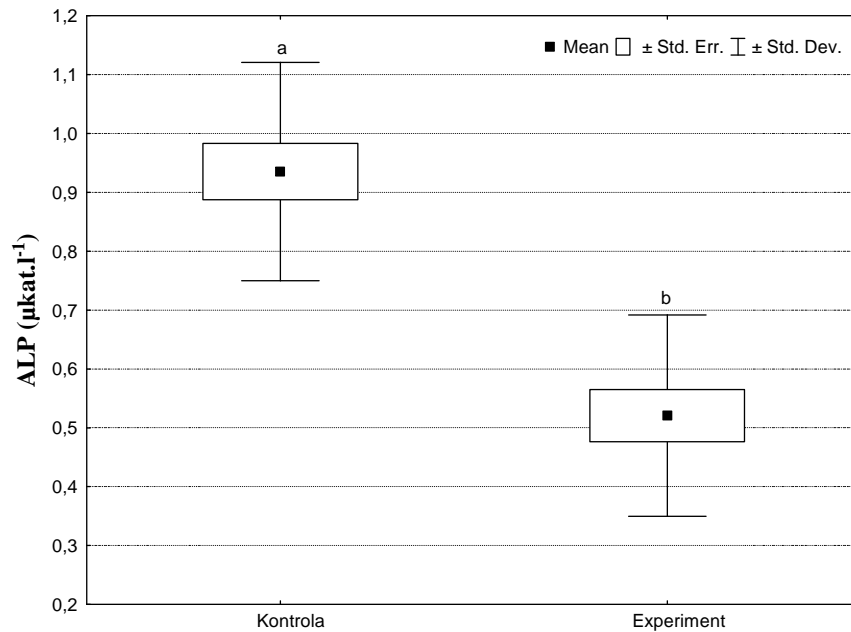
Graf 4: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na koncentraci aspartát aminotransferázy v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



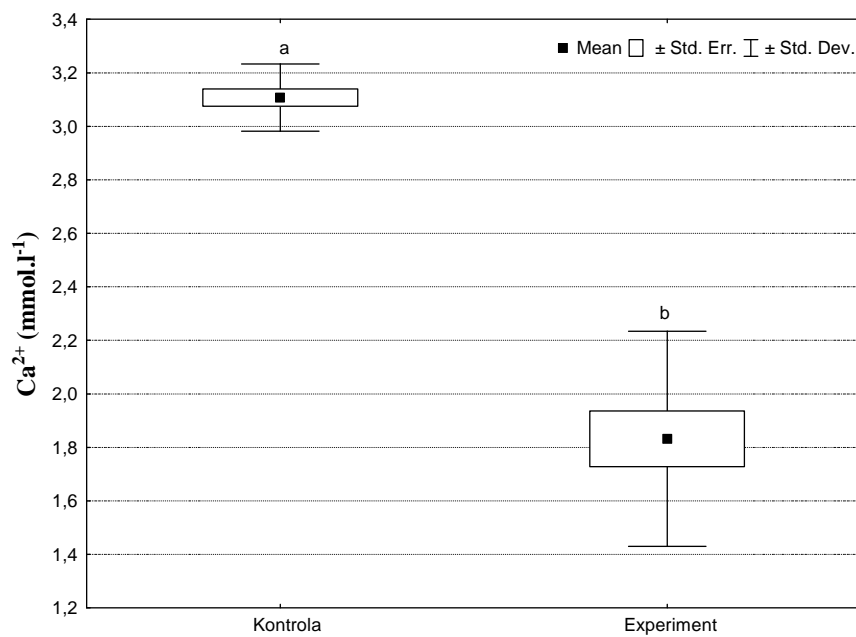
Graf 5: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na koncentraci amoniaku v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 6: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (89,3 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci alkalické fosfatázy v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 7: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (89,3 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci kalcia v krevní plazmě pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



#### 4.1.6 Stanovení hematologického profilu pstruha duhového

Tab. 8: Vliv pesticidu Sencor 70 WG na hematologické ukazatele krevní plazmy u pstruha duhového.

Ukazatel	Kontrola $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)	Experiment $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)
Er ( $T \cdot l^{-1}$ )	$1,53 \pm 0,21^a$	$1,19 \pm 0,22^b$
Hb ( $g \cdot l^{-1}$ )	$50,77 \pm 5,73^a$	$46,23 \pm 6,77^a$
PVC ( $l \cdot l^{-1}$ )	$0,40 \pm 0,06^a$	$0,34 \pm 0,06^b$
MCV (fl)	$266,62 \pm 48,86^a$	$295,61 \pm 57,61^a$
MCH (pg)	$33,70 \pm 5,23^a$	$39,86 \pm 6,93^b$
MCHC ( $g \cdot l^{-1}$ )	$127,78 \pm 14,26^a$	$136,41 \pm 19,89^a$
Leuko ( $G \cdot l^{-1}$ )	$26,40 \pm 11,66^a$	$19,73 \pm 8,29^a$

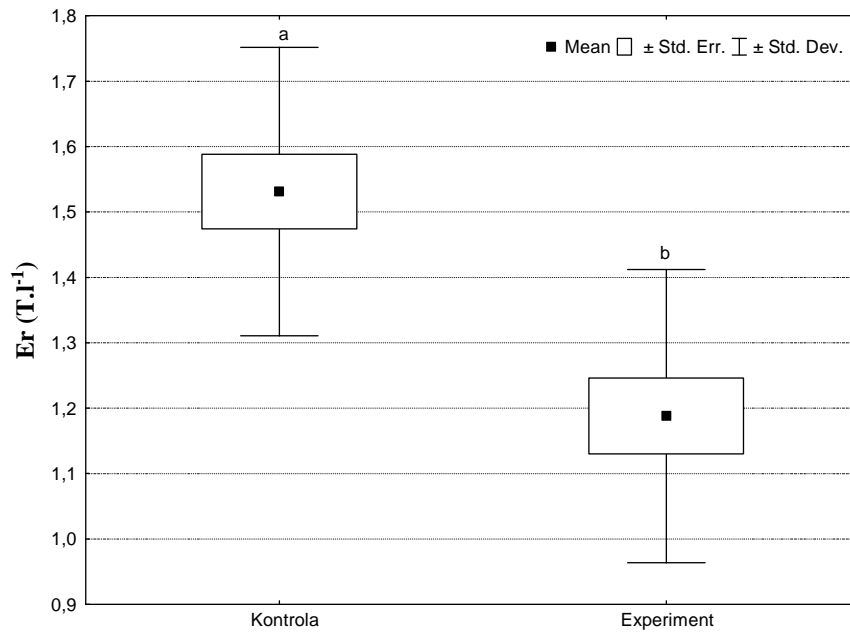
Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.7 Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na hematologické ukazatele pstruha duhového

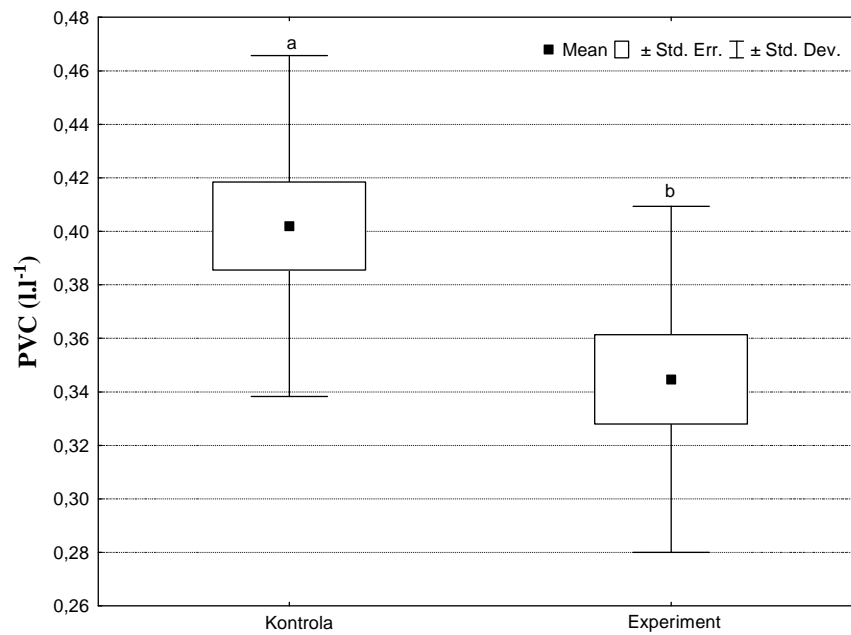
Výsledky hematologického profilu kontrolních a pokusných pstruhů duhových jsou znázorněny v tabulce č. 8. U experimentální skupiny pstruhů duhových, která byla vystavena akutnímu působení pesticidního přípravku na bázi metribuzinu došlo k signifikantnímu snížení ( $p < 0,05$ ) počtu erytrocytů (Graf č. 8), hematokritové hodnoty (Graf č. 9) a signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) hodnoty hemoglobin erytrocytu (Graf č. 10) oproti kontrolní skupině.

U ostatních sledovaných ukazatelů (Hb, MCV, MCHC, Leuko) nebyly zaznamenány mezi skupinou kontrolních a pokusných ryb statisticky významné rozdíly.

