

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na
raná vývojová stádia raka mramorovaného**

Autor: Milan Závorka

Vedoucí bakalářské práce: dr hab. Josef Velíšek, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, obor Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2020

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma “Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného“ vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této bakalářské práce.

Souhlasím dále s tím, aby touto cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledcích obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis studenta

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především vedoucímu bakalářské práce dr hab. Josefu Veliškovi, Ph.D., dále konzultantce Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. a dalším pracovníkům laboratoře Vodní toxikologie a ichtyopatologie, FROV JU Vodňany, kteří mi byli nápomocni během tvorby této práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Milan ZÁVORKA**
Osobní číslo: **V17B026P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Téma práce: **Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Růst spotřeby pesticidů v moderním světě budí stále větší obavy. Pesticidy v minulosti zaujímaly významné místo v pořadí příčin havarijních úhynů vodních organismů. V současné době přichází do úvahy vliv subletálních koncentrací pesticidů. V nižších koncentracích nemusí mít vždy bezprostřední dopad na vodní organismy, ale mohou dlouhodobě negativně ovlivňovat jejich nejranější vývojová stadia. Existuje velice málo informací o působení pesticidů a jejich metabolitů na raná vývojová stádia necílových vodních organismů, která jsou obecně pokládána za nejcitlivější vůči působení negativních faktorů. Pro tuto bakalářskou práci byl k hodnocení vlivu vybrán metazachlor, jehož průměrná spotřeba v ČR je 152,6 tun ročně, a jeho majoritní metabolit metazachlor OA. Jejich rezidua jsou velice často nacházena v půdě a i povrchových vodách dlouhou dobu po jejich aplikaci.

Cílem bakalářské práce je posouzení vlivu herbicidu metazachloru a jeho hlavního metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). V rámci bakalářské práce bude proveden embryonarvální test toxicity na raku mramorovaném s pesticidem metazachlorem a jeho metabolitem metazachlorem OA. V průběhu testu bude hodnocen vliv na mortalitu, růst, chování, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy, ontogenetický vývoj a výskyt deformací raných vývojových stádií raka. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD. Hodnocení vlivu na oxidativní stres a antioxidantní enzymy v tkáních raka signálního bude prováděno dle jednotlivých metod. Výsledky získané při testování budou podkladem pro hodnocení rizika metazachloru a jeho metabolitu pro vodní ekosystém.

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran textu**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 10 stran)**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Jurcikova, J., Mikula, P., Dobsikova, R., Nemethova, D., Svobodova, Z., 2007. Effects of metazachlor on vitellogenin induction in zebrafish. *Acta Veterinaria Brno* 76: S61-S66.
- Mantzou, N., Hela, D., Karakitsou, A., Antonopoulou, M., Konstantinou, I., 2016. Dissipation and runoff transport of metazachlor herbicide in rapeseed cultivated and uncultivated plots in field conditions. *Environmental Sciences and Pollution Research International* 23: 20517-20527.
- Mohr, S., Feibicke, M., Berghahn, R., Schmiediche, R., Schmidt, R., 2008. Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor. *Environmental Pollution* 152: 530-542.
- Mohr, S., Berghahn, R., Feibicke, M., Meinecke, S., Schmiedling, I., Schmiediche, R., Schmidt, R., 2007. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquatic Toxicology* 82: 73-84.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere* 175: 440-445.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., Kouba, A., 2018. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Science of the Total Environment* 643, 1456-1463
- Vogt, G., 2011. Marmorcrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36: 377-382.

Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 2. upravené vydání, 658 s.

Vedoucí bakalářské práce: **dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Alžběta Stará, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **11. ledna 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2020**

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019

U.2. 
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
359 25 Vodňany (2)


prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

OBSAH:

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. Pesticidy	10
2.1.1. Herbicidy.....	14
2.1.2. Metazachlor.....	17
2.1.3. Metabolit metazachlor OA.....	20
2.2. Raci	22
2.2.1. Testy toxicity na racích.....	22
2.2.2. Rak mramorovaný (<i>Procambarus virginalis</i>).....	23
3. MATERIÁL A METODIKA	26
3.1. Embryolarvální test toxicity	26
3.1.2. Princip a podmínky testu.....	26
3.1.3. Experimentální materiál.....	27
3.2. Vlastní test	29
3.3. Chování	30
3.4. Růst	31
3.5. Odběr vzorků pro biochemické analýzy	32
3.6. Metody stanovení biomarkerů	33
3.6.1. Příprava vzorků pro biochemické analýzy	34
3.6.2.1. Stanovení lipidní peroxidace (TBARS).....	35
3.6.2.2. Stanovení superoxid dismutázy (SOD).....	36
3.6.2.3. Glutathionreduktáza (GR).....	36
3.6.2.4. Stanovení katalázy (CAT).....	37
3.6.2.5. Stanovení glutathion S-transferázy (GST).....	37

3.6.2.6. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)	38
3.7. Statistické vyhodnocení testu	38
4. VÝSLEDKY	39
4.1. Chování.....	39
4.2. Kumulativní mortalita	41
4.3. Růst.....	43
4.4. Ontogenetický vývoj.....	44
4.5. Makroskopické morfologické anomálie.....	44
4.6. Biomarker oxidačního stresu.....	45
4.6.1. Lipidní peroxidace.....	45
4.7. Antioxidační biomarkery	46
4.7.1. Superoxid dismutáza (SOD).....	46
4.7.2. Kataláza (CAT).....	47
4.7.3. Glutathion reduktáza (GR).....	48
4.7.4. Glutathion S-transferáza (GST).....	49
4.7.5. Redukovaný glutathion (GSH).....	50
5. DISKUSE.....	51
6. ZÁVĚR.....	55
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	56
8. ABSTRAKT	65
9. ABSTRACT.....	66

1. Úvod

Lidstvo se zemědělstvím živí více než 10 000 let., S tímto faktem je blízce spojena ochrana pěstovaných plodin. Přítomnost plevelů vedle plodin byla nežádoucí, tehdejší zemědělci si všimli rostlin, které rostly jinak a rozhodli se je svojí mechanickou činností selektovat od pěstovaných plodin (Cobb a Reade, 2010).

V minulosti byly pesticidy rostlinného původu po staletí používány k ochraně plodin a skladovaných produktů a k odpuzování škůdců z lidských sídel. Mezi nejznámější patří pyrethrum, rotenon, nikotin a rostlinné esenciální oleje. Mnoho z těchto látek pocházejících z rostlin mají insekticidní účinky (Hideo a kol., 2007).

Nejvýznamnější rozvoj používání pesticidů a jiných chemických látek v zemědělství nastal v minulém století, a to zejména po 2. světové válce. V této době se použití pesticidů rozšířilo takřka do celého světa. Největší rozvoj používání těchto látek byl pozorován v Kanadě, v USA a ve Velké Británii. Ve 30. letech 20. století se zvýšilo množství spotřebovaných pesticidů v USA o 180 %, v Kanadě dokonce třikrát více (Sotherton a Holland, 2003). Rozvoj produkce a využívání pesticidů například v Japonsku zapříčinilo období po 2. světové válce, kdy bylo Japonsko sužováno nedostatkem potravin (Hideo a kol., 2007).

Globální zásobování potravinami představuje pro zemědělství neustálý úkol, a bude tak činit i v budoucnu. Rostoucí světová populace a rostoucí poptávka po vyšším množství a kvalitě potravin není kompenzována rovnocenným zvýšením dostupné zemědělské půdy nebo jiných zdrojů, jako je například voda. Naproti tomu oblast zemědělské půdy na jednoho obyvatele v posledních 50 letech dramaticky poklesla. Zemědělci ve svém úsilí o dodávku bezpečného a hojného zásobování potravinami musí čelit různým výrobním problémům, jako je hrozba, kterou představuje hmyz, škůdci, plevele a houby během vegetačního období, a i po sklizni. K tomu jsou vyvíjeny různé technologie, včetně používání pesticidů (Hideo a kol., 2007). Současně s tím aplikace pesticidních přípravků představuje celosvětově jeden z významných negativních faktorů, který je spojen s intenzifikací zemědělské produkce (Ceresena Research, 2012). Účinné látky pesticidů a jejich metabolitů se mohou kumulovat v různých složkách životního prostředí a vést přímo i nepřímo k různým zdravotním rizikům u necílových organismů v životním prostředí i u člověka (Bermudez-Saldana a kol., 2005; Abrantes a kol., 2010). Pesticidy kontaminují významně také vodní ekosystém, ve kterém se tyto látky

hromadí a dále se rozkládají na mnohdy rizikovější sloučeniny – metabolity (Ceyhun a kol., 2010).

Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), jakožto představitele necílových organismů konkrétně raků, kteří vypovídají svojí bioindikační hodnotou. Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl hodnocen na základě růstu, chování, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů, ontogenetického vývoje a výskytu deformací. Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika vlivu metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA pro vodní ekosystém.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

Definice pojmu „pesticid“ nenachází z celosvětového pohledu stejný význam v některých oblastech. Zejména v humánní medicíně existuje jakási shoda s pojmem terapeutické přípravky, kde jsou například fungicidy využívány i jako terapeutické přípravky (Velíšek a kol., 2018a).

Pesticidy jsou látky původu organického či anorganického, používané k hubení rostlinných a živočišných škůdců, parazitických hub, k ochraně rostlin, skladových zásob, technických produktů, domů, bytů, výrobních závodů, zvířat i člověka (Cremllyn, 1985). Z hlediska jejich původu je lze rozdělit na látky přírodního původu, syntetické a biopreparáty (Zapletal a kol., 2001). Rostlinný pesticid je látka přirozeně produkovaná rostlinami, které se jimi brání vůči hmyzu a patogenním mikrobům (Stersen, 2004).

Pesticidy se často rozdělují do několika skupin, v rámci skupin se liší schopností hubení určitého druhu škůdce. Dle Zapletala a kol. (2001) je dělíme na:

- Aficidy: přípravky určené k hubení mšic.
- 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.
- Graminocidy: přípravky určené k zastavení růstu jednoděložných trav (retardace trávy) ve dvouděložných rostlinách a dřevinách.
- Herbicidy: pesticidy určené k hubení rostlin (plevelů).
- Insekticidy: přípravky určené k hubení hmyzu (dezinsekce).
- Molluskocidy: prostředky určené k hubení měkkýšů.
- Nematocidy: prostředky určené k hubení hlístic a jiných červů.
- Piscicidy: přípravky určené k hubení ryb.
- Rodenticidy: přípravky určené k hubení hlodavců (deratizace).

Dělení pesticidů založené na způsobu aplikace (Pitter, 1999):

- Postřiky – aerosoly: slouží k aplikaci tekutiny ve formě kapek.
- Fumiganty: slouží k aplikaci chemické látky ve formě par nebo plynů.
- Popraše: slouží k aplikaci práškových ochranných prostředků.
- Pevné a tekuté nástrahy: potěrové nástrahy, především k hubení hlodavců.
- Mořidla: přípravky pro předset'ovou ochranu semen.
- Nátěry a impregnace: přípravky používané především k ochraně dřeva před dřevokaznými škůdci, plísněmi a houbami.

Dělení pesticidů podle působení na cílový organismus (Neuman a kol., 1989; Pitter, 1999):

- Kontaktní (dotykové) – účinná látka zůstává na povrchu rostliny či škůdce, působí pouze v místě zasažení postřikem, jejich účinky úzce souvisí s povětrnostními podmínkami.
- Systémové – účinná látka proniká do buněk rostliny či škůdce, je rozváděna cévním systémem. Jejich účinek není závislý na povětrnostních podmínkách.

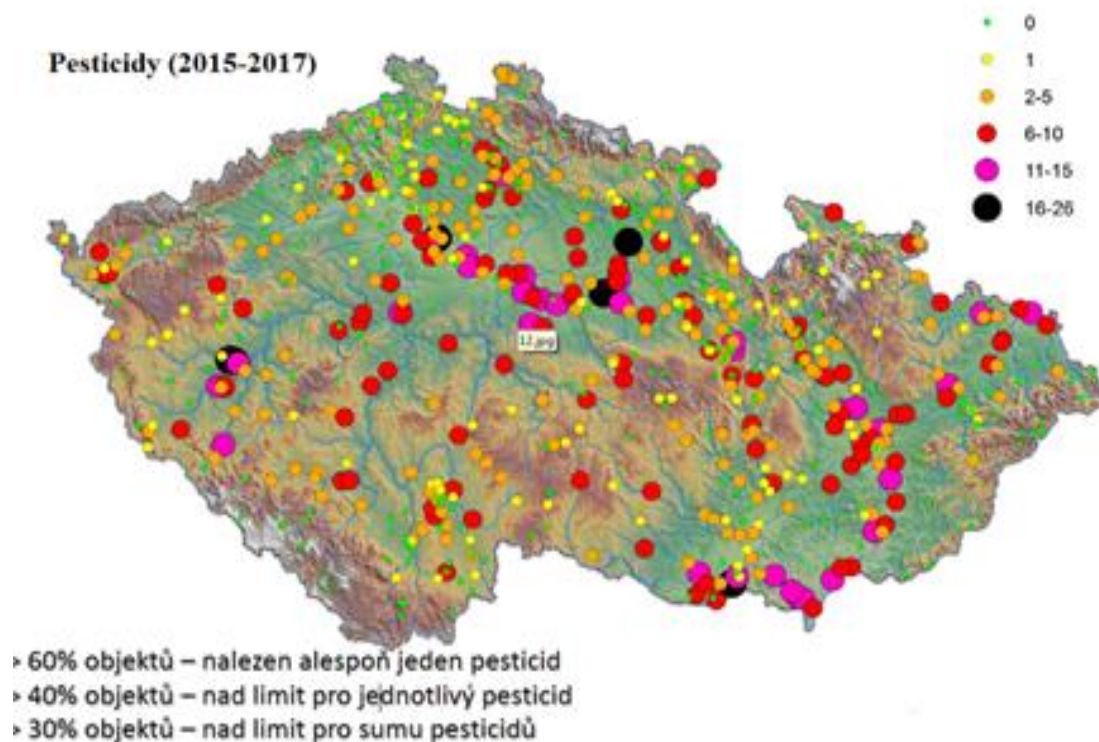
Dělení pesticidů podle chemické povahy (Pitter, 1999):

- Organofosfáty.
- Karbamáty.
- Chlororganické sloučeniny.
- Syntetické pyretridy.
- Fenoly.
- Morfoliny.
- Azoly.
- Aniliny.
- Sloučeniny arsenu.
- Sloučeniny na bázi nikotinamidu.

Mezi první ochranu plodin v minulosti byla využívána síra (plynná dezinfekce) k ochraně plodin a odpuzování hmyzu, později se využívali sloučeniny arsenu, olova a rtuti k ochraně plodin a skladovaných zásob. V 15. století byla izolována sloučenina nikotinu (sulfát nikotin) z tabákových listů, která se začala používat jako insekticid (Cremlyn, 1985). Ve 30. letech 20. století začala s rozvojem moderní syntetické chemie i výroba pesticidů, k jejímu hromadnému rozvoji došlo po druhé světové válce. V roce 1939 doktor Paul Müller objevil insekticidní účinky dichlordifenyltrichlorethanu (DDT) (Carson, 1962). DDT byl prvním účinným syntetickým pesticidem a měl všechny dobré vlastnosti pro insekticid, který si kdokoliv v té době dokázal představit. Je extrémně stabilní a pouze jedno ošetření stačilo pro dobrou kontrolu hmyzích škůdců. Dalším z mnoha kladných aspektů byla jeho nízká cena. Jako nástroj antimalarických kampaní byl mimořádně účinný (Stersen, 2004). Koncem druhé světové války byl používán k boji proti chorobám přenášeným hmyzem, zemědělským a domácím škůdcům. Produkce dosáhla maxima v roce 1963, konkrétně v USA se jednalo o množství 80 miliónů kg (Woodwell a kol., 1971). V roce 1962 poukázala Rachel Carson na negativní vliv DDT na ekosystém (Carson, 1962).

Po použití pesticidů dochází v prostředí k jejich rozkladu. Tento proces je ovlivněn řadou fyzikálně-chemických faktorů a jejich účinků. Ze skupiny fyzikálních faktorů se jedná o teplotu nebo sluneční záření, z chemických poté o oxidačně – redukční reakce a hydrolýzu. Mimo těchto faktorů se podílely i vlivy biologické (např. činnost mikroorganismů). Při degradačních procesech pesticidů vznikají metabolity, které mohou ztratit svůj původní účinek. Avšak tyto metabolity mohou být dokonce v některých případech toxičtější, než byly účinné látky (Velíšek a kol., 2018a).

Pesticidy se mohou ve vodách vyskytovat rozpuštěné nebo nerozpuštěné a mohou být sorbovány na nerozpuštěných látkách organických i anorganických a také mohou podléhat rozkladu. Výskyt pesticidů je vázán především na povrchové vody (Obr. č. 1), méně na podzemní vody díky sorpci půdy (Pitter, 1999). V současné době se stále častěji zjišťují pesticidy a jejich metabolity v podzemních vodách (Moulišová a kol., 2018). Pesticidy vstupují do vodních útvarů pomocí difuze včetně podpovrchového a povrchového odtoku, kde množství přepravované do povrchových vod závisí na mnoha faktorech, jako jsou půdní vlastnosti, topografie, klima (teplota, srážky, vlhkost a vítr), plodiny a vlastnosti pesticidů (Le a kol., 2017).



