

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Fakulta rybnářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

Diplomová práce

**Vliv metribuzinu na oxidativní stres
a antioxidační enzymy raka signálního**

Autor: Bc. Jaroslava Lidová

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

Konzultant diplomové práce: Ing. Dalibor Koutník

Studijní program a obor: N4103 Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma “Vliv metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního“ jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby touto cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledcích obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu diplomové práce dr hab. Josefu Velíškovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Daliboru Koutníkovi za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady poskytnuté při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. a všem ostatním zaměstnancům laboratoře Vodní toxikologie a ichtyopatologie, FROV JU Vodňany, kteří mi byli nápomocni při experimentální části této práce. V neposlední řadě Mgr. Daně Ryšlavé za jazykovou korekturu, Bc. Lukáši Jurkovi za poskytnuté fotografie a své rodině a přátelům za podporu.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava LIDOVÁ**
Osobní číslo: **V13N011P**
Studijní program: **N4103 Zootecnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Poslední desítky let je celosvětovým problémem vzrůstající výskyt xenobiotik v životním prostředí. Průmyslové a zemědělské technologie se stále zlepšují s cílem zefektivnit a zvýšit výrobu a výnosy na úkor vzrůstajícímu hromadění a výskytu polutantů v přírodních ekosystémech. Především zemědělství využívá řadu pesticidních přípravků na kontrolu plevelů a škůdců. Mezi nejčastěji monitorované pesticidy ve vodním prostředí patří triazinové herbicidy. V současnosti jsou některé triaziny považovány za nebezpečné pro životní prostředí a jsou zahrnuty na listině prioritních látek pro testování v EU a USA.

Cílem diplomové práce je posoudit účinky metribuzinu, pesticidu na bázi triazinu na raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Vliv metribuzinu na raka signálního bude posuzován pomocí oxidativního stresu a antioxidačních enzymů. Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika metribuzinu pro životní prostředí (environmental risk assessment).

V rámci diplomové práce bude proveden chronický test toxicity na raku signálním s metribuzinem. Během testu se bude sledovat vliv na mortalitu, biomarkery oxidativního stresu a antioxidační enzymy v tkáních raka signálního. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD. Oxidativní stres a antioxidační enzymy v tkáních raka signálního budou prováděny dle jednotlivých metod.

Rozsah grafických prací: **3 grafy**
Rozsah pracovní zprávy: **40-50 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

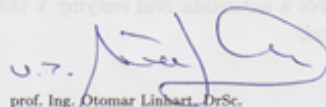
- Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a lake surrounded by agricultural lands: concerning risks to humans and ecological receptors. *Water Air Soil Pollut.* 212, 77-88 s.
- Beers, R. F., Sizer, I. W., 1952. Analysis of the kinetics and thermodynamics of the catalase-hydrogen peroxide system. *Fed. Proc.* 11 s.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide-dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474 s.
- Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšířková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010. Ekotoxikologie. Praktická cvičení, Testy toxicity na organismech vodního prostředí. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 84 s.
- Velisek, J., Stara, A., Svobodova, Z., 2011. The effects of pyrethroid and trazine pesticides on fish physiology. In: Stoytcheva, M., (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech Open, Rijeka, 377-402 s.

Vedoucí diplomové práce: **Josef Velíšek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

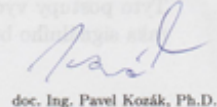
Konzultant diplomové práce: **Ing. Dalibor KOUTNIK**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **14. února 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2015**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zápis 28/11
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2014

OBSAH

1. Úvod	8
2. Literární přehled	10
2.1. Rak signální	10
2.1.2. Použití raků v testech toxicity s traziny	12
2.2. Pesticidy	14
2.2.1. Herbicidy.....	19
2.2.2. Triaziny	20
2.2.3. Metribuzin	21
2.3. Oxidativní stres	26
2.3.2. Biomarkery.....	28
2.3.3. Antioxidační systémy	29
2.3.3.1. Enzymatické antioxidační systémy.....	30
2.3.3.2. Neenzymatické antioxidační systémy.....	33
3. Materiál a metodika	34
3.1. Princip a podmínky testu	34
3.2. Experimentální materiál.	34
3.3. Průběh testu	35
3.3.1. Odběr vzorků.....	39
3.4. Metody stanovení biomarkerů	43
3.4.1. Metoda stanovení lipidní peroxidace.....	43
3.4.2. Stanovení enzymatické aktivity superoxiddismutázy.....	45
3.4.3. Stanovení enzymatické aktivity katalázy.....	46
3.4.4. Stanovení enzymatické aktivity glutathionreduktázy.....	48
3.4.5. Stanovení koncentrace proteinů	49
3.5. Statistické vyhodnocení testu	51
4. Výsledky	52
4.1. Chování raků.....	52
4.2. Biomarker oxidativního stresu.....	52
4.2.1. Lipidní peroxidace.....	52
4.3. Antioxidační biomarkery	54
4.3.1. Superoxiddismutáza.....	54

4.3.2. Kataláza	56
4.3.3. Glutathionreduktáza.....	58
5. Diskuse	60
5.1. Chování raků.....	61
5.2. Oxidativní stres	61
5.3. Antioxidační enzymy.....	62
6. Závěr	65
7. Přehled použité literatury.....	66
8. Abstrakt.....	74
9. Abstract	75

1. ÚVOD

Snaha chránit své zemědělské produkty a zásoby potravy provází lidstvo od nepaměti. Lidé se vždy snažili bojovat s různými škůdci, chorobami či plevele, které ohrožovali jejich úrodu a tím pádem i množství potravy. Efektivita jejich metod však byla často velice nízká, založená pouze na mechanickém principu (Cremllyn, 1978).

Chemické látky v zemědělství začaly být používány teprve v minulém století, a to především po druhé světové válce. Používání pesticidů se rozšířilo do celého světa. Lídry v této oblasti se staly Kanada, USA a Velká Británie. Od 30. let 20. století vzrostlo používání pesticidů v USA o 180 %, v Kanadě ještě třikrát více (Sotherton a Holland, 2003).

