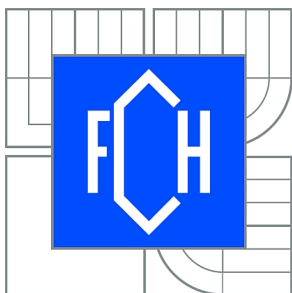




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## VYUŽITÍ ORGANISMU DAPHNIA MAGNA V TESTECH EKOTOXICITY

UTILIZATION OF ORGANISM DAPHNIA MAGNA IN ECOTOXICITY TESTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUCIE WINKLEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ  
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0561/2010** Akademický rok: **2010/2011**  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Student(ka): **Bc. Lucie Winklerová**  
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)  
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Využití organismu Daphnia magna v testech ekotoxicity

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracování literární rešerše týkající se akvatických testů ekotoxicity se zaměřením na organismus Daphnia magna
- 2) Výběr látek ze skupiny anorganických sloučenin a pesticidů pro účely ekotoxikologického testování na Daphnia magna
- 3) Posouzení ekotoxicity testovaných látek

### Termín odevzdání diplomové práce: 20.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Lucie Winklerová  
Student(ka)

-----  
MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá testy ekotoxicity vybraných látek používaných v zemědělství a zahradnictví. Jedná se o určení akutní i chronické toxicity vybraných komerčně prodávaných herbicidů, a to konkrétně výrobků Finalsan od firmy W.Neudorff GmbH KG (účinná látka kyselina nonanová) a Dominátor od firmy Dow AgroSciences s.r.o. (účinná látka isopropylaminová sůl glyfosátu) a v zemědělství běžně používaných hnojiv – dusičnanu draselného a dusičnanu sodného, označované také jako ledky. Dále také byl proveden chronický test dichromanu draselného, který je pro akvatické prostředí velice toxický a je v akutních testech používán jako standard. Testy byly prováděny z hlediska účinků na akvatický systém, a to z důvodu velmi dobré rozpustnosti vybraných látek ve vodě. Testy byly prováděny na organismu *Daphnia magna*.

## **ABSTRACT**

This thesis deals with ecotoxicity tests of selected substances used in agriculture and horticulture. It is focused on the determination of acute and chronic toxicity of selected herbicides. These herbicides are sold commercially, specifically Finalsan (active substance is nonanoic acid), the product of Neudorff GmbH KG company, and Dominator (active substance is glyphosate, isopropylamine salt) by Dow AgroSciences Ltd. Next tested substances are potassium nitrate and sodium nitrate - common agricultural fertilizers. Potassium dichromate was also tested. Potassium dichromate is very toxic for aquatic environment and it is used as the standard in acute tests. Tests were carried out in terms of effects on aquatic systems, due to very good solubility in water of selected substances. The tests were performed on the organism *Daphnia magna*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

zooplankton, akutní testy, chemický účinek, chronické testy, ekotoxicita, *Daphnia magna*

## **KEYWORDS**

zooplankton, acute tests, chemical effect, chronic tests, ecotoxicity, *Daphnia magna*

WINKLEROVÁ, L. *Využití organismu Daphnia magna v testech ekotoxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 65 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za její cenné rady a odborné vedení při zpracovávání diplomové práce. Také děkuji své rodině a svým nejbližším za podporu při studiu.

## OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Úvod</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>2. Teoretická část</b> .....   | <b>8</b>  |
| 2.1. Ekotoxikologie .....   | 8         |
| 2.2. Ekotoxikologické biotesty .....  | 8         |
| 2.2.1. Akvatické testy toxicity .....                                       | 9         |
| 2.2.2. Terestrické testy toxicity .....                                     | 9         |
| 2.2.4. Ekotoxikologické hodnocení látek .....                               | 9         |
| 2.2.5. Rozdělení ekotoxikologických biotestů dle doby expozice .....        | 10        |
| 2.2.5.1. Akutní testy .....   | 10        |
| 2.2.5.2. Subchronické testy .....   | 10        |
| 2.2.5.3. Chronické testy .....  | 10        |
| 2.2.6. Další možnosti dělení ekotoxikologických biotitů .....               | 11        |
| 2.2.7. Standardní testy ekotoxicity .....                                   | 11        |
| 2.2.8. Testy fytoxicity .....   | 12        |
| 2.2.9. Alternativní testy ekotoxicity .....                                 | 12        |
| 2.3. Související legislativa .....  | 13        |
| 2.3.1. Legislativa ČR .....   | 13        |
| 2.3.2. Nitrátová směrnice .....   | 14        |
| 2.3.3. REACH .....  | 15        |
| 2.4. Organismus rodu <i>Daphnia</i> .....                                   | 16        |
| 2.4.1. Výskyt .....   | 16        |
| 2.4.2. Stavba těla .....  | 16        |
| 2.4.3. Pohyb .....  | 17        |
| 2.4.4. Dýchání .....  | 17        |
| 2.4.5. Potrava .....  | 17        |
| 2.4.6. Rozmnožování .....   | 18        |
| 2.4.7. Chov .....   | 19        |
| 2.4.7.1. Udržovací chov .....   | 20        |
| 2.4.7.2. Množicí chov .....   | 20        |
| 2.4.7.3. Přirozené médium .....   | 20        |
| 2.4.7.4. Laboratorně připravená média .....                                 | 20        |
| 2.4.8. Využití perlooček v ekotoxikologii .....                             | 22        |
| 2.4.9. Testy toxicity na organismu <i>Daphnia magna</i> .....               | 22        |
| 2.4.9.1. Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i> ..... | 24        |
| 2.4.9.2. Stanovení chronické toxicity látek pro <i>Daphnia magna</i> .....  | 24        |
| 2.4.9.3. Daphnotoxkit F <sup>TM</sup> magna .....                           | 24        |
| 2.4.9.4. <i>Daphnia</i> Toximeter .....                                     | 25        |
| 2.5. Vybrané látky testované v rámci diplomové práce .....                  | 27        |
| 2.5.1. Herbicidy .....  | 27        |
| 2.5.1.1. Izopropylaminová sůl glyfosátu (IPA-sůl GLY) .....                 | 28        |
| 2.5.1.2. Kyselina nonanová .....  | 29        |
| 2.5.2. Hnojiva .....  | 30        |
| 2.5.2.1. Dusičnany .....  | 30        |
| 2.5.3. Dichroman draselný .....   | 32        |
| <b>3. Experimentální část</b> .....   | <b>34</b> |
| 3.1. Přístroje a zařízení .....   | 34        |
| 3.2. Chov v mediu M4 a M7 – porovnání porodnosti .....                      | 34        |
| 3.1.2. Příprava médií M4 a M7 .....   | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.1.1. Použité chemikálie .....   | 34        |
| 3.1.1.2. Pracovní postup .....  | 34        |
| 3.1.1.3. Vyhodnocení .....  | 35        |
| 3.2. Akutní imobilizační test na <i>Daphnia magna</i> .....                   | 36        |
| 3.2.1. Princip zkoušky .....  | 36        |
| 3.2.2. Použité chemikálie .....   | 36        |
| 3.2.3. Postup .....   | 36        |
| 3.2.5. Validace testu .....   | 37        |
| 3.2.6. Vyhodnocení .....  | 37        |
| 3.3. Test chronické toxicity .....  | 38        |
| 3.3.1. Princip zkoušky .....  | 38        |
| 3.3.2. Použité chemikálie .....   | 38        |
| 3.3.3. Postup .....   | 38        |
| 3.3.4. Validace testu .....   | 39        |
| 3.3.5. Vyhodnocení .....  | 39        |
| <b>4. Výsledky .....</b>  | <b>41</b> |
| 4.1. Média M4 a M7 – porovnání vhodnosti pro chov .....                       | 41        |
| 4.2. Testy akutní imobilizace .....   | 42        |
| 4.2.1. Isopropylaminová sůl glyfosátu (herbicidní přípravek Dominátor) .....  | 42        |
| 4.2.2. Kyselina nonanová (herbicidní přípravek Finalsán) .....                | 43        |
| 4.2.3. Dusičnan sodný NaNO <sub>3</sub> .....                                 | 44        |
| 4.2.4. Dusičnan draselný KNO <sub>3</sub> .....                               | 45        |
| 4.3. Testy chronické toxicity .....   | 46        |
| 4.3.1. Isopropylaminová sůl glyfosátu (herbicidní přípravek Dominátor) .....  | 47        |
| 4.3.2. Kyselina nonanová (herbicidní přípravek Finalsán) .....                | 48        |
| 4.3.3. Dusičnan sodný NaNO <sub>3</sub> .....                                 | 49        |
| 4.3.4. Dusičnan draselný KNO <sub>3</sub> .....                               | 50        |
| 4.3.5. Dichroman draselný K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ..... | 51        |
| <b>5. Diskuze .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>6. Závěr .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>Seznam použité literatury .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>Seznam zdrojů obrázků .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>Seznam zkratk .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>Přílohy .....</b>  | <b>65</b> |

# 1. ÚVOD

Většina chemických látek produkovaných lidskou činností skončí v akvatickém systému. Vody z domácností a průmyslu samozřejmě prochází fází čištění v čistírnách odpadních vod, ale tyto vody mohou a také obsahují látky, které nejsme ještě zcela schopni z vod odstranit, a tudíž jsou z čističek odpadních vod vypouštěny do recipientu. Další kontaminace vod je způsobena například dešťovými srážkami, při nichž dochází ke splachu chemických látek používaných v zemědělství z polí, dále pak ke splachu kontaminantů ze silnic.

V posledních několika desetiletích se frekvence produkce a tím pádem i transportu chemických látek do životního prostředí nebyvale zvedla. Je to samozřejmě dáno prudkým vývojem průmyslu a technologií v průběhu 20. století. Zejména v jeho první polovině nebylo počítáno se škodlivými účinky chemických látek, které v důsledku toho byly produkovány, používány a vypouštěny do životního prostředí bez jakéhokoli omezení. Samozřejmě, že neregulované vypouštění polutantů do životního prostředí ovlivnilo jeho kvalitu, jeho schopnost regenerace a také se projevilo v mnoha případech na kvalitě lidského života.

V dnešní době se potýkáme se znečištěním v podstatě všech složek životního prostředí. Abychom byli schopni se vyrovnat s již vzniklými problémy a popřípadě předcházet problémům novým, potřebujeme nejen nebezpečné a škodlivé látky identifikovat, ale také musíme vědět, jak velké jsou jejich účinky na živé organismy a jejich životní prostředí. K tomu využíváme testy ekotoxicity.

Z hlediska toxikologie lze považovat každou látku za potenciálně škodlivou, neboť každá v závislosti na velikosti dávky a době expozice může být toxická. Proto jsou v dnešní době chemické látky testovány, a to právě i v rámci ekotoxikologických testů. Je testována akutní i chronická toxicita chemických látek. V rámci akutní toxicity je testován krátkodobý účinek látky na vybraný organismus. Účinek se může projevit úmrtím nebo jiným stresovým chováním organismu. Pomocí chronických testů toxicity zjišťujeme dlouhodobé účinky látek na organismus, například snížení porodnosti [1].

Tato diplomová práce se zabývá chronickými i akutními testy toxicity vybraných látek, které jsou používány v zemědělství a zahradnictví. Pozornost byla soustředěna na komerčně prodávané herbicidy a běžně používaná hnojiva. Vybrané herbicidy a hnojiva byla zvolena z důvodu snadné rozpustnosti daných látek ve vodě a právě možnosti jejich jednoduchého průniku do akvatického systému. Testy byly prováděny na organismu *Daphnia magna*. Jak již bylo zmíněno, byly prováděny testy akutní i chronické toxicity. Akutní toxicita jednotlivých látek již byla testována a informace o ní byla k dispozici v bezpečnostních listech látek. Chronická toxicita však určena u daných chemikálií nebyla a to také byl důvod, proč byly dané látky testovány. Jedná se totiž o látky značně využívané a je důležité znát nejen jejich krátkodobý ale i dlouhodobý účinek.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je vědní disciplína, která se zabývá studiem toxického účinku látek přírodních i látek antropogenního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Na rozdíl od klinické toxikologie, která zkoumá účinky toxických látek na člověku, ekotoxikologie monitoruje účinky látek na různých úrovních ekosystémů. Sleduje nejen interakce mezi živými organismy a chemickými látkami, ale také se zabývá studiem transportu látek v životním prostředí. Obecně lze tedy říci, že se ekotoxikologie snaží prostřednictvím studia účinků polutantů na živé organismy najít možnost ochrany celého ekosystému, a ne pouze jeho určité části [2, 3].

Pojem ekotoxikologie použil jako první kolem roku 1969 Dr. Rene Truhaut, který byl členem francouzské akademie věd. Definoval ekotoxikologii jako „studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva“.

Historicky nejrozšířenější oblastí této disciplíny je vodní ekotoxikologie. První, kdo zaznamenal význam přítomnosti nebo absence druhů a společenstev v akvatickém prostředí byl Forbes (1887). Navrhl klasifikaci řek do zón znečištění podle jejich biodiverzity. Přibližně v té době také byly provedeny první testy akutní toxicity průmyslových odpadních vod [3].

### 2.2. Ekotoxikologické biotesty

Testy toxicity slouží ke zjištění či odhadu možného toxického účinku testovaných látek na živé organismy. Ekotoxikologické testy se rovněž využívají při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách. Podstatou ekotoxikologické práce jsou biotesty s živými organismy či organismálními systémy. Pojem biotesty je používán z toho důvodu, že se jedná o testy prováděné na živých systémech (buňkách, orgánech, ekosystémech atd.).

Biotest je proces, při kterém dochází k vystavení testovacího systému (buňka, organismus, ekosystém apod.) působení chemické látky, směsného nebo přírodního vzorku v různých koncentracích za přesně definovaných podmínek.

Biotest ve většině případů neposkytuje informaci, jaká látka a v jaké koncentraci je přítomna ve vzorku, to již podléhá chemické analýze. Na druhé straně jsme však schopni prostřednictvím biotestů zjistit, zda je vzorek biologicky aktivní a jestli ovlivňuje a popřípadě jak ovlivňuje testovaný systém.

Ekotoxikologických biotestů je celá řada. Provádí se pro akvatické i terestrické ekosystémy, pro různé druhy matric vzorků, jako například pro vodní výluhy z odpadů, sedimenty, vodné roztoky chemických látek anorganických i organických, včetně pesticidů a léčiv.

Výběr testovacích organismů pro hodnocení ekotoxického rizika by měl být proveden tak, aby byly zastoupeny veškeré trofické úrovně sledovaného ekosystému, tj. producenti, konzumenti a destruenti [2, 4, 5].



### 2.2.1. Akvatické testy toxicity

Testování účinků chemických látek popř. vodných výluhů různorodých matric na vodních organismech prostřednictvím vodních organismů v rámci ekotoxikologie patří nejrozšířenější metodiky. Cílem testů je určit účinek testované látky nebo vzorku na organismy vodního prostředí. Testy probíhají v nádobách, ve kterých jsou vodní roztoky testované látky o různých koncentracích. V každé koncentraci je umístěn určitý počet testovaných organismů, který je pro všechny koncentrace stejný. Po uplynutí doby expozice se odečte počet organismů, které vykazují reakci na účinky testované látky. Vzhledem k podmínkám testů, je vhodné testovat látky rozpustné ve vodě. Testy na vodních organismech se využívají i pro testování vodných výluhů, jako jsou sedimenty nebo odpady.

Mezi testovací vodní organismy patří ryby, koryši, vodní rostliny, řasy a bakterie [1, 2, 4].

### 2.2.2. Terestrické testy toxicity

Testy toxicity v terestrickém uspořádání slouží k posouzení možných toxických účinků chemických látek a vzorků na půdní ekosystémy. Pro tyto účely jsou využívány půdní organismy, včetně mikroorganismů. Testování je prováděno v nádobách naplněných umělou (artifiziální) nebo přírodní půdou, která obsahuje známou koncentraci testované látky. Tyto testy jsou vhodné i pro hydrofóbní látky, které není možné testovat v rámci akvatických testů ekotoxicity.

Pomocí terestrických testů jsou testovány látky, které přichází do kontaktu s půdními ekosystémy, používají se pro hodnocení ekotoxicity různých typů pevných odpadů a kontaminovaných zemín.

Testy toxicity sedimentů řek a vodních nádrží jsou zvláštní skupinou. Tyto matrice často obsahují vysoké koncentrace rizikových kovů a organických polutantů. Organismy, které v sedimentech žijí, vážou kumulují ve svých tělech tyto látky které se následně dostávají do potravního řetězce

V rámci terestrických testů se využívají zejména tyto organismy: chvostoskok, rounnice, žížaly, bakterie, jednoděložné a dvouděložné rostliny [2].

### 2.2.4. Ekotoxikologické hodnocení látek

Princip testů toxicity je u většiny metodik stejný nebo podobný. Testovaný organismus se vystaví působení zkoušené látky nebo vzorku o známé koncentraci, popřípadě jeho koncentrační řadě po určitou dobu. Po ukončení testu se vyhodnocují účinky testované látky. V případě rostlin to může být délka kořínků (testy na cibuli – *Allium cepa*), v případě živočichů například imobilizace jedinců (akutní test na perloočkách *Daphnia magna*) [2, 5].

Testování probíhá v rámci několika na sebe navazujících testů, pomocí kterých jsme schopni určit, zda je testovaná látka toxická či nikoli. Nejdříve se provádí limitní test, ve kterém je testována reakce testovacích organismů na koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> testované látky. Pokud v tomto testu neuhyne ani jeden testovací organismus, další testy nejsou vyžadovány. Pokud dojde k úhynu testovacích organismů, jako další se provádí předběžný test, který se nasazuje v širokém rozpětí koncentrací (např. od 0,01 do 100 mg.l<sup>-1</sup>). Na základě výsledků z předběžného testu, pak nasazujeme test základní, kde volíme užší rozsah koncentrací

testované látky. V případě prokázané toxicity pomocí základního testu jsme schopni vypočítat hodnoty EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, NOEC (*No Observed Effect Concentration* – koncentrace, při které již není pozorován účinek), LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* – nejnižší pozorovatelná účinná koncentrace) a další doplňkové hodnoty, záleží na každém jednotlivém testu.

Aby se výsledky testů prováděných jednotlivými laboratořemi daly porovnat, je nutné, aby laboratoře prováděly testy podle shodných metodik. Jednotlivé metodiky testů toxicity jsou standardizovány na mezinárodní úrovni. Standardizaci provádí mezinárodní organizace ISO (*International Organization for Standardization*) a OECD (*Organization for Economic Cooperation of Development*) a celá řada dalších [5, 6].

Hodnocení chemických látek a přípravků se provádí dle nařízení vlády č. 26/1998 a dle vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 84/1997 ve znění pozdějších předpisů.

Testované látky a přípravky jsou označovány z hlediska rizik:

- R50: vysoce toxické látky a přípravky pro vodní organismy  
LC (EC, IC)  $50 \leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$
- R51: toxické pro vodní organismy  
 $1 \text{ mg.l}^{-1} < \text{LC (EC, IC)} 50 \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$
- R52: škodlivé pro vodní organismy  
 $10 \text{ mg.l}^{-1} < \text{LC (EC, IC)} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$

Rozhodující je zjištěná hodnota pro nejcitlivější druh organismu

## **2.2.5. Rozdělení ekotoxikologických biotestů dle doby expozice**

### **2.2.5.1. Akutní testy**

Jedná se o testy krátkodobé s jednorázovým podáním látky. Pomocí těchto testů jsou hodnoceny účinky nejen chemických látek a jejich směsí, ale také výluhů odpadů, polutantů a environmentálních vzorků. Nejčastěji se sleduje mortalita testovacích živých organismů, která je vyjádřena hodnotami LD<sub>50</sub> (dávka, která způsobí úhyn 50 % testovacích organismů) nebo LC<sub>50</sub> (koncentrace látky, která způsobí úhyn 50 % testovacích organismů). Na základě těchto testů se vypočítává toxický index [1, 8].

### **2.2.5.2. Subchronické testy**

I v rámci těchto testů jsou testovány chemické látky, jejich směsi, výluhy odpadů a environmentálních vzorků. Testované organismy jsou vystaveny účinkům působení látky po dobu, která se rovná 10 % předpokládané doby života organismu. Díky těmto testům získáváme podrobnější informaci o působení testované látky, většinou ale neukazují dopady dlouhodobého působení látky na organismus. V rámci těchto testů je možné získat hodnoty NOEC a LOEC [1, 6, 9].

### **2.2.5.3. Chronické testy**

V těchto testech jsou testované organismy vystaveny dlouhodobému účinku testované látky, která je podávána průběžně během testování v malých koncentracích. Sledujeme patologické změny. Negativní vliv testované látky se projevuje například snížením porodnosti, výskytem degenerativních útvarů apod. v dalších vývojových stádiích, generacích a potomcích. I v případě těchto testů jsme schopni získat hodnoty NOEC a LOEC [1, 10].

Chronické testy toxicity sledují nižší koncentrace látek než standardně používané testy akutní toxicity. Tyto koncentrace se více blíží environmentálním koncentracím sledovaných látek.

Testování chronické toxicity je významné z hlediska stanovení prahových koncentrací látek v pitné vodě, nejvyšších přípustných koncentrací látek z hlediska požadavků na chovy ryb a na dlouhodobějšího zatížení krajiny.

Negativní důsledky působení toxických látek mohou být patrné až na dalších vývojových stádiích, generacích a potomcích, můžou se projevit snížením porodnosti v populaci, výskytem degenerativních útvarů, přenosem dědičných vad a onemocnění.

Testy chronické toxicity jsou prováděny zejména na řasách a vodních koryšcích. Řasy musí splňovat podmínku heterothalie (asexuální rozmnožování, tvorba autospor). V rámci testu jsou stanovovány hraniční koncentrace, ve kterých je vybraný testovací organismus schopen žít. Testo probíhá měsíc, sledováno je rozmnožování zeleného bičíkovce v kultuře, porovnávají se růstové křivky organismu v jednotlivých koncentracích a kontrole.

Při využití vodního koryše *Daphnia magna* v chronických testech se posuzuje vliv toxické látky na reprodukci organismu, během testu je zaznamenáván počet narozených živých jedinců v různých koncentracích testované látky a v kontrole. Testy se provádí dle ČSN ISO 10706. Doba testu je 21 dní, organismy je nutné nejméně jednou za tři dny krmit a je nutno pravidelně obnovovat roztoky o různých koncentracích testované látky [10].

#### 2.2.6. Další možnosti dělení ekotoxikologických biotitů

Dělení ekotoxikologických biotestů je značně nejednotné. Existuje mnoho kritérií, podle kterých se testy dají dělit, například dle designu testovacího systému, dle trofické úrovně testovacích organismů, dle typu testovaného vzorku, dle způsobu vyhodnocení a podle mnoha dalších kritérií [4, 10].

#### 2.2.7. Standardní testy ekotoxicity

Ekotoxikologických testů je celá řada. Jejich standardizací se zabývá mnoho organizací, z nichž nejznámější jsou organizace ISO (*International Organization for Standardization* - Mezinárodní organizace pro standardizaci), organizace OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* - Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj), pro Spojené státy americké se standardizací metodik stanovení ekotoxicity zabývá organizace US-EPA (*United States Environmental Protection Agency* - Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států). V rámci České republiky jsou standardně prováděny testy ekotoxicity vod, odpadních vod a vodních výluhů z pevných matric a to na organismech stanovených Metodickým pokynem odboru odpadů Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů z února 2007. Jedná se o testy na:

- akvariálních rybách, živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) podle ČSN EN ISO 7436-2, s dobou působení testované látky 96 hodin.
- na koryši z podtřídy lupenonožců, perloočka (*Daphnia magna*) podle ČSN EN ISO 6341, s dobou působení testované látky 48 hodin.
- na sladkovodních řasách, *Desmodesmus subspicatus* nebo *Pseudokirchneriella subcapitata* podle ČSN EN ISO 8692, s dobou působení testované látky 72 hodin

- na semenech vyšších rostlin, hořčice bílá (*Sinapis alba*), podle Metodického pokynu odboru odpadů Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů z února 2007, s dobou působení testované látky 72 hodin [11]

### 2.2.8. Testy fytotoxicity

Testy fytotoxicity se využívají pro testování půdy, kalů, bioodpadů, půdních a pěstebních substrátů aj. Pro tyto testy jsou využívány vyšší rostliny, na kterých je téměř okamžitě a viditelně patrný škodlivý účinek testované látky.