Obr. č. 1: Počet pesticidů detekovaných v tocích ČR v letech 2015 až 2017

(ČHMÚ, 2019).

Bylo prokázáno, že látky jakož jsou pesticidy, jsou velmi závažnými kontaminanty vodního prostředí a nesou s sebou riziko pro všechny vodní organismy (Svobodová a kol., 2007). Častou příčinou akutních otrav zaznamenaných v 60. až 80. letech minulého století byly pesticidy a tvořily 3 až 6 % úhynů. V současné době jsou takovéto otravy pozorovány jen ojediněle (Velíšek a kol., 2018a). V rybářství a ve vodním hospodářství byly a jsou používány některé pesticidy určené k (Velíšek a kol., 2018a):

- likvidaci vodních rostlin – Roundup Biaktiv, Reglone, Gramoxon (zakázán v roce 2007),
- redukci nadměrného rozvoje dafniového zooplanktonu – Soldep (zakázán v roce 2000), Diazinon 60EC (zakázán v roce 2011),
- léčbě parazitárních onemocnění – na bázi pyretroidů (deltamethrin, cypermethrin), Soldep, Kuprikol,
- likvidaci obaleče dubového (*Tortrix viridana*) na semenných porostech dubů na hrázích rybníků – pesticidy na bázi pyretroidů.

2.1.1. Herbicidy

Herbicidy jsou nejvíce využívanými pesticidy z celkového množství využívaných pesticidů. Tvoří 45 až 50 % produkce všech pesticidů. Jsou to látky sloužící ke kontrole či eliminaci nežádoucích rostlin. Herbicidy jsou využívány také jako prevence zaplevelení porostů kulturních rostlin. Jedná se o látky organického či anorganického původu (Neuman a kol., 1989).

Herbicidy jsou produkovány za účelem hubení rostlin. Ačkoliv se rostlinné buňky liší od živočišných buněk, je obtížné produkovat herbicidy, které nejsou toxické pro zvířata (Saunders a Harper, 1994). Herbicidy se aplikují na 92 až 97 % výměry osázené kukuřicí, bavlnou, nebo sójou (Sternsen, 2004). Hlavním důvodem značného úspěchu moderních herbicidů je jejich selektivní fyto toxický účinek (Cobb a Reade, 2010).

První významný organický herbicid Sinox byl vyvinut ve Francii v roce 1896. Koncem 40. let 20. století byly vyvinuty nové herbicidy. Z výzkumu během 2. světové války začalo období takzvané éry zabijáků plevelů (Nemá to být v uvozovkách?). Před zavedením selektivního herbicidu 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina) ve 40. letech minulého století bylo potlačování plevelů v zemědělských plodinách dosahováno především mechanicky. Od té doby se zvyšuje počet účinných herbicidních látek (Soloneski a Larramendy, 2011). Během 20. let pak bylo syntetizováno, vyvinuto a uvedeno do praxe více než 100 nových chemických látek. Zejména rok 1945 byl klíčem k rozvoji selektivní regulace chemických plevelů. Dále byly zavedeny 2,4,5-T (kyselina 2,4,5-trichlorfenoxycetová) a IPC (isopropyl-N-fenylkarbamát) (Britannica, 2019). Některé z těchto dřívějších herbicidů, včetně 2,4,5-T, byly později považovány za nebezpečné pro lidi a životní prostředí a v mnoha zemích byly zakázány. V roce 1962 Rachel Carson popsala ve své publikaci „*Silent spring*“ negativní vliv DDT na ekosystém a organismy v něm žijící. Tato publikace má spojitost se zákazem používání některých pesticidních přípravků (Carson, 1962). Mimo jiné došlo na základě těchto informací ke sledování reziduí pesticidů, ke zkoumání vlivu na živé organismy a také k rozvoji analytických metod pro sledování pesticidů a jejich metabolitů v ekosystému (Velíšek, kol., 2018a). Účinné herbicidy se nadále vyvíjejí a některé, jako například glyfosát (N-(phosphonomethyl)glycine), jsou široce používány po celém světě. Chemickou látku glyfosát označuje Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny za pravděpodobně

karcinogenní a rakouští poslanci v březnu 2019 schválili zákaz používání glyfosátu (Britannica, 2019).

Herbicidy lze rozdělit dle jejich mechanismu účinku, a to zejména z hlediska inhibice některého důležitého biochemického procesu v rostlině. Hlavní inhibované procesy jsou například inhibice fotosyntézy, inhibice syntézy aminokyselin či buněčného dělení (Ecobichon, 1991).

Dle doby aplikace lze herbicidy rozdělit na předset'ové herbicidy aplikované před samotnou výsadbou rostlin, preemergentní herbicidy, kdy je aplikace zavedena po vysetí rostliny do doby před jejím vzejitím, a dále pak na postemergentní herbicidy aplikované až po vzejití rostliny (Mikulka a kol., 2005).

Mezi mnohé další dělení herbicidů patří dělení podle způsobu aplikace, a to ať už aplikace na samotnou rostlinu nebo aplikace na půdu (Zapletal a Nepejchalová, 2001).

Dle selektivity se herbicidy dělí na selektivní a totální. Totální herbicidy mají vliv na všechny ošetřené rostliny. Naproti tomu herbicidy selektivní působí zejména na cílové rostliny (Mikulka a kol., 2005).

Do skupiny herbicidů se také zařazují prostředky, které mají defoliační a desikační účinky, které se používají k systematickému ukončení vegetace (Zapletal a kol., 2001).

Nejčastěji se herbicidy dostávají do vodního prostředí nepřímou cestou, a to zejména splachy z polí při prudkých srážkách. Herbicidní látky se často dostávají do povrchových vod, a dokonce se mohou dostat do podzemních vod a kontaminovat je. Riziko těchto látek kontaminujících vodní prostředí spočívá v nebezpečí kumulace v ekosystému a následná degradace, při které mohou vznikat látky rizikovější než s původním charakterem (Svobodová a kol., 1992). V povrchových vodách ČR jsou nejčastěji nalézána rezidua pesticidů na bázi triazinů (atrazin a jeho metabolity, hexazinon, simazin, terbutylazin, terbutryn), chloracetanilidů (metolachlor, alachlor), derivátů kyseliny fenoxycetové, organofosfátů (diazinon), karbamátů (karbofuran) a derivátů močoviny (diuron, chlorotoluron, linuron) (Sehonová a kol., 2012).

Metabolismus herbicidu

Metabolismus herbicidu byl v posledních desetiletích dobře zdokumentován, a bylo dosaženo velkého pokroku v našem chápání zapojených enzymových systémů, a kde konkrétně v rostlinné buňce působí (Stersen, 2004).

Metabolismus herbicidů má čtyři fáze (Stersen, 2004):

- Bioaktivace – proces, při kterém se „pro-herbicidy“, často herbicidně neaktivní molekuly, enzymaticky přeměňují na fytotoxické sloučeniny v rostlinné buňce. Mnohé herbicidy jsou tedy formulovány jako neaktivní hydrofobní estery, které jim umožňují proniknout do voskovité listové kůžičky. Esterová hydrolýza pak odhalí biologicky aktivní kyselinu nebo alkoholové skupiny.
- Metabolický útok – fáze metabolismu, která má za cíl zavést nebo odhalit chemicky aktivní skupiny, jako je – OH nebo – COOH, které mohou být podrobeny dalším reakcím. Nejběžnějším způsobem, jakým herbicidy napadají rostliny, je hydroxylace aromatických kruhů nebo alkylových skupin skupinou enzymů známých jako oxidázy cytochromu P450.
- Konjugace – v této fázi metabolismu herbicidů se molekula stává konjugovanou s metabolity přírodních buněk, jako jsou aminokyseliny, cukry, organické kyseliny nebo tripeptid glutathion (y glutamyl – cysteinyl – glycin). To má za následek jak další snížení fytotoxicity, tak zvýšení rozpustnosti herbicidu nebo jeho metabolitu, který může také sloužit k cílení konjugátu na vakuolu.
- Sekvestrace – sekvestrace herbicidního metabolitu probíhá podobně jako produkty sekundárního metabolismu rostlin pro skladování. Místo pro skladování je nebo není vakuola ve spojení s buněčnou stěnou.

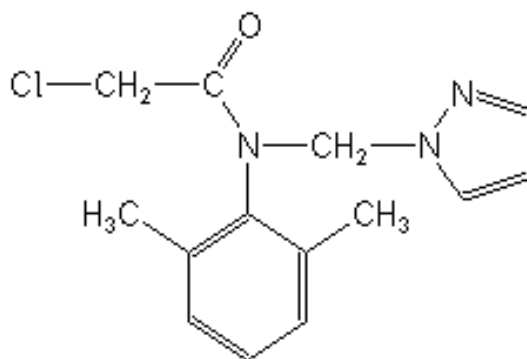
Mechanismus účinku herbicidů

Rozhodující význam pro účinek herbicidů na jednotlivé plevely má mechanismus působení (biologická aktivita herbicidu). Zcela elementárně lze rozdělit herbicidy podle biologických účinků na regulátory rostlinných hormonů, inhibitory buněčného dělení, inhibitory fotosyntézy, narušování buněčných membrán a inhibitory hlavních buněčných mechanismů (Radosevich a kol., 1997). Podle evropské klasifikace HRAC (z angl. *Herbicide Resistance Action Committee*), se člení mechanismy účinku do 15 hlavních skupin A-P (Z), které se dělí na podskupiny (C1, C2, C3; F1, F2, F3; K1, K2, K3) podle

místa a mechanismu účinku, podobnosti symptomů a příslušnosti k chemické skupině. Ve třídě „Z“ jsou uvedeny neobjasněné a přesně nezařazené způsoby účinku herbicidů. V systému HRAC nejsou zařazeny třídy s názvy „J“ a „Q“ aby se zabránilo možné záměně se třídami „I“ a „O“ (Mikula a kol., 2005).

2.1.2. Metazachlor

Metazachlor je selektivní herbicid určený k hubení jednoděložných i dvouděložných plevelů v řepce olejce a v jiných brukvovitých rostlinách, využívá se zejména jako preemergentní herbicid (Agromanuál, 2019). Systematický název metazachloru je 2-chloro-N-(2,6dimethylphenyl)-N-(1 H-pyrazol-1-ylmethyl) acetamide (Obr. č. 2) (ČHMÚ, 2019). Metazachlor patří do skupiny chlor acetanilidových a pyrazolových sloučenin, které se používají jako herbicidy. Působí jako inhibitor v biosyntéze lipidů a má vliv na buněčné dělení a diferenciaci tkání rostlin. Metazachlor je přijímán hlavně kořeny, hypokotyle a kotyledony klíčících a vznikajících plevelů (EFSA, 2014). Při účinku metazachloru na biosyntézu lipidů narušuje syntézu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA – z angl. *Very-long Chain Fatty Acid*) v rostlinách ireverzibilní inhibicí VLCFA elongázy (Eckermann, a kol., 2003; Tomlin, 2004). Začlenění mastných kyselin do buněčné membrány je membrána inhibována a ztrácí svou tuhost a propustnost. To vede ke zhoršenému dělení buněk a v důsledku toho je inhibován růst autotrofních organismů. Tento účinek byl zjištěn u vyšších rostlin a některých řas (Böger, 2003).



Obr. č. 2: Strukturální vzorec látky metazachlor (upraveno z ČHMÚ, 2019).

Vlastnosti látky metazachloru (FAO, 1999):

- Molekulová hmotnost: 277,753 g.mol⁻¹.
- Rozpustnost (voda): minimum 430, maximum 450 mg.l⁻¹.
- Poločas rozpadu (půda): min. 3, max. 21 dny.
- Rozdělovací koeficient oktanol – vod (KOW): min. 2,13, max. 2,49.
- Půdní adsorpční koeficient (KOC): min. 54, max. 54.

Účinná látka metazachlor je obsažena v následujících přípravcích (Agromanuál, 2019) a jejich registrace dle registru přípravků na ochranu rostlin (EAGRI, 2019):

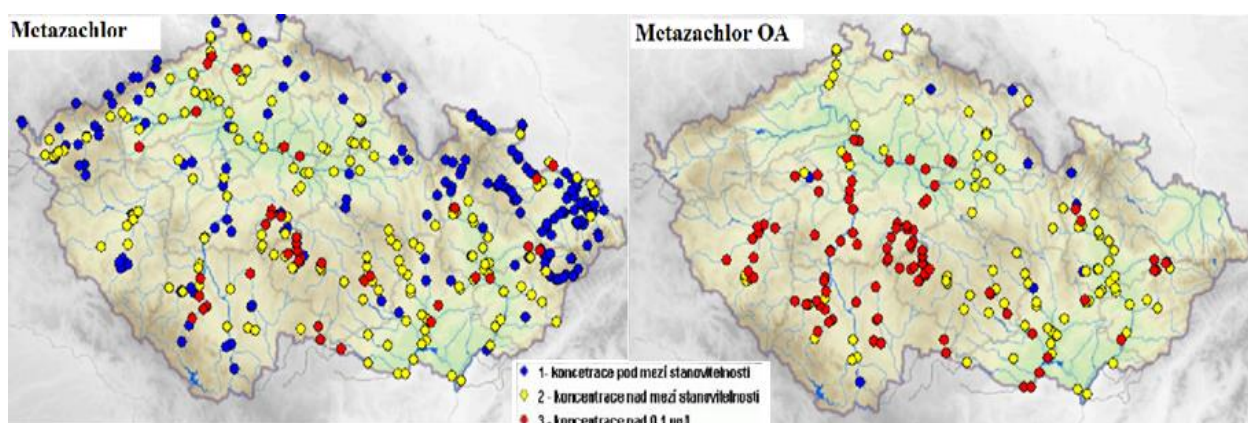
- Autor (500 g.kg⁻¹), registrace do 31. 7. 2020,
- Butisan S 50 SC (500 g.kg⁻¹), registrace skončila 31. 5. 2015,
- Butisan Star (333 g.kg⁻¹), registrace do 31. 7. 2020,
- Butisan 400 SC (400 g.kg⁻¹), registrace do 31. 7. 2022,
- Fuego (500 g.kg⁻¹), registrace ukončena 31. 5. 2015,
- Sultan 50 SC (500 g.kg⁻¹), registrace do 31. 7. 2020.

Tyto herbicidy, které obsahují metazachlor, se používají zejména k ochraně kulturních plodin, jako je řepka olejka a jiné brukvovité rostliny (Agromanuál, 2019).

Množství metazachloru aplikovaného v ČR za rok 2016 dosáhlo 164 607,79 kg. Téměř většina byla použita na ošetření olejnin, ze kterých se nejvíce jedná o řepku olejku. Největší nárůst ve spotřebě této látky byl v roce 2008, kdy byla zaznamenána i nejvyšší spotřeba na našem území, a ta činila 186 705,29 kg (ČHMÚ, 2019). Pro porovnání v roce 2003 byla spotřeba metazachloru ve Spojeném království 177 550 kg (Mohr a kol., 2008).

Osud metazachlorového herbicidu v životním prostředí byl zkoumán v polních podmínkách na pěstovaných a nekultivovaných pozemcích řepky po dobu 225 dnů. Herbicid byl detekovatelný v půdě až 170 dní po aplikaci, zatímco rychlost rozptylu byla nejlépe popsána kinetikou 1. řádu a její poločas rozpadu byl v rozmezí 10,92 až 12,68 dní (Mantzos a kol., 2016). Metabolity metazachloru jsou metazachlor OA (C₁₄ H₁₅ N₃ O₃) a metazachlor ESA (C₁₄ H₁₇ N₃ O₄ S) (ČHMÚ, 2019).

Českým hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) každoročně monitoruje výskyt metazachloru v povrchových vodách ČR (Obr. č. 3). Nejvyšší koncentrace nalezena v tocích ČR byla 22 µg.l⁻¹ v roce 2012 (ČHMÚ, 2019).



Obr. č. 3: Výskyt metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA v povrchových vodách ČR v roce 2017 (ČHMÚ, 2019).

Metazachlor je klasifikován jako H400 a H410 označující akutní a chronické nebezpečí pro vodní prostředí. Řasy a vyšší vodní rostliny, které mají vysoké a konstantní množství VLCFA, jsou nejvíce náchylnými organismy k poškození. Například Mohr a kol. (2007) prokázali, že jednorázová expozice několika vodních makrofytů vůči metazachloru v koncentracích vyšších než $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ měla dlouhodobé účinky na vodní biotu. V této studii se ani po 140–170 dnech makrofyty neobnovily.

Toxicita metazachloru pro některé organismy (FAO, 1999; ČHMÚ, 2019):

- LD50 (letální dávka) – krysa obecná (*Ratus ratus*): 2075 mg.l^{-1} .
- 4hLC50 (letální koncentrace) inhalačně – krysa obecná: $> 34,5 \text{ mg.l}^{-1}$.
- 96hLC50 – pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*): $8,5 \text{ mg.l}^{-1}$.
- 96hLC50 – kapr obecný (*Cyprinus carpio*): 15 mg.l^{-1} .
- 48hEC50 (efektivní koncentrace) – hrotnatka velká (*Daphnia magna*): 33 mg.l^{-1} .
- 96hEC50 – chlorella: $1,63 \text{ mg.l}^{-1}$.

