

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Akutní a chronické působení neonikotinoidových látek
na vodní organismy**

Autor: Bc. Alžběta Strouhová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.

Studijní program a obor: N4106, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: prezenční

Ročník. 2.

České Budějovice, 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Akutní a chronické působení neonicotinoidových látek na vodní organismy“ jsem vypracovala 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 diplomové 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 kvalifikační 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

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Alžbětě Staré, PhD. a dr hab. Ing. Josefu Velíškovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Marii Šandové; Ing. Miloši Buřičovi, Ph.D; Ing. Antonínu Koubovi, Ph.D a Ing. Janu Kubcovi, Ph.D. za pomoc při provedení experimentu.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alžběta STROUHOVÁ**
Osobní číslo: **V18N004P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Téma práce: **Akutní a chronické působení neonicotinoidových látek na vodní organismy**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Neonicotinoidové látky patří mezi systémové pesticidy, řadí se do třídy neuro-aktivních insekticidů, a jsou synteticky vyráběné na bázi přírodního nikotinu. Používání těchto látek bylo rozšířeno od 90. let, kdy nahradily pro savce a ptáky vysoce toxické karbamáty a organofosfáty. Pro neonicotinoidy je charakteristická nízká toxicita pro obratlovce a vysoká toxicita pro bezobratlé organismy. Od roku 2013 bylo komisí EU zakázáno používat několik účinných látek z této skupiny pesticidů (imidakloprid, thiamethoxam, klothianidin). Hlavními důvody jejich zákazu byly především jejich vysoké koncentrace zjištěné ve vodách, bioakumulace a negativní vliv na nečlově bezobratlé organismy.

Pro tuto práci byli vybráni raci, jako významní zástupci vodních ekosystémů. Použití raků v laboratorních pokusech respektuje koncept 3R (Replacement, Reduction a Refinement).

Cílem diplomové práce bude provést a vyhodnotit testy akutní toxicity na raku mramorovaném (*Procambarus virginalis*) s acetamipridem (účinnou neonicotinoidovou látkou) a s finálním přípravkem Mospilan 20 SP, který obsahuje 20 % této účinné látky. Dále na základě výsledků akutních testů budou provedeny chronické testy s těmito látkami na raku mramorovaném.

V průběhu testů bude sledován vliv testovaných látek na mortalitu a změny chování raků. V testech chronické toxicity budou navíc odebrány z testovacích organismů vzorky tkání na stanovení antioxidantních biomarkerů a oxidačního stresu a hemolymfa na stanovení biochemického profilu. Akutní a chronické testy toxicity budou prováděny podle standardních operačních postupů, které byly zpracovány Laboratoří vodní toxikologie a ichtyopatologie FROV JU v souladu s platnými mezinárodními normami OECD pro testy toxicity na zástupcích vodních organismů. Biochemické analýzy budou provedeny podle jednotlivých metod, které jsou ve výše uvedené laboratoři rutinně využívány.

Výsledky získané na základě provedených testů rozšíří dosavadní znalosti o vlivu neonicotinoidů, účinné látky acetamipridu a insekticidu Mospilan 20 SP, na nečlově vodní organismy, raky, a umožní tak komplexněji hodnotit rizika spojená s používáním těchto látek pro vodní ekosystémy (Environmental Risk Assessment).

Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Calvo-Flores, F.G., Isac-Garcia, J., Jiménez, J.A.D., 2018. Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties. John Wiley & Sons, 528 pp.

Kozák, P. a kol., 2013. Biologie a chov raků, FROV JU, 418 s.

Morrissey, C.A, Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surfacewaters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. Environment International 74: 291-303.

Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D.G., Sibley, P.K., 2018. Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37: 1430-1445.

Sanchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D., 2016. Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Frontiers in Environmental Science* 4: 71.

Simon-Delso, N., et al., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 5-34.

Stara, A., Kouba, A., Velisek, J., 2018. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. *Chemico-Biological Interactions* 291: 95-102.

Stara, A., Zuskova E., Kouba, A., Velisek, J., 2016. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment* 566/567: 733-740.

Velíšek, J. a kol., 2018. *Vodní toxikologie pro rybáře*. FROV JU, Vodňany, 2. upravené vydání, 658 s.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Alžběta Stará, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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

Datum zadání diplomové práce: **20. dubna 2020**

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



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.



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

V Českých Budějovicích dne 20. dubna 2020

OBSAH

1.	ÚVOD.....	9
	CÍL PRÁCE	11
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1.	Pesticidy	12
2.2.	Neonikotinoidy	13
2.2.1.	Postoj Evropské Unie k neonikotinoidům.....	15
2.2.2.	Mechanismus toxického účinku	16
2.2.3.	Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech.....	17
2.2.4.	Působení neonikotinoidů na akvatické organismy	19
2.3.	Chemikálie a modelové organismy použité v testech toxicity	23
2.3.1.	Acetamiprid	23
2.3.2.	Insekticidní přípravek Mospilan 20 SP	26
2.3.3.	Rak mramorovaný (<i>Procambarus virginalis</i>)	26
2.4.	Biochemický profil hemolymfy	28
2.5.	Oxidační stres a antioxidační obrana.....	29
3.	MATERIÁL A METODIKA	33
3.1.	Testované chemikálie	33
3.2.	Experimentální organismy.....	33
3.3.	Testy toxicity	34
3.3.1.	Akutní test toxicity	34
3.3.1.1.	<i>Princip a podmínky testu</i>	34
3.3.1.2.	<i>Průběh testu</i>	34
3.3.1.3.	<i>Vyhodnocení testů akutní toxicity</i>	36
3.3.2.	Chronický test toxicity	36
3.3.2.1.	<i>Princip a podmínky testu</i>	36
3.3.2.2.	<i>Průběh testu</i>	37

3.3.2.3.	<i>Odběr vzorků</i>	39
3.4.	Stanovení biochemického profilu hemolymfy	40
3.5.	Metody stanovení biomarkerů	41
3.5.1.	Stanovení koncentrace proteinů	41
3.5.2.	Stanovení stimulované lipidní peroxidace (TBARS)	42
3.5.3.	Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT).....	43
3.5.4.	Stanovení redukovaného glutathionu (GSH).....	44
3.5.5.	Stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST).....	46
3.6.	Statistické vyhodnocení	46
4.	VÝSLEDKY	47
4.1.	Akutní testy toxicity	47
4.1.1.	Chování raků	47
4.1.2.	Mortalita raků	47
4.2.	Chronický test toxicity	48
4.2.1.	Biochemický profil hemolymfy	49
4.2.1.1.	<i>Glukóza (GLU)</i>	49
4.2.1.2.	<i>Proteiny plazmy</i>	49
4.2.1.3.	<i>Amoniak</i>	51
4.2.1.4.	<i>Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy</i>	52
4.2.1.5.	<i>Minerály</i>	54
4.2.1.6.	<i>Laktát</i>	56
4.2.2.	Biomarker oxidačního stresu	56
4.2.2.1.	<i>Lipidní peroxidace</i>	56
4.2.3.	Antioxidační biomarkery	58
4.2.3.1.	<i>Kataláza</i>	58
4.2.3.2.	<i>Redukovaný glutathion</i>	59
4.2.3.3.	<i>Glutathion S-transferáza</i>	60

5.	DISKUSE	62
5.1.	Akutní testy toxicity	62
5.2.	Chronický test toxicity	63
5.2.1.	Biochemický profil hemolymfy	64
5.2.2.	Biomarker oxidačního stresu.....	65
5.2.3.	Antioxidační biomarkery.....	66
6.	ZÁVĚR.....	69
7.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	70
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	82
9.	SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A PŘÍLOH	83
10.	PŘÍLOHY	84
11.	ABSTRAKT	87
12.	ABSTRACT	88

1. ÚVOD

Lidé se snažili ochránit své plodiny před nejrůznějšími škůdci již od nepaměti, z počátku k tomu používali zejména látky přírodního původu, později i chemické látky – síru, arsen, olovo anebo kryolit. S rozvojem průmyslu docházelo k objevování a syntetizaci množství nových pesticidních látek, s tím však souvisí také objev jejich negativních účinků (Cremllyn, 1978).

Jednou z nejnovějších a nejrychleji se rozvíjejících skupin látek na ochranu před hmyzími škůdci (insekticidy), jsou neonikotinoidy, látky odvozené od přírodního toxinu nikotinu (3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]). Nejčastěji se neonikotinoidy používají ve formě aerosolu na celé rostliny, případně jako mořidla osiva. Některé látky z této skupiny jsou také účinnými látkami v přípravcích na hubení blech u psů a koček (Jeschke a kol., 2011; Morrissey a kol., 2015; Wang a kol., 2018a).

Od počátku devadesátých let dvacátého století do roku 2013 bylo na trh uvedeno osm neonikotinoidních látek: imidacloprid (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimin), thiacloprid ([3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-2-thiazolidinyliden]-cyanamid), nitenpyram ((1E)-N-((6-chloro-3-pyridinyl)methyl)-N-ethyl-N'-methyl-2-nitro-1,1-ethenediamin), acetamiprid ((1E)-N-[(6-Chlor-3-pyridinyl)methyl]-N'-cyan-N-methylethanimidamid), clothianidin (1(2-Chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidin), thiamethoxam (3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]-5-methyl-N-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imin), dinotefuran (2-methyl-1-nitro-3-[(tetrahydro-3-furanyl)-methyl]guanidin) a sulfoxaflor ([Methyl(oxo)[1-[6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]ethyl]-λ⁶-sulfanyliden]cyanamid) (Zhu a kol., 2013; Bass a kol., 2015). Všechny osm základních neonikotinoidních látek je dobře rozpustných a stálých ve vodě a stabilních v půdě. V příznivých podmínkách jsou odolné vůči hydrolyze, avšak mohou podléhat fotodegradaci (Jeschke a kol., 2011; Morrissey a kol., 2015).

Po uveřejnění několika studií, naznačujících, že neonikotinoidy jsou pro včely nebezpečné, zakázala Evropská komise od prosince 2013 použití tří neonikotinoidních látek (imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam) na plodinách atraktivních pro včely (Carreck, 2017). Od roku 2018 je zakázáno použití těchto látek ve venkovním prostředí. Používání další látky, thiacloprid, bylo schváleno do 30. dubna 2020 (Evropská komise, 2020).

U hmyzu i u savců fungují neonikotinoidy jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs). Díky rozdílné struktuře nAChRs vykazují vyšší

selektivitu vůči receptorům bezobratlých než obratlovců, což je důvodem jejich nižší neurotoxicity pro savce, ryby a ptáky než pro bezobratlé (Yamamoto a kol., 1998; Tomizawa a Casida, 2005). Mimo neurotoxicity vykazují neonikotinoidy také imunotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické a cytotoxické účinky a mohou narušovat reprodukční procesy a schopnosti obratlovců (Bal a kol., 2012; Lonare a kol., 2014; Wang a kol., 2018a).

Fyzikálně-chemické vlastnosti neonikotinoidů, jako je vysoká rozpustnost a nízká adsorpce do půdy podporují jejich pohyb povrchovým a podpovrchovým odtokem (EFSA, 2008). Rezidua neonikotinoidů jsou detekována v recipientech po celém světě, běžné koncentrace se pohybují v řádech desítek ng.l^{-1} , ale maximální koncentrace mohou dosahovat až stovek $\mu\text{g.l}^{-1}$, v nejvyšších koncentracích se vyskytují imidacloprid a thiacloprid (Sánchez-Bayo a kol., 2016; Mortl a kol., 2020).

Vodní ekosystémy a v nich žijící organismy jsou neonikotinoidy široce zasaženy, dosud prováděné studie však hodnotí jejich vliv zejména na terestrické necílové organismy, včelu medonosnou a další opylovače (Pisa a kol., 2014). Pokud se chemická látka anebo její rezidua vyskytuje ve vodě, organismy mají omezenou možnost jí uniknout (Escher a kol., 2011). Vzhledem k nízké toxicitě neonikotinoidů pro standardní testovací druhy se předpokládalo, že by neměly mít zásadní dopad na vodní ekosystém, až pozdější studie ukázaly, že vodní bezobratlí, zejména hmyz, jsou vůči neonikotinoidům mnohem citlivější (Sánchez-Bayo a kol., 2016). Nejcitlivějšími druhy se jeví jepice (Ephemeroptera), chrostíci (Trichoptera) a některé druhy dvoukřídlých (Diptera), zejména larvy některých pakomárů (Chironomidae) (Morrissey a kol., 2015). Toxicita pro mnoho druhů se liší v závislosti na době expozice (Stoughton a kol., 2008). Mimo letálních efektů mnoho studií poukazuje i na subletální vlivy – snížení reprodukční schopnosti (Beketov a Liess, 2008a), iniciace driftu organismů po proudu (Beketov a Liess, 2008b), snížení schopnosti příjmu potravy (Alexander a kol., 2007), imobilizace (Roessink a kol., 2013) anebo změnu potravních strategií (Kreutzweiser a kol., 2008; Englert a kol., 2012).

Široce používanou neonikotinoidní látkou je acetamiprid. Tato práce je zaměřena na toxicitu čisté neonikotinoidní látky, acetamipridu a pesticidního přípravku Mospilan 20 SP, jejíž je acetamiprid účinnou látkou. Akutní toxicita těchto látek byla prokázána a hodnocena pomocí testů akutní toxicity na raku mramorovaném (*Procambarus virginalis*). Na základě akutních testů byly provedeny chronické testy toxicity, kdy byl také hodnocen vliv biochemický profil hemolymfy raků, na biomarker oxidačního stresu a antioxidační biomarkery.

CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je provedení akutního testu toxicity s čistým neonikotinoidem (acetamiprid) a neonikotinoidním přípravkem Mospilan 20 SP, obsahující 20 % účinné látky acetamiprid na raku mramorovaném (*Procambarus virginalis*), zjištění akutní toxicity daných látek a posouzení rozdílu toxicity čisté látky a přípravku. Dále provedení chronického testu toxicity, a posouzení působení těchto látek na biochemický profil hemolymfy, oxidační stres a oxidační biomarkery raka mramorovaného.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

Chápání a definice pojmu *pesticid* není z globálního pohledu jednotná, asi nejlépe tento pojem definuje komise Codex Alimentarius Commission (CAC), jako: „*Všechny sloučeniny a jejich směsi, určené pro prevenci, zničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých organismů – nežádoucích rostlin, mikroorganismů či živočichů, během produkce, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv a dále látky aplikované u zvířat proti ektoparazitům*“ (CAC, 2013; Velíšek a kol., 2018).

Snaha o ochranu pěstovaných plodin a zásob provází lidstvo od počátku zemědělství. Přesto, že byly již od starověku známy i chemické látky s pesticidním účinkem – síra, arsen, olovo, rtuť a kryolit, k rozvoji jejich použití dochází až od 15. století. Aktivní látky přírodních insekticidních sloučenin – rotenoidy, pyretroidy anebo například nikotin se však daří izolovat až od poloviny devatenáctého století. Od přelomu devatenáctého a dvacátého století jsou vytvářeny a používány také anorganické syntetické pesticidní látky, jako dinitrofenoly a thiokyanáty. Za přelomový se dá označit objev doktora Paula Müllera – účinky dichlordifenyiltrichlorethanu (DDT), v roce 1939. DDT se stalo celosvětově nejužívanější insekticidní látkou (Cremlyn, 1978). V roce 1962 však Rachel Carson popsala jeho negativní vlivy na ekosystémy, pro který bylo použití DDT postupně omezeno a zakázáno ve většině zemí světa. Od čtyřicátých let byly syntetizovány také další organochlorové, organofosfátové a karbamátové sloučeniny (Carson, 1962; Cremlyn, 1978; Velíšek a kol. 2018).

Intenzifikace zemědělství vede k nárůstu výskytu pesticidů i pesticidních přípravků v životním prostředí. Od šedesátých let je kladen větší důraz na kontrolu reziduí pesticidů a pesticidních přípravků v potravinách, ekosystémech i jednotlivých organismech. Pesticidy i jejich sloučeniny se mohou v životním prostředí kumulovat, což může vést ke zdravotním rizikům u člověka i dalších, často necílových, organismů. Po aplikaci, vlivem fyzikálně-chemických faktorů, pesticidy degradují, vznikají metabolity, ty mohou pesticidní účinek ztrácet, anebo naopak mohou vznikat látky toxičtější, působící na širší škálu organismů s různými mechanismy účinku (Hajšlová a Kocourek, 2004; Velíšek a kol., 2018).

Ve vodních ekosystémech mohou být pesticidy přítomny v rozpuštěné i nerozpuštěné formě, výskyt ve vyšších koncentracích může narušovat biologickou rovnováhu,

ovlivňovat samočistící procesy ve vodě, organoleptické vlastnosti vody a ohrožovat zdraví obyvatelstva (Pitter, 1999). Přítomnost pesticidů v recipientech je často způsobena nesprávnou a nešetrnou aplikací, případně splachem z ošetřených kultur (Velíšek a kol., 2018).

Pesticidy jsou celosvětově masivně používány, i přes nežádoucí účinky a vliv na životní prostředí. Negativní vliv pesticidů je nutné minimalizovat dodržováním správných technologických postupů a také využíváním takových látek, které netvoří rezidua, rychle se rozkládají a mají co nejmenší vliv na necílové organismy (Velíšek a kol., 2018).

Podle biologické účinnosti jsou základními skupinami pesticidů insekticidy – k hubení hmyzu; herbicidy – k hubení rostlin a fungicidy – proti škodlivým parazitickým houbám (Pitter, 1999).

2.2. Neonikotinoidy

Neonikotinoidy jsou jednou z nejnovějších skupin systémově působících insekticidů. Jde o synteticky vytvářené látky odvozené od nikotinu, přírodního toxinu, využívaného již dříve k hubení hmyzích škůdců (Cremlyn, 1978; Morrissey a kol., 2015). Dnes jsou neonikotinoidy jednou z nejdůležitějších chemických tříd insekticidů, jsou registrovány ve více než 120 zemích světa a patří mezi nejúčinnější látky pro kontrolu širokého spektra hmyzích škůdců. Pesticidy na bázi neonikotinooidů je možno aplikovat ve formě aerosolu na celé rostliny či jejich části, případně mohou být použity jako mořidla pro osiva. Některé látky z této skupiny, například nitenpyram a imidacloprid jsou účinnými látkami v přípravcích na hubení blech u psů a koček (Jeschke a kol., 2011; Morrissey a kol., 2015; Wang a kol., 2018a).

Výluh z tabákových listů byl použit k hubení škůdců zahradních rostlin již na konci 17. století, aktivní látkou těchto extraktů je alkaloid – nikotin. Izolovat čistý nikotin se však podařilo až v roce 1828 (Cremlyn, 1978). V 70. letech 20. století probíhaly pokusy o zvýšení insekticidní účinnosti nikotinooidů – přírodních látek s podobnou strukturou jako nikotin, vytvářením sloučenin s pyridiny či s olovem. Tyto sloučeniny však nebyly příliš účinné anebo nebylo možné jejich komerční využití k ochraně rostlin, kvůli jejich snadné fotodegradabilitě. Po studiích strukturní aktivity a nahrazení některých složek vznikly vysoce účinné a zároveň fotostabilní analogy přírodního nikotinu – neonikotinoidy. První z nich, nithiazin ((EIZ)-2-Nitromethylen-1,3-thiazin), byl syntetizován již v roce 1977, následovaly další heterocyklické sloučeniny – imidacloprid (1985), thiacloprid (1985) a thiamethoxam (1992). Zároveň byly vytvářeny acyklické sloučeniny – nitenpyram (1988),

acetamiprid (1989), clothianidin (1989) a dinotefuran (1994). Zásadní odlišností neonikotinoidů od nikotinoidů je nepřítomnost ionizovatelného bazického aminu nebo iminového substituentu (Tomizawa a Casida, 2005).

V roce 1991 byl na trh uveden *imidacloprid*, který se pro svou účinnost stal brzy nejprodávanějším insekticidem na světě. Na jeho úspěšnost navázal v roce 1995 nitenpyram a acetamiprid a poté thiamethoxam (1998). Po roce 2000 byly na trh uvedeny další tři sloučeniny – thiacloprid (2000), clothianidin (2001) a dinotefuran (2002) (Bass a kol., 2015). Poslední sloučeninou uvedenou na trh v USA a Číně, byl v roce 2013 sulfoxaflor (Zhu a kol., 2011). Na čínském trhu se blíží uvedení dalších pěti izomerů neonikotinoidů – *imidaclothiz*, *guadipyr*, *huanyanglin*, *paichongding* a *cycloxaprid* (Shao a kol., 2013).

Úspěšnost neonikotinoidů je patrná také ze zvyšujícího se podílu, který na agrochemickém trhu zaujímají. V roce 1990 celkový objem trhu tvořil 7,942 miliard USD, dominovaly mu organofosfáty (43 %), pyretroidy (18 %) a karbamáty (16 %). V roce 2008 se celkový objem trhu snížil na 6,330 miliard USD, neonikotinoidy zaujímaly již 24 % z této sumy, organofosfáty pak pouze 13,6 %, ke snížení podílu došlo i u pyretroidů (15,5 %) a karbamátů (10,8 %) (Jeschke a kol., 2011).

Fyzikálně-chemické vlastnosti neonikotinoidů hrají důležitou roli v jejich úspěšném vývoji a stoupajícím prodeji po celém světě. Ať jsou cyklické (imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam) anebo necyklické (nitenpyram, acetamiprid, clothianidin, dinotefuran), všechny tyto sloučeniny jsou dobře rozpustné a stálé ve vodě, stabilní jsou i v půdě, mohou však podléhat za určitých podmínek fotodegradaci. Ve vodě jsou odolné vůči hydrolyze, za předpokladu anaerobních podmínek a neutrálního až mírně kyselého pH. Negativním aspektem vlastností neonikotinoidů je dobrá rozpustnost a stálost ve vodě i v půdě je možnost pohybu těchto látek prostřednictvím povrchového a podpovrchového odtoku a k možnému zvýšení perzistence v prostředí (Jeschke a kol., 2011; Morrissey a kol., 2015).

K oblíbenosti neonikotinoidů přispívá také fakt, že mají, stejně jako některé organofosfáty a methylkarbamáty, vyšší systémovou aktivitu než organochloriny a pyretroidy, ale stejně jako pyretroidy mají vyšší selektivní faktor pro hmyz než pro savce. Při hodnocení toxicity většina neonikotinoidů vykazovala relativně nízkou toxicitu pro obratlovce, což také přispělo k jejich hojnému používání. Většina neonikotinoidů však vykazuje toxicitu pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*), pro kterou je rizikové pozření i přímý kontakt s látkou. Potenciální otravě včel je možno předcházet namořením osiva před setím, místo používání postřiku na již kvetoucí plodiny (Tomizawa a Casida, 2005).

2.2.1. Postoj Evropské Unie k neonikotinoidům

V polovině 90. let 20. století, tedy nedlouho po uvedení prvních neonikotinoidů na trh, upozorňovali francouzští včelaři na ztráty včel, které měly být způsobeny nově zaváděnou třídou systémových insekticidů, zejména sloučeninou imidacloprid. Včelaři hlásili rozsáhlé poškození včelstev hledajících potravu na plodinách ošetřených právě imidaclopridem. Příznaky otravy však nasvědčovaly spíše na parazitického roztoče *Varroa* a přídružené viry (Schmuck, 1999). Na Evropské konferenci o výzkumu včel v roce 2006 varovali italští vědci o nebezpečnosti prachu vznikajícího při setí osiva ošetřeného clothianidinem a imidaclopridem (Greatti a kol., 2006). Nebezpečnost prachu z namořených semen se potvrdila masivní otravou včel v jižním Bavorsku v údolí Rýna. Příznaky otravy insekticidem vykazovalo více než 11 500 včelstev. Chemickou analýzou prachu, rostlinných vzorků, vzorků včel a pylu byla potvrzena otrava clothianidinem pocházejícím z ošetřených semen kukuřice (Pistorius a kol., 2009).

V roce 2012 byly uveřejněny čtyři zásadní studie (Gill a kol., 2012; Henry a kol., 2012; Lu a kol., 2012; Whitehorn a kol., 2012), které naznačují, že neonikotinoidy jsou pro včely nebezpečné. Přesto, že studie vykazovaly nedostatky v podobě nereálně nasimulovaných laboratorních podmínek či příliš vysokých dávek podávaného pesticidu, značně přispěly při rozhodování Evropské komise o moratoriu na používání tří neonikotinoidů (imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam) na plodinách atraktivních pro včely, od prosince 2013. Moratorium vzniklo na základě laboratorních studií, které se neshodují s reálným životním prostředím a chováním včel, což bylo matoucí zejména pro včelaře, kteří dlouhodobě přesouvali včelstva do blízkosti kvetoucí řepky olejky (*Brassica napus subsp. napus*), z jejíhož nektaru získávali ceněný med. Moratorium je problematické také pro zemědělce, kteří musejí zakázané prostředky problematicky nahrazovat (Carreck, 2017).