Fytotoxicita je definována zpožděním klíčení semen nebo inhibicí růstu rostlin [12].

V posledních dvaceti letech se testy fytotoxicity staly běžnou součástí environmentálního monitoringu. Pomocí jejich aplikace je možné posoudit vliv vzájemných účinků vnějších a vnitřních faktorů a také citlivost testovacích rostlinných druhů.

V České republice nejsou testy fytotoxicity, vyjma testu na *Sinapis alba*, legislativně zahrnuty do standardních testů ekotoxicity, ale přesto jsou široce a s úspěchem využívány.

Nejčastěji využívané testy fytotoxicity se provádí na:

- okřehek menším (*Lemna minor*), podle ČSN EN ISO 20079 – Jakost vod – Stanovení účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehek, doba expozice v testu je 7 dní
- na cibuli (*Allium cepa*), podle metodiky „A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.)“, jedná se o 48 až 72 hodinový test [13, 14]

### 2.2.9. Alternativní testy ekotoxicity

Alternativní testy, mikrobiotesty, jsou v posledních letech využívány čím dál častěji. Jejich výhodou je miniaturizace, snížení spotřeby testovaných roztoků, nízké náklady, vysoká citlivost, jednoduchost a dobrá dostupnost.

Tyto testy využívají k testování klidová stadia testovacích organismů (vajíčka, ephippia, cysty, tkáně, lyofilizované a imobilizované kultury organismů). Schopnost řízení líhnutí organismů z těchto klidových stádií umožňuje tyto testy provádět na zakázku. Vylíhnutí testovacích organismů a příprava kultur závisí na typu organismu, např. líhnutí vířníků z cysty trvá maximálně 24 hodin, líhnutí korýšů probíhá 24 – 72 hodin.

Alternativní testy pracují s minimálními počty testovacích jedinců. Pomocí těchto testů je stanovována toxicita chemikálií. Využívané testovací organismy v těchto testech jsou bakterie, řasy, prvoci, bezobratlí.

Testy jsou dodávány od výrobců v tzv. bateriích – toxkitech. Toxkity jsou nerozšířenější testy ekotoxicity na světě. Nejpropracovanější jsou toxkity pro akvatické prostředí. S jejich pomocí lze hodnotit různé druhy matric (sedimenty, odpadní vody, odpadní vody uvolněné do sladkých vod ústími přímo do vod slaných, nebo odpadní vody vypouštěné přímo do moří). Označení testovací sady písmenem „F“ značí, že test je určen pro sladkou vodu, označení písmenem „M“ je pro testy určené pro slané, mořské vody. Nejpoužívanější toxkity s následujícími testovacími organismy jsou: Rototoxkit (vířník -*Brachionus calyciflorus*), Thamnotoxkit (korýš – *Thamnocephalus* (korýš – *Thamnocephalus platyurus*), Daphtoxkit (korýš – *Daphnia pulex* nebo *Daphnia magna*), Algal toxkit (řasa – *Selenastrum capricornutum*, syn. *Raphidocelis subcapitata*) [8, 10, 15, 16].

## 2.3. Související legislativa

### 2.3.1. Legislativa ČR

Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů je platnou právní úpravou v oblasti uvádění chemických látek a přípravků na trh. Zákonem byly do české legislativy implementovány evropské předpisy z oblasti chemické politiky. Zákon se zabývá nebezpečnými vlastnostmi chemických látek a chemických přípravků a ochranou zdraví a životního prostředí před toxickými účinky těchto látek. Zákon ukládá povinnost dodávat ke každé chemické látce a přípravku bezpečnostní list, který obsahuje informace o výrobcí a dovozci, o samotné látce nebo přípravku, o jeho vlastnostech a rizikovitosti a údaje nutné pro zajištění ochrany zdraví a životního prostředí [17].

Se zákonem o chemických látkách souvisí Vyhláška č. 449/2005 Sb., kterou je upravována Vyhláška č. 443/2004 Sb., stanovující základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků [18].

Další legislativní dokument, který se zabývá úpravou o nakládání s chemickými látkami je Vyhláška č. 329/2004 Sb. o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin. Jedná se o legislativní úpravu vydanou Ministerstvem zemědělství ve spolupráci s Ministerstvem zdravotnictví a Ministerstvem životního prostředí v souladu s právem Evropských společenství. Tento právní dokument uvádí podmínky používání přípravku, ze kterých vyplývá povinnost nakládat s přípravky a prostředky na ochranu rostlin podle pokynů, jimiž jsou označeny, je nutné zabránit kontaminaci vody a poškození ostatních složek životního prostředí včetně poškození zdraví zvířat používáním těchto přípravků a prostředků. Účinná látka daného přípravku nebo prostředku musí být klasifikována, balena a označena v souladu s požadavky zvláštních právních předpisů (Zákon č. 356/2003 Sb., Směrnice Rady 67/548/EHS, Směrnice Rady 1999/45/ES). Účinná látka má být označena na obalu přípravku nebo prostředku výrazně a nerasmazatelně a odpovídá-li to povaze přípravku, je povinnost také uvádět standardní věty, které označují specifickou rizikovitost (R-věty) a standardní pokyny pro bezpečné nakládání (S-věty), které vyplývají z následujících právních předpisů: Zákon č. 356/2003 Sb., Směrnice Rady 67/548/EHS, Směrnice Rady 1999/45/ES. Tato vyhláška také stanovuje zásady hodnocení podkladových údajů a kritéria při posuzování vlastností přípravku za účelem jeho registrace. Dokumentační soubor musí zahrnovat technickou dokumentaci, která obsahuje informace nutné pro vyhodnocení předpokládaných okamžitých i dlouhodobých rizik pro člověka, zvířata a životní prostředí. Vyhláška ve svých přílohách uvádí analytické metody ke stanovení povahy a množství účinných látek, toxikologicky nebo ekotoxikologicky významných nečistot a přísad [19].

Zákon č. 308/2000 Sb., upravuje zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech), a zákon č. 569/1991 Sb., o Pozemkovém fondu České republiky, ve znění pozdějších předpisů definuje hnojivo jako látku obsahující živiny pro výživu kulturních rostlin a lesních dřevin, pro udržení nebo zlepšení půdní úrodnosti a pro příznivé ovlivnění výnosu či kvality produkce. Tento zákon ukládá povinnost aby hnojiva uváděná do oběhu byla registrována v souladu s tímto zákonem, neohrožovala úrodnost půdy ani zdraví lidí a zvířat, nepoškozovala životní prostředí. Dále stanovuje povinnost aby hnojiva splňovala požadavky určené tímto zákonem na jejich označení, balení a skladování.

O registraci hnojiva rozhoduje Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský na základě žádosti výrobce nebo dovozce. Zákon dále stanovuje zásady skladování a používání hnojiv, které musí být v jeho souladu. V zákoně je také zahrnuto agrochemické zkoušení zemědělských půd, což je pravidelné zjišťování vybraných parametrů půdní úrodnosti v důsledku používání hnojiv s cílem jejich používání usměrňovat [20, 21].

### 2.3.2. Nitrátová směrnice

Směrnice Rady č. 91/676/EHS - nitrátová směrnice je směrnice Evropské Unie přijatá v roce 1991 a je orientovaná na ochranu a nakládání s vodními zdroji. EU přistoupila k přijetí této směrnice z důvodu vysokého znečištění vod dusičnany, které pochází ze zemědělských zdrojů a významným způsobem poškozuje životní prostředí a ohrožuje lidské zdraví. Z Informačního systému „Pitná voda“, který spadá pod Ministerstvo zdravotnictví vyplývá, že v České republice má cca 300 veřejných vodovodů problémy s dodržáním limitní hodnoty dusičnanů, která je daná platnými hygienickými předpisy pro pitnou vodu, tzn. že tento problém se týká cca 300 000 obyvatel ČR.

Nitrátová směrnice má za cíl snížit znečištění vod způsobené dusičnany pocházejících ze zemědělských zdrojů a také předcházet dalšímu takovému znečištění. To je důležité nejen pro zajištění dostatečného počtu zdrojů pitné vody, ale také kvůli omezení eutrofizace povrchových vod a moří [22].

V ČR je nitrátová směrnice uplatněna v §33 vodního zákona (zákon č. 254/2001 Sb.). Prováděcím předpisem je nařízení vlády č. 103/2003 Sb., o stanovení zranitelných oblastí a o používání a skladování hnojiv, statkových hnojiv, střídání plodin a provádění protierozních opatření v těchto oblastech. Zranitelné oblasti jsou oblasti s vodami znečištěnými dusičnany pocházejícími ze zemědělských zdrojů (viz obr. č. 1), tyto oblasti jsou vymezeny hranicemi katastrálních území. Vymezení zranitelných oblastí je přezkoumáváno a upravováno nejdéle ve čtyřletých intervalech [23].

Hospodaření ve zranitelných oblastech je upraveno akčním programem (nařízení vlády č. 103/2003 Sb.) přijatým podle článku 5 nitrátové směrnice 91/676/EHS a představuje systém povinných opatření ve zranitelných oblastech, tato opatření mají za úkol redukovat riziko vyplavování dusíku do povrchových a podzemních vod [24].



Obrázek č. 1: Přehled zranitelných oblastí v ČR [1]

### 2.3.3. REACH

V 90. letech 20. století bylo provedeno hodnocení situace v oblasti nakládání s chemickými látkami v zemích Evropské unie, na základě tohoto vyhodnocení byla vytvořena nová strategie, která je uplatňována ve všech zemích EU. 1. 6. 2007 vstoupilo v platnost nařízení REACH, jedná se o legislativní nástroj, který zajišťuje jednotný systém v oblasti registrace, hodnocení, povolování a omezování výroby, a také uvádění na trh a používání chemických látek, přípravků a předmětů. Do českého právního řádu bylo nařízení REACH implementováno zákonem č. 371/2008 Sb. Tato novela zákona nabyla účinnosti 1. 11. 2008.

Cílem politiky REACH je zlepšení ochrany lidského zdraví a životního prostředí prostřednictvím lepší a rychlejší identifikace důležitých vlastností chemických látek a přípravků. Nařízení REACH klade větší zodpovědnost na průmysl za řízení rizik spojenými s chemickými látkami a na poskytování bezpečnostních informací o těchto látkách.

Nařízení REACH určuje podmínky, povinnosti a pravomoci dotčených osob v procesu registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. V procesu registrace je výrobcům a dovozcům uloženo zjišťovat a poskytovat údaje o vyráběných nebo dovážených látkách v množství větším jak 1 tona za rok. Registrace chemických látek a přípravků zajišťuje Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) se sídlem v Helsinkách, průběh registrace chemických látek je rozložen do 11 let. Agentura působí jako centrální nástroj v systému REACH. Spravuje databáze, koordinuje hloubkové hodnocení chemikálií, buduje veřejnou databázi s informacemi o nebezpečnosti jednotlivých látek, tato databáze má být přístupná i běžným spotřebitelům [25, 26].

## 2.4. Organismus rodu *Daphnia*

*Daphnia* česky hrotnatka nebo také perloočka je malý vodní živočich, který se vyskytuje prakticky v každé nádrži. Slouží jako potrava pro mnoho živočichů a samy se také živí planktonními řasami, čímž zabraňují jejich přílišnému množení v nádržích, a tím napomáhají správnému fungování vodních ekosystémů [27].

Perloočky jsou lidstvu známé již dlouhý čas. První vyobrazení dafnií pochází z roku 1669 a bylo zveřejněno v Swammerdamově encyklopedii *Historia Insectorum Generalis*. Jméno *Daphnia* je používáno od roku 1785 a pochází od O. F. Millera [27, 28].

Rod hrotnatek (*Daphnie*) patří systematicky do čeledi hrotnatkovití (*Daphniidae*), řádu perloočky (*Cladocera*), třídy koryši (*Crustacea*), kmene členovci (*Arthropoda*) [29].

Rod *Daphnia* zahrnuje více než sto známých druhů tohoto planktonního organismu. Lze je najít ve sladkovodních nádržích po celém světě [30].

### 2.4.1. Výskyt

Perloočky se vyskytují ve všech typech povrchových vod, kromě vod s prudkým tokem a vod, které jsou extrémně znečištěny. Nejlépe se jim daří ve vodách stojatých, kde jsou součástí zooplanktonu.

Druh *Daphnia magna* můžeme nejčastěji nalézt v malých stojatých organicky znečištěných vodách, například v rybníčcích na návších, nebo dešťových loužích a tůňkách. Tyto hypertrofní vody jim poskytují dostatek živin, v důsledku čehož vytlačí jiné druhy z konkurence a bohatě se rozmnožují a žijí zde v obrovských společenstvech a stávají se potravou pro ryby. Druh *Daphnia magna* je teplomilný a vyskytuje se spíše v nížinách a pahorkatinách, výjimečně na něj můžeme narazit i v horských oblastech [31, 32].

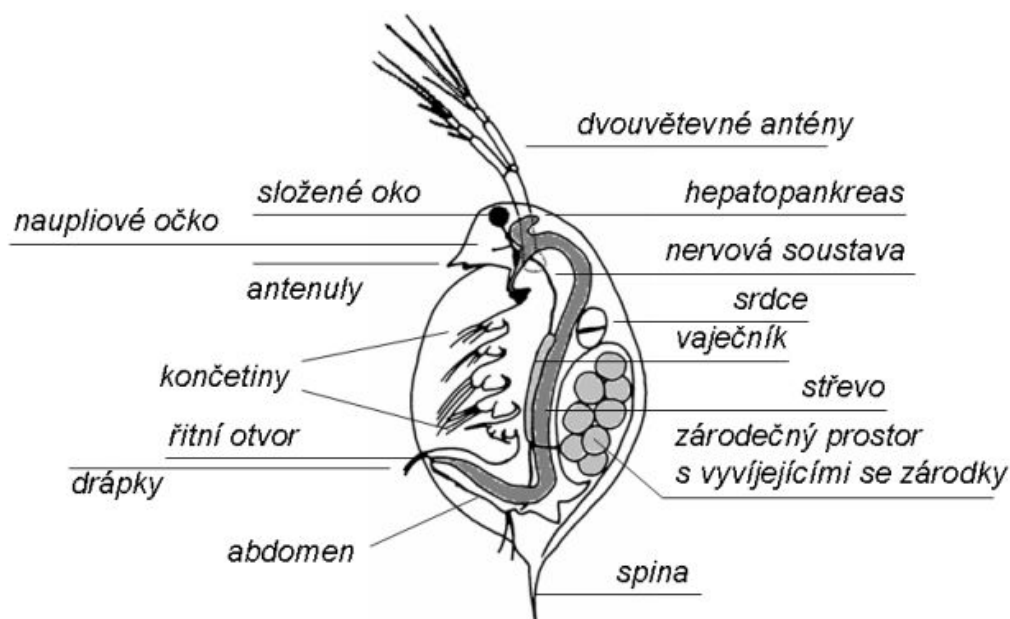
### 2.4.2. Stavba těla

Jak už napovídá samotné jméno *Daphnia magna*, tento druh patří mezi perloočkami mezi největší. Velikost, respektive délka těla dospělé samice dosahuje až 5 mm, bez započítání helmy a spiny. Samečci jsou o poznání menší.

Perloočky mají lehce zploštělé tělo, které se skládá z nezřetelných článků. Tělo perlooček je uloženo v dvouchlopňové chitinové průhledné skořápce, ze které vyčnívá hlava s dvouvětevnými anténami. Na hlavě perlooček je větší složené oko a většinou jedno malé napulinové oko. Abdomen (zadeček) je zahnutý pod břišní stranou těla. Hrotnatky mají pět párů diferenciovaných končetin [27, 31, 32].

Tělo hrotnatek je v podstatě průhledné a díky tomu můžeme pozorovat i vnitřní orgány. Potrava je posunována do úst se dvěma protáhlými kusadly a pokračuje přes hrtan do trávicí trubice, která přechází ve střevo, které je protažené a zahýbá dolů. V blízkosti ohybu střeva se nachází hepatopankreas. Na zadní straně těla leží soudečkové srdce, jehož pohyb je pod mikroskopem dobře viditelný. U samic je pod srdcem zárodečný prostor na vajíčka [28, 29].





Obrázek č. 2: Stavba těla perlooček [2]

### 2.4.3. Pohyb

Hlavním pohybovým aparátem perlooček jsou dvouvětevné antény. Těžiště těla hrotnatek je v blízkosti těchto antén, při jejich úderu se tělo perlooček naklání dopředu a při pohybu zpět se vyrovnává. U velkých druhů, jako je *Daphnia magna* je frekvence úderů antén nižší a jejich pohyb je tvořen zřetelně oddělenými skoky [31].

Perloočky reagují tzv. diurnální migrací na osvětlení vodního sloupce (intenzitu, vlnovou délku či polarizaci světla). To znamená, že se ve vodním sloupci pohybují nahoru a dolů podle množství světla a podle jeho úhlu dopadu na vodní hladinu [27].

### 2.4.4. Dýchání

Dříve se předpokládalo, že perloočky dýchají pomocí žaberních výběžků na hrudních nožkách – epopoditů [31]. Nejnovější výzkumy však prokázaly, že perloočky dýchají celým povrchem těla a výměna plynů probíhá difúzí [27].

*Daphnie* mají otevřený krevní oběh, to znamená, že hemoglobin není umístěn v krevních buňkách, ale je volně v hemolymfě. Perloočky mají tendenci vytvářet více hemoglobinu v případě nízké koncentrace kyslíku ve vodě. Tudíž ve vodách s malým obsahem kyslíku můžeme pozorovat hemoglobinem (červeně) zbarvenou populaci [27, 29].

### 2.4.5. Potrava

Dafnie se živí filtrováním nanosestonu (řasy, bakterie, organický detrit) z vody. Aparátem pro získání potravy jsou jejich končetiny. První pár nohou vyřídí pohybem vodu a ta je nasávána rozevřením třetího a čtvrtého páru do filtračního prostoru. Tato fáze se nazývá addukční. V addukční fázi se schránky uzavřou, spodek filtrační komory uzavírá pátý pár nohou a postupným uzavíráním třetího a čtvrtého páru končetin je voda nasátá do filtračního prostoru vypuzena přes filtrační hřebínky na končetinách. Odfiltrovaná potrava je na konci této fáze vzniklým přetlakem dopravena do břišní rýhy a následně do ústního prostoru a rozdracena protáhlými kusadly – mandibulami a poté polknuta [27, 31].

#### 2.4.6. Rozmnožování

Perloočky jsou odděleného pohlaví, s rozdílnými znaky. Jak již bylo výše uvedeno, samečci jsou viditelně menší než samičky, nemají vyvinutý zárodečný prostor, mají dlouhá tykadélka a na předních nohách na konci silně zahnutý kopulační háček s dlouhou záchytnou brvou (viz obr. č. 3) [31, 32].

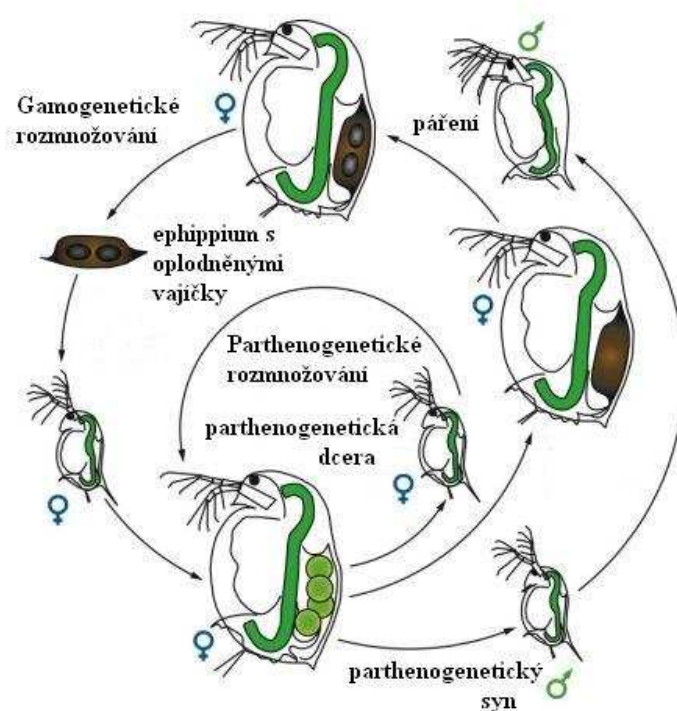
Perloočky se rozmnožují gamogeneticky (sexuálně) a parthenogeneticky. Převažuje parthenogenetické rozmnožování, to znamená, že populace je tvořena zejména parthenogenetickými samičkami. Embryonální vývoj parthenogenetických vajíček probíhá v zárodečném prostoru samiček, vajíčka prochází osmi vývojovými stádii. Délka embryonálního vývoje je ovlivňována teplotou. Pro druh *Daphnia magna* je při 25 °C embryonální vývoj vajíčka asi 46 hodin. Počet vajíček v jedné snůšce se nedá určit, záleží na druhu, stáří matky, potravě a podmínkách prostředí. Při gamogenetickém rozmnožování dochází ve vaječníku samiček k diferenciaci vajíček a z části, popřípadě z celé snůšky se líhnou samečci. Samečci poté oplodní další vajíčka, která se při svlékání samičky uvolňují. Tato vajíčka jsou umístěna v ochranném obalu, tzv. ehippiu. Ehippia jsou velice odolná vůči nepříznivým podmínkám, zárodky v nich jsou schopny přežít velmi dlouhou dobu a líhnout se až po nastolení vhodných podmínek. Ehippia jsou přímo určena pro přežití populace. K gamogenetickému rozmnožování dochází při změně podmínek prostředí (teplota, zkrácení délky dne, množství a kvalita potravy a jiné) [27, 30, 31].



Obrázek č. 3: *Daphnia magna* – rozdíly mezi samičkou (a) a samečkem (b) [3]  
1 – sameček – kopulační háček se záchytnou brvou, 2 – zárodečný prostor u samičky chybí

Nově narození jedinci jsou velmi podobní dospělým, zásadní rozdíl je, že u samiček není vyvinutý zárodečný prostor. Vývojová stádia jsou oddělena svlékáním chitinové skořápky. Stádia před dosažením dospělosti jsou označována jako preadultní, ostatní pak jako adultní. U většiny druhů prochází juvenilní jedinci čtyřmi až šesti vývojovými stádii, než dosáhnou dospělosti a produkují první vajíčka, toto první adultní stádium se nazývá primipara. Nově narozená mláďata se označují jako neonata a poslední preadultní stádium je nazýváno adolescentní. Počet preadultních stádií je určen množstvím potravy a velikostí neonat. Větší neonata, která žijí v prostředí obsahujícím hodně potravy, proto absolvují méně svlékání a

dospívají rychleji než malá neonata ve vodách chudých na potravu. Počet adultních stádií je určen podmínkami ve vodním prostředí, není možné jej predikovat [27, 30, 31].