Významným mezníkem v historii pesticidů se stal rok 1939, kdy došlo k objevení silných insekticidních vlastností v budoucnu nejznámějšího a nejvíce používaného insekticidu na světě, DDT ((1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan). Objevitel této látky, doktor Paul Hermann Müller (12. ledna 1899 - 13. října 1965), získal za objev DDT v roce 1948 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Světová spotřeba DDT, hlavně v zemědělství, je v letech 1940 až 1973 odhadována až kolem dvou milionů tun (Cremllyn, 1985).

Masové používání DDT však později podnítilo obavy ohledně jeho bezpečnosti a v roce 1962 byla zveřejněna první studie o negativním vlivu DDT na ekosystém, především na ptáky. V souvislosti s tímto významným objevem začalo být DDT postupně zakazováno ve většině zemí světa. Rok 1962 se stal počátkem výzkumu vlivu pesticidů na životní prostředí a jeho složky včetně člověka (Cremllyn, 1985).

Zemědělství, jako jedno z nejvýznamnějších hospodářských odvětví, je nuceno k neustálému zvyšování efektivity výroby, aby byly zajištěny dostatečné zásoby potravin pro stále narůstající populaci lidí na této planetě. Dosáhnout ovšem dostatečné produkce potravin bez použití pesticidů je prakticky nereálné. Tato činnost s sebou však nese riziko, že těmito látkami budou poškozeny i necílové organismy, dojde ke kumulaci v ekosystému a ohrožení životního prostředí jako takového. Dalším problémem je neodborné zacházení s pesticidními látkami například při nesprávné aplikaci, likvidaci zbytků a jejich často nadměrné využívání (Kreuger a kol., 1999).

V současnosti je ve světě používáno více jak 800 aktivních látek a 25 000 různých komerčních produktů pesticidů. Ročně jsou prodány pesticidy za 35 miliard dolarů.

Vzhledem ke stávajícímu trendu je předpokládán každoroční nárůst prodeje těchto látek. Celosvětový prodej pesticidů v roce 2019 je odhadován až na 52 miliard dolarů (Ceresena Research, 2013).

Cílem diplomové práce bylo posouzení vlivu metribuzinu na raka signálního. Vliv metribuzinu na raka signálního byl hodnocen pomocí biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů. Cílem této práce bylo přispět k rozšíření podkladů pro hodnocení rizika metribuzinu pro životní prostředí a možnosti využití raků k testování pesticidů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Rak signální (*Pacifastacus leniusculus* Dana)

Raci, jako zástupci velkých korýšů, jsou považováni za významné obyvatele tekoucích i stojatých vod, hrají klíčovou roli v ekosystému, jsou důležitou komoditou akvakultury a významnými indikátory znečištění vodního prostředí (Momot, 1995).

Rak signální (obr. č. 1, 2 a 3) patří k nepůvodním druhům raků v České republice. Do Evropy byl introdukován ze Severní Ameriky, kde přirozeně obývá chladnější oblasti. Rak signální je v současné době nejrozšířenějším druhem v Evropě. Do tehdejšího Československa byl vysazen v roce 1980 na mnoha místech. Jednalo se o raky dovezené ze Švédska. V současnosti se však vyskytuje především na jihovýchodě a jihu našeho území (Štambergová a kol., 2009; Kozák a kol., 2013). Vzhledem k nálezům dalších lokalit obsazených rakem signálním lze předpokládat postupné rozšiřování jeho areálu výskytu (Kozák a kol., 2013).



Obr. č. 1. Rak signální (*Pacifastacus leniusculus* Dana) (Foto: Lukáš Jurek).

Mezi poznávací znaky raka signálního patří hladká hlavohruď a klepeta bez trnů. Za očima se nacházejí dva páry postorbitálních lišt. Rostrum je poměrně dlouhé a zašpičatělé. Klepeta jsou velice mohutná a široká s výraznou bílou skvrnou mezi pohyblivým a nepohyblivým prstem, spodní strana klepet je sytě červená. Barva raka signálního přechází od světle hnědé, přes sytě tmavě hnědou, až po hnědočervenou. Ojedinele se může vyskytovat v modrém zbarvení (Kozák a kol., 2013).



Obr. č. 2. Rak signální v přirozeném prostředí (Foto: Lukáš Jurek).

Samci raka signálního dorůstají velikosti okolo 16 cm, samice jsou o něco menší, dorůstají velikosti 12 cm. Hmotnost se pohybuje mezi 200 a 250 g. Jedná se o dlouhověký druh, který se může dožít až dvaceti let (Kozák a kol., 2013).

Rak signální na našem území obývá podobné biotopy jako naše původní druhy raků, především rak říční (*Astacus astacus*). Oproti raku říčnímu je však daleko tolerantnější k nepříznivým podmínkám, jako například znečištění životního prostředí a daleko lépe se jim přizpůsobuje. Proto je rak signální významným konkurentem raka říčního a je schopen jej vytlačovat z původních lokalit. Dále je rak signální imunní vůči

onemocnění zvanému račí mor, přestože je jeho přenašečem. Pro naše původní druhy raků je však račí mor vysoce infekční onemocnění, které je schopné v krátkém čase vyhubit celé populace (Štambergová a kol., 2009).

Rak signální dosahuje pohlavní dospělosti mezi druhým a třetím rokem života. K rozmnožování a kladení vajíček dochází většinou v období října. Ráčata se líhnou na jaře následujícího roku. Plodnost samic se pohybuje v rozmezí 200 až 400 vajíček (Štambergová a kol., 2009).

Zhruba po týdnu od vylíhnutí se ráčata poprvé svlékají a začínají přijímat potravu. V prvním roce života se raci svlékají až jedenáctkrát, od třetího roku života pouze dvakrát nebo jednou (Kozák a kol., 2013).

