

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**  
**Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích**  
**Katedra rybářství**

**Obor :** rybařství



# DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Ekotoxikologické hodnocení přípravků na bázi organofosfátů  
vybraných pro potenciální využití v rybníkářské praxi**

Knihovna JU - ZF



3114703794

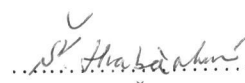
**Vedoucí diplomové práce :** Ing. Jana Máchová

**Autor diplomové práce :** Štěpánka Hrabánková

### **Prohlášení**

Prohlašuji tímto, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně na základě vlastních sledování a s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 23. dubna 2006

  
.....  
Štěpánka Hrabánková

### **Poděkování**

Dovoluji si poděkovat Ing. Janě Máchové za odborné vedení, cenné rady a nevšední ochotu při konzultacích. Děkuji též za pomoc všem pracovníkům oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech, především Ing. Jindřišce Čížkové a Ing. Anně Kocové za pomoc a čas, který mi věnovaly v průběhu této práce.

Chtěla bych také poděkovat doc. Ing. Janu Třískovi CSc. z ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR za poskytnutou literaturu týkající se toxického působení insekticidů na organismy.

Diplomová práce byla provedena v rámci řešení projektu NAZV GF3029 „Harmonizace s EU v uplatňování principů farmakovigilance v akvakulturních chovech v ČR“.

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Štěpánka Hrabánková**

Studijní program: M 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

Název tématu: **Ekotoxikologické hodnocení přípravků na bázi organofosfátů  
vybraných pro potenciální využití v rybníkářské praxi**

**Zásady pro vypracování:**  
(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Hospodaření na vysoce eutrofizovaných rybnících má své přednosti ale i rizika. V jarních měsících zde dochází obvykle k nadměrné produkci fytoplanktonu, výraznému zvýšení hodnot pH, rozkolísání kyslíkového režimu a k nadměrnému rozvoji hrubého zooplanktonu. Pokud ryba není schopna svým vyžíracím tlakem rozvoj zooplanktonu regulovat, může se stát přemnožený zooplankton příčinou vzniku kyslíkového deficitu. K regulaci rozvoje zooplanktonu se v rybníkářské praxi v minulém období využíval Soldep, jehož použití bylo zakázáno. Proto je v současné době nahrazován přípravkem Diazinon 60 EC. Vzhledem k tomu, že stávající předpisy povolující aplikaci cizorodých látek do vodního prostředí se stále zpřísnují, existuje reálný předpoklad, že i tento přípravek bude z použití do vodního prostředí vyloučen. Proto je třeba stále hledat a vytypovávat nové přípravky, které by mohly ten stávající nahradit. Cílem práce je vytypovat a z hlediska akutní toxicity pro vodní organizmy otestovat 2 přípravky. Na základě dosažených výsledků potom tyto přípravky doporučit k dalšímu testování, nebo je z potenciálního dalšího využití vyloučit.

V rámci práce budou otestovány 2 přípravky na bázi organofosfátů.

Metodicky bude postupováno podle platných standardně operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou toxikologickou laboratoří VÚRH JU Vodňany. Tyto postupy vycházejí z norem OECD a ISO pro testy akutní toxicity na zástupcích vodních organismů.

Rozsah grafických prací: 5 – 15 tabulek a grafů

Rozsah průvodní zprávy: 35 - 40 stran

Seznam odborné literatury:

- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VESELÝ, V., MODRÁ, H., SVOBODA, M., a kol., 2003. Veterinární toxikologie. Praktická cvičení, část I. (Veterinary Toxicology. Practical exercises, part I). VFU Brno, 179s.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J., 2000. Ekotoxikologie – praktická cvičení, část I. Ediční středisko VFU Brno, 2000. 70 str.
- MÁCHOVÁ, J., FAINA, R., SVOBODOVÁ, Z., RANDÁK, T., 2003. Toxikologické hodnocení přípravku Diazinon 60 EC. Sborník referátů z 11. konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH Vodňany, Aquachemie Ostrava, 149 – 158
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 201 Alga, Growth Inhibition Test. 1984, 14 pp.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992, 9 pp.
- ČSN EN ISO 28692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989). ČNI Praha, 1995, 12 s.
- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. ČNI Praha, 1997, 16 s.


Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Máchová


Konzultant: Ing. Jindřiška Čížková

Datum zadání diplomové práce: únor 2004

Termín odevzdání diplomové práce: 30. 4. 2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.  
Vedoucí katedry

  
doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.  
Děkan

V Českých Budějovicích dne 7. 3. 2004

## Souhrn

Diplomová práce byla zaměřena na hledání přípravku, který by bylo možné v rybářské praxi využívat k redukci nadměrného rozvoje hrubého dafniového zooplanktonu. K těmto účelům byl dříve využíván přípravek Soldep, jehož použití bylo zakázáno a v současné době jej nahrazuje přípravek Diazinon 60. V rámci řešené diplomové práce byly testovány z hlediska akutní toxicity pro *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna* a *Desmodesmus subspicatus* dva přípravky – Neocidol 600 EC a Nomolt 15 SC. Výsledky provedených testů prokázaly, že oba přípravky se vyznačují vysokou akutní toxicitou pro dafnie (pro Neocidol 600 EC SC byla zjištěna 48hEC<sub>50</sub> v rozmezí 0,001 – 0,002 mg.l<sup>-1</sup>, pro Nomolt 15 SC dokonce hodnota 0,0001 mg.l<sup>-1</sup>). Pro ryby a řasy vykazují oba přípravky výrazně nižší toxicitu. V případě přípravku Neocidol 600 EC jsou hodnoty 96hLC<sub>50</sub> pro *Poecilia reticulata* resp. *Oncorhynchus mykiss* 8, resp. 8,9 mg.l<sup>-1</sup>, a pro *Desmodesmus subspicatus* 7,3 mg.l<sup>-1</sup>. V případě přípravku Nomolt 15 SC se hodnoty 96hLC<sub>50</sub> pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* pohybují řádově v tisících mg.l<sup>-1</sup>. To znamená, že oba přípravky svou akutní toxicitou vůči vodním organismům odpovídají základním požadavkům pro jejich potenciální využití k tlumení nadměrného rozvoje dafniového zooplanktonu. Samozřejmě, praktickému využití musí ještě předcházet ověření jejich účinnosti v reálných přirozených podmínkách (poloprovozní pokus), při kterém by se také zjistila doba přetrvávání ve vodě, rybách a sedimentech.

Keywords: vodní organismus, testování, organofosfát, eutrofní vod, toxicita

## Summary

This thesis has been sight on search preparations, which will make use of reducing oversize expansion rough of *Daphnia* zooplankton. Earlier was using for this object preparative Soldep, whose using has been off limits and now is using for this object preparative Diazinon 60. During work of my thesis I tested two preparations Neocidol 600 EC and Nomolt 15 SC for acute toxic test. This preparations was tested of these test animals: *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus*. Result of both preparative evidence high level of acute toxic for *Daphnia magna* ( for Neocidol 600 EC was inquest 48hEC50 interval 0,001 - 0,002 mg·l<sup>-1</sup>, for Nomolt 15 SC value 0,0001 mg·l<sup>-1</sup>). This preparation have less toxic for fish and seaweed than for zooplankton. For preparative Neocidol 600 EC are value for *Poecilia reticulata* resp. *Oncorhynchus mykiss* 8, resp. 8,9 mg·l<sup>-1</sup> and for *Desmodesmus subspicatus* 7,3 mg·l<sup>-1</sup>. For preparative Nomolt 15 SC are value 96hLC50 for *Poecilia reticulata* and *Oncorhynchus mykiss* espressivo less. It does mean that effect of both preparations of zooplankton is espressivo higher than effect of fish, consequently is possibly using this preparations for suppression expansion of zooplankton. Before praktical using we must try their effect in real natural condition ( pilot plant attempt ), where we must discover how long are this preparations of the water enviroment, fish and sediments.

Keywords: water organism, testing, organophosphate, eutrophic wather, toxicity

# Obsah

1. Úvod	9
2. Literární přehled	11
<b>2.1. Eutrofizace</b>	<b>11</b>
2.1.1. Eutrofizace povrchových vod a její následné negativní vlivy	12
<b>2.2. Pesticidy</b>	<b>14</b>
2.2.1. Pesticidy na bázi organických sloučenin fosforu	15
2.2.2. Insekticidy na bázi benzoyl močoviny	16
<b>2.3. Stanovení toxicity látek pro vodní organismy</b>	<b>17</b>
2.3.1. Faktory ovlivňující toxicitu látek, přípravků a odpadních vod pro ryby a vodní bezobratlé	19
2.3.2. Zásady procesu testování léčivých přípravků určených pro ryby	20
<b>2.4. Předklinické zkoušení prováděné u ryb</b>	<b>21</b>
2.4.1. Zkoušení snášenlivosti	21
2.4.2. Hodnocení farmakologického účinku	24
2.4.3. Mikrobiologie a parazitologie	25
<b>2.5. Zkoušení reziduí</b>	<b>25</b>
<b>2.6. Klinické testování</b>	<b>26</b>
3. Materiál a metodika	29
<b>3.1. Charakteristika testovaných přípravků</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Neocidol 600 EC</b>	<b>29</b>
3.2.1. Charakteristika nebezpečnosti	30
3.2.2. Toxicita pro ryby	31
<b>3.3. Nomot 15 SC</b>	<b>32</b>
3.3.1. Charakteristika nebezpečnosti	32
3.3.2. Přehled toxicity	33
4. Experimentální část	34
<b>4.1. Testy akutní toxicity</b>	<b>34</b>
Test akutní toxicity na rybách	34
<b>4.2. Testovací organismy</b>	<b>34</b>
4.2.1. Živorodka duhová	34
4.2.2. Pstruh duhový	35
4.2.3. Testy akutní toxicity na <i>Daphnia magna</i>	35
4.2.4. Test akutní toxicity na řasách <i>Desmodesmus subspicatus</i>	36
<b>4.3. Podmínky testu</b>	<b>37</b>
4.3.1. <i>Poecilia reticulata</i>	37
4.3.1.1. Provedení testu - stanovení hodnoty LC <sub>50</sub> pro ryby	37
4.3.2. <i>Oncorhynchus mykiss</i>	38
4.3.3. Platnost testu (validace)	39
4.3.4. Akutní imobilizační test na perloočkách	39
4.3.4.1. Provedení testu- stanovení hodnoty LC <sub>50</sub> pro <i>Daphnia magna</i>	40
4.3.4.2. Platnost testu (validace)	40
4.3.5. Test inhibice růstu sladkovodních řas <i>Desmodesmus subspicatus</i>	41
4.3.5.1. Provedení testu- stanovení hodnoty 72hIC <sub>50</sub> pro <i>Desmodesmus subspicatus</i>	41
4.3.5.2. Platnost testu (validace)	43
<b>4.4. Hodnocení testu toxicity</b>	<b>43</b>
5. Výsledky	44



<b>Validace výsledků</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Testy na <i>Desmodesmus subspicatus</i></b>	<b>44</b>
<b>5.2. Testy na <i>Daphnia magna</i></b>	<b>44</b>
<b>5.3. Testy na rybách</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Výsledky testů přípravku NOMOLT 15 SC</b>	<b>45</b>
5.4.1. Vyhodnocení testů inhibice růstu sladkovodních řas <i>Desmodesmus subspicatus</i>	45
5.4.2. Vyhodnocení akutního imobilizačního testu na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	48
5.4.3. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách <i>Oncorhynchus mykiss</i>	50
5.4.4. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i>	52
<b>5.5. Výsledky testů přípravku NEOCIDOL 600 EC</b>	<b>53</b>
5.5.1. Vyhodnocení testů inhibice růstu sladkovodních řas <i>Desmodesmus subspicatus</i>	53
5.5.2. Vyhodnocení akutního imobilizačního testu na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	56
5.5.3. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách <i>Oncorhynchus mykiss</i>	57
5.5.4. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i>	59
<b>5.6. Souhrnné výsledky</b>	<b>61</b>
6. Diskuze	62
7. Závěr	64
8. Literatura:	65
9. Použité definice a zkratky	69
10. Přílohy	72

# 1. Úvod

Česká republika zaujímá v Evropě jedno z předních míst v produkci kapra. Tato vysoká produkce je umožněna využitím rybníční soustavy, která představuje světový unikát a je součástí národních kulturních a přírodních hodnot.

České rybníkářství má svá specifika. Jeho intenzifikace byla založena ani ne tak na vysokých materiálových základech, jako na využití přírodního rybníčního potenciálu (maximální využití přirozené potravní základny). Ryby jsou chovány i na vysoce úživných rybnících, které, kromě produkce ryb, zajišťují i dočišťování vod po jejich biologickém čištění. Navíc ještě stále existuje řada rybníků, kam jsou svedeny komunální odpadní vody a tyto rybníky plní do jisté míry funkci čistírny odpadních vod.

Zhruba 80 % plochy našich provozních rybníků se nachází v silně eutrofní až hypertrofní úrovni. Hospodaření na takových vysoce eutrofizovaných rybnících má svůj nesporný význam z hlediska ekologického (živiny, které by bez užitku, nebo lépe řečeno jako nežádoucí, byly odvedeny do vodních recipientů, jsou zde cíleně využívány). Na druhé straně však chov ryb na vysoce eutrofizovaných rybnících není bez rizika. V jarních měsících zde dochází obvykle k nadměrné produkci fytoplanktonu, výraznému zvýšení hodnot pH, rozkolísání kyslíkového režimu a k nadměrnému rozvoji hrubého zooplanktonu. Ryba může být v tuto dobu poškozena vnějším prostředím a není schopna svým vyžíráním tlakem rozvoj zooplanktonu regulovat. Přemnožený zooplankton potom prohlubuje kyslíkový deficit a často dochází k havarijním úhynům ryb.

Existují technologické postupy, které minimalizují uvedená rizika, avšak vznik těchto krizových situací nelze odvrátit se stoprocentní jistotou. Pro tento případ měli donedávna rybáři k dispozici přípravek Soldep (účinná látka trichlorfon), který ve velmi nízkých koncentracích selektivně odstranil dafniový zooplankton, ryby nepoškodil a poté se ve vodním prostředí rozložil.

Metodika selektivního použití nízkých dávek Soldepu na dafniový zooplankton ( $50 \text{ ml} \cdot \text{ha}^{-1}$  při průměrné hloubce 1 m a zamezené průtočnosti nádrže) byla vypracována ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech (Svobodová a Faina, 1984).

Soldep byl vyráběn a dodáván na trh podnikem Spolana Neratovice, a.s. Státní rostlinolékařská správa (Brno) podmínila na jaře 1998 registraci přípravku Soldep doplněním podkladů pro registraci podle znění nové vyhlášky (č. 84/1997 Sb.). V následujícím období však byla účinná látka Soldepu – trichlorfon uvedena v seznamu zakázaných látek a používání Soldepu bylo zakázáno

Absence takového přípravku vystavila rybáře nebezpečí velkých ztrát v chovech ryb na vysoce úživných rybnících. Toto riziko by mohlo vést k výraznému omezení racionálního využití vodních ploch, kde mnohdy dochází k terciálnímu čištění vyčištěných odpadních vod. Pokud se na takových vodách přestane hospodařit, ztratí tyto rybníky brzy svou původní funkčnost. Důsledky se projeví zejména v podobě zbytečného zatěžování vodních recipientů živinami (nadměrná eutrofizace) se všemi negativními dopady.

Z těchto důvodů bylo nutno hledat mezi povolenými přípravky preparát s vlastnostmi podobnými Soldepu, který by jej mohl Soldep v rybářství nahradit. Tento problém byl řešen za finanční podpory Rybářského sdružení České republiky na pracovišti Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. V průběhu řešení této problematiky bylo z hlediska akutní toxicity pro ryby a perloočky *Daphnia magna* otestováno 12 přípravků a po dvou letech hledání byl jako nejvhodnější vybrán přípravek Diazinon 60 EC. S tímto přípravkem byl kromě laboratorních testů akutní toxicity na vodních organizmech proveden také pokus v poloprovozních podmínkách.

Cílem této diplomové práce bylo vyhledat přípravek, jehož účinky by byly obdobné jako u Soldepu a Diazinonu 60 EC, a který by byl co možná nejšetrnější vůči vodnímu prostředí a současně vyhovoval požadavkům EU.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Eutrofizace

Pod pojmem eutrofizace se rozumí růst obsahu minerálních živin (nutrietů), především sloučenin fosforu a dusíku, ve vodách. Eutrofizace je doprovázena rozvojem fotosyntetizujících organismů. Projevuje se především ve stojatých vodách. Ukazatelem obsahu biologicky využitelných živin ve vodě je trofický potenciál. Eutrofní voda je bohatá na živiny, s velkou primární i sekundární produkcí a produkcí ryb.

Rozlišuje se *přírozená eutrofizace*, kterou nelze ovlivnit a která je způsobena přítomností sloučenin fosforu a dusíku pocházejících z půdy a dnových sedimentů a z rozkladu odumřelých vodních organismů, a *antropogenní (indukovaná) eutrofizace*, která je výsledkem civilizačního procesu. Je způsobena splachem hnojiv ze zemědělsky obdělávané půdy, používáním polyfosforečnanů v pracích a čistících prostředcích a zvětšujícím se množstvím splaškových vod. Dalším zdrojem jsou atmosférické depozice s rostoucím antropogenním podílem dusíku a fosforu.