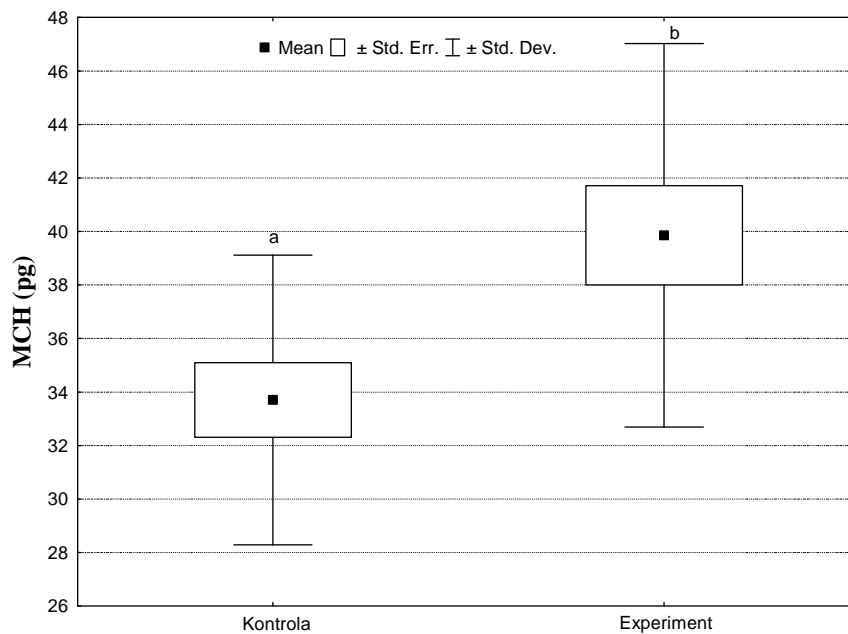
Graf 8: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na počet erytrocytů pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,05$ ).



Graf 9: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na hematokritovou hodnotu pstruha duhového (statistická významnost  $p < 0,05$ ).



Graf 10: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $89,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na hodnotu hemoglobin erytrocytu pstruha duhového. (statistická významnost  $p < 0,05$ ).



## **4.2 Kapr obecný (*Cyprinus carpio*)**

### **4.2.1 Stanovení 96hLC 50 Sencoru 70 WG pro kapra obecného**

#### *Předběžný test:*

Pro předběžný test akutní toxicity byly použity koncentrace Sencoru 70 WG: 0,1 mg.l<sup>-1</sup>; 10 mg.l<sup>-1</sup>; 50 mg.l<sup>-1</sup>; 100 mg.l<sup>-1</sup>; 200 mg.l<sup>-1</sup>; 300 mg.l<sup>-1</sup>.

V každé koncentraci a kontrole bylo použito 5 ks kapra obecného.

Ryby použité k předběžnému testu byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 21,9 g (5 - 33,1 g), průměrná celková délka těla 123 mm (95 - 138 mm). Teplota vody při testu byla 17,4 – 18,9 °C, pH 7,38 – 7,97, nasycení vody kyslíkem 92 - 99 %. Podmínky v průběhu testu jsou znázorněny v příloze tab. č. 5 a 6.

#### *Základní test:*

Pro základní test akutní toxicity byly použity koncentrace Sencoru 70 WG: 100 mg.l<sup>-1</sup>; 150 mg.l<sup>-1</sup>; 200 mg.l<sup>-1</sup>; 230 mg.l<sup>-1</sup>; 260 mg.l<sup>-1</sup>; 300 mg.l<sup>-1</sup>.

V každé koncentraci a kontrole bylo nasazeno 10 ks K<sub>1</sub>.

Ryby použité k testu byly homogenní a dobrého zdravotního stavu. Průměrná hmotnost ryb byla 22,27 g (6,0 – 32,1 g), průměrná celková délka těla 129 mm (105 – 148 mm).

Teplota vody při testu byla 17,8 – 19,5°C, pH 7,50 – 8,03, nasycení vody kyslíkem 87 - 100 %. Podmínky v průběhu testu jsou znázorněny v příloze tab. č. 7 a 8.

### **4.2.2 Test stanovení biochemického a hematologického profilu kapra obecného**

Pro test stanovení biochemického a hematologického profilu u kapra obecného byla použita koncentrace 96hLC50 Sencoru 70 WG získaná v základním testu.

Ke stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného po působení Sencoru 70 WG byly použity ryby o průměrné hmotnosti 480,67 g (265 - 695 g) a průměrné celkové délky těla 307 mm (280- 340 mm).

Teplota vody při testu byla 17,8 – 19,4 °C, pH 7,61 – 8,04, nasycení vody kys-



líkem 94 - 99 %.

#### 4.2.3 Vyhodnocení testů akutní toxicity LC 50 za 96 hodin u kapra obecného

Mortalitu pokusných ryb zobrazuje následující tabulka. V kontrolní skupině k úhynu nedošlo.

Koncentrace mg.l <sup>-1</sup>	Mortalita %
Kontrola	0
100	0
150	0
200	0
230	10
260	50
300	100

Výsledky byly vyhodnoceny probitovou analýzou v programu Eko – Tox 5.1.

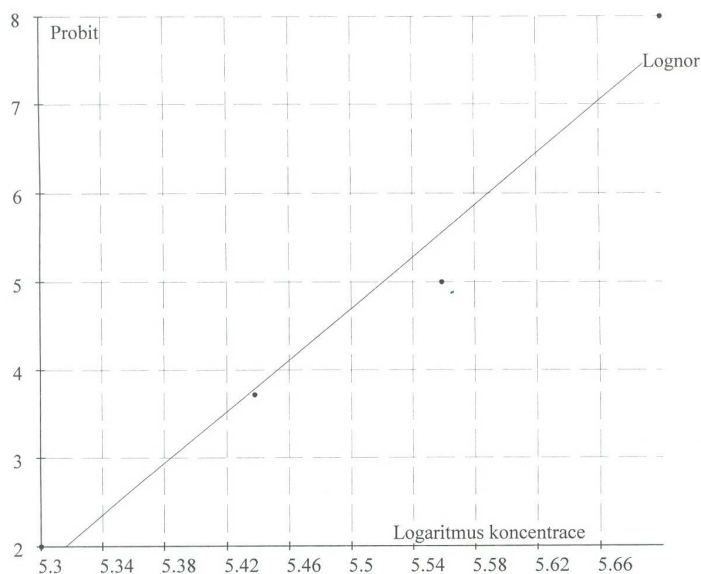
**96hLC 50 = 250,2 mg.l<sup>-1</sup> s 95% intervalem spolehlivosti (-19,5; +18,1)**

96hLC 0 = 203,3 mg.l<sup>-1</sup>

96hLC 100 = 308,0 mg.l<sup>-1</sup>

Výsledky základního testu pro kapra obecného: 96hLC50 je 250,2 mg.l<sup>-1</sup> Sencoru 70 WG

Graf 11: Test akutní toxicity Sencoru 70 WG u kapra obecného za 96 hodin.



Změny v chování ryb po působení přípravku na bázi triazinů nastávají již hodinu po započetí testu. Ryby ztrácejí koordinaci pohybů, objevují se trhavé pohyby, výjezdy k hladině a převracení na bok. Následuje velmi dlouhá fáze útlumu, zpomalují se dýchací pohyby skřelí, ryba leží na boku a hyne.

Obr. 10. Kapr obecný: horní kontrolní ryba, spodní ryba - kde byly diagnostikovány typické příznaky triazinů.



#### ***4.2.4 Stanovení biochemického profilu krevní plazmy kapra obecného***

Po ukončení testu akutní toxicity byl proveden test stanovení biochemického a hematologického profilu krve skupiny kaprů kontrolních (15 kusů) a skupiny kaprů pokusných (15 kusů). Pokusná skupina byla vystavena 96 hodinovému působení pesticidu na bázi triazinů Sencor 70 WG v koncentraci 250,2 mg.l<sup>-1</sup>. Po 96 hodinovém působení byl proveden odběr krve kontrolní a pokusné skupiny ryb. Po ukončení testu stanovení biochemického a hematologického profilu krve byla provedena pitva ryb. Výsledky pitvy jsou znázorněny na obrázku č. 10. Bylo zjištěno zvýšené zahlenění povrchu těla hlenem vodnaté konzistence, ryby měli tmavou barvu oproti kontrolní skupině. Tělní dutina byly zvětšená a obsahovala transudát. V dutině tělní byl zjištěn výraznější nástřik cév vnitřních orgánů.

Ke stanovení biochemického a hematologického profilu krevní plazmy kapra obecného po působení Sencoru 70 WG byly použity ryby o průměrné hmotnosti 480,67 g (265 - 695 g) a průměrné celkové délky těla 307 mm (280- 340 mm). Teplota vody při

testu byla 17,12 – 19,4 °C, pH 7,61 – 8,04, nasycení vody kyslíkem 94 - 99 %.

Tab. 9: Vliv pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy u kapra obecného.

Ukazatel	Kontrola $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)	Experiment $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)
TP (g.l <sup>-1</sup> )	42.13 ± 4.53 <sup>a</sup>	34.07 ± 5.05 <sup>b</sup>
TRIG (mmol.l <sup>-1</sup> )	0.52 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.15 <sup>b</sup>
GLU (mmol.l <sup>-1</sup> )	4.87 ± 0.79 <sup>a</sup>	23.99 ± 5.59 <sup>b</sup>
NH <sub>3</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )	292.20 ± 109.19 <sup>a</sup>	462.33 ± 85.55 <sup>b</sup>
AST (μkat.l <sup>-1</sup> )	2.11 ± 1.02 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.51 <sup>a</sup>
ALT (μkat.l <sup>-1</sup> )	0.47 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>a</sup>
LDH (μkat.l <sup>-1</sup> )	6.14 ± 1.20 <sup>a</sup>	4.37 ± 1.38 <sup>b</sup>
ALP (μkat.l <sup>-1</sup> )	0.20 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.06 <sup>a</sup>
CK (μkat.l <sup>-1</sup> )	14.35 ± 0.72 <sup>a</sup>	13.94 ± 0.58 <sup>a</sup>
PHOS (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.94 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.24 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup> (mmol.l <sup>-1</sup> )	2.26 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.15 <sup>b</sup>