V roce 2013 Evropská komise nařízením č. 485/2013 přísně omezila používání přípravků na ochranu rostlin a ošetřování semen obsahujících clothianidin, imidacloprid anebo thiamethoxam. Opatření, založené na posouzení rizik Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) v roce 2013, se týká rostlin atraktivních pro včely, jako je kukuřice, řepka olejka anebo slunečnice. Výjimkou bylo umožněno použití pesticidních přípravků obsahujících uvedené tři látky ve sklenících k ošetření některých plodin po odkvětu a ozimých obilovin. V roce 2017 kompetentní útvary Evropské komise předložily návrh na úplný zákaz použití těchto tří účinných látek ve venkovním prostředí. Prováděcí

nařízení, kterými se mění podmínky schvalování účinné látky imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam, byly zveřejněny v Ústředním věstníku Evropské unie 30. května 2018. Výsledkem je, že použití všech tří látek ve venkovním prostředí je zakázané a zůstává možné pouze použití ve stálých sklenících. Hodnoceny byly i další neonikotinoidní látky – acetamiprid a thiacloprid. Acetamiprid je hodnocen jako málo toxický pro včely a jeho použití je v Evropské unii schváleno až do 28. února 2033. Thiacloprid je vzhledem k vlastnostem narušujícím endokrinní systém kandidátem pro nahrazení. Orgány jednotlivých států provádějí posouzení, zda existují příznivější alternativy k používání přípravku, včetně nechemických metod. Použití thiaclopridu v EU bylo schváleno do 30. dubna 2020. Na základě závěru studie EFSA zveřejněné na začátku roku 2019 navrhla Evropská komise členským státům v regulačním výboru, aby nepodpořily prodloužení schválení používání přípravků na bázi thiaclopridu (Evropská komise, 2020).

2.2.2. Mechanismus toxického účinku

Neonikotinoidy jsou řazeny mezi systémové insekticidy a neurotoxiny, působící na centrální nervovou soustavu organismů (Wang a kol., 2018a). U hmyzu i u savců fungují jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs), zejména podtypu $\alpha 4\beta 2$ (Tomizawa a Casida, 2003).

Acetylcholin (ACh) je endogenním agonistou a excitačním neurotransmiterem cholinergního nervového systému. Při působení nikotinového cholinergika probíhá synapse ve dvou krocích. Acetylcholin je nejprve propuštěn skrz presynaptickou membránu a interaguje s lokalizovaným vazebným místem na extracelulární doméně komplexu nAChR – iontový kanál. Konformační změna molekuly receptoru vede k otevření iontového kanálu, podpoře přítoku extracelulárního Na^+ a intracelulárního K^+ a tím k narušení rovnovážného membránového potenciálu. U hmyzu se nejvíce nAChRs nachází v neuropilních oblastech centrální nervové soustavy. Jsou zodpovědné za rychlou neurotransmisi a jsou tedy důležitým cílem pro působení insekticidů (Tomizawa a Casida, 2003). Savci mají nAChRs zejména ve svalech, mozku a periferních vegetativních nervech, stejně jako u hmyzu fungují jako chemicky závislé iontové kanály, složené z pěti podjednotek, vytvářejících v plazmatické membráně buněk vertikální pór (Yamamoto a kol., 1998).

Obratlovci a bezobratlí mají rozdílnou strukturu nAChRs, proto se předpokládá, že neonikotinoidy mají vyšší selektivitu vůči nAChRs bezobratlých než obratlovců. Tento

jev je důvodem nižší neurotoxicity neonikotinoidů pro savce, ryby a ptáky. Receptory obratlovců mají odlišnou konfiguraci podjednotek tvořících receptor, vazba insekticidu je pak slabší anebo trvá kratší dobu než u hmyzu (Yamamoto a kol., 1998; Tomizawa a Casida, 2005)

Neurotoxicita není jediným možným toxickým účinkem neonikotinoidů. Poslední studie ukazují, že mohou mít také imunotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické a cytotoxické účinky (Wang a kol., 2018a). Bal a kol. (2012) a Lonare a kol. (2014) ve svých studiích také poukazují na možné narušení reprodukčních procesů a schopností obratlovců při vystavení působení neonikotinoidních látek.

2.2.3. Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech

Všechny neonikotinoidy vykazují vysokou rozpustnost ve vodě, což usnadňuje jejich široké použití, jako systémové insekticidy. Mají také dlouhé poločasy rozpadu v půdě i ve vodě, kde jsou v anaerobních podmínkách a při neutrálním anebo mírně kyselém pH odolné vůči hydrolyze (EFSA, 2008; Morrissey a kol., 2015). Perzistence je ovlivněna podmínkami prostředí, například zvýšení pH a zákal zvyšuje perzistenci (Sarkar a kol., 2001). V mělké vodě s vysokou průhledností mohou neonikotinoidy podléhat fotodegradaci. Fyzikálně-chemické vlastnosti, zejména vysoká rozpustnost a nízká adsorpce půdy podporují pohyb těchto pesticidů povrchovým a podpovrchovým odtokem (EFSA, 2008).

Do vodních ekosystémů se neonikotinoidy dostávají zejména povrchovým odtokem z ošetřených kultur (Armbrust a Peeler, 2002), vyplavováním do podzemních vod (Lamers a kol., 2011), ošetřováním kultur a setím namořených semen ve vodních útvarech, například rýžová pole (Kreutzweiser a kol., 2008). Během setby osiva ošetřeného neonikotinoidními přípravky vzniká prach, který se jako pevná frakce dostává do recipientů ve formě spadu (Morrissey a kol., 2015). Významná kontaminace povrchových vod nastává po vydatných srážkách (Chiovarou a Siewicki, 2008) a při tání sněhu, který může nést rozpuštěnou i pevnou frakci (Main a kol., 2014).

Perzistence v půdě a s tím související možnost pohybu neonikotinoidních látek závisí do značné míry na faktorech jako je způsob a rychlost aplikace, pH, teplota, přítomnost rostlinné pokrývky, typ půdy, přítomnost organických látek a případné současné použití hnojiva. Poločas rozpadu imidaclopridu v půdě může být v závislosti na uvedených faktorech 7 – 191 dnů (SERA, 2005; ČHMÚ, 2020). Scholz a Spiteller (1992) uvádějí

rozdílný poločas rozpadu v půdách s rostlinným pokryvem (48 dní) a v holých, neosetých, půdách (190 dní). Poločas rozpadu v půdách je u každého druhu neonikotinoidů jiný, u clothianidinu to může být až 545 dnů, u acetamipridu pouze 3 dny (ČHMÚ, 2020).

Perzistence v půdě ovlivňuje vyluhování neonikotinoidů, prostředí bez přístupu světla prodlužuje poločas rozpadu, látky pak mohou prosakovat a kontaminovat podzemní vody. Neonikotinoidní látky jsou detekovány v podzemních vodách po celém světě, jejich koncentrace se pohybují v řádech ng – $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Morrissey a kol., 2015). V USA se v podzemních vodách koncentrace thiamethoxamu pohybují v rozmezí 0,05 - 1,67 $\mu\text{g.l}^{-1}$, clothianidinu 8,9 – 90,4 ng.l^{-1} a imidaclopridu 12,1 – 18,1 ng.l^{-1} (Hladik a kol., 2017; Bradford a kol., 2018). Lamers a kol. (2011) detekovali v podzemní vodě v provincii Son La v severním Vietnamu imidacloprid v koncentraci 0,16 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Ve studnách poskytujících pitnou vodu ve středním Wisconsinu detekovali Bradford a kol. (2018) thiamethoxam (až 1,43 $\mu\text{g.l}^{-1}$), imidacloprid (až 1,59 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a clothianidin (až 3,88 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Sultana a kol. (2018) uvádí výsledky vzorkování povrchových zdrojů pitné vody v Kanadském Ontariu. Thiamethoxam se vyskytoval v koncentraci 0,01 – 0,28 $\mu\text{g.l}^{-1}$, detekován byl i v upravené vodě v koncentraci 0,02 - 0,09 $\mu\text{g.l}^{-1}$. V upravené vodě byl přítomen i imidacloprid v koncentraci $<0,005 \mu\text{g.l}^{-1}$, v surové vodě pak v koncentraci 0,002-0,14 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Lu a kol. (2020) detekovali ve vzorcích kohoutkové pitné vody v Číně acetamiprid (5,8 ng.l^{-1}), imidacloprid (4,0 ng.l^{-1}), nitenpyram (2,5 ng.l^{-1}), dinotefuran (1,8 ng.l^{-1}) a clothianidin (0,69 ng.l^{-1})

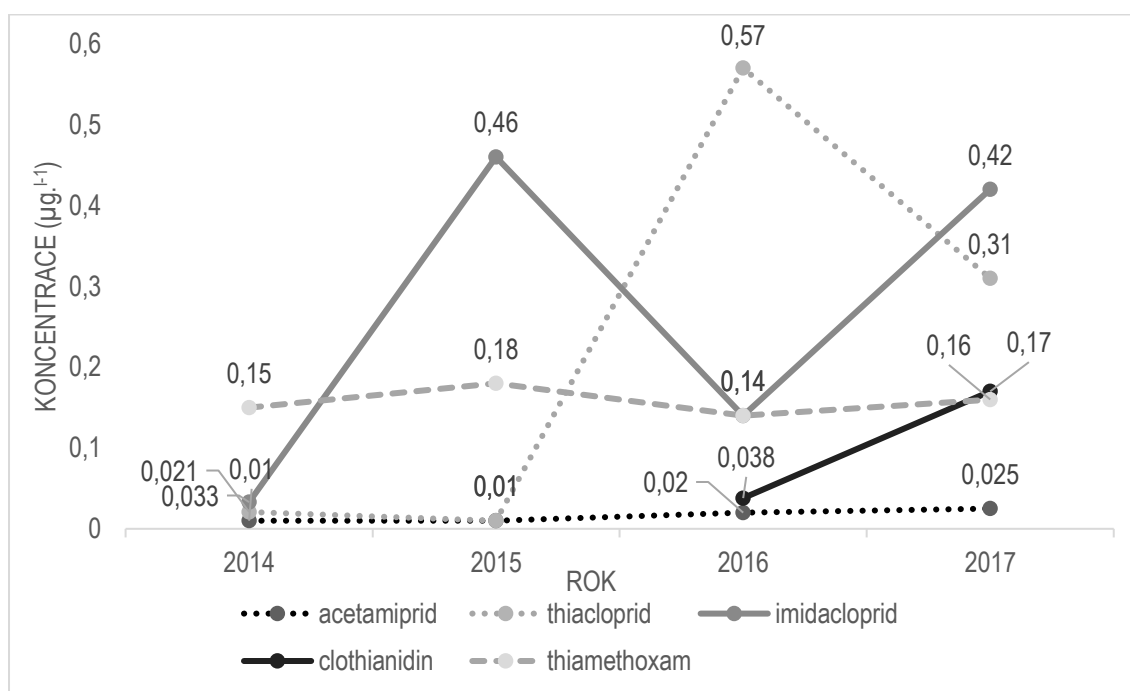
Frekvence detekce neonikotinoidů v povrchových vodách je vysoká, ale průměrně se pohybují v řádech desítek ng.l^{-1} , nejvyšší koncentrace se objevují v oblastech, kde je pěstována kukuřice a sója (Mortl a kol., 2020). Nejčastěji je detekován imidacloprid v koncentracích od 10,4 do 140 ng.l^{-1} , dále clothianidin (66-70 ng.l^{-1}), thiamethoxam (v maximální koncentraci 190 ng.l^{-1}), dinotefuran (v maximální koncentraci 130 ng.l^{-1}), acetamiprid (v maximální koncentraci 40 ng.l^{-1}), thiacloprid (0,02-4,50 $\mu\text{g.l}^{-1}$) (Suss a kol., 2006; Hladik a Kolpin, 2016; ČHMÚ, 2020).

V čínských řekách dosahují nejvyšších průměrných koncentrací imidacloprid a acetamiprid - 4,37 a 2,5 ng.l^{-1} v řece Yangtze (Mahai a kol., 2019); 31,0 a 17,1 ng.l^{-1} v řece Zhuijiang (Zhang a kol., 2019) v kanálech v urbanizovaných oblastech jsou koncentrace až 81,1 a 51,2 ng.l^{-1} (Xiong a kol., 2019).

V evropských řekách se obvykle vyskytují zejména imidacloprid (34–480 ng.l^{-1}), clothianidin (až 51,7 ng.l^{-1}), thiamethoxam (3,8–215 ng.l^{-1}), acetamiprid (12,7 ng.l^{-1}), detekován bývá i nitenpyram (Tsaboula a kol., 2016; Iancu a kol., 2019; Sousa a kol.,

2019). Nejvyšší koncentrace imidaclopridu v povrchových vodách – 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$ v Evropě byla naměřena v Nizozemí v roce 2005. Takto vysoké koncentrace se však obvykle v evropských řekách nevyskytují (Van Dijk a kol, 2013).

Výskyt neonikotinoidů v povrchových vodách v České republice je znázorněn v grafu č.1. Vývoj spotřeby jednotlivých druhů neonikotinoidů v České republice mezi lety 1995 až 2016 je zobrazen v grafu v příloze č. 1.



Graf č. 1. Výskyt neonikotinoidů v povrchových vodách v ČR v letech 2014-2017 (ČHMÚ, 2020).

2.2.4. Působení neonikotinoidů na akvatické organismy

Přesto, že vodní ekosystémy jsou neonikotinoidy široce zasaženy, jejich vlivem na akvatické organismy se stále zabývá pouze málo studií. Dosud provedené výzkumy hodnotí zejména vliv na suchozemské necílové organismy, nejčastěji včely medonosné, čmeláky (*Bombus*), další opylovače z čeledi Apoidea, motýly (*Lepidoptera*) a žížaly (*Lumbricidae*). Toxické i behaviorální účinky jsou však dobře popsány u suchozemských i vodních bezobratlých (Pisa a kol., 2014). Pokud se ve vodě vyskytuje chemická látka anebo její rezidua, vodní organismy mají velmi omezenou možnost jí uniknout. Jaký bude mít látka na organismus vliv, záleží na její koncentraci, kinetice, mechanismu účinku a schopnosti detoxifikace daného druhu (Escher a kol., 2011). Způsobů, jakými se pesticidy dostávají do těl organismů je několik, například vdechováním; společně s potravou anebo průchodem skrz epidermis (Pisa a kol., 2014).

Vzhledem k tomu, že první neonikotinoidy, zejména imidacloprid, uváděné na trh vykazovaly velmi nízkou akutní toxicitu pro standardní vodní testovací druhy používané při testování chemických látek, předpokládalo se, že by tyto látky neměly mít zásadní dopad na prostředí vodních ekosystémů (Sánchez-Bayo a kol., 2016). Morrissey a kol. (2015) uvádí 48hLC50 (koncentrace, která způsobí během 48 h úhyn 50 % testovaných organismů) imidaclopridu pro standardní testovací organismus – hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) 43,927 mg.l⁻¹, jedná se o průměrnou hodnotu získanou z 36 studií. Až v pozdějších studiích se ukázalo, že vodní bezobratlí jsou vůči imidaclopridu mnohem citlivější než standardní testovací druhy (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Neonikotinoidy mohou mít významný subletální i letální účinek na mnoho druhů vodních bezobratlých (Morrissey a kol., 2015). Vodní bezobratlí jsou velmi důležitou složkou ekosystémů, tvoří základní spojení pro tok energie mezi trofickými vrstvami. Bezobratlí jsou významnými predátory, parazity i dekompozitory, tvoří potravní základnu pro mnoho organismů z vyšších stupňů potravního řetězce (Covich a kol., 1999). Pro svou citlivost vůči kontaminaci vody jsou bezobratlí výborným bioindikátorem pro hodnocení přítomnosti znečišťujících látek a stavu ekosystému (Cairns a Pratt, 1993).

Akutní i chronická toxicita neonikotinoidních insekticidů se mezi různými druhy výrazně liší, nejcitlivějšími řády se jeví jepice (Ephemeroptera), chrostíci (Trichoptera) a některé druhy dvoukřídlých (Diptera), zejména larvy některých pakomárů (Chironomidae). Některé druhy z uvedených řádů hmyzu vykazují letální efekt již při koncentracích nižších než 1 µg.l⁻¹ (Morrissey a kol., 2015). S narůstající dobou expozice klesá hodnota LC50 (koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů) (Sánchez-Bayo a Tennekes, 2020). Například Van den Brink a kol. (2016) uvádějí rozdílnou LC50 imidaclopridu, thiaclopridu a thiamethoxamu pro jepici dvoukřídlou (*Cloeon dipterum*) při expozici 96 hodin (29-37 µg.l⁻¹, 30 µg.l⁻¹ a 52 µg.l⁻¹) a 28 dní (0,85 µg.l⁻¹, 0,30 µg.l⁻¹ a 0,94 µg.l⁻¹). Rozdílné hodnoty při krátkodobé a dlouhodobé expozici různonožce *Hyalella azteca* a larev pakomára *Chironomus tentanis* čistému imidaclopridu uvádějí Stoughton a kol. (2008). Akutní 96hLC50 (koncentrace, která způsobí během 96 h úhyn 50 % testovaných organismů) imidaclopridu pro různonožce je 65,43 µg.l⁻¹, pro pakomára 5,75 µg.l⁻¹; 28dLC50 (koncentrace, která způsobí během 28 dnů úhyn 50 % organismů) pak byla 7,08 µg.l⁻¹ a 0,91 µg.l⁻¹. Různonožec vykazuje vysokou citlivost vůči clothianidinu a acetamipridu – 96hLC50 je přibližně 5 µg.l⁻¹ (Raby a kol., 2018).

Zřejmě nejrozsáhlejší laboratorní studii akutní toxicity neonikotinoidů provedli Raby a kol. (2018), testovali vliv 6 čistých látek (acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid a thiamethoxam) na široké škále bezobratlých. Jako nejméně citlivé taxony vyhodnotili perloočky *Cladocera*, toxické účinky byly pozorovány pouze při koncentracích $> 40 \text{ mg.l}^{-1}$. Nejcitlivějšími naopak byli larvy pakomára *Chironomus dilutus* a jepice *Neocloeon triangulifer*.

Laboratorní ekotoxikologické studie jsou ve většině případů zaměřené pouze na hodnocení letality dané látky, na základě standardizovaných testů, tyto studie často zanedbávají vliv přírodních podmínek. Beketov a kol. (2008) sledovali dlouhodobé účinky 24h expozice thiaclopridu v přírodních podmínkách malé říčky tekoucí mimo zemědělsky využívané území. Mortalita organismů nenastala okamžitě po expozici, ale se 4–12denním zpožděním. Mimo mortality byl zaznamenán i další subletální účinek – snížení reprodukční schopnosti hrotnatky velké. Uvádějí také, že toxický účinek neonikotinoidů, i v nízkých koncentracích, může být v přírodních podmínkách zesílen faktory jako je predace či dostupnost potravy.

Neonikotinoidy mají na organismy také subletální efekt. U larev jepic *Hexagenia* dochází při krátkodobém vystavení (96 hodin) imidaclopridu, acetamipridu a thiaclopridu v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$, ke značnému snížení schopnosti hrabat v sedimentu a budovat v něm nory, které jsou zásadní pro jejich přežití. U thiaclopridu byl tento jev pozorován v menší míře již při koncentraci $0,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (Bartlett a kol., 2018). Stejná studie také poukazuje na snížení růstu u jepic, které byly po 96hodinovém vystavení neonikotinoidům pozorovány dalších 21 dní.

Subletálním efektem neonikotinoidů, zejména v tekoucích vodách, může být iniciace driftu organismů po proudu. Tento jev nastává například u jepice předjarní (*Baetis rhodani*), muchničky *Simulium latigonium* a blešivce obecného (*Gammarus pulex*) již při koncentracích, 7 – 22krát nižších, než je 96hLC50 pro tyto organismy, tedy při desetinách až desítkách $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Beketov a Liess, 2008b). Dalším pozorovaným jevem při vystavení organismů neonikotinoidům je snížení schopnosti příjmu potravy, která se po přemístění do čistého prostředí neobnoví. Larvy jepic, vystavené po dobu 24 hodin imidaclopridu v koncentraci vyšší než $0,5 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ již nebyly schopné vrátit se po 96 hodinách k příjmu potravy v množství jako larvy imidaclopridu nevystavené (Alexander a kol., 2007). Při koncentracích imidaclopridu $0,123 - 0,126 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ dochází k imobilizaci jepic *Cloeon dipterum* a *Caenis horaria*, u blešivce obecného dochází k imobilizaci při $15,4 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$,

u larev koreter *Chaoborus obscuripes* při 11,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. S imobilizací souvisí také snížení schopností příjmu potravy a úniku před predátory (Roessink a kol., 2013).

Při hodnocení neonikotinoidů i dalších látek by měly být hodnoceny nejen letální a subletální efekty, ale také vliv na celé společenstvo, interakce mezi organismy a funkčnost celého ekosystému (Hladik a kol., 2018).

Sánchez-Bayo a Goka (2006) provedli studii vlivu imidaclopridu na společenstvo organismů, žijících na rýžovištích. Počáteční koncentrace imidaclopridu, 240 $\mu\text{g.l}^{-1}$, klesla během měsíce na 1,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, později na 0,75 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Během prvního měsíce pokusu došlo k eliminaci většiny zooplanktonu, následkem toho také došlo ke snížení abundance dalších bezobratlých, zejména pakomárů a jepic, kterým vymizela potravní základna. Autoři poukazují na to, že je nevhodné posuzovat vliv látky na ekosystém na základě vlivu na jednotlivé, danému prostředí cizí, druhy. Snížení abundance a druhové diverzity, zejména jepic a chrostíků ve své studii zaznamenali také Pestana a kol. (2009) a to již při koncentraci imidaclopridu 1,63 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Ke změnám ve složení společenstva může docházet i při nízkých koncentracích. Organismy, které ze zasaženého prostředí vymizely, vytváří volnou niku, pro tolerantnější taxony, které zvyšují svou abundanci, aby volné místo zaplnily (Sánchez-Bayo a Goka, 2006). Mimo vymření citlivých organismů, může být změna společenstva tekoucích vod způsobena také migrací citlivějších organismů níže po proudu, do nezasažených oblastí (Beketov a Liess, 2008b).

Hayasaka a kol. (2012) sledovali po dobu dvou let vývoj společenstva na rýžových polích, uvádějí, že obnovení populací citlivých druhů je možné, pouze v případě, že koncentrace neonikotinoidních látek klesne pod hodnotu 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Avšak samotné obnovení je velmi pomalé a prakticky k němu nedochází, uvolněná místa po citlivých druzích zaujímají odolnější organismy a postupně tak dochází ke změně druhového složení společenstva.

Velmi náročné je hodnocení vlivu neonikotinoidních insekticidů na potravní sítě a s tím souvisejícími důsledky na funkce ekosystémů. Thiacloprid již v koncentraci 0,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ zvyšuje predaci blešivce potočního (*Gammarus fosarum*) vůči nymfám jepice předjarní. Zároveň dochází k redukci detritovorní činnosti blešivce na úkor predace, při koncentracích 0,75 a 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ klesá detritovorní činnost o 15,7 a 41,4 % a zároveň stoupá predace o 20,0 a 36,8 % (Englert a kol., 2012). Změnu v potravní strategii detritovorních pošvatek a chrostíků, rozkládajících opadané listy z javoru cukrového (*Acer saccharum*), ošetřené imidaclopridem popisuje také Kreutzweiser a kol. (2008). Reálně používané

koncentrace imidaclopridu, 3,2 a 11 mg.l⁻¹ nezpůsobily mortalitu vodních organismů, ale došlo ke zpomalení a omezení rozkladu organické hmoty.

Z výše uvedených skutečností vyplývají dva hlavní dopady na funkčnost ekosystému zasaženého neonikotinoidními insekticidy. Prvním je změna diverzity a abundance bezobratlých organismů, zejména hmyzu a s tím související změny v druhové skladbě jejich predátorů. Druhým dopadem je omezení rozkladu organických látek v důsledku snížení abundance rozkladačů (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Jednotlivé složky ekosystémů jsou spolu úzce propojené, přesto že neonikotinoidy nezpůsobují mortalitu obratlovců přímo, působí na ně skrz jejich potravní základnu. Snížení abundance bezobratlých koreluje se snížením abundance živočichů, jejichž potravní základnu tvoří zejména bezobratlí (Sánchez-Bayo a kol., 2016). Jak uvádí Hayasaka a kol. (2012) obnova populací zasažených neonikotinoidy je velmi náročná a pomalá, dá se tedy předpokládat, že návrat predátorů vodních bezobratlých bude stejně pomalý.

Jednou ze základních funkcí ekosystémů je rozklad organické hmoty, ten zajišťují, mimo jiné, také citlivé larvy jepic (Ephemeroptera), chrostíků (Trichoptera) a pošvatek (Plecoptera), které jsou také považovány za bioindikátory kvality vody (Morse a kol., 1993). Pokud dojde vlivem neonikotinoidů k redukci uvedených organismů, dochází také k redukci jejich detritovorní činnosti. Tento jev může nastat i jako subletální efekt (Kreutzweiser a kol., 2008). Rozklad organické hmoty ovlivňuje kvalitu vody v recipientech. Zhoršení kvality vody tak může být jedním z indikátorů přítomnosti polutantu v prostředí (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

2.3. Chemikálie a modelové organismy použité v testech toxicity

2.3.1. Acetamiprid

Acetamiprid je organická pesticidní látka ze skupiny necyklických acetamidinových neonikotinoidů s pesticidními účinky. Chemická látka byla poprvé patentována v roce 1991 (O'Neil, 2006).

Acetamiprid je bílá (obrázek č. 1), ve výjimečných případech nažloutlá krystalická látka bez zápachu, rozpustná ve vodě, acetonu, methanolu, ethanolu, dichlormethanu, chloroformu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu (PubChem, 2005). Základní vlastnosti látky jsou zaznamenány v tabulce č. 1.



Obrázek č. 1. Krystalky acetamipridu (Foto: A. Strouhová).

Tabulka č. 1. Základní fyzikálně-chemické parametry acetamipridu.