Přísun anorganických živin, zejména sloučenin fosforu a dusíku, porušuje biologickou rovnováhu ve vodě, vede k intenzivnější primární produkci a za určitých podmínek dochází k přemnožení fytoplanktonu. Typickým příznakem eutrofizace je změna kvantitativního složení fytoplanktonu, zejména řas a sinic. (Pitter, 1999)

Důsledky nadměrné eutrofizace se projevují v nádržích obvykle nepřímě, a to následkem přemnožení planktonních sinic, řas a vodních makrofyt, zhoršováním hydrochemického režimu, rozkolísáním kyslíkového režimu, vznikem a hromaděním jedovatých plynů a konečně i zmenšováním produkční plochy nádrží zarůstáním a nepříznivými kyslíkovými poměry u dna nádrží. Na některých nádržích pravidelně dochází k nadprodukcí vodního květu sinic. Vodní květ má velice nepříznivé účinky, např. v podobě různých alergií u lidí. Při náhlém rozkladu značné biomasy vodního květu dochází k hromadným úhynům rybích obsádek, především v důsledku vzniku kyslíkového deficitu při rozkladných procesech, případně toxinů a metabolitů, které se uvolňují. Vznik vodního květu se dá do značné míry regulovat správnou skladbou rybičských obsádek. (Svobodová et al., 1992)

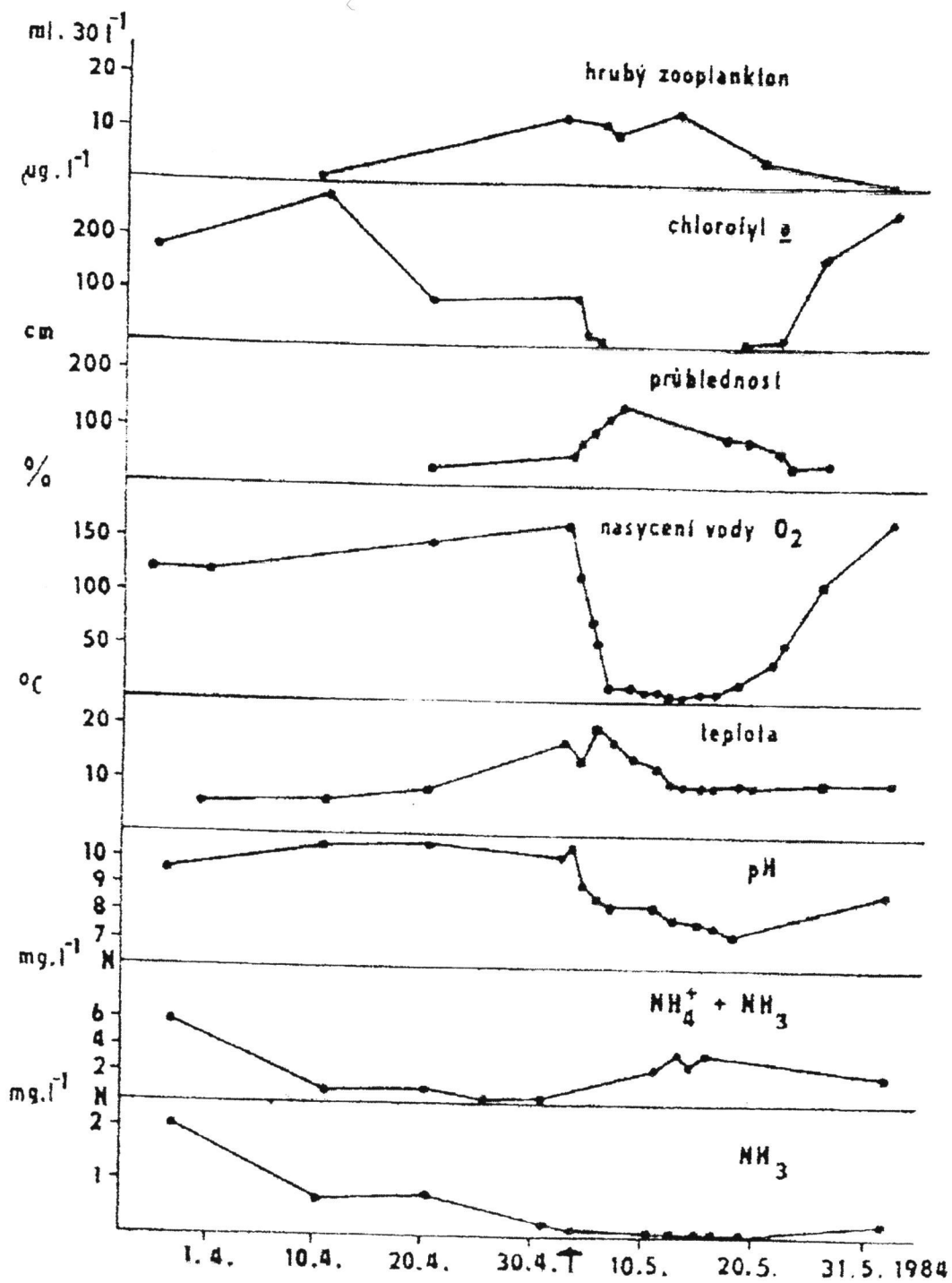
### 2.1.1. Eutrofizace povrchových vod a její následné negativní vlivy

Znakem, začínající nebo probíhající eutrofizace povrchových vod je nadměrný rozvoj fytoplanktonu a makrovegetace, druhově chudé společenstvo fytoplanktonu, výskyt typických organismů v planktonu, břehové nebo říční vegetaci, snížení průhlednosti a změny barvy vody, výskyt kyslíkového maxima a minima ve skočné vrstvě, v létě snížení nasycení vrstev u dna kyslíkem, kvalitativní a kvantitativní změny fauny dna a příbřežní oblasti, změny v druhovém složení rybích obsádek a konečně také chemicky jednoznačně stanovitelné zvýšení průměrné hladiny živin (Štěpánek a Červinka 1974).

Výrazně negativní účinek eutrofizace spojený s úhynem ryb se projevuje na některých silně úživných rybnících. Jde o rybníky s bodovými zdroji znečištění (vyústění odpadních vod komunálních, odpadních vod z potravinářského průmyslu, zemědělských odpadních vod) a s plošnými zdroji znečištění (splachy živin, zejména dusičnanů a fosforečnanů z okolních pozemků). Na těchto rybnících se v jarním období silně rozvíjí fytoplankton. Vlivem intenzivní fotosyntetické asimilace se odčerpává oxid uhličitý z uhličitanového komplexu, a tím se snižuje neutralizační kapacita vody. Následkem tohoto se hodnota pH zvyšuje až nad 10. Koncentrace veškerého amoniaku ( $\text{NH}_4 + \text{NH}_3$ ) v rybniční vodě bývá rovněž vysoká a v důsledku vysokých hodnot pH je vysoký i podíl nedisociovaného, pro ryby toxického amoniaku ( $\text{NH}_3$ ).

V období zvyšující se teploty vody se v těchto rybnících prudce rozvíjí hrubý zooplankton. Vedle vlastní vysoké spotřeby kyslíku zooplankton vyžírácím tlakem silně redukuje producenty kyslíku (fytoplankton), klesá koncentrace chlorofylu a zvyšuje se průhlednost vody. Následkem toho prudce klesá koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě během 1–2 dnů z přesycení na 40–80 % nasycení i nižší. To je kritický okamžik pro projevení se toxické nekrózy žaber.

Průběh popsaných změn v rybniční vodě před vypuknutím toxické nekrózy žaber a v jejím průběhu je znázorněn na obrázku č. 1 (hydrobiologické a hydrochemické vlastnosti vody v období výskytu toxické nekrózy žaber). Tyto hodnoty byly získány při šetření na rybníce Dřemliny (typ asimilačního rybníka) v roce 1984. Toxická nekróza žaber byla na tomto rybníce diagnostikována 2. 5. 1984. Uhynulo zhruba 50 % obsádky kapra  $K_{2-3}$ . V souvislosti s opakujícími se problémy na tomto rybníce byla vypracována metodika „Použití Soldepu v rybářství „ (Svobodová a Faina, 1984).



Obrázek 1. Hydrobiologické a hydrochemické vlastnosti vody v období výskytu toxické nekrózy žaber na rybníce Dřemliny (typ asimilačního rybníka) v roce 1984.

Včasné zabránění kyslíkového deficitu, např. použitím Soldepu k likvidaci hrubého zooplanktonu, má rozhodující význam pro přežití obsádky. (Svobodová et al., 1992).

Z klinických příznaků toxické nekrózy žaber kapra vystupuje do popředí shlukování ryb v hlubších a stinných částech rybníka, v pokročilém stadiu onemocnění ztmavnutí povrchu těla, ztráta nebo snížení únikové reakce a nouzové dýchání. Ryby nepřijímají krmivo.

Pro patologickoanatomický obraz je typické silné překrvení, edematozní zduření a zvýšené zahlenění žaber, následuje nekróza žaber a odlupování epitelu z žaberních lístků. Dochází k úplnému obnažení pilířů žaberních lístků, buď lokálně, nebo na celých žábřácích. V dalším průběhu onemocnění nekrotické žaberní lístky odpadávají a okraje žaber jsou nerovné. Histologicko-patologickým vyšetřením žaber je zjišťována venostáze (zamezení odtoku žilní krve), zduření, vakuolizace (buněčný edém) a uvolňování buněk respiračního epitelu od bazální membrány. Současně lze pozorovat zvýšenou aktivaci chloridových buněk, které se výrazně zmnožují zejména v epitelu lístečků. Dystroficky a nekrobioticky změněné buňky respiračního epitelu a chloridové buňky vytvářejí kompaktní masu v mezilamelárních prostorách žaber. Těžké změny jsou charakterizovány totální celulólyzou a nekrobiotickými změnami buněčných jader. (Svobodová et al., 1987)

## 2.2. Pesticidy

Pesticidy jsou látky používané v zemědělství na ochranu rostlin. Do vody se dostávají nesprávnou aplikací, při likvidaci nepoužitých zbytků a nebo přímo splachy pesticidů z okolních ošetřených kultur. Jejich účinky jsou jak akutní tak i chronické. Kromě toho působí pesticidy i nepřímě. Následkem jejich aplikace dochází k odumírání vodních organismů a řas, při jejich rozkladu se spotřebovává kyslík, ve vodě vzniká kyslíkový deficit a nastává úhyn ryb dušením (Svobodová et al., 1987). Pesticidy jsou často mnohem toxičtější pro vodní rostliny nebo vodní bezobratlé než pro ryby. Likvidují přirozenou potravní základnu a poškozují tak celou biocenózu. Některé pesticidy či jejich rezidua se kumulují v mase, a tím je znehodnocují (Hartman, et al., 1988).

S pesticidy se do recipientů dostává vedle účinné látky řada vedlejších komponentů, které bývají často pro ryby toxičtější než vlastní účinná látka. Při

vniknutí pesticidu do vodního prostředí podléhá účinná látka chemickému a biologickému rozkladu. V některých případech mohou být rozkladné produkty pro ryby ještě toxičtější než samotná látka (Svobodová et al., 1992).

### 2.2.1. Pesticidy na bázi organických sloučenin fosforu

Jsou to složité organické sloučeniny fosforu, přesněji estery substituovaných kyslíkatých kyselin fosforu s některými alkoholy (Piskač et al., 1985). Většinou jsou to látky toxické látky nejen pro hmyz, ale i pro zvířata a člověka.

Významnou předností organofosforových insekticidů je, že se po aplikaci poměrně rychle odbourávají na netoxické látky, takže se nehromadí v prostředí ani v některých člancích potravinového řetězce (Cremlýn, 1985).

Toxicita organofosforových insekticidů závisí na řadě faktorů, mezi něž patří zejména typ sloučeniny, dávka, druh, pohlaví a věk zvířete, solubilizační vehikulum a brána vstupu do organismu (Piskač et al., 1985).

Insekticidní organofosforové sloučeniny inhibují činnost některých enzymů, avšak hlavním účinkem *in vivo* je inhibice enzymu acetylcholinesterázy (Eto, 1974; Corbett, 1974). Mechanismus účinku pesticidů s obsahem organických sloučenin fosforu je shodný jak u poikilotermních (ryb) organismů tak i u homoiotermních (savců). Jde o inhibici některých hydrolytických enzymů, zejména hydrolázy acetylcholinu. Dochází k rozkladu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Tento enzym řídí hydrolýzu acetylcholinu, který se tvoří na nervovém spoji, na cholin. Za nepřítomnosti aktivní acetylcholinesterázy se uvolněný acetylcholin hromadí a brání hladkému přenosu nervových impulsů přes synaptickou mezeru na nervovém spoji. Důsledkem je ztráta svalové koordinace, křeče a nakonec smrt. Acetylcholinesterasa je podstatnou složkou nervového systému hmyzu i savců, takže základní mechanismus toxického působení organofosforových sloučenin se považuje v podstatě za stejný u hmyzu i savců. Aktivní centrum enzymu acetylcholinesterasy se skládá ze dvou hlavních reaktivních míst: aniontového místa, které nese záporný náboj a váže se na kationtovou část substrátu a esterového místa, tvořeného aminokyselinou serinem. (Cremlýn, 1985)

Stupeň mozkové inhibice acetylcholinu u ryb, vyvolaný různými organofosforečnými látkami, je rozdílný. Pesticidy na bázi dichlorvosu a imidanu způsobují snížení aktivity enzymu až na 60 % (Svobodová et al., 1987). Velmi citlivé



na organofosfáty jsou ryby lososovité, ryby kaprovité jsou odolnější (Čítek a Svobodová, 1992).

Bezobratlí jsou více citliví na organofosfáty než obratlovci. Je to dáno tím, že nervová soustava bezobratlých je více přístupná. Dále je to rozdílným metabolismem bezobratlých a ryb, který podporuje aktivaci organofosfátů v tělech bezobratlých a inaktivaci v rybách (Loomis, 1974). Z bezobratlých nejcitlivěji reagují na organofosforečné pesticidy perloočky *Daphnia magna*, a proto jsou pokládány za nejlepší indikátory znečištění vodního prostředí organofosforečnými pesticidy (Svobodová et al., 1992).

Pro klinický obraz intoxikace ryb pesticidy na bázi organického fosforu je typické ztmavnutí povrchu těla v období počínající nekoordinovanosti pohybu. Patologickoanatomický obraz je charakterizován zvýšeným zahleněním žaber a povrchu těla, žábry jsou silně překrvené, ve vysokých koncentracích pesticidu s drobnými tečkovitými krváčeninami. Histologicko-patologickým vyšetřením ryb intoxikovaných organofosforečnými pesticidy se zjišťuje velmi silné poškození žaber a parenchymatózních orgánů. Histologicko-patologické změny se zjišťují i v nervové soustavě (Svobodová et al., 1987).

### 2.2.2. Insekticidy na bázi benzoyl močoviny

#### **Deriváty benzoyl močoviny**

Tyto přípravky nejsou systémové, nefumigují, na povrchu rostlin setrvávají i několik týdnů. Působí především na larvy brouků *Coleoptera*, motýlů *Lepidoptera* a dvoukřídlých *Diptera* především požerově, v menší míře dotykově. Narušují tvorbu a ukládání chitinu v endokutikule larev. Současně zvyšují obsah enzymů chitinázy a fenoloxydázy. Nová nedokonale vyvinutá kutikula praská. Dochází k infekci, dehydrataci a smrti larev, obvykle při nejbližším svlékání.

#### **Acylmočovina (ACU)**

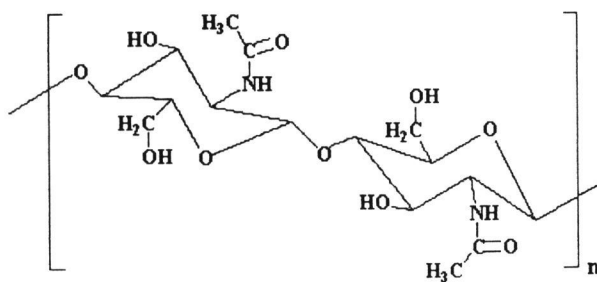
ACU účinkují na vajíčka některých druhů dotykově, na samičky chemosterilačně. Samičky, které přišly do styku s ACU, kladou vajíčka v nezmenšeném počtu, ale neschopné vývoje. Termíny aplikace ACU jsou k dosažení dobrého účinku vyhraněnější a kratší než termíny aplikace nervových jedů (organofosfátů, karbamátů, pyrethroidů). Obecně ACU vyžadují dřívější aplikace a to těsně před nebo na počátku

kladení vajíček, nejpozději na začátku líhnutí larev. Hubí rovněž některé vlnovníky. Účinkuje po dobu 3 – 4 týdnů. Včely, pestřenky, parazitoidy z čeledi blanokřídlých a dravé roztoče neohrožuje. Pro slunéčka je středně toxický, pro zlatoočka jedovatý. Hubí larvy motýlů *Lepidoptera*, brouků *Coleoptera*, dvoukřídlých *Diptera*, larvy mery hrušňové i molic jako požerový jed. Teflubenzuron šetří dravé plošnice (*Geocoris ssp.*, *Nabis ssp.*, *Orius ssp.*), dravé roztoče (*Typhlodromus pyri*). Je středně toxický pro larvy i dospělce slunéček, toxický pro zlatoočko *Chrysoperla carnea*. Včelám neškodí. Pro ryby slabě jedovatý.

Pro absenci systémového a fumigačního účinku (neproniká do rostliny) je potřebí rostliny dokonale ošetřit. Akutní toxicita ACU pro člověka a teplokrevné živočichy je většinou nízká. Některé druhy přirozených nepřátel škodlivého hmyzu a roztočů nejsou po použití ACU ohroženy.

Vzhledem ke značné perzistenci ACU a z toho plynoucího zvýšeného nebezpečí vývoje rezistence škůdců se nedoporučuje ošetřovat trvalé kultury deriváty acylmočoviny během vegetace vícekrát než jedenkrát.

Chitin se skládá z velkého počtu zbytků acetylglukosaminu. Štěpí se nejprve na disacharid chitobiózu. Je to strukturální polysacharid. Vyskytuje se hojně v kutikule členovců. Slouží jako potrava živočišného původu některým druhům hmyzu, měkkýšům a bakteriím.



Obrázek 2. Prostorový vzorec chitinu

### 2.3. Stanovení toxicity látek pro vodní organismy

Toxicita látek a přípravků se stanoví pomocí toxikologických testů. Toxikologické testy na vodních organismech se mohou provádět v podstatě na třech úrovních (Besch, 1977).

- 1) Na úrovních buněk, tkání
- 2) Na úrovni organismů (jedinců)
- 3) Na úrovni společenstev (biocenóz)

Testy na úrovni buněk a tkání se často používají pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na úrovni organismů. Jejich výhodou je dobrá reprodukovatelnost, nevýhodou je, že se výsledky získané *in vitro* často značně liší od faktorů získaných *in vivo*.

Výhodou testů na úrovni biocenóz je, že se toxický účinek sleduje v přírodě samotné a nebo na modelu, který je jí blízký. Nevýhodou je, že změny ve složení biocenóz nemusí být vždy vyvolány přímým toxickým účinkem na určitý druh, ale mohou být výsledkem narušení potravního řetězce. Reprodukovatelnost výsledků těchto testů je značně omezená, neboť nelze znovu vytvořit podmínky identické těm, které působily v předcházejícím testu. Většina testů, zejména testů akutní toxicity, se provádí na úrovni organismů. I přes potíže s jejich reprodukovatelností a s rizikem při interpretaci takto získaných výsledků na přírodní podmínky představují tyto testy jakýsi kompromis, který je přijatelný i z hlediska technického a ekonomického (Svobodová et al., 1987).

Z hlediska doby expozice organismu testované látce se rozlišuje a stanovujeme akutní a chronickou toxicitu látek, přípravků, popřípadě odpadních vod.

Základní hodnotou, stanovenou v testu akutní toxicity s vodními živočichy je  $LC_{50}$ . Je to nejpřesněji zjistitelný údaj a používá se ke kvalifikaci toxicity látek a přípravků (Svobodová et al., 1987, ON 46 6807). Podle uvedené normy byly testované látky (přípravky) zařazovány do níže uvedených tříd toxicity (tabulka č.1). Délka expozice testovacích organismů v testované látce byla 48 hodin.

Tabulka 1 Třídy toxicity

Třída toxicity	Hodnocení	Zjištěná hodnota LC <sub>50</sub> za 48 hodin působení
0.	Látky téměř nejedovaté	Vyšší než 10 000mg·l <sup>-1</sup> nebo 10ml·l <sup>-1</sup>
1.	Látky velmi slabě jedovaté	1 000 – 10 000mg·l <sup>-1</sup> nebo 1 – 10ml·l <sup>-1</sup>
2.	Látky slabě jedovaté	100 – 1 000mg·l <sup>-1</sup> nebo 0,1 – 1ml·l <sup>-1</sup>
3.	Látky středně jedovaté	10 – 100mg·l <sup>-1</sup> nebo 0,01 – 0,1ml·l <sup>-1</sup>
4.	Látky silně jedovaté	1 – 10mg·l <sup>-1</sup> nebo 0,001 – 0,01ml·l <sup>-1</sup>
5.	Látky velmi silně jedovaté	0,1 – 1mg·l <sup>-1</sup> nebo 0,0001 – 0,001ml·l <sup>-1</sup>
6.	Látky mimořádně jedovaté	Menší než 0,1mg·l <sup>-1</sup> nebo 0,0001ml·l <sup>-1</sup>

V současné době se provádí hodnocení chemických látek a přípravků včetně pesticidů podle Nařízení vlády č.25/1998 Sb. příloha č. 2 a podle Vyhlášky MZe ČR č.84 dubna 1997. Testované látky a přípravky se označují z hlediska speciálních rizik R větami:

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

R 51: toxické pro vodní organismy:  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} < LC (EC,IC)_{50} \leq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

R 52: škodlivé pro vodní organismy:  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} < LC (EC,IC)_{50} \leq 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Doba působení látky je v testech na rybách 96 hodin (96hLC<sub>50</sub>),

na *Daphnia magna* 48 hodin (48hLC<sub>50</sub>),

a na řasách 72 hodin (72hLC<sub>50</sub>).

### 2.3.1 Faktory ovlivňující toxicitu látek, přípravků a odpadních vod pro ryby a vodní bezobratlé

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

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

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

Všeobecným faktorem ovlivňující toxicitu látek a přípravků pro ryby je koncentrace kyslíku ve vodě. Při deficitním kyslíkovém stavu se toxicita všech látek a přípravků zvyšuje. (Svobodová et al., 1987)

### 2.3.2. Zásady procesu testování léčivých přípravků určených pro ryby

Tyto zásady jsou zde uváděny, proto, že cílem této práce bylo vytipovat přípravek, který by měl být cíleně aplikován do vodního prostředí. Vzhledem k tomu, že takový přípravek přijde do přímého styku s rybou, mají zásady testování léčivých přípravků určených pro ryby a přípravků pro zlepšení životního prostředí hodně společného.