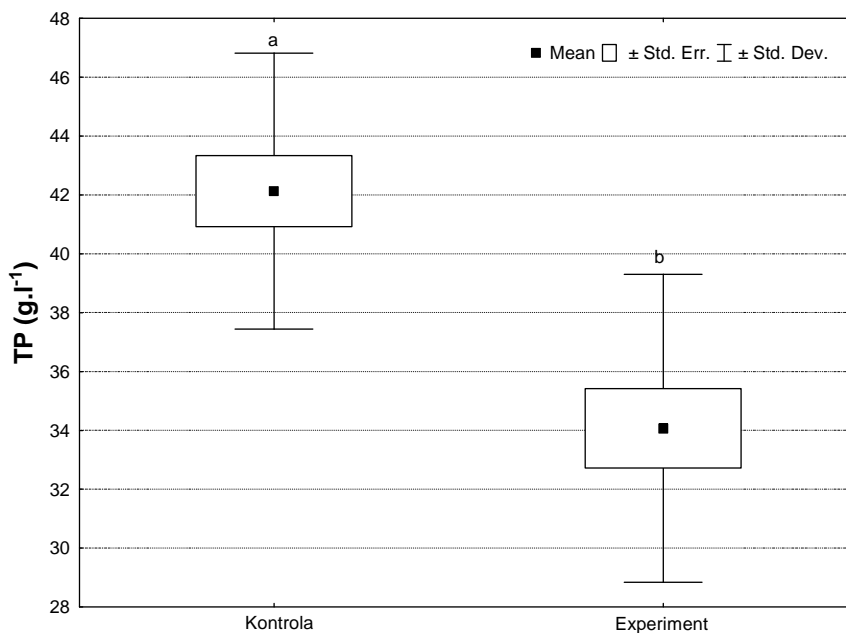
Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.5 Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy kapra obecného

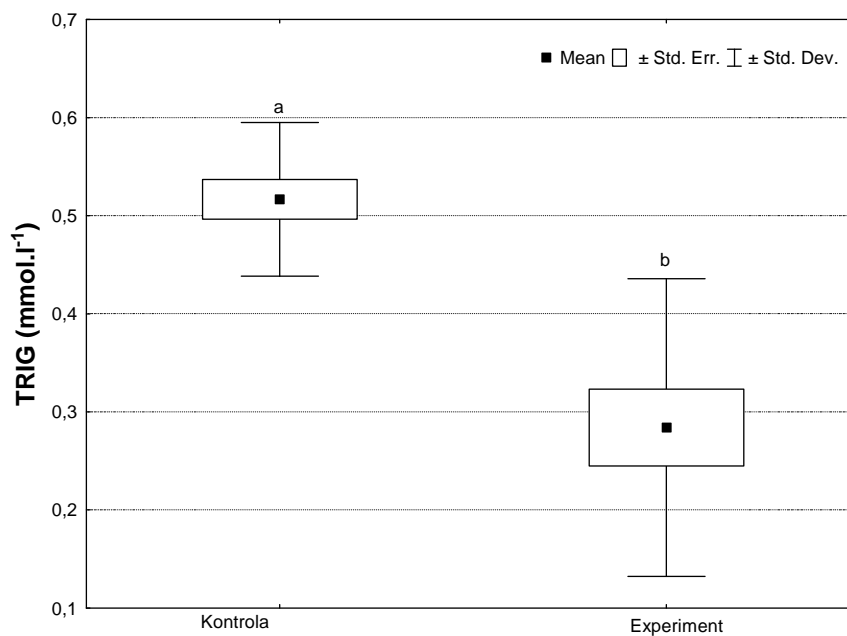
Výsledky biochemického profilu krve kontrolních a pokusných kaprů jsou znázorněny v tabulce č. 7. Experimentální skupina kaprů obecných vystavená akutnímu působení pesticidního přípravku na bázi metribuzinu ukázala signifikantní snížení ( $p < 0,01$ ) celkových bílkovin (Graf č.12), triglyceridů (Graf č. 13), laktát dehydrogenázy (Graf č. 14), kalcia (Graf č. 15), anorganického fosfátu (Graf č. 16) a signifikantní zvýšení ( $p < 0,01$ ) koncentrace glukózy (Graf č. 17) a amoniaku (Graf č. 18), v krevní plazmě oproti kontrolní skupině.

U ostatních sledovaných ukazatelů (ALT, AST, ALP, CK) nebyly zaznamenány mezi skupinou kontrolních a pokusných ryb statisticky významné rozdíly.

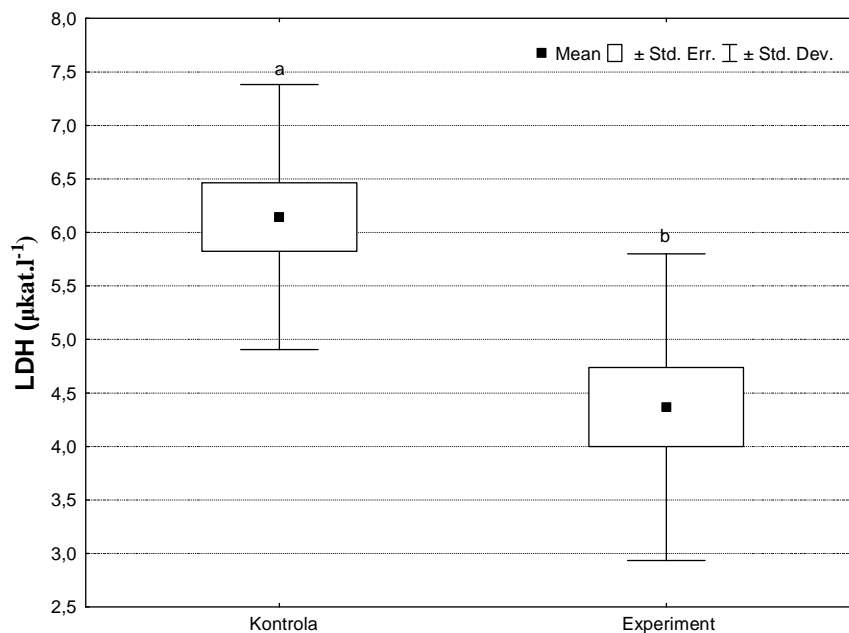
Graf 12: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $250,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na hladinu celkových bílkovin v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



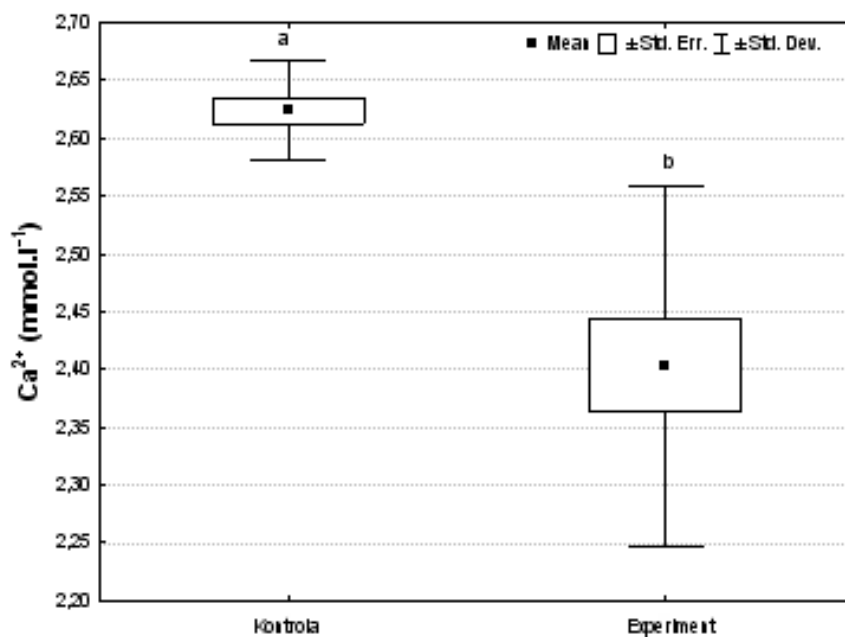
Graf 13: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $250,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na hladinu triglyceridů v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



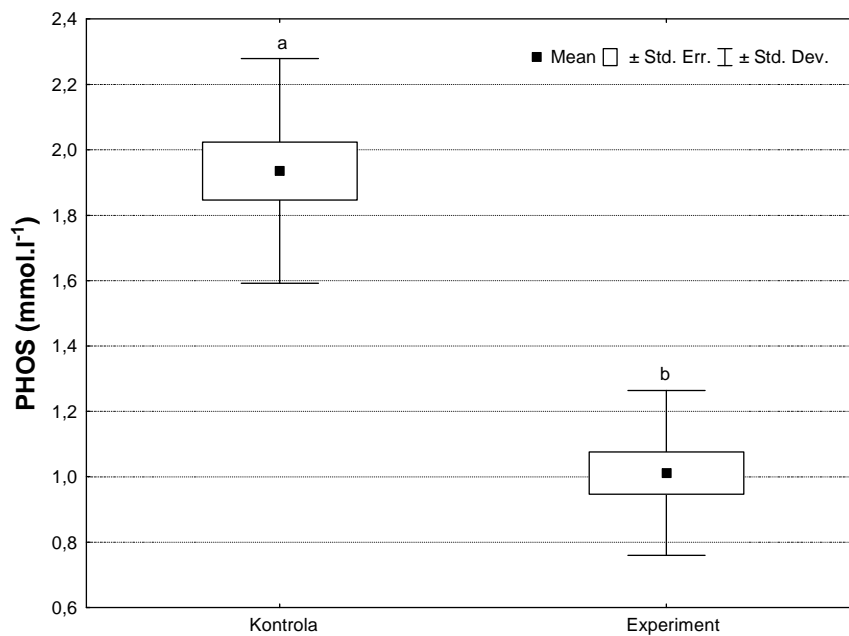
Graf 14: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na aktivitu laktát dehydrogenázy v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