Parametr	Hodnota	Zdroj
Molární hmotnost (g.mol ⁻¹)	226,67	PubChem, (2005)
Rozpustnost ve vodě při 25 °C, pH 5 (mg.l ⁻¹)	3,48.10 ³	PubChem, (2005)
Rozpustnost ve vodě při 25 °C, pH 7 (mg.l ⁻¹)	2,95.10 ³	PubChem, (2005)
Rozpustnost ve vodě při 25 °C, pH 9 (mg.l ⁻¹)	3,96.10 ³	PubChem, (2005)
Rozdělovací koeficient oktanol-voda (log K _{ow}) při 25 °C	0,8	PubChem, (2005)
Poločas rozpadu v půdě (dny)	3	ČHMÚ, (2020)
Bioakumulační potenciál	nízký	ČHMÚ, (2020)

Přesto, že je acetamiprid v půdě mobilní, jeho rychlá degradace snižuje jeho potenciál vyplavovat se do podzemních vod. Vyšší potenciál vyluhovat se do podzemních vod mají metabolity acetamipridu, které jsou v půdě perzistentnější. Primární cestou degradace pro tuto sloučeninu je aerobní půdní metabolismus, způsobující jeho rychlou biodegradaci v půdě. Ve vodě při běžných teplotách nepodléhá hydrolyze a relativně pomalu podléhá fotodegradaci, což jej dělá ve vodě značně perzistentním. Ve většině půd je acetamiprid středně až vysoce mobilní a nepředpokládá se, že by se silně vázal na vodní sedimenty. Povrchové vody mohou být acetamipridem zasaženy při nešetrné aplikaci přípravků ve formě postřiků, anebo povrchovým odtokem (EPA, 2002).

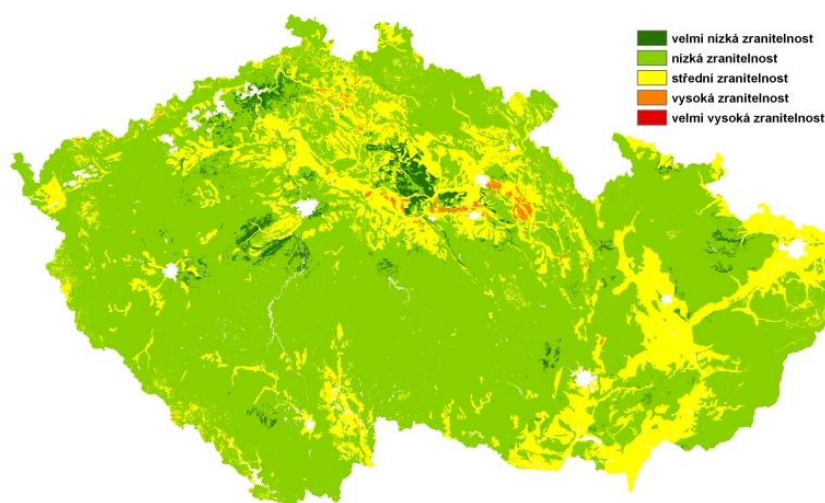
Účinná látka acetamiprid působí v insekticidních přípravcích při ochraně jabloní, hrušní, jaderovin, ořechů, chmele, brambor, plodové (rajčata, papriky, okurky) a listové zeleniny a řepky ozimé. V roce 2016 bylo v České republice aplikováno 3 543,7 t (l) acetamipridu v různých insekticidních přípravcích (ČHMÚ, 2020). Rozdělení spotřebovaného množství mezi jednotlivé plodiny je znázorněno v grafu v příloze č. 2. Spotřeba acetamipridu, obsaženého v insekticidních přípravcích, v České republice mezi lety 1998-2016 je zobrazena v grafu v příloze č. 3.

Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) (2011) je acetamidrid řazen mezi toxické látky. Bezpečný denní příjem acetamidridu je $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti.den⁻¹ (ČHMÚ, 2020). Toxicita acetamidridu pro vybrané organismy je uvedena v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Toxicita acetamidridu pro vybrané organismy

Druh	Toxicita	Hodnota (mg.l^{-1})	Zdroj
Krysa obecná (<i>Rattus rattus</i>)	LC50	213	ČHMÚ (2020)
Hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)	48hEC50	49,8	ČHMÚ (2020)
Zelená řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i>	48hEC50	98,3	ČHMÚ (2020)

Vyhláška Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zemědělství č. 5/2011 Sb., o vymezení hydrogeologických rajonů a útvarů podzemních vod, způsobu hodnocení stavu podzemních vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu podzemních vod stanovuje maximální koncentraci účinných látek v pesticidech včetně jejich významných metabolitů, produktů rozkladu a reakčních produktů na $0,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (Vyhláška č 5/2011 Sb., 2011). Zranitelnost podzemních vod acetamidridem je patrná z obrázku č. 2.



Obrázek č. 2. Zranitelnost podzemních vod látkou acetamidrid v České republice (Zdroj: ČHMÚ, 2020)

V povrchových vodách České republiky byl v roce 2017 acetamidrid detekován v 1824 vzorcích z 233 vzorkovacích míst. V 1821 vzorcích byl acetamidrid detekován pod mezí stanovitelnosti. Maximální naměřená hodnota byla $0,025 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$, tato hodnota byla naměřena na Klapském potoce u mostu Žabovřesky-Radovesice v Ústeckém kraji (ČHMÚ, 2020).

2.3.2. Insekticidní přípravek Mospilan 20 SP

Přípravek Mospilan 20 SP (Nippon Soda Chemical Co., Ltd., Japonsko) je systémově účinný selektivní insekticid, účinnou látkou, obsaženou v přípravku je acetamiprid v 20% koncentraci (200 g acetamipridu v 1 kg přípravku), dále přípravek obsahuje 2,4 % benzosulfonové kyseliny mono-C10-13-alkylderivátu sodné soli. Přípravek se ve formě postřiku používá k hubení širokého spektra škůdců, například mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), mšice *Aphidoidea sp.*, vlnatky krvavé (*Eriosoma lanigerum*), obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), krytonosce řepkového (*Ceutorhynchus napi*), blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) či bejlomorky kapustové (*Dasineura napi*). Mospilan se používá zejména při ošetření brambor, ovoce, zeleniny, chmele a olejnin (Sumi Agro Czech s.r.o., 2018).

Mospilan je zdraví škodlivý (H302) a vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky (H410). Přípravek je prodáván ve formě modrobílého jemného prášku bez zápachu. Toxicita přípravku pro vybrané organismy je uvedena v tabulce č. 3. (Sumi Agro Czech s.r.o., 2017).

Tabulka č. 3. Toxicita přípravku Mospilan 20 SP pro vybrané organismy (Sumi Agro Czech s.r.o., 2017).

Organismus	Toxicita
Krysa obecná (<i>Rattus rattus</i>)	LD50 = 808-689 mg.kg ⁻¹ (v závislosti na pohlaví)
Hrotnatka (<i>Daphnia</i>)	48hEC50 >159 mg.l ⁻¹
Pakomár <i>Chironomus riparius</i>	48hEC50 = 0,0981 mg.l ⁻¹
Řasy	72hEC50 >97,8 mg.l ⁻¹

2.3.3. Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*)

Raci patří mezi největší vodní bezobratlé živočichy, škála jimi přijímané potravy je velmi široká, jedná se o všežravé bentické makrofágy, a proto jsou ve vodním prostředí nezastupitelní. Taxonomicky se raci řadí mezi koryše řádu Decapoda, infrařádu Astacida (Hobbs, 1989).

Tělo raka tvoří dvě hlavní části – hlavohruď (cephalotorax) a zadeček (abdomen). Hlavohruď je tvořena 13 tělními články, zadeček dalšími šesti krátkými, širokými články, které jsou jasně zřetelné. Na svém těle rak nese celkem 19 párů končetin, z toho hlava nese 2 páry tykadel, kusadla a 2 páry čelistí, na hrudi se nachází 8 párů nohou (první 3

představují nohočelisti a 5 párů pereopodů, vykonávajících hlavní pohybovou funkci), posledních 6 párů končetin nese zadeček (5 párů pleopodů a jeden pár uropodů). Nejvýraznějším párem končetin je devátý pár, opatřen klepety. Celé tělo raka je pokryto exoskeletem (krunýřem), hlavohruď kryje z vrchní strany a boků karapax, vybíhající mezi očima do špičatého rostra. Karapax je celistvý a jeho povrch může být hladký, granulovaný či pokrytý drobnými i většími ostrými trny. Dýchání rakům umožňují žábry, uložená v žaberních komorách na bocích cephalotoraxu. Významným orgánem raků je také hepatopankreas, velký víceúčelový orgán, jehož hlavními funkcemi je sekrece trávicích enzymů, metabolismus sacharidů a depozice některých těžkých kovů. Hepatopankreas je také hlavním detoxikačním orgánem těla raka (Kozák a kol., 2013).

Rak mramorovaný (obrázek č. 3) je menším a značně krátkověkým druhem raka, obvykle dorůstá méně než 10 cm a dožívá se průměrně dvou let (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010). Pro tento druh je charakteristické mramorování na tmavě hnědém anebo tmavě zeleném podkladu cephalotoraxu. Klepeta jsou malá a slabě zrnitá (Holdich a kol., 2006).



Obrázek č. 3. Rak mramorovaný (Foto: A. Strouhová)

Vzhledem ke své krátkověkosti má, oproti původním evropským druhům raků, poměrně rychlý životní cyklus. V závislosti na podmínkách prostředí dosahují jedinci pohlavní dospělosti ve 25 až 35 týdnech věku, při vhodných podmínkách se raci celoročně opakovaně rozmnožují v osmi až devítitýdenních intervalech (Holdich a kol., 2006).

U raka mramorovaného vyskytujícího se v Evropě jsou známy pouze samice (obrázek č. 4), tento druh se rozmnožuje partenogeneticky – bez přítomnosti samce (Martin a kol., 2007).



Obrázek č. 4. Samice raka mramorovaného s vajíčky (Foto: A. Strouhová).

Rak mramorovaný je, co se životních podmínek týče, chovatelsky velmi nenáročným druhem, rychle roste, pohlavně dospívá a je vysoce plodný. V podmínkách střední Evropy je schopný přežít a dále se rozmnožovat i ve volné přírodě. Nebezpečnost raka mramorovaného spočívá v tvorbě velkých populací, vytlačujících původní druhy raků a je potenciálním přenašečem račího moru (Jimenez a Faulknes, 2011).

Jako bioindikátory a modelové organismy při hodnocení znečištění vody a toxicity některých látek jsou často používáni koryši, včetně raků. U raků je možné pozorovat změny v organismu na molekulární úrovni, působením polutantů. Molekulární změny v organismech jsou také ukazatelem pro posuzování ekotoxicity látek (Struzyński a kol., 2014). Za většinu hlavních metabolických procesů v organismu koryšů je zodpovědný hepatopankreas. V hepatopankreatu probíhá trávení, absorpce a skladování živin (Kozák a kol., 2013). Jako metabolicky aktivní orgán vykazuje vyšší hladiny a aktivitu enzymů vytvářejících oxyradikály než jiné tkáně, a proto je v toxickém prostředí náchylnější k oxidačnímu stresu (Kandemir a kol., 2011).

Vzhledem k nenáročnosti chovu, rychlému životnímu cyklu a partenogennímu rozmnožování s produkcí geneticky identického potomstva je rak mramorovaný vhodným indikačním druhem pro testy toxicity. Raci jsou vhodné k použití v laboratorních pokusech, vzhledem k tomu, že splňují koncept 3R (Replacement, Reduction, Refinement).

2.4. Biochemický profil hemolymfy

Při hodnocení výsledků testů toxicity je významným zdrojem informací, o stavu organismu, biochemický profil plazmy. Biochemický profil plazmy se stanovuje zejména

u ryb, ale i u raků, a přináší cenné informace o změnách stavu organismu. Hemolymfu je pro získání plazmy nutné odebírat do odběrového materiálu, ošetřeného proti srážení, například vodným roztokem sodné soli heparinu. Biochemické vyšetření informuje o metabolických funkcích, má široký rozsah a dostatečnou specifitu a citlivost. Základními stanovovanými biochemickými parametry jsou glukóza (GLU), proteiny plazmy, amoniak (NH_3), cytoplazmatické a mitochondriální enzymy, enzymy vázané na buněčnou membránu, minerály (Ca^{2+} , Mg^{2+} a anorganický fosfát) a laktát (Kolářová a Velíšek, 2012).

GLU je hlavním zdrojem energie organismů. Stanovením hladiny proteinů krevní plazmy je sledováno poškození funkce ledvin a jater (hepatopankreatu) (Kolářová a Velíšek, 2012). Amoniak je hlavním dusíkatým odpadním produktem metabolismu raků (Kozák a kol., 2013). Zvýšená hladina amoniaku indikuje selhání jaterních funkcí anebo metabolických defektů amoniaku v Krebsově cyklu. Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy jsou uvolňovány z buněk v případě změny buněčné permeability nebo buněčné nekrózy. Enzymy vázané na buněčnou membránu, zejména alkalická fosfatáza (ALP), ovlivňují membránový transport, metabolismus glykogenu a syntézu proteinů (Kolářová a Velíšek, 2012).

Esenciálním prvkem, vyskytujícím se v mnoha tělních systémech, jako je skelet, enzymatická aktivita, svalový metabolismus anebo osmoregulace, je Ca^{2+} . V plazmě se vyskytuje nejčastěji ve formě vázané na bílkoviny anebo v ionizované formě, část také tvoří komplex s kyselinami. Neméně důležitou roli v organismu hraje Mg^{2+} , mimo jiné je zapojen do syntézy a destrukce Ach, který reguluje přenos elektrických impulsů. V metabolických procesech a jako součást nukleových kyselin, fosfolipidů a nukleotidů je významný anorganický fosfát (PHOS). Laktát vzniká při anaerobní glykolýze přeměnou pyruvátu pomocí dehydrogenázy (Kolářová a Velíšek, 2012).

2.5. Oxidační stres a antioxidační obrana

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, která může vést k poškození organismu (Sies, 2000). Během buněčného metabolismu aerobních organismů mohou vést některé enzymatické a neenzymatické reakce k produkci oxyradikálů – reaktivních forem kyslíku (ROS), ty vznikají v důsledku neúplné redukce kyslíku (Halliwell, 2007). ROS se řadí mezi volné radikály – vysoce reaktivní molekuly, disponující jedním (anebo více) molekulovým či

atomovým orbitalem s nepárovým – volným elektronem. Volné radikály velmi rychle reagují s okolními částicemi, pokud radikál reaguje s dalším radikálem, vznikne molekula, která již nemá nepárový elektron. Reakcí volného radikálu s molekulou však vzniká další radikál, který získá nepárový počet elektronů. Může docházet k radikálovým řetězovým reakcím (Halliwell a Gutteridge, 2015).

Za ROS jsou považovány superoxidový anion (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) anebo hydroxylový radikál (OH) a další částečně redukované molekuly. ROS poškozují makromolekuly jako je DNA, uhlohydráty či proteiny, čímž ohrožují organismus. Ve zdravých organismech je produkce ROS vyvážena antioxidačními systémy. Antioxidační obrana reguluje hladiny ROS, ale neeliminuje je. Antioxidační obrana je pro organismus velmi energeticky náročná (Halliwell, 2007). Pokud je antioxidační obrana narušená, dochází k tzv. oxidačnímu poškození organismu – biomolekulárnímu poškození způsobeným útokem ROS na složky živých organismů. Vysoká úroveň oxidačního poškození může být způsobeno nejen oxidačním stresem, ale také selháním opravných anebo náhradních mechanismů. Zvýšené hladiny biomarkerů oxidačního stresu nemusí vždy znamenat vyšší hladinu oxidačního stresu (Halliwell a Gutteridge, 2015).

Nejběžnější reakcí, ke které vlivem oxidačního stresu dochází je lipidní peroxidace (LPO) – oxidace lipidů. Oxidací polynenasycených mastných kyselin vznikají hydroperoxydy a aldehydy, látky toxické pro organismus. Může docházet k narušení syntézy proteinů, změny struktury proteinů, poškozování DNA narušením transkripce a translace, dále k narušení buněčných membrán, poškození jejich struktury či změny v prostupnosti. Problematické je i poškození mitochondrií a mitochondriální DNA. Poškozené mitochondrie produkují větší množství ROS a tím dochází k masivní destrukci DNA (Lushchak, 2011).

Buňky na expozici ROS reagují širokou škálou způsobů – proliferací, pozastavením buněčného dělení, stárnutím, nekrózou anebo apoptózou. Reakce závisí na buněčném typu, přítomnosti určitých receptorů na povrchu buňky a účinnosti antioxidantů (Halliwell, 2007).

K testování oxidačního poškození buněk a k hodnocení různých aspektů oxidačního stresu se využívají molekulární biomarkery. Je možné sledovat hodnoty primárních a sekundárních produktů, vznikajících při působení volných radikálů v buňkách, ale také stav a aktivitu antioxidačních obranných mechanismů (Valavanidis a kol., 2005).

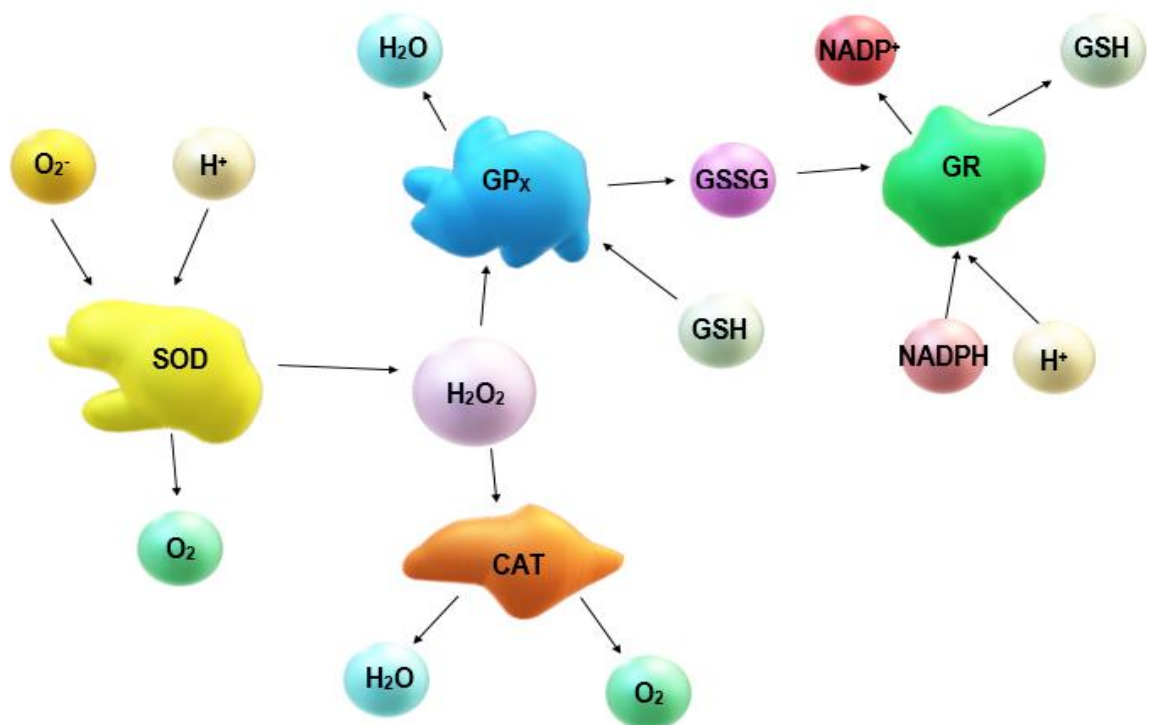
Antioxidanty jsou různorodou skupinou látek, jako celek tvoří antioxidační ochranu organismu, která musí být komplexní a jednotlivé složky se musí vzájemně doplňovat.

Složky antioxidační ochrany mají různý mechanismus účinku, intenzitu i koncentraci. Antioxidanty musejí být také v rovnováze s produkcí ROS (Racek, 2003).

Dle de Zwarta a kol. (1999) lze antioxidanty rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Základními enzymatickými antioxidačními systémy jsou superoxiddismutázy (SOD), kataláza (CAT), glutathionperoxidáza (GPx), glutathionreduktáza (GR) a glutathion S-transferáza (GST). Neenzymatickými antioxidanty jsou pak například glutathion (GR), vitamín E anebo urát.

Stanovení antioxidačních enzymů poskytuje informace o antioxidačním stavu organismu a mohou sloužit jako biomarkery oxidačního stresu (Kohen a Nyska, 2002). Při vystavení organismu nepříznivým účinkům xenobiotik se snižuje hladina antioxidačních enzymů a dochází k nerovnováze v antioxidační obraně (Livingstone, 2003).

Antioxidačními systémy (SOD, CAT, GPx, GR a GST) přímo reagují s volnými radikály a redukují jejich vliv na buňku (de Zwart a kol. 1999; Lushchak, 2011). Vzájemné působení antioxidačních enzymů je znázorněno na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5. Vzájemné působení antioxidační enzymů (upraveno podle Kohen a Nyska, 2002).

Jedním ze základních enzymatických antioxidačních systémů jsou superoxiddismutázy (SOD), ty reagují se superoxidovým radikálem za současné produkce peroxidu vodíku, který dále štěpí GPx a CAT. Aktivita tohoto enzymu určuje koncentraci O_2 a H_2O_2 a proto je pravděpodobně středem obranného mechanismu (Bowler a kol., 1992).

Na SOD navazuje kataláza (CAT) a reaguje s peroxidem vodíku za vzniku kyslíku a vody. CAT odstraňuje peroxid vodíku, vyskytující se ve vysokých koncentracích (Kohen a Nyska, 2002).

Na antioxidační obraně se mimo enzymatických systémů podílejí také systémy neenzymatické, mezi neenzymatické antioxidační systémy se řadí zejména látky s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou vitamíny C a E, glutathion, urát, melatonin anebo β -karoten, tyto sloučeniny jsou schopny bránit oxidačnímu poškození přímou a nepřímou reakcí s ROS (Kohen a Nyska, 2002).

Nejdůležitějším neenzymatickým antioxidantem je redukovaný glutathion (GSH). Jedná se o nízkomolekulární tripeptid obsahující thiolovou skupinu. Uplatňuje se při ochraně thiolových skupin buněk a je schopný také vytvářet jejich určité rezervy. Působí jako kofaktor enzymu peroxidázy a nepřímý antioxidant peroxidu vodíku, při jehož rozkladu funguje jako donor elektronů. GSH může zachytávat některé ROS také přímo, po reakci s nimi se sám stává radikálem glutathionu, na který dále reaguje jeho redukovaná forma (Kohen a Nyska, 2002; Halliwell, 2007).

Neenzymatické antioxidační systémy působí často jako kofaktory enzymatických antioxidantů, jednotlivé systémy nemohou působit samostatně, vždy je nutná přítomnost dalších systémů. Přítomnost a funkce antioxidantů však musí být vyrovnaná, při nerovnováze může docházet ke vzniku radikálů z původních antioxidantů a dalšímu poškození organismu (Ráček., 2003)

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv pesticidu na bázi neonikotinoidů (Mospilan 20 SP) a účinné látky acetamipridu na raka mramorovaného byl hodnocen pomocí akutního a chronického testu toxicity. Testování probíhalo v akvarijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie a v akvarijní místnosti Laboratoře sladkovodních ekosystémů Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

3.1. Testované chemikálie

Pro experiment byl použit chemicky čistý (99,9 %) neonikotinoid – acetamiprid a dále insekticidní přípravek Mospilan 20 SP, obsahující 20,2 % acetamipridu. Čistá látka byla zakoupena od společnosti Sigma-Aldrich. Insekticidní přípravek je registrován německou společností Nisso Chemical Europe GmbH, distributorem pro Českou republiku je Sumi Agro Czech s.r.o.

3.2. Experimentální organismy

Pro akutní i chronický testu toxicity byli použiti dospělci invazního druhu – raka mramorovaného.

Všichni použítí jedinci pocházeli z chovu Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Průměrné délky těl (měřeno od špičky rostra po konec telsonu) a průměrné hmotnosti raků jsou zaznamenány v tabulce č. 4. Všichni jedinci byli v dobré zdravotní kondici.

Tabulka č.4. Průměrné míry raků použitých v testech toxicity.

Test	Průměrná délka těla (mm) ± SD	Průměrná hmotnost (g) ± SD
Akutní test	51,17 ± 4,55	3,48 ± 0,88
Chronický test	20,60 ± 1,37	2,56 ± 0,54

3.3. Testy toxicity

3.3.1. Akutní test toxicity

3.3.1.1. *Princip a podmínky testu*

Akutní test toxicity na racích byl proveden s modifikacemi podle metodiky OECD č. 203 pro testování toxicity na rybách.

Po dobu 96 hodin byly testované organismy vystaveny účinku různých koncentrací testovaných látek rozpuštěných ve vodě. Kontrolní skupina vznikla nasazením testovacích organismů do čisté vody bez testovaných látek. Lázeň byla vyměňována každých 24 hodin. Každý den byla zaznamenávána mortalita testovacích organismů, z hodnot mortality byla pomocí probitové analýzy stanovena LC50 – letální koncentrace testovaného vzorku, která vyvolala úhyn 50 % testovacích organismů. LC byla stanovována po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

3.3.1.2. *Průběh testu*

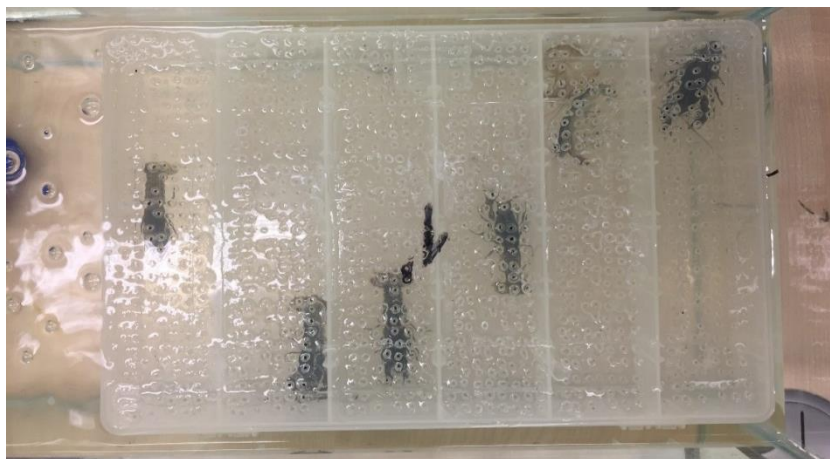
Test akutní toxicity byl proveden na invazním druhu, na raku mramorovaném. Testovanou látkou byl čistý neonikotinoid acetamiprid a neonikotinoidový insekticidní přípravek Mospilan 20 SP, s účinnou látkou acetamipridem. Byly tedy provedeny dva testy, každý test ve dvou stejných koncentračních řadách. Před testem akutní toxicity byl proveden předběžný test, ve kterém byla použita široká škála koncentrací (0-800 mg.l⁻¹ testované látky.