Zkušenosti s rybou jako testovacím organismem jsou rozsáhlé. Ryba se již dlouho uplatňuje v rámci monitoringu životního prostředí jako indikátorový druh a jako testovací organismus při toxikologických testech pro látky a odpady. Podrobně jsou vypracovány přesné metodické postupy pro akutní i chronické testy toxicity podle norem OECD.

Obecně je nutné si uvědomit některé zvláštnosti ryby jako testovacího organismu. Velmi významným faktorem pro provádění zkoušek léčivých přípravků u ryb je kvalita životního prostředí těchto organismů, tzn. kvalita vody, která zásadně může ovlivnit výsledky zkoušky. Rybu jako testovací organismus je nutné chápat jako

hejnový typ. Vyšetření několika jedinců je reprezentativní pro celé hejno ryb za předpokladu, že jsou všechny ryby chovány za stejných podmínek. To v praxi ale také znamená, že není vhodné, a ve většině případů i nemožné, provádět opakované odběry a časté manipulace, neboť to může zcela zásadně negativně ovlivnit stav organismu ryby a potažmo výsledky prováděného testu. Proto je nutné např. pro stanovení farmakokinetických parametrů provádět v daných časových odstupech odběr u různých jedinců stejné skupiny (hejna). Při opakované injekční aplikaci nebo perorální aplikaci sondou je nutné stejný úkon provést u kontrolní skupiny ryb se stejným přípravkem o stejném objemu bez obsahu účinné látky. Při celkovém hodnocení zkoušky testovaného léčebného přípravku je nutno individuálně přihlížet k počtu a rozsahu manipulací vzhledem k negativním účinkům na cílový organismus a vedoucí pokusu musí tyto okolnosti správně interpretovat.

Veterinární léčivé přípravky určené pro ryby (včetně jejich vývojových a reprodukčních stadií a s určitými výjimkami okrasných ryb) musí vyhovovat všem registračním požadavkům, tzn., musí být bezpečné pro konzumenta, uživatele a prostředí a dále účinné, s potvrzením dobré snášenlivosti (bezpečnost pro cílový organismus – rybu) a mít či udržet si v průběhu používání odpovídající kvalitu.

Navrhovaný postup zkoušení léčebných přípravků by měl být zvážen s ohledem na jednotlivé případy. Protože je ryba velmi specifickým případem cílového druhu zvířat, prolínají se při testování vzájemně předklinické a klinické zkoušky, např. zkoušení toxicity se s ohledem na použité druhy stává zároveň stanovením snášenlivosti. Pokud jsou některé aspekty zkoušení změněny nebo vynechány, je nutné tuto skutečnost odůvodnit.

## **2.4. Předklinické zkoušení prováděné u ryb**

### **2.4.1. Zkoušení snášenlivosti**

Zkoušení snášenlivosti (bezpečnosti pro cílový organismus): musí být provedeno na hlavních cílových druzích. Studie provedené s jedním druhem ryb jsou považovány za odpovídající pro posouzení snášenlivosti na jiných druzích ryb stejné zoologické čeledi (ev. rodu). Pro účinné látky s novou chemickou strukturou nebo látky, které nebyly dříve určeny pro ryby nebo jejich reprodukční vývojová a klidová stadia, je nutné rozsáhlejší zkoušení snášenlivosti. Naopak zkrácené zkoušení snášenlivosti je možné u látek, jejichž toxikologický profil je dobře znám na odpovídajících druzích.

Pro zkoušení se používají zdravé testovací organismy. Vždy je nutná kontrolní skupina ryb, se kterou jsou prováděny stejné manipulace jako se skupinou ryb pokusných, kromě vystavení účinku zkoušeného léčivého přípravku. U ryb je možné v odůvodněných případech využít přirozené infekce ryb a provést zkoušení snášenlivosti na nemocných rybách (testovacích organismech).

Stejný postup se týká také testování pomocných farmakologických látek využívaných pro ryby. Toto zkoušení je možné vynechat, jestliže jsou k dispozici seriózní údaje z literatury nebo předběžné údaje o dané látce.

Vlastní zkouška bezpečnosti pro cílový organismus (snášenlivosti) je prováděna stanovením akutní toxicity po podání jedné dávky léčebného přípravku a testem toxicity po opakovaném podání.

Při akutním testu toxicity po podání jedné dávky zkoušeného léčivého přípravku nebo pomocné látky má být získána hodnota přibližné letální dávky pro údaje o vztahu mezi dávkou a účinkem. Test akutní toxicity zahrnuje také klinické sledování a patologicko-anatomické vyšetření pitvou, pokud je to možné. Vlastní metodický postup akutního testu se řídí metodickými principy uvedenými v OECD pokynu č. 203 „Test akutní toxicity na rybách“, nutné odchylky v rámci potřeb je nutné vždy dokumentovat a odůvodnit v projektu pokusu. Způsob aplikace léčiv musí být prováděn takovým způsobem, jak je zamýšleno pro konečný přípravek. U ryb je aplikace léčebného přípravku prováděna třemi způsoby:

**2.4.1.1. Podání ve vodě (koupel, ponoření)** — kontrolní skupiny musí být vystaveny stejné koncentraci pomocných látek ve zkoušeném léčebném přípravku.

**2.4.1.2. Perorální aplikace (sondou nebo medikovaným krmivem)** — kontrolní skupině je v tomto případě podán zkoušený přípravek bez účinné látky. Maximální aplikační dávka by neměla překročit 2000 mg na 1 kg hmotnosti ryb. Objem aplikované dávky sondou nemá překročit 0,5 ml zkoušeného roztoku („kaše“) na 100 g hmotnosti ryb pro dosažení požadované dávky.

**2.4.1.3. Injekční aplikace (intraperitoneální nebo intramuskulární)** — kontrolní skupině je aplikován stejným způsobem stejný objem roztoku bez účinné látky. Vždy je nutné znát koncentraci účinné látky v léčivém přípravku před použitím v testu. Testovány mají být minimálně tři koncentrace: nejvyšší dávka pro zjištění vážných

toxických účinků. Vedoucí pokusu musí obhájit vybranou velikost dávky a délku expozice.

Testované ryby v jednom testu mají být odpovídající velikosti, věku, fyziologickému stavu a původu. Velikost skupiny testovaných ryb je minimálně deset kusů. Pro každý test je nutné nasadit dvě pokusné nádrže a dvě kontrolní nádrže, umístění ryb je provedeno náhodným rozdělením. Zkoušené ryby jsou po dobu dvou týdnů před vlastním testem aklimatizovány v pokusných nádržích a musí vykazovat dobrý zdravotní stav.

Pokud je letální dávka vyšší než 2000 mg na 1 kg hmotnosti ryb, nemusí být prováděny další pokusy. Na závěr testu musí být všechny ryby vyšetřeny patologickoanatomickou pitvou.

Toxicita při opakovaném podání je sledována pouze u přípravků určených pro opakované podání. Postup odpovídá pokynu OECD č. 204 „Test dlouhodobé toxicity na rybách, 14 denní studie“. Výběr testovacích organismů je stejný jako u testu akutní toxicity po jednom podání. Testované ryby v jednom testu mají být odpovídající velikosti, věku, fyziologickému stavu a původu. Velikost skupiny testovaných ryb je minimálně deset kusů. Pro každý test je nutné nasadit dvě pokusné nádrže a dvě kontrolní nádrže, umístění ryb je provedeno náhodným rozdělením. Zkoušené ryby jsou po dobu dvou týdnů před vlastním testem aklimatizovány v pokusných nádržích a musí vykazovat dobrý zdravotní stav,

Způsoby aplikace vycházejí ze zásad aplikace při akutním testu toxicity po jednom podání. Při perorální aplikaci je nutné provádět detailní záznamy o příjmu krmiva a souběžně podávané denní dávce léčebného přípravku. Kontrolní skupiny musí být krmeny bez přítomnosti testované látky stejným způsobem jako ryby testované. Vedoucí pokusu stanoví a odůvodní dávkovací schéma a délku expozice.

Během celého testu je nutné průběžně sledovat a zaznamenávat parametry kvality vody (teplota, salinita, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>, tvrdost ( $\Sigma$ Ca a Mg), pH, průtok) a klinické parametry (chování ryb, příjem potravy, příznaky nežádoucích účinků, mortalitu). U všech uhynulých ryb během testu musí být provedeno patologickoanatomické vyšetření pitvou a histologicko-patologické vyšetření vybraných orgánů, eventuálně místa vpichu při injekční aplikaci. Pokud je to nutné, jsou stejným způsobem vyšetřeny i přežívající ryby na konci testu.

Vyhodnocení snášenlivosti je odvozeno z dokumentace toxikologických a klinických zkoušení. Cílem je stanovení terapeutického indexu, který určuje hranice



mezi maximální doporučovanou léčebnou dávkou a dávkou způsobující nežádoucí účinky. Je dostačující stanovit minimální nebo přibližnou hodnotu tohoto faktoru. U přípravku určeného pro opakovanou aplikaci je nutné zvážit maximální doporučovanou délku používání. Dále musí být definována povaha a frekvence nežádoucích účinků, která je stanovena na základě důkladného sledování klinických pokusů. Sledování interakcí se týká léčebných přípravků, které budou pravděpodobně aplikovány souběžně.

#### 2.4.2. Hodnocení farmakologického účinku

Před testováním léčebného přípravku je třeba shromáždit dostupné farmakologické informace o přípravku, případně některé parametry stanovit. Přesně musí být definován chemický vzorec, molekulová hmotnost, záporný logaritmus disociační konstanty (pKa) a rozpustnost.

Pro hodnocení farmakologického účinku jsou požadovány zkoušky na cílových organismech. Studie provedené s jedním druhem ryb jsou považovány za odpovídající pro posouzení účinku na jiných druzích ryb stejné zoologické čeledi (event. rodu). Všechny zkoušky musí být prováděny za stejných podmínek, jako je stanoven způsob aplikace daného léčebného přípravku.

V rámci farmakodynamiky je nutné znát farmakodynamické účinky účinné látky zkoušeného léčebného přípravku, které jsou základem pro doporučené užití přípravku. Musí být známy očekávané i vedlejší účinky, popř. nežádoucí účinky. Pokud je to možné, je třeba stanovit ED50 (efektivní dávku, kdy 50 % organismů vykazuje pozitivní farmakologický účinek).

Provádění farmakokinetických studií je u ryb velmi složité. Sledování časového průběhu koncentrací účinné látky a metabolitů v tělních tekutinách, tkáních a exkretech je u ryb možné pouze na různých jedincích ze stejné experimentální skupiny (hejna). U náhodně vybraných jedinců (doporučeno u deseti kusů, minimálně u čtyř kusů) je vyšetřena tělní tekutina (krevní plazma), obsah střev a svalovina, případně játra (*hepatopankreas* u kaprovitých ryb). Pokud je to vhodné, měly by být farmakokinetické studie prováděny při různých teplotách vody.

U látek, které jsou určeny k jednorázové aplikaci, je dostačující jednodávková studie. Pokud je přípravek určen pro opakované podání, je třeba uvádět údaje o dosažení a udržení ustáleného stavu nebo o možné akumulaci.

Cílem hodnocení farmakologického účinku je stanovení časového průběhu koncentrace účinné látky v plazmě, eventuálně v cílových tkáních, ve kterých dochází k farmakologickým nebo toxickým účinkům. Měla by být stanovena rychlost a rozsah absorpce. Pro léčivé přípravky, u kterých je účinnost závislá na tkáňové nebo plazmatické koncentraci (u perorální a injekční aplikace), musí být stanovena absolutní nebo alespoň relativní biologická dostupnost léčebného přípravku. V rámci sledování distribuce je nutné zjistit jakékoliv zadržování účinné látky nebo metabolitů. Pokud je to možné, má být stanoven metabolismus nebo biotransformace účinné látky. Musí být určena hlavní cesta exkrece účinné látky a jejích hlavních metabolitů.

#### 2.4.3. Mikrobiologie a parazitologie

Pokud je to možné, provádí se důkaz účinnosti in vitro. U bakteriostatik a baktericidních látek musí být známy nebo stanoveny a potvrzeny MIC (minimální inhibiční koncentrace) nebo MBC (minimální baktericidní koncentrace), nejlépe je stanovit poměr MIC/MBC. Stanovení se provádí u nejméně deseti příslušných kmenů daného patogenu, v případě, že patogen má několik sérotypů, musí kmeny reprezentovat různé sérotypy. U antiparazitik musí být uvedeny přibližné letální koncentrace pro cílové druhy parazitů. Podle hodnot MIC jsou stanoveny očekávané léčebné koncentrace účinné látky v krvi nebo séru, případně v cílových tkáních.

## **2.5. Zkoušení reziduí**

U ryb je stanovení reziduí prováděno ve svalovině v přirozené souvislosti s kůží, v odůvodněných případech v játrech (*hepatopankreatu* u kaprovitých ryb). Studie se skládá z jedno až dvoutýdenní aklimatizace ryb, z období aplikace zkoušeného léčebného přípravku a z fáze odběru vzorků pro stanovení reziduí. Pokud není určeno vedoucím pokusu, jsou vzorky pro stanovení reziduí odebírány minimálně po dobu 20 dnů od poslední aplikace léčiva. Vzorek je odebírán vždy od deseti kusů ryb jak pokusných, tak kontrolních skupin.

Pro stanovení reziduí platí stejné požadavky na testovací organismy, testovací prostředí a manipulaci s testovacími organismy jako při pokusech předklinického a klinického testování. Pro určení reziduí je akceptovatelné využití klinického pokusu za předpokladu nasazení dostatečného počtu testovacích organismů, který umožní provést požadované odběry.

Na základě stanovení obsahu reziduí je určena ochranná lhůta léčebného přípravku. U ryb se uvádí v denních stupních (stupňodnech). Jeden stupňoden je představován průměrnou teplotou 1 °C podobu jednoho dne (24 hodin).

## 2.6. Klinické testování

Hlavním cílem sestavování dokumentace k účinnosti je prokázat léčebnou hodnotu nového léčebného přípravku určeného pro ryby a definovat vhodnou dávku a dávkovací schéma. Klinické testování je požadováno pro každou doporučovanou indikaci a skupinu cílových organismů. Pokusy musí zahrnovat kontrolní skupiny. Testování musí proběhnout v experimentálních i poloprovozních podmínkách. Terénní zkoušení musí být prováděno v souladu s GCP (Good Clinical Practice = správná klinická praxe) podle pokynu Good Clinical Practice for the Conduct of Clinical Trials on Veterinary Medicinal Products in the European Union (v ČR vyhláška o správné klinické praxi č. 472/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů). Během celého pokusu jsou sledovány a zaznamenávány nežádoucí účinky, vedlejší účinky a snášenlivost cílových organismů.

Všechny pokusy musí být provedeny v odpovídajících podmínkách, které jsou dány pro doporučované použití léčebného přípravku. Vedle pokusných skupin je testována pozitivní a negativní kontrolní skupina. Kontrolním rybám je prováděn stejný způsob aplikace „placeba“ a všechny manipulace jako s rybami pokusnými.

2.6.1. Pokusy pro stanovení a ověření dávky (dose determination): cílem je stanovit optimální dávku, dávkový interval a celkovou délku léčby pro uvedené indikace. Pokusy se provádějí jako kombinace experimentálních zkoušek a terénních (poloprovozních) pokusů. Údaje získané terénními pokusy jsou považovány za významnější. Pokud je předpoklad, že existují rozdíly ve farmakokinetice nebo účinnosti v závislosti na věku, velikosti, fyziologickém stavu ryb nebo kvalitativních parametrech vody je potřeba provést diferencované studie.

2.6.2. Experimentální pokusy: mají možnosti kontroly a standardizace podmínek pokusu. Pokusy jsou prováděny s hlavními cílovými organismy — ryby musí být stejného stáří, velikosti a původu, musí být vnímavé k chorobě, která má být léčena a musí být zaznamenán jejich zdravotní stav (vyšetření vzorku deseti ryb z hejna před

pokusem). Všechny pokusy musí být naplánovány tak, aby získané údaje byly vhodné pro statistickou analýzu (počet a velikost skupin ryb). Testovaná zvířata by neměla být vystavena v předcházejícím období čelenžnímu mikroorganismu. Čelenžní organismus musí být zástupcem kmenu, který odpovídá aktuální nálezové situaci a který byl izolován a určen pomocí vhodných metod (přednostně standardních), které jsou detailně popsány. Výsledky nadávkování čelenžního organismu do různých skupin musí být zaznamenány a založeny na počítání parazitů, mikrobiologickém testování nebo dalších příslušných metodách.

*2.6.3. Terénní pokusy:* musí zajistit, že léčebný přípravek je účinný v různých podmínkách, které jsou v akvakulturních chovech ČR. Pro terénní klinické pokusy je třeba vybrat 3 — 5 rybích hospodářství (farem) v takovém optimálním zeměpisném rozmístění, aby byly zastoupeny různé podmínky prostředí. Každé hospodářství musí mít více stejných nádrží a dostatek ryb odpovídajícího druhu, věku, velikosti, původu a zdravotního stavu. Chovatel musí být patřičně proškolen, jak vést podrobné záznamy (původ ryb, anamnéza, předchozí medikace, použití chemikálií nebo vakcinace, vzplanutí onemocnění, mortalita, léčba, krmění, zoohygiena parametry kvality vody — teplota, kyslík, pH). Všechny ryby v jedné nádrži jsou považovány za jednu skupinu. Pro terénní pokus musí být použity minimálně dvě skupiny, z toho jedna kontrolní. Většinou je kontrolní skupina kontrolou pozitivní, tj. skupinou, kde je rozšířeno onemocnění, ale není prováděna léčba. Negativní kontroly nejsou pro testy nakažlivých onemocnění požadovány.

Terénní klinické pokusy v komerčních rybích hospodářstvích by měly být prováděny za spontánních vzplanutí infekcí (přirozených infekcí), pro které je požadována účinnost. Pak je nutné provést identifikaci původců onemocnění. Terénní testování anestetik a jiných neléčebných přípravků (např. preventivních) je prováděno na zdravých rybách. Čelenžní pokusy jsou v terénním testování akceptovány, pokud je to odůvodněno vedoucím pokusu.

Je třeba stanovit kritéria pro diagnózu, která musí být použita pro všechny terénní pokusy, včetně patologicko-anatomického vyšetření pitvou vzorku nejméně šesti ryb z každé skupiny. Bakteriální onemocnění musí být diagnostikována pomocí izolace minimálně ze šesti kusů ryb a určení patogenu co možná nejvhodnější mikrobiologickou metodou.

Na základě výsledků studií dávka-odpověď, kinetických údajů a výsledků experimentálních klinických pokusů je stanovena doporučená dávka pro terénní pokusy. V dokumentaci musí být stanovena kritéria pro hodnocení účinnosti zkoušeného léčebného přípravku. Také musí být zaznamenána a diskutována současně prováděná léčba v průběhu pokusu. Mělo by být podáno vysvětlení nespecifické mortality a komentáře k fyziologickým abnormalitám, ke změnám chování a také ke vzniku rezistence. Každý terénní pokus musí být detailně popsán podle stejných protokolů na všech rybích hospodářstvích.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Charakteristika testovaných přípravků

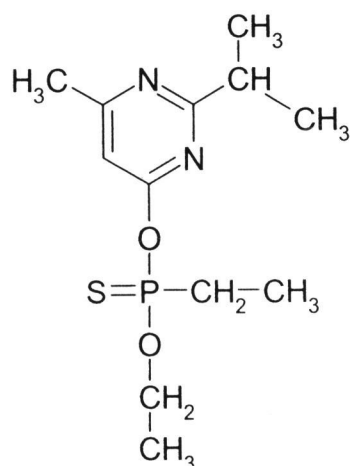
Testovány byly dva přípravky. Insekticidní organofosfát Neocidol 600 EC na bázi diazinonu, který je používán jako veterinární léčivo a insekticidní Nomolt 15 SC na bázi teflubenzuronu. Přípravek Nomolt 15 SC je uveden v Seznamu registrových prostředků na ochranu rostlin 2004.