Obrázek č. 4: Rozmnožovací cyklus *Daphnia magna* [3]

V laboratorních podmínkách lze dosáhnout i cílené produkce ephippií. Přímět organismy ke gamogenetickému rozmnožování lze pomocí úpravy krmení. Sníží se interval dodávání fytoplanktonního krmiva na jedenkrát za týden a hlavními složkami krmiva budou zdroje zooplanktonní a bakteriální. Samičky trpící deficitem řas v krmivu reagují na střídání dietologických zdrojů střídáním parthenogenetického rozmnožování s gamogenetickým. Tím dojde k produkci samečků, kteří se páří se samičkami a následuje intenzivní produkce ephippií [33].

#### 2.4.7. Chov

Perloočky je nutné chovat v médiu, v jakékoli chladnější místnosti. Teplota by se měla pohybovat mezi 15 – 25 °C, neměla by být vyšší jak 26 °C. Je doporučeno chovy přisvětlovat a nastavit světelný režim 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Pro chov perlooček je možné použít jakoukoli skleněnou čirou nádobu, velikost by měla být uzpůsobena počtu jedinců.

V případě, že jsou perloočky chovány v přirozeném médiu (voda z nádrže) s obsahem zelených řas, postačí několikrát do týdne část média vyměnit za čerstvé. Pokud jsou perloočky pěstovány v laboratorně připraveném médiu, je nutné je pravidelně krmit. Vhodným krmivem jsou zelené řasy kultivované souběžně s chovem dafnií. Interval krmení je závislý na hustotě a množství podávaného krmiva, na objemu kultivačního média, počtu jedinců a typu chovu, není tedy možné jej stanovit obecně. Médium by mělo být lehce zakalené a měly by v něm být vidět malé tečky.

Chov dafnií je nutné pravidelně kontrolovat, sleduje se množství jedinců, jejich stáří, skladba populace (zda jsou v chovu nově narození jedinci), vzhled (perloočky by neměly být

příliš průhledné) a aktivita. Doporučuje se minimálně jednou týdně prohlédnout několik adultních jedinců pod mikroskopem, změřit je a spočítat vajíčka v zárodečném prostoru. Také se sleduje, zda v chovu nejsou přítomni samečci, nebo zda nedochází ke tvorbě trvalých vajíček (ephipií). Chov dělíme na udržovací a množicí.

#### **2.4.7.1. Udržovací chov**

V udržovacím chovu jsou dafnie umístěny ve velkých zkumavkách uzavřených prodyšnými zátkami. Tyto zkumavky je vhodné uložit do kultivační skříně nebo místnosti s nižší teplotou (do 14 °C) a se světelným režimem 16:8. Tento chov je krmen jednou maximálně dvakrát týdně cca 1 – 1,5 ml krmiva. Chov je nutné přibližně jednou měsíčně obnovit, tzn. přenést jedince do nového čistého média a zkumavek a upravit jejich počet. Je nutné sledovat, zda perloočky v chovu nehynou nebo jestli se netvoří trvalá vajíčka.

#### **2.4.7.2. Množicí chov**

Pro množicí chov jsou použity větší číré skleněné nádoby, kádiny o objemu 1 l, akvária, která jsou umístěna v místnosti s pokojovou teplotou v rozmezí 18 – 24 °C, teplota by neměla překročit 26 °C. Na chovné nádoby by nemělo dopadat přímé sluneční světlo. Je vhodné kádiny s chovem přisvěcovat (zejména v době krátkého dne) a nastavit periodu osvitů na 16 hodin dne a 8 hodin noc. Krmení dafnií by mělo probíhat přibližně každý druhý den. Kultivační médium by mělo být lehce zakalené.

V rámci tohoto chovu by mělo dojít k nastavení vhodných podmínek pro rychlé rozmnožení organismů. Je nutno pravidelně kontrolovat, zda samičky tvoří dostatek vajíček, zda se mezi narozenými organismy nevyskytují samečci, či jestli se netvoří trvalá vajíčka, ephippia.

#### **2.4.7.3. Přirozené médium**

Pro běžný chov je doporučeno používat přirozené médium. Jedná se o přefiltrovanou vodu z vybrané vodní nádrže, která se ale již jinak neupravuje.

Před samotným odběrem z nádrže je dobré zjistit, zda v ní žije nějaký zooplankton, posoudit, zda je voda v dobré kondici, tedy jestli nezapáchá, není zakalená apod. Voda je odebírána do čisté skleněné nádoby, a před nasazením chovu perlooček je nutné ji přefiltrovat přes sítko s velikostí ok 40 µm, aby se zabránilo přenosu jiného druhu zooplanktonu do chovu.

Je doporučeno zjistit pomocí mikroskopu, zda a jaká je v médiu přítomna zelená řasa. Přirozený výskyt fytoplanktonu v médiu je výhodou, může sloužit jako krmivo pro perloočky, v případě jeho dostatečného množství (voda má zákal do zelena) je možné vodu použít také pro kultivaci řas na krmení.

Nevýhodou tohoto média je jeho neznámé chemické složení. To může být komplikací v určitých typech testů. Médium je nutné pravidelně měnit. Výběr lokality pro odběr vody pro médium by měl být velmi pečlivý.

#### **2.4.7.4. Laboratorně připravená média**

Použití laboratorně připraveného média je výhodné z důvodu znalosti jeho chemického složení. Ve vhodně laboratorně připraveném médiu by se perloočky měly nelimitovaně množit a růst, a to i při malém obsahu krmení. Laboratorně připravené médium by mělo mít

stálou teplotu, pH v rozmezí 6,0 – 9,0, mělo by být chemicky stabilní a jednoduše připravitelné [34, 35].

Laboratorně připravená média jsou různých typů, nedefinovaná, polodefinovaná, zcela definovaná. Uměle připravovaných médií je velká řada, a před výběrem média pro chov je potřeba nejdříve zvážit účel, k němuž bude sloužit. Zda se bude jednat o chov dlouhodobý nebo krátkodobý, zda se jedná o médium pro pokusy a jakým směrem budou zaměřeny.

Jedním z mnoha médií pro chov perlooček je médium MS vyvinuté Keatingem (1985), toto médium bylo navrženo tak, aby bylo možné v něm chovat organismy a zároveň s jeho minimálními úpravami i kultivovat řasy (médium A-MS), ty je pak možné přímo podávat organismům. V tomto médiu dafnie výborně prospívají a rostou, zejména pak druh *Daphnia magna*. Nicméně kvůli vysokému obsahu pufru glycyglycinu, musí být kultury aseptické, což je nepraktické pro běžné použití média. Pufr je snadno rozkládán bakteriemi, což může způsobit jejich zvýšenou reprodukci a tím vést k vyčerpání kyslíku z kultivačních návod. Lze zvolit variantu bez glycyglycinu, ale v tomto případě dochází ke snížení reprodukce [34, 36, 37].

Další uměle připraveným médiem pro chov perlooček a řas je COMBO. Je to médium určené pro chov zooplanktonu i fytoplanktonu. Ze studie Susan Kilhamové a kol. (1998), vyplývá, že jimi navržené médium COMBO je vhodné pro kultivaci řas a zároveň pro dlouhodobý chov perlooček [36].

Často používané médium pro testy chronické toxicity je také médium ASTM, které má vyšší sumu vápníku a hořčíku a bylo popsáno Baratou a kol. (2006) [38, 39].

Ve studii *Laboratorně připravené médium pro chov perlooček v AČR Šárky Veselé* (2004) byla věnována pozornost kultivaci několika druhů dafnií v několika médiích. Pokus trval 36 dní. Testováno bylo nejjednodušší uměle připravované médium ISO (viz příloha, tabulka 8) v porovnání s přirozeným médiem, které je složeno pouze ze čtyř složek, jeho příprava je jednoduchá a zásobní roztoky pro jeho přípravu lze uchovávat v chladničce. Z výsledků studie vyplývá, že ISO médium není zcela vhodné pro chov perlooček, byl pozorován pokles reprodukční rychlosti oproti přírodnímu médiu, také došlo ke snížení velikosti snůšek. Je pravděpodobné, že složení tohoto média je příliš jednoduché a organismům chybí některé chemické látky potřebné pro jejich optimální vývoj, například selen. Výsledky ukazují, že v médiu je možné chovat druhy *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* a *Daphnia pulicaria*, což jsou větší a odolnější druhy perlooček, přesto i u nich dochází ke snížení reprodukce. Toto médium není vhodné pro dlouhodobé chovy [35].

Elendt a Bias (1990) navrhli laboratorně připravené médium M4, které má vyšší tvrdost vody (suma vápníku a hořčíku). Toto médium vychází z ISO a MS médií. Médium M4 je vhodné pro dlouhodobý chov dafnií, ale již ne pro kultivaci řas. Vzhledem k vysoké vhodnosti média pro kultivaci perlooček, zejména pak pro druh *Daphnia magna* bylo toto médium přijato organizací OECD a zahrnuto v rámci toxikologického programu mezi doporučená média pro chov testovacích organismů *Daphnia magna*.

Na základě jednotnosti evropských předpisů a norem pro určování toxicity látek je médium M4 součástí normy ČSN ISO 10706 – Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). Mimo média M4 je v normě uvedena jeho modifikace médium M7, tato média jsou definována pro dlouhodobý chov a reprodukční test perlooček (viz kapitola 3.1.1.1., tabulka 2) [6, 37].

Laboratorně připravovaných médií pro chov perlooček je celá řada, v rámci této práce jsou uvedena ta média, která jsou nejčastěji zmiňována v odborných článcích a publikacích.

#### 2.4.8. Využití perlooček v ekotoxikologii

Ekotoxikologické biotesty slouží ke zjištění nebo k odhadu možných dopadů působení testovaných látek na živé organismy. Pomocí těchto testů lze prokázat celkový toxický účinek testovaných látek, aniž bychom museli znát jejich přesné složení či chemické struktury. Testy ekotoxicity využívající vodní organismy patří mezi nejrozšířenější metodiky. Nejvyužívanější organismy jsou bakterie, jednobuněčné zelené řasy (např. *Desmodesmus subspicatus*), rostliny (okřehek *Lemna minor*), bezobratlí (perloočky *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, žábronožky, vířníci) a také ryby (např. akvarijní ryba paví očko *Poecilia reticulata*).

Metodiky, které využívají jako testovací organismus perloočky pro testy ekotoxicity zapracované v českých normách jsou: ČSN ISO 10706 – Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) a ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity [27, 6, 40].

Metody stanovení akutní i chronické toxicity jsou vhodné pro testy chemických látek, které jsou rozpustné ve vodě za podmínek zkoušky, popřípadě je možné je udržovat ve stálých suspenzích či disperzích za podmínek zkoušky. Dále jsou vhodné pro environmentální vzorky, ať už povrchových nebo podzemních vod a vodných výluhů z pevných matric. Poslední skupinou určenou pro testování těmito testy jsou průmyslové odpadní vody, čištěné i nečištěné, po dekantaci, filtraci nebo odstředění [6, 40].

#### 2.4.9. Testy toxicity na organismu *Daphnia magna*

*Daphnia magna*, nebo-li Hrotnatka velká patří mezi nejvýznamnější a nejběžnější vodní organismy, na kterých jsou prováděny akvatické ekotoxikologické testy. Jejich použití je možné zejména díky tomu, že jsou dostatečně citlivé a jejich chov v laboratorních podmínkách je relativně snadný.

Druh *Daphnia magna* je často volen pro tyto důvody: dá se s nimi velmi jednoduše manipulovat, ve srovnání s jinými druhy mají velké množství neonat v jedné snůšce a její neonata jsou poměrně velká a mírně zbarvená, tudíž je snadné je odečítat.

*Daphnia magna* je však v zásadě dosti odlišná od ostatních druhů perlooček, tudíž je předmětem diskuzí, zda se skutečně jedná o dostatečně reprezentativní organismus. Tento druh je adaptovaný pro život v malých nádržích bez rybí obsádky (návesní rybičky, rybníčky v parcích). Tyto vodní plochy jsou více vystaveny měnícím se podmínkám, proto lze usuzovat, že *Daphnia magna* bude více adaptovaná na změny prostředí.

Organismus *Daphnia magna* byl použit na zkoušky toxicity Andersonem už v roce 1940. V posledních dvaceti letech je tento organismus značně využíván pro běžné testování, stejně jako v základním ekotoxikologickém výzkumu [27, 41].

Tento organismus je hojně využíván jak pro testy akutní, tak i pro testy chronické toxicity. Hrotnatka velká je obecně uznávaným zástupcem zooplanktonu, tento organismus je dostatečně citlivý k toxickým látkám, snadno se pěstuje v laboratorních podmínkách, je schopný rychlé reprodukce a jeho biologie i toxikologická specifika jsou již dobře prostudována [27, 42].

Enserink, de la Hays a Maas se ve studii „Reproductive strategy of *Daphnia magna*: implications for chronic toxicity tests“ (1993) zabývali závislostí reprodukce perlooček na množství krmiva. Je samozřejmé, že reprodukce perlooček souvisí s množstvím potravy a její

kvalitou. V rámci studie byl nasazen chronický test s organismem *Daphnia magna*. Nejdříve byly mateřské organismy vystaveny různým úrovním krmení, jejich potomstvo pak bylo nasazeno do testu s chloridem kadmiovým a dichromanem draselným. Test trval 21 dní, roztoky, v nichž byly testované organismy nasazeny byly pravidelně měněny, perloočky byly v testu pravidelně krmeny. Byla sledována citlivost jednotlivých organismů na působení toxických látek v souvislosti s jejich původem a úrovní výživy matky. Výsledky testu pak byly porovnány s výsledky z podobného testu, který trval 48 hodin. Bylo prokázáno, že výživa matky ovlivňuje citlivost potomstva. Čím byly mateřské organismy krmeny méně, tím bylo potomstvo citlivější na působení chemické látky (podobné výsledky pro obě chemikálie). Dále bylo prokázáno, že citlivost potomků se více projevuje při větších dávkách chemických látek v akutním testu, v chronickém testu nebyly rozdíly mezi citlivostí tak velké, to bylo nejspíše způsobeno pravidelným krmením testovaných organismů během testu [43].

Biotesty s *Daphnia magna* pro určení akutní i chronické toxicity chemických látek ve vodním prostředí jsou přijaté a používané po celém světě [44].

Organismus *Daphnia magna* je široce využíván pro testování toxicitických vlastností různých chemických látek a přípravků. Perloočky mohou být použity pro testování různých matric vzorků, vodných roztoků, vodných výluhů, výluhů z odpadů, zkoumá se toxicita jednotlivých látek i směsí [2].

Perloočky *Daphnia magna* jsou široce využívány pro testování pesticidů, které v dnešní době představují jeden ze zásadních ekotoxikologických problémů vodního i terestrického prostředí. Konkrétní studie se zabývají například testováním akutní toxicity karbofuranu v kombinaci se suspendovanými látkami [45], nebo v rámci testování vzorků říční vody testy chronické toxicity molinátu, simetrynu, insekticidů fenytrotionu a dichlorvosu [46], další studie se zabývá akutními testy herbicidů paraquatu a glyfosátu, které jsou účinnými látkami komerčně prodávaných přípravků na postřiky plevelů [47]. Villarroelová a kol. (2003) se ve své studii věnuje akutním, chronickým a subletálním účinkům propanilu, který patří do skupiny fenylamidů a je to selektivní herbicid [48], studie Nathalie Chévre a kol. (2005) zkoumá dobu přežití a reprodukci organismu *Daphnia magna* v dlouhodobých testech (110 dní – přežití a 70 dní – reprodukce) herbicidu dinoseb [49]. Další studie se zabývají embryotoxickými účinky organofosfátového neselektivního insekticidu chlorpyrifosu [38] a vztahem mezi účinky samostatných látek a jejich odpovídajících směsí, a to kovů (Cd a Cu) a insekticidů cyhalotrinu a deltamethinu [39].

Organismus *Daphnia magna* se využívá nejen pro testování organických látek, ale také pro testy látek anorganických. Velmi rozšířené jsou testy dusičnanů, a to z důvodu častého znečištění vod dusičnany pocházejícími ze zemědělských zdrojů [22], v rámci jednotlivých studií jsou prováděny například testy akutní toxicity dusičnanu olovnatého [51], testy chronické toxicity dusičnanu stříbrného, v rámci této studie byly také zkoumány případné zmírňující faktory působení testované látky [52]. Velice komplexní studií v rámci zjišťování toxicity dusičnanů je Camargova a kol. studie akutní toxicity dusičnanů draselného a sodného na různé druhy bezobratlých, včetně *Daphnia magna* a ryb [53]. Mezi další hojně testované anorganické látky jsou rizikové prvky a to jak jednotlivě, tak ve směsích. Například chronický test mědi a jí často doprovázejícího zinku [54], akutní test toxicity niklu jako samostatné látky a dále směsi niklu s dalšími rizikovými prvky olovem a kadmii [55].

V posledních letech se začala testovat také farmaceutická rezidua ve vodním prostředí, i tyto testy mohou být prováděny na *Daphnia magna*, například akutní účinky diclofenaku [56].

To jsou jen některé příklady testovaných skupin látek na *Daphnia magna*, výčet veškerých testů toxicity prováděných na tomto organismu je v podstatě z důvodu jejich širokého využití nemožný.

#### **2.4.9.1. Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna***

Při testu akutní toxicity je sledována imobilizace perlooček v několika koncentracích testované látky (minimálně pěti) po dobu 24 a 48 hodin. Vedle testované látky o různých koncentracích se také nasazují jedinci do čisté ředící vody bez testované látky – tato pak slouží jako kontrola. Také se nasazuje test pro dichroman draselný, který je standardem pro testy akutní toxicity. Do testu jsou nasazováni jedinci mladší 24 hodin, a to z toho důvodu, že se u nich předpokládá nejvyšší citlivost vůči toxickým látkám. Během testu nejsou organismy krmeny, proto také je maximální doba testů 48 hodin, delší testy by již mohly být negativně ovlivněny nedostatkem potravy a tím by mohlo dojít ke zkreslení výsledků. Po 24 a 48 hodinách je sledována imobilizace a uhynutí organismů v jednotlivých koncentracích a kontrole. Ze získaných hodnot se stanoví střední efektivní koncentrace  $EC_{50}$  pro 24 a pro 48 hodin [5, 40].

#### **2.4.9.2. Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna***

Do testu jsou nasazovány samičky *Daphnia magna* mladší 24 hodin a jsou po dobu 21 dní v obnovovací nebo průtočné zkoušce vystaveny působení testované látky, průmyslové nebo komunální odpadní vody, povrchové nebo podzemní vody, extraktu nebo výluhu ze sedimentů. Během testu je sledováno přežívání mateřských organismů a počet živých potomků, kteří jsou od matek odebíráni. I v rámci tohoto testu je nasazována kontrola, to znamená, že perloočky jsou pouze v čisté ředící vodě bez přítomnosti zkoušené látky. Výsledky přežívání a reprodukční výtěžek testu se pak porovnává s kontrolou.

Během testu jsou organismy krmeny, je sledována teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Teplota se během testu udržuje v rozsahu 18 – 22 °C, pH musí být v rozsahu 6 až 9 a v průběhu zkoušky se nesmí změnit o více než 1,5 jednotky pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být vyšší jak 3 mg.l<sup>-1</sup>. Suma vápníku a hořčíku musí být vyšší jak 140 mg.l<sup>-1</sup>. Během testu se nastavuje fotoperioda 16 hodin světla a 8 hodin tmy, intenzita světla musí být v rozsahu 600 až 800 lux a nesmí přesáhnout 1200 lux.

V rámci tohoto testu stanovujeme koncentraci bez pozorovatelných výsledků NOEC, v tomto případě musí rozsah koncentrací zahrnovat nejméně jednu koncentraci, která NOEC předchází a vyvolává významný účinek ve srovnání s kontrolou.

Další stanovovanou hodnotou je účinná koncentrace vyvolávající účinek vyjádřený v procentech  $EC_p$ , nejčastější je účinek 20 a/nebo 50 % [6, 42].

#### **2.4.9.3. *Daphnotoxkit F<sup>TM</sup> magna***

*Daphnotoxkit F<sup>TM</sup> magna* patří k nejvíce používaným tzv. alternativním testům toxicity. Testovací organismus *Daphnia magna* je pro test uchován ve spící formě v tzv. spících vajíčkách, ephippiích. Ephippia jsou uchovávána v roztoku se striktně daným složením a deionizovanou vodou. Přísné podmínky na uchování vajíček mají pozitivní vliv na vysokou a jednotnou kvalitu vylíhnutých hrotnatek. Správně uchovávaná ephippia mohou zůstat použitelná až několik měsíců. Před samotným provedením testu je tedy nutné nejdříve nechat vylíhnout testovací organismy v definovaných podmínkách, to trvá zhruba 72 hodin.



K provedení testu potřebujeme minimální vybavení, a to malou umělou líheň, mikroskop a konvekční laboratorní sklo. Sada toxkitu (viz obr. č. 5) obsahuje veškeré materiály potřebné pro uskutečnění testu, tzn. operační postup, protokol, formuláře pro vyhodnocení zjištěných dat i s výpočtem hodnot indexů  $LC_{50}$  nebo  $EC_{50}$ , formulář pro grafické zpracování dat. Pomocí tohoto testu se nasazuje šest akutních testů, které jsou vyhodnocovány po 24 a 48 hodinách. Sledujeme pohyblivost, imobilizaci až usmrcení testovacích organismů [15, 57].

Test je vyhodnocován pomocí probitové metody. Probitová analýza vhodným způsobem převádí procentuální data odpovědi organismů na tak zvané probity, ty mají přibližně lineární závislost na logaritmu koncentrace. Aby mohla být probitová analýza provedena, je třeba získat alespoň dva parciální účinky, tedy koncentrace, při kterých byla pozorována odpověď větší jak 0 % a menší jak 100 %. Imobilizace nebo mortaliza testovacího organismu vyjádřená v procentech se pomocí probitové tabulky (viz Tabulka 1 Příloha 2) převádí na probity. Získané hodnoty se pak vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je logaritmus koncentrace ( $\log c$ ) a závisle proměnnou probitové hodnoty. Vynesené body se proloží přímkou, například pomocí metody nejmenších čtverců. Z průsečíku proložené přímky a souřadnice probitové hodnoty 5 (tedy 50 %) se spustí kolmice na osu x a odečte se příslušná hodnota  $\log c$ , odlogaritmováním této hodnoty získáme hledanou koncentraci  $EC_{50}$  [2, 5].



Obrázek č. 5: Daphtoxkit  $F^{TM}$  magna [4]

#### 2.4.9.4. *Daphnia* Toximeter

Tento přístroj je navržen jako systém včasného varování. Je určen pro nahrazení ručních testů, toxkitů. Toximetr je schopen velmi rychle odhalit přítomnost celé řady rozpuštěných toxických látek, včetně pesticidů, neurotoxinů a bojových látek. Je vhodný pro zjišťování náhlých kontaminací, ať už úmyslných (terorismus) nebo způsobených náhodně (úniky, havárie). *Daphnia* toximetr můžeme také použít pro dlouhodobý monitoring hodnocení kvality vody v napevno instalovaných stanicích pro kontrolu jakosti vody.

Výhodou tohoto zařízení je jeho vysoká citlivost, kontinualita odběru vzorku, možnost zachycení kontaminace v době výskytu.