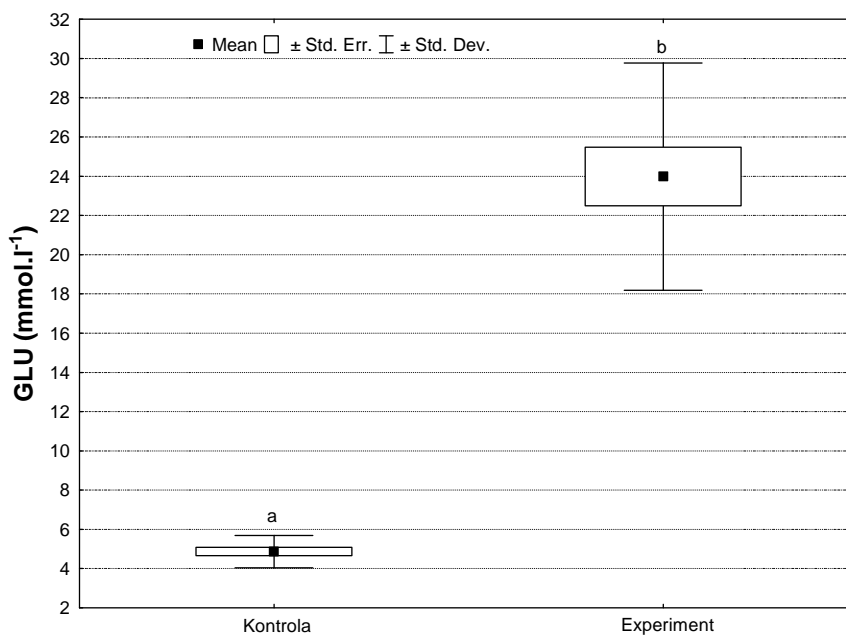
Graf 15: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci kalcia v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



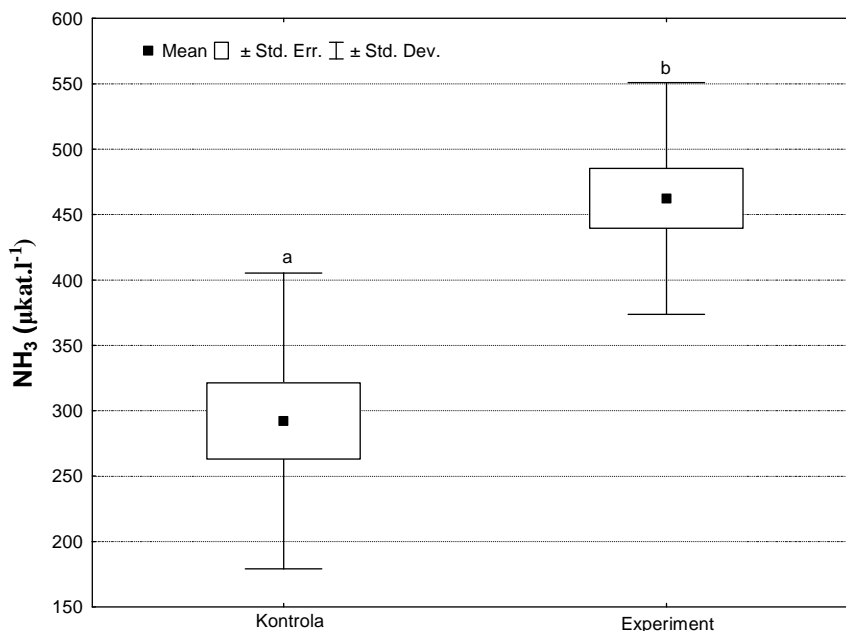
Graf 16: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $250,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na koncentraci anorganického fosfátu v krevní plazmě kapra obecného. (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 17: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $250,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na koncentraci glukózy v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 18: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci amoniaku v krevní plazmě kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



#### 4.2.6 Stanovení hematologického profilu kapra obecného

Tab. 10: Vliv pesticidu Sencor 70 WG na biochemické ukazatele krevní plazmy u kapra obecného.

Ukazatel	Kontrola $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)	Experiment $\bar{x} \pm SD$ (n = 15)
Er (T.l <sup>-1</sup> )	1.78 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.31 <sup>a</sup>
Hb (g.l <sup>-1</sup> )	84.29 ± 14.73 <sup>a</sup>	70.81 ± 18.36 <sup>b</sup>
PCV (l.l <sup>-1</sup> )	0.33 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>b</sup>
MCV (fl)	189.52 ± 30.43 <sup>a</sup>	165.63 ± 25.76 <sup>b</sup>
MCH (pg)	48.34 ± 8.81 <sup>a</sup>	43.92 ± 12.58 <sup>a</sup>
MCHC (g.l <sup>-1</sup> )	255.94 ± 27.17 <sup>a</sup>	269.34 ± 67.12 <sup>a</sup>
Leuko (G.l <sup>-1</sup> )	104.01 ± 33.85 <sup>a</sup>	33.60 ± 18.20 <sup>b</sup>

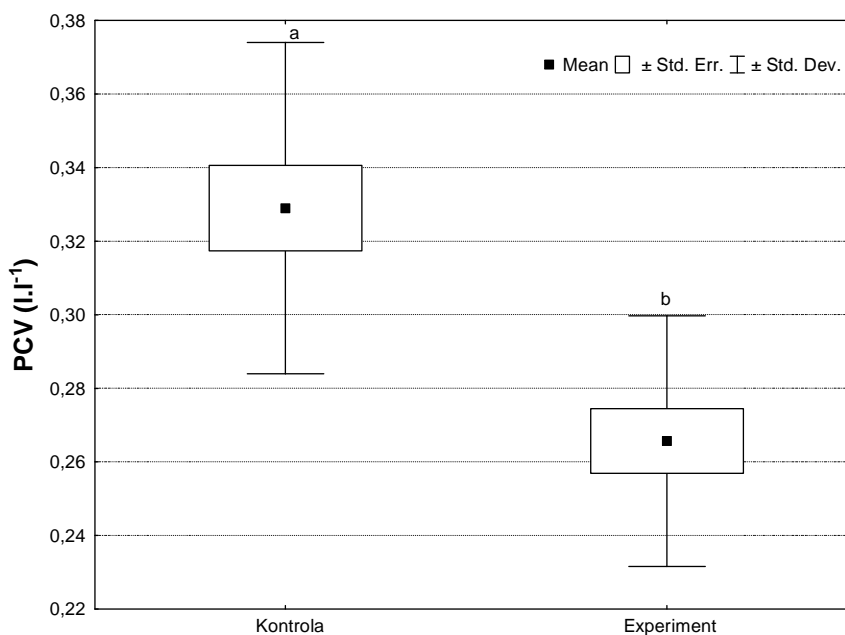
Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (ANOVA  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.7 Vyhodnocení vlivu pesticidu Sencor 70 WG na hematologické ukazatele kapra obecného

Výsledky hematologického profilu kontrolních a pokusných kaprů obecných jsou znázorněny v tabulce č. 10. U experimentální skupiny kaprů obecných, která byla vystavena akutnímu působení pesticidního přípravku na bázi metribuzinu došlo k signifikantnímu snížení ( $p < 0,01$ ) hematokritové hodnoty (Graf č. 19), koncentrace hemoglobinu (Graf č. 20), středního objemu erytrocytu (Graf č. 21) a počtu leukocytů (Graf č. 22) oproti kontrolní skupině.

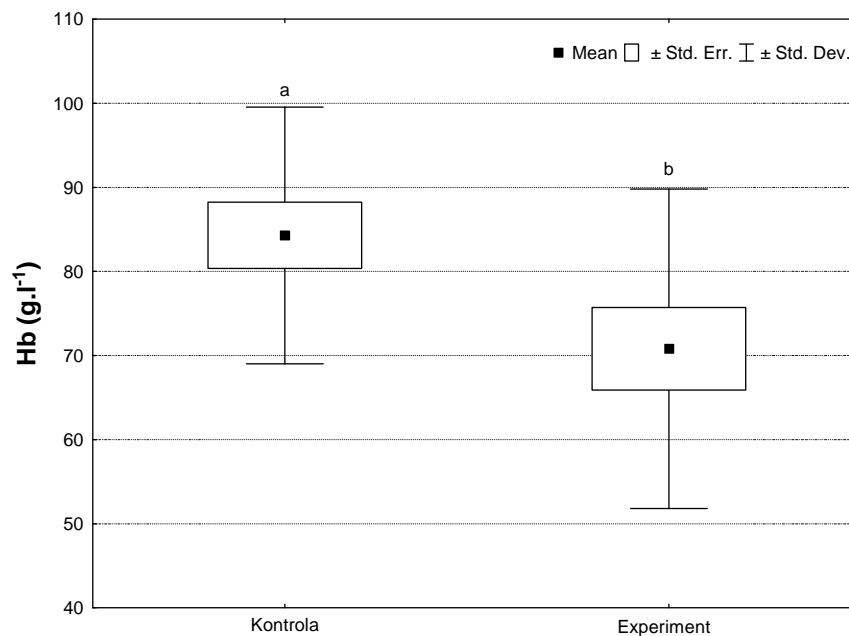
U ostatních sledovaných ukazatelů (Er, MCH, MCHC) nebyly zaznamenány mezi skupinou kontrolních a pokusných ryb statisticky významné rozdíly.

Graf 19: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG ( $250,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na hematokritovou hodnotu kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).