#### 3.2. Neocidol 600 EC

Účinná látka: 600g.l<sup>-1</sup> dimpylatum

Přípravek je používán jako veterinární ektoparazitikum. Je určen k postřiku, ke koupelím nebo k omývání hospodářských a domácích zvířat: prasat, skotu, koz, koní, oslů a psů. Přípravek je vysoce účinný proti blechám, vším, zákožkám, dospělým střečkům i larvám, klíšťatům, klošům a jiným ektoparazitům. Přípravek je rovněž určen k postřiku stájí a k hubení much. Nesmí se používat u koček a drůbeže.

Neocidol 600 EC se užívá jako emulgovaný ve vodě po naředění. Je zde ochranná lhůta pro maso 14 dnů a mléko 3 dny. Nesmí se používat u koní, jejichž maso je určeno pro lidský konzum.



O,O-diethyl-O-(2-isopropyl-6methylpyrimidin)-4-yl-thiofosfát

Obrázek 3. Strukturní vzorec diazinonu (Tomlin, 2003)

Účinná látka Neocidolu 600 EC je stejná jako již u používaného přípravku Diazinonu 60 EC. Komerční výrobu pro účinnou látku diazinon, v jehož molekule je zabudován pyrimidinový kruh, zavedla společnost Geigy v roce 1952 (Cremlyn, 1985).

Je to systémový insekticid s dosti značnými akaricidními účinky a celkem dobrou reziduální účinností. Je dostatečně těkavý, takže je účinný i proti mouchám (Cremlyn, 1985).

Účinně hubí řadu půdních škůdců a škůdce ovoce, zeleniny a rýže např. květilku zelnou, pochmurnatku mrkvovou, mšice, svilušky, třásněnky a štítěnky. Dále je účinný proti řadě škůdců dobytka a proti škůdcům vyskytujícím se v domácnostech. Mezi sklizní jedlých plodů a poslední aplikací by měla uběhnout minimální doba dvou týdnů. Diazinon je poměrně málo toxický pro savce: LD<sub>50</sub> (orálně) pro krysy je 150 mg·kg<sup>-1</sup>. Dále je účinný proti řadě škůdců vyskytujících se v domácnostech (Eto 1974, Martin 1974, Ware 1975).

Mnoho organofosforových insekticidů vykazuje velmi malou anticholinesterazovou aktivitu *in vitro* a jejich účinnost *in vivo* je výsledkem čistě metabolické aktivace. Příkladem aktivačního procesu jsou enzymové oxidace (enzymy označované jako MFO neboli oxidázy s širokou specifikou účinků se vyskytují ve zvířecích, rybích a hmyzích buněčných mikrosomech a za přítomnosti NADPH nebo NADH oxidují řadu lipofilních substrátů) thiofosfátů, jako je právě diazinon, kde probíhá přeměna vazby P=S na P=O. Uvedené aktivace *in vivo* probíhají zpravidla v hmyzím střevě a v tukových tkáních a játrech obratlovců (Metcalf 1971, Fukuto et Sims 1971). Také Piskač (1985) uvádí, že k metabolizaci dochází již v krvi a z velké části v játrech a ledvinách.

Diazinon sám o sobě není inhibitorem cholinesterázy. Avšak v těle živočichů je konvertován na diazoxon, složku, která je silným inhibitorem tohoto enzymu (Eisler 1986, Gallo et Lawryk 1991).

V porovnání s mnoha dalšími organofosfátovými insekticidy, organizmy které přežijí inhibici cholinesterázy diazinonem podléhají spontánní reaktivaci tohoto enzymu. To znamená, že defosforylace nastupuje snadněji než při inhibici jinými organofosfáty (Fleming et Bradbury 1981).

### 3.2.1. Charakteristika nebezpečnosti

Přestože některé testy naznačují, že diazinon má mutagenní účinky, není tato domněnka průkazná. Nebyl zjištěn žádný karcinogenní efekt (Gallo et Lawryk 1991).

Poločas rozpadu diazinonu v těle zvířat je asi 12 hodin. Probíhá rapidní metabolismus a vylučování diazinonu. Produkty metabolismu diazinonu jsou z těla odváděny močí a výkaly. Organismus vyloučí 70% metabolitů. U skotu bylo pozorováno krátkodobé uložení (2 týdny) složek diazinonu v tukové tkáni (U.S. Public Health Service 1995).

V rostlinném těle podléhá kompletnímu rozkladu s poločasem rozpadu kratším než 14 dní, přičemž s klesající teplotou roste perzistence pesticidu (nejvyšší perzistence je pozorována u rostlin s vysokým obsahem oleje) (Eisler 1986).

Degradace diazinonu ve vodě závisí na pH vody. Při nízké kyselosti se koncentrace ve vodě sníží na polovinu za 12 hodin, zatímco v neutrálním prostředí tento proces trvá 6 měsíců (Howard 1991). Z tohoto důvodu je obtížné stanovit bezpečnou koncentraci diazinonu v prostředí (Kanazawa 1978).

Organofosforové insekticidy jsou mnohem méně perzistentní než insekticidy organochlorové. To platí také pro diazinon, který se v půdě rozloží za 2 až 3 týdny po aplikaci (Cremlyn, 1985).

Diagnostiku intoxikace lze provést průkazem organofosfátů a jejich metabolitů v krvi a moči, postmortálně ze vzorků jater či ledvin, chromatografií (Piskač et al. 1985).

### 3.2.2. Toxicita pro ryby

LC<sub>50</sub> pro pstruha duhového je uvedeno v rozmezí 2,6 – 3,2 mg·l<sup>-1</sup> (Kidd et James 1991). Eisler (1986) dále uvádí velice rozdílnou toxicitu vzhledem k formě, ve které je diazinon testován. Nejtoxičtější byl pro pstruha duhového v technické formě, kdy byla pozorována 96hLC<sub>50</sub> = 110 µg·l<sup>-1</sup>, zatímco k diazinonu rozpuštěnému v tucích byl pstruh duhový nejméně vnímavý 96hLC<sub>50</sub> 19 mg·l<sup>-1</sup>.

Pro *Leuciscus indus* L. byla zjištěna LC<sub>50</sub> 15 mg·l<sup>-1</sup>.

Hodnota 96hLC<sub>50</sub> diazinonu pro *Poecilia reticulata* byla 0,8 mg·l<sup>-1</sup>, pro *Brachydanio rerio* 8 mg·l<sup>-1</sup> (Keizer et al. 1991). OH et al. (1991) uvádějí tři faktory, které zapříčiňují selektivní toxicitu diazinonu pro různé druhy ryb. Jsou to rozdílná inhibice acetylcholinesterázy, rozdílná detoxikace a rozdílná absorpce.

Teplomilné ryby jsou diazinonu více odolné (U.S. Public Health Service 1995). Ryby mořské jsou vnímavější oproti rybám sladkovodním (Meister, 1992).

Diazinon je poměrně málo toxický pro savce (LD<sub>50</sub> orálně pro krysou *Rattus rattus* je 150 mg·kg<sup>-1</sup>) (Eto, 1974).



Biokoncentrační koeficient se pohybuje v rozmezí od 17,5 u *Poecilia reticulata* Peters až 200 u *Pimephales promelas* Raf. Tyto studie dokládají, že diazinon není u ryb významně biokoncentrován (Howard, 1991).

### 3.3. Nomot 15 SC

Účinná látka: teflubenzuron 150 g.l<sup>-1</sup>

Insekticid firmy BASF vyvinutý Becherem v roce 1983 a poprvé použit v Thajsku v roce 1984 (Tomlin, 2003).

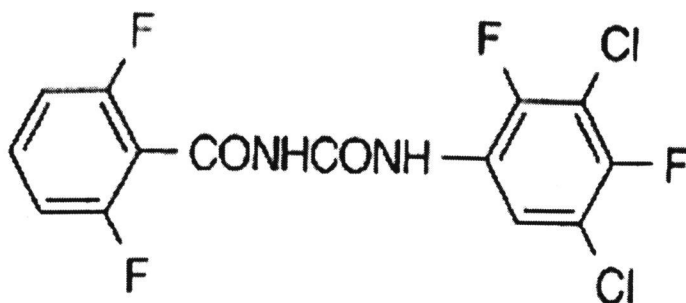
Tento přípravek na ochranu rostlin se používá ve formě suspenzního koncentrátu na ochranu zemědělských plodin a lesních kultur proti škodlivému hmyzu.

R 50/53 vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (Anonym, 2005)

#### 3.3.1. Charakteristika nebezpečnosti

Působení: teflubenzuron působí na larvální stadia motýlů a fytofágních blanokřídlých především jako požerový, žaludeční jed. Narušuje biosyntézu chitinu a tím procesy svlékání. Larvy, housenky a housenice se dále nevyvíjejí a hynou. Některé druhy už krátce po žíru na ošetřené části rostliny končí požerovou aktivitu. Nejcitlivější jsou nejmladší stadia, která hynou v závislosti na povětrnostních podmínkách a intenzitě žíru zpravidla po 5 – 7 dnech po ošetření. Starší larvy a housenky též uhynou, ale až po delším žíru na ošetřené rostlině. Na dospělý hmyz – brouky a motýli – přípravek neúčinkuje, působí však výrazně chemosterilačně.

Předností přípravku je, že zůstává na povrchu rostlin, má příznivou toxicitu pro teplokrevné živočichy, účinkuje proti rezistentním kmenům škůdců a nepoškozuje užitečné členovce.



1-(3,5-dichloro-2,4-difluorofenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)močovina

Obrázek 4. Strukturální vzorec teflubenzuronu (Tomlin,2003)

### 3.3.2.Přehled toxicity

Toxicita pro savce: akutní orální  $LD_{50}$  pro krysy a myši je vyšší než 5000  $mg \cdot kg^{-1}$  pokožka a oči: akutní perkutánní  $LD_{50}$  pro krysy je více než 2000  $mg \cdot kg^{-1}$ , nedráždí pokožku ani oči králíků, NOEL (90dní) pro krysy 8  $mg/kg$  živé hmotnosti (denně), pro psy 4,1  $mg /kg$  živé hmotnosti (denně) Není teratogenní ani mutagenní.

Ekotoxikologie: ptáci: akutní orální  $LD_{50}$  pro křepelky > 2250  $mg \cdot kg^{-1}$ , potravní  $LC_{50}$  pro křepelky a kachny >5000  $mg \cdot kg^{-1}$ , ryby:  $LC_{50}$  (96h) pro kapra a pstruha > 500  $mg \cdot l^{-1}$  včely: netoxický pro včely pokud se používá v doporučených koncentracích,  $LD_{50}$  (místní) >1  $mg$  na včelu

Odbourávání v prostředí: u krys, kterým byl přípravek podáván orálně se teflubenzuron a jeho metabolity vylučovaly velmi rychle ve výkalech a v moči. V moči byly identifikovány 3 metabolity. Rostliny tuto látku nepřijímají a ani u nich není metabolizován.

Půda a prostředí:  $DT_{50}$  v půdě 2-12 týdnů. V půdě nastává rychlá mikrobiální přeměna na hlavní metabolit 3,5-dichloro-2,4- difluorofenylmočovinu.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Testy akutní toxicity

#### Test akutní toxicity na rybách

Byl prováděn podle standardního operačního postupu, zpracovaného v toxikologické laboratoři VÚRH JU Vodňany, který vychází z ČSN ISO 7346-2 a OECD 203. K přípravě zásobních roztoků a k přípravě ředící vody byla použita deionizovaná voda.

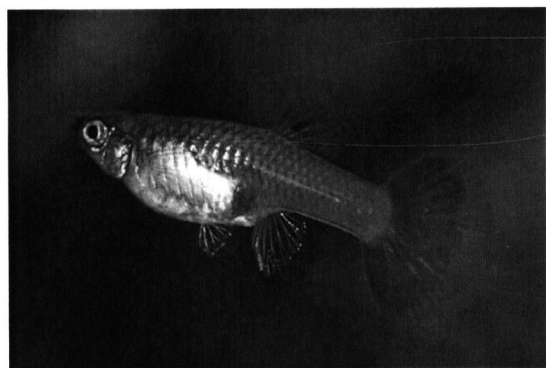
### 4.2. Testovací organismy

K testům byla použita živorodka duhová (*Poecilia reticulata* Peters) a plůdek pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

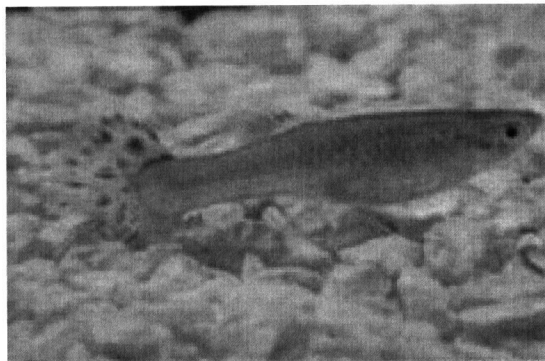
#### 4.2.1 Živorodka duhová

*Poecilia reticulata* - (živorodka duhová)

K testům byly použity ryby stáří 3-4 měsíců o délce těla 15-20 mm, dobrého zdravotního stavu z chovu VÚRH JU. Postup chovu živorodky duhové je uvedený v příloze této práce. K testům jsem použila ryby, které byly pohlavně diferencované (samice neměly zřetelnou "zárodečnou" skvrnu). Ryby byly v přirozeném poměru pohlaví 1:1, přičemž jsem vybírala do jednotlivých testovacích nádob ryby náhodně. Ryby použité do testů akutní toxicity se před zahájením testu chovaly při teplotě  $21 \pm 2$  °C, 48 hodin před začátkem testu a během testu nebyly krmeny.



Obrázek 5. *Poecilia reticulata* ♀



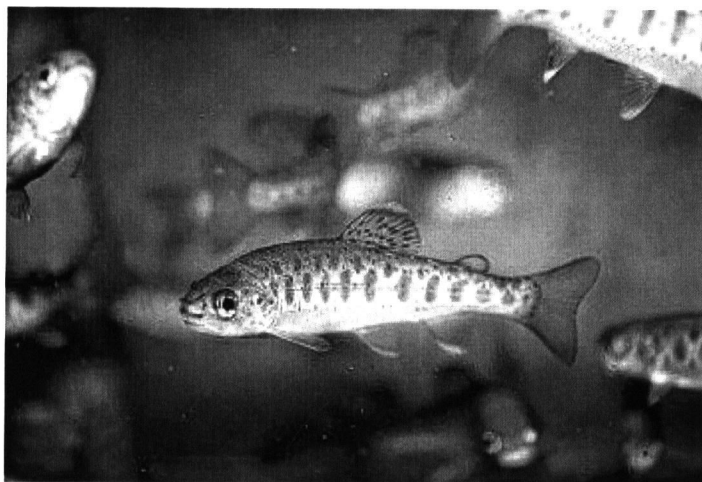
Obrázek 6. *Poecilia reticulata* ♂

#### 4.2.2. Pstruh duhový

*Oncorhynchus mykiss* - (pstruh duhový).

Byl dovezen ze pstruhařství Josefa Miekeše Zvotoky. Ryby byly ve velikosti 10-15 cm. Testy probíhaly v 25 l akváriích za stálého vzduchování a udržování nízké teploty do  $15 \pm 2$  °C. Teplota vzduchu byla udržována pomocí klimatizační jednotky. (OECD EO 7346-2, 1999).

Před vlastním testem byly ryby adaptovány na podmínky testu. Ryby jsem vybírala do jednotlivých testovacích nádob náhodně.

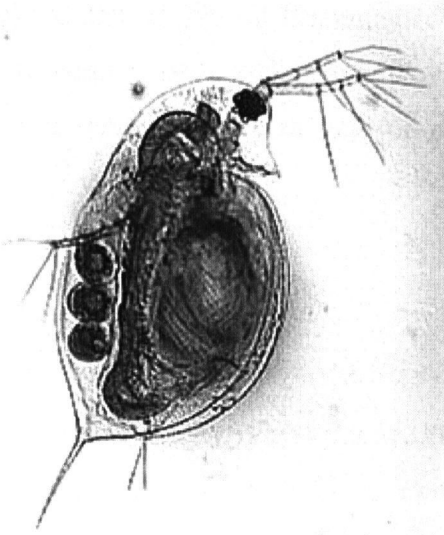


Obrázek 7 *Oncorhynchus mykiss*

#### 4.2.3. Testy akutní toxicity na *Daphnia magna*

K testům byla použita perloočka *Daphnia magna* Stratus z laboratorního chovu VÚRH JU. Pro testy se používaly perloočky ve stáří 24 hodin, nejméně třetí generace získané acyklickou partenogenezí za podmínek zdravého prosperujícího chovu. Zásady chovu *Daphnia magna* jsou uvedeny v příloze této diplomové práce.

*Daphnia magna* (hrotnatka) patří do řádu perloočky (*Cladocera*) a podkmenu korýši (*Crustacea*). V dospělosti může být až 6 mm velká. Tělo se skládá z hlavy, hrudě a zadečku. Je nezřetelně článkované a uložené ve dvouchlopňové skořápce, která může být u dravých druhů redukována. Skořápka nikdy nekryje hlavu. Dafnie má jedno velké složené oko, z pravidla jedno naupliové očko a dva páry antén. První pár antén je zakrnělý a má smyslovou funkci, druhý pár je mohutný, dvouvětevný a slouží perloočkám k pohybu. Dafnie má 4–6 párů hrudních končetin, které jsou zpravidla listovité a slouží k filtraci potravních částic a k dýchání.

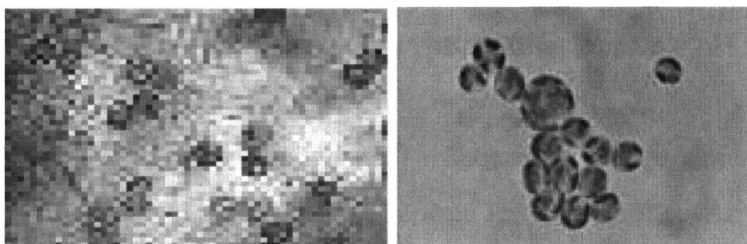


obrázek 8 *Daphnia magna*

Konec zadečku je pozměněn ve zvláštní orgán (postabdomen), zakončený dvěma drápky (Hartman, Příkryl, Štědroňský, 1988).

#### 4.2.4. Test akutní toxicity na řasách *Desmodesmus subspicatus*

K testům byla použita sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus* z laboratorního chovu VÚRH JU. **Řasové inokulum** pro tento test se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury. Pro kultivaci této kultury se použije živný roztok připravený smícháním jednoho objemového dílu zásobního roztoku živin s osmi díly vody. Přidá se takový objem zásobní řasové kultury, aby při desetinásobném zředění živným roztokem dosahovala hustota buněk řádově  $10^4$  v 1 ml. Inokulační kultura se udržuje po dobu 3 dnů za podmínek testu a poté se použije pro inokulaci.



Obrázek 9 a 10 *Desmodesmus subspicatus*

Udržování kmenové kultury se provádí na šikmém 1,5 % agaru ve standardním živném mediu, na nepřímém denním světle při laboratorní teplotě, přeočkovává se jedenkrát za dva měsíce

Zásobní kultury se pěstují ve 250 až 300 ml Erlenmayerových baňkách se 100 ml standardního živného media, za stejných podmínek jako udržovací kmenová kultura

Předkultivace se provádí v termoluminostatu za stejných podmínek jako vlastní test.

### 4.3. Podmínky testu

#### 4.3.1. *Poecilia reticulata*

Během testu a 48 hodin před ním nebyly ryby krmeny. Při testech na *Poecilia reticulata* se neprováděla aerace (vzduchování). V testu na *Poecilia reticulata* byla teplota vody  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  a délce expozice  $96 \pm 2$  hodiny. Stejně tak se prováděla i výměna lázně po 48 hodinách v závislosti na charakteru testovaného vzorku. Aby nasycení vody kyslíkem v průběhu testu nekleslo v kontrole pod 60 % (bylo měřeno na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu), doporučený poměr hladiny k objemu roztoku  $800 \text{ cm}^2$  na 10 litrů – těmto podmínkám vyhovují potravinářské sklenice o objemu 3 litrů, kam se odměřují 3 litry lázně (obrázek 11).