V rámci některých studií byl u metazachloru prokázán negativní vliv na některé vodní organismy. Byla provedena dlouhodobá studie s cílem prozkoumat vlivy metazachloru na potoky a společenství rybníků. Do toků byly dávkovány koncentrace metazachloru v koncentracích 5, 20, 80, 200 a $500 \mu\text{g.l}^{-1}$ a vodní společenství bylo monitorováno po dobu 140 dnů. Bylo zjištěno, že metazachlor významně ovlivňoval potoky a komunity rybníků v koncentracích vyšších než $5 \mu\text{g.l}^{-1}$. Negativní účinky byly nejvýraznější u zelených řas (Chlorophyta), zatímco rozsivky (Diatomeae) a skrytěnky (Cryptophyta) se

zdály být necitlivé. Účinky na zooplankton byly způsobeny změnami ve struktuře stanovišť v důsledku silného poklesu makrofytů. Pomalá degradace metazachloru v kombinaci s nepřítomností regenerace jak řas, tak i makrofyt, pravděpodobně způsobuje dlouhodobé účinky vůči vodním organismům a ekosystému (Mohr a kol., 2007). Podobný výsledek uvádí i Udo a kol. (2003), kteří popisují, že výskyt chloracetanilidů ve vodních systémech selektivně ovlivňují sukcesi fytoplanktonu a inhibují citlivé druhy. Na základě studie bylo poukázáno, že zelené řasy byly selektivně ovlivněny v prostředí s metazachlorem, zatímco rozsivky, skrytěnky a jiné řasy se zdály být necitlivé k metazachloru, což vedlo k posunu abundance těchto druhů.

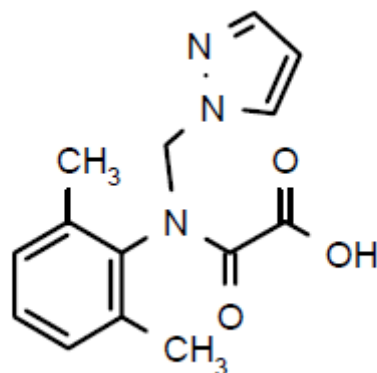
Jurčíková a kol. (2007) popisují ve své studii vliv herbicidu Butisan 400 SC (aktivní látka 36,5 % metazachloru) na proces vitellogeneze u juvenilních danií pruhovaných (*Danio rerio*). Expozice ryb přípravkem Butisan 400 SC o koncentraci 5 mg.l⁻¹ vedla k signifikantní indukci procesu vitellogeneze u exponovaných ryb.

Studie na zvířatech ukázaly, že metazachlor může způsobit poškození jater, ledvin a krevního obrazu při opakovaném perorálním podání. V dlouhodobých studiích nebyla zjištěna karcinogenita. Studie na zvířatech neprokázaly jakékoli známky teratogenity a ovlivnění reprodukce. Metazachlor nevykazoval žádné mutagenní vlastnosti v různých testovacích systémech (*in vitro* a *in vivo*). Ekotoxikologické účinky metazachloru byly zkoumány s použitím různých druhů z hlavních ekologických skupin. Výsledky ukázaly, že metazachlor není nebezpečný pro půdní mikroflóru, žížaly, ptáky a včely (FAO, 1999).

2.1.3. Metabolit metazachlor OA

Hlavními degradačními produkty metazachloru ve vodním prostředí jsou metazachlor ESA [N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(1H-pyrazol-1-ylmethyl) aminocarbonylmethylsulfonic acid] a metazachlor OA [[N-(2,6-dimethylphenyl) -N-(1H-pyrazol-1-ylmethyl) oxalamide]. Metazachlor má poločas rozpadu v půdách 5 až 30 dní, a degraduje na kyselinu oxanilovou (OA), kyselinu ethansulfonovou (ESA) a deriváty (Lewis a kol., 2016; Hvězdová a kol., 2018).

Metazachlor OA má systematický název: N-(2,6dimethylphenyl)-N-(1H-pyrazol-1-ylmethyl) oxalamide a chemický vzorec: C₁₄ H₁₅ N₃ O₃ (Obr. č. 4).



Obr. č. 4: Strukturální vzorec metabolitu metazachloru OA (upraveno z ČHMÚ, 2019).

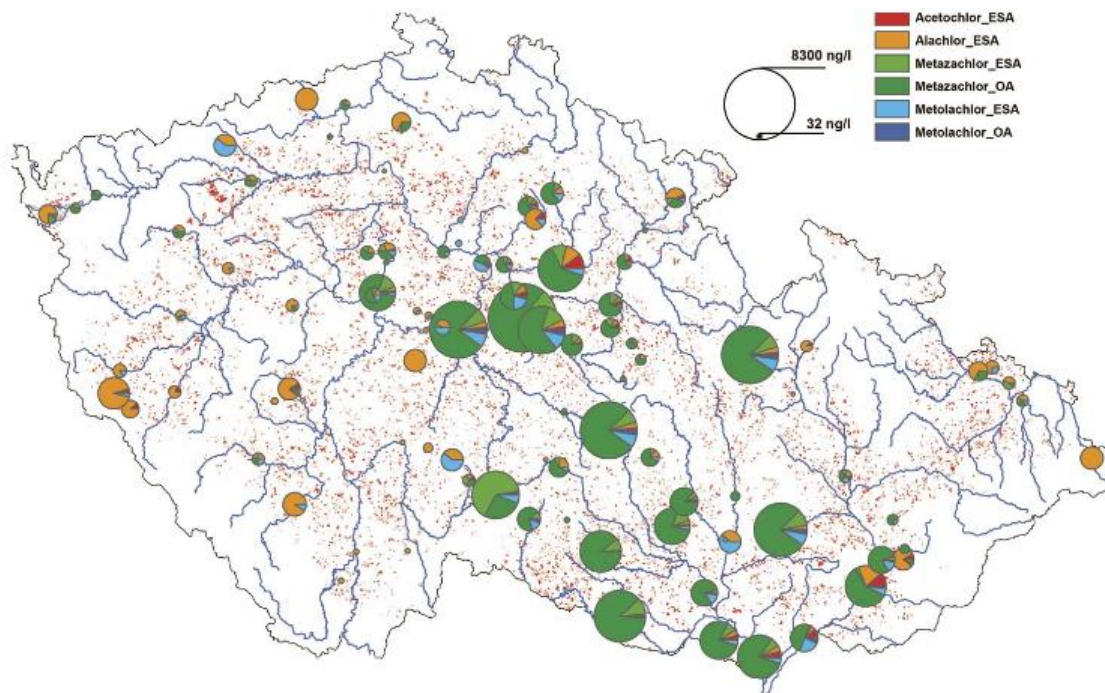
Toxicita metabolitu metazachloru OA (ČHMÚ, 2019):

- LD50 – krysa obecná: 2200 mg.l⁻¹.

Vlastnosti metazachloru OA (ČHMÚ, 2019):

- Molekulová hmotnost: 273,29 g.mol⁻¹.
- Poločas rozpadu (půda): minimum 96,3, maximum 96,3 dny.
- KOC: min. 18,9, max. 18,9.

Českým hydrometeorologický ústav každoročně monitoruje výskyt metazachloru OA v povrchových vodách ČR (Obr. č. 3). Nejvyšší koncentrace metazachloru OA nalezena v tocích ČR byla 3,2 µg.l⁻¹ (ČHMÚ, 2019). Ulrich a kol. (2018) našli nejvyšší koncentraci metazachloru OA v povrchových vodách 1,8 µg.l⁻¹. V rámci 1. etapy národního monitorování pesticidů a jejich metabolitů v pitné vodě v ČR v roce 2017 bylo odebráno celkem 362 vzorků pitné vody (177 vzorků na jaře a 185 vzorků na podzim). Metabolit metazachlor OA v 68 vzorcích (Obr. č. 5) překročil hodnotu 0,1 µg.l⁻¹ (Moulisová a kol., 2018).



Obr. č. 5: Výskyt několika metabolitů (acetochlor ESA, alachlor ESA, metazachlor ESA, metazachlor OA, metolachlor ESA a metolachlor OA) v pitné vodě v ČR v roce 2017 (Moulisová a kol., 2018).

2.2. Raci

Raci patří mezi korýše řádu Decapoda a infrařádu Astacida (někdy též Astacoidea). Infrařád je tvořen nadčeledi Enoplometopoidea, Nephropoidea, Astacoidea a Parastacoidea. První dvě nadčeledi zahrnují mořské humry, zbývající dvě nadčeledi zahrnují sladkovodní raky. V současnosti známe přes 600 druhů raků (Kozák a kol., 2013).

2.2.1. Testy toxicity na racích

Raci, jakožto zástupci velkých korýšů, jsou charakterizováni jako významní obyvatelé tekoucích i stojatých vod. Ve správně fungujícím ekosystému hrají klíčovou roli, jsou důležitou komoditou akvakultury a jsou také považováni za významné indikátory znečištění vodního prostředí (Momot, 1995).

Raci tvoří významnou složkou ekosystému (Buřič a kol., 2013). Raci patří k největším bezobratlým živočichům tekoucích i stojatých sladkých vod. Jako všežraví živočichové

se širokým spektrem přijímané potravy jsou ve vodním prostředí nezastupitelní. Jejich absence v současné sladkovodní fauně či oslabení jejich populací se bezesporu odráží i v posunech kvality vodního prostředí a struktury biologických společenstev (Kozák a kol., 2013).

Testy toxicity na racích vychází ze stejných principů jako testy s ostatními organismy žijícími ve vodním prostředí. K testům je nejčastěji využíván rak signální (*Pacifastacus leniusculus*) a rak červený (*Procambarus clarkii*) (Kouba a kol., 2012; Buřič a kol., 2013). Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*) má díky svému rychlému růstu, dospívání, vysoké plodnosti, krátké době inkubace a produkci geneticky uniformního potomstva značný potenciál stát se modelovým organismem v cytologických, vývojových, neurobiologických, epigenetických, toxikologických a dalších studiích (Vogt, 2008, 2010, 2011).

V zemích EU je stále více dbáno na využívání konceptu tzv. 3R (z angl. **R**eplace, **R**educe, **R**efine). Samotný koncept existuje více jak 60 let, avšak v ČR k jeho významnějšímu používání, rozvoji alternativních metod, nárůstu a jeho využívání došlo v posledních letech. Cílem této koncepce je omezit využití pokusných zvířat, hlavně obratlovců, v souladu s jejich ochranou a zároveň zvýšit používání nových, alternativních metod testování s přednostním využitím nižších organismů (např. bezobratlých a mikroorganismů) k testům toxicity. Proto by raci v budoucnu mohli hrát velice významnou roli při testování vlivu pesticidů a jejich metabolitů na vodní organismy a mohli by být využíváni jako vhodný bioindikátor znečištění vodního prostředí xenobiotiky, respektive pesticidy (Velíšek a kol., 2018b).

2.2.2 Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*)

Rak mramorovaný (Obr. č. 6) je sladkovodním rakem. De Grave a kol. (2009) jej zařazuje do řádu Decapoda, infrařádu Astacida, nadčeledi Astacoidea, čeledi Cambaridae, podčeledi Cambarinae, rodu *Procambarus*, druh *Procambarus virginalis*.

Rak mramorovaný je znám především díky svému způsobu reprodukce. Rozmnožuje se totiž prostřednictvím partenogeneze s tím, že samci u něj nejsou známi. Potomstvo jednotlivých samic je tudíž geneticky identické (Scholz a kol., 2003; Vogt a kol., 2004a,b; Martin a kol., 2007).

Rak mramorovaný patří mezi menší raky. Může dorůstat velikosti až 13 cm, obvykle je to však méně než 10 cm. Zbarvení tohoto druhu je typické mramorováním na hnědavém, tmavě hnědém nebo zeleném podkladě, které je patrné především na bocích hlavohruď. Hlavohruď je hladká s několika trny za týlní brázdou a jedním párem post orbitálních lišt. Rostrum je výrazné a jeho hladké okraje se sbíhají a tvoří malý trojúhelníkový vrcholek. Střední rýha rostra chybí. Klepeta jsou velmi malá a na svém povrchu jen slabě zrnitá. Pouze výjimečně jsou delší než 50 % délky hlavohruď a na spodní i svrchní straně není patrné mramorování. Obě zápěstí klepet mají na vnitřní straně silně vyvinutý trn (Holdich a kol., 2006). Jedná se o značně krátkověký druh. V laboratorních podmínkách se v průměru dožívá dvou let. K úhynu obvykle dochází v průběhu neúspěšného svlékání (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010). Mimo jiné je rak mramorovaný potenciálním přenašečem račího moru. Původcem onemocnění račího moru je parazit *Aphanomyces astaci* (Söderhäll a Ceresius, 1999). Pro naše původní druhy raků je račí mor vysoce infekční onemocnění působící velké úhyny (Štambergová a kol., 2009).



Obr. č. 6: Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*).

Rozšíření a popis biotopu

Rak mramorovaný je druhem původním v amerických státech Florida a Georgia (Taylor a kol., 2007; Dorn a Volin, 2009). V jeho domovině není doposud známa partenogeneticky se rozmnožující forma. Tato forma byla poprvé popsána až v Evropě, kde byla od poloviny 90. let minulého století dostupná v německých a rakouských akvaristických obchodech (Lukhaup, 2001) a mezi chovateli se od té doby rychle rozšířila. Neuvážené introdukce nezodpovědných chovatelů pak vedly ke vzniku životaschopných populací tohoto raka i ve volných vodách Evropy. V rámci svého původního areálu obývá rak mramorovaný nevysychající lokality se stojatou i tekoucí vodou a je znám budováním jednoduchých nor (Hobbs, 1989; Hendrix a Loftus, 2000; Dorn a Trexler, 2007).

Za optimální teplotu pro chov je považováno 18–25 °C, po dobu několika týdnů však dokáže tolerovat i teploty pod 8 a nad 30 °C. V tom případě však zastavuje svůj růst i reprodukci. V Evropě je jeho výskyt znám i z lokalit, které zamrzají. Na základě dosavadního poznání je patrné, že se jedná o značně tolerantní a adaptabilní druh (Holdich a kol., 2006; Kaldre a kol., 2012).

Samice se rozmnožují pouze apomiktickou partenogenezí (Martin a kol., 2007). Samci nebyli pozorováni ani při snaze o zvrát pohlaví, kdy byla vyvíjející se vajíčka i ráčata exponována samčímu pohlavnímu hormonu 17-methyl testosteronu (Vogt, 2007). Samice v závislosti na teplotě pohlavně dospívají poměrně záhy, již ve věku pouhých 25 až 35 týdnů (při teplotě 25, resp. 20 °C), kdy dosahují celkové délky těla okolo 40 mm. Při vhodných chovatelských podmínkách se opakovaně rozmnožují v průběhu celého roku s intervalem pouhých 8 až 9 týdnů. Plodnost samic roste s jejich velikostí. U malých samic chovaných v laboratorních podmínkách se plodnost pohybuje mezi 50 a 150 vajíčky, u větších samic to může být až 400 vajíček (Holdich a kol., 2006; Vogt, 2010). Vajíčka tohoto druhu jsou poměrně malá a dosahují velikosti v rozmezí 1,5–1,9 mm. Doba inkubace je velice krátká a při vyšších teplotách může být pouhé 2 až 3 týdny (Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006). Po prodělání dvou svlékání, kdy jsou ráčata přichycena na samičích pleopodech, dochází k započetí příjmu potravy a pozvolnému osamostatnění ráčat (Vogt a Tolley, 2004a; Vogt, 2008). Raka mramorovaného lze velice snadno chovat, což svědčí o jeho nenáročnosti na životní podmínky (Jimenez a Faulkes, 2010).

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl hodnocen za pomoci embryolarválního testu toxicity. Experiment probíhal v akvarijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie (LVTI), Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech (VÚRH), Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV JU).