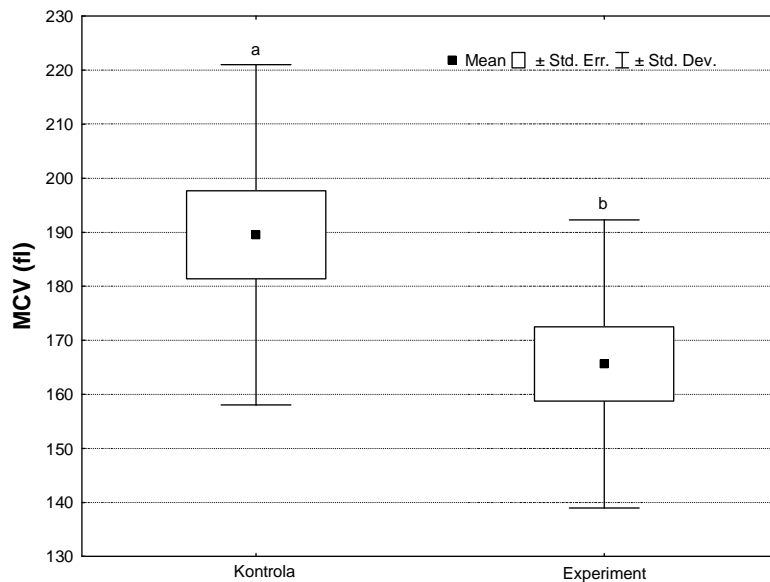




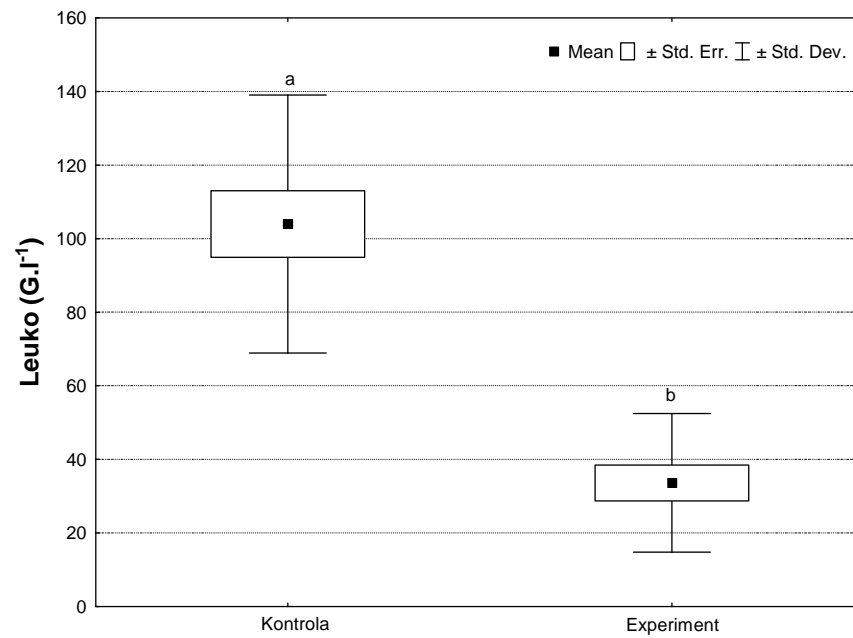
Graf 20: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci hemoglobinu kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 21: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na hodnotu středního objemu erytrocytu kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



Graf 22: Vliv akutní expozice Sencor 70 WG (250,2 mg.l<sup>-1</sup>) na počet leukocytů kapra obecného (statistická významnost  $p < 0,01$ ).



## 5. DISKUSE

### 5.1 Pstruh duhový

Hodnota 96hLC50 89,3 mg.l<sup>-1</sup> Sencor 70 WG zjištěná u pstruha duhového odpovídá hodnotě 62,51 mg.l<sup>-1</sup> metribuzinu. Tato hodnota je shodná s rozmezím 96hLC50 64 – 76 mg.l<sup>-1</sup> metribuzinu, kterou pro pstruha duhového uvádějí Mayer and Ellersieck (1986) a Fairchild and Sappington (2002). Hudson et al., (1984) uvádějí hodnotu LC50 70 mg.l<sup>-1</sup> metribuzinu pro pstruha duhového. Naproti tomu Waynon and Finley (1980) uvádějí hodnotu LC50 42 mg.l<sup>-1</sup> pro pstruha duhového.

Pouhý přepočítání toxicity přípravku na toxicitu účinné látky však nezahrnuje vzájemné interakce jednotlivých složek přípravku. Při testování přípravku dochází k antagonistickému a synergickému působení složek přípravku, které se podílejí na výsledné toxicitě hodnoceného přípravku. Tento přepočítání je proto pouze orientační.

Na základě zjištěných hodnot 96hLC50 pro pstruha duhového byl přípravek Sencor 70WG zařazen do skupiny látek pro ryby **ŠKODLIVÉ** (riziková věta R52, 96hLC50 10 - 100 mg.l<sup>-1</sup>). Svobodová (2004) hodnotí látky s rozmezím hodnot 96hLC50 10 – 100 mg.l<sup>-1</sup> jako škodlivé pro vodní organismy.

#### 5.1.1 Chování ryb v průběhu testu

Změny v chování ryb po působení přípravku na bázi triazinů nastávají již hodinu po započítání testu. Ryby ztrácejí koordinaci pohybů, objevují se trhavé pohyby, výjezdy k hladině a převrácení na bok. Následuje velmi dlouhá fáze útlumu, zpomalují se dýchací pohyby skřelí, ryba leží na boku a hyne. Neumann (1990) popisuje projevy intoxikace jako poruchy motility, projevy deprese, dyspnoe, tonicko-klonické křeče. Podobné příznaky popisují při akutní otravě atrazinem i Hussein et al., (1996) u *Oreochromis niloticus* a *Chrysichthyes auratus* a Saglio and Trijasee (1998) u karase stříbřitého.

#### 5.1.2 Biochemický profil krve pstruha duhového

Biochemický a hematologický profil krve má významnou vypovídací schopnost o stavu vnitřního prostředí organismu (Masopust, 2000). Hlavní biochemická odezva u pstruha duhového po akutním působení přípravku Sencor 70WG bylo statisticky vý-

znamné snížení ( $p < 0,01$ ) celkových bílkovin, triacylglycerolů, aspartát aminotransferázy, amoniaku, alkalické fosfatázy a vápníku ve srovnání s kontrolní skupinou.

Mekkawy et al., (1996) popisují signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) glukózy a signifikantní snížení ( $p < 0,05$ ) celkových plazmatických bílkovin u *Oreochromis niloticus* a *Chrysichthyes auratus* po akutní expozici atrazinu v koncentraci 3 mg.l<sup>-1</sup>. Davies et al., (1994) popisují také snížení celkových bílkovin u pstruha duhového po akutní expozici atrazinu v koncentraci 50 µg.l<sup>-1</sup>. Snížení kalcia u tilapie (*Tilapia mossambica*) po akutní expozici atrazinu zjistili i Prasad and Reddy (1994). Naproti tomu Neskovic et al., (1993) popisují zvýšení aktivity alkalické fosfatázy u pstruha duhového po akutní expozici atrazinu. Waring and Moore (2004) popisují zvýšení hladiny kortizolu u lososa atlantického (*Salmo salar*) po expozici atrazinu.

### **5.1.3 Hematologický profil krve pstruha duhového**

Hlavní hematologická odezva u pstruha duhového po akutním působení přípravku Sencor 70WG bylo statisticky významné snížení počtu erytrocytů ( $p < 0,01$ ), hodnoty hematokritu ( $p < 0,05$ ) a významné zvýšení ( $p < 0,05$ ) hodnoty hemoglobin erytrocytu ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobné změny popisuje i Svobodová a Pečena (1988) a Osetrov (1978) u kapra obecného po akutní otravě atrazinem. Stejný vliv pesticidů na bázi triazinů na hematokritové hodnoty popisuje i Svobodová et. al., (1996). Dá se předpokládat, že přípravky na bázi triazinů významně narušují hemopoetický systém ryb a v některých případech vyvolávají i zvýšený rozpad erytrocytů. Po působení atrazinu byla popisována zvýšená regenerace krevních buněk a to na základě vyšetření hemopoetické tkáně ledvin u ryb. Podle Svobodové et al., (1996) se dá tato reakce vyložit jako odpověď organismu na anemický stav vyvolaný triaziny. Snížení hematokritové hodnoty je popisováno také u přípravku Basudin 600 EW s účinnou látkou diazinon (Lusková, 2003). Vlivem tohoto přípravku došlo také ke snížení celkového počtu erytrocytů a snížení množství hemoglobinu.

### **5.1.4 Pítva ryb**

Po skončení testu stanovení biochemického a hematologického profilu byla pro-

vedena pitva ryb a bylo zjištěno zvětšení tělní dutiny a transudat v tělní dutině. Lze předpokládat, že ke zvýšení úniku proteinů došlo v důsledku poškození ledvinových tubulárních epiteliálních buněk. Následkem toho byla diagnostikována hypoproteinémie (z  $48.40 \pm 4.90 \text{ g.l}^{-1}$  na  $24.40 \pm 9.73 \text{ g.l}^{-1}$ ) v krevní plazmě, která způsobila vznik výpotku v tělní dutině. Svobodová et al., (1987) popisují vznik transudatu u pstruha duhového po akutní intoxikaci atrazinem.

## **5.2 Kapr obecný**

V průběhu 96 hodinového testu akutní toxicity přípravku Sencor 70 WG, s metribuzinem jako účinnou látkou, na plůdcích kapra obecného nedošlo k úmrtí ani jednoho kusu kontroly. Stejně tak koncentrace kyslíku u ani jedné z testovaných koncentrací ani u kontrolní skupiny neklesla v žádném okamžiku průběhu testu pod 60 %. Zajištění přítomnosti testované látky (80 % nominální koncentrace) bylo provedeno výměnou lázně každých 24 hodin. Díky splnění těchto podmínek může být tento test považován za validní. Na základě zjištěné hodnoty 96hLC50 ( $250.2 \text{ mg.l}^{-1}$ ), může být přípravek Sencor 70 WG zařazen do skupiny látek, které mohou způsobit dlouhodobé nepříznivé efekty ve vodním prostředí. Riziková věta R53 stanovuje hodnotu 96hLC50  $> 100 \text{ mg.l}^{-1}$  (zákon č. 356/2003 Sb.), čímž se přípravek Sencor 70 WG zařazuje do rizikové věty R53. Hodnota 96hLC50 pro přípravek Sencor 70 WG -  $250.2 \text{ mg.l}^{-1}$  je po přepočtení  $175.14 \text{ mg.l}^{-1}$  metribuzinu. Hodnoty zjištěné během našeho testu jsou v rozporu s některými jinými autory, kteří stanovovali toxicitu pro jiné druhy ryb. Rozdíl je způsoben tím, že kapr obecný není tak citlivý jako lososovité druhy ryb, v našem případě pstruh duhový. V našem testu akutní toxicity pro pstruha duhového byla hodnota 96hLC50 –  $62,51 \text{ mg.l}^{-1}$  metribuzinu. Mayer a Ellersieck (1986) a Mun et al., (2006) zjistili hodnotu LC50 64 –  $76 \text{ mg.l}^{-1}$  metribuzinu pro pstruha duhového. Fairchild a Sappington (2002) udávají hodnotu 96hLC50  $76 \text{ mg.l}^{-1}$  metribuzinu pro ryby.