**Předběžný test:** sestával ze 6-7 koncentrací testované látky, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací testované látky o objemu 1000 ml se nasazovalo po třech kusech *Poecilia reticulata*.

**Základní test:** sestával ze 6-7 různých koncentrací testované látky v rozmezí stanovené předběžným testem nacházející se v okolí předpokládané hodnoty  $LC_{50}$ . Do připravených koncentrací o objemu 2 litrů se nasadilo po 7 kusech *Poecilia reticulata*.

#### 4.3.1.1. Provedení testu - stanovení hodnoty $LC_{50}$ pro ryby

Testovaná látka byla dávkována ve formě roztoku. Na začátku testu, ve 24 hodinových intervalech a na konci testu se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po  $48 \pm 2$  hodinách se ryby přelovily do čerstvě připravených, vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu testu se zaznamenávala mortalita ryb. Uhynulí jedinci byli odlovováni. Po ukončení testu se měřila délka těla ryb u 10 % k testu použitých ryb. Na základě výsledků testu byla vypočtena hodnota  $96hLC_{50}$ . (ON 46 6807 Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších. ÚNM Praha.)

Jedinci, kteří přežili se po ukončení testu, usmrcovali (s výjimkou ryb z kontrolní skupiny) oxidem uhličitým (Beklová a Svoboda. 1999).



Obrázek 11 testovací nádoby

#### 4.3.2. *Oncorhynchus mykiss*

Během testu a 48 hodin před ním nebyly ryby krmeny. Při testech na *Oncorhynchus mykiss* se prováděla aerace (vzduchování). Pro *Oncorhynchus mykiss* byla teplota vody během testu  $15 \pm 2$  °C, délka expozice byla  $96 \pm 2$  hodiny. Stejně tak se prováděla i výměna lázně po 48 v závislosti na charakteru testovaného vzorku. Aby nasycení vody kyslíkem v průběhu testu nekleslo v kontrole pod 60 % (bylo měřeno na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu). *Oncorhynchus mykiss* se nasazoval do akvária o objemu cca 25 l po 5 kusech. Stejným způsobem se nasazovala i kontrola.

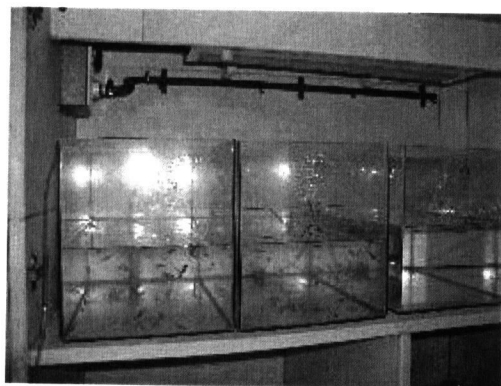
**Předběžný test:** sestával ze 6-7 koncentrací testované látky, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací testované látky o objemu cca 25 l se nasazovalo po pěti kusech *Oncorhynchus mykiss*.

**Základní test :** sestával ze 6-7 různých koncentrací testované látky v rozmezí stanovené předběžným testem nacházející se v okolí předpokládané hodnoty LC<sub>50</sub>. Do připravených koncentrací o objemu cca 25 litrů se nasadili *Oncorhynchus mykiss*.

#### 4.3.2.1. Provedení testu - stanovení hodnoty LC<sub>50</sub> pro ryby

Testovaná látka byla dávkována ve formě roztoku. Na začátku testu, ve 24 hodinových intervalech a na konci testu se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po  $48 \pm 2$  hodinách se ryby přelovily do čerstvě připravených, vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu testu se zaznamenávala mortalita ryb. Uhynutí jedinci byli odlovováni. Po ukončení testu se měřila délka těla ryb u 10 % k testu použitých ryb. Na základě výsledků testu byla vypočtena hodnota 96hLC<sub>50</sub>. (ON 46 6807 Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších. ÚNM Praha.)

Jedinci, kteří přežili, se po ukončení testu usmrcoval (s výjimkou ryb z kontrolní skupiny) oxidem uhličitým (Beklová a Svoboda. 1999).



Obrázek 12 testovací nádrže

#### 4.3.3. Platnost testu (validace)

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

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích a v kontrole během celého testu neklesla pod 60 %,
- Koncentrace testované látky během testu neklesla pod nominální koncentraci 80%,
- Mortalita kontrolních ryb nepřekročila 10 %,
- Zjištěná hodnota  $96hLC_{50}$  standardu je ve shodě z výsledky odpovídajícími pro tento standard.

#### 4.3.4. Akutní imobilizační test na perloočkách

Byl prováděn podle standardního operačního postupu, zpracovaného v toxikologické laboratoři VÚRH JU Vodňany, který vychází z ČSN ISO 6341 a OECD 202.

Teplota vody během testu byla  $21 \pm 2$  °C při délce expozice  $48 \pm 2$  hodiny. Testovací organismy jsem nasazovala do skleněných kádinek o objemu 100 ml v jedné či dvou paralelních testech, v závislosti na druhu testu. Dafnie jsem nasazovala pomocí skleněné trubičky s malým objemem vody, tak aby nedošlo k zavzdušnění. Během testu se dafnie nekrmily. Test probíhal bez osvětlení (v šeru) a bez areace.

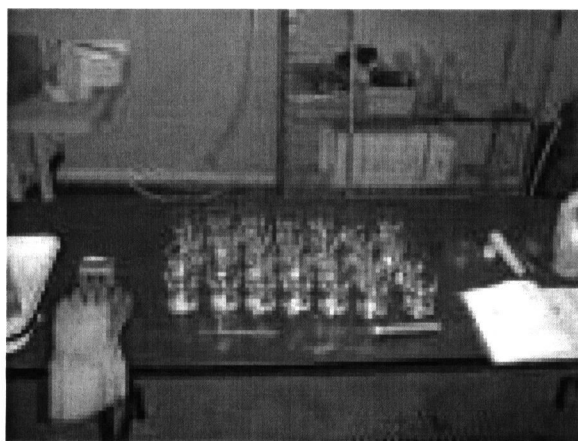
Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu jsem měřila teplotu. V nádobách, kde došlo v průběhu testu ke 100% úhynu nebo imobilizaci testovacích organismů jsem také změřila koncentraci rozpuštěného kyslíku a v závěru testu jsem ve všech zbývajících nádobách změřila koncentraci rozpuštěného kyslíku.



#### 4.3.4.1. Provedení testu- stanovení hodnoty LC<sub>50</sub> pro *Daphnia magna*

**Předběžný test:** tento test sestával ze 6-7 různých koncentrací testovaného vzorku, volených širokém rozpětí (podle povahy testovaného vzorku, obvykle u látek od 1-1000 mg·l<sup>-1</sup>) a kontroly. Do každé koncentrace se nasazovalo 10 kusů testovacího organismu.

**Základní test:** základní test sestával z 6-10 různých koncentrací testovaného vzorku v rozmezí stanovené předběžným testem. Pro každou koncentraci se nasazovaly obvykle dvě paralelky (tzn., že počet nasazených organismů byl 10+10 ks). Rozsah koncentrací se volil tak aby bylo možno stanovit hodnotu LC<sub>50</sub>. Pracovní postup byl stejný jako u předběžného testu. Současně se nasazovala i kontrola. Na základě výsledků základního testu byla vypočtena hodnota 48hEC<sub>50</sub>.



Obrázek 13 testovací kádinky

V průběhu testů jsem zaznamenávala imobilizaci a mortalitu dafnií, kontrola se prováděla po 24 a 48 hodinách. Počítala jsem imobilní jedince v každé nádobě (pokud nebyli schopni se rozplavat za 15 s po mírném zamíchání roztoku, považovala jsem je za imobilizované, i když ještě pohybovaly tykadly). Dále jsem kontrolovala teplotu a koncentraci rozpuštěného kyslíku.

#### 4.3.4.2. Platnost testu (validace)

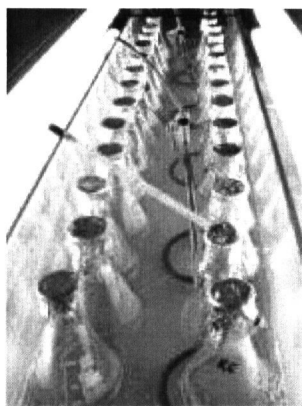
Výsledky se považují za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích na konci testu je větší nebo rovna 2 mg·l<sup>-1</sup>,
- Koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace,

- Imobilizace kontrolních organismů je menší nebo rovna 10 %,
- Zjištěná hodnota 24hLC<sub>50</sub> dichromanu draselného je v rozsahu 0,6 mg·l<sup>-1</sup> do 1,7 mg·l<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5. Test inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus*

Řasy byly inkubovány po dobu 72 hodin. V době inkubace se v nich jedenkrát za 24 hodin měřila hustota buněk. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projevoval jako **inhibice** (snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur) a potom se vyhodnotil 72hIC<sub>50</sub>. Pokud testovaná látka působila stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působila inhibičně, vyhodnocuje se IC<sub>50</sub> za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu.



Obrázek 14. Erlenmayerovy baňky (kultivace řas)

##### 4.3.5.1 Provedení testu- stanovení hodnoty 72hIC<sub>50</sub> pro *Desmodesmus subspicatus*

Teplota vody během testu byla  $25 \pm 2$  °C při délce expozice  $72 \pm 2$  hodiny. Testovací organismus se nasazoval do testovaného roztoku 25 ml ve 100 ml Erlenmayerových baňkách, jejichž počáteční koncentrace řasové suspenze:  $10\,000 \pm 2000$  buněk v 1 ml, ve dvou paralelních testech. Během celého testu bylo kontinuální osvětlení 6 000 lux, max. 10 000 lux. A minimálně třikrát denně se řasové suspenze ručně promíchávaly. Kontrola podmínek testu se prováděla na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech, kdy se měřila teplota a hodnota pH roztoků.

**Předběžný test:** tento test sestával ze 6-7 různých koncentrací testovaného vzorku, volených širokém rozpětí (podle povahy testovaného vzorku, obvykle u látek od 1-1000 mg·l<sup>-1</sup>) a kontroly. Pro každou koncentraci testované látky se připravily objemy 25 ml standardního živného roztoku s testovanou látkou, který se inokuloval řasovou

suspenzí. Kontrolní řasy byly kultivovány v živném roztoku bez přídavku testované látky,

**Základní test:** základní test sestával z 6-10 různých koncentrací testovaného vzorku v rozmezí stanovené předběžným testem. Pro každou koncentraci se nasazovaly obvykle dvě paralelky (tzn., že od každé koncentrace se inokulovaly dvě baňky). Rozsah koncentrací se volil tak aby bylo možno stanovit hodnotu  $LC_{50}$ . Pracovní postup byl stejný jako u předběžného testu. Současně se nasazovala i kontrola. Na základě výsledků základního testu byla vypočtena hodnota  $72hIC_{50}$ .

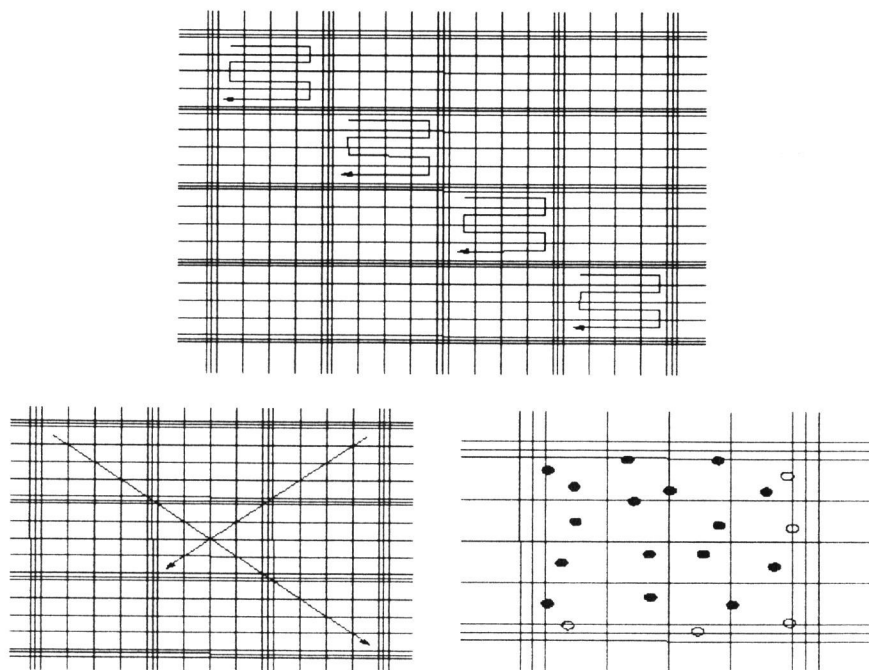
**Hodnota  $IC_{50}$  se vyhodnocuje dvěma základními způsoby:**

- 1) stanovení hodnoty  $IC_{50}$  pomocí integrálů biomasy ( $IC_{50A}$ )
- 2) stanovení hodnoty  $IC_{50}$  pomocí růstových rychlostí ( $IC_{50\mu}$ )

Podrobnější postup při výpočtech je uveden v příloze této diplomové práce.

**Příprava inokula** - řasová suspenze v živném roztoku se nechá usadit, horní čirá vrstva živného roztoku se slije. Tím se řasová suspenze zahustí a v počítací komůrce se stanoví její hustota. Výpočtem se určí objem řasové suspenze, kterým se inokuluje koncentrační řada a kontrola.

**Počítání řas v Bürkerově počítací komůrce** - počítají se řasy v 50 velkých čtvercích a výsledná hodnota se násobí číslem 5 000. Tím se získá počet buněk v 1 ml řasové suspenze.



Obrázek 15 Bürkerovy komůrky

**Výpočet potřebného objemu inokula** – v počítací komůrce se stanoví hustota kultury

z předkultivace. Testovací i kontrolní roztoky se naočkují stejným množstvím řasové suspenze tak, aby po naočkování bylo ve všech testovacích i kontrolních kulturách  $10000 \pm 2000$  buněk v 1 ml.

**Kultivace** - pokusné i kontrolní baňky se uzavřou parafilmem a umístí do termoluminostatu.

#### 4.3.5.2. Platnost testu (validace)

Výsledky testu se považují za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- hustota buněk u kontrolního vzorku se musí v průběhu 72 hodin zvýšit více než 16krát,
- pH v kontrolním vzorku se nemá změnit během testu o více než 1,5 jednotky,
- zjištěná hodnota  $72hIC_{50}$  dichromanu draselného je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

## **4.4. Hodnocení testu toxicity**

Vyhodnocení bylo prováděno pomocí probitové analýzy, tj. analýzy kvantálních dat, určených relativní četností uhynulých jedinců v závislosti na koncentraci, resp. na jejím logaritmu, přičemž se esovitá regresní křivka aproximuje distribuční funkcí normálního rozložení. Probitová analýza byla provedena pomocí počítačového programu EKO – TOX 5.1.

## 5. Výsledky

### Validace výsledků

#### 5.1. Testy na *Desmodesmus subspicatus*

V průběhu 72 hodinové expozice se hustota buněk u kontrolního vzorku zvýšila více než 16krát. V kontrolním vzorku se nezměnilo pH během testu o více než 1,5 jednotky

#### 5.2. Testy na *Daphnia magna*

V průběhu 48 hodinové expozice nebyla imobilizace kontrolních organismů vyšší než 10 %. Nasycení vody kyslíkem nekleslo v žádné koncentraci pod  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Nominální koncentrace testované látky neklesla pod 80 %.

#### 5.3. Testy na rybách

V průběhu 96 hodinové expozice nedošlo k úhynu ryb v kontrolních akváriích, stejně tak i nasycení vody kyslíkem nekleslo v žádné testované koncentraci ani v kontrolních akváriích pod 60 %. Udržení nominální koncentrace testované látky nad 80 % bylo zajištěno výměnou testované lázně. Teploty se v průběhu testu pohybovaly v daném rozmezí doporučeném pro daný druh ryb.

Lze tedy konstatovat, že podmínky validace byly splněny a výsledky testů jsou platné

## 5.4. Výsledky testů přípravku NOMOLT 15 SC

### 5.4.1. Vyhodnocení testů inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus*

Tabulka 2 Výsledky předběžného testu

Číslo baňky	Nominální koncentrace	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)			Teplota °C				pH	
		24	48	72	0	24	48	72	0	72
	mg·l <sup>-1</sup>									
1	0,1	16	118	482	24,0	26,5	25,5	26,5	7,95	9,43
2	0,5	22	188	450	23,5	26,5	25,5	26,5	7,93	9,41
3	1,0	25	135	402	23,5	26,5	25,5	26,5	7,94	9,46
4	5,0	26	155	552	24,0	26,5	25,5	26,5	7,93	9,48
5	10,0	18	74	490	23,5	26,5	25,5	26,5	7,92	9,37
6	100,0	10	14	20	24,0	26,5	25,5	26,5	7,89	8,34
7	500,0	1	2	0	23,5	26,5	25,5	26,5	7,82	7,83
K1	0	18	137	458	23,5	26,5	25,5	26,5	7,86	9,40
K2	0	17	122	368	23,5	26,5	25,5	26,5	7,86	9,40

Počáteční hustota řasové suspenze: 10225 buněk · ml<sup>-1</sup>

Tabulka 3 Výsledky základního testu

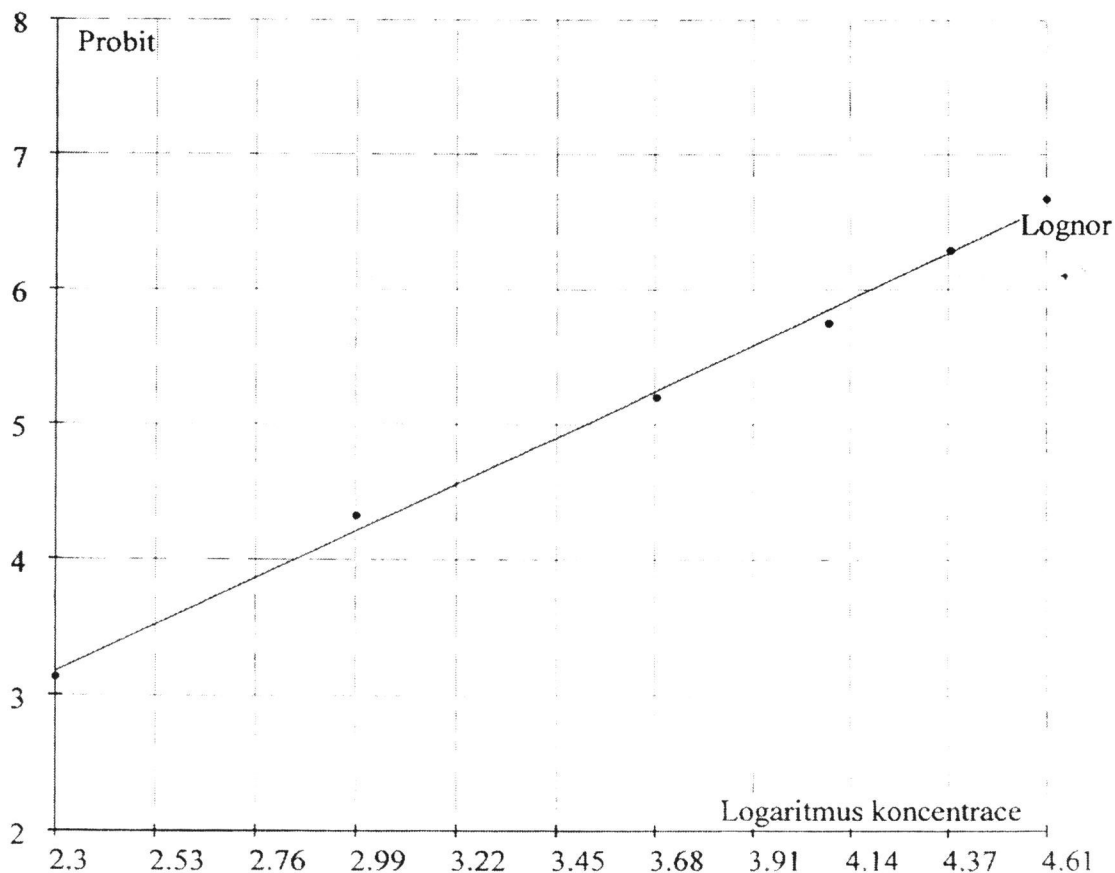
Číslo baňky	Nominální koncentrace	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)			Teplota °C				pH	
		24	48	72	0	24	48	72	0	72
	mg·l <sup>-1</sup>									
1	10	24	93	435	23,0	25,0	26,0	25,5	7,77	9,30
2	20	15	67	359	23,0	25,0	26,0	25,5	7,77	9,28
3	40	14	50	175	23,0	25,0	26,0	25,5	7,75	9,22
4	60	15	37	68	23,0	25,0	26,0	25,5	7,76	9,23
5	80	10	19	28	23,0	25,0	26,0	25,5	7,75	8,57
6	100	9	10	14	23,0	25,0	26,0	25,5	7,74	7,88
K1	0	16	107	480	23,0	25,0	26,0	25,5	7,75	9,23
K2	0	13	95	455	23,0	25,0	26,0	25,5	7,75	9,23