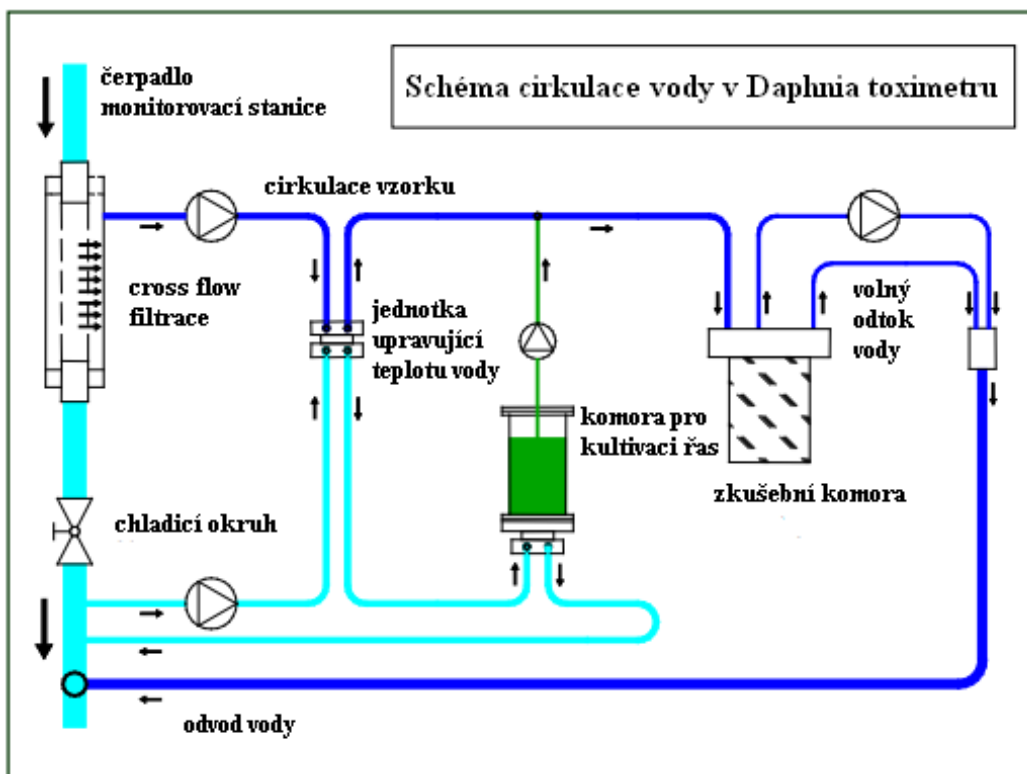
Dafnie jsou umístěny v testovací komoře, kterou neustále protéká testovaný vzorek vody ( $0,5 - 2 \text{ l.h}^{-1}$ ). V komoře je umístěna CCD-kamera, pomocí které je snímáno chování testovacích organismů je možné jej přímo v integrovaném počítači analyzovat. Sledovány jsou tyto parametry chování:

- průměrná rychlost a rozdělení
- úhel pohybu
- vzdálenost ve skupině
- růst perlooček
- výška plavání
- počet pohyblivých dafnií

Je nutné, aby v testovací komoře s hrotnatkami byla konstantní teplota, to je zajištěno pomocí jednotky pro úpravu teploty vody, která je vložena mezi koloběh vzorku vody a chladicí okruh. Dafnie v testovací komoře jsou pravidelně krmeny řasou (*Chlorella vulgaris*) kultivovanou v kultivační komoře. Sluneční osvit je napodoben osvitem žluté LED žárovky umístěné nad testovací komorou [58, 59, 60, 61].



Obrázek č. 6: *Daphnia* toximetr v zapojení [5]



Obrázek č. 7: Schéma cirkulace vody v trimetru [6]

## 2.5. Vybrané látky testované v rámci diplomové práce

Pro testy ekotoxicky v rámci této diplomové práce byly vybrány látky a přípravky používané v zemědělství a zahradnictví, a to dva komerčně prodávané produkty, herbicid Finalsan s účinnou látkou kyselinou nonanovou a herbicid Dominátor s účinnou látkou isopropylamino-sůl glyfosátu. Z hnojiv byly testovány hojně využívané ledky – dusičnan draselný a sodný. V rámci diplomové práce byly prováděny testy akutní toxicity a zavedeny testy chronické toxicity. V rámci testů akutní toxicity je vždy kromě testované látky také nasazován test s dichromanem draselným, který v testech akutní toxicity plní funkci standardu. Proto byl dichroman draselný nasazen i v rámci testu chronické toxicity, aby bylo možné diskutovat jeho krátkodobé i dlouhodobé účinky na organismus *Daphnia magna*.

### 2.5.1. Herbicidy

Herbicidy jsou skupina látek spadající pod pesticidy. Jedná se o látky biologicky aktivní, které způsobují zpomalení nebo úplné přerušení růstu a vývoje rostlin. Tyto látky jsou masivně využívány v zemědělství k regulaci plevelů. Používání herbicidů je relativně málo náročné na lidskou práci a také je to finančně nejméně nákladný způsob boje s plevely, ale jejich užívání s sebou nese riziko narušení životního prostředí, kontaminace ekosystémů a potravních řetězců, včetně toho lidského.

Obecně lze říci, že používání pesticidních přípravků za posledních dvacet let kleslo, je to dáno mnoha faktory. K tomuto faktu přispěly nové vědecké poznatky, objevy a technologie ze zahraničí, velký vliv na snížení spotřeby těchto přípravků měla snaha vstoupit ČR do EU, což s sebou neslo povinnost splnit legislativní podmínky EU. Ke snižování spotřeby pesticidů také vedly nové poznatky o jejich škodlivosti a následná záměrná snaha o zmírnění

negativních dopadů pesticidů na životní prostředí. Spotřebu pesticidních přípravků je možné mezinárodně sledovat, ale pro mezinárodní posouzení a srovnání dat, která se týkají používání pesticidů je vhodnější porovnávat hodnoty srovnatelné, například zatížení 1 ha zemědělské půdy.

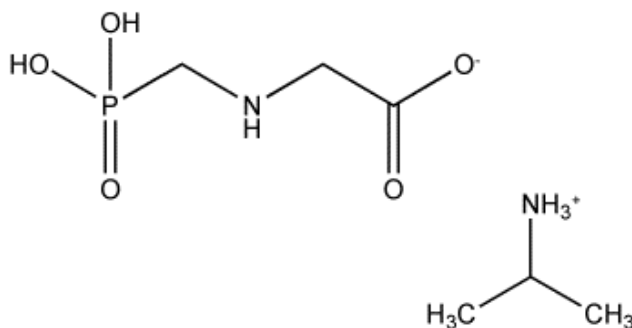
Během posledních dvaceti let byla významně snížena toxicita přípravků na ochranu rostlin. Z celkového počtu 456 registrovaných přípravků v roce 2003 téměř 80 % nespadá do kategorie „vysoce toxický“ nebo „toxický“ podle Nařízení vlády č. 25/1999 Sb., o jedech. Většina přípravků spadá do kategorií „zdravý škodlivý“ nebo „dráždivý“ [62].

Herbicidy působí na rostliny tak, že narušují některý fyziologický proces, který je pro růst a vývoj rostliny nezbytný. Většinou je inhibován jeden nebo více enzymů, které katalyzují některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin.

Herbicidy lze dělit několika způsoby. Z agrochemického hlediska je dělíme na selektivní a totální. Selektivní herbicidy jsou takové, které působí pouze na určitou rostlinu, totální pak hubí všechny rostliny. Z chemického pohledu se jedná o mnoho sloučenin, z nichž můžeme vybrat několik základních typů, například herbicidy s karboxylovou skupinou, karbamáty, přípravky na bázi sulfonylované močoviny, herbicidy s triazinovou skupinou, s heterocyklickým jádrem, difenyethery, deriváty fosforu a mnohé další [63, 64].

#### 2.5.1.1. Izopropylaminová sůl glyfosátu (IPA-sůl GLY)

Tato látka je herbicid na bázi glyfosátu a patří do skupiny herbicidů derivátů fosforu. Jedná se o tzv. totální herbicid, prodáváný pod komerčním názvem Dominator, vyráběný firmou Dow AgroSciences s.r.o. [64, 65].



Obrázek č. 8: Strukturální vzorek izopropylaminové soli glyfosátu [7]

Herbicidy na bázi glyfosátu jsou široce používány, jejich mechanismus toxického účinku na rostliny se zakládá na inhibici enzymu 5-enolpyruvylšikimár-3-fosfátsyntázy. Tento enzym souvisí s biosyntézou aromatických aminokyselin u rostlin. Zablokování tohoto enzymu vede k narušení proteosyntézy a následnému zániku rostliny.

Dříve se předpokládalo, že pro živočichy nejsou glyfosátové herbicidy toxické, a to z toho důvodu, že živočichové nejsou schopni aromatické aminokyseliny biosyntetizovat a získávají je z potravy. Studie prováděné v několika posledních letech však ukazují, že tyto herbicidní přípravky možná tak neškodné nejsou. V roce 2001 zařadila americká EPA (Environmental Protection Agency) glyfosát do kategorie látek pravděpodobně nekarcinogenních. Ovšem krátce na to zveřejněná studie švédských onkologů prokázala, že tato látka může vyvolat rakovinu lymfatického systému. V roce 2008 se Benachour a Séralini ve své studii zabývali

experimentem s lidskými buněčnými kulturami. Prokázali, že glyfosátové herbicidy usmrcují buňky do 24 hodin prostřednictvím inhibice mitochondriální sukcinátdehydrogenázy a vyvolávají apoptózu [66, 67].



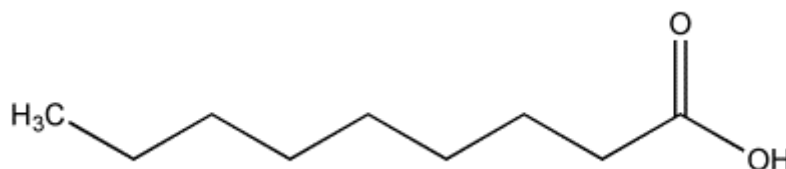
Obrázek č. 9: Balení herbicidu Dominátor [11]

Jak již bylo uvedeno výše, herbicid s účinnou látkou isopropylaminovou solí glyfosátu je prodáván pod názvem Dominátor, koncentrace účinné látky je  $480 \text{ g.l}^{-1}$ . Přípravek je prodáván ve formě koncentráту a je určen pro hubení plevelů.

Jedná se o čirou světle žlutou viskózní kapalinu, rozpustnou ve vodě. Výrobce uvádí, že může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí organismy, je toxická pro řasy ( $1 \text{ mg/l} < \text{LC50} < 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), v rámci akutního testování prakticky netoxická pro ryby a bezobratlovce žijící ve vodě ( $\text{LC50} > 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) [65].

#### 2.5.1.2. Kyselina nonanová

Kyselina nonanová, triviálním názvem kyselina pelargonová patří mezi přírodní neselektivní herbicidy. Jedná se o mastnou kyselinu, která se přirozeně vyskytuje v rostlinách i živočiších. Kyselina pelargonová je účinnou látkou herbicidního přípravku prodáváného pod názvem Finalsan vyráběného firmou Neudorff [68, 69].



Obrázek č. 10: Strukturní vzorec kyseliny nonanové [8]

Účinek kyseliny nonanové je rychlý, kyselina působí na tkáň zelených listů rostlin tak, že odstraňuje jejich voskovou ochrannou vrstvu a proniká do tkáně, způsobuje vysušování buněk a tím pádem úmrtí kontaktované tkáně.

Mastné kyseliny jsou důležitou součástí lidské stravy. Kyselina pelargonová se běžně přirozeně vyskytuje v ovoci, zelenině, mléčných výrobcích, mase a obilí v množství od 0,2 až 400 mg.kg<sup>-1</sup> [68, 70].

Prodává se ve formě koncentráту. Obsah kyseliny pelargonové je 186 g.l<sup>-1</sup>. Jedná se o světle žlutou viskózní kapalinu, dobře rozpustnou ve vodě. Podle informací od výrobce je přípravek biologicky dobře rozložitelný. V bezpečnostním listě herbicidu jsou uvedeny jednotlivé hodnoty toxicity pro vodní organismy: podle subakutního 96 hodinového testu je hodnota LC<sub>50</sub> pro pstruha duhového 100 g.l<sup>-1</sup>, pro organismus *Dafnia magna* je stanovená hodnota NOEC po 48 hodinách 10 g.l<sup>-1</sup> a pro řasu *Desmodesmus subspicatus* byla stanovena hodnota NOEC v testu 72 hodinovém na 20 g.l<sup>-1</sup> [69].



Obrázek č.11: Balení herbicidního prostředku Finalsan [9]

## 2.5.2. Hnojiva

Hnojiva jsou látky které zvyšují úrodnost půdy a podporují růst rostlin. Rostliny potřebují pro svůj růst živiny a ty jim mohou dodat právě hnojiva. Během posledních dvou set let došlo k obrovskému rozmachu civilizace a také značnému rozšíření lidské populace, to vede k potřebě vypěstovat čím dál tím víc plodin.

Zákon o hnojivech definuje hnojivo jako látku obsahující živiny pro výživu kulturních rostlin a lesních dřevin, pro udržení nebo zlepšení půdní úrodnosti a pro příznivé výnosy či kvalitu produkce.

Druhů hnojiv je celá řada: organická, dusíkatá, fosforečná, draselná, vápenatá a mnohá další. Dusíkatá hnojiva patří mezi nejdůležitější a také mezi nejpoužívanější. Mezi nejvýznamnější zástupce patří ledek vápenatý a ledek sodný [21, 71].

### 2.5.2.1. Dusičnany

Během posledních dvou století se naprosto proměnil koloběh dusíku v životním prostředí, a to díky lidské činnosti, která se stala hlavním zdrojem anorganického dusíku v ekosystémech. Hlavními antropogenními zdroji anorganického dusíku jsou chovné farmy zvířat, průmyslové odpady a zejména hojně využívání dusíkatých hnojiv v zemědělství a

masivní spalování fosilních paliv – zvláště díky těmto dvěma posledním faktorům se významně zvýšila atmosférická depozice dusíku, hlavně ve formě dusičnanů.

Dusičnany se vyskytují ve všech vodách, jejich koncentrace se neustále zvyšuje a to v přímém důsledku zvyšujícího se počtu obyvatel a rozmáhající se zemědělské činnosti.

Do povrchových vod dusičnany jsou transportovány zejména splachem z polí, do podzemních vod přechází půdním průsakem. Koncentrace dusičnanů v přírodních vodách je závislá na vegetačním období. Nejnižší koncentrace dusičnanů ve vodách bývá v letním, tj. vegetačním období, kdy jsou odčerpávány z půdy, nejvyšší pak v zimním, tj. mimovegetačním období. Dusičnany jsou také konečným produktem mineralizace organického dusíku, za oxických podmínek jsou stabilní. Pokud je ale ve vodách deficit kyslíku, podléhají denitrifikaci a vzniká elementární dusík respektive oxid dusný.

Dusičnany samy o sobě nejsou příliš toxické. Mohou ovšem být nebezpečné nepřímo, v gastrointestinálním traktu totiž může docházet prostřednictvím bakteriální činnosti k jejich redukcí na mnohem více toxické dusitany. Dusitany reagují s hemoglobinem za vzniku methemoglobinu, který není schopen v krvi transportovat kyslík [72, 73].

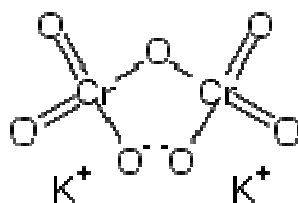
Dusičnany jsou v životním prostředí velmi mobilní. Ačkoli do prostředí vstupují ve formě solí ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  a další), tak ve vodním prostředí rychle disociují. Dusičnany se nevážou v půdách ani na částicích ve vodě, a proto jsou vodou snadno transportovány. Dusičnany patří mezi základní živiny rostlin. Jejich vysoký obsah ve vodních ekosystémech může přispět k nadměrnému růstu vodních rostlin a řas. Řasy snižují obsah kyslíku ve vodách, to může mít dopad na vodní organismy, které budou mít k dispozici málo kyslíku pro přežití a následně dochází k eutrofizaci vod, některé řasy produkují toxiny, které jsou pro vodní organismy nebezpečné. Nadměrné množství dusičnanů je přímo škodlivé pro vodní živočichy. Vodní bezobratlí a ryby, které jsou vystaveny účinkům dusičnanů, dorůstají menších velikostí, pomaleji dospívají a snižuje se jejich reprodukce. Extrémně velké koncentrace dusičnanů mohou vést až k úmrtí vodních živočichů. Toxicita dusičnanů se pro vodní bezobratlé zvyšuje s jejich rostoucími koncentracemi a s opakovaním expozicí. Naopak se toxické účinky dusičnanů pro bezobratlé snižují s rostoucí velikostí těla a s rostoucí slaností vody [53, 73, 74].

Tabulka č. 1: Vlastnosti vybraných dusičnanů [74, 75]

| Vlastnosti   | NaNO <sub>3</sub>          | KNO <sub>3</sub>          |
|--|----------------------------|---------------------------|
| Skupenství   | Pevné                      | Pevné                     |
| Barva  | Bezbarvá                   | bezbarvá, bílá            |
| Zápach   | bez zápachu                | bez zápachu               |
| Oxidační vlastnosti  | silné oxidační činidlo     | silné oxidační činidlo    |
| Rozpustnost ve vodě při 20 °C (g.l <sup>-1</sup> )                           | 880                        | 320                       |
| Hustota (g.cm <sup>-3</sup> )  | 2,26                       | 2,11                      |
| Ekotoxikologické informace   | NaNO <sub>3</sub>          | KNO <sub>3</sub>          |
| 96hLC <sub>50</sub> ryby (mg.l <sup>-1</sup> )<br><i>Ictalurus punctatus</i> | 6200                       | 162                       |
| dafnie (mg.l <sup>-1</sup> )<br><i>Daphnia magna</i>                         | 48hEC <sub>50</sub> – 3581 | 48hLD <sub>50</sub> – 226 |

### 2.5.3. Dichroman draselný

Toxicita sloučenin chromu je závislá na oxidačním stupni. Sloučeniny chromičité nejsou téměř vůbec toxické, soli chromnaté a chromité mohou vyvolat alergické reakce, jsou dráždivé pro sliznice trávicího traktu a pro pokožku, ale mají nízkou toxicitu. Nejtoxikější formy chromu mají oxidační stupeň +6. Oxid chromový, chromany a dichromany způsobují vředy na kůži a v žaludku, silně dráždí pokožku a sliznice. Šestimocný chrom vyvolává silné alergické reakce, má hepatotoxické a nefrotoxické účinky, je karcinogenní a mutagenní [1, 16].



Obrázek č. 11: Strukturální vzorec dichromanu draselného [10]

Dichroman draselný (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) je pevná látka oranžové barvy bez zápachu. Jedná se o silné oxidační činidlo, je dobře rozpustný ve vodě (při 20 °C 130 g.l<sup>-1</sup>). Toxikologické údaje, uvedené v bezpečnostním listě nám říkají, že dichroman draselný je toxický zejména pro vodní bezobratlé organismy, byla stanovena hodnota EC<sub>50</sub> po 48 hodinách pro *Daphnia magna* na 0,77 mg.l<sup>-1</sup>, pro ryby (*Pimephales promelas*) je stanovena hodnota LC<sub>50</sub> po 96 hodinách 26,13 mg.l<sup>-1</sup>. Vzhledem k vysoké ekotoxikologické nebezpečnosti nesmí být látka vypouštěna do půdy, veřejné kanalizace ani do blízkosti zdrojů vody [77].





*Obrázek č. 12: Dichroman draselný*

Dichroman draselný je nejčastěji používanou referenční látkou v testech akutní toxicity na vodních organismech. Zejména účinek dichromanu draselného na ryby byl a stále je detailně prozkoumáván. Studie jsou zaměřeny na šestimocný chrom z toho důvodu, že se jedná o nejtoxičtější formu prvku [78].

Je předpoklad, že toxicita šestimocného chromu na vodní bezobratlé je závislá na několika faktorech, jako je suma vápníku a hořčíku obsažená ve vodě, pH a teplota vody. V dlouhodobějších testech byla prokázána menší závislost toxicity látky na těchto parametrech [79].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem diplomové práce bylo posoudit akutní a chronickou toxicitu látek patřících do skupiny herbicidů a pesticidů. Jednalo se o účinné látky komerčně prodávaných herbicidů, a to o kyselinu nonanovou která je účinnou látkou výrobku Finalsan od firmy W.Neudorff GmbH KG a isopropylaminovou sůl glyfosátu, která je účinnou látkou výrobku Dominátor od firmy Dow AgroSciences s.r.o. Ze skupiny běžně používaných hnojiv byl testován dusičnan draselný a dusičnan sodný. Součástí práce bylo také určit chronickou toxicitu dichromanu draselného, který je pro akvatické prostředí velice toxický a je v akutních testech používán jako standard. Testy byly prováděny na organismu *Daphnia magna*. Rovněž byla v rámci diplomové práce testována dvě media doporučována pro chov dafnií z hlediska lepší porodnosti dafnií.

#### 3.1. Přístroje a zařízení

Pro účely diplomové práce byly používáno nejen běžné laboratorní sklo, ale i následující

- váhy SCALTEC SPB 31
- sušárna Binder
- pHmetr Stirrer OP – 951
- laboratorní teploměr
- inkubátor Nüve Cooled Incubator ES 110 – inkubace bez osvětlení
- oxymetr Greininger GNH 3610
- luxmetr Tecpel 536
- inkubátor typu Novital CO Vatutto 20 – inkubace s osvětlením
- chemikálie čistoty p.a.

#### 3.2. Chov v mediu M4 a M7 – porovnání porodnosti

Norma ČSN ISO 10706 – Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) doporučuje pro stanovení chronické toxicity médium M4 a jeho modifikaci M7.

V rámci diplomové práce byl zkoumán vliv obou médií na chov perlooček.

##### 3.1.2. Příprava médií M4 a M7

###### 3.1.1.1. Použité chemikálie

Přehled chemikálií pro na přípravu médií M4 a M7 je včetně jejich potřebných množství uveden v tabulce č. 2.

###### 3.1.1.2. Pracovní postup

Jednotlivé zásobní roztoky jsou skladovány v lednici. Pomocí pipet z nich bylo odebráno potřebné množství a nadávkováno do zásobní lahve na médium a doplněno na objem 10 l destilovanou vodou. Abychom předešli reakcím mezi jednotlivými chemikáliemi, byly chemikálie dávkovány do 2 až 3 litrů destilované vody.

Srovnání vhodnosti obou médií bylo prováděno po 34 dnů. První den experimentu bylo do dvou akvárií s médii M4 a M7 nasazeno pět samic *Daphnia magna*. Byl sledován počet narozených potomků, kteří byli z akvárií odebírání. Samozřejmě, že během pokusu byly

chovy běžně krmeny zelenou řasou *Desmodesmus subspicatus*. Pozorování bylo několikrát opakováno.