### **5.2.1 Chování ryb v průběhu testu**

V průběhu testu akutní toxicity na kapru obecném byly pozorovány tyto klinické příznaky: zrychlené dýchání, ztráta pohybové koordinace, ryba leží na boku a hyne. Po-

dobné změny popisuje i Hussein et al., (1996) u *Oreochromis niloticus*, *Chrysichthyes auratus* a Saglio a Trijasse (1998) v *Carassius auratus*, jako následek akutní otravy atrazinem. Reddy et al., (1992) pozoroval ztrátu koordinace pohybů u *Sarotherodon mossambicus* po chronické expozici diuronu. Na druhé straně Oporesa-Jimenez et al., (2005) nepozorovali změny v chování u kapra po expozici simazinu.

### **5.2.2 Hematologický profil krve kapra obecného**

Hematologický a biochemický profil krve může poskytnout důležité informace o vnitřním prostředí organismu (Masopust, 2000). Hlavní hematologická odezva u kapra obecného na přípravky na základě metribuzinu se projevila signifikantním snížením hematokritu ( $p < 0,01$ ), hodnota leukokritu ( $p < 0,01$ ), počet lymfocytů ( $p < 0,01$ ), hodnoty koncentrace hemoglobinu ( $p < 0,05$ ) a střední objem erytrocytů. Snížení hematokritové hodnoty (PCV) a koncentrace hemoglobinu (Hb) u kapra obecného může být vyložena jako kompenzační odpověď, která zhoršuje přenos kyslíku a také ukazuje na změny vodo – krevní bariéry u výměny plynů v žaberních liscích (Jee et al., 2005). Hematologické výsledky indikují snížení nespecifické imunity. Podobné změny v hodnotách hematokritu, lymfocytů, počtu monocytů a segmentovaných neutrofilních granulocytů byly zjištěny Svobodovou a Pečenou (1988) u kapra po akutní intoxikaci atrazinem.

V našem testu došlo k signifikantnímu snížení ( $p < 0,01$ ) hematokritové hodnoty, koncentrace hemoglobinu, středního objemu erytrocytu a počtu leukocytů. Také Vachunková (2007) popisuje signifikantní snížení ( $p < 0,01$ ) hematokritové hodnoty a počtu leukocytů po expozici kapra obecného přípravku na bázi triazinu Gardoprim plus Gold 500 SC v koncentraci 96hLC50 13mg.l<sup>-1</sup>.

### **5.2.3 Biochemický profil krve kapra obecného**

Hlavní biochemická odpověď kapra obecného na akutní intoxikaci přípravky na základě metribuzinu bylo signifikantní snížení vůči kontrolní skupině ( $p < 0,01$ ) celkových bílkovin, triacylglycerolů, laktát dehydrogenázy, kalcia a anorganického fosfátu. Zvýšená koncentrace amoniaku indikuje neschopnost organismu přeměnit toxický amo-

niak na méně škodlivé látky (Svoboda, 2001). Zvýšení koncentrace glukózy v krvi představuje odpověď exponovaného organismu na metabolický stres. V našem pokusu došlo k pětinasobnému nárůstu koncentrace glukózy oproti fyziologickým hodnotám pro kapra, které uvádí Svobodová (1986). Snížení laktát dehydrogenasy (LDH) indikuje metabolické změny. Glykogenový katabolismus a glukóza jsou ukazateli stresu u ryb. (Simon et al., 1983). Tato zjištění jsou v dobré shodě se zjištěním Mekkawy et al., (1996), který pozoroval signifikantní nárůst ( $p < 0,05$ ) glukózy (GLU) a signifikantní pokles ( $p < 0,05$ ) celkových bílkovin (TP) u *Oreochromis niloticus* a *Chrysichthyes auratus* po akutní expozici atrazinu v koncentraci  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Davies et al., (1994) pozoroval pokles celkových bílkovin (TP) u pstruha duhového po akutní expozici atrazinu v koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ . Prasad a Reddy (1994) pozorovali po expozici atrazinu u *Tilapia mossambica* pokles kalcia v plazmě. V našem testu došlo k signifikantnímu snížení ( $p < 0,01$ ) celkových bílkovin, triglyceridů, laktát dehydrogenázy, kalcia, anorganického fosfátu a signifikantnímu zvýšení ( $p < 0,01$ ) koncentrace glukózy a amoniaku v krevní plazmě. Vachunková (2007) popisuje signifikantní snížení ( $p < 0,01$ ) anorganického fosfátu, triglyceridů, kalcia a statisticky významné zvýšení ( $p < 0,01$ ) glukózy a amoniaku po expozici kapra obecného přípravku na bázi triazinu Gardoprim plus Gold 500 SC v koncentraci 96hLC50  $13 \text{ mg.l}^{-1}$  s obsahem terbutylazinu a S-metolachloru. Dále uvádí statisticky významné zvýšení ( $p < 0,01$ ) alanin aminotransferázy, aspartat aminotransferázy, kreatin kinasy a celkových bílkovin, které jsme naopak my v testu nepozorovali. Rozdíly jsou způsobeny synergickým působením obou složek pesticidu a rozdílností chemických vlastností.

#### **5.2.4 Triaziny v prostředí**

Zhruba od šedesátých let byly pesticidy na bázi triazinu, zejména atrazin, simazin a propazin, široce využívány jako selektivní herbicid. Byly používány v Evropě i Severní Americe, kde odhadované množství použitého atrazinu dosahovalo v roce 1993 35 000 tun. Podle Sandersona et al., (2001) byl v USA v devadesátých letech atrazin nejpoužívanějším herbicidem. V důsledku toho jsou triaziny nacházeny v relativně vysokých koncentracích v povrchových vodách na mnoha místech Evropy i Severní a Jižní

Ameriky. Sanderson et al., (2001) spojuje dlouhodobé expozice triazinových herbicidů se zvýšeným rizikem rakoviny vaječníků u pracovníků v zemědělství v Itálii a rakoviny prsu v Kentucky v USA.

Triaziny a jejich rezidua jsou nejčastěji nacházenými pesticidy v povrchových vodách. V oblasti středozápadní Brazílie, byly podle Dores et al., (2006), triaziny přítomny v 72 % odebraných vzorků, a to jak ve studnách s pitnou vodou, přehradách i zavlažovacích nádržích. Koncentrace nalezených pesticidů se pohybují v řádech mikrogramů na litr. Stejně tak u nás jsou triaziny skupinou nejčastěji nacházených pesticidů ve vodách. V zatížených lokalitách ČR se koncentrace metribuzinu ve vodě pohybuje v rozmezí 0,023 – 0,059  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,018 – 0,021  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (data ČHMÚ; data VÚRH JU).



## 6. ZÁVĚR

V rámci této práce byly akutními testy toxicity určeny 96hLC50 po expozici pesticidního přípravku na bázi triazinů Sencor 70 WG se 70% obsahem metribuzinu pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v koncentraci 89,3 mg.l<sup>-1</sup> a kapra obecného (*Cyprinus carpio*) v koncentraci 250,2 mg.l<sup>-1</sup>. Zařazením přípravku do tzv. R vět, pro pstruha duhového R52- látky škodlivé pro vodní organismy a pro kapra obecného R53- látky, které mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí, naplnila tato práce svůj cíl, kterým bylo posouzení toxického vlivu přípravku Sencor 70 WG na ryby. Vliv tohoto přípravku byl posuzován pomocí stanovení biochemického a hematologického profilu obou druhů ryb. Byla potvrzena hypotéza, že pesticidy na bázi triazinů mají toxický vliv na necílové organismy.

Tyto výsledky mohou být použity pro výběr optimálních pesticidů k ochraně kulturních plodin a mohou tak pomoci ke snížení kontaminace životního prostředí a vstupu reziduí do potravního řetězce.

Získané výsledky týkající se vlivu metribuzinu na biochemický a hematologický profil kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) byly prezentovány na toxikologické konferenci ve Vodňanech.

Výsledky hodnocení přípravků na bázi triazinů byly publikovány v časopise *Bulletin VÚRH Vodňany*, a byly odeslány do redakce *Veterinary Medicine Czech*.

## 7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ANONYM 1: Sencor 70 WG [online]. 2007 [cit. 2007 - 11 - 24]

<http://www.agromanualshop.cz/p243-sencor-70-wg-baleni-5-20-g>

ANONYM 2: EXTTOXNET [online]. 2007 [cit. 2007 - 4 - 18]

<http://exttoxnet.orst.edu/pips/metribuz.htm>

ACGIH (AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS, INC) 1991: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 6. Vydání, Cincinnati, OH, 128 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.

DORES, E.F.G.C., NAVICKIENE, S., CUNHA, M.L.F., CARBO, L., RIBEIRO, M.L. DE-LAMONICA-FREIRE, E.M., 2006: Multiresidue Determination of Herbicides in Environmental Waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD in *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, No. 5, 866-873.

DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., HLÚBIK, P., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V., WINKLEROVÁ, D., 2005: Rezidua pesticidů v potravinách, vydalo VŠCHT Praha, 29s.