Počáteční hustota řasové suspenze: 10076 buněk · ml<sup>-1</sup>

**Graf 1 Vyhodnocení inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* podle ploch pod růstovými křivkami**

Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Průměrná hustota buněk (počet buněk v 1 ml)			Inhibice %
	1. den	2. den	3. den	
kontrola	40000	270000	1105000	0
10	60000	232500	1087500	3.1
20	37500	167500	897500	24.9
40	35000	125000	437500	57.8
60	37500	92500	170000	77.3
80	25000	47500	70000	90.2
100	22500	25000	35000	95.2

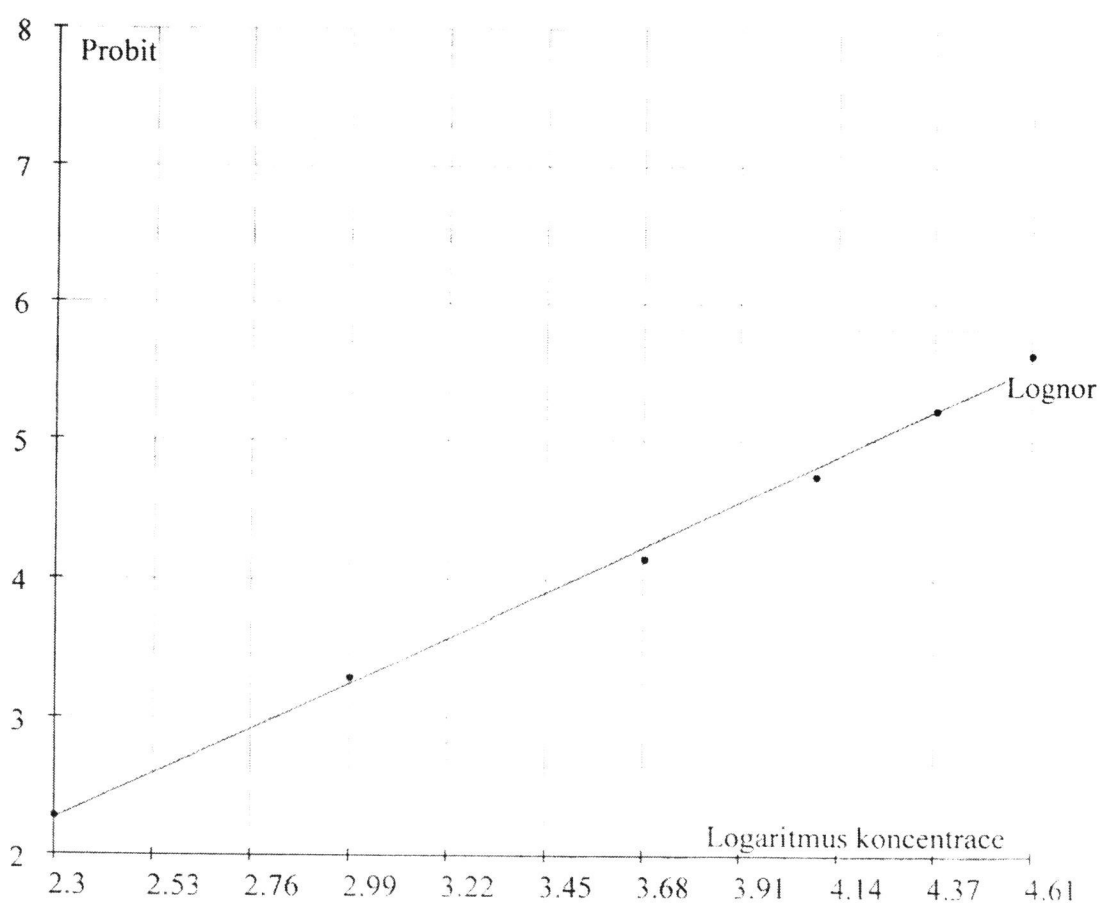
**72hIC<sub>50A</sub> = 34.0 mg·l<sup>-1</sup>**



**Graf 2 Vyhodnocení inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* podle rychlosti růstu řas**

Koncentrace $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	hustota buněk (počet buněk v 1 ml)	Inhibice %
kontrola	1105000	0
10	1087500	0.3
20	897500	4.4
40	437500	19.7
60	170000	39.8
80	70000	58.7
100	35000	73.5

**72hIC<sub>50μ</sub> = 68.5 mg·l<sup>-1</sup>**





5.4.2. Vyhodnocení akutního imobilizačního testu na perloočkách *Daphnia magna*

Tabulka 3 Výsledky předběžného testu

Číslo baňky	Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Mortalita (ks)		Nasycení vody O <sub>2</sub> na konci testu
		24 hodin	48 hodin	
1	0,00001	0	0	97 %
2	0,00010	0	1	97 %
3	0,00100	3	6	97 %
4	0,0050	2	10	97 %
5	0,010	4	10	97 %
6	0,050	6	10	97 %
7	0,100	8	10	97 %
K1	0	0	0	97 %

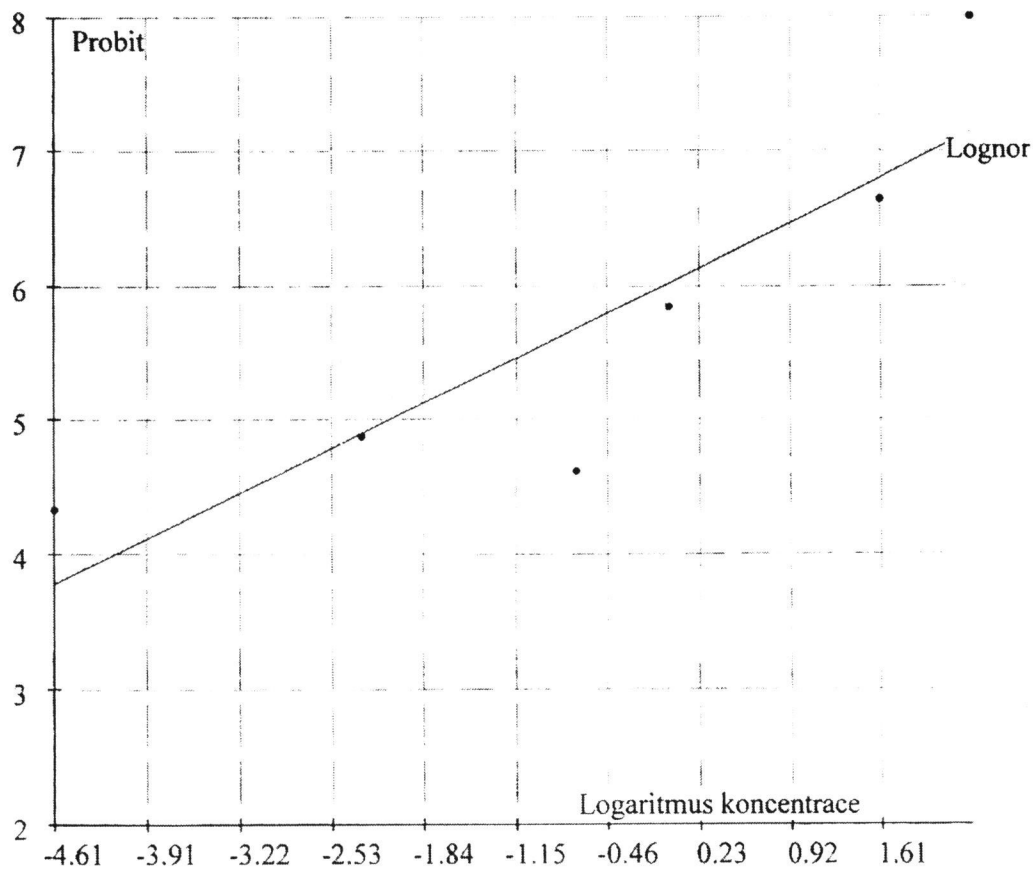
Tabulka 4 Výsledky základního testu

Číslo baňky	Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Mortalita				Nasycení vody O <sub>2</sub> na konci testu
		24 hodin		48 hodin		
		ks	%	ks	%	
1	0,00001	0 + 0	0	3 + 2	25 %	96%
2	0,00010	2 + 1	15%	6 + 3	45%	96%
3	0,00050	3 + 2	25%	4 + 3	35%	96%
4	0,00100	3 + 3	30%	9 + 7	80%	96%
5	0,00500	6 + 7	65%	9 + 10	95%	96%
6	0,0100	6 + 5	55%	10+10	100%	96%
7	0,0200	5 + 6	55%	10+10	100%	96%
K1	0	0	0%	0	0%	96%

**Graf 3** *Vyhodnocení akutního imobilizačního testu na perloočkách *Daphnia magna**

Koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Imobilizace %
0.01	25.0
0.1	45.0
0.5	35.0
1	80.0
5	95.0
10	100.0

$48\text{hEC}_{50} = 0.12 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$



5.4.3. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*

Tabulka 5 Výsledky předběžného testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb	
		ks				Σ		Hmotnost g	Délka mm
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%		
1	100	0	0	0	0	0	0	4,0	66
2	500	0	0	0	0	0	0	5,9	69
3	1000	0	0	0	0	0	0	5,9	67
K	0	0	0	0	0	0	0		

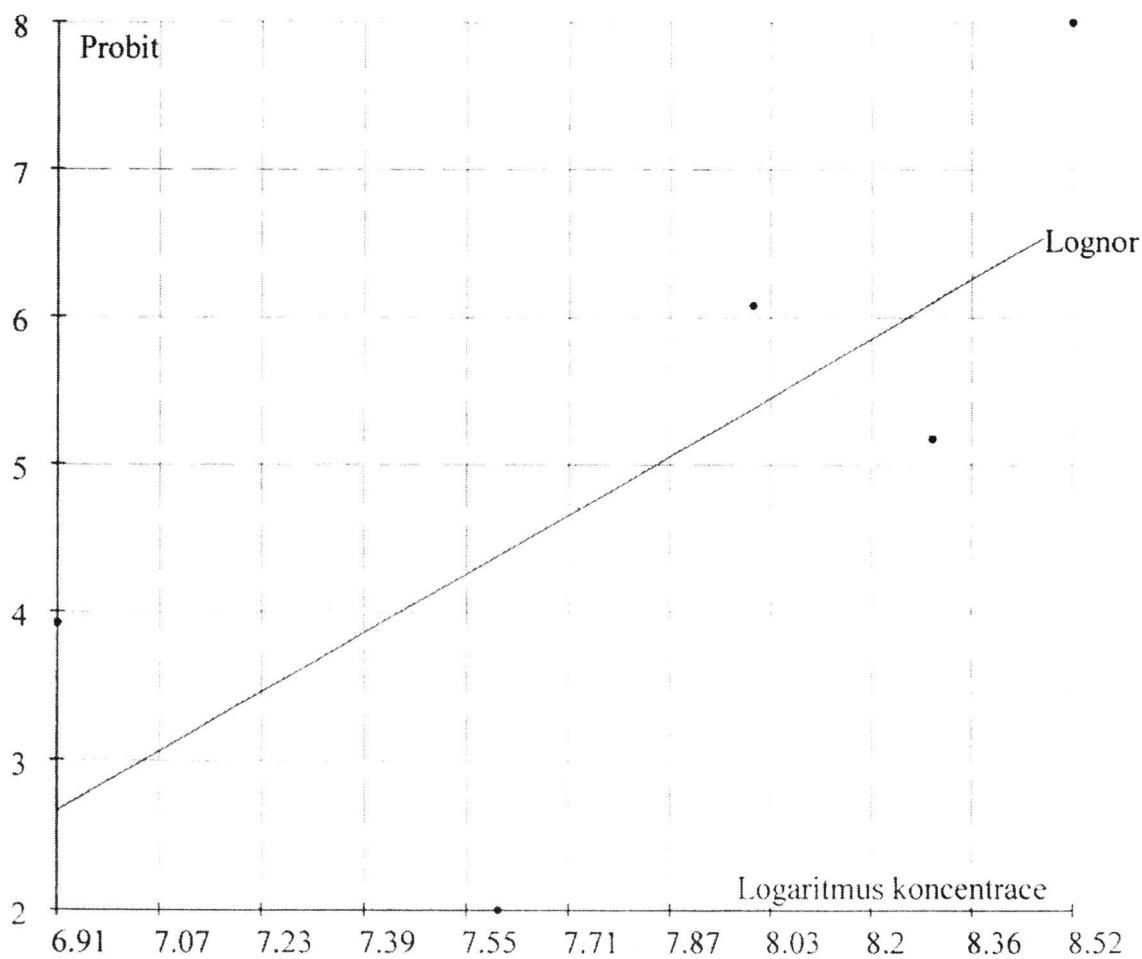
Tabulka 6 Výsledky základního testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb	
		ks				Σ		Hmotnost g	Délka mm
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%		
1	1000	1	0	0	0	1	14,3	4,4	61
2	2000	0	0	0	0	0	0	10,0	77
3	3000	2	2	1	1	6	85,7	7,1	69
4	4000	2	2	0	0	4	57,1	5,0	62
5	5000	3	3	0	1	7	100	5,8	69
K	0	0	0	0	0	0	0	4,5	70
								7,2	59

**Graf 4** Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*

Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Mortalita %
1000	14.0
2000	0.0
3000	86.0
4000	57.0
5000	100.0

96hLC<sub>50</sub> = 2569 mg·l<sup>-1</sup>



5.4.4. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

tabulka 7 Výsledky předběžného testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb
		ks				Σ		
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%	Délka mm
1	0,1	0	0	0	0	0	0	16
2	1,0	0	0	0	0	0	0	18
3	5,0	0	0	0	0	0	0	18
4	10,0	0	0	0	0	0	0	
5	50,0	0	0	0	0	0	0	
6	100,0	0	0	0	0	0	0	
7	200,0	0	0	0	0	0	0	
8	500,0	0	0	0	0	0	0	
9	1000,0	0	0	0	0	0	0	
K	0	0	0	0	0	0	0	

Tabulka 8 Výsledky ověřovacího testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb
		ks				Σ		
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%	Délka mm
1	1000	0	0	0	0	0	0	18
2	1000	0	0	0	0	0	0	20
3	1000	0	0	0	0	0	0	17
K	0	0	0	0	0	0	0	17

U *Poecilia reticulata* se grafické znázornění neprovádělo neboť byl zde byl zaznamenán nulový úhyn což je

**96hLC<sub>50</sub> > 1000 mg·l<sup>-1</sup>**

## 5.5. Výsledky testů přípravku NEOCIDOL 600 EC

### 5.5.1. Vyhodnocení testů inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus*

Tabulka 9 Výsledky předběžného testu

Číslo baňky	Nominální koncentrace	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)			Teplota °C				pH	
		24 hodin	48 hodin	72 hodin	0	24	48	72	0	72
	mg·l <sup>-1</sup>									
1	0,1	13	66	257	23,0	26,0	26,5	26,5	7,79	9,28
2	0,5	17	94	387	23,0	26,0	26,5	26,5	7,77	9,20
3	1,0	12	103	362	23,0	26,0	26,5	26,5	7,75	9,20
4	5,0	13	41	264	23,0	26,0	26,5	26,5	7,75	9,17
5	10,0	5	4	33	23,0	26,0	26,5	26,5	7,66	8,25
6	50,0	4	6	1	23,0	26,0	26,5	26,5	7,64	7,94
K1	0	22	86	371	23,0	26,0	26,5	26,5	7,84	9,32
K2	0	19	77	344	23,0	26,0	26,5	26,5	7,84	9,32

Počáteční hustota řasové suspenze: 10290 buněk · ml<sup>-1</sup>

Tabulka 10 Výsledky základního testu

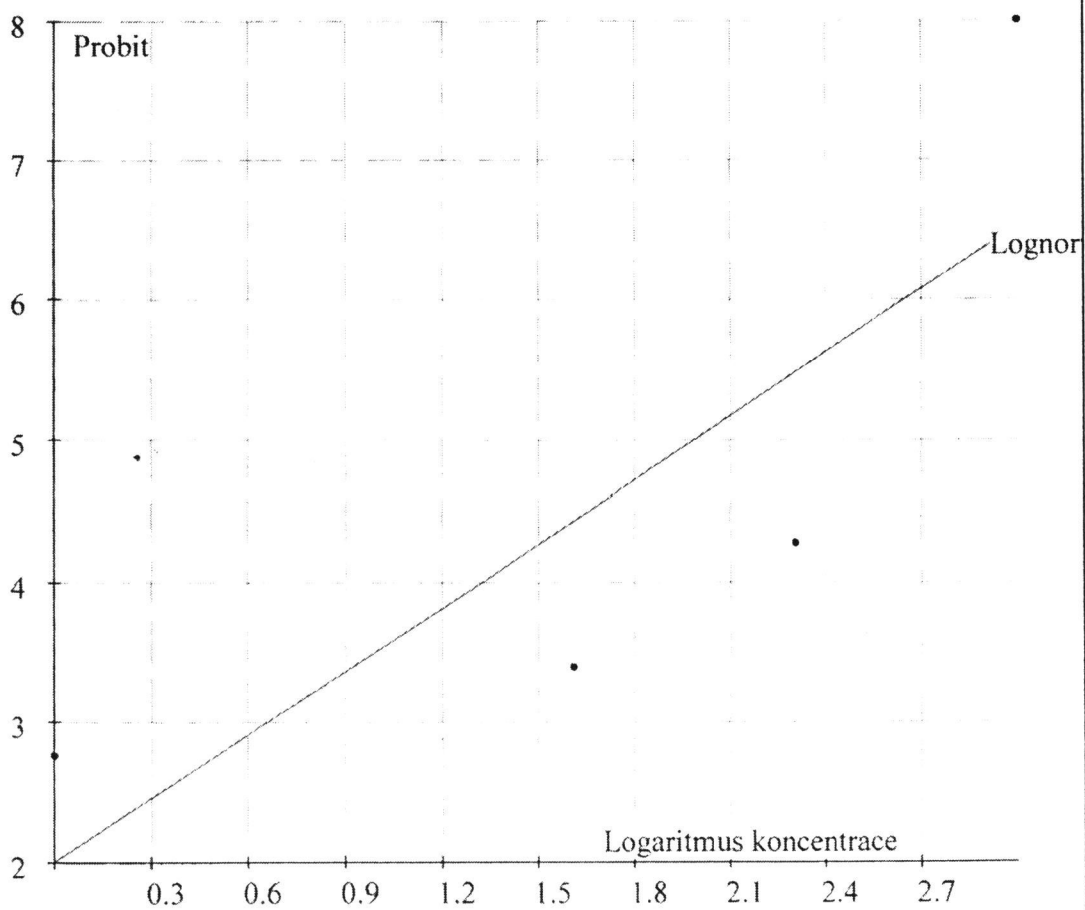
Číslo baňky	Nominální koncentrace	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)			Teplota °C				pH	
		24 hodin	48 hodin	72 hodin	0	24	48	72	0	72
	mg·l <sup>-1</sup>									
1	1,0	18	106	465	24,0	26,5	27,5	27,0	7,88	9,38
2	5,0	20	125	380	24,0	26,5	27,0	26,5	7,88	9,40
3	10,0	8	40	160	24,0	26,5	27,0	26,5	7,89	9,42
4	20,0	8	3	3	24,0	26,5	27,5	27,0	7,88	7,98
5	50,0	5	2	1	24,0	26,5	27,5	26,5	7,87	7,86
K1	0	20	111	448	24,0	27,0	27,5	26,5	7,84	9,32
K2	0	20	104	496	24,0	27,0	27,5	26,5	7,84	9,32