Na základě výsledků předběžných testů bylo pro testování čistého acetamipridu použito 6 koncentrací (0,1 – 10 mg.l⁻¹), pro testování Mospilanu 20 SP bylo použito 7 koncentrací (0,1 – 24 mg.l⁻¹) (obrázek č. 6).



Obrázek č. 6. Koncentrační řada při akutním testu toxicity s neonikotinoidovým přípravkem (Foto: A. Strouhová).

Před zahájením každého z testů byli raci zkontrolováni a rozděleni do akvárií po 6 kusech, tedy 12 kusů v každé koncentraci. Byla použita akvária o objemu 20 l s 10 l vody, po rozdělení do akvárií byli raci 7 dní před expozicí testovaným látkám aklimatizováni v čisté vodě. Raci byli v akváriích odděleni pomocí speciálních plastových boxů (obrázek č. 7) pro znemožnění kanibalismu.



Obrázek č. 7. Raci ve speciálním boxu pro znemožnění kanibalismu (Foto: A. Strouhová).

Voda použita pro testy měla kyselinovou neutralizační kapacitu (KNK_{4,5}) 1,0 mmol.l⁻¹, koncentraci celkového amoniaku (NH₃+NH₄⁻) 0,1 mg.l⁻¹, koncentraci dusičnanů (NO₃⁻) 2,92 mg.l⁻¹, koncentraci dusitanů (NO₂⁻) 0,0001 mg.l⁻¹, koncentraci fosforečnanů (PO₄³⁻) 0,003 mg.l⁻¹, koncentraci vápenatých a hořečnatých iontů (Ca²⁺+Mg²⁺) 7,0 mg.l⁻¹ a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK_{Mn}) 0,6 mg.l⁻¹.

Další fyzikálně chemické parametry vody v akváriích (teplota, pH a nasycení vody kyslíkem) byly měřeny před zahájením testů, dále po 24, 48, 72 a 96 hodinách, vždy před výměnou a po výměně lázně, všechny hodnoty byly pravidelně kontrolovány a zaznamenávány. Teplota se pohybovala mezi 17,9 až 19,9 °C, pH vody bylo v rozmezí 6,84 až 8,05, nasycení vody kyslíkem dosahovalo 87–108,7 %.

Výsledky testů lze považovat za platné, v jednotlivých testech: v kontrolních skupinách nebyly zaznamenány úhyny, teplota vody se nezměnila o více než 1 stupeň Celsia; pH se nezměnilo o jednotku; nasycení vody kyslíkem nekleslo pod 60 % a koncentrace testované látky neklesla pod 80 % nominální koncentrace. Během testů byla analyticky stanovena koncentrace acetamipridu ve vodě pomocí metody kapalinové chromatografie (HPLC-MS/MS). Koncentrace acetamipridu ve vodě během testů neklesla pod 95 % nominální

koncentrace. Stanovení koncentrace nebylo součástí diplomové práce a toto stanovení bylo provedeno formou služby. Byla tedy splněna validace pro akutní testy toxicity.

Doba expozice během testu akutní toxicity byla 96 hodin. Po každých 24 hodinách byla vyměňována celá lázeň, plastové boxy s testovanými raky byly z akvárií opatrně vyjmuty, raci byli zkontrolováni (pozorovány byly mimo úhynů také změny v chování, aktivita, reakce na podráždění aj.). Uhynulí jedinci byli z boxů odstraněni, zváženi a změřeni. Pozorované změny v chování a mortalita byly pečlivě zaznamenávány. V průběhu testů raci nebyli krmeni, z důvodu eliminace možných vlivů uvolněných toxinů z krmiva a případného ovlivnění toxicity testované látky.

3.3.1.3. Vyhodnocení testů akutní toxicity

Pro výpočet letálních koncentrací (LC) byly použity hodnoty mortality získané z jednotlivých akutních testů toxicity. Letální koncentrace byly určeny lineární regresí a probitovou analýzou s intervalem spolehlivosti 95 % pomocí programu EKO-TOX (verze 5.2, INGEO Liberec). Po 24, 48, 72 a 96 hodinách byly určovány:

- **LC0** (koncentrace testované látky, která nezpůsobí úhyn žádného testovacího organismu),
- **LC50** (koncentrace testované látky, která způsobí úhyn 50 % testovacích organismů) a
- **LC100** (koncentrace testované látky, která způsobí úhyn 100 % testovacích organismů).

3.3.2. Chronický test toxicity

3.3.2.1. Princip a podmínky testu

Na základě výsledků akutních testů toxicity byl proveden chronický test toxicity na racích.

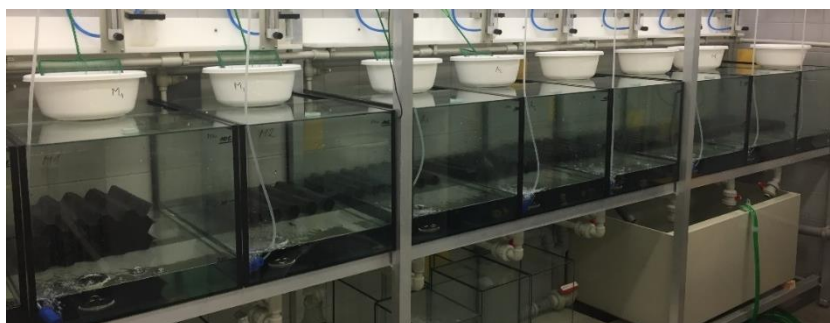
Raci byli vystaveni účinku dvou různých koncentrací testovaných látek, (acetamiprid a Mospilan 20 SP) rozpuštěných ve vodě, po dobu 20 dnů, po expozici byli raci dalších 10 dnů ponecháni v čisté vodě. Testování obou látek probíhalo současně, kontrolní skupina, která vznikla nasazením testovacích organismů do čisté vody bez testovaných látek, byla pro obě látky společná. Všechny sledované skupiny byly provedené ve dvou opakováních.

3.3.2.2. Průběh testu

Raci byli 7 dní před začátkem testu pro aklimatizaci nasazeni do testovacích akvárií s čistou vodou. Každé z akvárií bylo vybaveno úkryty a vzduchovacím zařízením. Úkryty pro raky snižují pravděpodobnost kanibalismu mezi raky (obrázek č. 8). Do každého akvária o objemu 100 litrů, s objemem lázně 20 litrů, bylo nasazeno 16 raků. Celkem bylo použito 32 raků v každé testované koncentraci i kontrole (obrázek č. 9).



Obrázek č. 8. Raci využívající úkryty (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 9. Akvária použitá v testech chronické toxicity (Foto: A. Strouhová)

Obě testované látky byly použity ve dvou různých koncentracích. Použité koncentrace byly stanoveny na základě akutních testů jako 0,1 % a 1 % zjištěné 96hLC50. Zjištěná 96hLC50 dávka pro Mospilan 20 SP byla 2,71 mg.l⁻¹ a pro acetamiprid 0,8 mg.l⁻¹ a pro Mospilan 20 SP. Výsledné koncentrace pro chronický test jsou zaznamenány v tabulce č. 5. Lázeň byla vyměňována po každých 48 hodinách.

Tabulka č. 5. Koncentrace použité v chronickém testu toxicity.

Skupina	Koncentrace (µg.l ⁻¹)
Kontrola	0
Mospilan 0,1 %	2,71
Mospilan 1 %	27,1
Acetamiprid 0,1 %	0,8
Acetamiprid 1 %	8,0

Voda použitá pro testy měla kyselinovou neutralizační kapacitu (KNK_{4,5}) 1,0 mmol.l⁻¹, koncentraci celkového amoniaku (NH³⁺ NH⁴⁺) 0,1 mg.l⁻¹, koncentraci dusičnanů (NO³⁻) 2,92 mg.l⁻¹, koncentraci dusitanů (NO²⁻) 0,0001 mg.l⁻¹, koncentraci fosforečnanů (PO₄³⁻) 0,003 mg.l⁻¹, koncentraci vápenatých a hořečnatých iontů (Ca²⁺+Mg²⁺) 7,0 mg.l⁻¹ a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK_{Mn}) 0,6 mg.l⁻¹.

Další fyzikálně – chemické parametry vody v akváriích (teplota, pH a nasycení vody kyslíkem) byly měřeny před zahájením testů, dále vždy po 48 hodinách, vždy před výměnou a po výměně lázně, všechny hodnoty byly pravidelně kontrolovány a zaznamenávány. Teplota se pohybovala mezi 19,4 až 22,4 °C, pH vody bylo v rozmezí 6,89 až 7,97, nasycení vody kyslíkem dosahovalo 82,8–94,7 % v průběhu testu.

Výsledky testů lze považovat za platné, jelikož v jednotlivých testech: v kontrolních skupinách neuhynulo více než 10 % jedinců, teplota vody v jednotlivých akváriích se nezměnila o více než 1 stupeň Celsia; pH se nezměnilo o jednotku; nasycení vody kyslíkem nekleslo pod 60 % a koncentrace testované látky neklesla pod 80 % nominální koncentrace. Během testů byla analyticky stanovena koncentrace acetamipridu stejně jako je pospáno u akutních testů (viz kapitola 3.2.2.). Byla tedy splněna validace pro chronické testy toxicity.

Test byl proveden semistaticky s celkovou dobou expozice 30 dní. Po 20denní expozici testovaným látkám následovala 10denní fáze depurace, během které byly raci umístěni pouze do čisté vody.

Krmení raků (obrázek č. 10) probíhalo jednou denně, komerčním krmivem pro ryby Granugreen od německé firmy Sera. V průběhu testu byl nastaven stabilní světelný režim – 12 hodin světla a 12 hodin tmy.



Obrázek č. 10. Krmení raků (Foto: A. Strouhová).

3.3.2.3. Odběr vzorků

Odběr vzorků (obrázek č. 11) probíhal po 10 a 20 dnech expozice testovaným látkám a po 10 dnech depurace bez testované látky. Z každé testované skupiny bylo vždy vybráno šest jedinců, ti byli změřeni a zváženi. Raci byli umístěni do šupinkového ledu (obrázek č. 12), což způsobilo jejich anestezii, následoval odběr vzorků hemolymfy a tkání (hepatopankreatu, svalu a žaber) od každého jedince.



Obrázek č. 11. Rak mramorovaný připraven k odběru vzorku hepatopankreatu a žaber (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 12. Raci umístěni na šupinkový led pro anestezii před odběrem vzorků (Foto: A. Strouhová).

Odebrané vzorky byly ukládány do předem popsaných mikrozkuvek a umístěny do hlubokomrazicího boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly uchovány až do doby jejich analyzování.

Před samotnými analýzami byly zmražené vzorky zváženy a následně homogenizovány 5 minut na rotačním homogenizátoru (TissueLyser II, QIAGEN) za použití 50mM fosfátového pufru (PP, KH_2PO_4) s 1 mM EDTA (pH 7,4). Na 100 mg tkáně byl použit 1 ml pufru. Po celou dobu homogenizace i přípravy musely být vzorky uchovány na ledu. Homogenizované vzorky byly rozpipetovány do mikrozkušavek v množství potřebném pro dané analýzy. Dále byly vzorky homogenátů skladovány zamražené při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Stanovení biochemického profilu hemolymfy

Hemolymfa raků, pro stanovení biochemických ukazatelů byla odebírána z ventrální abdominální strany injekční stříkačkou obsahující 0,01 ml heparinu sodného (Heparin inj., Léčiva, Praha) na ml hemolymfy. Vzorky hemolymfy byly promíchány a uchovávány na ledu, po odběru byly centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Následně byl odpipetován supernatant, který byl uchován při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ až do provedení měření biochemických markerů. Měření biochemických parametrů hemolymfy raků bylo prováděno na přístroji VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) podle metodiky Kolářová a Velíšek (2012). Na tomto přístroji byly měřeny následující parametry:

- glukóza (GLU),
- proteiny plazmy:
 - celkové proteiny (TP), globuliny (GLOB), albumin (ALB),
- amoniak (NH_3),
- triglyceridy (TAG),
- cytoplazmatické a mitochondriální enzymy:
 - asparát aminotransferáza (AST), alanin aminotransferáza (ALT),
 - kreatin kináza (CK), kreatin (CREA), laktát dehydrogenáza (LDH),
- enzymy vázané na buněčnou membránu:
 - alkalickou fosfatáza (ALP),
- minerály:
 - hořčík (Mg^{2+}), vápník (Ca^{2+}), anorganický fosfát (PHOS),
- laktát (LACT).

3.5. Metody stanovení biomarkerů

Všechny biomarkery byly stanovovány spektrofotometricky za pomoci přístroje TECAN Infinite M200 (TECAN Austria GmbH) v mikrodestičkovém provedení.

3.5.1. Stanovení koncentrace proteinů

Princip metody:

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA metody. Tato metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA), komplexující ionty Cu^{I} , tvořených reakcí peptidové vazby s Cu^{II} . Činidlo vzniká smísením roztoků sodné soli kyseliny bicinchoninové v alkalickém prostředí a CuSO_4 , v poměru 100:1. Vzniklý komplex je měřen spektrofotometricky při 562 nm.

Materiál a reagensie:

- 0,1M roztok NaOH, BSA standard – Sigma Aldrich (P-0914),
- roztok kyseliny bicinchoninové (BCA) – Sigma Aldrich (B-9643),
- roztok síranu měďnatého (CuSO_4) – Sigma Aldrich (C-2284).

Postup stanovení:

K 30 μl homogenátu bylo den před samotnou analýzou přidáno 570 μl 0,1M roztoku NaOH a ponecháno při pokojové teplotě.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 10 μl vzorku s 200 μl roztoku kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého, vzniklého smícháním 19,6 ml BCA a 0,4 ml CuSO_4 .

Mikrotitrační destička byla překryta fólií a vzorky byly inkubovány 30 minut při 37 °C v termoboxu. Následně byly vzorky po inkubaci spektrofotometricky změřeny při absorbanzi 562 nm.

Kalibrace:

Ke kalibraci byl použit standard BSA (1mg BSA. ml^{-1} 0,1M NaOH). Jako blank byl použit 0,1M roztok NaOH. Kalibrační řada byla stanovena v rozsahu 12,5 – 1000 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$.

Vyhodnocení:

Koncentrace proteinů byla vypočítána podle vytvořené kalibrační křivky se standardem BSA. Hodnoty byly vyjádřeny v $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$.

3.5.2. Stanovení stimulované lipidní peroxidace (TBARS)

Princip metody:

Lipidní peroxidace (LPO) byla stanovena pomocí TBARS testu. Tato metoda je založena na stanovení barevných aduktů, vznikajících reakcí produktů LPO s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Produktem LPO je malondialdehyd – MDA, jedná se o sekundární lipidický oxidační produkt, vznikající reakcí ROS s nenasycenými mastnými kyselinami. MDA reaguje s TBA za vzniku barevného komplexu, který je spektrofotometricky měřen při 532 nm.

Při stanovení stimulované LPO je cílem zhodnocení potenciálu homogenátu podstoupit lipidní peroxidaci.

Materiál a reagensie:

- TCA-BHT (20% kyselina trichloroctová a 2% butylovaný hydrotoluen v poměru 200:1,
- 0,6M HCl,
- TRIS-TBA (25mM TRIS a 10mM TBA),
- standard MDA (22% 1,1,3,3-tetraethoxypropan v 1% H₂SO₄),
- 2mM FeSO₄ v PBS.

Postup stanovení:

Pro stanovení stimulované lipidní peroxidace bylo 250 µl homogenátu vzorku 30 minut preinkubováno s 12,5 µl 2mM FeSO₄ na termodesce při 37 °C.

K 250 µl homogenátu preinkubovaného vzorku bylo přidáno 75 µl roztoku TCA-BHT. Po zvortexování byl homogenát s TCA-BHT 20 minut centrifugován při 4000 rpm a 4 °C.

Do mikroskopické kumavky bylo napipetováno 250 µl supernatantu vzorku, 50 µl HCl a 200 µl TRIS-TBA, vzniklá směs byla vařena na termobloku 45 minut při 90 °C. Následně bylo 250 µl vařeného vzorku přeneseno do mikrotitrační destičky a spektrofotometricky bylo měřeno vzniklé zbarvení při 550 a 590 nm

Kalibrace:

Rozsah kalibrační řady byl stanoven na 0,5 – 8 nmol MDA. Jako standard MDA byl použit 10mM zásobní roztok MDA (11,02 mg tetraethoxypropanu, rozpuštěného v 5 ml 1% H₂SO₄), naředěný na 100µM roztok MDA. Následně byla připravena koncentrační řada, zaznamenaná v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Koncentrační řada pro kalibraci MDA.

nmol.reakci ⁻¹	100μM roztok MDA (μl)	PBS (μl)
0	0	750
0,5	15	735
1	30	720
2	60	690
3	90	660
4	120	630
5	150	600
6	180	570
7	210	540
8	240	510

Vyhodnocení:

Lipidní peroxidace byla vypočítána podle vytvořené kalibrační křivky se standardem MDA. Hodnoty byly vyjádřeny jako nmol TBARS.mg proteinů⁻¹

3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)

Princip metody:

Metoda je založena na schopnosti kataláz rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík, rozklad je sledován měřením poklesu absorbance směsi vzorku s peroxidem vodíku, spektrofotometricky při 240 nm.

Materiál a reagensie:

- Homogenizační 50mM PP pufr,
- TRIS EDTA pufr (50mM TRIS pufr s 0,1mM EDTA),
- 0,09% H₂O₂ v TRIS EDTA pufru

Postup stanovení:

Homogenát vzorku bylo nejprve nutné zcentrifugovat 30 minut při 15 000 rpm a 4 °C, dále byl vzorek ředěn dle druhu tkáně. Poměr ředění byl nejprve vyzkoušen a poté použit u celé testované skupiny. Celkový objem vzorku po ředění musí být vždy 500 μl.

U hepatopankreatu i u žaber bylo použito ředění 30:470, tedy k 30 μl supernatantu bylo přidáno 470 μl 50 mM homogenizačního PP pufru.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 50 μl vyředěného vzorku a 250 μl 0,09% H_2O_2 v TRIS EDTA pufru. U vzorku byla ihned spektrofotometricky měřena kinetika reakce po dobu 1 minuty s 5 vteřinovými intervaly, při 240 nm.

Vyhodnocení:

Pro výpočet výsledné hodnoty aktivity kataláz je nutné znát molární extinkční koeficient H_2O_2 při 240 nm ($= 39,4 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$) Výsledná hodnota aktivity kataláz je vyjádřena jako směrnice křivky vzorku, od níž je odečtena směrnice křivky blanku a přepočtena dle následující rovnice na $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteinů}^{-1}$.

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{směrnice křivky}}{39,4 \times 1 \times \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}\text{proteinu} \times 10^3}$$

3.5.4. Stanovení redukováného glutathionu (GSH)

Princip metody:

Principem metody je reakce thioselektivní Ellmannovy reagentie (DTNB – 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými -SH skupinami za tvorby barevného produktu, který je spektrofotometricky stanovován při 420 nm. Volné – SH skupiny se ve vzorku zbaveného proteinů vyskytují zejména v molekule redukováného glutathionu – GSH.

Materiál a reagentie:

- TRIS pufr (0,8 M TRIS a 0,02M EDTA)
- 0,02M DTNB v methanolu
- GSH (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS roztok)
- TCA (25% kyselina trichloroctová)
- Homogenizační 50mM PP pufr

Postup stanovení:

Metoda má dvě fáze – nejprve byl odstraněn ze vzorků protein a poté proběhlo samotné stanovení GSH. Před první fází byl homogenát vzorku centrifugován 15 minut při 10 000 rpm a 4 °C. Do mikrozkušavek bylo pipetováno 180 μl supernatantu vzorku a 18 μl TCA. Obsah mikrozkušavek byl zvortexování, ponechán 15 minut při pokojové teplotě a následně 10 minut centrifugován při 8 000 rpm a 4 °C.

Po odstranění proteinů bylo do mikrotitračních destiček pipetováno 50 μl vzorku, 190 μl TRIS pufru a 10 μl 0,02M DTNB. Jako blank se pipetuje 240 μl TRIS pufru a 10 μl

0,02M DTNB. Vzorek byl ponechán v mikrotitračních destičkách 5 minut inkubovat při pokojové teplotě a následně byla spektrofotometricky měřena jeho absorbance při 420 nm.

Kalibrace:

Kalibrace byla provedena na základě koncentrační řady v rozsahu 0,0025 – 0,075 mg.ml⁻¹ GSH. Standard GSH (1 mg.ml⁻¹ PP pufru) byl 10krát vyředěn na 0,1 mg.ml⁻¹ v PP pufru, poté se z daného zásobního roztoku připravila koncentrační řada, ta je zaznamenána v tabulce č. 7.

K 500 μl GSH standardů bylo přidáno 50 μl TCA, obsah byl zvortexování a ponechán k inkubaci po dobu 15 minut při pokojové teplotě.

Do mikrotitrační destičky bylo pro kalibraci pipetováno 190 μl TRIS pufru, 50 μl daného standardu s TCA a 10 μl DTNB. Mikrotitrační destička se vzorky byla 5 minut ponechána při pokojové teplotě, následně byla měřena spektrofotometricky absorbance při 420 nm.

Tabulka č. 7. Koncentrační řada pro kalibraci GSH.

GSH (μM)	GSH (mg.ml⁻¹)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem homogenizačního PP pufru (μl)
244	0,075	375	125
162,85	0,05	250	250
81,42	0,025	125	375
48,85	0,015	75	425
32,57	0,01	50	450
24,42	0,0075	37,5	462,2
16,28	0,005	25	475
8,14	0,0025	12,5	487,5

Vyhodnocení:

Koncentrace glutathionu se vypočte na základě kalibrační křivky pro standardní redukováný glutathion, výsledné hodnoty jsou vyjádřeny v nmol GSH.mg proteinů⁻¹.

3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST)

Princip metody:

Metoda je založena na detekci konjugátu mezi redukovaným glutathionem a CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen), což je běžný substrát pro všechny isoformy glutathion S-transferázy.

Konjugát je detekován spektrofotometricky při 340 nm.

Materiál a reagensie:

- Homogenizační 50 mM PP pufr
- 10mM roztok redukovaného GSH
- 50mM CDNB v ethanolu

Postup stanovení:

Homogenát vzorku byl nejprve centrifugován 15 minut při 10 000 rpm a 4 °C, poté byl vyředěn s PP pufrem v poměru 1:1 (250 µl supernatantu a 250 µl PP pufru).

Do mikrotitračních destiček bylo pipetováno 30 µl vzorku a 160 µl PP pufru (poměr je nutné upravit v závislosti na druhu tkáně) a následně 10 µl 50mM CDNB v ethanolu.

Po přidání substrátu – 50 µl 10 mM redukovaného GSH probíhá ihned reakce, je tedy nutné okamžitě začít s měřením. Měření kinetiky reakce probíhá po dobu 5 minut spektrofotometricky při 340 nm.

Vyhodnocení:

Hodnota aktivity GST je vyjádřena jako směrnice křivky, od níž je odečtena směrnice blanku a přeočtena dle následující rovnice na $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteinů}^{-1}$:

$$GST \text{ aktivita} = \frac{\text{směrnice křivky} \cdot \text{min}^{-1}}{9600 \times 0,6791 \times (\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ proteinů}) \times 10^6}$$

Pro výpočet je nutné znát molární extinkční koeficient konjugované CDNB ($= 9\,600 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$) a výšku hladiny v jamce ($= 0,6791 \text{ cm}$).

3.6. Statistické vyhodnocení

Stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami a pro stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami a skupinou kontrolní byla použita jednosměrná analýza variance (ANOVA). Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica verze 12.0 (StatSoft).

4. VÝSLEDKY

4.1. Akutní testy toxicity

4.1.1. Chování raků

V průběhu akutního testu bylo sledováno chování raků. Nejpatrnější byla klesající aktivita raků se stoupající koncentrací testované látky. Po 24 hodinách expozice Mospilanu 20 SP se raci od koncentrace 10 mg.l^{-1} převraceli na bok a postupně na záda (obrázek č.13). Od koncentrace 25 mg.l^{-1} byli raci přetočeni na záda a byly patrné křečovitě záškuby končetin. U všech jedinců byly patrné rychlé pohyby žaber. Se stoupající koncentrací testované látky stoupala celková apatie organismů.



Obrázek č. 13. Raci převracejí se na bok a na záda při kontrole (Foto: A. Strouhová).