Původní druhy raků v Evropě patří mezi ohrožené druhy a jejich zdroje jsou omezené, tudíž by bylo jejich použití pro testy toxicity neetické. Z tohoto důvodu jsou pro testy toxicity využívány nepůvodní druhy raků, jako je právě rak signální. Rak signální je i díky své velikosti a mohutné stavbě těla velice vhodným testovacím organismem (Buřič a kol., 2013).



Obr. č. 3. Rak signální (Foto: Lukáš Jurek).

2.1.1. Použití raků v testech toxicity s triaziny

Raci, jako necílové organismy, jsou zástupci skupiny korýšů, kteří tvoří velice početnou skupinu s velkým rozšířením. Raci jsou významnou složkou ekosystému (Buřič a kol., 2013).

V zemích EU je stále více dbáno na využívání konceptu tzv. 3R (*Replace, Reduce, Refine*). Tento koncept existuje již přes 60 let, avšak teprve v posledních letech dochází v ČR k jeho významnějšímu používání a rozvoji alternativních metod. Cílem této koncepce je omezit využití pokusných zvířat, hlavně obratlovců, v souladu s jejich ochranou a zároveň zvýšit používání nových, alternativních metod testování s přednostním využitím nižších organismů (např. bezobratlých a mikroorganismů k testům toxicity. Proto by raci v budoucnu mohli hrát velice významnou roli při testování vlivu pesticidů a jejich metabolitů na vodní organismy a mohli by být využíváni jako vhodný bioindikátor znečištění vodního prostředí xenobiotiky, respektive pesticidy (Velíšek a kol., 2014a).

Raci mají i další vhodné vlastnosti, které je předurčují pro testování a bioindikaci, tak jak ukazují následující studie. Použití raků k testům toxicity bylo publikováno v 82 publikacích na Web of Science. Hlavní výzkum v těchto člancích je zaměřen pouze na testování akutní toxicity u organofosfátů (Buřič a kol., 2013), chlorantranilproleu (Barbee a kol., 2010), pyrethroidů (Barbee a Stout, 2009), azadirachtinu (Goktepe a Plhak, 1998).

Triaziny a jejich vliv na terestrické organismy je velice dobře popsán ve vědecké literatuře (okolo 17 550 článků na Web of Science), ale vliv triazinů na raky je popsán pouze ve třech člancích na Web of Science. První studie Velíšek a kol. (2013) popisuje pouze akutní toxicitu šesti triazinů na raka signálního. Z výsledků této studie vyplývá, že raci jsou ve srovnání s jinými vodními organismy citlivější k atrazinu, hexazinonu a metribuzinu.

Ve druhé studii Stará a kol. (2014) popisuje vliv prometrynu na antioxidantní biomarkery raka červeného (*Procambarus clarkii*). V této práci bylo zjištěno, že prometryn v reálných koncentracích ($0,51 \mu\text{g.l}^{-1}$) vyskytujících se v řekách České republiky, ovlivnil antioxidantní biomarkery ve svalu a hepatopankreatu a způsobil

patologické změny v hepatopankreatu raků. Třetí studie Velíšek a kol. (2014b) prokázala vliv chronické expozice prometrynu na mortalitu, růst a histopatologické změny u raných vývojových stadií raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *Virginalis*)

Přestože toxikologických studií na racích prozatím není mnoho, bylo již díky nim prokázáno, že raci jsou ve srovnání s rybami velice citlivými organismy vůči působení triazinů. A proto by mohli nahradit ryby jako obratlovce v ekotoxikologických testech. Současně lze z výsledků toxikologických studií na nepůvodních druzích raků jako modelových organismech odhadnout i vliv polutantů, přítomných ve vodním prostředí, na naše původní ohrožené raky, například raka říčního.

2.2. Pesticidy

Definice pojmu „pesticid“ není z celosvětového pohledu jednotná a v některých oblastech (převážně v humánní medicíně) existuje určitý překryv s pojmem terapeutické přípravky (např. u fungicidů, které jsou využívány jako terapeutické přípravky) (Velíšek a kol., 2014a).

Pesticidy rozumíme biologicky aktivní látky organického či anorganického původu, které jsou používány ke kontrole či eliminaci rostlinných a živočišných škůdců. Jedná se o velmi obsáhlou skupinu chemických sloučenin se složitými strukturami, často označovanou triviálními či obchodními názvy (Cremlyn, 1985).

Pesticidy je možno rozdělit z několika hledisek, a to dle cílového organismu, způsobu aplikace, působení a mechanismu účinku. Základní dělení pesticidů se provádí podle cílového organismu, který má daný pesticid eliminovat (Pitter, 1999):

- Akaricidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení roztočů.
- Algicidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení řas.
- Arboricidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení dřevin (stromů a keřů).
- Avicidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení ptáků.
- Fungicidy: jsou skupinou pesticidů určených k ochraně před houbovými chorobami, které napadají rostliny a působí na nich ekonomické škody.

- Herbicidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení nežádoucích rostlin (invazní rostliny, plevele).
- Moluskocidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení měkkýšů.
- Piscicidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení ryb.
- Rodenticidy: jsou skupinou pesticidů určených k hubení hlodavců.

Dělení pesticidů dle způsobu aplikace (Pitter, 1999):

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

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

- Kontaktní (dotykové) - účinná látka zůstává pouze na povrchu rostliny či škůdce a neproniká do buněk. Kontaktní pesticidy působí v místě zasažení.
- Systémové - účinná látka pesticidu proniká do buněk rostliny či škůdce, je rozváděna cévním systémem do celého těla.

Pesticidy jsou používány k ochraně užitkových organismů, rostlin, potravin, skladových zásob, technických produktů, domů, bytů, výrobních závodů. Dále jsou pesticidy používány k ochraně zvířat a v neposlední řadě i člověka a jeho zdraví (Cremlýn, 1985).

Vzhledem k velice rozličné chemické povaze pesticidů mezi nimi můžeme nalézt látky vysoce toxické, ale i látky téměř neškodné pro životní prostředí a jeho složky (Cremlýn, 1985). Používání pesticidů bezesporu přináší lidstvu mnohé výhody, má však

i svá rizika. Mezi kladné stránky jejich používání patří zvyšování produkce zemědělství a lepší kvalita zemědělských produktů (Pauli a kol., 1990; Brown a kol., 2001). Právě zemědělství je oblastí, kde dochází k nejmasivnějšímu používání pesticidů. Pesticidy jsou používány na přibližně 95 % zemědělské půdy (Zapletal a Nepejchalová, 2001).