3.1. Embryolarvální test toxicity

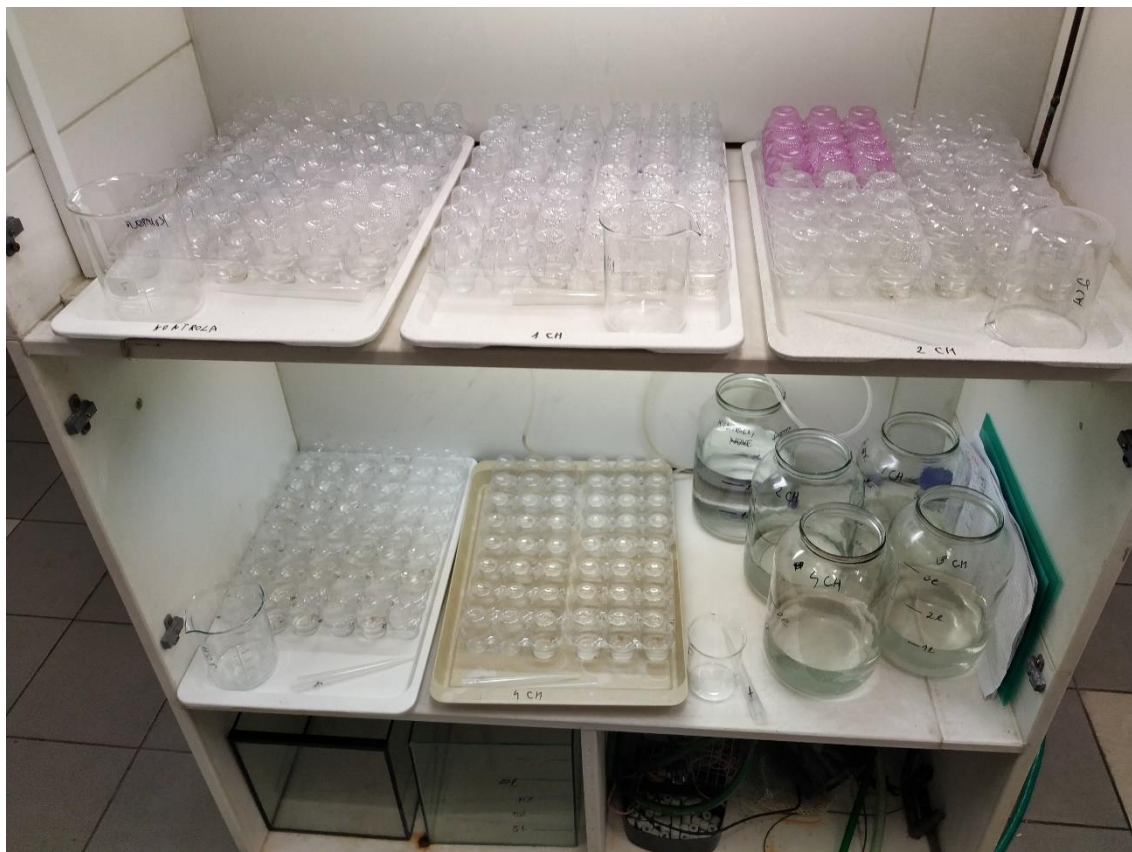
Testy toxicity na organismech vodního prostředí mají nezastupitelnou úlohu při hodnocení rizik chemických látek a přípravků včetně pesticidů pro vodní ekosystém. Snahou vodní toxikologie je hodnotit potencionální nebezpečí pro vodní ekosystém jako celku. Prakticky to znamená pět úrovní studovaného ekosystému, a to bakterie, řasy, bezobratlí, ryby a obojživelníci. K hodnocení ekotoxikologického rizika látek včetně pesticidů jsou vyžadovány výsledky testů toxicity na řasách, dafniích a rybách (Svobodová et al., 2010).

3.1.2. Princip a podmínky testu

Princip embryolarválních testů na racích vychází z principů testů na jiných vodních organismech, jako jsou například ryby. Všeobecným principem testů je vystavení testovaných organismů v definovaných podmínkách po stanovený čas různým koncentracím testované látky včetně kontroly, kde jsou organismy umístěny do vody bez testované látky. Po ukončení testu se odečte počet organismů vykazujících odpověď na testovanou látku, která se porovná s kontrolní skupinou. Zaznamenává se jak působení nepříznivé (toxicita), tak případné příznivé účinky (Svobodová a kol., 2010).

V rámci tohoto embryolarválního testu na racích byl testován vliv dvou látek a dvou koncentrací od každé z nich včetně jedné kontroly. V průběhu samotného testu je důležité udržovat jednotlivé koncentrace testované látky, nástrojem k tomu je pravidelná výměna lázně. Dále je nutné udržovat chemické parametry vody, jako je teplota, obsah kyslíku či pH. Při tomto testu se využila metoda semistatického systému po dobu 40 dní, kde raci byli umístěni v makrodeskách (Obr. č. 7). Během testu byli testovaní jedinci krmeni *ad libitum* (dle libosti) čerstvě vylíhnutými naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*).

Během testu byly sledovány letální účinky, růst jedinců a mimo jiné i výskyt malformací. Na konci testu bylo sledováno chování raků (rychlost chůze, ušlá vzdálenost a aktivita). Následně byli raci zváženi, a byl proveden odběr vzorků pro laboratorní stanovení oxidativního stresu a antioxidantních enzymů.



Obr. č. 7: Umístění nasazených raků v makrodeskách.

3.1.3. Experimentální materiál

Původní druhy raků vyskytujících se na území České republiky jsou řazeny mezi ohrožené druhy a jejich ochrana je v zájmu vnitrostátních a evropských předpisů. Proto by bylo jejich použití pro účely testů toxicity nejenom neetické, ale i nezákonné. Nejen z těchto důvodů jsou využívány zejména invazní druhy raků, v tomto případě rak mramorovaný, který je velice vhodným druhem pro toxikologické studie (Kozák a kol., 2011).

V této studii byla použita ráčata ve třetím stadiu embryonálního vývoje od jedné samice a jejich průměrná hmotnost činila $5,31 \pm 0,22$ mg. Do doby dosažení třetího

vývojového stadia, tzv. do doby přechodu na exogenní výživu, byli juvenilní jedinci inkubovaní spolu s matkou samice raka mramorovaného (Obr. č. 8). Samice z chovu FROV JU měla délku karapaxu 24,50 mm, délku postorbitálu 28,36 mm a hmotnost 6,4 g.



Obr. č. 8: Samice raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) použita k testu.

Pro test byly použity dvě látky, a to metazachlor o čistotě 99,7 % zakoupen od firmy Sigma-Aldrich Corporation (USA) a metazachlor OA o čistotě 98,7 % zakoupen od firmy Neochema GmbH (Německo). Aby byla zajištěna shoda mezi nominální a skutečnou koncentrací metazachloru a metazachloru OA ve vzorcích vody, byla provedena analýza pomocí tandemové hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) podle Ramos a kol. (2017). Ve vzorcích vody byl limit kvantifikace (z angl. *Limit of Quantification* – LOQ) metazachloru a metazachloru OA v rozmezí 0,01 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Naměřené hodnoty se od nominálních koncentrací nelišily o více než $\pm 9,11$ %. Analytické stanovení testovaných látek nebylo součástí práce a bylo provedeno formou služby.

3.2. Vlastní test

Do plastových makrodestiček o objemu 20 ml bylo individuálně vloženo 200 ráčat ve III. fázi vývoje. Pro test byly použity dvě koncentrace metazachloru, dvě koncentrace metazachloru OA a kontrola. Do každé skupiny bylo nasazeno individuálně 40 jedinců. Testované koncentrace byly následující:

M1 – metazachlor v koncentraci $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$;

M2 – metazachlor v koncentraci $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ (maximální skutečná koncentrace v české řece (ČHMÚ, 2019));

MOA1 – metazachlor OA v koncentraci $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ (maximální skutečná koncentrace v české řece (ČHMÚ, 2019));

MOA2 – metazachlor OA v koncentraci $22 \mu\text{g.l}^{-1}$;

C – kontrola (ředící voda bez přidaných chemikálií).

Makrodestičky byly umístěny do laboratoře se světelným režimem světlo: tma 12:12. Test byl semistatický s výměnou lázně třikrát týdně (Po, St, Pá) (Obr. 9). Parametry kvality vody byly následující: teplota $21,51 \pm 0,71 \text{ } ^\circ\text{C}$, nasycení rozpuštěným kyslíkem $> 89,75 \%$, pH 7,74-8,01. Teplota vody byla měřena každou hodinu pomocí Minikin loggerů (Environmental Measuring Systems, Brno, Česká republika).

Během testu byli raci denně kontrolováni za účelem sledování jejich mortality, ontogenického vývoje, morfologických anomálií a tělesné hmotnosti jednotlivých stádií. Stanovení vývojových stádií bylo určeno podle Vogt a kol. (2004a).

Na konci testu (po 40 dnech expozice) byla provedena analýza chování raků.



Obr. č.9: Pravidelná výměna lázně.

3.3. Chování

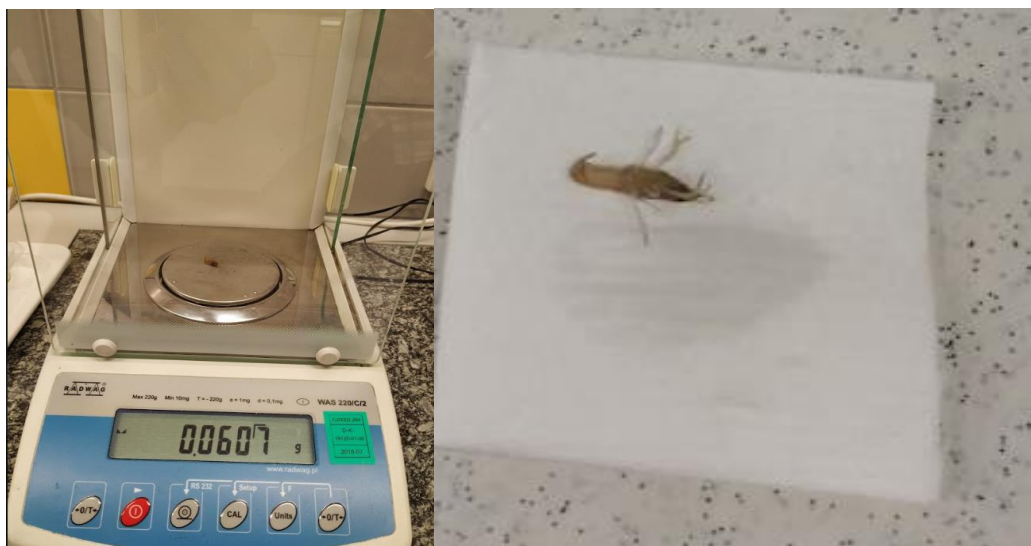
Na konci testu byla u všech přeživších raků provedena analýza chování (Obr. 10). Raci se umístili do bílých plastových misek (průměr 95 mm; výška 30 mm) předem naplněných 50 ml roztoku specifického pro danou experimentální skupinu (M1, M2, MOA1 a MOA2) a pro kontrolní skupinu jen ředící voda. Chování bylo zaznamenáváno pomocí videokamery Sony HDR-CX240E (Sony, Japonsko) po dobu jedné hodiny a následně analyzováno softwarem EthoVision® XT 13 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemsko). Na základě získaných údajů byla vyhodnocena aktivita v procentech (procento času stráveného pohybem), ušlá vzdálenost (cm) a rychlost chůze ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) pro jednotlivé experimentální skupiny a kontrolu.



Obr. č.10: Analýza chování raků po skončení testu.

3.4. Růst

V průběhu testu, ždy druhý den po svlečení (dosažení dalšího vývojového stupně), byli raci váženi na analytických vahách značky Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko). Samotné vážení probíhalo následovně: po odstranění přebytečné vody na filtračním papíru, byla celková hmotnost těla zvážena pomocí analytické váhy s přesností 0,1 mg (Obr. 11).



Obr. č.11: Vážení raků na analytických vahách.

Na konci testu došlo k vyhodnocení růstových parametrů raků. Pro vyhodnocení byla využita specifická rychlost růstu (SGR) a inhibice růstu (I).

Specifická rychlost růstu je podíl rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností raků při prvním vážení (5. den) a na konci testu (40. den testu). Výpočet byl proveden podle vzorce (OECD, 2000):

$$SGR = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

kde: SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině; w_1 , w_2 = hmotnosti jednoho raka v čase t_1 a t_2 , jednotlivě (g); t_1 = čas (dny) – začátek expozice (5 den); t_2 = čas – konec expozice (40 den)

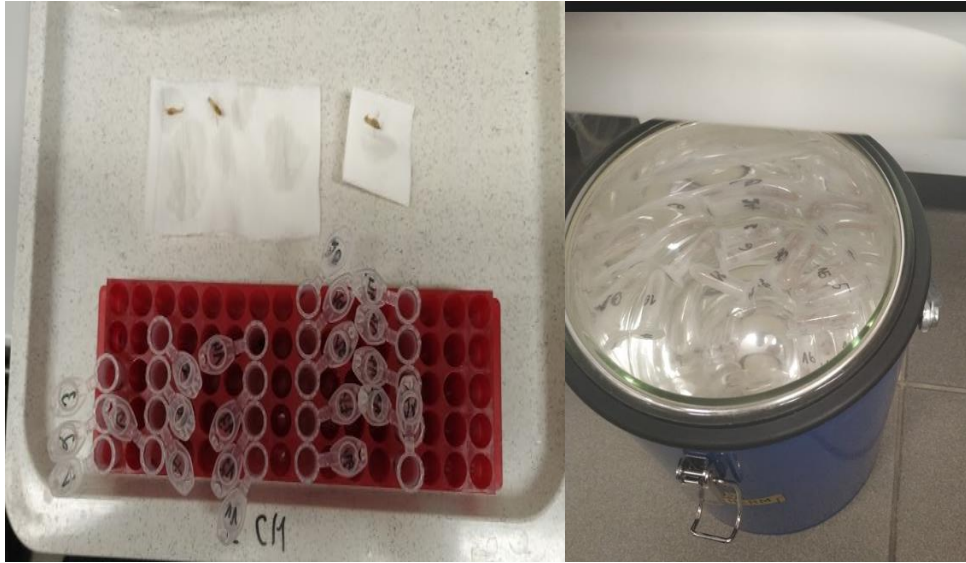
Inhibice růstu je podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontrolní skupiny raků a experimentální skupiny raků a průměrné specifické rychlosti růstu v kontrolní skupině raků po 40 dnech expozice, násobený stem. Výpočet byl proveden podle vzorce (OECD, 2000):

$$I_x [\%] = \frac{SGR_x(\text{kontrola}) - SGR_x(\text{skupina})}{SGR_x(\text{kontrola})} \cdot 100$$

kde: I = inhibice růstu v experimentální skupině po 40 dnech expozice; SRG (kontrola) = průměrná specifická rychlost růstu v kontrolní skupině; SRG (skupina) = průměrná specifická rychlost růstu v experimentální skupině raků po 40 dnech expozice.

3.5. Odběr vzorků pro biochemické analýzy

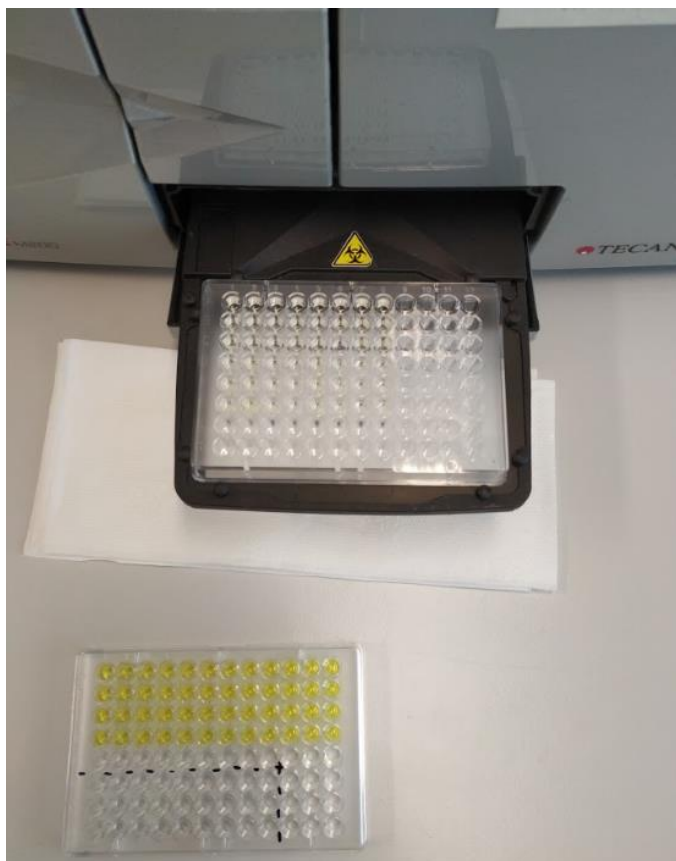
Po analýze chování byli raci zváženi a vloženi do mikrozkuvek, které jsme vložili do tekutého dusíku (Obr. 12). Tyto vzorky byly následně uchovány při teplotě -80 °C do dalšího zpracování.



Obr. č.12: Odběr vzorků pro biochemické analýzy.

3.6. Metody stanovení biomarkerů

Oxidační stres a antioxidační biomarkery byly hodnoceny mezi jednotlivými experimentálními skupinami po 40 dnech. Vzorky raků z celého těla z kontrolní a experimentálních skupin byly homogenizovány a připraveny pro hodnocení oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů podle Stará a kol. (2016). Všechny biomarkery byly měřeny spektrofotometricky (Infinite M200, Švýcarsko, Obr. 13).