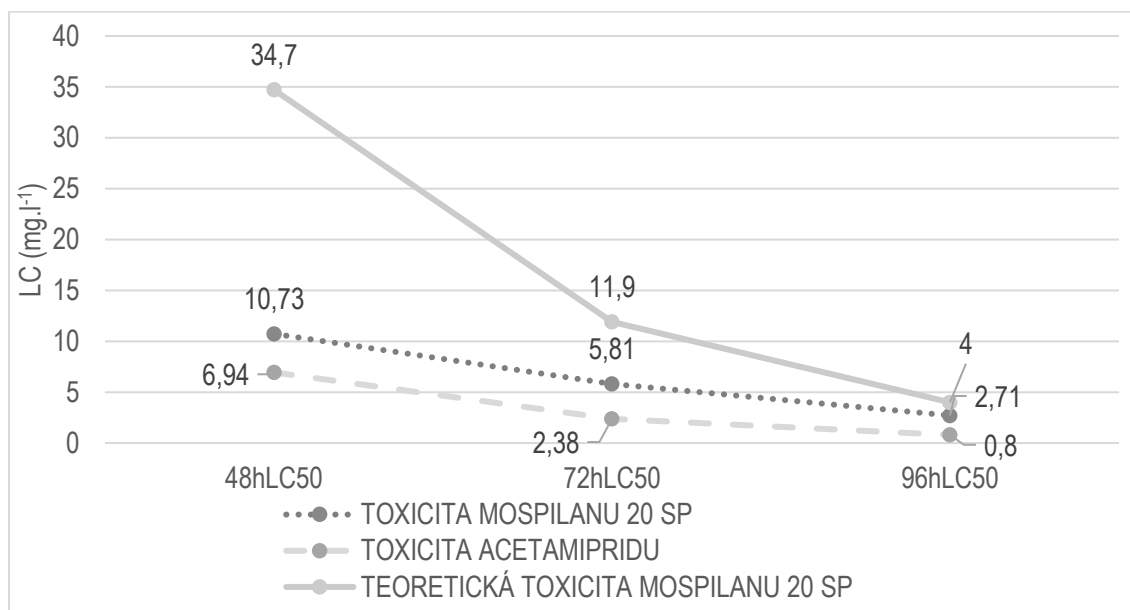
V průběhu akutního testu s čistým acetamidem byla, po 24 h pozorována klesající aktivita jedinců od koncentrace 1 mg.l^{-1} . Přetáčení na záda bylo pozorováno od koncentrace 3 mg.l^{-1} .

Raci v akváriích s koncentrací do 10 mg.l^{-1} (Mospilan) a 1 mg.l^{-1} (acetamid) byli při kontrolách pohybliví, u některých jedinců bylo pozorováno i obranné chování (štípání klepety), svlékání a kladení vajíček.

4.1.2. Mortalita raků

Na základě akutních testů toxicity byla vypočtena 96hLC50 acetamidu $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ a Mospilanu 20 SP $2,71 \text{ mg.l}^{-1}$. Neonikotinoidní přípravek Mospilan obsahuje 20 % acetamidu, na základě této skutečnosti, byla vypočtena také teoretická akutní toxicita

Mospilanu ($96\text{hLC}_{50} = 4,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Srovnání akutní toxicity acetamipridu a Mospilanu a teoretické akutní toxicity Mospilanu je znázorněno v grafu č. 2.



Graf č. 2. Srovnání akutní toxicity acetamipridu a Mospilanu a teoretické akutní toxicity Mospilanu.

Z grafu vyplývá, že největší rozdíl mezi toxicitou čisté látky a přípravkem je na počátku expozice. Dle teoretické toxicity Mospilanu lze usuzovat, že přídatné látky, obsažené v přípravku Mospilan se na toxicitě podílejí výrazněji než samotná účinná látka. Nejvýrazněji se přídatné látky projevují na začátku expozice, poté se postupně teoretická toxicita Mospilanu i toxicita naměřená vyrovnávají, v závěru expozice, po 96 hodinách, je toxicita téměř srovnatelná.

4.2. Chronický test toxicity

Během chronického testu toxicity nebyly pozorovány změny v chování, předkládané krmivo raci využívali beze zbytků. Po více než 10 dnech expozice bylo u 19 jedinců (ze všech skupin) pozorováno kladení vajíček, ta byla v průběhu testu odebírána a likvidována. V kontrolní skupině byl pozorován kanibalismus, uhynul však pouze jeden jedinec. Po 32 dvou dnech (2. den depurace) uhynul jedinec ze skupiny Mospilan 1 %, při svlékání.

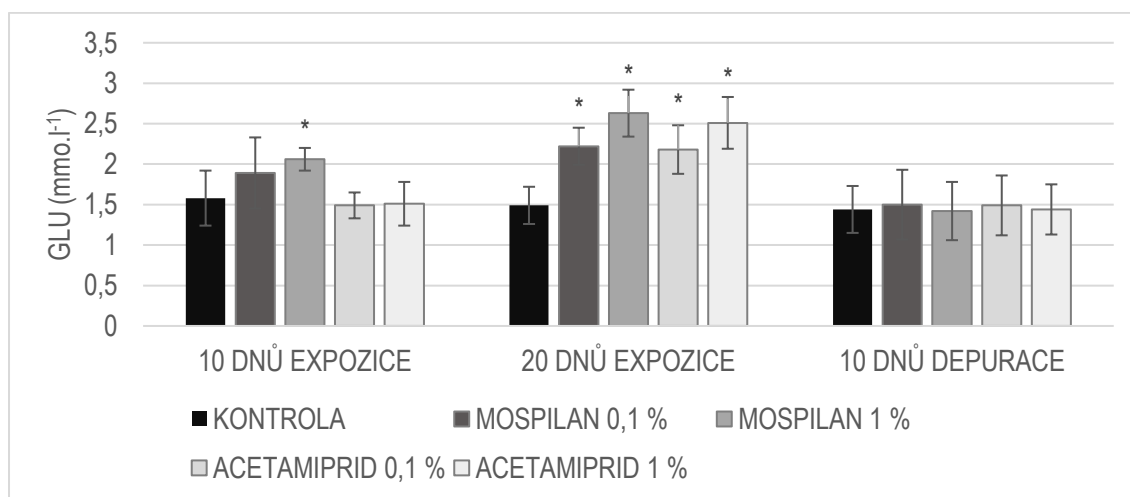
4.2.1. Biochemický profil hemolymfy

4.2.1.1. Glukóza (GLU)

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu GLU v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 3.

Po 10 dnech expozice se statisticky významně ($P<0,01$) zvýšila hladina GLU v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$, oproti kontrole. Po 20 dnech expozice se statisticky významně ($P<0,01$) zvýšila hladina GLU v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích $2,71$ a $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentracích $0,8$ a $8,0 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nenastaly u testovaných jedinců žádné statisticky významné změny v hladině GLU, oproti kontrolní skupině.



Graf č. 3. Hladina GLU v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $N=6$. Mospilan 0,1 % = $2,71 \mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = $0,8 \mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = $8 \mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P<0,01$.

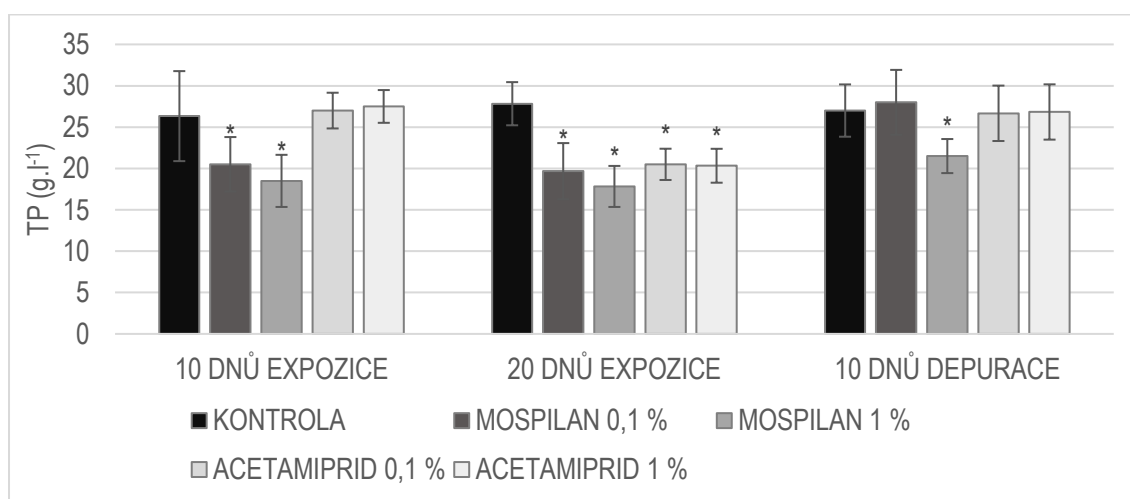
4.2.1.2. Proteiny plazmy

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu TP v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 4, na hladinu ALB v grafu č. 5 a na hladinu GLOB v grafu č. 6.

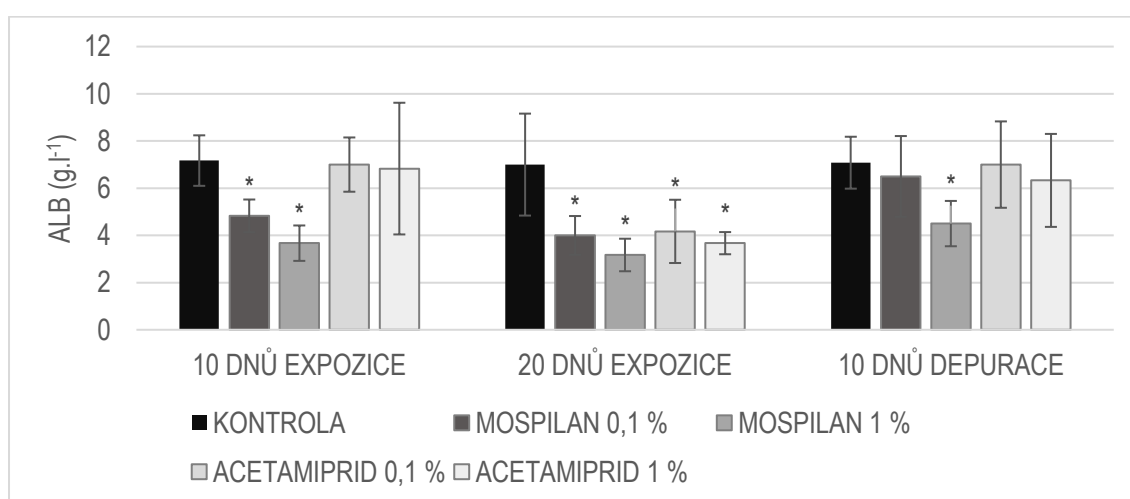
Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P<0,01$) snížení hladiny TP, ALB i GLOB, v hemolymfě jedinců exponovaných Mospilanu v koncentraci $2,71$ a $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ oproti kontrolní skupině. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému snížení TP, ALB i GLOB, v hemolymfě jedinců exponovaných Mospilanu

v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, a acetamidridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$, oproti kontrolní skupině.

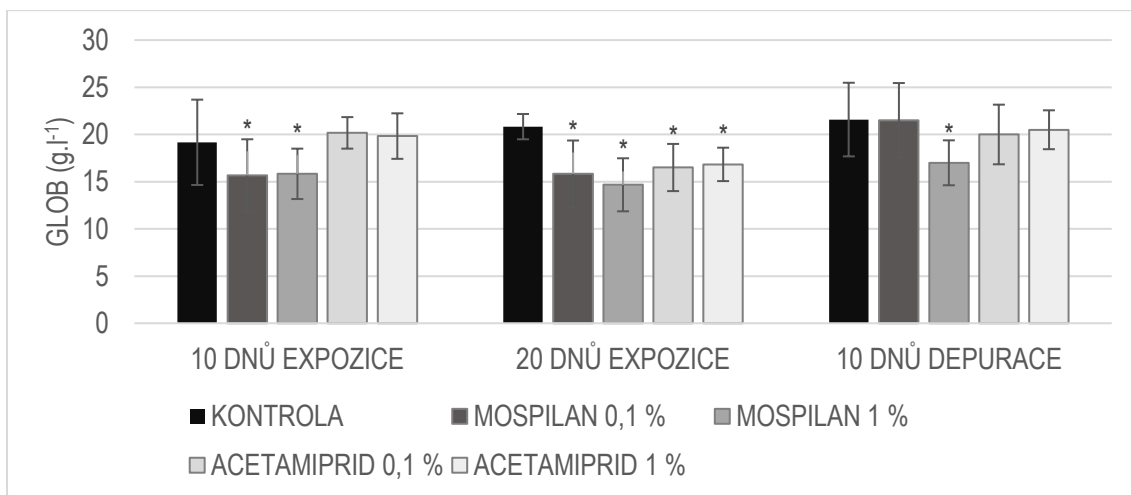
Po 10 dnech depurace byla hladina TP, ALB i GLOB statisticky významně ($P<0,01$) nižší v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců z ostatních skupin nebyly pozorovány statisticky významné změny.



Graf č. 4. Hladina TP v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidrid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidrid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P<0,01$.



Graf č. 5. Hladina ALB v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidrid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidrid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P<0,01$.

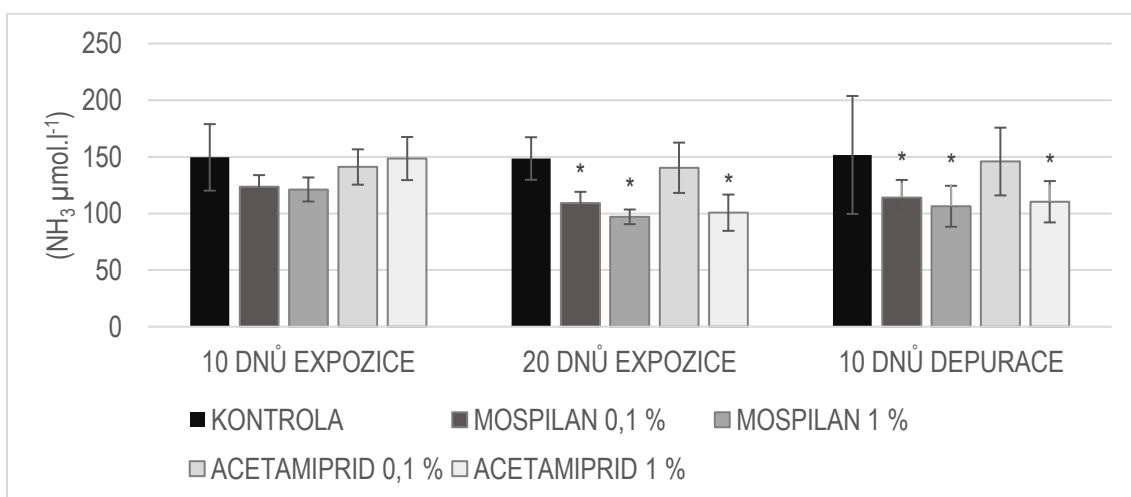


Graf č. 6. Hladina GLOB v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

4.2.1.3. Amoniak

Účinky chronické expozice acetamidipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu NH_3 v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 7.

Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny NH_3 , oproti kontrolní skupině, bylo pozorováno po 20 dnech expozice v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamidipridu v koncentraci 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Stejně statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny NH_3 bylo v hemolymfě jedinců z těchto skupin pozorováno i po 10 dnech depurace.



Graf č. 7. Hladina NH_3 v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

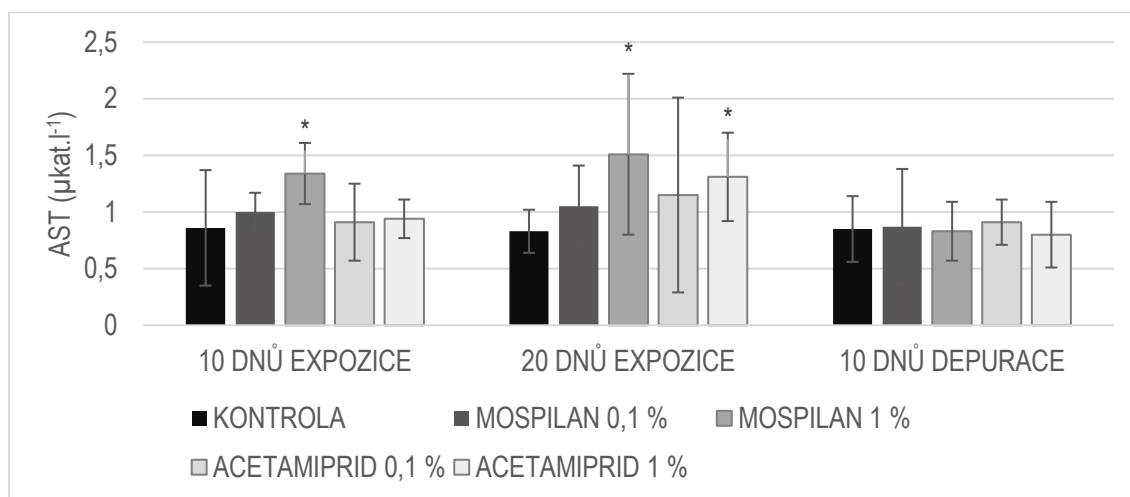
4.2.1.4. Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy

Asparát aminotransferáza (AST)

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu AST v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 8.

Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny AST, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny AST, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentraci 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nebyly pozorovány statisticky významné změny v hladině AST, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců ze žádné z testovaných skupin.



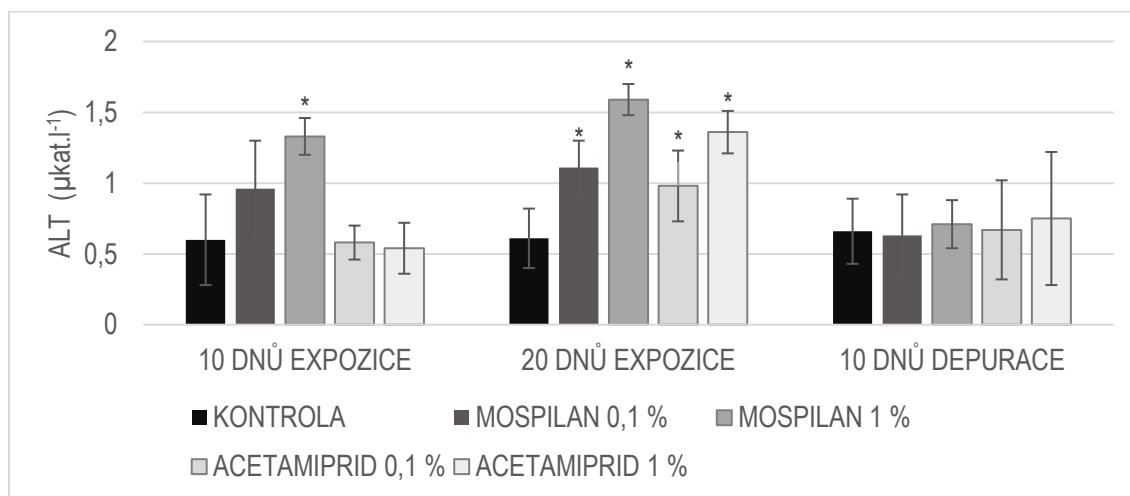
Graf č. 8. Hladina AST v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $N=6$. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

Alanin aminotransferáza (ALT)

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu ALT v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 9.

Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny ALT, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny ALT, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nebyly pozorovány statisticky významné změny v hemolymfě jedinců ze žádné testované skupiny, oproti kontrolní skupině.



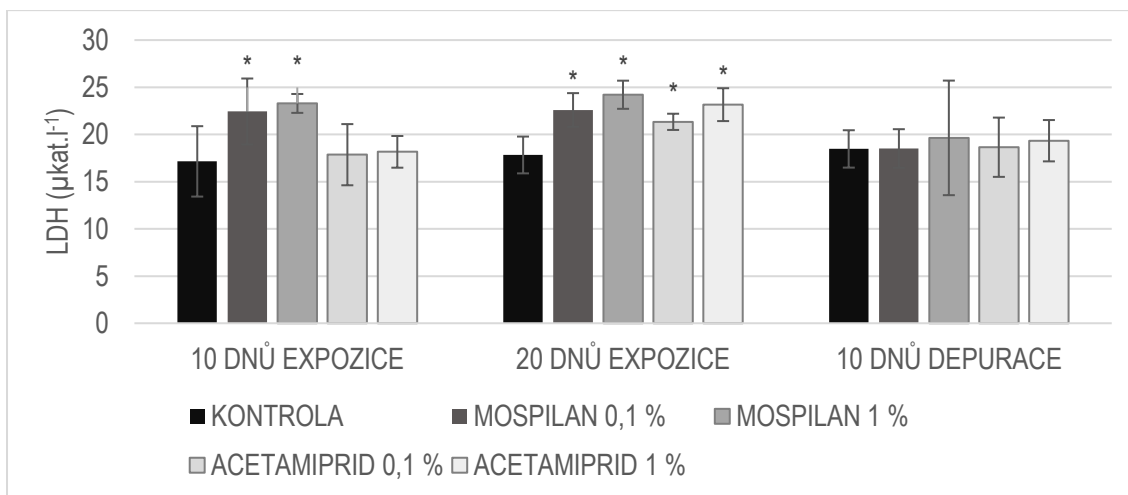
Graf č. 9. Hladina ALT v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

Laktát dehydrogenáza (LDH)

Účinky chronické expozice acetamidipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu LDH v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 10.

Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny LDH, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny LDH, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamidipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nebyly pozorovány statisticky významné změny v hemolymfě jedinců ze žádné testované skupiny, oproti kontrolní skupině.



Graf č. 10. Hladina LDH v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

4.2.1.5. Minerály

Vápník (Ca^{2+})

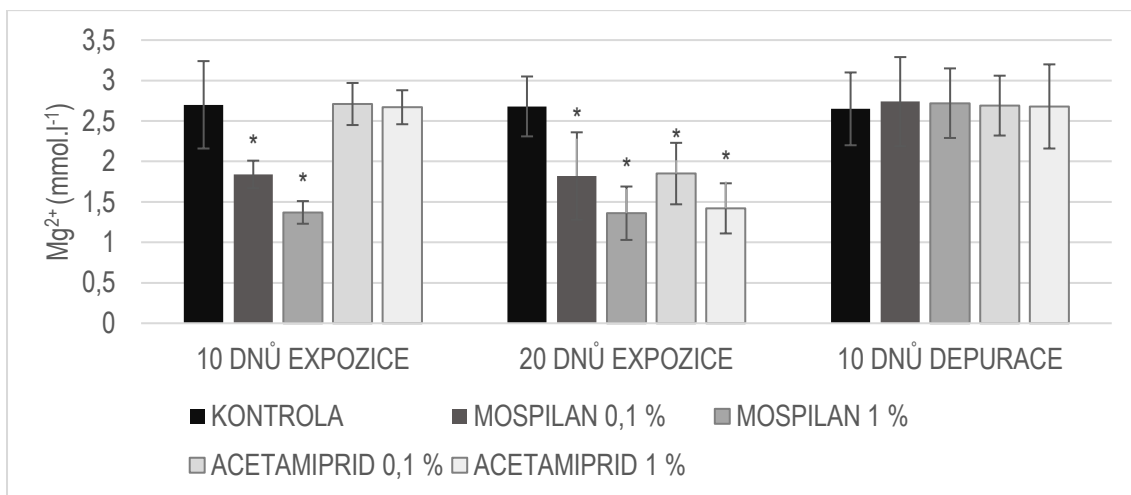
Chronická expozice acetamidipridu a přípravku Mospilan 20 SP neměla vliv na hladinu Ca^{2+} v hemolymfě raka mramorovaného.

Hořčík (Mg^{2+})

Účinky chronické expozice acetamidipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu Mg^{2+} v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 11.

Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení hladiny Mg^{2+} , oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení hladiny Mg^{2+} , oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamidipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nebyly pozorovány statisticky významné změny v hemolymfě jedinců ze žádné testované skupiny, oproti kontrolní skupině.



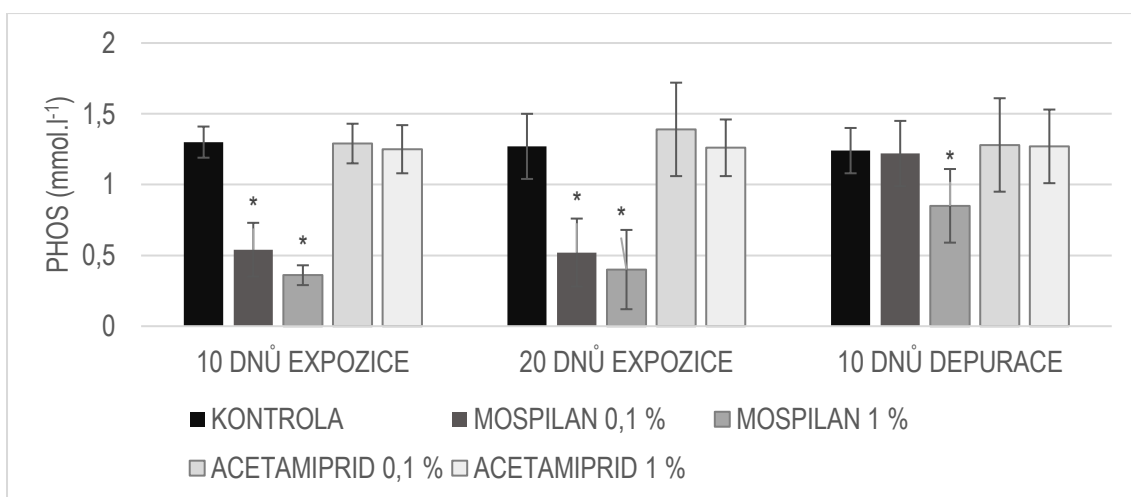
Graf č. 11. Hladina Mg²⁺ v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr ±SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 μg.l⁻¹, Mospilan 1 % = 27,1 μg.l⁻¹, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 μg.l⁻¹, Acetamidiprid 1 % = 8 μg.l⁻¹. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou *P<0,01.