Počáteční hustota řasové suspenze: 10116 buněk · ml<sup>-1</sup>

Graf 6 Vyhodnocení testů inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* podle rychlosti růstu řas

Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Hustota buněk počet buněk v 1 ml	Inhibice %
kontrola	1235000	0
1	162500	1.3
5	950000	5.5
10	400000	23.5
20	7500	>100

72hlC<sub>50μ</sub> = 7.3 mg·l<sup>-1</sup>



### 5.5.2. Vyhodnocení akutního imobilizačního testu na perloočkách *Daphnia magna*

Tabulka 11 Výsledky předběžného testu

Číslo baňky	Koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Mortalita ks		Kyslík na konci testu Koncentrace $\text{O}_2$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
		24 hodin	48 hodin	
1	0,1	0	0	8,9
2	0,2	0	1	8,9
3	0,5	0	0	8,9
4	1,0	0	0	8,9
5	5,0	5	7im + 3	8,9
6	10,0	6	5im + 5	8,9
7	100,0	2	5im + 5	8,9
K1	0	0	0	8,9
K2	0	0	0	8,9

**im** – imobilizovaný jedinec

Tabulka 12 Výsledky základního testu

Číslo baňky	Koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Mortalita				Kyslík na konci testu Koncentrace $\text{O}_2$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
		24 hodin		48 hodin		
		ks	%	ks	%	
1	0,5	0 + 0	0%	0 + 0	0%	8,9
2	1,0	0 + 0	0%	0 + 0	0%	8,9
3	2,0	0 + 0	0%	10+10(im)	100%	8,9
4	3,0	2im + 2im	20%	10+10(im)	100%	8,9
5	5,0	10+10(im)	100%	10+10(im)	100%	8,9
6	7,0	10+10(im)	100%	10+10(im)	100%	8,9
7	10,0	10+10(im)	100	10+10(im)	100	8,9
K1	0	0	0%	0	0%	9,0
K2	0	0	0%	0	0%	9,0

U *Daphnia magna* se grafické znázornění neprovádělo, neboť byl zde zaznamenán ve dvou po sobě jdoucích koncentracích nulový a stoprocentní úhyn což je

$$48\text{hEC}_{50} = 1 - 2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$$



### 5.5.3. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*

Tabulka 13 Výsledky předběžného testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb	
		ks				Σ		Hmotnost g	Délka mm
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%		
1	0,5	0	0	0	0	0	0	16	47
2	1	0	0	0	0	0	0	11	42
3	10	0	0	1	1	2	66	19	49
4	20	0	3	/	/	3	100		
5	50	3	/	/	/	3	100		
6	100	3	/	/	/	3	100		
K	0	0	0	0	0	0	0		

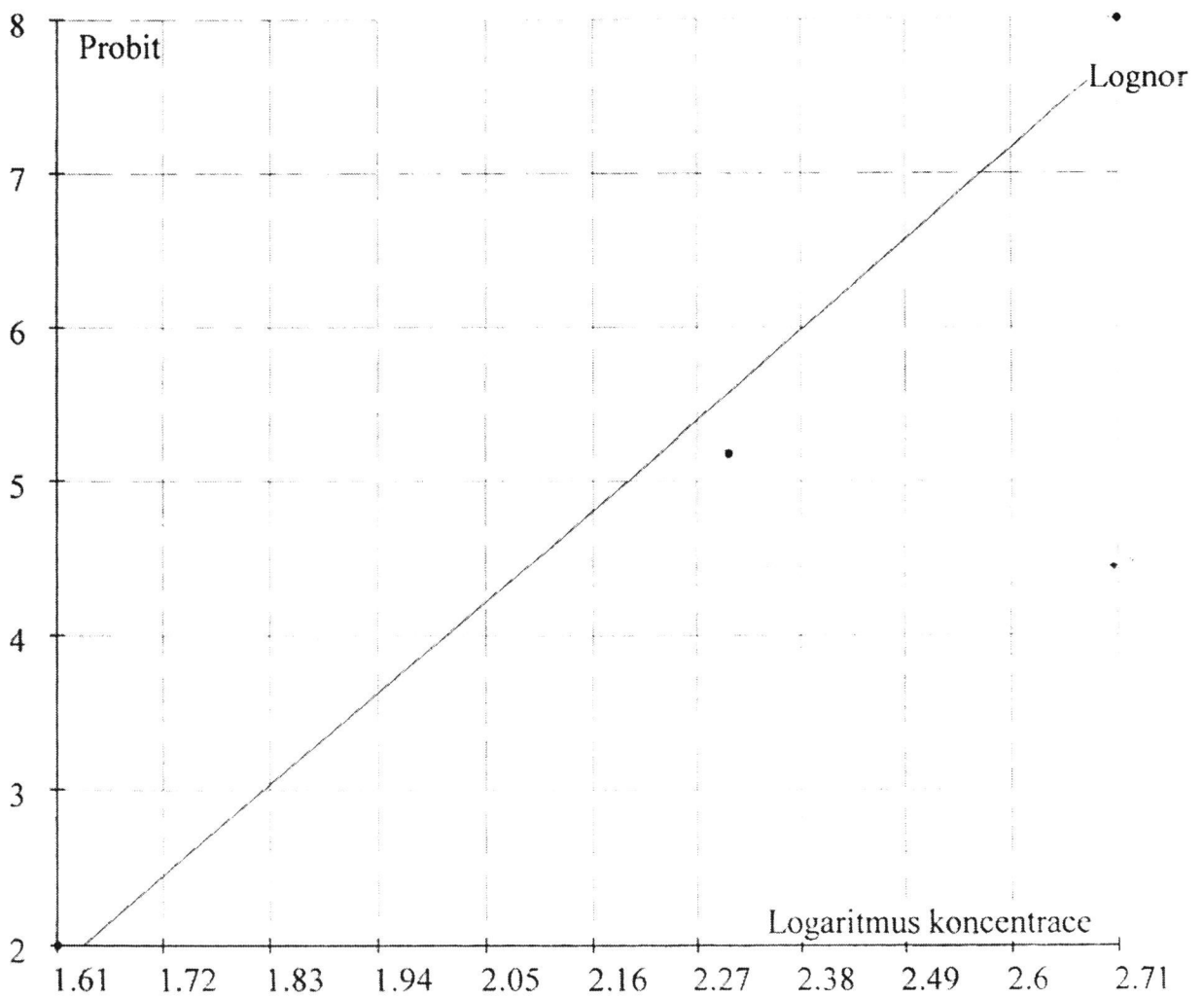
Tabulka 14 Výsledky základního testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb	
		ks				Σ		Hmotnost g	Délka mm
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%		
1	1,0	0	0	0	0	0	0	27	53
2	2,0	0	0	0	0	0	0	32	57
3	5,0	0	0	0	0	0	0	22	46
4	10,0	0	0	1	3	4	57	15	44
5	15,0	2	5	/	/	7	100	16	45
6	20,0	7	/	/	/	7	100	19	46
K	0	0	0	0	0	0	0	20	48

**Graf 7. Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss***

Koncentrace mg·l <sup>-1</sup>	Mortalita %
5	0.0
10	57.0
15	100.0

96hLC<sub>50</sub> = 9.0 mg·l<sup>-1</sup>



5.5.4. *Vyhodnocení testů akutní toxicity na rybách Poecilia reticulata*

Tabulka 15 Výsledky předběžného testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb
		ks				Σ		
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%	Délka mm
1	0,01	0	0	0	0	0	0	16
2	0,1	0	0	0	0	0	0	19
3	0,5	0	0	0	0	0	0	17
4	1,0	0	0	0	0	0	0	
5	2,0	0	0	0	0	0	0	
6	3,0	0	0	0	0	0	0	
7	5,0	0	1	0	0	1	33,3	
8	10,0	0	1	0	1	2	66,6	
K	0	0	0	0	0	0	0	

Tabulka 16 Výsledky základního testu

Číslo nádrže	Koncentrace	Mortalita						Velikost ryb
		ks				Σ		
	mg·l <sup>-1</sup>	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin	ks	%	Délka mm
1	3,0	0	0	0	0	0	0	20
2	5,0	0	0	0	0	0	0	19
3	10,0	2	2	2	1	7	100	20
4	12,0	1	3	1	1	6	86	17
5	20,0	3	3	1		7	100	17
K	0	0	0	0	0	0	0	19
								18

## 5.6. Souhrnné výsledky

Tabulka 17

Test Nomolt 15 SC	Testovací organismus	Výsledek testu mg·l <sup>-1</sup>
Test akutní toxicity na rybách	<i>Poecilia reticulata</i>	96hLC <sub>50</sub> ≥ 1000 mg·l <sup>-1</sup>
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC <sub>50</sub> = 2570 mg·l <sup>-1</sup>
Akutní imobilizační test na perloočkách	<i>Daphnia magna</i>	48hEC <sub>50</sub> = 0,0001 mg·l <sup>-1</sup>
Test inhibice růstu sladkovodních řas	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72hIC <sub>50μ</sub> = 68,5 mg·l <sup>-1</sup> 72hIC <sub>50A</sub> = 34,0 mg·l <sup>-1</sup>

Tato testovaná látka vykazuje vysokou toxicitu pro *Daphnia magna* a výrazně nižší toxicitu pro ryby *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* pro oba druhy ryb se pohybují řádově v tisících mg·l<sup>-1</sup>. Také toxicita pro *Desmodesmus subspicatus* v porovnání s je o tři řády nižší (tabulka 17).

Tabulka 18

Test Neocidol 600EC	Testovací organismus	Výsledek testu mg·l <sup>-1</sup>
Test akutní toxicity na rybách	<i>Poecilia reticulata</i>	96hLC <sub>50</sub> = 8 mg·l <sup>-1</sup>
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC <sub>50</sub> = 8,9 mg·l <sup>-1</sup>
Akutní imobilizační test na perloočkách	<i>Daphnia magna</i>	48hEC <sub>50</sub> = 0,001 – 0,002 mg·l <sup>-1</sup>
Test inhibice růstu sladkovodních řas	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72hIC <sub>50μ</sub> = 7,3 mg·l <sup>-1</sup> 72hIC <sub>50A</sub> = 4,9 mg·l <sup>-1</sup>

Provedené testy akutní toxicity na vodních organismech tedy prokázaly, že účinná látka diazinon je vysoce toxická pro *Daphnia magna*, ale pro ryby je toxicita o několik řádů nižší (tabulka 18). Také toxicita přípravku Neocidol 600 EC pro *Desmodesmus subspicatus* je o několik řádů nižší než pro hrubý dafniový zooplankton.

48hEC<sub>50</sub> pro *Daphnia magna* je o tři řády nižší (tabulka 17). Tomu též odpovídají hodnoty nalezené v literatuře, kde uvádí Tomlin (2003) toxicitu pro ryby: 96hLC<sub>50</sub> pro kapra a pstruha > 500 mg·l<sup>-1</sup>. V další dostupné literatuře se uvádí pouze označení R větami R 50/53 (Anonym, 2005)

R50 vysoce toxické pro vodní organismy LC(EC,IC)<sub>50</sub> ≤ 1 mg·l<sup>-1</sup>

R53 může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí LC(EC,IC)<sub>50</sub> ≥ 100 mg·l<sup>-1</sup>

Při vzájemném srovnání toxicity pro všechny sledované druhy vycházím z předpokladu, že je nutné zajistit ve vodě spolehlivou koncentraci pro potlačení hrubého dafniového zooplanktonu, ovšem zároveň by měla být tato koncentrace bezpečná nejnižší pro ostatní vodní organismy. Z tohoto důvodu byl udělán podíl mezi průměrnou koncentrací 48hEC<sub>50</sub> pro potlačení dafnií a mezi průměrnou koncentrací 96hLC<sub>50</sub> pro jednotlivé druhy případně třídy druhů (tabulka 19) Pokud tedy podle tohoto kritéria porovnáme námi testované přípravky (tabulka 19), jeví se příznivější pro vodní prostředí Nomolt 15 SC a to proto, že podíl mezi 48hEC<sub>50</sub> pro dafnie a mezi 96hLC<sub>50</sub>, případně 72hIC<sub>50μ</sub> pro ostatní vodní organismy je vyšší právě u tohoto přípravku.

Stejně tak při porovnání dosažených výsledků našich testů s údaji o toxicitě Diazinonu 60 EC (Máchová et al., 2003) , jsou právě pro stejnou účinnou látku (Diazinon 60 EC a Neocidol 600 EC – dimpylatum) výsledky z hlediska akutní toxicity pro ryby obou přípravků velmi podobné (tabulka 19). Ovšem vzhledem k inhibici růstu sladkovodních řas by bylo vhodnější použít přípravek Neocidol 600 EC.

Tabulka 19 – srovnání dvou námi testovaných přípravků a Diazinonu 60 EC (Máchová et al., 2003)

testovaný organismus	Neocidol 600EC		Nomolt 15SC		Diazinon 60 EC	
	koncentrace v μg l <sup>-1</sup>	podíl daphnia a ostatní	koncentrace v μg l <sup>-1</sup>	podíl daphnia a ostatní	koncentrace v μg l <sup>-1</sup>	podíl daphnia a ostatní
<i>Daphnia magna</i>	1,5	1	0,12	1	2,9	1
<i>Piscies</i>	8500	5667	1000000	8333333	17500	6034
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	6100	4067	51500	429167	5000	1724

## 7. Závěr

V rámci této práce byly testovány dva přípravky – Neocidol 600 EC a Nomolt 15 SC z hlediska jejich akutní toxicity pro vodní organismy. Provedenými testy akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna* a *Desmodesmus subspicatus* byly získány následující výsledky:

- 1) Přípravek Neocidol 600 EC vykazuje vysokou toxicitu pro *Daphnia magna* (48hEC<sub>50</sub> v rozmezí 0,001 – 0,002 mg.l<sup>-1</sup>) o tři řády nižší toxicitu pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* (96hLC<sub>50</sub> pro *Poecilia reticulata*, resp. *Oncorhynchus mykiss* je 8, resp. 8,9 mg.l<sup>-1</sup>), pro *Desmodesmus subspicatus* 72hIC<sub>50</sub> 7,3 mg.l<sup>-1</sup>.
- 2) Přípravek Nomolt 15 SC vykazuje vysokou toxicitu pro *Daphnia magna* (48hEC<sub>50</sub> v rozmezí 0,0001 mg.l<sup>-1</sup>) a výrazně nižší toxicitu pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* (96hLC<sub>50</sub> pro oba druhy ryb se pohybují řádově v tisících mg.l<sup>-1</sup>).

Na základě dosažených výsledků je vhodné doporučit jak přípravek Neocidol 600 EC, tak především Nomolt 15 SC k dalšímu testování jako možné náhrady přípravku Diazinon 60 EC, který se v současné době využívá v rybářské praxi k tlumení nadměrného rozvoje hrubého dafniového zooplanktonu.

## 8. Literatura:

1. ANONYM, 2005: online březem 2006:<http://www.pesticideinfo.org>
2. BESH, W.K et al., 1987: A biological monitoring systém employing rheotaxis of fish 68 pp.
3. CORBETT, J.R., 1974: The biochemical mode of action of pesticides. Academic press, London, 165pp. Ex. CREMLYN, R. 1985: Pesticidy. SNLT Praha, 244s.
4. CREMLYN, R. 1985: Pesticidy. SNLT Praha, 244s.
5. ČÍTEK, J., SVOBODOVÁ, Z., TESARČÍK, J. 1998: Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Informatorium, Praha, 218 pp.
6. ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan(*Teleostei*, *Cyprinidae*)). Část 1 : Obnovovací metoda. 1999: ČNI Praha, 16s.
7. DIRECTIVE 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to veterinary medicinal products.
8. EISLER, R. 1986: Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv., Biol. Rep. 85: 37 pp.
9. ETO, M. 1974: Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry. CRC press, Cleveland, Ohio, Ex. CREMLYN, R. 1985: Pesticidy. SNLT Praha, 244s.
10. FLEMING, W.J., BRADBURY, S.P. 1981: Recovery of cholinesterase activity in mallard ducklings administered organophosphorus pesticides. Toxicol. Environ. Health 8:885-897
11. FUKUTO, T.R., SIMS, J.J. 1971: Metabolism of insecticides and fungicides. Decker, NY, pp 145.
12. GALLO, M.A., LAWRYK, N.J. 1991: Organic phosphorus pesticides. Academic Press, New York, 5-3. Ex. The extension toxicology network. PIPs. [extoxnet@ace.orst.edu](mailto:extoxnet@ace.orst.edu)
13. GIDDINGS, J.M., BIEVER, R.C., ANNUNZIATO, M.F., HOSMER, A.J. 1996: Effects of diazinon on large outdoor pond microcosms. Environ. Toxicol. Chem. 15: 618-629
14. Good Clinical Practice for the Conduct of Clinical Trials on Veterinary Medicinal Products in the European Union.

15. HARTMAN, P., PŘIKRYL, I., ŠTĚDRONSKÝ, E., 1988: Hydrobiologie, SZN Praha, 314 s.
16. HAYES, W.J., Laws, E.R. 1990: Handbook of pesticide toxicology. General principles. Academic press, Inc., NY, vol.1. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
17. HOWARD, P.H. 1991: Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, 3: 5-13. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
18. KANAZAWA, J. 1978: Bioconcentration ratio of diazinon by freshwater fish and snail. BULL. Environ. Contam. Toxicol. 20:613-617
19. KEIZER, J., D' AGOSTINO, G., VITTOZZI, L. 1991: The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. 1. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rerio*). Aquat. Toxicol. 21: 239 - 254
20. KIDD, H., JAMES, D.R. 1991: The agrochemicals handbook. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, 5-14pp. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
21. LOOMIS, T.A. 1995: Essentials of toxicology, Lea and Febiger, Philadelphia, PA.,
22. MÁCHOVÁ, J., FAINA, R., SVOBODOVÁ, Z., RANDÁK, T. 2003: Toxikologické hodnocení přípravku Diazinon 60EC
23. MARTIN, H., WORTHING, C.R. 1974: Pesticide manual, British Crop Protection Council 408 pp.
24. MEISTER, R.T. 1992: Farm chemicals handbook 1992. Meister publishing company, Willoghby. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
25. METCALF, R.L. 1971: Chemistry and biology of pesticides. Decker, NY, pp1, Ex. CREMLYN, R. 1985: Pesticidy. SNLT Praha, 244s.
26. NAVRÁTIL, S., SVOBODOVÁ, Z., LUCKÝ, Z. 2000: Choroby ryb. Ediční středisko VFU, Brno. 155 s.
27. NORMA OECD: pokyn č. 204 Test dlouhodobé toxicity na rybách, 14denní studie.
28. OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test. 1992: 9pp.