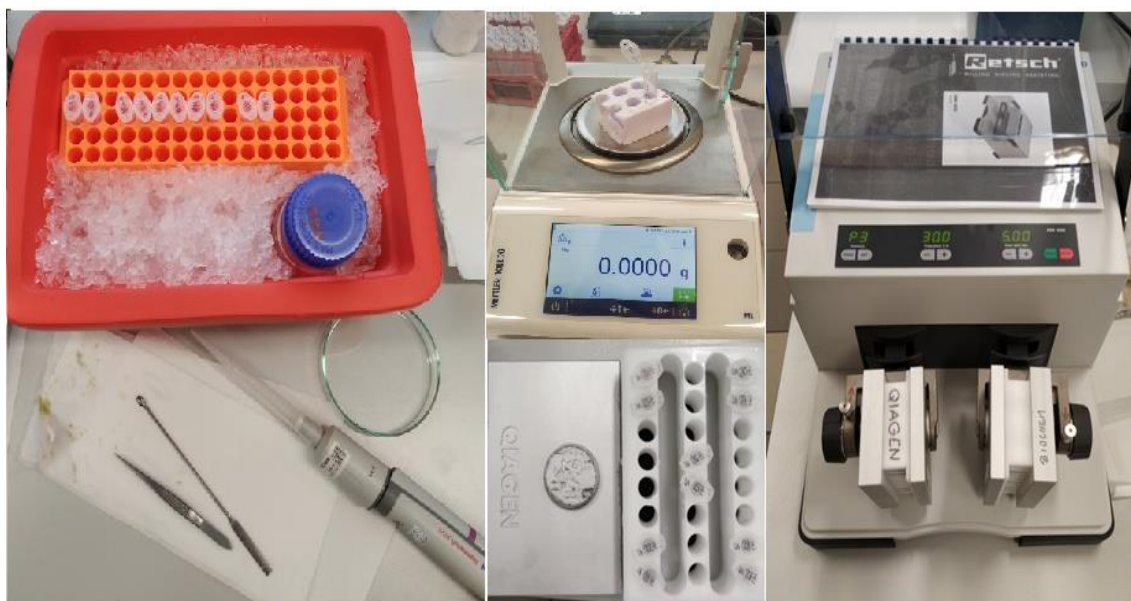


Obr. č.13: Spektrofotometr Infinite M200 s mikrodestičkami.

3.6.1. Příprava vzorků pro biochemické analýzy

Před samotným stanovením dílčích biochemických analýz oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů byla provedena příprava vzorků, jednalo se zejména o homogenizaci zmražených vzorků raků (Obr. 14). Ta se provádí ve fosfátovém pufru, pro stanovení CAT a SOD se využívá 50 mM PP pufr (50 mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA v deionizované vodě, pH 7,4), a pro ostatní parametry se využívá PBS pufr (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,02% KH_2PO_4 v deionizované při pH 7,2) homogenizátoru TissueLyser II (QIAGEN, Německo).

Zmražené vzorky raků byly po dobu jejich zpracování uloženy na ledu. Vzorky raků byly zváženy v mikrozkušavkách Eppendorf pomocí analytických vah (0,140 – 0,169 mg tkáně potřebné pro stanovení). Do každé zkumavky byl poté přidán odpovídající pufr v množství 1ml pufru na 100 mg vzorku tkáně. Vzorky raků byly následně homogenizovány a připravené vzorky byly mezi stanoveními uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. č.14: Příprava vzorků a následná homogenizace.

3.6.2.1. Stanovení lipidní peroxidace TBARS

Lipidní peroxidace je založena na tzv. TBARS testu (z angl. *Thiobarbituricacid Reactive Substances* = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Metoda je založena na principu stanovení barevných komplexů. Ty vznikají při reakci produktů lipidní peroxidace a kyseliny barbiturové (TBA). Měření vzorků vycházelo z metodiky Lushchak a kol. (2005).

Ke stanovení bylo využito necentrifugovaného homogenátu, vzorku o objemu 250 μ l, ke kterému bylo následně přidáno 12,5 μ l 2mM FeSO₄ a došlo k preinkubování, po dobu 30 minut při 37 °C. Poté bylo z mikrozkušavek odebráno 12,5 μ l vzorku pro dosažení požadovaného objemu (250 μ l) a bylo přidáno 75 μ l roztoku TCA-BHT. Vzorek byl následně centrifugován po dobu 20 minut při 4000 rpm a 4 °C. Po centrifugaci bylo do mikrozkušavek Eppendorf odpipetováno 250 μ l vzorku a přidáno 50 μ l HCl a 200 μ l TRIS TBA. Vzorek byl umístěn do termobloku po dobu 45 minut s teplotou 90 °C. Dále bylo z mikrozkušavek odpipetováno 250 μ l vzorku a vloženo na mikrotitrační destičku. Destička byla vložena do spektrofotometru po dobu 10-15 minut proběhlo měření vzniklého zbarvení při vlnové délce 550 a 590 nm. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny výpočtem přes kalibrační křivku v nmol TBARS na mg proteinů.

3.6.2.2. Stanovení superoxid dismutázy (SOD)

Superoxid dismutázy se řadí do skupiny metaloenzymů, které obsahují ve své struktuře iont kovu (Cu, Mn, Ni, Zn). Tento iont určuje jejich aktivitu. Superoxid dismutázy se vyskutují v různé míře ve všech buňkách těla, nejvíce však v jaterních buňkách, kde je jejich množství dáno detoxikační funkcí jater. Jejich funkcí je katalýza přeměny reaktivních superoxidových radikálů na molekulový kyslík a peroxid vodíku (Öztürk-Ürek a kol., 2001).

Metoda vychází ze schopnosti SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. K produkci superoxidů je použit NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a phenazin methosulfonát (PMS). Vzniklé superoxidy jsou stanovovány pomocí NBT (nitrobluetetrazolim). Ty se po reakci se superoxidy mění na stabilní formazanový produkt. Ten je následně spektrofotometricky měřen jako pokles přeměny NBT po reakci vzniklých superoxidů se SOD. Stanovení aktivity proběhlo dle metodiky Ewing a Janero (1995).

Vzorky byly centrifugovány po dobu 30 minut. Následně bylo z každého vzorku odebráno 25 μ l supernatantu do mikrotitrační destičky, stejný. Do každého vzorku bylo přidáno 200 μ l NADH+NBT pufru. Destička byla umístěna do spektrofotometru a proběhlo první měření při 560 nm po dobu 2 minut s 20 sec intervaly ke stanovení interní přeměny NBT vzorkem k odstartování reakce došlo přidáním 25 μ l 35 μ M PMS a znovu bylo měřeno při 560 nm po dobu 5 minut s 20 sec intervaly. Vzorky byly měřeny ve třech opakováních. Výsledná aktivita SOD byla vyjádřena v nmol NBT za min na mg proteinů.

3.6.2.3. Glutathion reduktáza (GR)

Metoda stanovení GR vychází ze schopnosti enzymu glutathion reduktázy katalyzovat přeměnu oxidovaného glutathionu na redukovaný za procesu spotřebování NADPH. Podle metody Carlberga a Mannervika (1975) byla stanovena aktivita glutathion reduktázy spektrofotometricky měřením oxidace NADPH při vlnové délce 340 nm.

Do mikrodestiček bylo postupně napipetováno 80 μ l GR pufru, 20 μ l NADPH, 20 μ l GSSH a 30 μ l destilované vody. Takto smíchaný roztok byl 20 sekund promícháván při pokojové teplotě 25 °C a následně byla měřena spotřeba NADPH, pokles absorbance při 340 nm bez vzorku po dobu 2 minut. Reakce byla nastartována přidáním 50 μ l vzorku, a poté bylo provedeno měření při 340 nm v jednotlivých intervalech po 15 sekundách. Doba

měření byla 5 minut a analýza každého vzorku proběhla ve třech opakováních. Aktivita GR je vyjádřena jako počet jednotek na $\text{ml.nmol}^{-1} \text{NADPH min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$.

3.6.2.4. Stanovení katalázy (CAT)

Metoda vychází ze schopnosti katalázy rozložit peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento proces se stanovuje pomocí měření poklesu absorbance ve vzorku s H_2O_2 za jednotku času. Měření probíhá ve spektrofotometru při vlnové délce 240 nm. Stanovení aktivity katalázy proběhlo podle metodiky Aebi (1984).

Vzorek byl nejprve centrifugován 30 minut. Následně došlo k ředění, kdy byl supernatant vzorku vyředěn pomocí homogenizačního PP pufru v poměru 50 μl supernatantu vzorku : 450 μl PP pufr. Poté bylo odpipetováno 50 μl vyředěného vzorku do mikrotitrační destičky. K tomu bylo ihned přidáno do každé jamky 250 μl 0,09 % H_2O_2 a došlo k měření absorbance reakční směsi. Měření proběhlo ve třech opakováních po dobu 1 minuty při 240 nm oproti kontrole.

3.6.2.5. Stanovení glutathion S-transferázy (GST)

Metoda vychází z detekce konjugátu mezi redukováným glutathionem a CDNB (1chloro-2,4-dinitrobenzen), substrátem běžným pro všechny izoformy glutathion-S-transferázy. Metoda byla modifikována na mikrodoskové provedení a využití spektrofotometrické koncovky při 340 nm. Stanovení bylo provedeno podle metodiky Habig a kol. (1974).

Vzorek byl umístěn do centrifugy na 15 minut. Poté byl supernatant vyředěn pomocí PBS v mikrozkuhavce Eppendorf, a to v poměru 200 μl vzorku : 200 μl PBS pufru. Poté bylo napipetováno na mikrotitrační destičku 70 μl zředěného supernatantu vzorku/blanku (PBS), 120 μl PBS pufru a 10 μl 50 mM CDNB v ethanolu. Reakce byla odstartována přidáním 50 μl 10 mM redukováného GSH a ihned proměřena ve spektrofotometru 5 minut při vlnové délce 340 nm. Všechny vzorky včetně blanku byly měřeny ve třech opakováních.

3.6.2.6. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)

Metoda vychází z principu reakce thioselektivní Ellmanovy reagentie (DTNB; 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými –SH skupinami za tvorby barevného produktu, jenž je stanovován. Takto vzniklé SH skupiny byly ve vzorku zbaveného proteinů, a to zejména v molekule redukovaného glutathionu. Měření proběhlo dle metodiky Ellman (1959).

Vzorek byl po rozmrznutí promíchán na vortexu a umístěn v mikrozkuvkách Eppendorf do centrifugy na dobu 15 minut při 10 000 rpm a 4 °C. Z každé mikrozkuvky bylo poté odebráno 180 µl supernatantu a přidáno 18 µl 25% kyseliny trichloroctové. Upravený vzorek byl ponechán po dobu 15 minut při pokojové teplotě a poté umístěn zpět do centrifugy na 10 minut při 8 000 rpm a 4 °C. Tímto postupem byl získán supernatant vzorku bez obsahu proteinu. Následně došlo k vlastnímu měření, kdy bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 50 µl vzorku/blanku, 190 µl TRIS pufru a 10 µl 0,02 M DTNB. Měření proběhlo ve třech opakováních. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 420 nm proti blanku a pozadí při 680 nm. Výsledné hodnoty vychází u kalibrační křivky v nmol GSH na mg proteinů.

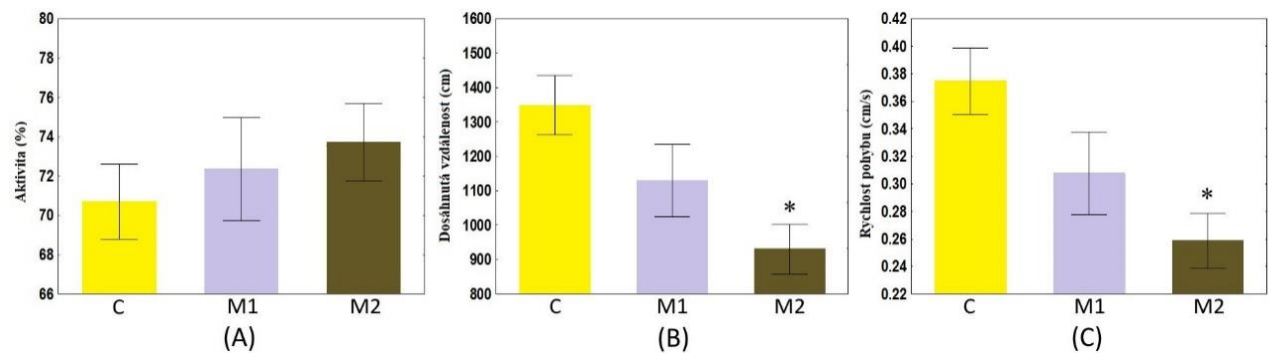
3.7. Statistické vyhodnocení testu

Rozdíly v kumulativní mortalitě mezi experimentálními skupinami a kontrolou byly hodnoceny pomocí kontingenčních tabulek (χ^2). Kolmogorov-Smirnov a Bartlettův test byl použit k posouzení normálního distribučního rozložení a homoskedasticity rozptylu. Pro data s normální distribucí byla použita jednocestná ANOVA. V případě neobvyklé distribuce byl proveden neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Hladina významnosti byla stanovena na $P < 0,05$.

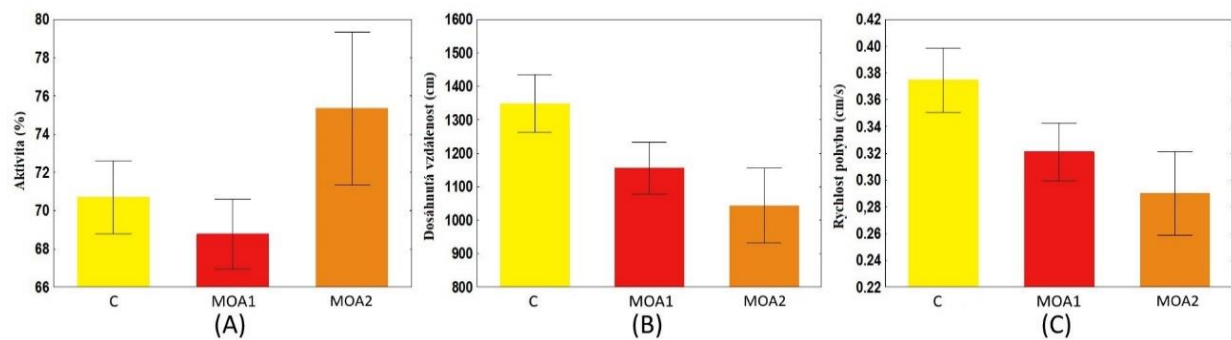
4. VÝSLEDKY

4.1. Chování

Po ukončení testu nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly ($H = 0,98$, $P = 0,614$) oproti kontrole v aktivitě raků vystavených metazachloru a metazachloru OA (Graf č. 1A a 2A). Celková ušlá vzdálenost ($H = 9,68$, $P = 0,008$) a rychlost chůze ($H = 9,76$, $P = 0,008$) u raků ve skupině M2 se statisticky významně lišila od skupiny M1 a kontroly. Raci ve skupině M1 vykazovali kratší ušlou vzdálenost a nižší rychlost pohybu, než bylo zjištěno u kontroly, ale hodnoty se statisticky významně nelišily. Raci vystaveni metazachloru OA (MOA1 a MOA2) nevykazovali žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrole v hodnocených parametrech: ušlá vzdálenost ($H = 4,32$, $P = 0,115$), rychlost chůze ($H = 4,32$, $P = 0,115$) a aktivita ($H = 4,86$, $P = 0,088$).



Graf. č. 1: Chování raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40 denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 µg.l⁻¹, M2 – 22 µg.l⁻¹).



Graf. č. 2: Chování raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40 denní expozici metazachloru OA (MOA1 – 3,2 µg.l⁻¹, MOA2 – 22 µg.l⁻¹).

4.2. Kumulativní mortalita

Statisticky významný ($P < 0,05$) rozdíl v celkové kumulativní mortalitě byl nalezen u raků vystavených všem testovaným koncentracím metazachloru a metazachloru OA ve srovnání s kontrolou (tabulka č. 1). Kumulativní mortalita ve skupině raků vystavené metazachloru v koncentracích $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ (M2) byla 42,5 a 50,0 %, zatímco mortalita kontroly byla zanedbatelná (9,5 %). Kumulativní mortalita ve skupině vystavené působení metazachloru OA v koncentracích $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ (MOA1) a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ (MOA2) byla 47,5 a 67,5 %.

Tabulka č. 1. Růst a kumulativní mortalita raků mramorovaných (*Procambarus virginalis*) po 40 denní expozici metazachloru a metazachloru OA.