Tabulka č. 2: Rozpis jednotlivých solí pro přípravu médií [6, 34]

| Zásobní roztoky | Chemické složení                                    | mg v 1 litru hotového média |        | mg.l <sup>-1</sup> pro přípravu 1 litru zásobního roztoku |        | ml zás. roztoku pro přípravu 1 l média |
|-----------------|---|-----------------------------|--------|---|--------|--|
|                 |   | M4                          | M7     | M4  | M7     |  |
| 1               | Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O <sup>a</sup> | 2,5                         | 0,625  | 5000  | 1250   | 0,5                                    |
|                 | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>   | 0,995                       | 0,2488 | 1991  | 497,75 |  |
| 2               | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 2,85                        | 0,7125 | 5719  | 1430   | 0,5                                    |
| 3               | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 0,36                        | 0,09   | 721   | 180,25 | 0,5                                    |
| 4               | LiCl  | 0,31                        | 0,0775 | 612   | 153    | 0,5                                    |
| 5               | RbCl  | 0,07                        | 0,0175 | 142   | 35,5   | 0,5                                    |
| 6               | SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,15                        | 0,0375 | 304   | 76     | 0,5                                    |
| 7               | NaBr  | 0,016                       | 0,004  | 32  | 8      | 0,5                                    |
| 8               | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,063                       | 0,0158 | 126   | 31,5   | 0,5                                    |
| 9               | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,017                       | 0,0043 | 33  | 8,25   | 0,5                                    |
| 10              | ZnCl <sub>2</sub>                                   | 0,013                       | 0,013  | 26  | 26     | 0,5                                    |
| 11              | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,01                        | 0,01   | 20  | 20     | 0,5                                    |
| 12              | KI  | 0,0033                      | 0,0033 | 6,5   | 6,5    | 0,5                                    |
| 13              | Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                    | 0,0022                      | 0,0022 | 4,38  | 4,38   | 0,5                                    |
| 14              | NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>                     | 0,0006                      | 0,0006 | 1,15  | 1,15   | 0,5                                    |
| 15              | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 293,8                       | 293,8  | 29380   | 29380  | 10                                     |
| 16              | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 123,3                       | 123,3  | 12330   | 12330  | 10                                     |
| 17              | KCl   | 0,58                        | 0,58   | 580   | 580    | 10                                     |
| 18              | NaHCO <sub>3</sub>                                  | 64,8                        | 64,8   | 6480  | 6480   | 10                                     |
| 19              | Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O | 10                          | 10     | 1000  | 1000   | 10                                     |
| 20              | NaNO <sub>3</sub>                                   | 0,274                       | 0,274  | 27,4  | 27,4   | 10                                     |
| 21              | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,143                       | 0,143  | 14,3  | 14,3   | 10                                     |
| 22              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 0,184                       | 0,184  | 18,4  | 18,4   | 10                                     |
| 23              | Thiamin HCl <sup>b</sup>                            | 0,0075                      | 0,0075 | 75  | 75     | 10                                     |
| 24              | Cyanocobalamin <sup>b</sup>                         | 0,001                       | 0,001  | 1   | 1      | 10                                     |
| 25              | Biotin <sup>b</sup>                                 | 0,00075                     | 0,0008 | 0,75  | 0,75   | 10                                     |

Roztoky označené indexem <sup>a</sup> je potřeba spolu smíchat a nechat autoklávovat, vznikne Fe-EDTA. Roztoky označené indexem <sup>b</sup> se rozpustí, vniklý roztok je skladován zmražený [34].

### 3.1.1.3. Vyhodnocení

Pro hodnocení obou médií byla jako parametr použita míra porodnosti dafnií pro posouzení vhodnějšího média, které následně bylo vybráno pro další chov a pro provedení chronických testů.



Obrázek č.13: Akvária s chovem *Daphnia magna*

### 3.2. Akutní imobilizační test na *Daphnia magna*

Akutní imobilizační test je zkouška akutní toxicity látek, vychází normy ČSN EN ISO 6341 – Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity.

Cílem zkoušky je stanovení akutní toxicity zkoušené látky na organismu *Daphnia magna* a určení ekotoxikologického indexu  $EC_{50}$ .

#### 3.2.1. Princip zkoušky

Je sledována imobilizace organismu *Daphnia magna*, který je vystaven působení testované látky v různých koncentracích po dobu 48 hodin. Perloočky nasazované do testu jsou mladší 24 hodin, získané acyklickou parthenogenezí, nejméně třetí generace [5, 40].

#### 3.2.2. Použité chemikálie

Příprava ředící vody:  $CaCl_2$ ,  $NaHCO_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $KCl$ . Standard:  $K_2Cr_2O_7$

Pro přípravu ředící vody je použita destilovaná nebo demineralizovaná voda s konduktivitou do  $1 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ .

#### 3.2.3. Postup

Ředící voda byla připravena podle ISO 6341 pro testy toxicity na perloočkách. Následujícím způsobem byly připraveny zásobní roztoky solí:

Roztok 1:  $CaCl_2$  11,75 g bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou do 1 litru.

Roztok 2:  $MgSO_4$  4,93 g bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou do 1 litru.

Roztok 3:  $NaHCO_3$  2,59 g bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou do 1 litru.

Roztok 4:  $KCl$  0,23 g bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou do 1 litru.

Na litr ředící vody bylo z každého zásobního roztoku odebráno 25 ml a doplněno destilovanou vodou. Takto připravená ředící voda byla 24 hodin provzdušňována, poté se nechala odstát a bylo změřeno pH.

Byly připraveny koncentrační řady pro jednotlivé látky a také pro standard dichroman draselný. Jednotlivé koncentrace byly připraveny dvacetkrát vyšší, jelikož při nasazování testu dochází k dvacetinásobnému zředění.

Do plastových testovacích desek bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  z každého připraveného roztoku a 9500  $\mu\text{l}$  ředící vody, u každého testu byla nasazena kontrola, kam bylo pipetováno 10 ml ředící vody. Do takto připravených komůrek byly z rozplavovacích komůrek, které jsou součástí testovací desky, přeneseny dafnie. Do jedné komůrky vždy pět jedinců, každá koncentrace byla nasazována čtyřikrát, tzn. 20 jedinců na jednu koncentraci. Zároveň byl nasazen i test na dichroman draselný. U každého nasazeného testu byla zaznamenána teplota a pH roztoků a obsah rozpuštěného kyslíku. Desky byly překryty parafilmem, uzavřeny víčkem, označeny a vloženy do inkubátoru s nastavenou teplotou na  $20 \pm 2$  °C. Desky byly ponechány ve tmě. Během testu nebyly dafnie krmeny řasovou suspenzí [5, 40].

### 3.2.5. Validace testu

Aby mohly být výsledky považované za platné, je nutno splnit tato kritéria:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích je na konci testu větší nebo rovna  $2 \text{ mg.l}^{-1}$
- koncentrace testované látky během testu neklesne pod 80 % nominální koncentrace
- Imobilizace kontrolních samiček je menší nebo rovna 10 %
- Zjištěná hodnota  $24\text{hEC}_{50} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  je v rozsahu od 0,6 do  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$  [5, 40]

### 3.2.6. Vyhodnocení

Po 24 a 48 hodinách byl proveden odečet imobilizovaných organismů v jednotlivých koncentracích a kontrole. Byla zaznamenána teplota, pH a obsah rozpuštěného kyslíku.

Samotné vyhodnocení a vypočítání hodnot  $\text{EC}_{50}$ , popřípadě jiných ekotoxikologických indexů bylo provedeno pomocí probitové analýzy. Probitové hodnoty (viz příloha, tabulka 1) byly vyneseny do grafu proti logaritmu koncentrací. Vynesením kolmice do grafu proti probitové hodnotě 5, byly odečteny logaritmy koncentrací, po následném odlogaritmování byla dosažena hodnota  $\text{EC}_{50}$ , popřípadě  $\text{EC}_{40}$  [5].



Obrázek č. 14: Nasazený test akutní toxicity před vložením do inkubátoru

### 3.3. Test chronické toxicity

Vychází z normy ČSN ISO 10706 – Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*), která definuje postup stanovení chronické a subletální toxicity chemických látek a vod pro perloočky *Daphnia magna*.

Cílem testu je sledování přežívání a reprodukčního výtěžku mateřských organismů v testovaných látkách a porovnání s mateřskými organismy v kontrole [6].

#### 3.3.1. Princip zkoušky

Samičky *Daphnia magna* mladší 24 hodin (získané acyklickou parthenogenezí nejméně třetí generace) jsou vystaveny působení testované látky v různých koncentracích po dobu 21 dní. Zkouška probíhá buď jako průtočná nebo obnovovací. V případě této diplomové práce byly testy nasazovány v obnovovací variantě [6].

#### 3.3.2. Použité chemikálie

Chemikálie potřebné pro přípravu média M4, viz. tabulka 2, kapitola 3.1.1.1.  
Testované herbicidy, dusičnany a dichroman draselný.

#### 3.3.3. Postup

Byly připraveny koncentrační řady testovaných látek. Koncentrace byly připraveny dvacetkrát vyšší, jelikož při nasazování testy dochází k jejich dvacetinásobnému zředění. Pro testované organické látky byly jako testovací nádoby použity 100 ml kádinky, pro látky anorganického původu byly jako testovací nádoby použity plastové kelímky. Do testovacích nádob bylo pipetováno 2,5 ml testovaných koncentrací, každá koncentrace v deseti opakováních. Poté byl objem roztoků doplněn médiem M4 na objem 50 ml. Samičky *Daphnia*

*magna* (mladší 24 hodin) byly nasazeny do testovacích nádob po jednom jedinci. Teplota byla při zkouškách udržována v rozsahu 20 – 22 °C, pH roztoků bylo v rozsahu 6 – 9. Při testech byla nastavena fotoperioda 16 hodin světla a 8 hodin tmy při intenzitě světla 600 - 800 lux. Každý druhý den byly roztoky testovaných látek vyměňovány a bylo prováděno krmení. Dafnie byly krmeny suspenzí zelených řas *Desmodesmus subspicatus* [6].

### 3.3.4. Validace testu

Aby mohl být test považován za platný, je nutné splnit následující požadavky:

- celkový počet organismů v kontrolách, který vykazuje úhyn dospělých a vývoj v samce je na konci testu menší nebo roven 20 %
- průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je větší nebo roven 60.
- variační koeficient porodnosti (počet potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách není větší jak 20 % [6]

### 3.3.5. Vyhodnocení

Byly spočítány celkové počty potomků pro každý mateřský organismus, poté byly spočteny průměrné hodnoty počtu potomků na mateřský organismus v každé koncentraci. Reprodukční výtěžek je vyjádřen jako celkový počet živých potomků na živý mateřský organismus.

Dále byla vyhodnocena mortalita testovacích organismů a porovnána s kontrolou. Na základě probitové analýzy byly vypočteny ekotoxikologické indexy EC<sub>50</sub>, popřípadě EC<sub>40</sub>.



Obrázek č. 15: Nasazený test chronické toxicity (IPA-sůl glyfosátu)



Obrázek č. 16: Nasazené testy chronické toxicity (kys. nonanová a  $\text{NaNO}_3$ )

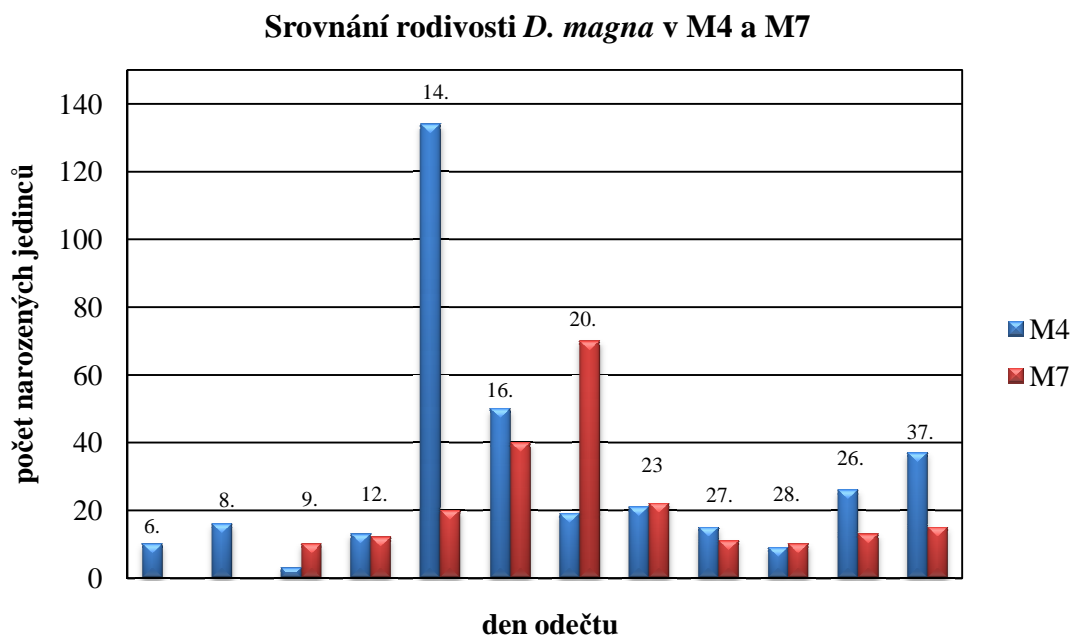


## 4. VÝSLEDKY

Vybrané testované látky – vybrané herbicidy, dusičnanová hnojiva a dichroman draselný byly hodnoceny pomocí testů akutní a chronické toxicity na organismu *Daphnia magna*. Testy byly prováděny s ředícím médiem M4. Veškeré výsledky jsou pro lepší přehlednost shrnuty do tabulek a grafů.

### 4.1. Média M4 a M7 – porovnání vhodnosti pro chov

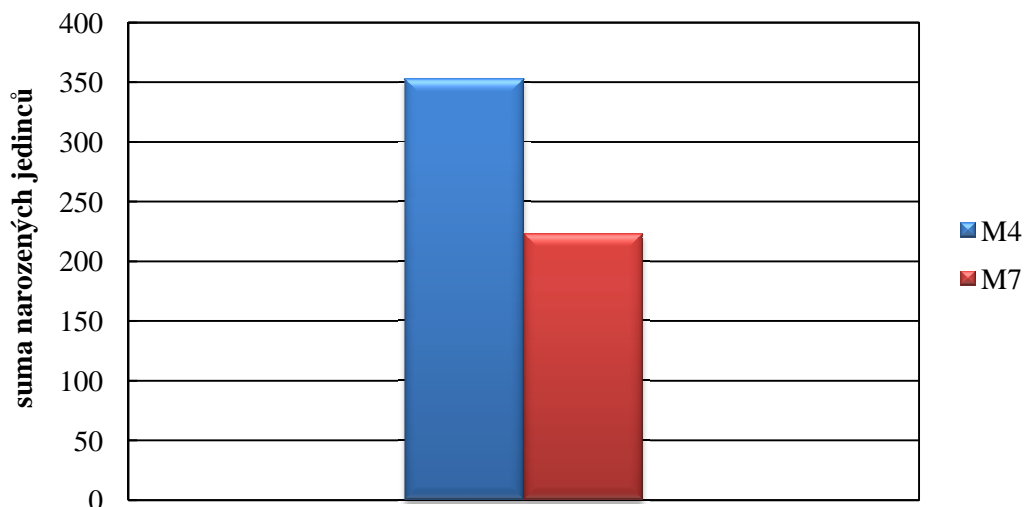
Vzhledem k tomu, že norma ČSN ISO 10706, která je metodickým návodem pro testování chronické toxicity doporučuje dvě média pro provedení testů, bylo řešeno porovnání jejich vhodnosti použití pro testy chronické toxicity v podmínkách naší laboratoře. Jako ukazatel rozhodující o vhodnosti media byla zvolena rodivost jedinců v jednotlivých médiích. Grafy 1 a 2 znázorňují srovnání porodnosti *D. magna* v jednotlivých médiích, a to jak pro jednotlivé odečítací dny, tak pro průměrný konečný počet neonatů na dané médium (graf 2). V grafu č. 1 označují čísla nad vykreslenými daty den odečtu. Jak je z grafu č. 1 patrné, první jedinci se narodili 7. den v médiu M4, v médiu M7 se první potomstvo narodilo až devátý den.



Graf č. 1: Počty narozených jedinců odebíraných mateřským organismům v M4 a M7

Jak vyplývá z grafů, v podmínkách naší laboratoře se médium M4 prokázalo jako vhodnější pro chov perlooček *Daphnia magna*. Toto médium bylo rovněž využito v testech chronické toxicity

## Srovnání celkových počtů nově narozených v M4 a M7



Graf č. 2: Srovnání celkových počtů narozených potomků v jednotlivých médiích

### 4.2. Testy akutní imobilizace

Testy imobilizace *Daphnia magna* byly provedeny v plastových testovací destičkách, bez aerace, osvětlení a krmení. Teplota se během testů pohybovala mezi 20 a 21 °C. Uvšech testů bylo dodrženo rozpětí pH i minimální hodnota obsahu rozpuštěného kyslíku. Hodnota 24hEC<sub>50</sub> pro dichroman draselný byla stanovena na 1,67 mg.l<sup>-1</sup>.

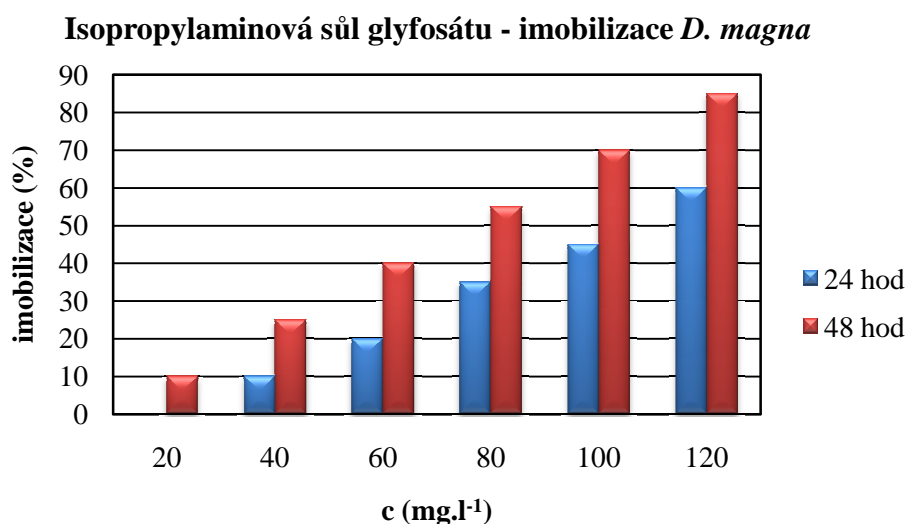
V následujících tabulkách 3 – 6 jsou uvedeny počty a procenta imobilizovaných jedinců v jednotlivých koncentracích pro jednotlivé testované látky. V grafech 3 – 6 jsou porovnány imobilizace perloček v různých koncentracích po 24 a 48 hodinách, z nichž jasně vyplývá závislost imobilizace počtu jedinců na koncentraci testované látky a čase, kdy počet imobilizovaných jedinců s rostoucí koncentrací a s časem roste.

#### 4.2.1. Isopropylaminová sůl glyfosátu (herbicidní přípravek Dominátor)

V tabulce č. 3 jsou uvedeny počty a procenta imobilizovaných jedinců nasazených do testu akutní toxicity komerčně prodáváného přípravku proti plevelům Dominátor s účinnou látkou, kterou je v tomto případě isopropylaminová sůl glyfosátu. Jak z této tabulky vyplývá již po 24 hodinách expozice došlo k významné imobilizaci testovacích organismů. V rámci testu nedošlo k úhynu žádného organismu v kontrole. Tyto výsledky zobrazené v grafu 3. jasně prokazují zvyšující se toxikologický účinek v závislosti na koncentraci testované isopropylaminové soli glyfosátu na testovací organismus. Byla stanovena hodnota EC<sub>50</sub> pro 24 i pro 48 hodinovou expozici.

Tabulka č. 3: Počty a procenta imobilizovaných jedinců pro isopropylaminovou sůl glyfosátu

| Koncentrace<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | Imobilizace       |    |                   |    |
|--------------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|
|                                      | Expozice 24 hodin |    | Expozice 48 hodin |    |
|                                      | ks                | %  | ks                | %  |
| 20                                   | 0                 | 0  | 2                 | 10 |
| 40                                   | 2                 | 10 | 5                 | 25 |
| 60                                   | 4                 | 20 | 8                 | 40 |
| 80                                   | 7                 | 35 | 11                | 55 |
| 100                                  | 9                 | 45 | 14                | 70 |
| 120                                  | 12                | 60 | 17                | 85 |



Graf č. 3: Porovnání imobilizace *D. magna* v jednotlivých koncentracích po 24 a 48 hodinách

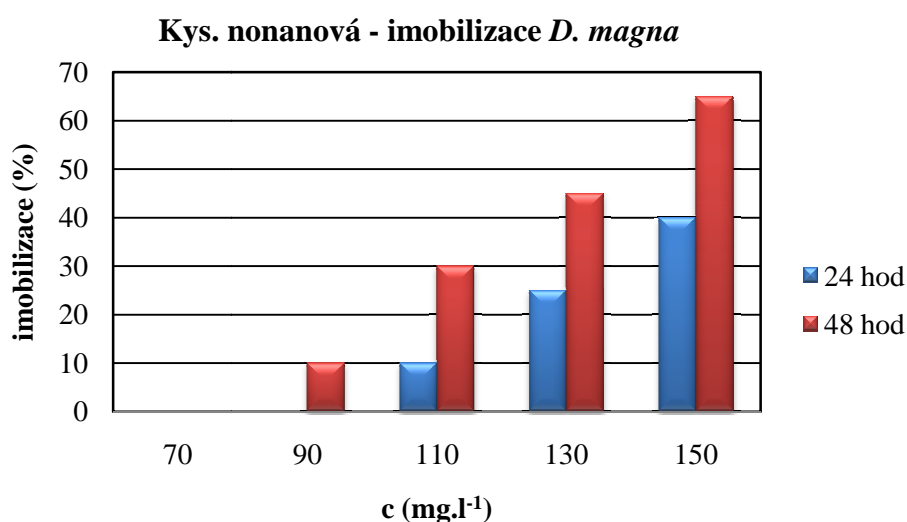
#### 4.2.2. Kyselina nonanová (herbicidní přípravek Finalsan)

Tabulka č. 4 uvádí počty a procenta imobilizovaných jedinců nasazených do testu akutní toxicity komerčně prodáváného přípravku proti plevelům Finalsanu s účinnou látkou kyselinou nonanovou. Grafické znázornění závislosti zvyšující se mortality na rostoucí koncentraci testované látky po 24 a 48 hodinách je uvedeno v grafu 4.

Již v rámci 24 hodinové expozice byly v nejvyšších koncentracích zaznamenány imobilizované organismy. Přesto nebyl úhyn natolik markantní, aby bylo možné určit hodnotu 24EC<sub>50</sub>, proto byl vyhodnocen pouze index 24EC<sub>40</sub> a 48EC<sub>50</sub>. V rámci tohoto testu nedošlo k žádnému úhynu v kontrole.

Tabulka č. 4: Počty a procenta imobilizovaných jedinců pro kyselinu noniovou

| Koncentrace<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | Imobilizace       |    |                   |    |
|--------------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|
|                                      | Expozice 24 hodin |    | Expozice 48 hodin |    |
|                                      | ks                | %  | ks                | %  |
| 70                                   | 0                 | 0  | 0                 | 0  |
| 90                                   | 0                 | 0  | 2                 | 10 |
| 110                                  | 2                 | 10 | 6                 | 30 |
| 130                                  | 5                 | 25 | 9                 | 45 |
| 150                                  | 8                 | 40 | 13                | 65 |



Graf č. 4: Porovnání imobilizace *D. magna* v jednotlivých koncentracích po 24 a 48 hodinách

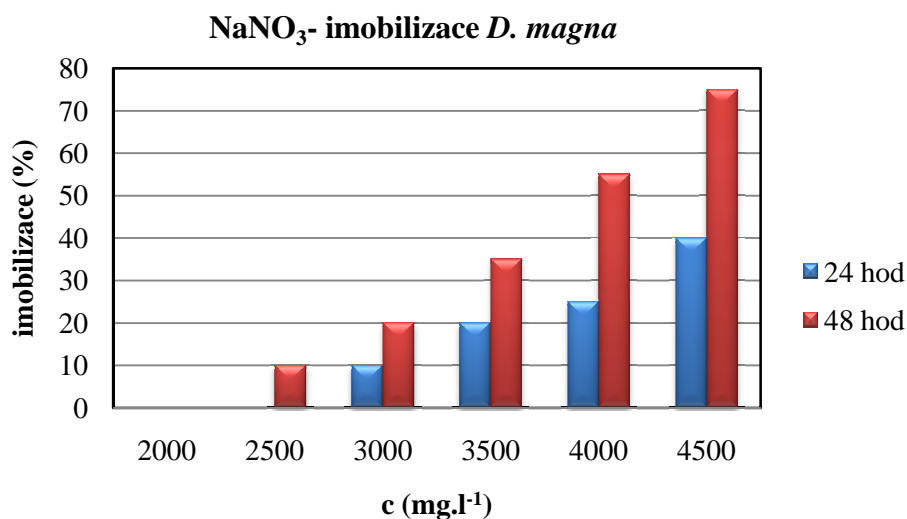
#### 4.2.3. Dusičnan sodný NaNO<sub>3</sub>

Nasazované koncentrace dusičnanu sodného jsou o mnoho vyšší než je limitní koncentrace 100 mg.l<sup>-1</sup>. Přesto je z tabulky č. 5 patrné, že ani koncentrace 2000 mg.l<sup>-1</sup> není pro testovací organismus toxická z hlediska krátkodobého účinku.