Pesticidy dále mohou zabraňovat výskytu epidemií a tím nepřímo přispívají k ochraně lidského zdraví. Na druhou stranu však může používání pesticidů lidské zdraví i ohrožovat. Pesticidy mohou být lidmi zneužívány či používány nesprávně. Člověk, jako vrchol potravního řetězce, může být ohrožen například konzumací potravin, které obsahují neodbourané zbytky pesticidů (tzv. rezidua). Dalším rizikem může být požití kontaminované pitné vody (Brown a kol., 2001).

Pesticidy nejsou rizikem pouze pro člověka, ale i pro ostatní složky životního prostředí, živočichy, rostliny, ale i pro životní prostředí jako takové (Brown a kol., 2001).

Je prokázáno, že pesticidy jsou velmi závažnými kontaminanty vodního prostředí a mohou negativně ovlivňovat všechny vodní organismy (Svobodová a kol., 2007). V 60. až 80. letech minulého století byly pesticidy častou příčinou akutních otrav ryb a tvořily 3 až 6% úhynů (Velíšek et al., 2014a).

Příkladem akutní otravy je masivní úhyn úhořů říčních (*Anguilla anguilla*) v Maďarském jezeře Balaton v letech 1991 a 1995. Vzhledem k nálezům pesticidních látek v tkáních ryb a inhibici funkce enzymu acetylcholinesterázy, která je příznakem otravy pesticidy, lze předpokládat, že právě pesticidy byly příčinou této otravy (Balint a kol., 1995).

V posledním období nejsou zaznamenávány případy havarijního úhynu ryb způsobených pesticidy, přesto je problematika pesticidů ve vodním prostředí stále aktuální (Svobodová a kol., 2011). V současné době přichází v úvahu spíše vliv subletálních koncentrací pesticidů na vodní ekosystém, kde mohou i v nízkých koncentracích negativně ovlivňovat vodní organismy (Velíšek a kol., 2014a).

Do vody se pesticidy dostávají přímo a nepřímo. Přímé vstupy zahrnují nesprávnou aplikaci (zasažení nádrže nebo toku při leteckém ošetření, únik preparátu do recipientu při čerpání zředovací vody, nedodržení technologických postupů v rybářství). Dalším příkladem je neodborná likvidace nepoužitých zbytků (vylévání zbytků přípravků

a vyplachování cisteren do recipientů, nezodpovědná manipulace s obaly, zbytky z čištění aplikačních strojů a pomocných zařízení). K dalším, velmi významným zdrojům přímého znečištění, patří odpady a odpadní vody z průmyslové výroby pesticidů, z domácností, z čištění strojů a různých zařízení. Nepřímou cestou vstupu pesticidů do životního prostředí jsou splachy do vod z okolních ošetřovaných zemědělských kultur. Riziko nepřímého vstupu do recipientu hrozí především v období zvýšených srážek (Velíšek a kol., 2014a).

Pesticidy narušují vodní ekosystémy a tím dochází k dlouhodobým změnám jejich přirozených podmínek. Navíc stále ještě není příliš prozkoumána otázka společné toxicity pesticidů (Ecobichon, 1991).

Samostatné používání pesticidů není příliš obvyklé. Tyto látky bývají používány v různých kombinacích a v těchto případech může nastat riziko jejich synergických účinků (Belden a Lydy, 2000). Kontaminace prostředí může být způsobena nejen účinnou látkou přípravku, ale i ostatními komponenty, které společně tvoří daný pesticid (Pitter, 1999).

Především při odtoku ze zemědělství a z průmyslových center dochází ke kontaminaci vodního prostředí a kumulaci znečištění v recipientech. Vyluhováním některých pesticidů může docházet i ke kontaminaci vod podzemních (Ceyhun a kol., 2010).

V rybářství a ve vodním hospodářství byly, nebo jsou, často používány některé pesticidy určené k (Velíšek a kol., 2014a):

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

Hlavní právní předpisy týkající se pesticidů

Maximální limit reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu upravuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 299/2008. S výše uvedeným nařízením úzce souvisí Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES. Tento předpis stanovuje rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Limit pro obsah pesticidů v pitné vodě je $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, dle směrnice EU 98/83/ES.

U nás upravuje zacházení s pesticidy zákon č. 350/2011 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích.

Zákon 199/2012 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, upravuje práva a povinnosti fyzických a právnických osob, týkající se ochrany rostlin a rostlinných produktů proti škodlivým organismům a poruchám registrace, uvádění na trh, používání a kontroly přípravků na ochranu rostlin a dalších prostředků na ochranu rostlin a kontroly účinných látek určených pro použití ve formě přípravku.

Registraci pesticidů v ČR provádí Státní rostlinolékařská správa. Podmínky registrace upravuje vyhláška č. 32/2012 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin. Ministerstvo zdravotnictví posuzuje přípravek z hlediska lidského zdraví. Tento posudek poskytuje Státní rostlinolékařské správě, která rozhodne o případné registraci.

Při aplikaci pesticidů je potřeba vnímat i fakt, že každé jejich použití vnáší tyto látky do životního prostředí, kde se mohou kumulovat a ovlivňovat vodní organismy. V současné době je kladen důraz na používání pesticidů, které jsou šetrnější k životnímu prostředí. Rezidua těchto pesticidů podléhají degradaci v mnohem kratším čase, než tomu bylo u pesticidů používaných v minulosti (např. v případě DDT se jedná o desítky let). Degradace moderních pesticidů pobíhá buďto mikrobiální cestou nebo fyzikálně-chemickými procesy. Jedná se o fotolýzu, hydrolýzu, vypařování či oxidaci vzdušným kyslíkem. S tím souvisí také biologická dostupnost pesticidů, která je ukazatelem chování pesticidu v životním prostředí (Drápal, 2005).