29. OH, H.S., LEE, S.K., KIM Y.H., ROH, J.K. 1991: Mechanism of selective toxicity of diazinon to killifish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. 14: 343- -353
30. ON 46 6807 „Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočišných“. 1989: ÚNM Praha, 31s.
31. PISKAČ, A., KAČMÁR, P., KOLEKTIV 1985: Veterinární ekotoxikologie. SZN, Praha, s.110-116
32. PITTER, P., 1999: Hydrochemie, VŠCHT, Praha, 568 s.
33. RAY, D.E. 1991:Pesticides derived from plants and other organism. Handbook of pesticide toxicology, Classes of pesticides, Academic press, Inc., NY, vol.2. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
34. Seznam registrovaných prostředků na ochranu rostlin 2004. SRS v Agrospoj, Praha, 168 s.
35. SVOBODOVÁ, Z. A FAINA, R., 1984: Metodika použití Soldepu v rybářství. VÚRH Vodňany, 12 s.
36. SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J., 2000: Ekotoxikologie. Praktická cvičení, část II. VFUT Brno 2000, 70s.
37. SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VESELÝ, B., MODRÁ, H., SVOBODA, M., a kol 2003: Veterinární toxikologie – Praktické cvičení, část I., Brno 105 s.
38. SVOBODOVÁ, Z., VYKUSOVÁ, B., GROCH, L. 1998: Pesticides and fish poisoning. *Agrochemicals and Animal Poisoning: Towards Toxicovigilance*, IUTOX – Satellite Meeting, Lyon, 7 pp.
39. SVOBODOVÁ, Z., BEKLOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, D., LUKAVSKÝ, J., MÁCHOVÁ, J., MARŠÁLEK, B., MODRÁ, H., PIKULA, J. 1995: Zkušební metody pro stanovení ekotoxikologických vlastností látek., Část A – Metody stanovení toxicity. VÚRH Vodňany, 80s.
40. THE EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. PIPs., internetové stránky extoxnet@ace.orst.edu
41. THE RULES GOVERNING MEDICINAL PRODUCTS in the European Union, (Volumes 5— 9), Efficacy of veterinary medicinal products for use in farmed aquatic species.
42. TOMLIN,C., 2003: The Pesticide manual, British Crop Protection Council, 1344pp.

43. U.S. environmental protection agency, 1995: Fact sheet number 171 : Karate (PP 321), Washington, DC, Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
44. U.S. Public Health Service. 1995: Hazardous substance data bank., Washington, DC, 5-8. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
45. VYHLÁŠKA MZe ČR č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat
46. VYHLÁŠKA Mze ČR č.84/1997 SB, kterou se upravuje registrace přípravků na ochranu rostlin a zacházení s nimi a technické a technologické požadavky na mechanizační prostředky na ochranu rostlin a jejich kontrolní testování
47. VYHLÁŠKA o správné klinické praxi č. 472/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů.
48. WORTHING, C.R. 1987: The pesticide manual: A World Compendium. British crop protection council, 8th edition. Ex. The extension toxicology network. PIPs. extoxnet@ace.orst.edu
49. Zákon č. 79/1997 Sb., O léčivech.
50. Zákon č.246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání

## 9. Použité definice a zkratky

- **Adaptace ryb:** přizpůsobení ryb podmínkám testu
- **EC<sub>50</sub>:** efektivní koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna*
- **24hEC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 24±2 hodin
- **48hEC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 48±2 hodin
- **LC:** letální koncentrace
- **LC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích ryb
- **24hLC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích ryb v časovém úseku 24±2 hodin
- **48hLC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích ryb v časovém úseku 48±2 hodin
- **96hLC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích ryb v časovém úseku 96±2 hodin
- **Hustota řasové kultury:** počet buněk v 1 ml
- **IC<sub>50</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou
- **72hIC<sub>50μ</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50% inhibici růstové rychlosti řasové kultury v časovém úseku 72±2 hodin ve srovnání s kontrolou
- **72hIC<sub>50A</sub>:** koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50% inhibici růstu sladkovodní řasy v časovém úseku 72±2 hodin ve srovnání s kontrolou, zjištěnou na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami
- **Imobilizace *Daphnia magna*:** makroskopicky pozorovatelná neschopnost samostatného prostorového pohybu *Daphnia magna* do 15 s po krouživém

zamíchání lázně. Jako imobilizované organizmy hodnotíme např. i jedince, kteří pohybují tykadly 2. páru, ale výše uvedeného samostatného pohybu nejsou schopny.

- **Inhibice růstu řas:** snížení růstu zjištěné na základě rychlosti růstu řas nebo na základě ploch pod růstovými křivkami ve srovnání s kontrolou
- **Inokulum:** množství buněk vložených do testovacích baněk na začátku testu, vyjádřené jako hustota řasové kultury na počátku testu (počet buněk v 1 ml)
- **Koncentrace látky:** hmotnost látky rozpuštěné v ředící vodě doplněné do 1 litru ředící vodou ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- **Kontrola:** ředící voda (v testech na řasách standardní živný roztok) s testovacími organizmy bez testovaného vzorku
- **Limitní test:** provádí se s koncentrací  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  testovaného vzorku, aby se prokázalo, že hodnota  $\text{LC}(\text{EC}, \text{IC})50$  tohoto vzorku je větší, než uvedená koncentrace ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- **Lognor:** označení křivky v grafu, která byla aproximována distribuční funkcí logaritnicko – normálního rozdělení
- **LOEC:** nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)
- **Min – max:** variační rozpětí
- **NOEC:** nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)
- **Ověřovací test:** test k ověření výsledku úvodního testu, provádí se s neředěným vodným výluhem odpadu
- **Probitová analýza:** analýza dat, určených relativní četností uhynulých jedinců v závislosti na koncentraci, resp. na jejím logaritmu, přičemž se esovitá regresní křivka aproximuje distribuční funkcí normálního rozložení
- **Probit :** statistická jednotka, P- procentní kvantyl normovaného normálního rozdělení
- **Předběžný test:** test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací testovaného vzorku

- **Přírůstek řasové kultury:** změna hustoty řasové kultury zjištěná za určitý časový interval
- **Rychlost růstu řasové kultury:** vyjádření přírůstku hustoty buněk za určitý časový interval
- **Ředící voda:** voda připravená podle ČSN EN ISO 7346, nebo voda pitná, která je zbavená chloru probubláváním vzduchem po dobu 24 hodin. Pro testy toxicity na řasách je ředící vodou standardní živný roztok.
- **Standard:**  $K_2Cr_2O_7$  p.a. - kontrolní látka, u níž je opakovaně určována hodnota LC(EC,IC)50 (tzv. vnitřní kontrola laboratoře). Změny LC(EC,IC)50 standardu odrážejí variabilitu podmínek testu a kondice testovacích organismů.
- **Stimulace růstu řas:** zvýšení růstu řas zjištěné na základě rychlosti růstu řas nebo na základě ploch pod růstovými křivkami ve srovnání s kontrolou
- **Základní test:** test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu LC(EC,IC)50. Sestává zpravidla z 6 až 10 různých koncentrací testovaného vzorku v rozmezí stanoveném předběžným testem.

## **10. Přílohy**

### **Příloha 1**

**Doporučené postupy pro chovy testovacích organismů chov  
ryb *Poecilia reticulata***

### **Příloha 2**

**Chov perlooček *Daphnia magna***

### **Příloha 3**

**Udržování řasové kultury a adaptace na pokusné podmínky**

## Příloha 1

### Doporučené postupy pro chovy testovacích organizmů

#### Chov ryb

##### Poecilia reticulata

K testům se používají rybky z vlastního chovu nebo od stabilních chovatelů - akvaristů. Živorodky se chovají v akváriích o objemu nad 10 litrů při teplotě vody 25 až 28 °C, teplota nesmí dlouhodobě poklesnout pod 16 °C . Voda v akváriích se mírně aeruje. Samečci se zřetelně odlišují od samic. Oplozená samička je nápadná zvětšeným bříškem, na jeho bocích a na spodku se v blízkosti řitní ploutve nachází tmavě zbarvená skvrna březosti – „zárodečná“ skvrna. Samičky rodí podle věku a zdravotního stavu 10 až 100 mladých, doba březosti trvá v průměru 4 týdny při teplotě vody 25 °C. Samička vypuzuje z těla jikry s úplně vyvinutými mlád'aty, která ihned po vypuštění z těla matky protrhnou blánu jikry, plavou a jsou schopna přijímat i větší potravu. Pro zdárný vývoj však potřebují i potravu rostlinnou. Plůdek je možno krmit jak živou potravou (nitěnky, perloočky), tak i vhodnou krmnou směsí. Potrava nesmí být jednotvárná, doporučuje se, aby převažovaly živé nitěnky. Chovné hejno v přirozeném poměru pohlaví je chováno odděleně od potomstva. Vzhledem k tomu, že páření může nastat již u velmi mladých jedinců, je nutné oddělit samce od samic co nejdříve a ponechat je až do doby jejich řádného vzrůstu a zesílení oddělené. Rybky pohlavně dospívají během 3 až 4 měsíců. Oplodněné samičky se značně zvětšeným bříškem a tmavou skvrnou březosti se oddělují od chovu a dávají se do tzv. porodnic (nádoby o objemu 1 až 5 litrů s možností úkrytů narozených ryb), po porodu se ihned samička od mlád'at oddělí a po uplynutí 2 až 3 dnů se opět zařazuje do chovné nádrže. Chovné nádrže je nutno minimálně jedenkrát týdně zbavit usazenin. (OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992, 9 pp.)

## Příloha 2

### Chov perlooček *Daphnia magna*

#### Životní cyklus perlooček

Po většinu roku dochází u druhu *Daphnia magna* k partenogenetickému rozmnožování. Znamená to, že z partenogenetických, tzv. letních vajíček se líhnou pouze samičky. K líhnutí samečků, a poté k pohlavnímu rozmnožování, dochází při nástupu nepříznivých životních podmínek. Pohlavním rozmnožováním vznikají oplozená, tzv. zimní, nebo-li efipialní vajíčka, která jsou na rozdíl od letních vajíček pouze 2 a jsou uložena v tmavém pouzdře - efipiu.

#### Chov perlooček

Podmínky chovu nejsou jednoznačně stanoveny. Pro zajištění kvalitní partenogenetické reprodukce mohou být použity různé metody odchovu. Doporučuje se např. tento postup:

Několik skleněných nádob, (např. 0,75 l potravinářských lahví OMNIA), se naplní přibližně do poloviny vodou přirozeného původu (rybník, studna, potok apod.), která není kontaminována cizorodými látkami a nepůsobí nepříznivě na dafnie. Je vhodné vodu nejdříve předběžně vyzkoušet v pokusném odchovu v malém měřítku. Lze použít i několik dní odstátou a vápenatých povlaků zbavenou vodu vodovodní.

Do každé nádoby se přenese po 10 až 20 ks samiček *Daphnia magna* z prosperujícího laboratorního chovu nebo z přirozené lokality. Jestliže začínáme pracovat s dafniemi z přirozené lokality, je nutné selektovat samičky následujícím způsobem: Na podložní sklíčko se přenese několik kusů dafnií a mikroskopicky se určí, zda se jedná o druh *Daphnia magna*. Dospělé samičky s vajíčky umístíme do nádoby, kde je dále popsáním způsobem krmíme. Z uvolněných mlád'at zakládáme další chov. Prohlídkou pod mikroskopem překontrolujeme, zda všichni nasazení jedinci jsou samičky. Získáme-li z přírodního chovu mladé jedince, též mikroskopicky zkontrolujeme jejich pohlaví a samečky vyřadíme. Vhodné je prohlédnout též část jejich potomstva, určenou pro nasazení do chovu. Samečkové se mohou dostat do chovu při rutinním přesazování mlád'at z degradujícího chovu, kde se již určité množství samečků



může vyskytovat. Dospělého samečka poznáme podle odlišného chování: sameček prudce plave a snaží se přichytit na samičky, přichycuje se i na stěny nádob. Má též odlišný tvar těla. Mladé samečky lze s jistotou poznat podle dlouhých tykadélek pouze mikroskopicky. Samičky je nutno selektovat následujícím způsobem: Na podložní sklíčko se přenese několik ks dafnií a mikroskopicky, při malém zvětšení, např. 6x10, se určí samečkové - u samiček tykadélka nepřesahují rypec, zatímco u samečků tykadélka rypec výrazně přečnívají.

Při mikroskopování perlooček postupujeme takto: trubičkou odchytíme 3 až 4 kusy dafnií, které kápneme na čisté podložní sklíčko a přebytečnou vodu odsajeme ke sklíčku kolmo postavenou trubičkou. Tím dafniím znemožníme aktivní pohyb a můžeme je poměrně snadno prohlédnout. Po prohlédnutí a vyřazení nevhodných jedinců zbylé dafnie spláchneme do nádoby.

Nasazené dafnie je nutné ihned začít krmit, nejlépe suspenzí čerstvých, lyofilizovaných nebo sušených řas. Suspenze řas se dává do sklenic do vzniku slabě nazelenalého zákalu vody. Sušené a lyofilizované řasy dodává Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň – Opatovický mlýn. Dávky krmiva nesmí být příliš velké, aby nedocházelo k tvorbě zahnívajících sedimentů na dně nádob. Vhodnější je krmení v malých dávkách a kratších intervalech (např. dvakrát denně). Před dnem pracovního volna je možno dávky zvýšit, ale poté je třeba kontrolovat čistotu nádob. Pro krmení se osvědčila příprava zásobní koncentrované suspenze řas na 3 až 4 krmné dny, kterou uchováváme v chladu, mírný silážní zápach není na závadu. Při nedostatečném krmení se objevují samečci a samičky s efípií. Při překrmování nebo krmení nevhodným krmivem bývají kultury napadány plísněmi. Napadené kultury je nutné ihned odstranit a umyté nádoby dezinfikovat 4% formaldehydem.

Zásadní podmínkou prosperujícího chovu je udržování perlooček ve fázi partenogenetického rozmnožování (rodí se pouze samičky). Tohoto stavu lze docílit pravidelnou inokulací čerstvě narozených mlád'at z předchozí generace. Perloočky jsou pravidelně (3x týdně) přelévány přes sadu planktonních sítok o různé velikosti ok. Jedinci zachycení na jednotlivých sítkách se okamžitě spláchnou původním médiem do jednotlivých lahví. Obnovené médium, ve kterém jsou perloočky dále chovány, je tvořeno z jedné třetiny původním médiem, z jedné třetiny ředící vodou připravenou dle ISO 6341 a z jedné třetiny odstátou vodovodní vodou, zbavenou vápenatých povlaků. Tímto způsobem je docílena separace nejstarších, největších samiček, samiček

středně velkých a nejmladších (ve stáří do 24 až 48 hodin). Vyprázdněné dospělé samice jsou vraceny do chovu, juvenilní jedinci ve stáří do 24 hodin mohou být nasazeni do testů toxicity nebo jsou využiti pro kontinuální regeneraci chovu. Tím se získá záruka relativně synchronního chovu. Z 10 nasazených samic je možno počítat se ziskem 150 až 300 mladých jedinců *Daphnia magna* (dle velikosti mateřských organismů). Při teplotě vody 20 až 22 °C a dostatečném krmení bývá interval od inokulace jednodenních samic do odběru mladých perlooček do testů zhruba deseti až čtrnáctidenní. Při použití vyprázdněných dospělých samic z předchozího chovu lze získat použitelné mladé jedince zhruba za týden. (ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. ČNI Praha, 1997, 16 s.)

#### Počítání perlooček

Počítání perlooček do chovných či testovaných roztoků se provádí následujícím způsobem: K odlovu dafnií se používají plastové pipety nebo skleněné trubičky světlosti 2 až 4 mm podle velikosti dafnií, opatřené pipetovacím balónkem. Při přenosu dbáme, aby nedošlo k mechanickému poškození těl perlooček. Perloočky vysazujeme do vytemperovaných roztoků (bez bublinek), aby nedošlo k vniknutí vzduchu pod skořápky perlooček. Manipulační nádoby i trubičky udržujeme v úzkostlivé čistotě, neboť i nepatrná kontaminace některým toxikantem může likvidovat chov. (OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. (Draft Updated Guideline, July 1999) Testy akutní toxicity

## Příloha 3

### Udržování řasové kultury a adaptace na pokusné podmínky

Jednodruhové řasové kmeny se po několika generacích kultivují v definovaném živném médiu (toto médium je zde ředící vodou), které obsahuje koncentrační řadu testované látky. Udržování kmenové kultury se provádí na šikmém 1,5% agaru ve standardním živném médiu, na nepřímém denním světle při laboratorní teplotě, přeočkovává se 1x za 2 měsíce

zásobní kultury se pěstují ve 250 až 300 ml Erlenmayerových baňkách se 100 ml standardního živného media, za stejných podmínek jako udržovací kmenová kultura. Předkultivace se provádí v termoluminostatu za stejných podmínek jako vlastní test (Svobodová et al., 2003)

#### Řasové inokulum

Pro testy se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury. Pro kultivaci této kultury se použije živný roztok připravený smícháním 1 objemového dílu zásobního roztoku živin s 8 díly vody. Přidá se takový objem zásobní řasové kultury, aby při desetinásobném zředění živným roztokem dosahovala hustota buněk řádově  $10^4$  v 1 ml. Inokulační kultura se udržuje po dobu 3 dnů za podmínek testu a poté se použije pro inokulaci.

#### Příprava inokula

Řasová suspenze v živném roztoku se nechá usadit, horní čirá vrstva živného roztoku se slije. Tím se řasová suspenze zahustí a v počítací komůrce se stanoví její hustota. Výpočtem se určí objem řasové suspenze, kterým se inokuluje koncentrační řada a kontrola.

#### Počítání řas v Bürkerově počítací komůrce

Počítají se řasy v 50 velkých čtvercích a výsledná hodnota se násobí číslem 5000. Tím se získá počet buněk v 1 ml řasové suspenze.

Je zde určité pravidlo jak počítat v komůrce je třeba spočítat minimálně 400 buněk v jakémkoli množství velkých čtverců. Pokud 400 buněk nenapočítáme ani v 50 velkých čtvercích, počítáme buňky ve 100 čtvercích a výsledný počet násobíme hodnotou 2 500.

Při počítání buněk ve velkých čtvercích dodržujeme obecně platnou zásadu, tzn. počítáme buňky uvnitř velkého čtverce a ty, které se dotýkají (vně i uvnitř čtverce) horní a pravé strany čtverce (obrázek 15 ).

#### Výpočet potřebného objemu inokula

V počítací komůrce se stanoví hustota kultury z předkultivace. Testovací i kontrolní roztoky se naočkují stejným množstvím řasové suspenze tak, aby po naočkování bylo ve všech testovacích i kontrolních kulturách  $10\,000 \pm 2\,000$  buněk v 1 ml. Výpočet množství inokulační suspenze  $x$  přidávané k testovanému roztoku  $V$  se provádí následujícím způsobem:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}$$

$x$  je potřebný objem inokula v ml

$c$  je požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu (počet buněk v 1 ml)

$V$  je množství testovaného roztoku v ml

$a$  je hustota inokulační kultury (počet buněk v 1 ml)

Stanovený objem řasové suspenze  $x$  dávkujeme do připravené koncentrační řady a do kontroly.

#### Kultivace

Kultivace se provádí u pokusné i kontrolní baňky uzavřené parafínem a umístěné do termoluminostatu.

#### Stanovení hodnoty $IC_{50}$ pomocí integrálů biomasy

Základem pro výpočet hodnoty  $IC_{50}$  jsou růstové křivky řasové kultury sestavené pro jednotlivé koncentrace, které se porovnávají s kontrolou.

Stanovení inhibice růstu je založeno na porovnání ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a v testovaných vzorcích (integrály biomasy).

#### Stanovení hodnoty $IC_{50}$ pomocí růstových rychlostí

Výpočet inhibice růstu může být také založen na porovnání růstových rychlostí  $\mu$  řasové kultury v testovaných roztocích a v kontrole:

Z vypočtených hodnot  $\mu$  pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice (případně stimulace)  $I_i$  v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

#### **Výpočet hodnoty $IC_{50}$**

- koncentrace látky, kde došlo k inhibici růstu se vyjádří v logaritmických hodnotách
- do tabulky se sestaví hodnoty  $I_{Ai}$ , příp.  $I_{\mu_i}$  proti odpovídajícím koncentracím testované látky
- získané hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je  $\log c$  (osa x), závisle proměnnou inhibice růstu  $I_{Ai}$  nebo  $I_{\mu}$ , (osa y)
- získanými body se proloží metodou nejmenších čtverců přímka
- z průsečíku proložené přímky a souřadnice inhibice 50 % se spustí kolmice na osu x a odečte se  $\log IC_{50}$
- odlogaritmováním hodnoty  $\log IC_{50}$  se získá hodnota  $IC_{50A}$  ( $IC_{50\mu}$ )