Pomocí probitové analýzy byly vypočteny ekotoxikologické indexy 24EC<sub>40</sub> a 48EC<sub>50</sub>. Ani u tohoto testu nedošlo k úhynu jedinců v kontrole.

Tabulka č. 5: Počty a procenta imobilizovaných jedinců pro dusičnan sodný

| Koncentrace<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | Imobilizace       |    |                   |    |
|--------------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|
|                                      | Expozice 24 hodin |    | Expozice 48 hodin |    |
|                                      | ks                | %  | ks                | %  |
| 2000                                 | 0                 | 0  | 0                 | 0  |
| 2500                                 | 0                 | 0  | 2                 | 10 |
| 3000                                 | 2                 | 10 | 4                 | 20 |
| 3500                                 | 4                 | 20 | 7                 | 35 |
| 4000                                 | 5                 | 25 | 11                | 55 |
| 4500                                 | 8                 | 40 | 15                | 75 |



Graf č. 5: Porovnání imobilizace *D. magna* v jednotlivých koncentracích po 24 a 48 hodinách

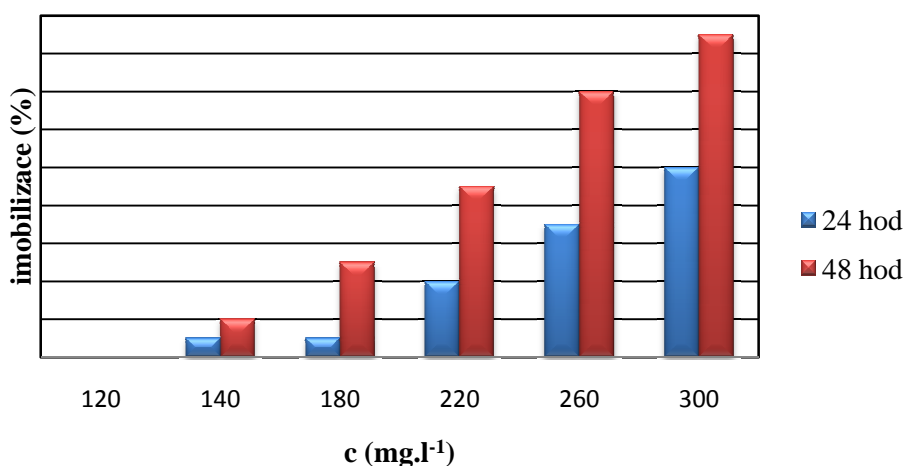
#### 4.2.4. Dusičnan draselný KNO<sub>3</sub>

Dusičnan draselný je oproti dusičnanu sodnému pro testovací organismus daleko více toxický, přesto i jeho akutní účinky jsou nad limitní hodnotou 100 mg.l<sup>-1</sup>. I pro tuto látku byly stanoveny koncentrace EC: pro 24EC<sub>40</sub> a 48EC<sub>50</sub>.

Tabulka č. 6: Počty a procenta imobilizovaných jedinců pro dusičnan draselný

| Koncentrace<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | Imobilizace       |    |                   |    |
|--------------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|
|                                      | Expozice 24 hodin |    | Expozice 48 hodin |    |
|                                      | ks                | %  | ks                | %  |
| 120                                  | 0                 | 0  | 0                 | 0  |
| 140                                  | 1                 | 5  | 2                 | 10 |
| 180                                  | 1                 | 5  | 5                 | 25 |
| 220                                  | 4                 | 20 | 9                 | 45 |
| 260                                  | 7                 | 35 | 14                | 70 |
| 300                                  | 10                | 50 | 17                | 85 |

KNO<sub>3</sub> - imobilizace *D. magna*



Graf č. 6: Porovnání imobilizace *D. magna* v jednotlivých koncentracích po 24 a 48 hodinách

### 4.3. Testy chronické toxicity

Testy chronické toxicity byly prováděny ve formě obnovovací zkoušky. Obnova roztoků probíhala každý druhý den, společně s krmením. Teplota se během testu pohybovala v rozmezí 20 až 22 °C. Hodnoty pH se pro každou látku lišily, ale byly v rozmezí 6 až 9, hodnota pH se u zkoušených roztoků nezměnila víc jak o 1 jednotku. Obsah rozpuštěného kyslíku v roztocích kolísal mezi jednotlivými obnovami, podmínka minimálního obsahu rozpuštěného kyslíku (3 mg.l<sup>-1</sup>) však byla dodržena. Byla stanovena suma vápníku a hořčíku ředícího média na hodnotu 152 mg.l<sup>-1</sup>. Během testů byla nastavena fotoperioda na 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Intenzita osvětlení během testu byla v rozmezí 600 až 800 lux.

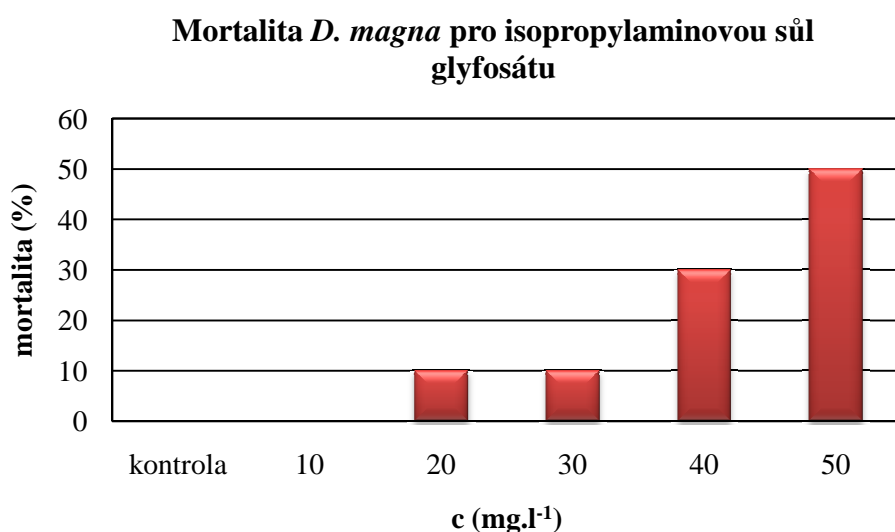
Na následujících grafech 7 – 16 je znázorněna závislost mortality a rodivosti na koncentraci jednotlivých látek na konci testovacího období. Ze všech grafů je patrné, že s rostoucí koncentrací stoupá mortalita jedinců a klesá rodivost. Tento trend však nebyl během průběhu testu pozorovatelný ve všech případech. Na přelomu prvního a druhého týdne testu se u herbicidního přípravku Finalsán (účinná látka kyselina nonanová) projevila krátkodobá stimulace porodnosti u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrace 40 mg.l<sup>-1</sup> v té době nevykazovala

velké odchylky od kontroly, zatímco u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup> se porodnost viditelně zvedla a po několik dnů byla nejvyšší.

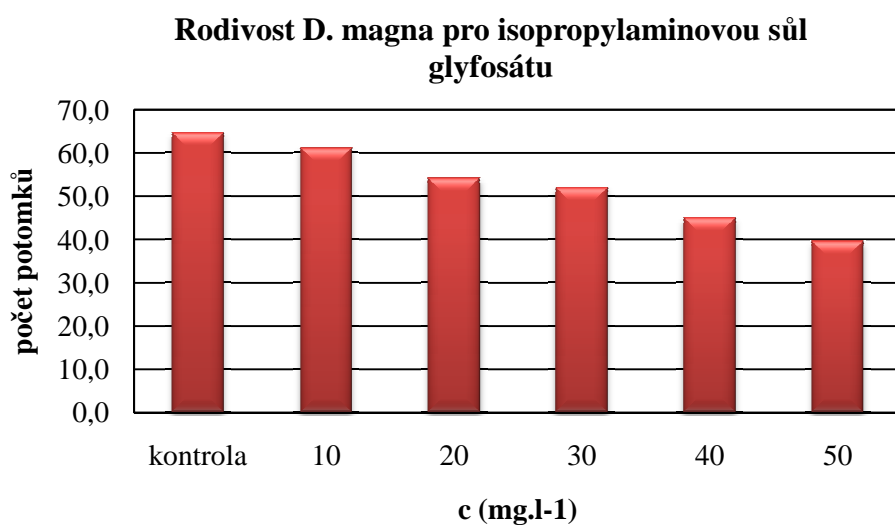
U žádné z dalších testovaných látek k podobnému jevu nedošlo, porodnost se postupně během testu snižovala, a většina zemřelých mateřských jedinců uhynula během posledních dnů testu.

#### 4.3.1. Isopropylaminová sůl glyfosátu (herbicidní přípravek Dominátor)

V grafech 7 a 8 je zaznamenána závislost mortality a rodivosti na koncentraci testované látky. Dafnie počaly v nejnižší koncentraci rodit sedmý den od nasazení do testu, nejvyšší pak devátý den. Byl zaznamenán úhyn jedinců zejména pak v posledních dnech probíhajícího testu. V kontrole nebyl žádný uhynulý mateřský organismus. Byla vypočtena hodnota EC<sub>40</sub>.



Graf č. 7: Mortalita *D. magna* pro isopropylaminovou sůl glyfosátu (přípravek Dominátor)



Graf č. 8: Rodivost *D. magna* pro isopropylaminovou sůl glyfosátu (přípravek Dominátor)

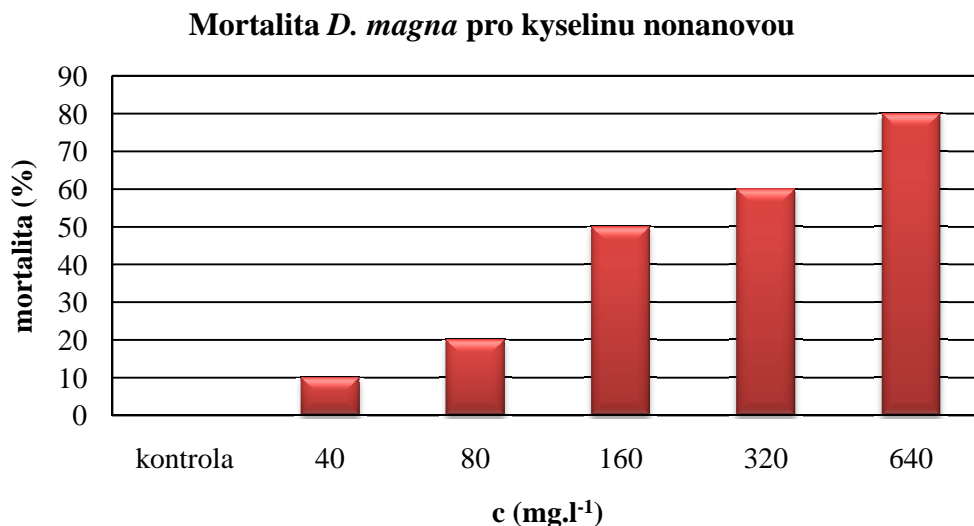
#### 4.3.2. Kyselina nonanová (herbicidní přípravek Finalsan)

Kyselina nonanová je přírodním herbicidem, který je využívám proti plevelu. Přesto, že se jedná o přírodní látku, má toxické účinky na životní prostředí. U všech testovaných látek byla zaznamenána závislost mortality a počtu potomků na koncentraci. Čím vyšší byla testovaná koncentrace tím také byla vyšší úmrtnost a menší porodnost.

Tak tomu však nebylo ve všech případech. Jak již bylo zmíněno, na přelomu prvního a druhého týdne testu se u kyseliny nonanové projevila krátkodobá stimulace porodnosti u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrace 40 mg.l<sup>-1</sup> v té době nevykazovala velké odchylky od kontroly, zatímco u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup> se porodnost viditelně zvedla a po několik dnů byla nejvyšší, tento jev však není v grafu č. 9, který shrnuje situaci za celé testovací období, patrný. Je to z toho důvodu, že se poté porodnost u této koncentrace rapidně snížila a došlo v ní k prvnímu úhynu jedince v rámci celého testu. Krátkodobé rapidní zvýšení porodnosti u jedné koncentrace přípravku Finalsanu je znázorněno v grafu č. 11, který vykresluje průměrné porodnosti v jednotlivých koncentracích všech testovaných látek mezi 7. a 11. dnem. Sedmý den se poprvé projevila zvýšená porodnost u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup>, jedenáctý den je patrný propad.

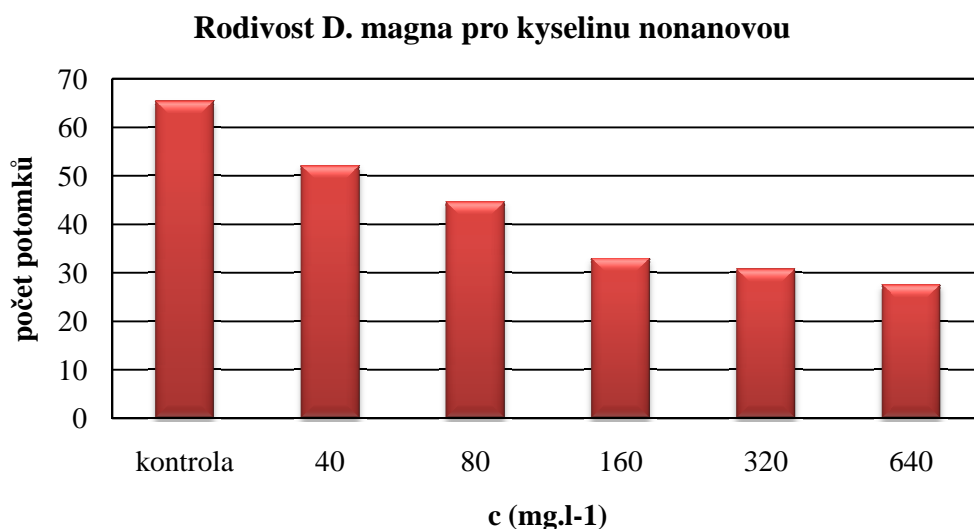
U žádné z dalších testovaných látek k podobnému jevu nedošlo, porodnost se postupně během testu snižovala, a většina zemřelých mateřských jedinců uhynula během posledních dnů testu.

V kontrole nedošlo k uhynutí žádného organismu. Byla vypočtena hodnota ekotoxikologického indexu EC<sub>50</sub>.

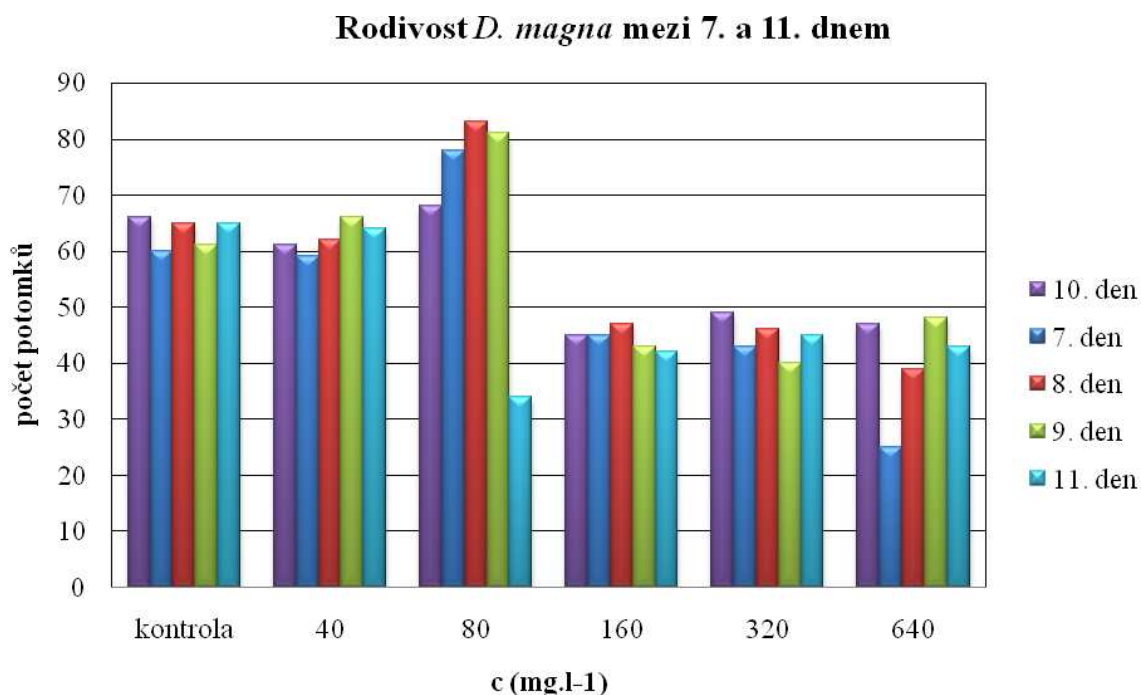


Graf č. 9: Mortalita *D. magna* pro kyselinu nonanovou (přípravek Finalsan)





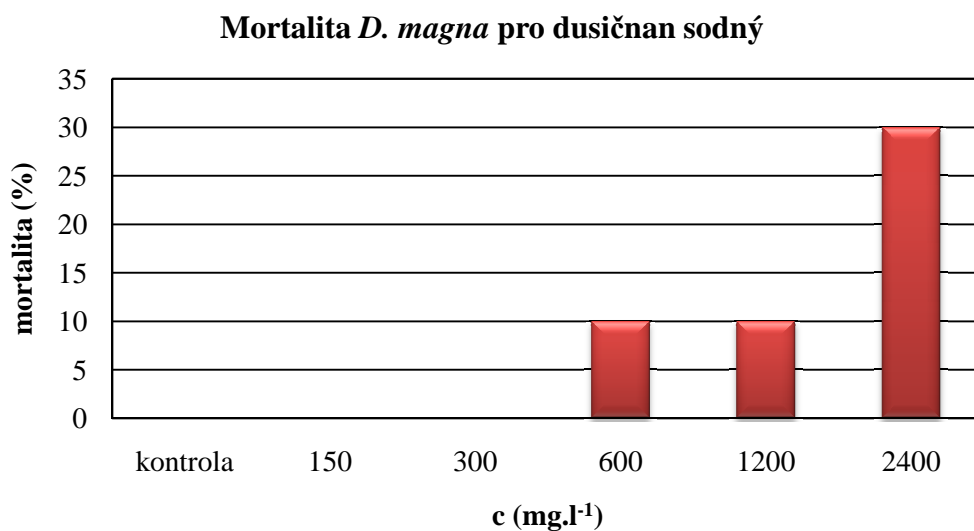
Graf č. 10: Rodivost *D. magna* pro kyselinu nonanovou (přípravek Finalsan)



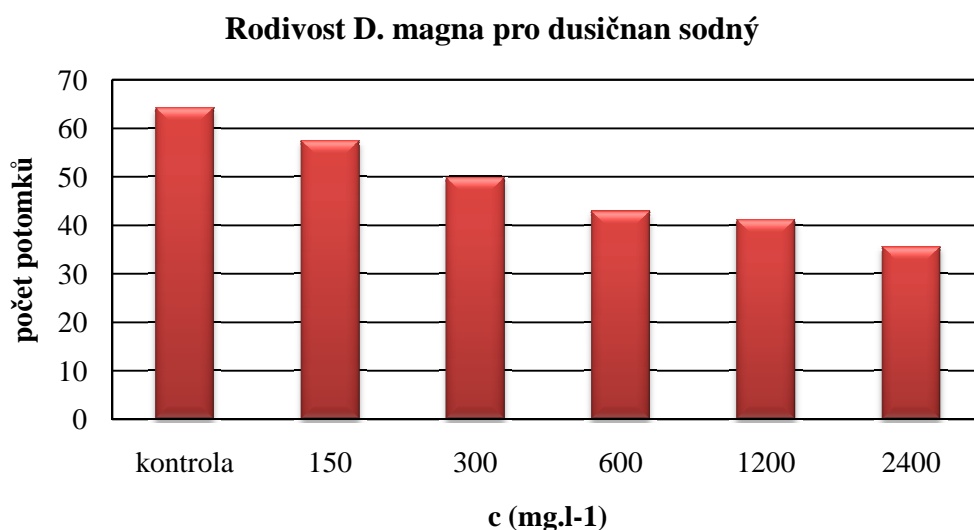
Graf č. 11: Rodivost *D. magna* v různých koncentracích kyseliny pelargonové mezi 7. a 11. dnem

#### 4.3.3. Dusičnan sodný NaNO<sub>3</sub>

U dusičnanu sodného byl rovněž pozorovatelný účinek na porodnost, která se u testovacích organismů během testu postupně snižovala, v závislosti na zvyšující se koncentraci testované látky. V nejvyšší koncentraci látky došlo k úhynu 30 % jedinců, což je nejnižší dosažená mortalita a zároveň nejvyšší nasazená koncentrace mezi testovanými látkami. Pro dusičnan sodný byla na základě výsledků stanovena hodnota EC<sub>40</sub>.