V povrchových vodách ČR jsou nejčastěji nalézána rezidua pesticidů na bázi triazinů, chloracetanilidů, derivátů kyseliny fenoxycetové, organofosfátů, karbamátů a derivátů močoviny (Sehonová a kol., 2012).

2.2.1. Herbicidy

Nejvíce využívanou skupinou pesticidů jsou herbicidy, které tvoří 45 až 50% produkce všech pesticidů. Jedná se o látky sloužící ke kontrole či eliminaci nežádoucích rostlin nebo jejich částí. Herbicidy mohou být používány i jako prevence zaplevelení porostů kulturních rostlin. Jsou buďto organického či anorganického původu (Neuman a kol., 1989).

Oblastí nejintenzivnějšího využívání herbicidů je zemědělství. Zde může nepřiměřený růst plevelů výrazně snižovat produkci pěstovaných rostlin, či zapříčinit úplnou ztrátu úrody. Plevelné rostliny jsou často daleko odolnější než rostliny cíleně pěstované a jsou schopny v krátké době úplně obsadit daný prostor (Nottingham, 2002).

U herbicidů rozlišujeme několik typů mechanismů účinku, kterými působí na ošetřené rostliny. Prvním mechanismem účinku je přerušení procesu fotosyntézy, kdy dochází k likvidaci nadzemní části rostliny. Dalším mechanismem je blokáce přenosu elektronů při fotosyntéze v chloroplastech a inhibice tzv. Hillovy reakce. Tento mechanismus je typický pro herbicidy ze skupiny triazinů. Dalšími mechanismy jsou narušení klíčivosti semen plevelů, inhibice buněčného dělení či syntézy aminokyselin (Ecobichon, 1991).

Dle selektivity jsou herbicidy děleny na selektivní a totální. Totální herbicidy působí na všechny rostliny na ošetřené ploše. Používají se především na nezemědělských půdách nebo k ničení ohnisek plevelů. Naproti tomu herbicidy selektivní při správném použití eliminují pouze cílové rostliny. Používány jsou nejčastěji na zemědělské půdě v porostech kulturních rostlin (Mikulka a kol., 2005).

Dle doby aplikace jsou herbicidy děleny na (Mikulka a kol., 2005):

- Předset'ové: herbicidy aplikované před výsadbou rostlin.
- Preemergentní: herbicidy aplikované po vysetí rostliny a před jejím vzejitím.

- Postemergentní: herbicidy aplikované po vzejití rostliny.

Mezi další dělení herbicidů patří dělení dle způsobu aplikace, a to aplikace na nadzemní část rostliny, nejčastěji na list, nebo aplikace na půdu (Zapletal a Nepejchalová, 2001).

2.2.2. Triaziny

Triaziny jsou jedny z nejstarších herbicidů, které byly objeveny již v roce 1952 švýcarskou společností J. R. Geigy Ltd. 1952 (Kearney a Kaufmann, 1975) a jsou nejčastěji používanými herbicidy na světě. Většina triazinů je tvořena symetrickou, heterocyklickou strukturou složenou ze střídajících se atomů uhlíku a dusíku. Nejznámějšími symetrickými triazinovými herbicidy jsou simazin, atrazin, ametryn, propazin, terbutryn a prometron. Jedinou výjimkou je právě metribuzin, který je tvořen strukturou asymetrickou a v současné době je používán hlavně k ochraně proti zaplevelení bramborových porostů (Giesy a kol., 2001).

Triazinové herbicidy jsou používány proti širokému spektru plevelů a to samostatně či v kombinaci s ostatními herbicidními látkami, které mohou zvyšovat jejich účinek. V nižších koncentracích (1 - 4 kg.ha⁻¹) je jejich účinek selektivní, ve vyšších koncentracích (5 - 20 kg.ha⁻¹) působí triazinové herbicidy totálně (Martin a Worthing, 1974).

Jak již bylo zmíněno, mechanismem účinku triazinů je inhibice fotosyntézy, konkrétně tzv. Hillovy reakce ve fotosystému II. Zasažené rostliny ztrácejí schopnost produkovat energii, což nejprve způsobí zastavení růstu a následuje úhyn. Tyto herbicidy jsou aplikovány na půdu, avšak místem vstřebávání do těla rostliny jsou kořeny (Corbett, 1974).

Triaziny jsou relativně stabilní ve vodním prostředí (poločas rozpadu je až 900 dní) a v sedimentech (až několik let). Přestože bylo používání většiny z nich v nedávné době zakázáno, stále se tyto látky ve formě reziduí vyskytují ve vodách na celém světě (Hildebrandt a kol., 2008; Woundneh a kol., 2009; Abrantes a kol., 2010; Vryzas a kol., 2011).

Vzhledem k této skutečnosti je osm látek ze skupiny tzv. S-triazinů (atrazin, cyanazin, prometryn, propazin, sebutylazin, simazin, terbutylazin a terbutryn) považováno za nebezpečné pro životní prostředí a v Evropské unii a USA zařazeno na seznam prioritních látek (US EPA, 1994; European Commission, 1999).