DUPONT DE NEMOURS CORP. 1991: Material Safety Data Sheet for Metribuzin Technical, Wilmington, DE, 36 p.

- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 1988: Health Advisory Summary: Metribuzin, Office of Drinking Water, Washington, DC
- 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.
- GOSSELIN, R.E., SMITH, R.P., HODGE, H.C., 1984: Clinical Toxicology of Commercial Products, 5. vydání, nakl. William and Wilkins, Baltimore, MD, 184 p.
- HAIŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V., 2004: Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, 35s.
- HARTMAN, P., PŘIKRYL, I., ŠTĚDRONSKÝ, E., 1988: Hydrobiologie, SZN Praha 314 s.
- HUDSON, R.H., TUCKER, R.K., HAEGELE, M.A., 1984: Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. USDI Fish and Wildlife Service Resource Publication Number 153. Washington, D.C. 136p.
- HUSSEIN, S.Y., EL-NASSER, M.A., AHMED, S.M., 1996: Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on fresh water fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57, 503–510.
- JEE, J.H., MASROOR, F., KANG, J.C., 2005: Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquacul. Res., 36, 898-905.
- KIDD, H., JAMES, D.R., EDS. 1991: The Agrochemicals Handbook, Third Edition,

Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, 243 p.

LUSKOVÁ, V., 2003: Vliv pesticidů na hematologické a biochemické parametry u ryb.  
In Ekotoxikologické biotesty 3. Brno: Vodní zdroje EKOMONITOR s.r.o., 119s.

MASOPUST, J., 2000. Klinická biochemie. Karolinum, Praha, 832s.

MAYER, F.L., ELLERSIECK, M.R., 1986: Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. US Fish and Wildlife Service Resource Publication 160, Washington, DC, 86p.

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.

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.

NESKOVIC, N. K., ELEZOVIC, I., KARAN, V., POLEKSIC, V., BUDIMIR, M., 1993: Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 25, 173-182.

NEUMANN, J., 1990: Chemizace zemědělství, farmakologie a toxikologie., 1. vyd., Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 304s

OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test. 1992: 9pp.

OSETROV, V.S., 1978. Handbook on fish diseases. Izd. Kolos, Moscow, 350 p. (In

Russian).

PRASAD, T.A.V., REDDY, D.C., 1994: Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish *Tilapia mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28, 313-316.

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., 1998: Changes in erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentrations of the herbicide diuron, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 730–737.

SAGLIO, P., TRIJASSE, S., 1998: Behavioural responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:484-491.

SANDERSON J.T., LETCHER R.J., HENEWEER M., GIESY J.P., VAN DEN BERG M., 2001: Effects of Chloro-s-Triazine Herbicides and Metabolites on Aromatase Activity in Various Human Cell Lines and on Vitellogenin Production in Male Carp Hepatocytes in *Environ Health Perspect* 109:1027–1031

SIMON, L.M., NEMCSÓK, J., BOROSS, L., 1983: Studies on the effects of paraquat on glycogen mobilization in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 75C 167-169.

SVOBODA, M., 2001: Stress in fish - review. *Bulletin of Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany*, 37, 169-191.

- SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J., 1986: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 22, 36 s.
- SVOBODOVÁ, Z., GELNEROVÁ, J., JUSTÝN, J., KRAUPER, V., MÁCHOVÁ, J., SIMANOV, L., VALENTOVÁ, V., WOHLGEMUTH, E., 1987: Toxikologie vodních živočichů. SZN Praha 231 p.
- SVOBODOVÁ, Z., PEČENÁ M., 1988: Changes in the red and white blood picture of carp after acute exposure to toxic substance. Bull. VÚRH , Vodňany. 17, 116-128.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VYKUSOVÁ, B., 1992: Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod, VURH Vodňany, 180 s.
- SVOBODOVÁ, Z., BEKLOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, D., LUKAVSKÝ, J., MÁCHOVÁ, J., MARŠÁLEK, B., MODRÁ, H., PIKULA, J., 1995: Zkušební metody pro stanovení ekotoxikologických vlastností látek., Část A – Metody stanovení toxicity. VÚRH Vodňany, 80s.
- SVOBODOVÁ, Z., 1996: Vliv vybraných negativních faktorů na hematologické ukazatele kapra obecného, *Cyprinus carpio L.* a lína obecného, *Tinca tinca L.* In Sborník vědeckých prací k 75. Výročí založení VÚRH Vodňany, VÚRH, 93s.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J., 2000: Ekotoxikologie. Praktická cvičení, část I. VFUT Brno 2000, 70s.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., 2003: Cizorodé látky ve vodním prostředí a problematika sledování jejich účinků. Sb. referátů z 11. konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH JU Vodňany, Aquachemie Ostrava: 275-278.

- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VESELÝ, V., MODRÁ, H., SVOBODA, M., 2003: Veterinární toxikologie – Praktická cvičení, část I., Brno.
- SVOBODOVÁ, Z. 2004: Přehled testů toxicity na rybách a jejich využití. *In Ekotoxikologické biotesty 4* . Chrudim: Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s r.o., 95s.
- VACHUNKOVÁ, Š., 2007: Vliv stresových faktorů na vybrané ukazatele krevní plazmy kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 46 s.
- WARING, C.P., MOORE, A., 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aqua. Toxicol.* 66, 93-104.
- WAUCHOPE, R. D., BUTTLER, T. M., HORNSBY A. G., AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M., BURTJ.P., 1992: SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123:1-157
- WAYNON, J., FINLEY, M.T., 1980. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. U.S. Fish and Wildlife Service Publication 137. Washington, D.C.
- WEXLER P., ANDERSON B.D., PEYSTER A., GAD S., HAKKINEN P., KAMRIN M., LOCKEY B., MEHENDALE H., POPE C., SHUGART L., 2005: Encyclopedia of toxicology. second edition, 795p.
- WSSA (WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA), 1994: Herbicide Handbook, 7. Vydání, Champaign IL,

ZAPLETAL, O., NEPEJHALOVÁ, L. :Speciální veterinární toxikologie.,  
1.vyd.,Brno:Editační středisko VFU Brno , 2001, 148s, ISBN 80-7305-403-5



## **8. KLÍČOVÁ SLOVA**

metribuzin, pesticidy, triaziny, kapr obecný, pstruh duhový, hematologie, biochemie

## 9. PŘÍLOHY

Tab. 1: Předběžný test toxicity u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina					Velikost ryb	
	koncentrace mg/l	dávka do 20 l	zásobní roztok		13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>	Hmotnost (g)	Délka těla (cm)
			objem	č. zás. rozt.							
1	0,05	1	1 ml	1	0	0	0	0	0	18,2	13,0
2	0,1	2	2 ml	1	0	0	0	0	0	19,3	12,0
3	1,0	20	20 ml	1	0	0	0	0	0	22,14	14,1
4	10,0	200	0,2 g		0	0	0	0	0	18,45	13,0
5	50,0	1000	1,0 g		0	0	0	0	0	14,7	12,5
6	100,0	2000	2,0 g		0	0	0	0	0	13,1	12,0
7	200,0	4000	4,0 g		3	-	-	-	-	19,3	13,3
K					0	0	0	0	0	9,3	10,5

Zásobní roztok č. 1: 0,1g do 100 ml → v 1 ml – 1 mg

Tab. 2: Podmínky v průběhu předběžného testu akutní toxicity u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>	13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>	13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>
		0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h
1	0,05	15,1	15,3	15,4	15,3	16,1	16,1	89	94	90	98	96	94	8,10	8,06	8,01	8,00	7,93	7,86
2	0,1	15,1	15,3	15,4	15,3	16,1	16,1	87	98	96	97	97	97	8,60	8,23	8,24	8,40	8,36	8,21
3	1,0	15,2	15,2	15,3	15,2	16,2	16,2	88	90	93	97	99	98	8,15	8,04	8,02	8,10	8,01	7,93
4	10,0	15,3	15,3	15,5	15,3	16,2	16,2	84	93	94	95	100	99	7,96	7,90	7,84	8,06	7,94	7,87
5	50,0	15,2	15,3	15,4	15,3	16,1	16,1	83	95	96	93	98	94	7,92	7,70	7,69	8,16	8,05	7,91

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>	13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>	13.11. 9 <sup>00</sup>	14.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 9 <sup>00</sup>	15.11. 11 <sup>00</sup>	16.11. 9 <sup>00</sup>	17.11. 9 <sup>00</sup>
0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h		
6	100,0	15,2	15,4	15,5	15,4	16,2	16,1	85	96	94	96	97	93	7,86	7,81	7,72	8,21	8,13	8,02
7	200,0	15,2	-	-	-	-	-	88	-	-	-	-	-	7,71	-	-	-	-	-
K		14,8	15,3	15,4	15,4	16,3	16,2	86	90	94	98	96	96	8,14	8,10	8,10	8,20	8,11	8,03

Tab. 3: Základní test toxicity u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina					Velikost ryb	
	koncentrace mg/l	dávka do 20 l ( mg )	zásobní roztok		20.11. 9 <sup>00</sup>	21.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 9 <sup>00</sup>	23.11. 9 <sup>00</sup>	24.11. 9 <sup>00</sup>	Hmotnost ( g )	Délka těla ( cm )
			objem	č. zás. rozt.							
1	50,0	1000	1 g		0	0	0	0	0	18,6	13,5
2	70,0	1400	1,4 g		0	0	0	2	1	19,54	13,2
3	100,0	2000	2,0 g		0	0	4	0	0	20,82	13,1
4	120,0	2400	2,4 g		0	2	4	3	0	16,37	12,8
5	150,0	3000	3,0 g		0	3	5	2	-	18,97	10,2
6	180,0	3600	3,6 g		0	7	3	-	-	18,69	13,2
7	200,0	4000	4,0 g		2	8	-	-	-	20,24	13,5
K					0	0	0	0	0	25,8	14,8