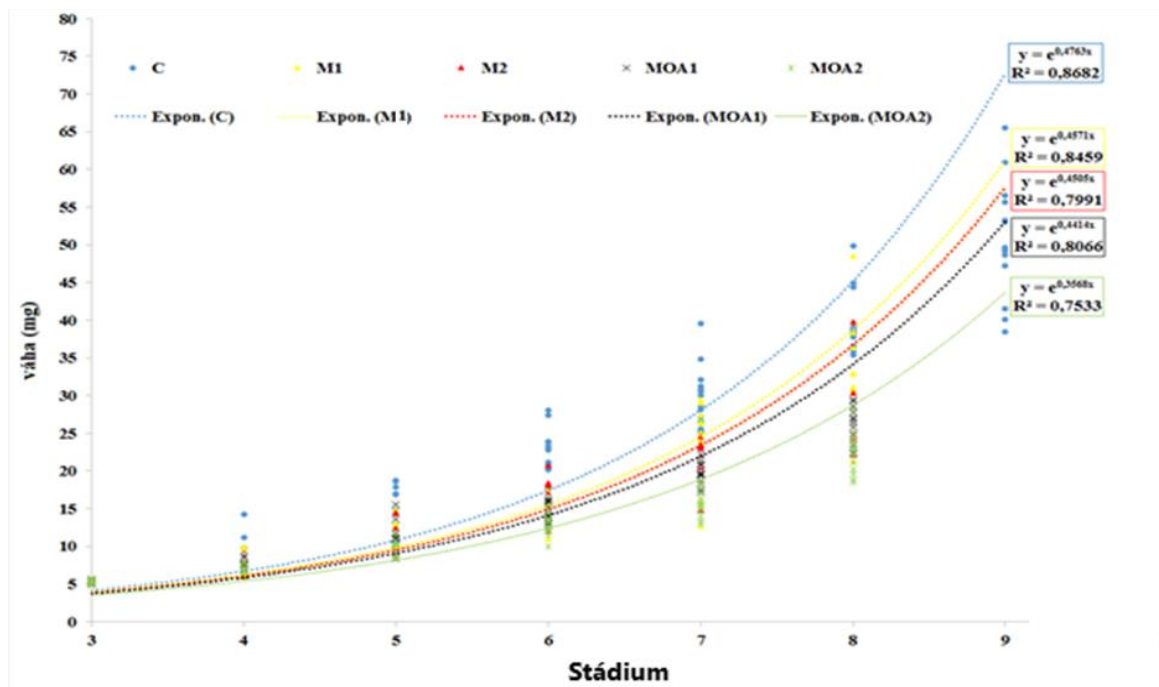
Skupina	Kontrola	M1	M2	MOA1	MOA2
Koncentrace	0	Metazachlor (3,2 µg.l ⁻¹)	Metazachlor (22 µg.l ⁻¹)	Metazachlor OA (3,2 µg.l ⁻¹)	Metazachlor OA (22 µg.l ⁻¹)
M ₅ (Mean ± SD, mg)	8,74 ± 1,01 ^a	7,74 ± 1,29 ^a	7,62 ± 0,90 ^a	7,54 ± 0,83 ^a	7,01 ± 0,60 ^b
M ₄₀ (Mean ± SD, mg)	52,12 ± 8,14 ^a	42,43 ± 5,83 ^b	38,90 ± 4,41 ^b	37,02 ± 5,54 ^b	26,32 ± 3,08 ^c
SGR	5,14 ± 0,15	4,83 ± 0,21	4,69 ± 0,19	4,54 ± 0,21	3,77 ± 0,11
I (%)	-	6,03 ± 0,45	8,75 ± 0,36	11,67 ± 0,87	26,65 ± 1,03
Celková mortalita (%)	9,50 ^a	42,50 ^b	50,00 ^b	47,50 ^b	67,50 ^c

Poznámka: M₅, M₄₀ – průměrná hmotnost raků ve vybrané skupině po 5 a 40 dnech expozice; SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve vybraných skupinách po 40denní expozici; I = inhibice specifického růstu ve vybraných skupinách po 40denní expozici; SD = standardní odchylka.

Hodnoty s odlišnými písmeny v horních indexech se mezi skupinami statisticky ($P < 0,05$) významně liší.

4.3. Růst

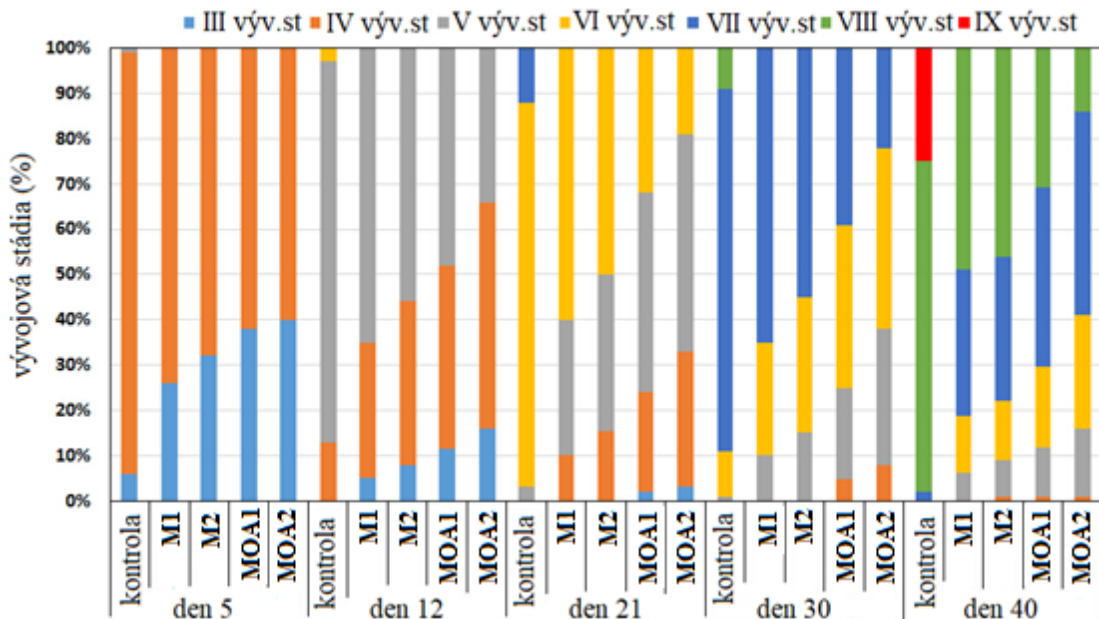
Růst raných vývojových stadií raků mramorových během expozice metazachloru a metazachloru OA je znázorněn v grafu č. 3. Od 4. vývojového stadia raci vystaveni metazachloru OA v koncentraci $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ (MOA2) vykazovali statisticky významně ($P > 0,01$) nižší hmotnost ve srovnání s kontrolou. Od 5. vývojového stadia u raků vystavených všem testovaným koncentracím metazachloru (M1 a M2) a metazachloru OA (MOA1 a MOA2) došlo k signifikantně významnému ($P > 0,01$) snížení hmotnosti ve srovnání s kontrolou. Specifická rychlost růstu (SGR) raků a inhibice růstu (I) raků v jednotlivých testovaných skupinách je uvedena v tabulce č. 1. Ve srovnání s kontrolou byla inhibice růstu 6,03; 8,75; 11,67 a 26,65 % pro skupiny M1, M2, MOA1 a MOA2.



Graf. č. 3: Tělesná hmotnost v závislosti na dosaženém vývojovém stádiu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) vystaveného 40denní expozici metazachloru (M1 – $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – $22 \mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – $22 \mu\text{g.l}^{-1}$).

4.4. Ontogenetický vývoj

Raná stádia raků vystavených působení metazachloru a metazachloru OA v obou testovaných koncentracích (3,2 a 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) vykazovala ve srovnání s kontrolní skupinou zpoždění vývoje ontogeneze (graf č. 4). Na konci testu bylo ve skupině M1 (47 %), M2 (46 %), MOA1 (31 %) a MOA2 (14 %) jedinců ve vývojovém stadiu VIII. Zatímco v kontrole dosáhlo 73 % raků stadia VIII a 25 % stadia IX.



Graf. č. 4: Vliv metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) na raný ontogenetický vývoj raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*).

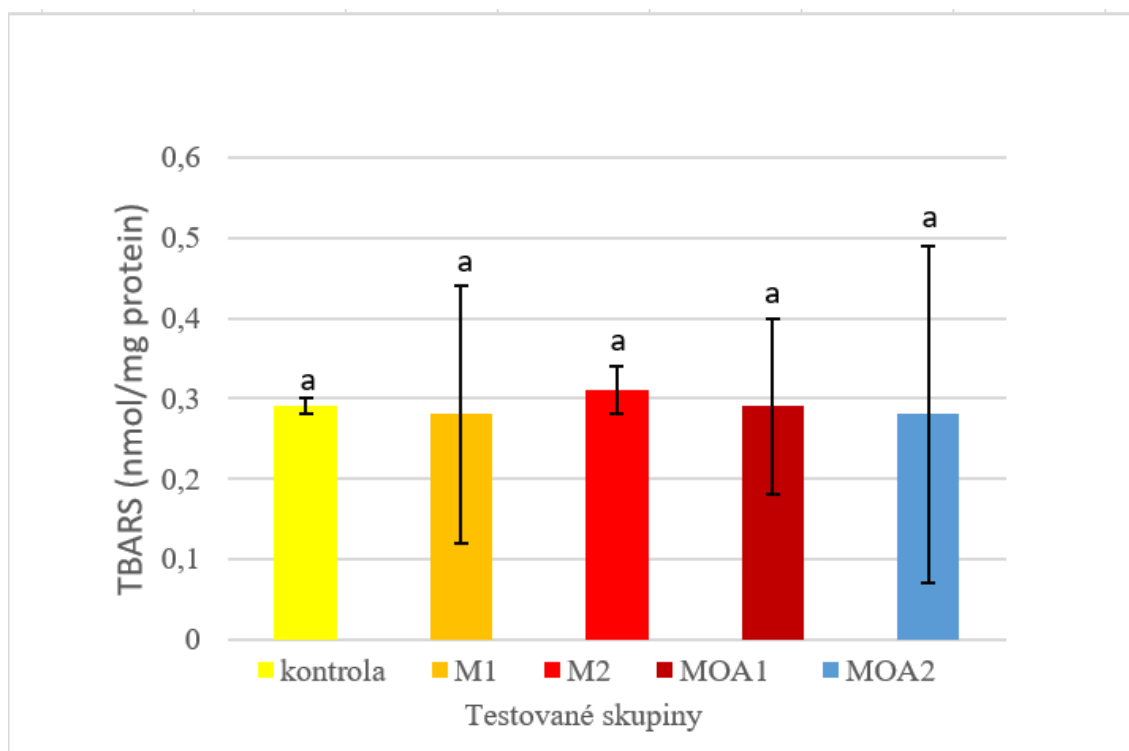
4.5. Makroskopické morfologické anomálie

U raků vystavených testovaným koncentracím metazachloru a metazachloru OA nebyly během testu pozorovány žádné makroskopické změny či morfologické anomálie.

4.6. Biomarker oxidačního stresu

4.6.1. Lipidní peroxidace

Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na hladinu TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 5. U raků vystavených metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) hladiny TBARS v celotělním homogenátu v porovnání s kontrolní skupinou.

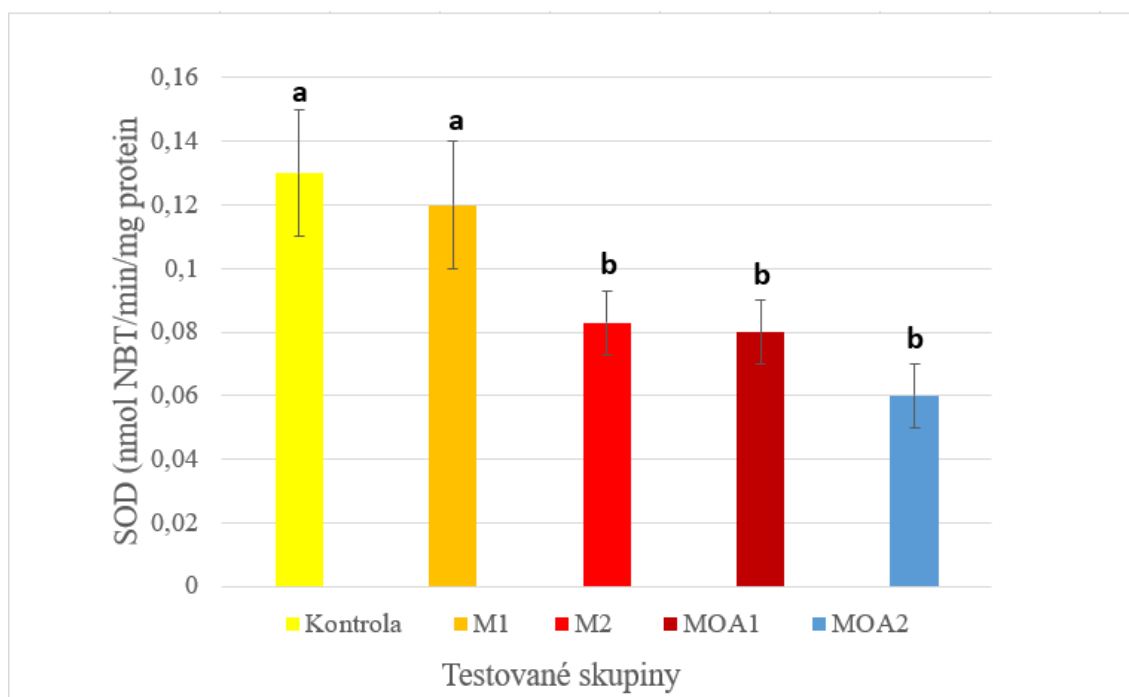


Graf č. 5. Hladina TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7. Antioxidační biomarkery

4.7.1. Superoxid dismutáza (SOD)

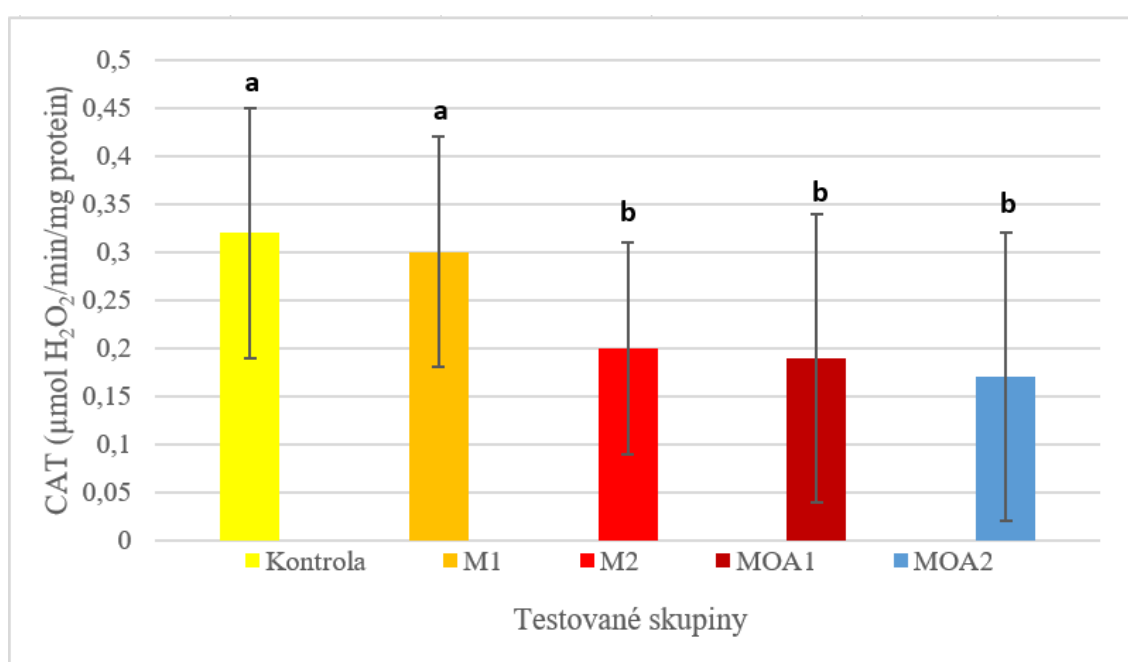
Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na enzymatickou aktivitu SOD v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v Grafu č. 6. Expozice metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení ($P < 0,05$) aktivity SOD v celotělním homogenátu raka mramorovaného. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) aktivity SOD v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 6. Aktivita SOD v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7.2. Kataláza (CAT)

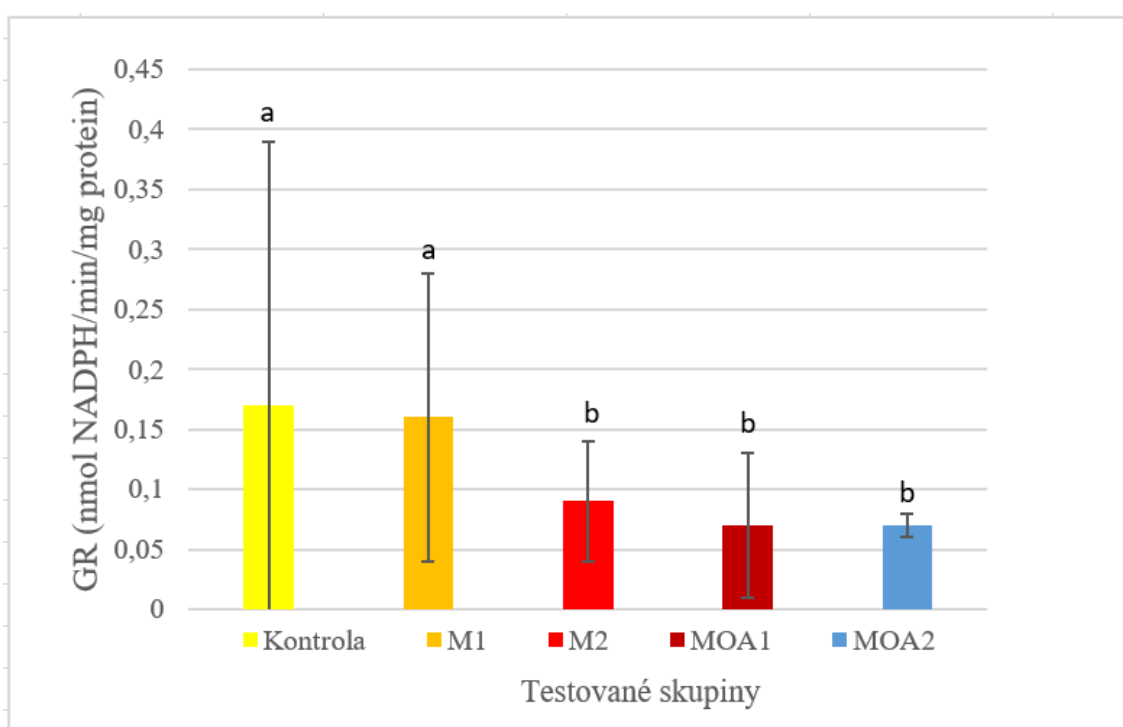
Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na enzymatickou aktivitu CAT v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 7. Expozice metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení ($P < 0,05$) aktivity CAT v celotělním homogenátu raka mramorovaného. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) aktivity CAT v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 7. Aktivita CAT v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7.3. Glutathion reduktáza (GR)