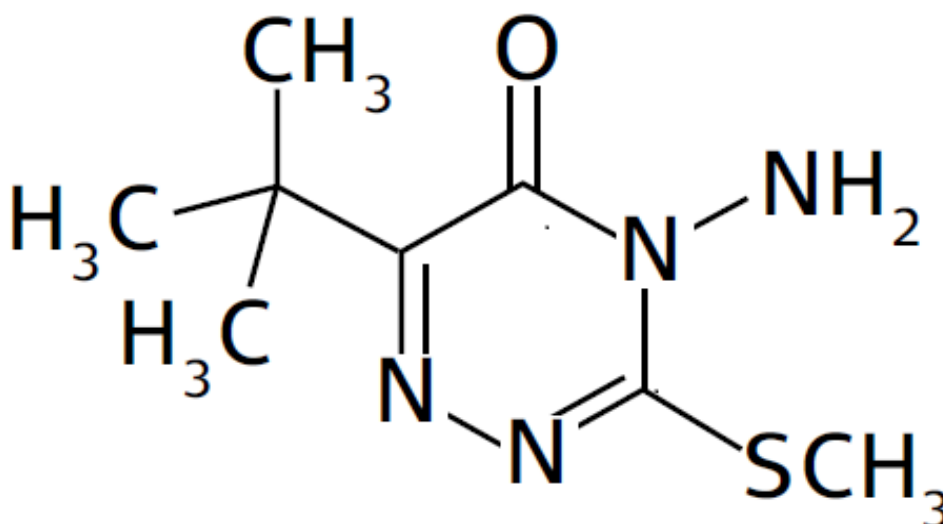
V současné době je na světě komerčně používáno 14 pesticidů na bázi triazinů, v ČR jsou registrované jen 4 účinné látky (metribuzin, metamitron, terbutylazin, tebuconazol) (Velíšek a kol., 2014a).

2.2.3. Metribuzin

Metribuzin (obr. č. 4.), empirický vzorec: C₈H₁₄N₄O_S, chemický název: [4 - amino - 6 - terc - butyl - 3 - (methythio) - 1,2,4 - triazin - 5 - on], CAS registrační číslo: 21087 - 64 - 9 (US EPA, 1998).

Metribuzin je asymetrický triazinový herbicid. Obchodními názvy je označován jako Sencor či Lexon. Komerčně je vyráběn ve formě rozpustných granulí, kapalného roztoku nebo jako suchý prášek určený k rozptylu po ošetřované ploše (Tomlin, 1994).

Molekulová hmotnost metribuzinu je 214,3. Teplota tání je 125 až 126,5 °C, tlak par je < 1,3 . 10⁻³ Pa při 20 °C (US EPA, 1998).



Obr. č 4. Chemická struktura metribuzinu (upraveno podle Breckenridge, 2010).

Poprvé byl metribuzin registrován v Kanadě v roce 1971, kde je ho ročně spotřebováno mezi 100 000 a 500 000 kg. Používán je jako preemergentní či postemergentní herbicid k eliminaci plevelů a trav. Metribuzin je registrován pro použití v porostech několika druhů plodin, a to především brambor, kukuřice a sóji. Nicméně prakticky je používán téměř výhradně pro ochranu brambor proti plevelům, kde bývá aplikován při výsadbě. Jedná se o selektivní systémový herbicid inhibující proces fotosyntézy, tak jako všechny triaziny (Tomlin, 1994).

Metribuzin je náchylný k odtoku do povrchových vod díky svým fyzikálněchemickým vlastnostem. Je poměrně dobře rozpustný ve vodě a některých organických rozpouštědlech. Rozpustnost ve vodě je 1,220 mg.l⁻¹ při teplotě 20 °C. Rozpustnost metribuzinu v některých organických rozpouštědlech dle US EPA (1998) je uvedena v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Rozpustnost metribuzinu v některých organických rozpouštědlech (US EPA, 1998).

Rozpouštědlo	g/100g rozpouštědla (teplota 20 °C)
Methanol	35
Ethanol	19
Aceton	82
Toluen	12
Xylen	9
Chloroform	85
Dimethylformamid	178
n-hexan	0,2
Ethyl acetát	4

Degradace metribuzinu probíhá pomocí fotochemické, chemické a biochemické deaminace. Poločas rozpadu v půdě je 30 až 120 dní, kdy nejrychlejší cestou degradace je cesta mikrobiální. Metribuzin podléhá deaminaci prostřednictvím půdní houby *Cunninghamella echinulata* (Pauli a kol, 1990).

Chemickou a mikrobiální degradací vznikají tři hlavní metabolity metribuzinu, deaminometribuzin (DA), diketometribuzin (DK) a deaminodiketometribuzin (DADK). Při úplné mikrobiální degradaci metribuzinu vzniká oxid uhličitý (CO₂) a voda. Mezi dostupnými metabolity tohoto procesu je metabolit DADK (Henriksen a kol., 2002).

Vodná fotolýza metribuzinu je velmi rychlá. Poločas rozpadu je zde kratší než jeden den, v přírodní rybníční vodě méně než sedm dní. Koncentrace metribuzinu v životním prostředí jsou obvykle nízké, maximum uváděné v Battaglin a kol. (2001) je 1,8 µg.l⁻¹.

Těkavost metribuzinu určená Henryho konstantou ($1,43 \times 10^{-9}$) je velmi nízká. Tato vlastnost spolu s poměrně vysokou rozpustností ve vodě je zřejmě příčinou kontaminace vodních zdrojů, a proto je metribuzin řazen mezi nejpravděpodobnější kontaminanty podzemních vod (US EPA, 1998).

Znečištění vody metribuzinem může nastat následkem neodborné aplikace za nevhodných povětrnostních podmínek, přímé aplikace na vodu nebo při erozi ošetřené půdy ze zemědělských ploch při srážkových událostech s následným odtokem do recipientu. Především při příchodu dešťů do 14 dnů od aplikace metribuzinu je riziko kontaminace povrchových vod velmi vysoké (Glotfelty a kol., 1984).

Doposud není k dispozici mnoho informací o osudu metribuzinu ve vodním prostředí. Stejně tak není příliš znám vliv metribuzinu na vodní organismy žijící v sedimentu (Muir, 1991). Metribuzin je mírně toxický pro vodní bezobratlé a vodní obratlovce. Hodnoty akutní toxicity (96hLC₅₀) pro slunečnici pestrá (*Lepomis gibbosus*) se pohybují mezi 80 - 100 mg.l⁻¹, pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) 42 - 76 mg.l⁻¹ (Mayer and Ellersieck, 1986; Worthing a Walker, 1987). U karasa stříbřitého (*Carassius auratus*) byla zjištěna akutní toxicita 10 mg.l⁻¹ (Kidd a kol., 1991).