*Graf č. 12: Mortalita *D. magna* pro dusičnan sodný*

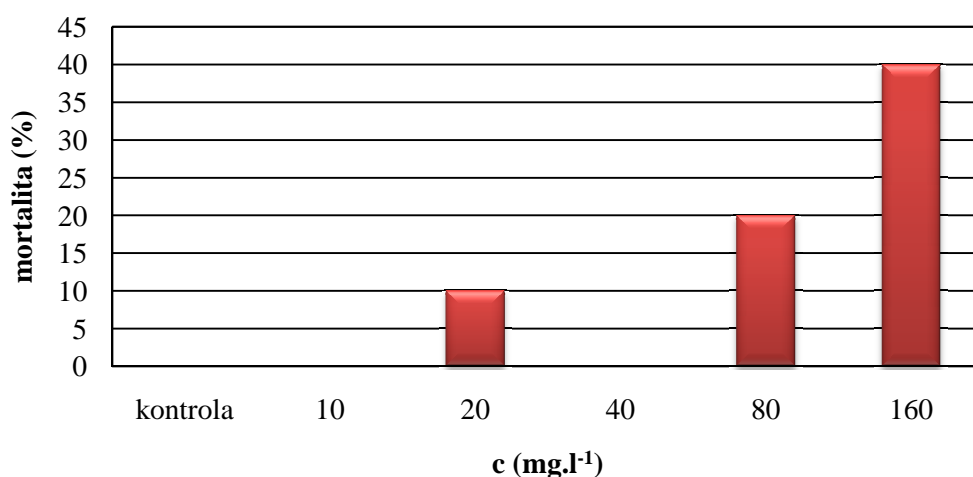


*Graf č. 13: Rodivost *D. magna* pro dusičnan sodný*

#### 4.3.4. Dusičnan draselný KNO<sub>3</sub>

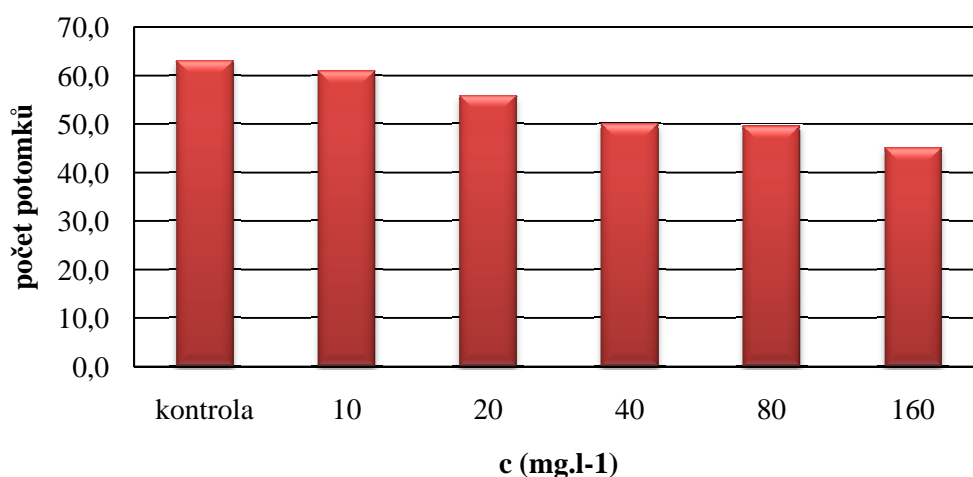
U dusičnanu draselného byl v jednotlivých nasazených koncentracích pozorován relativně malý vliv testované látky na rodivost, ale přesto k poklesu produkce potomstva u vyšších koncentrací došlo. Větší úmrtnost mateřských organismů byla pouze v případě nejvyšší nasazené koncentrace (4 jedinci). Pro dusičnan draselný byla rovněž stanovena hodnota EC40.

### Mortalita *D. magna* pro dusičnan draselný



Graf č. 14: Mortalita *D. magna* pro dusičnan draselný

### Rodivost *D. magna* pro dusičnan draselný



Graf č. 15: Rodivost *D. magna* pro dusičnan draselný

#### 4.3.5. Dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$

Dichroman draselný není ani hnojivem ani látkou jinak používanou v zemědělství. K jeho testování bylo přistoupeno z důvodu jeho použití jako standardní látky v testech akutní toxicity. Pro testy chronické toxicity není žádný standard určen. Bylo proto zajímavé porovnat účinky této látky z hlediska akutní a chronické toxicity na organismu *Daphnia magna*.

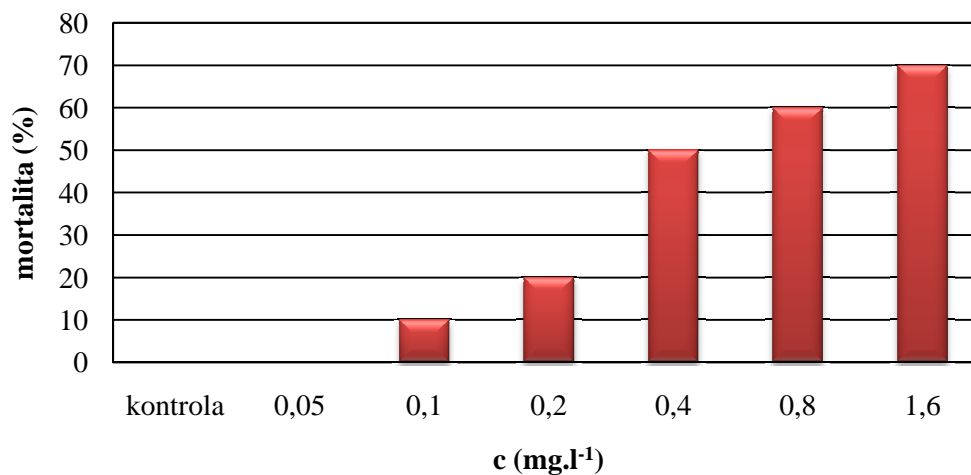
Dichroman draselný je velmi toxickou látkou, která by se za žádných okolností neměla dostat do akvatického prostředí.

Nasazené koncentrace dichromanu draselného v testu jsou nejnížší v rámci všech testů chronické toxicity, které byly v rámci této diplomové práce prováděny, je to právě z důvodu jeho velmi vysoké toxicity.

I při velice nízkých koncentracích byly zaznamenány výrazné odpovědi v rámci reprodukce a mortality testovacího organismu. Na mateřských organismech přežívajících

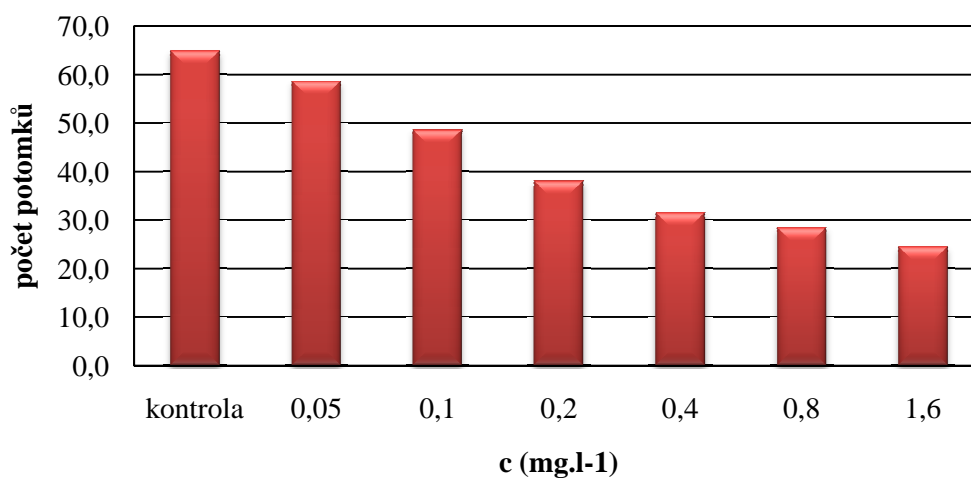
v roztocích dichromanu draselného bylo asi po dvou týdnech pozorovatelné stresové chování. Jedinci nasazení ve vyšších (0,8 a 1,6 mg.l<sup>-1</sup>) koncentracích dichromanu draselného plavali zvláštním trhavým způsobem, takováto reakce se u jiné testované látky neprokázala. Pro dichroman draselný byla stanovena hodnota EC<sub>50</sub>.

### Mortalita *D. magna* pro dichroman draselný



Graf č. 16: Mortalita *D. magna* pro dichroman draselný

### Rodivost *D. magna* pro dichroman draselný



Graf č. 17: Rodivost *D. magna* pro dichroman draselný

## 5. DISKUZE

V rámci této diplomové práce byla hodnocena akutní i chronická toxicita látek používaných zemědělství. A to dusíkatých hnojiv dusičnanu sodného a draselného, herbicidních látek na potlačení růstu plevele - isopropylaminové soli glyfosátu a kyseliny nonanové. Také byla hodnocena toxicita dichromanu draselného, který využití v rámci zemědělství vzhledem ke své toxicitě nemá, ale je běžně využíván jako standardní látka v testech akutní toxicity.

Dále bylo také provedeno porovnání dvou médií určených pro testy chronické toxicity na perloočce *Daphnia magna*. Tato dvě média jsou doporučena normou ČSN ISO 10706 pro stanovení chronické toxicity na *Daphnia magna*, jedná se o média M4 a M7.

Jako ukazatelem vhodnosti použití toho kterého média byla zvolena rodivost perlooček v nich chovaných. Z dosažených výsledků uvedených v grafech 1 a 2, bylo pro chov dafnií a testy chronické toxicity vybráno médium M4. O jeho optimální vlastnostech, jako je dobrá reprodukce chovu a nízká úmrtnost v dlouhých časových periodách se ve své studii zmiňují Elendt a Bias (1990), také Chévre a kol. (2006) používají médium M4 pro test chronické toxicity [48, 79]. Na druhé straně o médiu M7 se v odborných článcích a studiích nehovoří.

Toxicita jednotlivých látek byla hodnocena pomocí testu akutní a chronické toxicity na organismu *Daphnia magna*.

Dal se vysledovat základní vztah mezi koncentrací, rodivostí a mortalitou. Čím vyšší byly koncentrace sledovaných látek, tím byla vyšší mortalita mateřských jedinců a nižší rodivost, která se snižovala nejen s rostoucí koncentrací ale i s přibývajícím dobou expozice.

Ze sledovaných parametrů testu chronické toxicity na perloočkách *Daphnia magna*, se jako nejcitlivější odpověď projevuje hodnocení rodivosti mateřských organismů. Wollenberger a kol. (2000) se ve své studii zabýval reprodukcí a přežíváním mateřských organismů během 21 testovacích dnů. V případě reprodukce vyhodnocuje hodnoty EC<sub>50</sub> [81].

V následující tabulce je souhrn všech vypočtených koncentrací EC.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty EC<sub>50</sub> a EC<sub>40</sub> v jednotlivých testech toxicity

|   | Testy akutní toxicity |        |                  |         | Testy chronické toxicity |                  |
|---|-----------------------|--------|------------------|---------|--------------------------|------------------|
|   | EC <sub>40</sub>      |        | EC <sub>50</sub> |         | EC <sub>40</sub>         | EC <sub>50</sub> |
|   | 24 hod                | 48 hod | 24 hod           | 48 hod  |                          |                  |
| IPA-sůl GLY                                   | 51,286                | 28,569 | 105,78           | 59,292  | 28,31                    | -                |
| Kys. nonanová                                 | 119,12                | 97,275 | -                | 133,35  | 58,479                   | 229,09           |
| NaNO <sub>3</sub>                             | 3365,12               | 2811,9 | -                | 3801,89 | 1254,74                  | -                |
| KNO <sub>3</sub>                              | 205,59                | 158,49 | -                | 219,28  | 40,94                    | -                |
| K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | 0,822                 | -      | 1,675            | 0,866   | 0,137                    | 0,598            |

Hodnoty EC<sub>50</sub> herbicidní látky IPA-soli GLY z akutních testů toxicity ukazují na střední toxicitu pro *Daphnia magna*, hodnoty námi získaných výsledků se blíží výsledkům studie, kterou vypracoval Alberdi a kol. (1996) akutní toxicity GLY, který má velmi podobné

toxikologické vlastnosti jako IPA-sůl GLY. Autoři studie uvádí hodnotu  $24hEC_{50}$  95,96  $mg.l^{-1}$  a  $48hEC_{50}$  61,72  $mg.l^{-1}$ . Uvedené hodnoty  $EC_{50}$  autoři prohlašují za středně toxicické pro testovací organismus (*D. magna*) [46]. Uvedená herbicidní látka je účinnou látkou prostředku proti plevelům, který je prodáván pod názvem Dominator. Jako každý přípravek pro úpravu rostlin i tento musí mít bezpečnostní list. V něm je uvedena informace, že IPA-sůl GLY je prakticky netoxická pro vodní bezobratlé, pro tuto kategorii látek platí že hodnota  $LC_{50} > 100 mg.l^{-1}$ . Jak je uvedeno v tabulce č. 7.

Výslednou hodnotou námi provedeného chronického testu pro IPA-soli GLY je hodnota  $48hEC_{50}$  59,292  $mg.l^{-1}$ .

Hodnoty EC další herbicidní látky kyseliny nonanové jsou o něco vyšší, což ukazuje na nižší toxicitu než má IPA-sůl GLY. Kyselina nonanová je přírodním herbicidem. Je součástí komerčně prodáváného herbicidního přípravku Finalsan. Informace z bezpečnostního listu výrobku udávají hodnotu NOEC 10  $mg.l^{-1}$  pro dafnie po 48 hodinách. Tato hodnota včetně výsledků získaných v rámci testů této diplomové práce ukazuje na velmi nízkou toxicitu. Bohužel další studie ke srovnání výsledků nejsou k dispozici. V jedné z nižších koncentrací kyseliny nonanové došlo ke krátkodobé stimulaci porodnosti dafnií, tento efekt je odborně označován jako – hormese efekt. Hormese je přirozenou reakcí organismu, která mu napomáhá přežít nepříznivé podmínky. U ostatních testovaných látek tento efekt pozorován nebyl [2].

Testované dusičnany jsou velmi diskutovanou skupinou látek. Jejich přítomnost ve vodách není příliš vítaná, a to z toho důvodu, že mohou být původcem ještě více toxických dusitanů. Samy o sobě jsou pro vodní organismy také nebezpečné, jelikož mají schopnost se vázat na hemoglobin a vytvářet methemoglobin, který není schopen transportovat kyslík [82].

Podle výsledků z provedených testů toxicity vyplývá, že  $KNO_3$  je několikrát toxicitější než  $NaNO_3$ , toto zjištění odpovídá tvrzení uvedenému v článku Dowdena a Bennetta (1956) [83]. Ovlivnění rodivosti bylo markantnější u  $NaNO_3$  než u  $KNO_3$ , ale u  $KNO_3$  zase byla vyšší úmrtnost mateřských organismů. Získané hodnoty EC z provedených testů pro  $NaNO_3$  relativně odpovídají údajům z bezpečnostních listů dodávaných firmami Penta a Lach-Ner, které uvádí hodnotu  $48hEC_{50}$  3581  $mg.l^{-1}$  [75, 84]. Camargo a Ward (1992) uvádí ve své studii hodnotu  $EC_{50}$  pro *Daphnia magna* 2047  $mg NO_3^- .l^{-1}$  ( $NaNO_3$ ) po 48 hodinové expozici [84]. Hodnota 7-d LOEC pro *Daphnia magna* je uváděna obecně jako  $10^3 mg.l^{-1}$  [82], Scott s Crunkiltonem (2000) testovali akutní toxicitu  $NaNO_3$  a  $48hEC_{50}$  pro *D. magna* stanovili na 462  $mg NO_3^- .l^{-1}$  a 7-d LOEC pro *D. magna* hodnotu 3176  $mg NO_3^- .l^{-1}$  [86]. Jejich výsledek akutní toxicity je výrazně odlišný od výsledků testů prováděných v rámci této diplomové práce i v oproti studii Camarga a Warda (1992), Camargo a kol. však jejich výsledky sám cituje v článku v Chemosphere z roku 2005 [53]. Dusičnany jsou testovány celosvětově na všech typech vodních organismů, dostupných výsledků je velmi mnoho, ale často bývají protichůdné. To je nejspíše dáno, rozdílnými podmínkami, které jsou pro dané testy nastaveny.

Dichroman draselný byl v rámci testu akutní toxicity testován jako standardní látka, prostřednictvím toho testu bylo prověřeno splnění jedné z podmínek pro validaci testů akutní toxicity ostatních látek. Hodnota  $24hEC_{50}$  byla stanovena na 1,675  $mg.l^{-1}$ . Test chronické toxicity byl proveden pro srovnání. Jeho toxicita je ze všech látek největší, projevila se nejen velmi nízkou stanovenou hodnotou  $EC_{50}$ , ale také chováním přeživších mateřských jedinců. V nejvyšších koncentracích tito jedinci neplavali jim přirozeným plynulým kývavým

způsobem jako ostatní perloočky, ale jejich pohyby byly trhavé neusměrněné. U jiných organismů v roztocích ostatních testovaných látek nebyl tento jev pozorován.

## 6. ZÁVĚR

Na základě testů akutní a chronické toxicity bylo prokázáno, že každá z testovaných látek může mít negativní vliv na akvatické prostředí, a to jak v krátkodobém, ale zejména při dlouhodobém působení.

U testovaných herbicidních látek bylo prokázáno, že IPA-sůl glyfosátu je pro vodní prostředí toxičtější než herbicid přírodního původu kyselina nonanová. I přes to lze oba herbicidy zařadit mezi látky málo toxické pro vodní prostředí. Ze srovnání hodnot  $EC_{40}$  IPA-soli glyfosátu pro 48 hodinový akutní test a pro chronický test vyplývá výrazná blízkost získaných hodnot.

U kyseliny pelargonové byl pozorován hormese efekt, kdy v jedné z nižších koncentrací došlo ke krátké stimulaci reprodukce, která výrazně vzrostla ve srovnání s kontrolou. U testovaných dusičnanů jsou výsledky nejednoznačné. Dosažené hodnoty  $EC_{50}$  pro 48 hodin jsou blízké hodnotám uváděných výrobcí nebo distributory v bezpečnostních listech. Avšak některé výše zmiňované studie uvádějí výsledky, které se výrazně liší, některé řádově.

Vzhledem k velmi vysoké efektivní koncentraci dusičnanu sodného, by se dalo uvažovat nad jeho netoxicitou pro vodní prostředí. Není tomu ovšem tak. Dusičnany jsou pro vodní prostředí nebezpečné hned ze dvou důvodů, jejich nadprůměrná koncentrace může způsobovat přemnožení bakterií ve vodě, které spotřebují všechny kyslík a dojde k eutrofizaci vody. Další důvod, proč je potřeba sledovat obsah dusičnanů ve vodách je jejich schopnost vázat se na hemoglobin, vytvářet methemoglobin, který není schopen přenášet kyslík krví [53].

Silná toxicita dichromanu byla prokázána, nejen v akutních ale i v chronických testech, ve kterých je odpověď testovacího organismu na působení dichromanu sodného dobře rozpoznatelná. V nejvyšších koncentracích dichromanu se dokonce změnilo chování mateřských organismů, kromě snížení porodnosti, úhynu některých jedinců, se u části testovacích organismů projevila změna charakteru pohybu. Místo plynulého kývavého pohybu, měly organismy trhavé pohyby.

Pesticidní – herbicidní přípravky jsou v dnešní době hojně využívány, ale jejich škodlivost se za posledních 20 let snížila, také jsou více vyvíjeny specifické herbicidy, které působí určitým účinkem na uvedené rostliny. O dichromanu draselném je známo, že se nesmí dostat do akvatického prostředí, jelikož je pro něj vysloveně jedovatý.

Největším problémem zůstávají dusičnany, které se do akvatického systému dostávají zejména ze zemědělských zdrojů a průmyslových odpadů. Vzhledem k jejich škodlivým účinkům v rámci ekosystémů i možnému působení na člověka je potřeba jejich obsahy ve vodách kontrolovat a monitorovat. Již v devadesátých letech si Evropská Unie nechala zhodnotit vliv dusičnanů na životní prostředí a na základě analýzy vypracovala a poté i zavedla do praxe tzv. Nitrátovou směrnici, která je již v dnešních letech součástí české legislativy. Jedná se o politiku šetrného nakládání s dusíkatými hnojivy s ohledem na životní prostředí [23, 62].



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 HORÁK, J. ; LINHART, I.; KLUSOŇ , P. Úvod do toxikologie a ekologie *pro chemiky*. Praha : VŠCHT, 2004. 188 s.
- 2 KOČÍ, V ; MOCO VÁ, K. *Titul Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT, 2009. 199 s. [kniha]
- 3 KOČÍ, V. Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Ústav chemie ochrany prostředí. *Ekotoxikologické biotesty I: sborník pracovní konference : 18.-19.9.2002 Juniorcentrum, Seč u Chrudimi*. Praha : Vodní zdroje Ekomonitor, 2002. s. 187.
- 4 MARŠÁLEK, B. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. In Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Ústav chemie ochrany prostředí. *Ekotoxikologické biotesty I: sborník pracovní konference : 18.-19.9.2002 Juniorcentrum, Seč u Chrudimi*. Praha : Vodní zdroje Ekomonitor, 2002. s. 187.
- 5 SVOBODOVÁ, Z., et al. *Ekotoxikologie - praktická cvičení : část I.* 1. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2000. 72 s.
- 6 ČSN ISO 10706. *Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. Praha : Český normalizační institut, 2001. 20 s.
- 7 HOFFMAN, D. J. *Handbook of ecotoxicology*. [s.l.] : Lewis Publishers, 2003. 1290 s.
- 8 PAVLÍKOVÁ, D. *Ekotoxikologie*. Praha : Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra agrochemie a výživy rostlin, 2006. 152 s.
- 9 AMBROŽOVÁ, J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie* [online]. 2. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze : Praha, 2003 [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-521-8/pages-img/obsah.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-521-8/pages-img/obsah.html)>.
- 10 Ministerstvo životního prostředí - Odbor odpadů. *Ministerstvo životního prostředí* [online]. 2007 [cit. 2011-05-10]. Ekotoxicita odpadů. Dostupné z WWW: <[http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni\\_ekotoxicity/\\$FILE/oodp-MP\\_ke\\_stanoveni\\_ekotoxicity\\_odpadu-2007.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni_ekotoxicity/$FILE/oodp-MP_ke_stanoveni_ekotoxicity_odpadu-2007.pdf)>.
- 11 BAUMGARTEN, Andreas ; SPIEGEL, Heide . *ECN : Energy research centre of the Netherlands* [online]. 2004 [cit. 2011-05-10]. Phytotoxicity (Plant tolerance). Dostupné z WWW: <[http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor8\\_phytotoxicity.pdf](http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor8_phytotoxicity.pdf)>.
- 12 BAKALOVÁ, L. *Testy fytoxicity a jejich využití pro hodnocení vlivu xenobiotů* [online]. Brno, 2008. 132 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně. Dostupné z WWW: <[http://is.muni.cz/th/106666/prif\\_m/Text\\_prace\\_DIPLOMKA.pdf](http://is.muni.cz/th/106666/prif_m/Text_prace_DIPLOMKA.pdf)>.
- 13 *Vysoké učení technické v Brně : e-learning* [online]. 2011 [cit. 2011-05-10]. Test na Allium cepa. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=129468>>.
- 14 *Microbiotests* [online]. 2001 [cit. 2011-04-30]. Daphtoxkit F<sup>TM</sup> microbiotests. Dostupné z WWW: <<http://www.microbiotests.be/>>.
- 15 TICHÝ, M. *Toxikologie pro chemiky : Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 2., Praha : Karolinum, 2003. 119 s.