Anorganický fosfát (PHOS)

Účinky chronické expozice acetamidipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu PHOS v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 12.

Po 10 a 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P<0,01$) snížení hladiny PHOS, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 μg.l⁻¹.

Po 10 dnech depurace bylo pozorováno statisticky významné ($P<0,01$) snížení hladiny PHOS v hemolymfě jedinců dříve exponovaných Mospilanu v koncentraci 27,1 μg.l⁻¹.



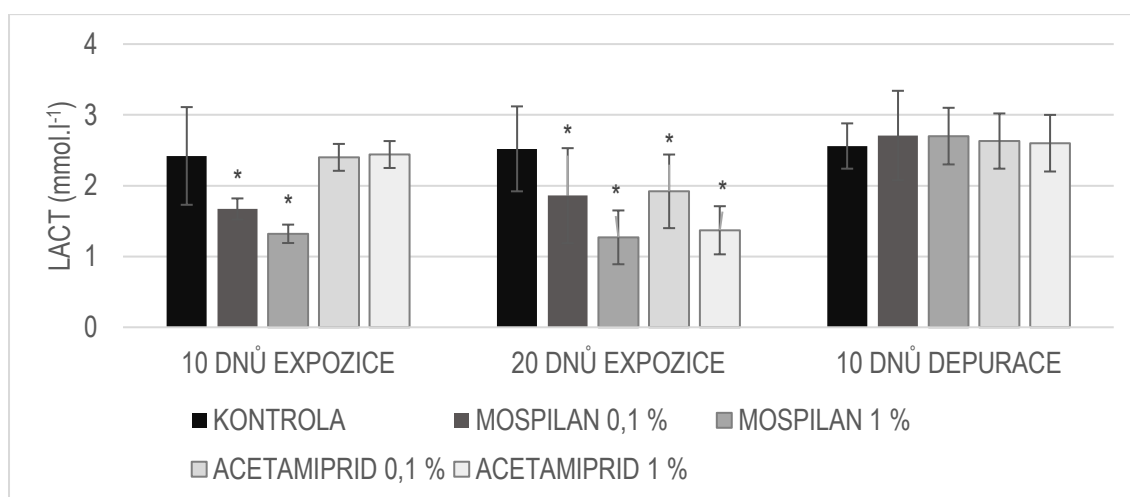
Graf č. 12. Hladina PHOS v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr ±SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 μg.l⁻¹, Mospilan 1 % = 27,1 μg.l⁻¹, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 μg.l⁻¹, Acetamidiprid 1 % = 8 μg.l⁻¹. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou *P<0,01.

4.2.1.6. Laktát

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu LACT v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 13.

Po 10 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P<0,01$) snížení hladiny LACT, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P<0,01$) snížení hladiny LACT, oproti kontrolní skupině, v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 10 dnech depurace nebyly pozorovány statisticky významné změny v hemolymfě jedinců ze žádné testované skupiny, oproti kontrolní skupině.



Graf č. 13. Hladina LACT v hemolymfě raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P<0,01$.

4.2.2. Biomarker oxidačního stresu

4.2.2.1. Lipidní peroxidace

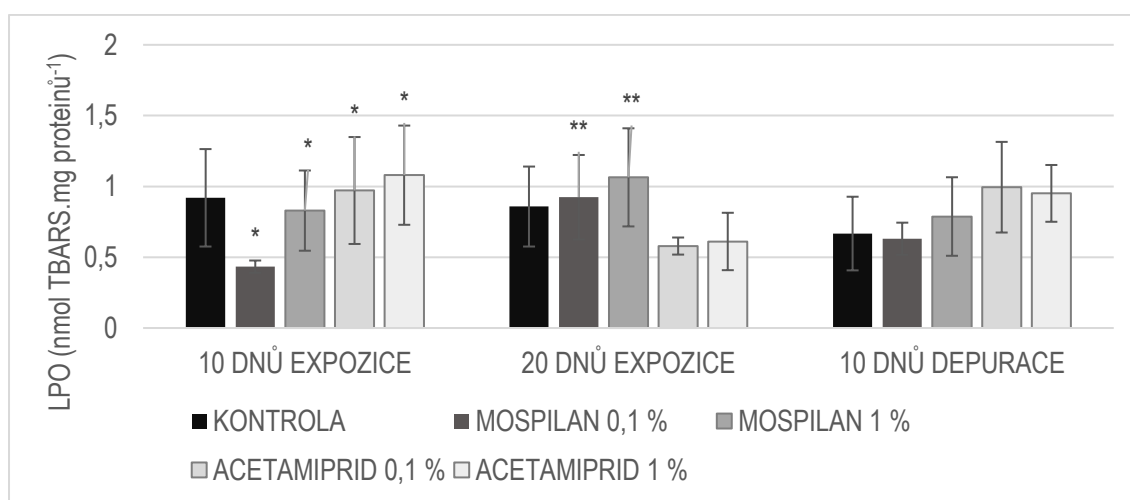
Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu LPO v hepatopankreatu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 14, účinky na hladinu LPO v žábrech raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 15.

Statisticky významné ($P<0,01$) snížení hladiny LPO v hepatopankreatu bylo pozorováno po 10 dnech expozice ve skupinách vystavené přípravku Mospilan 20 SP v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, oproti kontrolní skupině. Ve skupinách vystavených acetamipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$ došlo naopak ke zvýšení hladiny LPO. Došlo

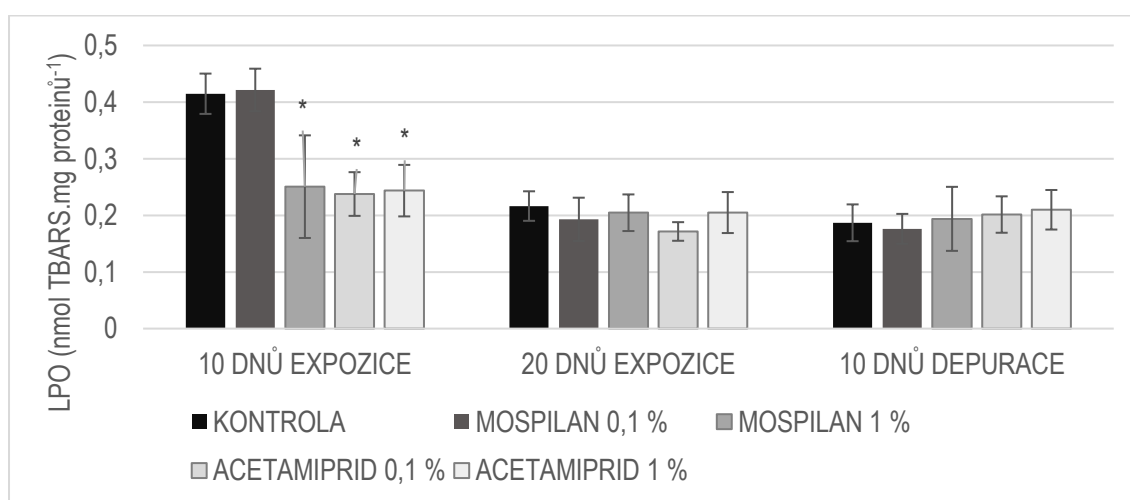
také ke statisticky významnému snížení hladiny LPO v žábrech jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P<0,05$) zvýšení hladiny LPO v hepatopankreatu raků vystavených Mospilanu, naopak u raků vystavených acetamipridu došlo ke snížení hladiny LPO. V žábrech nedošlo ke statisticky významným změnám v hladinách LPO oproti kontrolní skupině.

Po 10 dnech depurace nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v hladině LPO v hepatopankreatu ani žábrech raka mramorovaného.



Graf č. 14. Hladina LPO v hepatopankreatu raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $P<0,01$, ** $P<0,05$.



Graf č. 15. Hladina LPO v žábrech raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $P<0,01$.

4.2.3. Antioxidační biomarkery

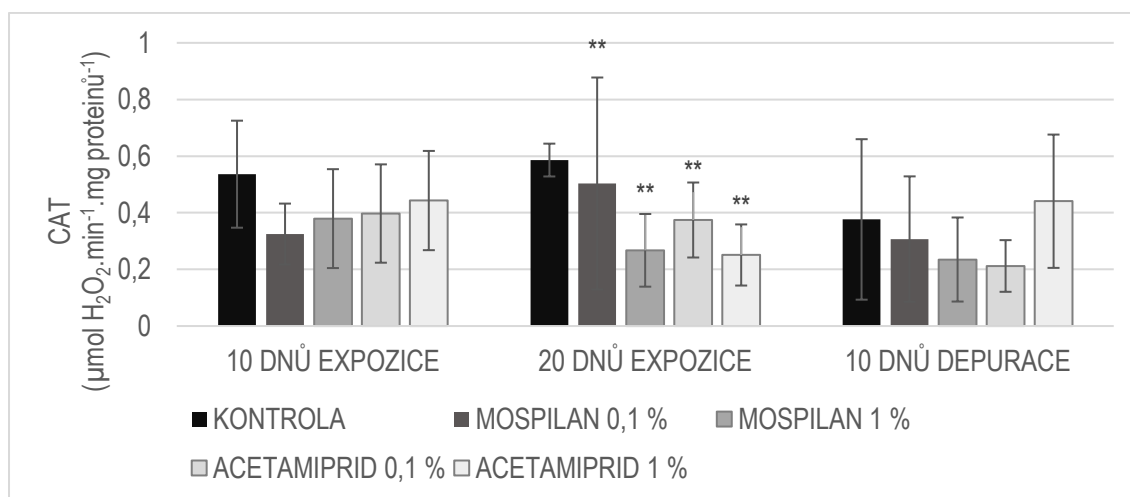
4.2.3.1. Kataláza

Účinky chronické expozice acetamipridu a přípravku Mospilan 20 SP na aktivitu CAT v hepatopankreatu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 16, účinky na aktivitu CAT v žábrech raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 17.

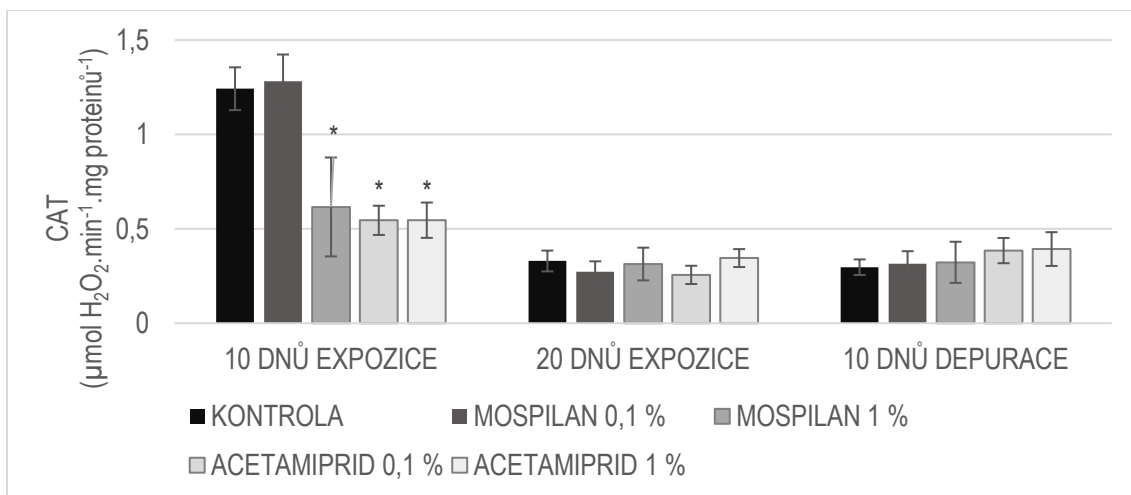
Po 10 dnech expozice nastalo statisticky významné ($P < 0,01$) snížení aktivity CAT, oproti kontrolní skupině, v žábrech jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a acetamipridu v koncentracích $0,8$ a $8,0 \mu\text{g.l}^{-1}$. V hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu ani acetamipridu nedošlo ke statisticky významným změnám, oproti kontrolní skupině.

Statisticky významné ($P < 0,05$) snížení aktivity CAT, oproti kontrolní skupině, v hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu i acetamipridu nastalo po 20 dnech expozice. V žábrech nedošlo ke statisticky významným změnám, oproti kontrolní skupině.

Po 10 dnech depurace nebyly zaznamenány statisticky významné změny v aktivitě CAT v hepatopankreatu ani žábrech raka mramorovaného.



Graf č. 16. Aktivita CAT v hepatopankreatu raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = $2,71 \mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = $27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 0,1 % = $0,8 \mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamiprid 1 % = $8 \mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou ** $P < 0,05$.



Graf č. 17. Aktivita CAT v žábrech raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetaminiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetaminiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: 10 dnů expozice * $P < 0,01$.

4.2.3.2. Redukovaný glutathion

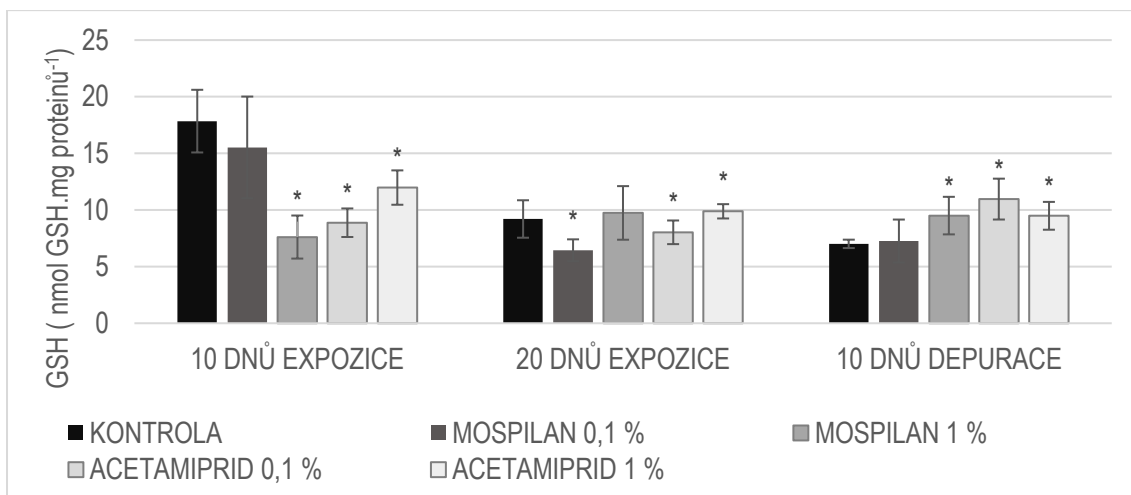
Účinky chronické expozice acetaminipridu a přípravku Mospilan 20 SP na hladinu GSH v žábrech raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 18.

V hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu a acetaminipridu nedošlo ke statisticky významným změnám v hladině GSH.

V žábrech jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetaminipridu v koncentracích 0,8 a 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ došlo po 10 dnech expozice ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení hladiny GSH, oproti kontrolní skupině.

Po 20 dnech expozice došlo v žábrech jedinců, vystavených Mospilanu v koncentraci 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetaminipridu v koncentracích 0,8 a 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení hladiny GSH, oproti kontrolní skupině.

Po 10 dnech depurace došlo u jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetaminipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$ ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny GSH, oproti kontrolní skupině.



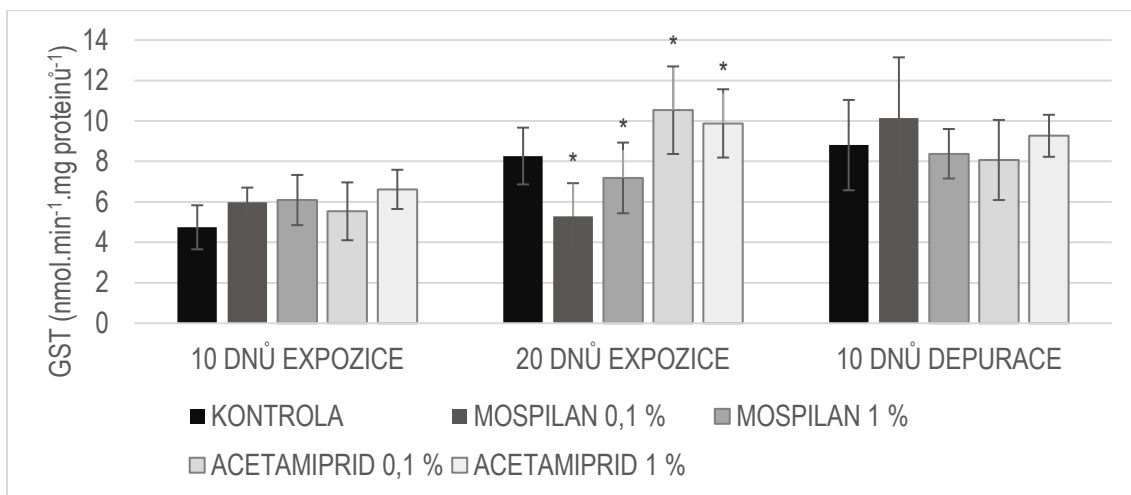
Graf č. 18. Hladina GSH v žábrech raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetaminiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetaminiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

4.2.3.3. Glutathion S-transferáza

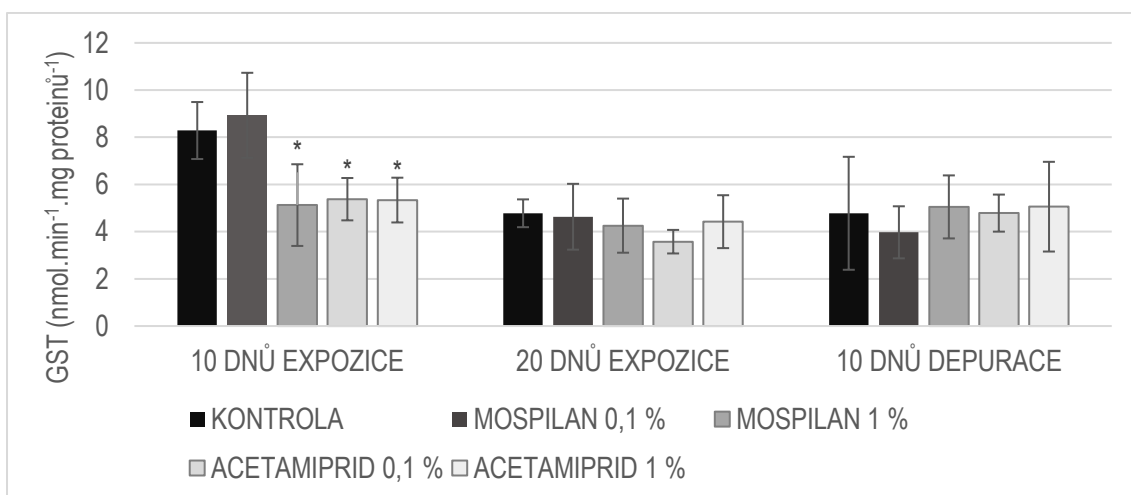
Účinky chronické expozice acetaminipridu a přípravku Mospilan 20 SP na aktivitu GST v hepatopankreatu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 19, účinky na aktivitu GST v žábrech raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 20.

Po 10 dnech expozice nedošlo ke statisticky významným změnám, oproti kontrolní skupině, v hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu ani acetaminipridu. V žábrech došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení aktivity GST, oproti kontrolní skupině, u jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a acetaminipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Po 20 dnech expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení aktivity GST, oproti kontrolní skupině, v hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu v koncentracích 2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. U jedinců vystavených acetaminipridu v koncentracích 0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$ došlo ke zvýšení aktivity GST oproti kontrolní skupině.



Graf č. 19. Aktivita GST v hepatopankreatu raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.



Graf č. 20. Aktivita GST v žábrech raka mramorovaného. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Mospilan 0,1 % = 2,71 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Mospilan 1 % = 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 0,1 % = 0,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Acetamidiprid 1 % = 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou * $P < 0,01$.

5. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo provedení akutního testu toxicity s čistým neonikotinoidem – acetamiprid a neonikotinoidním přípravkem Mospilan 20 SP, obsahující 20 % účinné látky acetamiprid, na raku mramorovaném, zjištění akutní toxicity těchto látek a posouzení rozdílu toxicity čisté látky a přípravku. Se stejnými látkami byl proveden i chronický test toxicity a bylo posouzeno působení těchto látek na biochemický profil hemolymfy, oxidační stres a oxidační biomarkery.

5.1. Akutní testy toxicity

Během experimentu byla zjištěna toxicita přípravku Mospilan 20 SP a toxicita látky acetamiprid. Mimo mortality byly sledovány také změny v chování raků. Raci exponovaní Mospilanu v koncentracích 10 mg.l⁻¹ a vyšších se převraceli na bok a na záda, klesala jejich celková aktivita. U raků vystavených čistému acetamipridu byla pohyblivost a obranné chování pozorována do koncentrace 1 mg.l⁻¹. Změny v chování raků byly pozorovány při akutních testech toxicity s pesticidním přípravkem Calypso 480 SC, jehož účinnou látkou je neonikotinoid thiacloprid, v koncentracích nad 5 mg.l⁻¹ značně klesala aktivita raků, převraceli se na záda a zvyšovala se celková apatie organismů (Strouhová, 2018). Sohn a kol. (2018) popisuje pokles obranného chování raků rusobokých (*Faxonius rusticus*), vystavených imidaclopridu v koncentraci 1 a 100 µg.l⁻¹, po 8 a 4 dnech expozice. Barbee a Stout (2009) naopak popisuje rapidní nárůst agresivního chování a kanibalismu u jedinců vystavených thiamethoxamu v koncentracích 500–700 µg.l⁻¹.

Obratlovci jsou díky jiné struktuře nAChRs vůči působení neonikotinoidů odolnější (Tomizawa a Casida, 2005). U tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*) nastávají změny chování, při akutní expozici po dobu 96 h, až od koncentrace acetamipridu 140 mg.l⁻¹ a více, kdy s narůstající koncentrací narůstá letargie a ztráta rovnováhy testovaných jedinců. V koncentracích acetamipridu 120 mg.l⁻¹ a více dochází také ke ztrátě přirozeného zbarvení některých testovaných jedinců (Guedegba a kol., 2019). Tento jev nebyl u raků pozorován a ani žádný z dalších autorů jej při expozici neonikotinoidům, nepopisuje.

Změny v chování organismů mohou vést ke zhoršení schopnosti přežití na stanovištích, kde hrají dané organismy důležitou ekologickou roli, tím dochází k narušení funkce ekosystému jako celku (Sohn a kol., 2018).

Na základě akutních testů toxicity byla zjištěna 96hLC₅₀ acetamipridu 0,8 mg.l⁻¹ a Mospilanu 20 SP 2,71 mg.l⁻¹ a dále teoretická akutní toxicita Mospilanu (96hLC₅₀ = 4,0

mg.l⁻¹). Dle teoretické toxicity Mospilanu, zejména na počátku expozice (48hLC50 = 34,7 mg.l⁻¹; 48hLC50 Mospilanu = 10,73 mg.l⁻¹; 48hLC50 acetamipridu = 6,94 mg.l⁻¹), lze usuzovat, že na toxicitě přípravku Mospilan se podílejí přídavné látky významněji než samotná účinná látka acetamiprid. Strouhová (2018) uvádí 96hLC50 přípravku Calypso pro raka mramorovaného 96hLC50 27,3 mg.l⁻¹, pro juvenilní jedince pak 96hLC50 1,6 mg.l⁻¹. Uvádí také akutní toxicitu (96hLC50) pro raka červeného (*Procambarus clarkii*) 1,94 mg.l⁻¹ a pro raka ničivého (*Cherax destructor*) 7,65 mg.l⁻¹. Barbee a Stout (2009) uvádí 96hLC50 clothianidinu (59 µg.l⁻¹), dinotefuranu (2,032 mg.l⁻¹) a thiamethoxamu (967 µg.l⁻¹) pro juvenilní jedince raka červeného. Toxicita různých neonikotinoidů pro různé druhy bezobratlých se velmi liší. Stara a kol. (2020) uvádí toxicitu přípravku Calypso pro slávku středomořskou (*Mytilus galloprovincialis*) 7,77 g.l⁻¹. Pro břichatku *Ceriodaphnia dubia* je 48hLC50 acetamipridu >33,5 mg.l⁻¹ (Raby a kol., 2018), vyšší hodnoty pak uvádí pro clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid a thiamethoxam (>100,00; >87,00; 72,12; >41,50 a >80,00 mg.l⁻¹).

96hLC50 acetamipridu pro tlamouna nilského je 183 mg.l⁻¹ (Guedegba a kol., 2019). Pro danio pruhované (*Danio rerio*) uvádí Ding a kol. (2004) hodnotu 96hLC50 imidaclopridu 281 mg.l⁻¹. Wang a kol. (2018b) hodnotí toxicitu acetamipridu pro embrya, larvy juvenilů i dospělé dania pruhovaného, 96hLC50 jsou 13,33; 15,52; 36,91 a 10,36 mg.l⁻¹.

Akutní testy toxicity nemají takovou vypovídací hodnotu jako chronické testy, i tak se ale jedná o významný způsob hodnocení toxicity látek. Na základě výsledků testů toxicity lze řadit látky do skupin dle jejich toxicity. Výsledky je také možno použít pro modelování dalších studií, využívajících akutní toxicitu jako základ, od kterého se odvozují testované koncentrace látek.