Akutní toxicita metribuzinu pro vodní organismy se pohybuje mezi jednotkami až stovkami mg.l⁻¹, je tedy velice variabilní u jednotlivých druhů vodních organismů. Jako nejvíce citlivé organismy vůči působení metribuzinu se ukázaly být zelené řasy, nejméně citlivý je naopak skokan volský (*Lithobates catesbianum*). Toxicita metribuzinu pro vybrané vodní organismy je popsána v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Toxicita metribuzinu pro vybrané vodní organismy.

Organismus	expozice (hod.)	LC50/EC50 (mg.l-1)	Literatura
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	96	175,1	Velišek a kol. (2009)
Razbora černopruhá (<i>Rasbora borapetensis</i>)	96	145	Tooby a kol. (1975)
Slunečnice velkoploutvá (<i>Lepomis Macrochirus</i>)	96	75,96	Pesticide Ekotoxicity Database (2000)
Pstruh obecný (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)	96	42	Mayer a Ellersieck (1986)
Sumeček tečkovaný (<i>Ictalurus punctatus</i>)	96	3,4	Clemens a Slead (1959)
Hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)	48	98,5	Pesticide Ekotoxicity Database (2000)
Řasa (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	94	0,04	Caquet a kol. (1992)
	24	95,8	
Rak signálního (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	48	37,6	
	72	17,6	Velišek a kol. (2013)
	96	14,4	
Krab (<i>Uca pugilator</i>)	96	65	Pesticide Ekotoxicity Database (2000)
Kreveta (<i>Penaeus dourarum</i>)	96	48,27	Pesticide Ekotoxicity Database (2000)
Skokan volský (<i>Lithobates catesbianum</i>)	24	856	Chapman (1978)

Inhibice růstu vodních rostlin vystavených metribuzinu byla pozorována u daleko nižších koncentrací, než je tomu u bezobratlých a obratlovců. Bylo zjištěno, že koncentrace 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ významně inhibuje růst pěti druhů řas, a to *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas*, *Anabaena* a *Schizothrix* (Arvik a kol., 1973).

V současné době neexistují žádné studie, které by prokazovaly teratogenní, mutagenní či karcinogenní vliv na vodní organismy. Studií zabývajících se toxicitu metribuzinu, zejména těch dlouhodobých, také není mnoho. Bylo prokázáno, že metribuzin o koncentraci 32 mg.l^{-1} má za následek opoždění v ontogenetickém vývoji a zpomalení růstu. Dále způsobuje poškození jater a kaudální části ledvin kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (Štěpánová a kol., 2012). Podobné působení metribuzinu bylo pozorováno také u dánia pruhovaného (*Brachydanio rerio*) vystaveného koncentracím 33 mg.l^{-1} a 55 mg.l^{-1} (Plhalová kol., 2012).

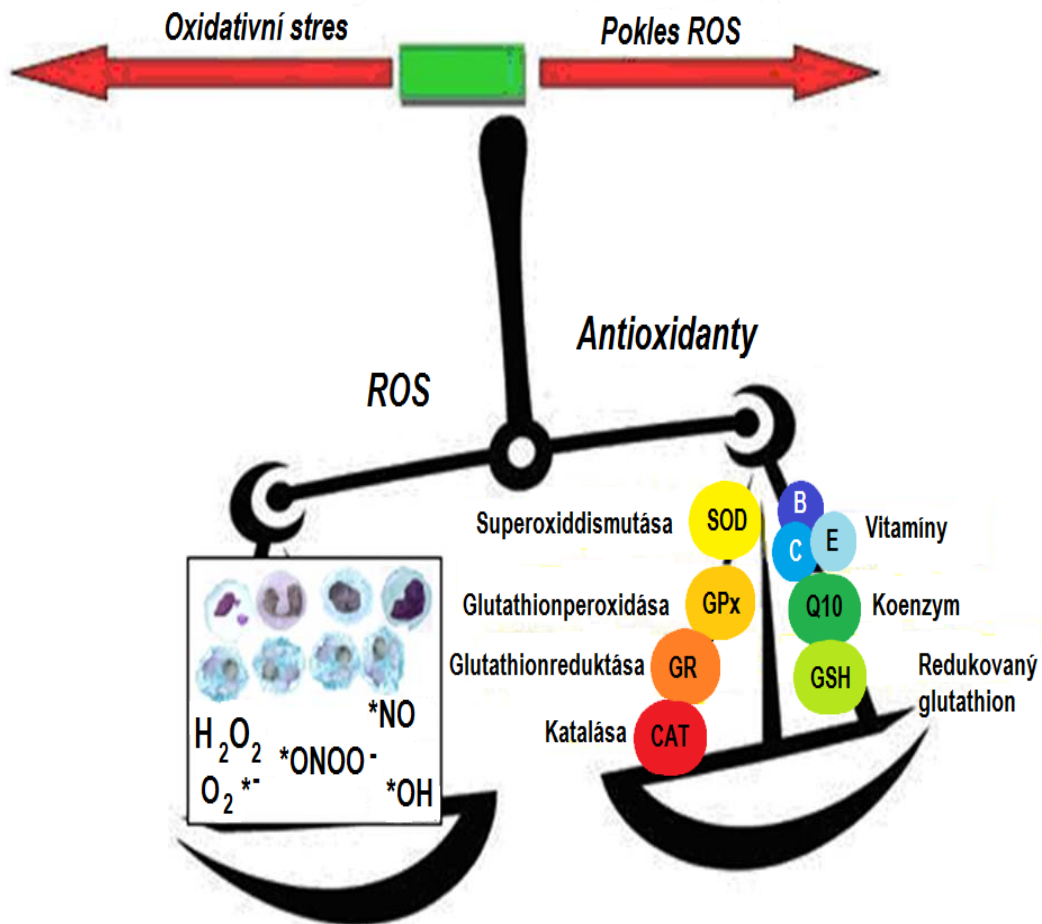
Další autoři popisují negativní vliv metribuzinu na hematologický a biochemický profil ryb (Modrá a kol., 2008; Velíšek a kol., 2008, Velíšek a kol., 2009). U obojživelníků vystavených environmentální koncentraci metribuzinu byly pozorovány poruchy imunitního systému (Christin a kol., 2004).