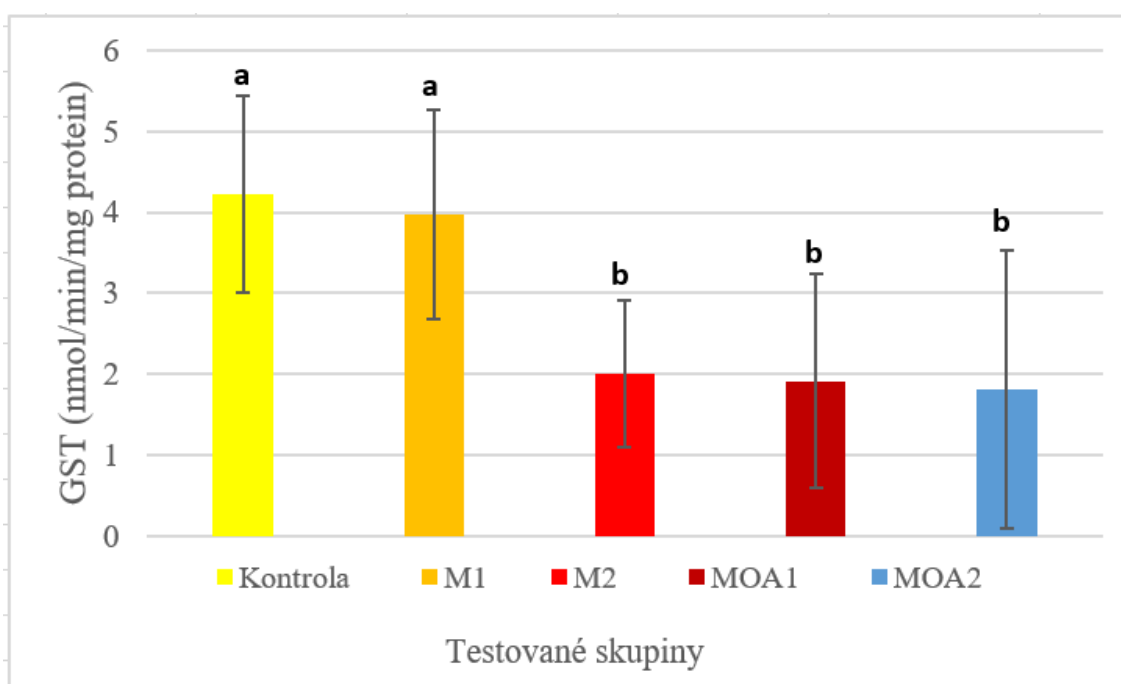
Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na enzymatickou aktivitu GR v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 8. Expozice metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení ($P < 0,05$) hladiny GR v celotělním homogenátu raka mramorovaného. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) hladiny GR v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 8. Hladina GR v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7.4. Glutathion S-transferáza (GST)

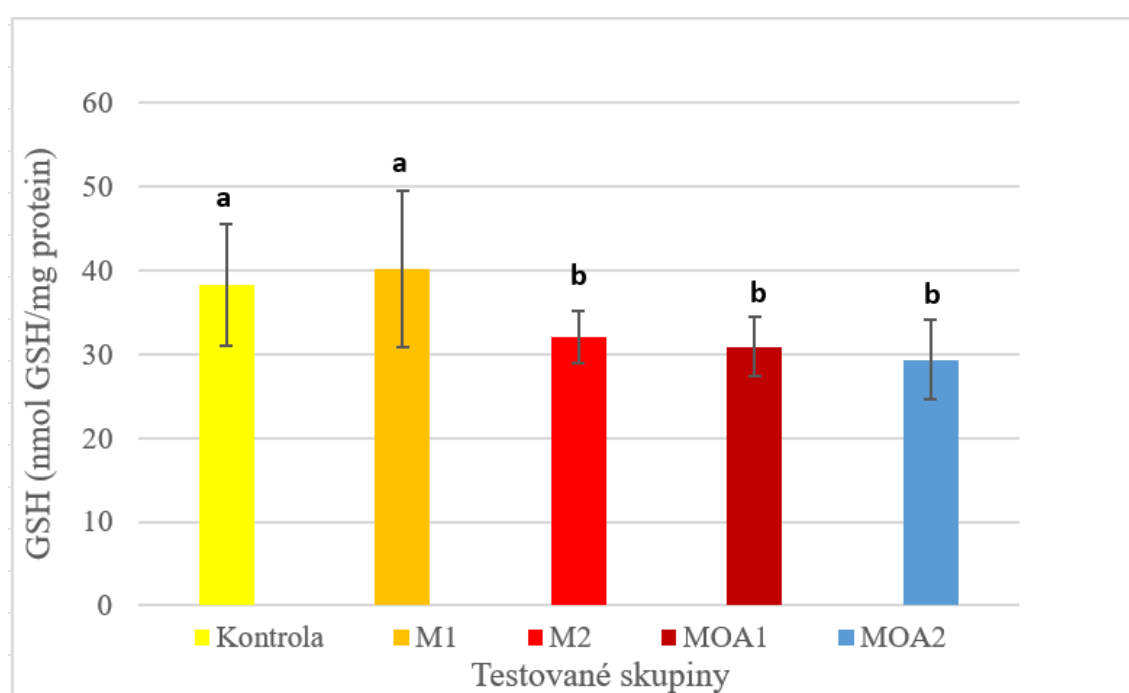
Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na enzymatickou aktivitu GST v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 9. Expozice metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení ($P < 0,05$) hladiny GST v celotělním homogenátu raka mramorovaného. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) hladiny GST v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 9. Hladina GST v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7.5. Redukovaný glutathion (GSH)

Účinky chronické expozice metazachloru a metazachloru OA na hladinu GSH v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 10. Expozice metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení ($P < 0,05$) hladiny GSH v celotělním homogenátu raka mramorovaného. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) hladiny GSH v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 10. Hladina GSH v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po 40denní expozici metazachloru (M1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo posouzení vlivu metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Tato studie je jedním z prvních příspěvků hodnotící účinky metazachloru a jeho hlavního metabolitu metazachloru OA při využití relevantních koncentrací v životním prostředí na raná stadia bezobratlých. Zástupci z řádu Decapoda nám mohou sloužit jako vynikající modelové druhy ke zvýšení ekotoxikologických znalostí (Vogt, 2008). Jedná se o významné a velikostně vhodné druhy snadno chovatelné v laboratorních podmínkách, což je činí užitečnými nejen pro testování toxicity, ale také jako modelové druhy bezobratlých pro disciplíny včetně genetiky, vývoje a buněčné biologie (Vogt, 2008).

Raci, jakožto významní zástupci velkých korýšů, jsou označováni za podstatné obyvatele tekoucích i stojatých vod, v ekosystému hrají klíčovou roli, jsou významnou komoditou akvakultury a jsou ceněni jako indikátory znečištění vodního prostředí (Momot, 1995). Raci jsou významnou složkou ekosystému (Buřič a kol., 2013). Původní druhy raků vyskytující se na území České republiky jsou řazeny mezi ohrožené druhy a jejich ochrana je v zájmu vnitrostátních a evropských předpisů. Proto by bylo jejich použití pro účely testů toxicity nejenom neetické, ale i nezákonné. Nejen z těchto důvodů jsou využívány zejména invazní druhy raků, v tomto případě rak mramorovaný, který je velice vhodným druhem pro toxikologické studie (Kozák a kol., 2011).

V této práci byla vystavena raná vývojová stádia raka mramorovaného dlouhodobému působení metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA. Dlouhodobé testy toxicity vykazují mnohem lepší vypovídající hodnotu než testy akutní toxicity, které jsou založeny na krátkém časovém úseku, při čemž využívají vysokých koncentrací testované látky. Při dlouhodobých testech toxicity je naopak využíváno nižších koncentrací, která se z pravidla vyskytují v ekosystému. Tyto testy daleko lépe simulují podmínky životního prostředí (Lahr a kol., 2000). Pokus probíhal v koncentracích odpovídajících skutečným nejvyšším naměřeným hodnotám vyskytujícím se v českých řekách. Tyto koncentrace nezpůsobují přímo úhyn vodních organismů, avšak mají potenciál vyvolat negativní fyziologické změny organismů.

Osud pesticidů v životním prostředí a jejich toxicita pro necílové organismy jsou zkoumány po mnoho desetiletí. Metazachlor vykazuje mírnou toxicitu vůči rybám (Gangolli, 1999). Akutní toxicita 96hLC50 pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) je 4,0 mg.l⁻¹, pro slunečnici velkoploutvou (*Lepomis macrochirus*) 15,0 mg.l⁻¹ a pro kapra

obecného (*Cyprinus carpio*) 15,0 mg.l⁻¹ (FAO, 1999). Metazachlor má dlouhodobé účinky na vodní makrofyty a funkci ekosystému v koncentracích vyšších než 5,0 µg.l⁻¹ (Mohr a kol., 2007, 2008). Zatímco účinky expozice metazachloru na obratlovce byly dobře zdokumentovány, neexistují žádné údaje o dopadu metazachloru a jeho metabolitů v koncentracích relevantních pro životní prostředí na raná stádia korýšů. Hlavními degradačními produkty metazachloru ve vodě jsou metazachlor ESA a metazachlor OA. Transformační produkty jsou jen slabě adsorbované do půdy, což vede k vysoké mobilitě. V důsledku toho patří metabolity metazachloru mezi nejčastější znečišťující látky vodního prostředí (Lewis a kol., 2016; Chen a kol., 2017). Metazachlor byl zjištěn v povrchových a podzemních vodách Evropy v koncentracích od 0,1 µg.l⁻¹ do 100 µg.l⁻¹ (Kreuger a kol., 1999; Ulrich a kol., 2018; Weber a kol., 2018). Metazachlor OA a metazachlor ESA byly nalezeny v povrchových vodách v koncentracích až 1,8 µg.l⁻¹ (Ulrich a kol., 2018). Maximální koncentrace metazachloru a metazachloru OA zjištěná v českých řekách je 22 µg.l⁻¹ a 3,2 µg.l⁻¹ (ČHMÚ, 2019). Tyto koncentrace byly využity v rámci této práce.

I přesto, že v této studii byly použity koncentrace vyskytující se v ekosystému, byla zjištěna mortalita během testu u obou testovaných látek. Kumulativní mortalita u skupin vystavených metazachloru M1 a M2 byla 42,5 a 50,0 %. Mortalita u raků vystavených metazachloru OA MOA1 a MOA2 byla 47,5 a 67,5 %. Raná životní stadia raků často vykazují vyšší úmrtnost, než je tomu u dospělých po expozici pesticidům (Velíšek a kol., 2012, 2017, 2018b, 2019, 2020). Výsledky naznačují, že koncentrace tohoto herbicidu a jeho hlavního metabolitu, který se nachází v povrchových vodách, mohou způsobovat mortalitu raných vývojových stádií raků.

Raci exponovaní metazachloru a metazachloru OA ve všech testovaných koncentracích vykazovali nižší růst. Ve srovnání s kontrolou byla pozorovaná inhibice růstu 6,03; 8,75; 11,67 a 26,65 % ve skupinách M1, M2, MOA1, MOA2. Snížení růstu může být důsledkem zvýšené spotřeby energie k detoxikaci a antioxidačním procesům, což vede ke zpoždění raného ontogenetického vývoje. Zpomalený růst raných stádií raků byl zjištěn také po expozici triazinů (PED, 2000), chloracetanilidů (Velíšek a kol., 2018b) a metabolitů triazinů (Velíšek a kol., 2017; Koutník a kol., 2017).

Ontogenetický vývoj je velice důležitý parametr hodnocený v toxikologických studiích (Hayes, 2007). V této práci raci vystavení metazachloru a metazachloru OA v obou testovaných koncentracích vykazovali významné zpoždění ontogenetického vývoje. Na konci testu bylo ve skupině M1 (47 %), M2 (46 %), MOA1 (31 %) a MOA2 (14 %)

jedinců ve vývojovém stadiu VIII. Zatímco v kontrole dosáhlo 73 % raků stadia VIII a 25 % stadia IX. Výsledky této práce jsou v souladu s ostatními pracemi, které popisují, že raný ontogenetický vývoj je citlivým parametrem v rámci hodnocení účinků pesticidů na ryby (Woltering, 1984; Velíšek a kol., 2012, 2016) a raky (Koutník a kol., 2017; Velíšek a kol., 2019, 2020).

Studie chronické expozice herbicidům nebo jiným znečišťujícími látkám často využívají pozorování na bázi příjmu potravy a chování (Wolf a Moore, 2002). Dříve se zkoumaly zejména základní vzorce chování, jako je úroveň aktivity a pohybu (Velíšek a kol., 2018). Současná studie byla zaměřena na pozorování možného zhoršení senzorického chování, které mělo za následek snížení pohybu závislého na koncentraci testovaných látek. Významné rozdíly byly pozorovány v ušlé vzdálenosti a rychlosti, ale nikoli v aktivitě. To naznačuje, že potenciál expozice metazachlorem má za následek pomalejší odezvu. Raci jsou silně závislí na zpracování širokého spektra vizuálních, chemických a vodou nesených signálů (Kubec a kol., 2019) s únikovým chováním jako vhodnou reakcí. Opožděná reakce na přítomnost predátorů a pomalejší pohyb může být smrtelná. Raci exponovaní metazachloru OA vykazovali vzorce chování podobné jako bylo pozorováno u raků exponovaných metazachlorem.

Pesticidy mohou ovlivnit fyziologický a biochemický stav, což vede k produkci reaktivních forem kyslíku ROS (z angl. *Reactive Oxygen Species*) (Stará kol., 2016). Nejvýznamnějšími antioxidantními biomarkery regulujícími s ROS jsou SOD, CAT, GPX, GSH, GR a GST (Tkachenko kol., 2014). Hladiny antioxidantních biomarkerů závisí na koncentraci xenobiotika a době expozice (Hostovský a kol., 2014). Expozice raků metazachloru (M2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a metazachloru OA (MOA1 – 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a MOA2 – 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) způsobila statisticky významné snížení hladiny antioxidantních biomarkerů (SOD, CAT, GR, GST a GSH) v celotělním homogenátu. U raků vystavených metazachloru v koncentraci 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (M1) nedošlo ke statisticky významným změnám hladiny těchto biomarkerů v porovnání s kontrolní skupinou. K těmto změnám došlo zřejmě v závislosti na udržování rovnovážného stavu v buňkách proti produkci reaktivních forem kyslíku, přestože oxidační poškození (LPO) nebylo zaznamenáno. Snížené hladiny antioxidantů u vystavených raků souvisely s detoxikací oxidačního stresu, což naznačuje, že testované látky ovlivňují antioxidantní obranné systémy. Podobný trend snížení hladiny antioxidantních biomarkerů, které nejsou doprovázeny změnou LPO, byl zaznamenán u raků exponovaných pesticidy (Stará a kol., 2014, 2018;

Velíšek a kol., 2019). Tyto účinky byly potvrzeny i u ryb po expozicích triaziny (Hostovský a kol., 2014).

Po expozici environmentálně relevantních koncentrací metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA byla pozorována vyšší mortalita, vliv na růst a na ontogenetický vývoj a aktivitu antioxidantních enzymů. Metabolit metazachlor OA vykazoval výrazněji vyšší vliv na fyziologii raných vývojových stádií raků mramorovaných než jeho mateřská látka metazachlor. Závěrem lze říct, že hladina antioxidantů, růst a raná ontogeneze raků mramorovaných jsou užitečné biomarkery pro monitorování vodního prostředí kontaminovaného herbicidem metazachlorem a jeho metabolitem metazachlorem OA.