5.2. Chronický test toxicity

Během chronického testu toxicity nebyly pozorovány žádné změny v chování testovaných jedinců. Koncentrace použité v chronickém testu toxicity byly určeny na základě akutních testů toxicity, jako 0,1 % a 1 % 96hLC50 Mospilanu (tedy 2,71 a 27,1 µg.l⁻¹) a acetamipridu (0,8 a 8,0 µg.l⁻¹). Vliv neonikotinoidů na biochemický profil hemolymfy (krevní plazmy) a biomarkery oxidačního stresu a antioxidantů vodních bezobratlých uvádí pouze málo studií. Studie se častěji zaměřují na obratlovce – ryby, potkany, případně žáby. Dostupné studie jsou často také nekomplexní, hodnotí vliv na

biomarkery, avšak neuvádí hodnotu LC50. Některé studie také používají nereálné, příliš vysoké koncentrace.

5.2.1. Biochemický profil hemolymfy

Biochemický profil hemolymfy byl hodnocen ve vzorcích odebraných po 10 a 20 dnech expozice a dále po 10 dnech depurace. Během expozice došlo ke zvýšení hladiny GLU v hemolymfě jedinců ze všech testovaných skupin. Raj a Joseph (2015a) ve své studii uvádějí pokles hladiny GLU v orgánech tlamouna mosambického (*Oreochromis mossambicus*) vystaveného acetamipridu v koncentraci 399,33 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (1/15 96hLC50) po dobu 28 dnů. Výrazné snížení GLU indikuje akutní selhání jater, jako důsledek vyčerpání glykogenu, naopak zvýšení koncentrace GLU indikuje u exponovaného jedince stres (Kolářová a Velíšek, 2012).

V hemolymfě jedinců ze všech testovaných skupin došlo během expozice ke snížení hladiny proteinů. Snížená hladina proteinů v hemolymfě byla pozorována i po 10 dnech depurace u jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Raj a Joseph (2015a) pozorovali pokles hladiny proteinů při dlouhodobé expozici (28 dnů) tilapie mosambické acetamipridu v koncentraci 399,33 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pokles hladiny proteinů může být způsobený vylučováním proteinů anebo narušením syntézy proteinů v důsledku poruch jater. Snížení hladiny proteinů v krevní plazmě ropuchy skvrnitě (*Amietophrynus maculatus*), popisují Loutfy a Kamel (2018), při expozici pesticidním přípravkům Actara (obsah účinné látky thiamethoxamu – 25 %) a Acetamore (obsah účinné látky acetamiprid – 25 %) v koncentracích 30 a 40 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, po dobu 12 dnů. Použité koncentrace odpovídají 1/6 koncentracích používaných pro ošetření rostlin.

V hemolymfě raků ze všech testovaných skupin došlo během expozice ke zvýšení hladiny AST, ALT a LDH. Raj a Joseph (2015b) zaznamenali nárůst hladiny LDH v játrech, mozku a žábrech tilapií mosambických vystavených acetamipridu v koncentraci 399,33 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nárůst hladiny LDH může odrážet zvýšenou rychlost přeměny LDH na pyruvát a poté na GLU, jako zdroj energie. Nárůst AST a LDH v krevní plazmě živorodek gambusie Holbrookově (*Gambusia holbrooki*), při expozici přípravku RastT 20 SP v koncentracích 8,44 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (1/5 96hLC50) a 21,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (1/2 96hLC50) po dobu 96 hodin, uvádějí Demirci a Güngördü (2020). Chakroun a kol. (2016) uvádějí nárůst hladiny AST, ALT i LDH u potkanů domácích po 60denním podávání přípravku Mospilan 20 SL v dávce 21,7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (1/10 96hLC50). Zvýšení hladiny těchto cytoplazmatických a

mitochondriálních enzymů indikuje také poškození jater anebo hepatopankreatu (Kolářová a Velíšek, 2012).

Snížená hladina PHOS byla během expozice zaznamenána u jedinců ze všech skupin. Snížená hladina PHOS byla po 10 dnech depurace pozorována v hemolymfě jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Alam a kol. (2014) uvádějí snížení hladiny PHOS v krevní plazmě labea avanského (*Labeo rohita*) po 7 dnech expozice acetamipridu v koncentraci 10 mg.l^{-1} .

5.2.2. Biomarker oxidačního stresu

Jednou z nejběžnějších reakcí vznikajících v důsledku oxidačního stresu je lipidní peroxidace (LPO), ta byla stanovena pomocí TBARS testu. Ke snížení hladiny LPO došlo po 10 dnech expozice v hepatopankreatu jedinců vystavených Mospilanu, naopak u jedinců vystavených acetamipridu došlo ke zvýšení hladiny LPO. Po 20 dnech expozice došlo ke zvýšení hladiny LPO v hepatopankreatu jedinců v obou skupinách vystavených Mospilanu. V žábrech bylo po 10 dnech pozorováno snížení hladiny LPO.

Neonikotinoidy mohou výrazně zvýšit LPO. Studie akutních neurotoxických a hepatotoxických účinků imidaclopridu na krysy potvrzují zvýšení obsahu MDA v jádře a plazmě buněk, což svědčí o oxidačním poškození jader necílových organismů (Duzguner a Erdogan, 2012).

Stara a kol. (2019) uvádí snížení hladiny LPO v hepatopankreatu raka ničivého exponovaného pesticidním přípravku Calypso v koncentracích 0,1; 1 a 10 mg.l^{-1} po dobu 96 hodin. Zvýšení hladiny LPO nastalo u blešivce potočního, vystaveného, po dobu 24 hodin, imidaclopridu a přípravku Confidor 200 SL (účinná látka imidacloprid v koncentraci 200 g.l^{-1}) v koncentracích 102,2 a 255,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Malev a kol., 2007). Loutfy a Kamel (2018) popisují zvýšenou hladinu LPO u ropuch vystavených přípravkům Actara a Acetamore v koncentracích 30 a 40 mg.l^{-1} , po dobu 12 dnů. Zvýšení hladiny LPO bylo pozorováno také u potkanů, kterým byl po dobu 60 dnů podáván přípravek Mospilan v koncentraci 10,85 mg.kg^{-1} (1/20 96hLC50) (Chakroun a kol., 2016). K významnému zvýšení hladiny MDA v játrech, ledvinách a vaječnicích samic potkana domácího došlo při podávání imidaclopridu v dávce 20 mg.kg^{-1} (Kapoor a kol., 2010). Orální podávání imidaclopridu a zvýšení hladiny MDA ve varlatech potkana obecného vede také k výraznému ovlivnění reprodukčních procesů. K tomuto ovlivnění došlo již při podávání dávky 45 mg imidaclopridu na kilogram váhy testovaného organismu, tato dávka je desetkrát nižší než uváděná letální dávka (Lonare a kol., 2014)

U žížal hnojních (*Eisenia fetida*) měla vliv na hladinu MDA dávka 4 mg imidaclopridu na 1kg zeminy, nižší koncentrace zvýšení MDA nezpůsobily (Zhang a kol., 2014). Stejně tak u orebice rudé (*Alectoris rufa*) nemělo podávání semen ošetřených imidaclopridem žádný vliv na hladinu MDA v buňkách (Lopez-Antia a kol., 2013). Naopak při studii vlivu imidaclopridu na oxidační stres u ryb bylo prokázáno, že při koncentraci imidaclopridu 1,25 mg.l⁻¹ docházelo k vysokému nárůstu MDA a k významnému poškození DNA dania pruhovaného (Ge a kol., 2015).

5.2.3. Antioxidační biomarkery

Během expozice došlo ke snížení aktivity CAT v hepatopankreatu i žábrech jedinců ze všech testovaných skupin. Stará a kol. (2019) popisují snížení aktivity CAT v hepatopankreatu raka ničivého při 96h expozici přípravku Calypso v koncentraci 0,1 mg.l⁻¹. Snížení aktivity CAT při 20denní expozici slávek středomořských neonicotinoidnímu přípravku Calypso v koncentracích 7,77 (0,1 % 96hLC50) a 77,70 (1 % 96hLC50) mg.l⁻¹ popisují Stara a kol. (2020). Ke snížení aktivity CAT dochází u hrotnatky velké při expozici imidaclopridu v koncentraci 2,5 mg.l⁻¹ po dobu 21 dnů (Jemec a kol., 2007). Naopak zvýšení aktivity CAT v těle blešivce potočního popisují Malev a kol. (2007) při expozici přípravku Confidor, v koncentraci 511,3 μg.l⁻¹ po dobu 24 h. Zvýšení aktivity CAT nastává u bakterií *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* při vystavení acetamipridu v koncentracích 1000 a 10 mg.l⁻¹, způsobený oxidační stres však trvá relativně krátkou dobu a nezpůsobuje dlouhodobé poškození (Yao a kol., 2006). U plžů z čeledi okružákovitých *Biomphalaria straminea* došlo k poklesu aktivity CAT při 14denní expozici přípravku Assail 70 WP, obsahujícího 70 % acetamipridu, v koncentraci 1500 μg.l⁻¹ (Cossi a kol., 2020). Ke snížení aktivity (CAT) i v játrech potkanů, kterým byl po dobu 60 dní podáván přípravek Mospilan v koncentraci 10,85 mg.kg⁻¹ (Chakroun a kol., 2016).

Snížení hladiny GSH bylo pozorováno v žábrech v průběhu celé expozice u obou testovaných látek. Po 10 dnech depurace došlo k nárůstu hladiny GSH v žábrech jedinců vystavených Mospilanu v koncentraci 27,1 μg.l⁻¹ a acetamipridu v obou testovaných koncentracích. Pokles aktivity GSH po 12 dnech expozice přípravkům Actara a Acetamore v koncentracích 30 a 40 mg.l⁻¹ popisují Loutfy a Kamel (2018) u ropuch. Naopak nárůst aktivity GSH popisují Cossi a kol. (2020) u plžů *Biomphalaria straminea* při 14denní expozici přípravku Assail a acetamipridu v koncentracích 150 a 1500 μg.l⁻¹.

Ke snížení hladiny GSH v mozku potkanů dochází při koncentraci imidaclopridu 90 mg.kg^{-1} (Lonare a kol., 2014).

Snížená aktivita GST byla pozorována v hepatopankreatu i v žábrech v průběhu expozice u obou testovaných látek. Naopak u plžů *Biomphalaria straminea* došlo k nárůstu aktivity GST při 14denní expozici přípravku Assail v koncentracích 150 a $1500 \mu\text{g.l}^{-1}$ a při expozici acetamipridu v koncentraci $1500 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Cossi a kol., 2020). U standardního testovacího organismu, hrotnatky velké, dochází k poklesu aktivity GST při expozici imidaclopridu v koncentraci $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ po dobu 21 dnů (Jemec a kol., 2007). Malev a kol. (2007) uvádí nárůst aktivity GST v těle blešivce potočního, vystaveného přípravku Confidor, v koncentraci $511,3 \mu\text{g.l}^{-1}$ po dobu 24 h. Nárůst aktivity GST byl zaznamenán i u živorodek, exponovaných po dobu 24 hodin přípravku RastT v koncentraci $21,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Demirci a Güngördü, 2020). Stejně tak dochází ke zvýšení aktivity GST v játrech gambusie komáří (*Gambusia affinis*) při expozici přípravku Actara v koncentraci $10\text{--}40 \text{ mg.l}^{-1}$ ($48\text{hLC}5 = 84,7 \text{ mg.l}^{-1}$) při 14denní expozici (Cheghib a kol., 2020). Zvýšení a snížení aktivity GST v různých koncentracích acetamipridu bylo pozorováno u včely medonosné. Při orálním podání $0,01 \text{ mg}$ acetamipridu docházelo, během 24 hodin, ke zvýšení aktivity GST, ke snížení docházelo při podávání dávek $0,04 \text{ mg}$ a vyšších. V případě orálního podávání dinotefuranu docházelo ke snížení aktivity GST již při dávce $0,01 \text{ mg}$. $24\text{hLC}50$ pro včelu medonosnou je $1,69 \mu\text{g}$ orálně podaného acetamipridu a $0,6 \text{ ng}$ dinotefuranu (Badawy a kol., 2015). Stoupající aktivitu GST zaznamenali také Drobne a kol. (2008) při podávání $5 \mu\text{g}$ imidaclopridu stínce obecné (*Porcellio scaber*) při zvýšení dávky na 10 a $50 \mu\text{g}$ došlo opět k poklesu aktivity GST.

Aktivita biomarkerů oxidačního stresu se liší nejen v závislosti na druhu testovaného organismu, ale také v závislosti na druhu a množství použité neonicotinoidní látky. Provedené studie ukazují, že antioxidační enzymy velmi dobře reagují na působení neonicotinoidů a jsou proto dobrými biomarkery pro hodnocení toxického efektu neonicotinoidů (Livingstone, 2003; Wang a kol., 2018a).

Změny v hladinách biomarkerů biochemického profilu hemolymfy, biomarkeru oxidačního stresu i antioxidačních biomarkerů často nastávají již při koncentracích odpovídajících $1/2$; $1/5$ (Demirci a Güngördü, 2020); $1/6$ (Loutfy a Kamel, 2018); $1/10$ (Chakroun a kol. 2016) anebo $1/15$ (Raj a Joseph, 2015a) $\text{LC}50$ či koncentrace běžně používané pro ošetření rostlin. V této studii byly pozorovány změny již při koncentracích odpovídajících $1/100 \text{ LC}50$ přípravku Mospilan i acetamipridu.

Z této i dalších uvedených studií často vyplývá, že pesticidní přípravek je často toxičtější, působí rychleji anebo působí větší poškození organismu než jeho samotná účinná látka. Vzhledem k této skutečnosti je vhodné hodnotit současně vliv přípravku i účinné látky současně, jako bylo provedeno v této práci. Vyšší toxicita přípravků je často způsobena přídatnými látkami, které přípravek, mimo účinné látky, obsahuje.

6. ZÁVĚR

V této práci bylo posuzováno působení neonikotinoиду – acetamipridu a neonikotinoïdního přípravku Mospilan 20 SP, jehož je acetamiprid účinnou látkou. K posouzení vlivu těchto látek byl použit akutní a chronický test toxicity. Pomocí akutního testu toxicity byla zjištěna akutní toxicita těchto látek a byl posouzen rozdíl toxicity čisté látky a přípravku. Dále byl proveden chronický test toxicity a bylo posouzeno působení těchto látek na biochemický profil hemolymfy, oxidační stres a antioxidační biomarkery.

Pomocí akutních testů toxicity byla zjištěna akutní toxicita acetamipridu ($96hLC_{50} = 0,8 \text{ mg.l}^{-1}$) a Mospilanu 20 SP ($96hLC_{50} = 2,71 \text{ mg.l}^{-1}$). Na základě informace, že přípravek Mospilan obsahuje 20 % účinné látky acetamiprid, byla vypočtena teoretická akutní toxicita Mospilanu ($96hLC_{50} = 4,0 \text{ mg.l}^{-1}$), lze usuzovat, že na toxicitě přípravku Mospilan se významně podílejí přídavné látky, zřejmě benzosulfonové kyseliny mono-C10-13-alkylderivátu sodné soli. Během akutních testů toxicity byly pozorovány také změny v chování testovaných jedinců, zejména zpomalování pohybů, otáčení na záda, apatie organismů a úhyny.

Chronické testy toxicity, modelované na základě výsledků akutních testů, prokázaly vliv neonikotinoïdního přípravku a čisté látky na biochemické biomarkery, oxidační stres i antioxidační biomarkery. Jedná se zejména o zvýšení hladiny GLU, AST, ALT a LDH, snížení hladiny TP, PHOS a GSH, snížení aktivity CAT a GST a o změny v hladině LPO.

Tato studie prokazuje negativní vliv neonikotinoïdů i neonikotinoïdních pesticidních přípravků na necílové vodní organismy. Změny v chování organismů, případně jejich vyhubení vede ke změnám ve funkčnosti celých ekosystémů.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Alam, A., Tabinda, A. B., Hassan, M., Yasar, A., 2014. Comparative Toxicity of Acetamiprid and *Azadirachta indica* Leave Extract on Biochemical Components of Blood of *Labeo rohita*. J. Zool. 46, 1215–1520.
- Alexander, A. C., Culp, J. M., Liber, K., Cessna, A. J., 2007. Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1726–1732.
- Armbrust, K.L., Peeler, H.B., 2002. Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf. Pest Manag. Sci. 58, 702–706.
- Badawy, M. E. I., Nasr, H. M., Rabea, E. I., 2015. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. Apidologie 46, 177–193.
- Bal, R., Türk, G., Yilmaz, Ö., Etem, E., Kuloğlu, T., Baydaş, G., Naziroğlu, M., 2012. Effects of clothianidin exposure on sperm quality, testicular apoptosis and fatty acid composition in developing male rats. Cell Biochem. Funct. 28, 187–200.
- Barbee, G. C., Stout, M. J., 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. Pest Manag. Sci. 65, 11.
- Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., Gillis, P. L., de Solla, S. R., 2018. Lethal and sublethal toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the mayfly, *Hexagenia* spp. Environ. Pollut. 238, 63–75.
- Bass, Ch., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pestic. Biochem. Physiol. 121, 78–87.
- Beketov, M. A., Liess, M., 2008a. Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environ. Toxicol. Chem. 27, 461–470.
- Beketov, M. A., Liess, M., 2008b. Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates. Arch. Environ. Contam. Toxicol 55, 247–253.
- Beketov, M. A., Schäfer, R. B., Marwitz, A., Paschke, A., Liess, M., 2008. Long-term stream invertebrate community alternations induced by the insecticide thiacloprid: Effect concentrations and recovery dynamics. Sci. Tot. Environ. 405, 96–108.

- Bowler, Ch., Van Montagu, M., Inzé, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bradford, B. Z., Huseeth, A. S., Groves, R. L., 2018. Widespread detections of neonicotinoid contaminants in central Wisconsin groundwater. *PLoS One* 13(10), e0201753.
- CAC (Codex Alimentarius Commission), 2013. Dostupné z: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/> (navštíveno online 2. 3. 2020).
- Cairns, J., Pratt, J. R., 1993. A History of Biological Monitoring Using Benthic Macroinvertebrates. In: Rosenberg, D. M., Resh, V. H., *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. New York: Chapman & Hall, pp. 10-27.
- Carreck, N. L., 2017. A beekeeper's perspective on the neonicotinoid ban. *Pest. Manag. Sci.* 7, 1295–1298.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 378 pp.
- Cossi, P. F., Herbet, L. T., Yusseppone M. S., Fernanda P., Kristoff, G., 2020. Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail 70[®]) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 192, 110248.
- Covich, A. P., Palmer, M. A., Crowl, T.A., 1999. The Role of Benthic Invertebrate Species in Freshwater Ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience* 49, 119–127.
- Cremlyn, R. J. W., 1978. *Pesticides: preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, 240 pp.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2020. Pasportizace pesticidů. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/>, (navštíveno online 29. 1. 2020).
- de Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E., 1999. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals Biol. Med.*, 26, pp. 202-226.
- Demirci, Ö., Güngördü, A., 2020. Evaluation of the biochemical effects of an acetamiprid-based insecticide on a non-target species, *Gambusia holbrooki* Water. *Environ. J.* 0, 1–9.

- Ding, Z., Yang, Y., Jin, H., Shan, Z., Yu, H., Feng, J., Zhang, X., Zhou, J., 2004. Acute toxicity and bio-concentration factor of three pesticides on *Brachydanio rerio*. *J. App. Ecol.* 15, 888-890.
- Drobne, D., Blazic, M., Van Gestel, C.A., Leser, V., Zidar, P., 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 71, 1326–1334.
- Duzguner, V., Erdogan, S., 2010. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 13–18.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imidacloprid. European Food Safety Authority Scientific Report. European Food Safety Authority.
- Englert, D., Bundschuh, M., Schulz, R., 2012. Thiacloprid affects trophic interaction between gammarids and mayflies. *Environ. Pollut.* 167, 41–46.
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 2002. Pesticide Fact Sheet. Name of chemical: Acetamiprid, Reason for Issuance: Conditional Registration. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf, (navštíveno online 30. 1. 2020).
- Escher, B. I., Ashauer, R., Dyer, S., Hermens, J. L. M., Lee, J.-H., Leslie, H. A., Mayer, P., Meador, J. P., Warne, M. S. J., 2011. Crucial Role of Mechanisms and Modes of Toxic Action for Understanding Tissue Residue Toxicity and Internal Effect Concentrations of Organic Chemicals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 28–49.
- Evropská komise, 2020. Neonicotinoids. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en, (navštíveno online 26. 3. 2020).
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63, 1856–1862.
- Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N. E., 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual – and colony – level traits in bees. *Nature* 491, 105–119.
- Greatti, M., Barbattini, R., Stravisi, A., Sabatini, A.G., Rossi, S., 2006. Presence of the ai imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds. *Bull. Insectology* 59, 99–103.

- Guedegba, N. L., Toko, I. I., Agbohessi, P. T., Zoumenou, B., Douny, C., Mandiki, S. N. M., Schiffers, B., Scippo, M. L., Kestemont, P., 2019. Comparative acute toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) juveniles. *J. Environ. Sci. Health., Part B.* 54, 580–589.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, pp 1147-1150.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th Edition. Oxford: Clarendon Press, 944 pp.
- Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Saito, F., Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2012. Cumulative ecological impact of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 355–362.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–351.
- Hladik, M. L.; Kolpin, D. W., 2016. First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. *Environ. Chem.* 13, 12–20.
- Hladik, M. L., Bradbury, S., Schulte, L. A., Helmers, M., Witte, C., Kolpin, D. W., Garrett, J. D., Harris, M., 2017. Neonicotinoid insecticide removal by prairie strips in row-cropped watersheds with historical seed coating use. *Agric Ecosyst Environ.* 241, 160–167.
- Hladik, M. L., Main, A. R., Goulson, D., 2018. Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3329–3335.
- Hobbs, H.H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 480, 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*. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle, pp. 49-129.

- Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., Bhourri, R., Sallem A., Najjar, M. F., Hassine, M., Mehdi, M., Haouas, Z., Cheikh, H. B., 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 25191–25199.
- Cheghib, Y., Chouahda, S., Soltani, N., 2020. Side-effects of a neonicotinoid insecticide (Actara) on a non-target larvivorous fish *Gambusia affinis*: Growth and biomarker responses. *Egypt. J. Aqua. Res.* DOI: 10.1016/j.ejar.2019.12.007.
- Chiovarou, E. D., Siewicki, T. C., 2008. Comparison of storm intensity and application timing on modeled transport and fate of six contaminants. *Sci. Total Environ.* 389, 87–100.
- Iancu, V., Petre, J., Galaon, T., Radu, G. L., 2019. Occurrence of neonicotinoid residues in Danube River and tributaries. *Rev. Chem.* 70, 313–318.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčič, K., Fournier, D., Trebše, P., 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere* 68, 1408–1418.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Jimenez, S. A., Faulkes, Z., 2011. Can the parthenogenetic marbled crayfish *Marmorkrebs* compete with other crayfish species in fight? *J. Ethol.* 29, 115–120.
- Kandemir, F. M., Benzer, F., Erisir, M., Yildirim, N. C., 2011. Malondialdehyde levels and glutathione peroxidase activities in the tissues of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*, Esch. 1823) in culture condition. *J. Anim. Plant. Sci.* 21, 146–150.
- Kapoor, U., Srivastava, M. K., Bhardwaj, S., Srivastava, L. P., 2010. Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its No Observed Effect Level (NOEL). *J. Toxicol. Sci.* 35, 577–581.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620–650.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. *Metodika č. 135. Edice Metodik (Technologická řada). FROV JU, Vodňany* 54 s.

- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, 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.
- Kreutzweiser, D. P., Good, K. P., Chartrand, D. T., Scarr, T. A., Thompson, D. G., 2008. Are leaves that fall from imidacloprid-treated maple trees to control Asian longhorned beetles toxic to non-target decomposer organisms? *J. Environ. Qual.* 37, 639–646.
- Lamers, M., Anyusheva, M., La, N., Nguyen, V. V., Streck, T., 2011. Pesticide pollution in surface and groundwater by paddy rice cultivation: a case study from northern Vietnam. *CLEAN* 39, 356–361.
- Livingstone, D. R., 2003. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue. Méd. Vét.* 154, 427–430.
- Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgujar, P., Doltade, S., Telang, A., 2014. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochem. Int.* 78, 122–129.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138.
- Loutfy, N. M., Kamel, M. S., 2018. Effects of Two Neonicotinoids Insecticides on Some Anti-Oxidant Enzymes and Hematological Parameters in Egyptian Frog, *Bufo regularis*. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 10, 25–36.
- Lu, C., Warchol, K. M., Callahan, E. A., 2012. *In situ* replication of honey bee Colony Collapse Disorder. *Bulletin of Insectology* 65, 65–99.
- Lu, C., Lu, Z., Lin, S., Dai, W., Zhang, Q., 2020. Neonicotinoid insecticides in the drinking water system – Fate, transportation, and their contributions to the overall dietary risks. *Environ. Pollut.* 258, DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113722.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aqua. Toxicol.* 101, 13–30.
- Mahai, G.; Wan, Y.; Xia, W.; Yang, S.; He, Z.; Xu, S., 2019. Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China. *Chemosphere* 229, 452–460.