- 16 Česko. Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích. In *Sbírka zákonů Česká republika*. 2003, 2003, 120, s. 5810-5837. Dostupný také z WWW: <[http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni\\_predpisy\\_chemicke\\_latky/\\$FILE/oer-zakon\\_356\\_2003-20040501.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni_predpisy_chemicke_latky/$FILE/oer-zakon_356_2003-20040501.pdf)>.
- 17 *Sagit : nakladatelství ekonomické a právní literatury Ostrava* [online]. 2005 [cit. 2011-05-10]. Sbírka zákonů, Vyhláška 449/2005 Sb. Dostupné z WWW: <<http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?sn=y&hledany=Z%C1KON+O+HNOJIVECH&zdr oj=sb05449&cd=76&typ=r>>.
- 18 Česko. Vyhláška č.329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin. In *Sbírka zákonů Česká republika*. 2004, 106, s. 6677-6943. Dostupný také z WWW: <[www.mvcr.cz/soubor/sb044-09-pdf.aspx](http://www.mvcr.cz/soubor/sb044-09-pdf.aspx)>.
- 19 Česko. Zákon č. 308/2000 Sb., který mění zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech), a zákon č. 569/1991 Sb., o Pozemkovém fondu České republiky, ve znění pozdějších předpisů . In *Sbírka zákonů Česká republika*. 2000, 85, s. 4148-4149. Dostupný také z WWW: <<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2000/sb085-00.pdf>>.
- 20 Česko. Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemické zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech). In *Sbírka zákonů Česká republika*. 1998, 54, s. 6709-6715. Dostupný také z WWW: <<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/1998/sb054-98.pdf>>.
- 21 *eAgri : Ministerstvo zemědělství* [online]. 2010 [cit. 2011-05-10]. Aktualizace Strategie financování implementace směrnice Rady 91/676/EHS o ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů (nitratové směrnice) . Dostupné z WWW: <[http://eagri.cz/public/web/file/56954/Aktualizace\\_Strategie\\_financovani\\_implementace\\_nitratove\\_smernice.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/56954/Aktualizace_Strategie_financovani_implementace_nitratove_smernice.pdf)>.
- 22 *Nitratová směrnice* [online]. Poslední aktualizace: 12.12.2009 [cit. 2011-05-10]. Nitratová směrnice - Úvodem. Dostupné z WWW: <<http://www.nitrat.cz/>>.
- 23 *eAgri : Životní prostředí* [online]. 2009 [cit. 2011-05-10]. Akční program nařízení vlády č. 103/2003 Sb. podle směrnice Rady 91/676/EHS. Dostupné z WWW: <<http://eagri.cz/public/web/mze/zivotni-prostredi/ochrana-vody/nitratova-smernice/akcni-program-narizeni-vlady-c-103-2003.html>>.
- 24 *CENIA, česká informační agentura životního prostředí* [online]. 1. Praha : CENIA, česká informační agentura životního prostředí, 2010 [cit. 2011-05-10]. REACH Informační brožura: REACH - příčiny a důsledky. Dostupné z WWW: <[http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/\\$pid/CENMSFYV5Y5D/\\$FILE/brochure\\_reach\\_priciny\\_a\\_dusledky.pdf](http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/$pid/CENMSFYV5Y5D/$FILE/brochure_reach_priciny_a_dusledky.pdf)>.
- 25 *European Commission Environment* [online]. 2008, Last updated: 01/03/2011 [cit. 2011-04-30]. REACH. Dostupné z WWW: <[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)>.
- 26 VESELÁ, Š. Co víme (a nevíme) o perloočkách : Perloočky v ekotoxikologii. In *Ekotoxikologické biotesty 4: sborník pracovní konference, Chrudim 15.-17.9.*. Praha : 2004Vysoká škola

- chemicko-technologická v Praze. Ústav chemie ochrany prostředí. Vodní zdroje Ekomonitor, 2004. s. 218.
- 27 HANZÁK, J.; HALÍK, L.; MIKULOVÁ, M. . *Světlem zvířat V. díl : Bezobratlí*. Praha : Albatros, 1973. 321 s.
  - 28 BREHM, A., et al. *Brehmův život zvířat : Bezobratlí*. [s.l.] : Josef Hokr, 1941. 533 s.
  - 29 EBERT, D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [online]. [s.l.] : Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2011-04-30]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>>
  - 30 LELLÁK, J., et al. *Biologie vodních živočichů*. Praha : Univerzita Karlova, 1982. 220 s.
  - 31 ŠRÁMEK-HUŠEK, R. ; STRAŠKRABA, M.; BRTEK, J. *Lupenonožci—Branchiopoda: Fauna ČSSR – Svazek 16*. [s.l.] : Nakl. Československé akademie věd, 1962. 470 s.
  - 32 DOMA, S. Ehippia of *Daphnia magna* Straus - A technique for their mass production and quick revival. *Hydrobiologia*. 1979, 2, s. 183-188.
  - 33 VESELÁ, Š. Jak úspěšně chovat perloočky (Média pro laboratorní chov perlooček). In *Ekotoxikologické biotesty 4 : sborník pracovní konference, Chrudim 15.-17.9.2004*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Ústav chemie ochrany prostředí. , 2004. s. 218.
  - 34 VESELÁ, Š. Laboratorně připravené médium pro chov perlooček v AČR. *Zpravodaj vojenské farmacie*. 2004, č. 2, s. 12-16.
  - 35 KILHAM, S. S., et al. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*. 1998, 377, s. 147-159. Dostupný také z WWW: <[http://www.scottglynn.com/1998%20Kilham%20et%20al%20Hydrobiologia%20%20377\(1-3\)%20147-159.pdf](http://www.scottglynn.com/1998%20Kilham%20et%20al%20Hydrobiologia%20%20377(1-3)%20147-159.pdf)>
  - 36 ELENDT, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*. 1990, No. 9, s. 1157-1167.
  - 37 PALMA, P., et al. Embryo-toxic effect of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009, 72, s. 1714-1718.
  - 38 BARATA, C., et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for mustli-substances risks assessment. *Aquatic Toxicology*. 2006, 78, s. 1-14.
  - 39 ČSN EN ISO 6341. *Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity*. Praha : Český normalizační institut, 1997. 16 s.
  - 40 KOIVISTO, S. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Enviromental pollution* [online]. 1995, no. 2, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VB5-4037PMP-15/2/15092ebc88e8593f902fc3de331a3f6e>>.

- 41 FELDMANNOVÁ, M.; BLÁHA, L.; MARŠÁLEK, B. Chronický test toxicity na *Daphnia magna* - metodika a možnosti využití. In Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Ústav chemie ochrany prostředí. *Ekotoxikologické biotesty 4: sborník pracovní konference, Chrudim 15.-17.9.2004*. Praha : Vodní zdroje Ekomonitor, 2004. s. 218.
- 42 ENSERINK, L.; HAYE DE LA, M.; MAAS, H. Reproductive strategy of *Daphnia magna*: implications for chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology*. 1993, 25, s. 111-124.
- 43 KLEIN, B. Age as a factor influencing results in the acute daphnia test with *Daphnia magna* Straus. *Water Research*. 2000, No. 5, s. 1419-1424.
- 44 HERBRANDSON, C.; BRADBURY, S. P.; SWACKHAMER, D. L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. interactive effects. *Aquatic Toxicology*. 2003, 63, s. 333-342.
- 45 SAKAI, M. Use of chronic tests with *Daphnia magna* for examination of diluted river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2002, 53, s. 376-381.
- 46 ALBERDI, J.L., et al. Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1996, 57, s. 229-235.
- 47 VILLARROEL, M.J., et al. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2003, 53, s. 857-864.
- 48 CHÉVRE, N., et al. Modeling the concentration - response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella Supercapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005, 62, s. 17-25.
- 49 eAgri : Ministerstvo zemědělství [online]. 2010 [cit. 2011-05-10]. Aktualizace Strategie financování implementace směrnice Rady 91/676/EHS o ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů (nitratové směrnice) . Dostupné z WWW: <[http://eagri.cz/public/web/file/56954/Aktualizace\\_Strategie\\_financovani\\_implementace\\_nitratove\\_smernice.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/56954/Aktualizace_Strategie_financovani_implementace_nitratove_smernice.pdf)>.
- 50 ALTINDAG, A., et al. The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus. *African Journal of Biotechnology*. 2008, 23, s. 4298-4300.
- 51 NADDY, R. B., et al. Reprint of "Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors. *Aquatic Toxicology*. 2007, 84, s. I-X.
- 52 CAMARGO, J.A. ; ALONSO, A. ; SALAMANCA, A. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* [online]. 2005, 58, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <[http://www.waterboards.ca.gov/water\\_issues/programs/tmdl/records/region\\_2/2008/ref2426.pdf](http://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/tmdl/records/region_2/2008/ref2426.pdf)>.
- 53 MUYSEN, B. T. A. ; JANSSEN, C. R. Age and exposure duration as a factor influencing Cu a Zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007, 68, s. 436-442.
- 54 VANDENBROUCK, T., et al. Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular fingerprints and (sub)organismal effects. *Aquatic Toxicology*. 2009, 92, s. 18-29.

- 55 HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*. 2008, 73, s. 353-359.
- 56 *Tocoen s.r.o.* [online]. Poslední aktualizace: 04. 08. 2009 [cit. 2011-04-30]. Daphtoxkit FTM magna. Dostupné z WWW: <<http://www.tocoen.cz/toxkits/DaphtoxkitFmagnastp.pdf>>.
- 57 *Odra IV* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. Přístroj *Daphnia* toximeter. Dostupné z WWW: <<http://odra.vuv.cz/toximeter.PHP>>.
- 58 LECHTEL, M., et al. Monitoring of surface water by ultra-sensitive *Daphnia* toximeter. *Environmental Toxicology*[online]. 2000, 15, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.extolhydro.com/Products/Toxicity/Puplications/Monitoring%20with%20Daphnia%20Toximeter.pdf>>.
- 59 *Enviro-Analytical* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. *Daphnia* toximeter. Dostupné z WWW: <[http://www.enviro-analytical.com/enviroproducts/daphnia\\_toximeter.html](http://www.enviro-analytical.com/enviroproducts/daphnia_toximeter.html)>.
- 60 *Bbe moldaenke* [online]. last revizion: 2010 [cit. 2011-05-10]. DaphTox II . Dostupné z WWW: <<http://www.bbe-moldaenke.de/toxicity/daphniatoximeter/>>.
- 61 KAZDA, J. SMEP Systém multimediální elektronické publikace : Skripta ČZU [online]. 2003 [cit. 2011-05-10]. Vývoj spotřeby pesticidů v Evropě a v České republice. Dostupné z WWW: <[http://www3.czu.cz/php/skripta/skriptum.php?titul\\_key=56](http://www3.czu.cz/php/skripta/skriptum.php?titul_key=56)>.
- 62 JURŠÍK, M.; SOUKUP, J.; HOLEC, J. Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. 2010, č. 1, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <[http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2010/PDF/14-16.PDF](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF)>.
- 63 MACHÁČEK, V.; PANCHARTEK, J.; PYTELA, O. *Organická chemie : 2. část. 2. vydání.* Pardubice : Univerzita Pardubice, 1998. 311 s.
- 64 *Agromanuál.cz* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. Dominator-Bezpečnostní list. Dostupné z WWW: <[http://www.agromanual.cz/download/pdf\\_bezpecnost/bl\\_dominator.pdf](http://www.agromanual.cz/download/pdf_bezpecnost/bl_dominator.pdf)>.
- 65 PATOČKA, J. *Toxicology, Prof. RNDr. Patočka, DrSc. : Jak je to s nebezpečností glyfosátu pro člověka?* [online]. 29.12.2008 [cit. 2011-04-30]. Dostupné z WWW: <<http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=208>>.
- 66 BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.-E. [Http://www.pdazzler.com/wp-content/pdf/roundup.pdf](http://www.pdazzler.com/wp-content/pdf/roundup.pdf). *Chem. Res. Toxicol.* [online]. 2009, 22, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.pdazzler.com/wp-content/pdf/roundup.pdf>>.
- 67 *MassDOT : Massachusetts department of transportation - Highway division* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. Herbicide Alternatives Research. Dostupné z WWW: <[http://www.mhd.state.ma.us/downloads/manuals/rpt\\_herbicides\\_alternative.pdf](http://www.mhd.state.ma.us/downloads/manuals/rpt_herbicides_alternative.pdf)>.
- 68 *Neudorff* [online]. 2008 [cit. 2011-04-29]. Bezpečnostní list. Dostupné z WWW: <[http://www.neudorff.cz/fileadmin/tschechien/bezugsquellen/Finalsan\\_konc..pdf](http://www.neudorff.cz/fileadmin/tschechien/bezugsquellen/Finalsan_konc..pdf)>.
- 69 *Marin Municipal Water District* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. Chapter 7—Pelargonic Acid. Dostupné z WWW: <[http://www.marinwater.org/documents/Chap7\\_PelargonicAcid\\_8\\_28\\_08.pdf](http://www.marinwater.org/documents/Chap7_PelargonicAcid_8_28_08.pdf)>.
- 70 Hnojiva [online]. 2010 [cit. 2011-05-10]. Dusíkatá hnojiva. Dostupné z WWW: <<http://www.hnojiva.net/>>.

- 71 PITTER, P. *Hydrochemie*. 3. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. 568 s.
- 72 CAMARGO, J. A. ; ALONSO, Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* [online]. 2006, 32, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.uah.es/universidad/ecocampus/docs/6.pdf>>.
- 73 *State water resources control board : California environmental protection agency* [online]. 2005 [cit. 2011-04-30]. Canadian water quality guideline. Dostupné z WWW: <[http://www.swrcb.ca.gov/waterrights/water\\_issues/programs/bay\\_delta/deltaflow/docs/exhibits/bigbreak/dscbb\\_exh4.pdf](http://www.swrcb.ca.gov/waterrights/water_issues/programs/bay_delta/deltaflow/docs/exhibits/bigbreak/dscbb_exh4.pdf)>.
- 74 *Verkon* [online]. 2009 [cit. 2011-04-30]. Bezpečnostní list . Dostupné z WWW: <[www.verkon.cz/download?pdf=CHEM1-D-1270](http://www.verkon.cz/download?pdf=CHEM1-D-1270)>.
- 75 *Verkon* [online]. 2009 [cit. 2011-04-30]. Bezpečnostní list. Dostupné z WWW: <[www.verkon.cz/download?pdf=CHEM1-D-1120](http://www.verkon.cz/download?pdf=CHEM1-D-1120)>.
- 76 *Penta* [online]. Poslední aktualizace 2011 [cit. 2011-04-30]. Bezpečnostní list. Dostupné z WWW: <[www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/d/bezplist\\_27.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/d/bezplist_27.pdf)>.
- 77 KREJČÍ, R.; PALÍKOVÁ, M. Potassium Dichromate as a Reference Substance for Embryonic Tests of Toxicity in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno* [online]. 2006, 75, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <[actavet.vfu.cz/pdf/200675020259.pdf](http://actavet.vfu.cz/pdf/200675020259.pdf)>.
- 78 *European Commission Joint Research Centre* [online]. 2011 [cit. 2011-04-30]. European Union Risk Assessment Report. Dostupné z WWW: <[ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing.../R328\\_0211\\_env\\_hh.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing.../R328_0211_env_hh.pdf)>.
- 79 ELENDET, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*. 1990, No. 9, s. 1157-1167.
- 80 KLIMEŠOVÁ, Z. Studie ekotoxicity veterinárních léčiv vstupujících do životního prostředí. Brno, 2007. 77 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně.
- 81 Canadian Council of Ministers of the Environment. *Canadian Council of Ministers of the Environment* [online]. 2003 [cit. 2011-05-10]. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Nitrate ion. Dostupné z WWW: <<http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/197/>>.
- 82 DOWDEN, B.F. ; BENNETT, H.J. Toxicity of selected chemicals to certain animals. *Journal Water Pollution Control Federation*. 1965, No. 9, s. 1308-1316.
- 83 *Penta* [online]. 5.1.2011 [cit. 2011-05-10]. Bezpečnostní list. Dostupné z WWW: <[http://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/d/bezplist\\_190.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/d/bezplist_190.pdf)>.
- 84 CAMARGO, J. A.; WARD, J. V. . Short-term toxicity of sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) to non-target freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 1992, 1, s. 23-28.
- 85 SCOTT, G.; CRUNKILTON, R. L. . Acute a chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000, 12, s. 2918-2922.

## SEZNAM ZDROJŮ OBRÁZKŮ

- 1 *Nitrátová směrnice* [online]. Poslední aktualizace: 17.9.2009 [cit. 2011-05-10]. Mapa zranitelných oblastí. Dostupné z WWW: <<http://www.nitrat.cz/images/stories/documents/revize%20zranitelných%20oblastí%20v%20roce%202007%20mapa.jpg>>.
- 2 VESELÁ, Šárka. *Toxicology, Prof. RNDr. Patočka, DrSc. : Perloočka – nový modelový organismus v experimentální toxikologi* [online]. 18.03. 2007 [cit. 2011-05-04]. Dostupné z WWW: <<http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=93>>.
- 3 EBERT, Dieter . *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [online]. [s.l.] : Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2011-04-30]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>>.
- 4 *Microbiotests* [online]. 2001 [cit. 2011-04-30]. Daphtoxkit F<sup>TM</sup> microbiotests. Dostupné z WWW: <<http://www.microbiotests.be/>>.
- 5 *Odra IV* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. Přístroj Daphnia toximeter. Dostupné z WWW: <<http://odra.vuv.cz/toximeter.PHP>>.
- 6 LECHÉLT, M., et al. Monitoring of surface water by ultra-sensitive Daphnia toximeter. *Environmental Toxicology*[online]. 2000, 15, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.extolhydro.com/Products/Toxicity/Puplications/Monitoring%20with%20Daphnia%20Toximeter.pdf>>.
- 7 *PAN Pesticide Database* [online]. 2000 [cit. 2011-04-30]. Glyphosate, isopropylamine salt. Dostupné z WWW: <<file:///C:/Documents%20and%20Settings/Lucij%C3%A1%C5%A1/Dokumenty/ipa%20s%C5%AFI%20glyfos%C3%A1tu/Glyphosate,%20isopropylamine%20salt%20-%20toxicity,%20ecological%20toxicity%20and%20regulatory%20information.htm>>.
- 8 PAN Pesticides Database [online]. 2000 [cit. 2011-04-30]. Nonanoic acid. Dostupné z WWW: <[http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC34749](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34749)>.
- 9 AgroBio Opava [online]. 2010 [cit. 2011-04-30]. Výrobky Finalsan. Dostupné z WWW: <<http://www.agrobio.cz/vyrobky/653-neudorff-finalsan.html>>.
- 10 Dichroman draseln%C3%BD. In Wikipedia : the free encyclopedia [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 15. 6. 2009, last modified on 24. 3. 2011 [cit. 2011-05-11]. Dostupné z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Dichroman\\_draseln%C3%BD](http://cs.wikipedia.org/wiki/Dichroman_draseln%C3%BD)>.
- 11 *AgroBio Opava* [online]. 2010 [cit. 2011-04-30]. Výrobky Dominator. Dostupné z WWW: <<http://www.agrobio.cz/vyrobky/68-dominator.html>>.

## SEZNAM ZKRATEK

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>Cd</b>              | kadmium   |
| <b>Cu</b>              | měď   |
| <b>ČR</b>              | Česká republika   |
| <b>ČSN</b>             | Česká standardizovaná norma   |
| <b>EC<sub>50</sub></b> | koncentrace testovaného vzorku, která způsobuje úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů <i>Daphnia magna</i>     |
| <b>ECHA</b>            | Evropská agentura pro chemické látky  |
| <b>EDTA</b>            | kyselina ethyldiaminotetraoctová  |
| <b>Fe</b>              | železo  |
| <b>EU</b>              | Evropská Unie   |
| <b>IPA-sůl GLY</b>     | Isopropylaminová sůl glyfosátu  |
| <b>ISO</b>             | Mezinárodní organizace pro standardizaci (International Organization for Standardization)                                 |
| <b>LC<sub>50</sub></b> | koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb  |
| <b>LD<sub>50</sub></b> | letální dávka, dávka, která vyvolá úhyn 50 % organismů  |
| <b>LOEC</b>            | nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)          |
| <b>NOEC</b>            | nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)      |
| <b>OECD</b>            | Organizace pro rozvoj ekonomické spolupráce ( <i>Organization for Economic Cooperation of Development</i> )               |
| <b>REACH</b>           | Registrace, Evaluace a Autorizace chemických látek (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) |



## PŘÍLOHY

Tabulka č. 8: Rozpis pro přípravu média ISO [33]

| Zásobní roztok | Chemické složení                     | mg v 1 litru hotového média | g.l <sup>-1</sup> pro přípravu 1 litru zásobního roztoku | ml zás. roztoku pro přípravu 1 litru média |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| a              | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 294                         | 117,6  | 2,5  |
| b              | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 123,25                      | 49,3   | 2,5  |
| c              | NaHCO <sub>3</sub>                   | 64,75                       | 25,9   | 2,5  |
| d              | KCl                                  | 5,75                        | 2,3  | 2,5  |

Tabulka č. 9: Probitové hodnoty [5]

| <b>%</b> | <b>probity</b> | <b>%</b> | <b>probity</b> | <b>%</b> | <b>probity</b> | <b>%</b> | <b>probity</b> |
|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|
| 0,2      | 2,122          | 20,0     | 4,158          | 50,0     | 5,000          | 80,0     | 5,842          |
| 0,4      | 2,348          | 21,0     | 4,194          | 51,0     | 5,025          | 81,0     | 5,878          |
| 0,6      | 2,488          | 22,0     | 4,228          | 52,0     | 5,050          | 82,0     | 5,915          |
| 0,8      | 2,591          | 23,0     | 4,261          | 53,0     | 5,075          | 83,0     | 5,954          |
| 1,0      | 2,574          | 24,0     | 4,294          | 54,0     | 5,100          | 84,0     | 5,994          |
| 1,2      | 2,743          | 25,0     | 4,326          | 55,0     | 5,126          | 85,0     | 6,036          |
| 1,4      | 2,803          | 26,0     | 4,357          | 56,0     | 5,151          | 86,0     | 6,080          |
| 1,6      | 2,856          | 27,0     | 4,387          | 57,0     | 5,176          | 87,0     | 6,126          |
| 1,8      | 2,903          | 28,0     | 4,417          | 58,0     | 5,202          | 88,0     | 6,175          |
| 2,0      | 2,946          | 29,0     | 4,447          | 59,0     | 5,228          | 89,0     | 6,227          |
| 2,5      | 3,040          | 30,0     | 4,476          | 60,0     | 5,253          | 90,0     | 6,282          |
| 3,0      | 3,123          | 31,0     | 4,504          | 61,0     | 5,278          | 91,0     | 6,341          |
| 3,5      | 3,188          | 32,0     | 4,532          | 62,0     | 5,305          | 92,0     | 6,405          |
| 4,0      | 3,249          | 33,0     | 4,560          | 63,0     | 5,332          | 93,0     | 6,476          |
| 4,5      | 3,305          | 34,0     | 4,588          | 64,0     | 5,358          | 94,0     | 6,555          |
| 5,0      | 3,355          | 35,0     | 4,615          | 65,0     | 5,385          | 95,0     | 6,645          |
| 6,0      | 3,445          | 36,0     | 4,642          | 66,0     | 5,412          | 95,5     | 6,695          |
| 7,0      | 3,524          | 37,0     | 4,668          | 67,0     | 5,440          | 96,0     | 6,751          |
| 8,0      | 3,595          | 38,0     | 4,695          | 68,0     | 5,468          | 96,5     | 6,812          |
| 9,0      | 3,659          | 39,0     | 4,722          | 69,0     | 5,496          | 97,0     | 6,881          |
| 10,0     | 3,718          | 40,0     | 4,747          | 70,0     | 5,524          | 97,5     | 6,960          |
| 11,0     | 3,773          | 41,0     | 4,772          | 71,0     | 5,553          | 98,0     | 7,054          |
| 12,0     | 3,825          | 42,0     | 4,798          | 72,0     | 5,583          | 98,2     | 7,096          |
| 13,0     | 3,874          | 43,0     | 4,824          | 73,0     | 5,613          | 98,4     | 7,144          |
| 14,0     | 3,920          | 44,0     | 4,849          | 74,0     | 5,643          | 98,6     | 7,197          |
| 15,0     | 3,964          | 45,0     | 4,874          | 75,0     | 5,674          | 98,8     | 7,257          |
| 16,0     | 4,006          | 46,0     | 4,900          | 76,0     | 5,706          | 99,0     | 7,326          |
| 17,0     | 4,046          | 47,0     | 4,925          | 77,0     | 5,739          | 99,2     | 7,409          |
| 18,0     | 4,085          | 48,0     | 4,950          | 78,0     | 5,772          | 99,4     | 7,512          |
| 19,0     | 4,122          | 49,0     | 4,975          | 79,0     | 5,806          | 99,6     | 7,652          |
|          |                |          |                |          |                | 99,8     | 7,878          |