Tab. 4: Podmínky v průběhu základního testu toxicity u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Konc. mg/l <sup>-1</sup>	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		20.11. 9 <sup>00</sup>	21.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 10 <sup>00</sup>	23.11. 9 <sup>00</sup>	24.11. 9 <sup>00</sup>	20.11. 9 <sup>00</sup>	21.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 10 <sup>00</sup>	23.11. 9 <sup>00</sup>	24.11. 9 <sup>00</sup>	20.11. 9 <sup>00</sup>	21.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 9 <sup>00</sup>	22.11. 10 <sup>00</sup>	23.11. 9 <sup>00</sup>	24.11. 9 <sup>00</sup>
	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	48h	72h	96h	
1	50,0	16,1	16,2	16,2	16,1	16,1	16,0	89	98	94	97	94	98	8,14	8,02	7,93	8,21	7,91	7,93
2	70,0	16,2	16,3	16,2	15,9	16,1	16,1	86	95	98	98	96	97	8,10	7,94	7,86	8,23	7,93	7,96
3	100,0	16,1	16,2	16,1	15,9	16,2	16,2	94	96	93	97	95	96	8,13	8,02	7,96	8,20	7,98	8,01
4	120,0	16,1	16,1	16,1	16,0	16,2	16,2	95	95	90	95	96	95	8,24	8,19	8,09	8,21	8,11	8,10
5	150,0	16,1	16,2	16,2	16,1	-	-	96	93	98	96	-	-	8,19	8,10	8,06	8,20	-	-
6	180,0	16,1	16,2	-	-	-	-	97	94	-	-	-	-	8,17	8,16	-	-	-	-
7	200,0	16,1	-	-	-	-	-	96	-	-	-	-	-	8,19	-	-	-	-	-
K		16,1	16,1	16,2	16,2	16,1	16,1	99	94	96	98	98	97	8,20	8,10	8,10	8,23	8,20	8,16

Tab. 5: Předběžný test toxicity u kapra obecného.

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

Zásobní roztok č. 1: 0,1g do 100 ml → v 1 ml – 1 mg

Tab. 6: Podmínky v průběhu předběžného testu akutní toxicity u kapra obecného.

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		26.3. 9 <sup>00</sup>	27.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 10 <sup>00</sup>	29.3. 9 <sup>00</sup>	30.3. 9 <sup>00</sup>	26.3. 9 <sup>00</sup>	27.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 10 <sup>00</sup>	29.3. 9 <sup>00</sup>	30.3. 9 <sup>00</sup>	26.3. 9 <sup>00</sup>	27.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 9 <sup>00</sup>	28.3. 10 <sup>00</sup>	29.3. 9 <sup>00</sup>	30.3. 9 <sup>00</sup>
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

Tab. 7: Základní test toxicity u kapra obecného.

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina					Velikost ryb	
	koncentrace mg/l	dávka do 20 l ( mg )	zásobní roztok		2.4. 9 <sup>00</sup>	3.4. 9 <sup>00</sup>	4.3. 9 <sup>00</sup>	5.4. 9 <sup>00</sup>	6.4. 9 <sup>00</sup>	Hmotnost (g)	Délka těla (cm)
			objem	č. zás. rozt.							
1	100	2000	2,0 g		0	0	0	0	0	25,2	13,6
2	150	3000	3,0 g		0	0	0	0	0	25,1	12,9
3	200	4000	4,0 g		0	0	0	0	0	24,1	12,5
4	230	4600	4,6 g		0	0	0	1	0	5,5	10,6
5	260	5200	5,2 g		0	2	0	1	2	27,9	14,2
6	300	6000	6,0 g		0	9	0	1	-	26,0	11,5
K					0	0	0	0	0	32,1	14,8

Tab. 8: Podmínky v průběhu základního testu akutní toxicity u kapra obecného.

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)						Kyslík (% nasycení vody)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		2.4. 9 <sup>00</sup>	3.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 10 <sup>00</sup>	5.4. 9 <sup>00</sup>	6.4. 9 <sup>00</sup>	2.4. 9 <sup>00</sup>	3.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 10 <sup>00</sup>	5.4. 9 <sup>00</sup>	6.4. 9 <sup>00</sup>	2.4. 9 <sup>00</sup>	3.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 9 <sup>00</sup>	4.4. 10 <sup>00</sup>	5.4. 9 <sup>00</sup>	6.4. 9 <sup>00</sup>
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

Tab. 9: Stanovení biochemického a hematologického profilu u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina					Velikost ryb	
	koncentrace mg/l	dávka do 200 l ( mg )	zásobní roztok		11.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 9 <sup>00</sup>	13.12. 9 <sup>00</sup>	14.12. 9 <sup>00</sup>	15.12. 9 <sup>00</sup>	Hmotnost ( g )	Délka těla ( cm )
			objem	č. zás. rozt.							
1	89,3	17860			0	0	0	0	1	305,6	31,2
2	89,3	17860			0	0	0	2	1	297,4	30,8
K					0	0	0	0	0	304,3	30,6

Tab. 10: Podmínky v průběhu stanovení biochemického a hematologického profilu krve u pstruha duhového.

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)									
		Datum a hodina měření									
		11.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 10 <sup>00</sup>	13.12. 9 <sup>00</sup>	13.12. 10 <sup>00</sup>	14.12. 9 <sup>00</sup>	14.12. 10 <sup>00</sup>	15.12. 9 <sup>00</sup>	15.12. 10 <sup>00</sup>	
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h	
1	89,3	16,2	16,1	15,8	16,2	15,7	15,9	15,8	16,2	16,0	
2	89,3	16,2	15,9	16,1	16,1	16,2	16,0	16,0	15,9	16,0	
K		16,1	16,1	16,1	16,2	16,0	16,0	16,1	16,1	16,1	
Číslo nádrže	Konc. mg/l	Kyslík (% nasycení vody)									
		Datum a hodina měření									
		11.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 10 <sup>00</sup>	13.12. 9 <sup>00</sup>	13.12. 10 <sup>00</sup>	14.12. 9 <sup>00</sup>	14.12. 10 <sup>00</sup>	15.12. 9 <sup>00</sup>	15.12. 10 <sup>00</sup>	
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h	
1	89,3	89	98	95	94	98	94	98	98	96	
2	89,3	88	96	96	98	96	96	97	96	97	
K		98	94	98	96	98	97	94	95	98	
Číslo nádrže	Konc. mg/l	pH									
		Datum a hodina měření									
		11.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 9 <sup>00</sup>	12.12. 10 <sup>00</sup>	13.12. 9 <sup>00</sup>	13.12. 10 <sup>00</sup>	14.12. 9 <sup>00</sup>	14.12. 10 <sup>00</sup>	15.12. 9 <sup>00</sup>	15.12. 10 <sup>00</sup>	
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h	
1	89,3	8,12	8,10	7,99	7,98	8,23	7,98	8,14	8,09	8,12	
2	89,3	8,10	8,16	8,05	8,26	8,13	8,03	8,10	7,96	8,07	
K		8,16	8,20	8,00	8,14	8,26	8,20	8,06	8,16	8,12	

Tab. 11: Stanovení biochemického a hematologického profilu u kapra obecného.

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) – datum a hodina					Velikost ryb	
	koncentrace mg/l	dávka do 200 l ( mg )	zásobní roztok		16.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 9 <sup>00</sup>	18.4. 9 <sup>00</sup>	19.4. 9 <sup>00</sup>	20.4. 9 <sup>00</sup>	Hmotnost (g)	Délka těla (cm)
			objem	č. zás. rozt.							
1	250,2	50040			0	0	0	1	2	492,2	30,8
2	250,2	50040			0	0	0	0	2	488,1	32,9
K					0	0	0	0	0	490,1	31,8

Tab. 12: Podmínky v průběhu stanovení biochemického a hematologického profilu u kapra obecného.

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Teplota vody (°C)									
		Datum a hodina měření									
		16.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 10 <sup>00</sup>	18.4. 9 <sup>00</sup>	18.4. 10 <sup>00</sup>	19.4. 9 <sup>00</sup>	19.4. 10 <sup>00</sup>	20.4. 9 <sup>00</sup>	20.4. 10 <sup>00</sup>	
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h	
1	250,2	18,8	18,0	18,6	18,7	18,8	19,0	18,6	18,6	18,8	
2	250,2	18,3	17,8	18,7	18,6	18,6	18,9	18,7	19,4	18,6	
K		18,6	18,2	18,4	18,6	18,9	19,2	18,4	18,7	18,9	

Číslo nádrže	Konc. mg/l	Kyslík (% nasycení vody)									
		Datum a hodina měření									
		16.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 10 <sup>00</sup>	18.4. 9 <sup>00</sup>	18.4. 10 <sup>00</sup>	19.4. 9 <sup>00</sup>	19.4. 10 <sup>00</sup>	20.4. 9 <sup>00</sup>	20.4. 10 <sup>00</sup>	
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h	
1	250,2	94	96	95	94	96	95	97	94	98	
2	250,2	96	94	95	96	94	95	95	98	95	
K		94	98	97	94	98	97	96	96	99	



Číslo nádrže	Konc. mg/l	pH								
		Datum a hodina měření								
		16.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 9 <sup>00</sup>	17.4. 10 <sup>00</sup>	18.4. 9 <sup>00</sup>	18.4. 10 <sup>00</sup>	19.4. 9 <sup>00</sup>	19.4. 10 <sup>00</sup>	20.4. 9 <sup>00</sup>	20.4. 10 <sup>00</sup>
		0h	24h	24h	48h	48h	72h	72h	96h	96h
1	250,2	7,78	7,83	7,76	7,64	8,01	7,76	7,68	7,81	7,72
2	250,2	7,61	7,85	7,82	7,76	7,95	7,81	7,95	7,92	8,04
K		7,82	7,64	7,71	7,66	7,73	7,74	7,66	7,83	7,86