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo posouzení vlivu metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA byl hodnocen na základě vybraných parametrů. Jednalo se o vyhodnocení vlivu na chování raků na základě jejich aktivity, celkové ušlé vzdálenosti a rychlosti chůze. Mezi další hodnocené parametry patřilo sledování kumulativní mortality, měření růstových parametrů, ontogenetický vývoj a pozorování makroskopických morfologických anomálií v průběhu testu. Dalším důležitým ukazatelem vlivu bylo stanovení biomarkeru oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů. K posouzení vlivu byl použit embryolarvální test toxicity na racích. Test toxicity byl nasazen v pěti koncentracích dvě koncentrace metazachloru (3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a dvě koncentrace metazachloru OA (3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a jedné kontroly (C). Test probíhal po dobu 40 dnů v definovaných laboratorních podmínkách, do každé skupiny bylo nasazeno individuálně 40 jedinců. Expozice metazachloru a metazachloru OA ve všech testovaných koncentracích způsobila statisticky významně ($P < 0,05$) vyšší mortalitu, zpoždění ontogenetického vývoje a pomalejší růst raků. Expozice metazachloru v koncentraci 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a metazachloru OA v koncentracích 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ způsobila statisticky významné ($P < 0,05$) snížení antioxidačních enzymů (SOD, CAT, GR, GST a GSH) v celotělním homogenátu raků. Na základě výsledků této práce by parametry růstu, ontogenetický vývoj a antioxidační biomarkery mohly poskytnout užitečné informace pro vyhodnocení fyziologických účinků herbicidů a jejich metabolitů na raná vývojová stádia raků mramorovaných.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a Lake Surrounded by agricultural lands: Concerning risks to humans and ecological receptors. *Water Air. Pollut.* 212, 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase In vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Agromanuál, 2019. Metazachlor – Účinné látky. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky/ucinna-latka/metazachlor>, (navštívené online 27. 3. 2019).
- Bermudez-Saldana, J.M., Escuder-Gilabert, L., Medina-Hernandez, M.J., Villanueva-Camanas, R.M., Zahrado, S., 2005. Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides. *J. Chromatograph.* 814, 115-125.
- Böger, P., 2003. Mode of action for chloracetamides and functionally related compounds. *J. Pestic. Sci.* 24, 324-329.
- Britannica, 2019. Herbicides. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/herbicide>, (navštívené online 14. 6. 2019).
- Buřič, M., Kouba, A., Máchová, J., Machovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 10, 607-610.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, 378 pp.
- Ceresena Research, 2012. *Market study: Crop protection*. Ceresana, Konstanz, Germany, 800 pp.
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pest. Biochem. Physiol.* 97, 177-181.
- Cobb, A.H, Reade, J.P.H., 2010. *Herbicides and plant physiology*. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 286 pp.

- Cremlyn, R.J.W., 1985. Pesticides: Preparation and mode of action. Wiley, Chichester, 240 pp.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2019. On-line Water Quality Database. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/>, (navštívené online 15. 7. 2019).
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bull. Zool.* 21, 1109.
- Dorn, N., Trexler, J.C., 2007. Crayfish assemblage shifts in a large drought-prone wetland: the roles of hydrology and competition. *Freshwater Biol.* 52, 2399-2411.
- Dorn, N.J., Volin, J.C., 2009. Resistance of crayfish (*Procambarus* spp.) populations to wetland drying depends on species and substrate. *J. North Am. Benthol. Soc.* 28, 766-777.
- EAGRI (Portál eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství), 2019. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/>, (navštívené online 17. 12. 2019).
- Eckermann, C., Matthes, B., Nimtz, M., Reiser, V., Lederer, B., Böger, P., Schröder, J., 2003. Covalent binding of chloracetamide herbicides to the active site cysteine of plant type II polyketide synthases. *Phytochemist.* 64, 1045-1054.
- Ecobichon, D.J., 1991. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D. (Eds.), *Casarett and Doull's. Toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 193-213.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for metazachlor according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. European Food Safety Authority, pp. 51.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 232, 243-248.

- FAO (Food and Agriculture Organization), 1999. Metazachlor. Specifications and Evaluations for Plant Protection Products. Food and Agriculture Organization of United Nations, pp. 17.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hayes, A.W., 2007. Principles and methods of toxicology. CRC Press, Boca Raton, USA, 2296 pp.
- Hendrix, A.N., Loftus, W.F., 2000. Distribution and relative abundance of the crayfishes *Procambarus alleni* (Faxon) and *P. fallax* (Hagen) in southern Florida. *Wetlands* 20, 194-199.
- Hideo, O., Miyagawa, H., Lee, P.W., 2007. Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH Verlag, 538 pp.
- Hobbs, H.H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 236 pp.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds), *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Hostovský, M., Bláhová J., Plhalová L., Kopřiva V., Svobodová Z., 2014. Effects of the exposure of fish to triazine herbicides. *Neuroendocrinol. Lett.* 35 (Suppl. 2), 3-25.
- Hvězdová, M., Kosubová, P., Kosiková, M., Scherr, K.E., Šimek, Z., Brodský, L., Sudoma, M., Škulcová, L., Sanka, M., Svobodová, M., Krkoškova, L., Vašíčková, J., Neuwirthová, N., Bielská, L., Hofman, J., 2018. Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Sci. Total Environ.* 613, 361-370.
- Chen, Z., Chen, Y., Vymazal, J., Kule, L., Koželuh, M., 2017. Dynamics of chloroacetanilide herbicides in various types of mesocosm wetlands. *Sci. Total Environ.* 577, 386-394.
- Jimenez, S.A., Faulkes, Z., 2010. Establishment and care of a laboratory colony of parthenogenetic marbled crayfish, Marmorokrebs. *Invertebrate Rearing* 1, 10-18.

- Jurčíková, J., Mikula, P., Dobšíková, R., Némethová, D., Svobodová, Z., 2007. Effects of metazachlor on vitellogenin induction in zebrafish (*Danio rerio*). *Acta Vet. BRNO* 76, S61-S66.
- Kaldre, K., Meženin, A., Paaver, T., 2012. Marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) resistance and survival rates at low (under 5°C) temperatures during winter period. In: Book of abstracts, International Association of Astacology 19, Innsbruck, Rakousko, pp. 75.
- Kouba, A., Kuklina, I., Niksirat, H., Máchová, J., Kozák, P., 2012. Tolerance of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to Persteril 36 supports use of peracetic acid in astaciculture. *Aquacult.* 350/353, 71-74.
- Koutník, D., Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2017. The chronic effects of terbuthylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Pest. Biochem. Physiol.* 136, 29-33.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrušek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Polícar, T., 2013. *Biologie a chov raků*, 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 418 s.
- Kozák, P., Fureder, L., Kouba, A., Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. Current conservation strategies for European crayfish. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 401, 01.
- Kreuger, J. Peterson M., Lundgren E., 1999. Agricultural inputs of pesticide residues to stream and pond sediments in a small catchment in southern Sweden. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 55-62.
- Kubec, J., Hossain S., Grabicová, K., Rándák, T., Kouba, A., Grabic, R., Roje, S., Buřič, M., 2019. Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, Venlafaxine does not. *Water* 11, 196.
- Lahr, J., Diallo, A.O., Gadj, B., Diouf, P.S., Bedaux, J.J.M., Badji, A., Ndour, K.B., Andreasen, J.E., Van Straalen, N.M., 2000. Ecological effects of experimental insecticide applications on invertebrates in sahelian temporary ponds. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1278-1289.
- Le, T.D.H., Scharmüller, A., Kattwinkel, M., Kühne, R., Schüürmann, G., Schäfer, R.B., 2017. Contribution of waste water treatment plants to pesticide toxicity in agriculture catchments. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 145, 135-141.

- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Human Ecol. Risk Assess. Int. J.* 22, 1050-1064.
- Lukhaup, C., 2001. *Procambarus* sp. – Der Marmorkrebs. *Aquaristik Aktuell* 7/8, 48-51.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670-1680.
- Mantzou, N., Hela, D., Karakitsou, A., Antonopoulou, M., Konstantinou, I., 2016. Dissipation and runoff transport of metazachlor herbicide in rapeseed cultivated and uncultivated plots in field conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 20517-20527.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform off spring. *Naturwissenschaften* 94, 843-846.
- Mikulka, J., Kneifelová, M., Martinková, Z., Soukup, J., Uhlík, J., 2005. Plevelné rostliny. Profi Press s.r.o., Praha, 148 s.
- Mohr, S., Berghahn, R., Feibicke, M., Meinecke, S., Ottenströer, T., Schmiedling, I., Schmiediche, R., Schmindt, R., 2007. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mecososms. *Aquat. Toxicol.* 85, 73-84.
- Mohr, S., Feibicke, M., Berghahn, R., Schmiediche, R., Schmindt, R., 2008. Responce of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to herbicide metazachlor. *Environ. Polut.* 152, 530-542.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Rev. Fish. Sci.* 3, 3363.
- Moulisová, A., Bendakovská, L., Kožíšek, F., Vavrouš, A., Jeligová, H., Kotal, F., 2018. Pesticidy a jejich metabolity v pitné vodě: jaký je současný stav v České republice? *Vodní hospodářství* 7, 4-10.
- Neuman, J., Lopuchovský, J., Zapletal, O., 1989. Chemizace zemědělství, farmakologie a toxikologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 303 s.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2000. Guideline for Testing of 330 Chemicals 215. Fish Juvenile Growth Test.

- Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L.A., Tarhan, L., 2001. The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochem. Funct.* 19, 125-132.
- PED (Pesticide Ecotoxicity Database), 2000. Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division.
- Pitter P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT Praha, 568 s.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- Radosevich, S., Holt, J., Ghera, C., 1997. *Weed ecology*. John Wiley & Sons, New York, 589 pp.
- Saunders, D.S., Harper, C., 1994. Pesticides. In: Hayes, A.W. (Ed.): *Principles and methods of toxicology*. Raven Press, New York, pp. 389-416.
- Sehonová, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Svobodová, Z., 2012. Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. *Bull. VÚRH Vodňany* 48, 5-19.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorcrebs (marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *J. Experimen. Zool.* 303, 393-405.
- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421, 806.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. *Herbicides, Theory and Applications*. Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia ISBN 978-953-307-975-2.
- Sotherton, N., Holland, J., 2003. Indirect effects of pesticides on farmland wildlife. In: Hoffman, D.J. (Ed.), *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1173-1195.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Biomed Res. Int.* 2014, ID 680131.

- Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2016. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Sci. Total Environ.* 566, 733-740.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2018. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. *Chem. Biol. Inter.* 291, 95-102.
- Stersen, J., 2004. Chemical pesticides: mode of action and toxicology. CRC PRESS, 295 pp.
- Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010. Ekotoxikologie – praktická cvičení: Testy toxicity na organismech vodního prostředí. VFU Brno, Brno, 84 s.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. Informatorium, Praha, 264 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., 1992. Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod. VURH Vodňany, 180 s.
- Söderhäll, K., Ceresius, L., 1999. The crayfish plague fungus: History and recent advances. *Freshwater Crayfish* 12, 11-35.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. Raci v České republice. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 256 s.
- Taylor, C.A., Schuster, G.A., Cooper, J.E., DiStefani, R.J., Eversole, A.G., Hamr, P., Hobbs, H.H., Robison, H.W., Skelton, C.E., Thoma, R.F., 2007. A reassessment of the conservation status of crayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. *Fisheries* 32, 372-389.
- Tkachenko, H., Kurhaluk, N., Grudniewska, J., 2014. Oxidative stress biomarkers in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to disinfectant-CIP formulated with peracetic acid and hydrogen peroxide. *Arch. Pol. Fish.* 22, 207-219.
- Tomlin, C., 2004. Pesticide Manual. BCPC Publications, UK, 1350 pp.

- Udo, N., Geffke, T., Balasubramanian, R., Papenbrock, J., Braune, M., Scheerbaum, D., 2003. Effects of the herbicide metazachlor on phytoplankton and periphyton communities in outdoor mesocosms. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31, 482-490.
- Ulrich, U., Hormann, G., Unger, M., Pfannerstill, M., Steinmann, F., Fohrer, N., 2018. Lentic small water bodies: Variability of pesticide transport and transformation patterns. *Sci. Total Environ.* 618, 26-38.
- Velíšek, J., Stará, A., Machová, J., Dvořák, P., Zusková, E., Prokeš, M., Svobodová, Z., 2012. Effect of terbutryn at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pest. Biochem. Physiol.* 102, 102-108.
- Velíšek, J., Koutník, D., Zusková, E., Stará, A., 2016. Effects of the terbuthylazine metabolite terbuthylazine-desethyl on common carp embryos and larvae. *Sci. Total Environ.* 539, 214-220.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Chemosphere* 175, 440-445.
- Velíšek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018a. *Vodní toxikologie pro rybáře. 2. upravené vydání, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, 658 s.*
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kubec, J., Burič, M., Kouba, A., 2018b. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Sci. Total Environ.* 643, 1456-1463.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kubec, J., Burič, M., Kouba, A., 2019. Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pest. Biochem. Physiol.* 153, 87-94.
- Velíšek, J., Stará, A., Kubec, J., Zusková, E., Burič, M., Kouba, A., 2020. Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Sci. Rep.* 10, Article number: 875.

- Vogt, G., 2007. Exposure of the eggs to 17 α -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquat. Toxicol.* 85, 291-296.
- Vogt, G., 2008. The marbled crayfish: A new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *J. Zool.* 276, 1-13.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: A review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontol.* 11, 643-669.
- Vogt, G., 2011. Marmorkrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *J. Biosci.* 36, 377-382.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004a. Life stages and reproductive components of the Marmorecres, the first pathogenetic decapod crustacean. *J. Morphol.* 261, 286-311.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004b. Life stages and reproductive components of the Marmorkrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *J. Morphol.* 261, 286-311.
- Weber, G., Christmann, N., Thiery, A., Martens, D., Kubiniok, J., 2018. Pesticides in agricultural headwater streams in southwestern Germany and effects on macroinvertebrate populations. *Sci. Total Environ.* 619/620, 638-648.
- Wolf, M.C., Moore, P.A., 2002. Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *J. North Am. Benthol. Soc.* 21, 457-467.
- Woltering, D., 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 5, 1-21.
- Woodwell, G.M., Craig, P.P., Johnson, H.A., 1971. DDT in the biosphere: where does it go? *Science* 174, 1101.
- Zapletal, O., Nepejchalová, L., 2001. Speciální veterinární toxikologie., 1.vyd., Editační středisko VFU Brno, Brno, 148 s.
- Zapletal, O., Ruprich, J., Dvořáková, D., Nepejchalová, L., Vranová, E. 2001. Speciální veterinární toxikologie., Editační středisko VFU Brno, Brno, 132 s.

8. ABSTRAKT

Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného

Metazachlor je selektivní herbicid určený k hubení jednoděložných i dvouděložných plevelů v řepce olejce a jiných brukvovitých rostlinách. Využívá se zejména jako preemergentní herbicid. Metazachlor OA je jedním z hlavních degradačních produktu metazachloru.

Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Vliv metazachloru a jeho metabolitu metazachloru OA na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl hodnocen na základě vlivu na chování, růstu, biomarkeru oxidativního stresu, antioxidačních biomarkerů, ontogenetického vývoje a výskytu morfologických anomálií. Test toxicity probíhal v pěti koncentracích dvě koncentrace metazachloru ($3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$) a dvě koncentrace metazachloru OA ($3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$) a jedné kontroly (C). Test probíhal po dobu 40 dnů v definovaných laboratorních podmínkách.

Expozice metazachloru a metazachloru OA ve všech testovaných koncentracích způsobila statisticky významně ($P < 0,05$) vyšší mortalitu, zpoždění ontogenetického vývoje a pomalejší růst raků. Expozice metazachloru v koncentraci $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ a metazachloru OA v koncentracích $3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ způsobila statisticky významné ($P < 0,05$) snížení antioxidačních enzymů (SOD, CAT, GR, GST a GSH) v celotělním homogenátu raků. Metabolit metazachlor OA vykazoval výrazněji vyšší negativní vliv na raná vývojová stádia raků mramorovaných než jeho mateřská látka metazachlor.

Na základě výsledků této studie lze podotknout vhodnost raků, a to zejména jejich raných vývojových stadii pro testy toxicity a možnosti jejich využití pro biomonitoring zatížení vodního prostředí herbicidy a jejich metabolity.

Klíčová slova: herbicidy, embryolarvální test toxicity, chování, ontogenetický vývoj, antioxidační enzymy

9. ABSTRACT

Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish

Metazachlor is a selective herbicide used for controlling monocotyledonous and dicotyledonous weeds in oilseed rape and other cruciferous plants. It is mainly used as a pre-emergence herbicide. Metazachlor OA is one of the major degradation products of metazachlor.

The aim of this study was to evaluate the effect of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on the early live stages of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). The effect of metazachlor and metazachlor OA was evaluated on the basis of behaviour, growth, biomarker of oxidative stress, antioxidant biomarkers, ontogenetic development and occurrence of morphological anomalies. The toxicity test was performed at five concentrations, two concentrations of metazachlor (3.2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) and two concentrations of metazachlor OA (3.2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$) and one control (C). The test exposure was 40 days under defined laboratory conditions.

The exposure of metazachlor and metazachlor OA at all tested concentrations caused statistically significantly ($P < 0,05$) higher mortality, delayed ontogenetic development and slower growth of crayfish. Metazachlor exposure in concentration 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and metazachlor OA in concentrations 3.2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and 22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ caused statistically significant ($P < 0,05$) reduction of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GR, GST and GSH) levels in whole-body crayfish homogenate. Metazachlor OA showed a more pronounced adverse effect on the early live stages of marbled crayfish than its parent compound, metazachlor.

Based on the results of this study we can point out the suitability of crayfish, especially their early live stages for toxicity tests and the possibilities of their use for biomonitoring of aquatic environment herbicides and their metabolites.

Keywords: herbicides, embryo-larval toxicity test, behaviour, ontogenetic development, antioxidant enzymes