- Main, A. R., Headley, J. V., Peru, K. M., Michel, N. L., Cessna, A. J., Morrissey, C. A., 2014. Widespread Use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS One* 9, e92821.
- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., Trebše, P., 2007. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target Aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fosarum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 178–186.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorokrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94, 843–846.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid Contamination of Global Surface Waters and Associated Risk to Aquatic Invertebrates: A Review. *Environ. Int.* 74, 291–303.
- Morse, J. C., Stark, B. P., McCafferty, P. W., 1993. Southern Appalachian streams at risk: implications for mayflies, stoneflies, caddisflies, and other Aquatic biota. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst* 3, 293–303.
- Mortl, M., Vehovszky, Á., Klátyik, S., Takács, E., Györi, J., Székács, A., 2020. Neonicotinoids: Spreading, Translocation and Aquatic Toxicity *Environ. Res. Public Health* 17, 2006.
- O'Neil, M. J., Heckelman, P. E., Koch, Ch. B., Roman, K. J., Kenny, C. M., D'Arecca, M. R., 2006. Acetamiprid. In: *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, 14th edition. Whitehouse Station, N.J.: Merck&Co., Inc., pp. 10.
- Pestana, J. L. T., Alexander, A. C., Culp, J. M., Baird, D. J., Cessna, A. J., Soares, A. M. V. M., 2009. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environ. Pollut.* 157, 2328–2334.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2014. Effect of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102.

- Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U., Stähler, M., 2009. Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. In: Hazard of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP – Bee Protection Group, 118-126.
- Pitter, P., 1999. Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- PubChem (U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information), 2005. Acetamiprid: Compound Summary. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid>, (navštíveno online 29. 1. 2020).
- Pöckl, M., Holdich, D. M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D., Sibley, P. K., 2018. Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1430–1445.
- Racek, J., 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, 1. vyd. Praha: Galén, 90 s.
- Raj, S. J., Joseph, B., 2015a. Impact of Acetamiprid Toxicity on Biochemical Biomarkers (Protein Int. J. Zool. Res. *Int. J. Zool. Res.* 11, 222–227.
- Raj, S. J., Joseph, B., 2015b. Impact of Acetamiprid Toxicity on Lactate Dehydrogenase in some Tissues of the Fish *Oreochromis mossambicus*. *Int. J. Zool. Res.* 11, 112–115.
- Roessink, I., Merga, L. B., Zweers, H. J., Van den Brink, P. J., 213. The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1096–1100.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2006. Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1677–1687.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D., 2016. Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and its Implication for Ecosystems. *Front. Environ. Sci.* 4, 71.
- Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H. A., 2020. Time-Cumulative Toxicity of Neonicotinoids: Experimental Evidence and Implications for Environmental Risk assessments. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1629.

- Sarkar, M. A., Roy, S., Kole, R. K., Chowdhury, A., 2001. Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West Bengal. *Pest Manag. Sci.* 57, 598–602.
- SERA (Syracuse Environmental Research Associates), 2005. Imidacloprid: Human Health and Ecological Risk Assessment — Final Report. SERA TR 05-43-24-03a. Syracuse Environmental Research Associates, New York.
- Shao, X., Liu, Z., Sulfoxia, Xu, X., Li, Z., Qian, X., 2013. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: Production, application and innovation. *J. Pest. Sci.* 38, 1–9.
- Schmuck, R., 1999. No Causal Relationship between Gaucho® Seed Dressing in Sunflowers and the French Bee Syndrome. *Pflanzenschutz Nachrichten-Bayer (English Edition)*, 52, 257–299.
- Scholz, K., Spiteller, M., 1992. Influence of groundcover on the degradation of imidacloprid in soil. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases. Brighton, England, 883–888
- Sies, H., 2000. What is oxidative stress? In: Keaney, J.F., *Oxidative Stress and Vascular Disease*. New York: Springer US, 1–8.
- Sohn, L., Brodie, R. J., Couldwell, G., Demmons, E., Sturve, J., 2018. Exposure to a nicotinoid pesticide reduces defensive behaviors in a non-target organism, the rusty crayfish *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicology* 27, 900–907.
- Sousa, J. G. C., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Pereira, M. F. R., Silva, A. M. T., 2019. Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Sci. Total Environ.* 649, 1083–1095.
- Stara, A., Bellinvia, R., Velisek, J., Strouhova, A., Kouba, A., Faggio, C., 2019. Acute exposure of common yabby (*Cherax destructor*) to the neonicotinoid pesticide. *Sci. Total Environ.* 665, 718–723.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Vazzana, I., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., Faggio, C., 2020. Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc (*Mytilus galloprovincialis*). *Sci. Total Environ.* 700, 134914.
- Stoughton, S. J., Liber, K., Culp, J., Cessna, A., 2008. Acute and Chronic Toxicity of Imidacloprid to the Aquatic Invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under Constant- and Pulse-Exposure Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 662–673.

- Strouhová, A., 2018. Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové organismy. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický. Vedoucí práce Ing. Alžběta Stará, PhD.
- Struzyński, W., Dabrowksa-Bouta, B., Grygorowicz, T., Ziemińska, E., Struzyńska, L., 2014. Markers of Oxidative Stress in Hepatopancreas of Crayfish (*Orconectes limosus*, Raf) Experimentally Exposed to Nanosilver. *Environ. Toxicol.* 29, 1283–1291
- Sultana, T., Murray, C., Kleywegt, S., Metcalfe, C. D., 2018. Neonicotinoid Pesticides in Drinking Water in Agricultural Regions of Southern Ontario, Canada. *Chemosphere* 202, 506-513.
- Sumi Agro Czech s.r.o., 2017. Bezpečnostní list MOSPILAN® 20 SP. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/insekticidy/insekticid/mospilan-20-sp> (navštíveno online 12. 2. 2020).
- Sumi Agro Czech s.r.o., 2018. Přípravek na ochranu rostlin MOSPILAN® 20 SP. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/insekticidy/insekticid/mospilan-20-sp> (navštíveno online 12. 2. 2020).
- Suss, A., Bischoff, G., Mueller, A.C.W., Buhr, L., 2006. Chemical and biological monitoring of the load of plant protection products and of zoocenoses in ditches of the orchard region „Altes Land“. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 58, 28–42.
- Tomizawa, M., Casida, J. E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanism of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Tsaboula, A., Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2016. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: a prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. *Environ. Int.* 91, 78–93.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2005. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 64, 178–189.

- Van den Brink, P. J., Van Smeden, J. M., Bekele, R. S., Dierick, W., De Gelder, D. M., Noteboom, M., Roessink, I., 2016. Acute and chronic toxicity of neonicotinoids to nymphs of mayfly species and some notes on seasonal differences. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 128–133.
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., Van der Sluijs, J. P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One* 8, e62374.
- 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., 2018. *Vodní toxikologie pro rybáře*, 2. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological reaches: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontol.* 11, 643–669.
- Vyhláška č. 5/2011 Sb., 2011. Vyhláška o vymezení hydrogeologických rajonů a útvarů podzemních vod, způsobu hodnocení stavu podzemních vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu podzemních vod. V: *Sbírka zákonů České republiky*. 2011, část 2/2011. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2011-5>, (navštíveno online 30. 1. 2020).
- Wang, X., Anadón, A., Qinghua, W., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larranaga, M., Yuan, Z., Martínez, M., 2018a. Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 58, 471–507.
- Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., Cai, L., Shen, W., Wang, Q., 2018b. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere* 192, 14–23.
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351–352.
- WHO (World Health Organization), 2011. Acetamiprid. Dostupné z: <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=ACETAMIPRID>, (navštíveno online: 30. 1. 2020).
- Xiong, J., Wang, Z., Ma, X., Li, H., You, J., 2019. Occurrence and risk of neonicotinoid insecticides in surface water in a rapidly developing region: application of polar organic Chemical integrative samplers. *Sci. Total. Environ.* 648, 1305-1312.

- Yamamoto, I., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Walcott, E. C., Sumikawa, K., 1998. Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Insect Biochem. Physiol.* 37, 24–32.
- Yao, X., Min, H., Lv, Z., 2006. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomed. Environ. Sci.* 19, 309–314.
- Zhang, Q., Zhang, B., Wang, C., 2014. Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 12345–12353
- Zhang, C., Tian, D., Yi, X., Zhang, T., Ruan, J., Wu, R., Chen, C., Huang, M., Ying, G., 2019. Occurrence, distribution and seasonal variation of five neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Pearl Rivers, South China. *Chemosphere* 217, 437–446.
- Zhu, Y., Loso, M.R., Watson, G.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B., Huang, J.X., Gerwick, B.C., Babcock, J.M., Kelley, D., Hegde, V.B., Nugent, B. M., Renga, J.M., Denholm, I., Gorman, K., DeBoer, G.J., Hasler, J., Meade, T., Thomas, J.D., 2011. Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2950–2957.

8. SEZNAM ZKRATEK

28dLC50	letální koncentrace, která způsobí během 28 dnů úhyn 50 % testovaných organismů
48hEC50	efektivní koncentrace, která způsobí během 48 h imobilizaci 50 % testovaných organismů
48hLC50	letální koncentrace, která způsobí během 48 h úhyn 50 % testovaných organismů
96hLC50	letální koncentrace, která způsobí během 96 h úhyn 50 % testovaných organismů
ALB	albumin
ALT	alanin aminotransferáza
AST	asparát aminotransferáza
BCA	kyselina bicinchoninová
CAT	kataláza
ČHMÚ	Český hydrometeorologický úřad
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	United States Environmental Protection Agency
GLOB	globuliny
GLU	glukóza
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathion
GR	glutathionreduktáza
GSH	redukovaný glutathion
GST	glutathion S-transferáza
LACT	laktát
LC50	letální koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů)
LDH	laktát dehydrogenáza
LPO	lipidní peroxidace
MDA	malondialdehyd
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
PHOS	anorganický fosfát
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutázy
TP	celkové proteiny
WHO	World Health Organization

9. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A PŘÍLOH

Tabulka č. 1. Základní fyzikálně-chemické parametry acetamipridu.

Tabulka č. 2. Toxicita acetamipridu pro vybrané organismy.

Tabulka č. 3. Toxicita přípravku Mospilan 20 SP pro vybrané organismy.

Tabulka č. 4. Průměrné míry raků použitých v testech toxicity.

Tabulka č. 5. Koncentrace použité v chronickém testu toxicity.

Tabulka č. 6. Koncentrační řada pro kalibraci MDA.

Tabulka č. 7. Koncentrační řada pro kalibraci GSH.

Graf č. 1. Výskyt neonikotinoidů v povrchových vodách v ČR v letech 2014-2017.

Graf č. 2. Srovnání akutní toxicity acetamipridu a Mospilanu. a teoretické akutní toxicity Mosp.

Graf č. 3. Hladina GLU v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 4. Hladina TP v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 5. Hladina ALB v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 6. Hladina GLOB v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 7. Hladina NH₃ v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 8. Hladina AST v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 9. Hladina ALT v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 10. Hladina LDH v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 11. Hladina Mg²⁺ v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 12. Hladina PHOS v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 13. Hladina LACT v hemolymfě raka mramorovaného.

Graf č. 14. Hladina LPO v hepatopankreatu raka mramorovaného.

Graf č. 15. Hladina LPO v žábrech raka mramorovaného.

Graf č. 16. Aktivita CAT v hepatopankreatu raka mramorovaného.

Graf č. 17. Aktivita CAT v žábrech raka mramorovaného.

Graf č. 18. Hladina GSH v žábrech raka mramorovaného.

Graf č. 19. Aktivita GST v hepatopankreatu raka mramorovaného.

Graf č. 20. Aktivita GST v žábrech raka mramorovaného.

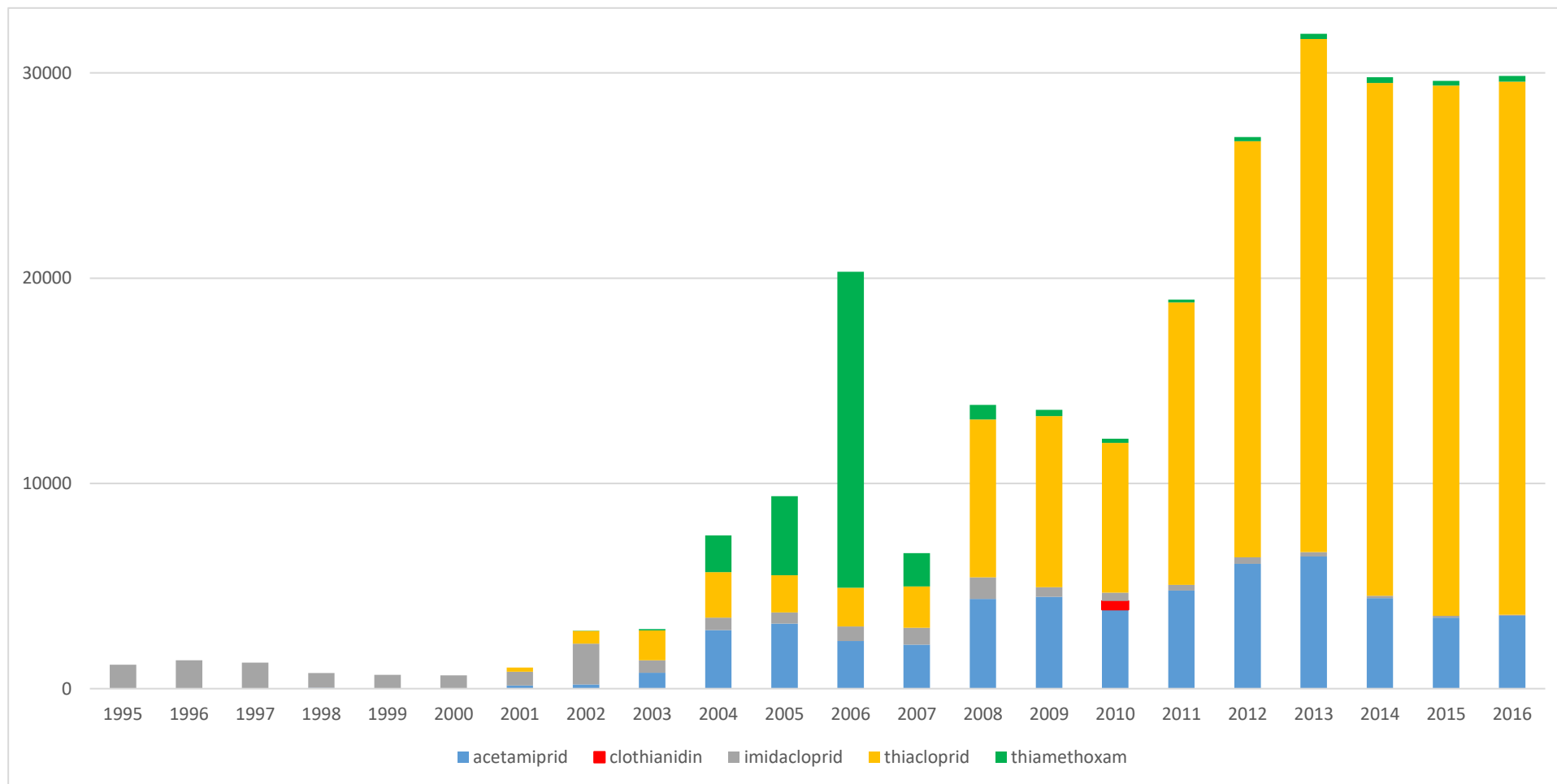
Příloha č. 1. Graf vývoje spotřeby jednotlivých druhů neonikotinoidů v České republice mezi lety 1999 a 2016 (v kg, l).

Příloha č. 2 Spotřeba acetamipridu dle jednotlivých plodin (v kg, l).

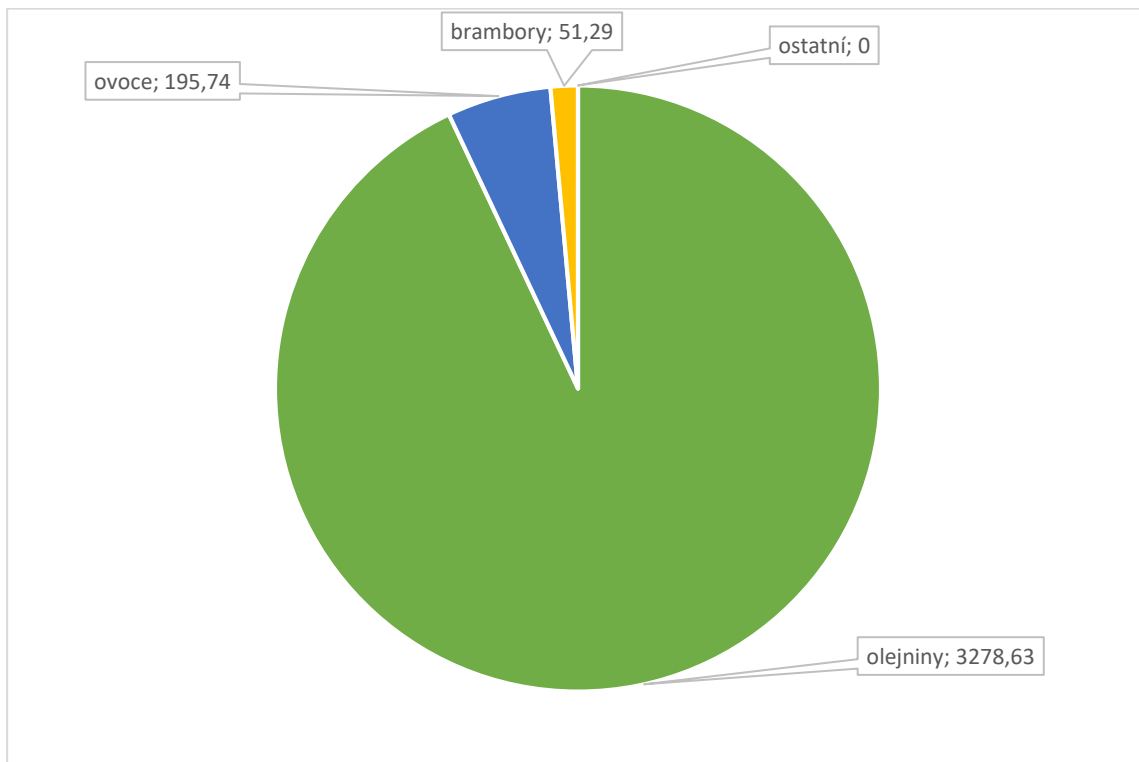
Příloha č. 3 Vývoj spotřeby acetamipridu dle jednotlivých plodin v letech 1997 – 2016.

10. PŘÍLOHY

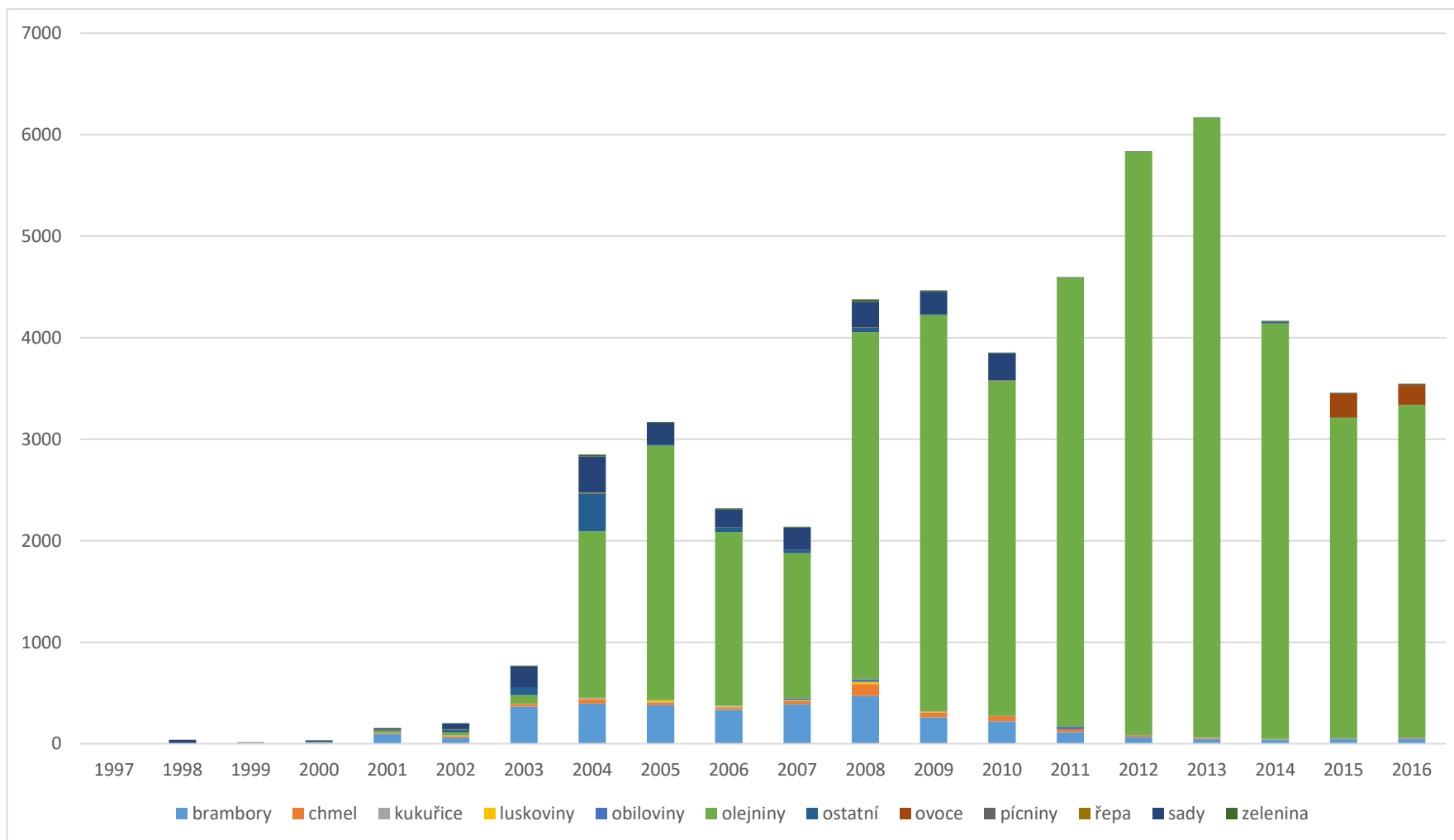
Příloha č. 1. Graf vývoje spotřeby jednotlivých druhů neonikotinoidů v České republice mezi lety 1995 a 2016 (v kg, l) (ČHMÚ, 2020).



Příloha č. 2. Spotřeba acetamipridu v České republice dle jednotlivých plodin (v kg, l)
(ČHMÚ, 2020).



Příloha č. 3. Vývoj spotřeby acetamipridu v České republice dle jednotlivých plodin v letech 1997-2016 (ČHMÚ, 2020).



11. ABSTRAKT

Akutní a chronické působení neonikotinoidových látek na vodní organismy

Jednou z nejnovějších tříd pesticidních látek jsou neonikotinoidy, syntetické látky odvozené od přírodního alkaloidu – nikotinu. Neonikotinoidy jsou selektivní vůči nikotinovým acetylcholinovým receptorům (nAChRs) bezobratlých, vzhledem k této skutečnosti jsou hojně využívány pro ošetřování zemědělských kultur po celém světě.

Cílem této studie bylo zhodnocení akutní toxicity neonikotinoidní látky acetamipridu a neonikotinoidního přípravku Mospilan 20 SP, který obsahuje 20 % acetamipridu, pro vodní organismy a dále zhodnocení chronického působení na biochemický profil hemolymfy, biomarker oxidačního stresu a antioxidační biomarkery. Jako modelový organismus byl použit rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*).

Akutní toxicita (96hLC50) čistého neonikotinoidu acetamipridu pro raka mramorovaného je 0,8 mg.l⁻¹, přípravku Mospilan pak 2,71 mg.l⁻¹. Na základě údajů o obsahu účinné látky acetamipridu v přípravku Mospilan byla vypočtena také teoretická toxicita Mospilanu (96hLC50 = 4,0 mg.l⁻¹). Na toxicitě přípravku se zřejmě podílejí více přídavné látky než samotná účinná látka.

Acetamiprid i Mospilan působí na změny hladinách biomarkerů biochemického profilu hemolymfy, biomarkeru oxidačního stresu i antioxidačních biomarkerů, již při koncentracích, které odpovídají 0,1 % a 1 % 96hLC50. Jedná se zejména o zvýšení hladiny GLU, AST, ALT a LDH, snížení hladiny TP, PHOS a GSH, snížení aktivity CAT a GST a o změny v hladině LPO.

Klíčová slova: insekticidy, acetamiprid, testy toxicity, oxidační stres, hemolymfa.

12. ABSTRACT

Acute and Chronic Effects of Neonicotinoid Substances to Aquatic Organisms

Neonicotinoids, synthetic substances derived from the natural alkaloid nicotine, are one of the newest class of pesticides. Neonicotinoids are selective for invertebrate nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and are widely used to treat crops around the world.

The aim of this study was to evaluate acute and chronic toxicity of neonicotinoid substance acetamiprid and neonicotinoid product Mospilan 20 SP, which contains 20 % of acetamiprid, to aquatic organisms. Chronic effects to the biochemical profile of haemolymph, oxidative stress biomarker and antioxidant biomarkers have been evaluated too. Marbled crayfish (*Procambarus virginalis*) was used as a model organism to provide the toxicity.

The acute toxicity (96hLC₅₀) of the pure neonicotinoid substance acetamiprid to marbled crayfish is 0.8 mg.l⁻¹, of Mospilan it is 2.71 mg.l⁻¹. The theoretical acute toxicity of Mospilan is 4.0 mg.l⁻¹. It was calculated based on the acute toxicity of pure acetamiprid as the active substance of Mospilan. Additives in the preparation probably contributes its toxicity more than the active substance itself.

Acetamiprid and Mospilan impact on changes in the levels of biomarkers of the biochemical profile of haemolymph, biomarker of oxidative stress and antioxidant biomarkers. Changes in the levels of biomarkers are already manifested at concentrations corresponding to 0,1 % and 1 % of 96hLC₅₀. These changes include increases in GLU, AST, ALT and LDH levels, decreases in CAT and GST activity and changes in LPO level.

Key words: insecticide, acetamiprid, toxicity tests, oxidative stress, haemolymph.