2.3. Oxidativní stres

Vedle ryb se i ostatní vodní organismy stávají stále významnějšími bioindikátory znečištění. Zájem o životní prostředí a vliv jeho znečištění na oxidativní stres a antioxidační systémy organismů vedl k zvýšenému zájmu o tuto problematiku v oblasti vodní toxikologie (Livingstone, 2001).

Oxidativní stres je způsoben zvýšeným množstvím volných radikálů v buňce (obr. č. 5). Volným radikálem chápeme vysoce reaktivní molekulu nebo molekulový fragment schopný samostatné existence. Volný radikál disponuje jedním nebo více molekulovými či atomovými orbitaly s nepárovým (volným) elektronem. Volné radikály velmi rychle reagují s okolními částicemi. Tato činnost je snahou volného radikálu o dosažení párového stavu elektronů a tím získání větší stability. Dojde-li k reakci dvou radikálů, vznikne molekula, která již není radikálem, protože získá druhý (párový) elektron. Ovšem v případě, kdy dojde k reakci radikálu s molekulou, která radikálem není, tato molekula se sama stane radikálem (získá nepárový počet elektronů). Tento stav může být počátkem dalších radikálových řetězových reakcí až do chvíle, kdy dojde k reakci s dalším volným radikálem (Halliwell a Gutteridge, 2001).

Buňky během svého života téměř nepřetržitě produkují volné radikály, které jsou zodpovědné za mnohé fyziologické procesy. Důležitou podmínkou správného fungování těchto procesů je udržení rovnováhy mezi vznikem a zánikem volných radikálů. Je-li tato rovnováha v buňce narušena a volné radikály se nacházejí v nadbytečném množství, mluvíme o oxidativním stresu. Oxidativní poškození buňky v důsledku oxidativního stresu je způsobeno v důsledku nadměrné tvorby volných radikálů, snížení antioxidační kapacity či ztrátou schopnosti buňky vyrovnávat se s oxidativním poškozením, případně kombinací těchto faktorů (Fiers a kol., 1999; Hofmanová a kol., 2000).



Obr. č. 5. Nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty
(upraveno podle Amira a Adly, 2010).

Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a volné radikály dusíku. Z těchto volných radikálů mohou vznikat látky s vysokou reaktivitou, které však již nemusí být volným radikálem (nemají nepárový elektron). Tyto látky se nazývají reaktivní formy kyslíku (ROS z angl. *Reactive Oxygen Species*) a reaktivní formy dusíku (RNS z angl. *Reactive Nitrogen Species*). Mezi ROS řadíme superoxidové anionty (O_2^-), hydroxylové radikály (OH), peroxy (ROO), alkoxy (RO), hydroperoxy (HO₂), které jsou radikálové povahy a peroxid vodíku (H₂O₂), kyselina chlorná (HClO), ozon (O₃) a singletový kyslík (¹O₂), které jsou neradikálové povahy (Racek a Holeček, 1999; Štípek a kol., 2000; Zhang, 2003).

Mezi nejběžnější reakce vznikající v důsledku oxidativního stresu patří oxidace lipidů (tzv. lipidní peroxidace). Nejčastěji dochází k oxidaci polynenasycených

mastných kyselin, při které vznikají pro organismus toxické hydroperoxydy a aldehydy. Dále může docházet k poškození DNA a vzniku mutací v důsledku oxidace nukleotidů. Jedná se také o narušení syntézy proteinů, změny jejich struktury, narušení transkripce a translace, poškození struktury buněčných membrán v důsledku oxidace lipidů (především fosfolipidů) a poškození jejich prostupnosti, poškození mitochondrií a mitochondriální DNA. Všechny tyto změny mohou mít pro buňku fatální následky, které mohou vést až k apoptóze (buněčné smrti) (Kovacic a kol., 2005; Lushchak, 2011).

Především mitochondrie poškozené oxidativním stresem pak produkují stále větší množství ROS a tím dochází k ještě masivnější destrukci DNA (Finkel a Holbrook, 2000). Takovéto změny se dále projevují na vyšších úrovních snížením či ztrátou funkce orgánů či orgánových soustav (Lushchak, 2011).

Častou příčinou vzniku oxidativního stresu jsou nepříznivé vnější vlivy, jako například znečištění vodního prostředí. Oxidativní stres je jedním z mechanismů obecné toxicity mnohých xenobiotik. Množství produkce ROS při oxidativním stresu a jejich reakce s biomolekulami je jedním z ukazatelů toxicity látek na organismus (Hofmanová a kol., 2000).

Zjištění oxidativního stresu v důsledku působení širokého spektra různých xenobiotik bylo zjištěno jak u člověka, tak i u dalších organismů včetně vodních. Toto se týká především sloučenin, které jsou schopné jedoelektronové redukce a tím i vzniku volného radikálu. Oxidativní stres byl prokázán po expozici xenobiotikům, jako jsou perzistentní organické polutanty, těžké kovy, ale i toxiny vznikající při masivním rozvoji sinicového květu (van der Oost a kol., 2003).

2.3.1. Biomarkery

Účinky xenobiotik v organismech jsou sledovány pomocí biomarkerů, které zahrnují změny (odpovědi) organismu na expozici xenobiotikům. Tyto změny odrážejí specifické toxické účinky, jako je zvýšená produkce ROS při oxidativním stresu, enzymatické a strukturální změny, například skeletální změny (skolyóza, lordóza) či

epidermální léze. Dále lze pozorovat změny v chování, snížení imunity a s ním spojená vyšší náchylnost k infekci (Boelsterli, 2003).

Další odpovědí organismu po expozici těžkým kovům, či některým pesticidům (pyrethroidům, triazinům) jsou hematologické změny (např. změny počtu erytrocytů a leukocytů), biochemické změny v plazmě (např. změny aktivity jaterních enzymů, změny koncentrace glukózy, laktátu a bílkovin) a histopatologické změny (Ballantyne a kol., 1999).

Mezi biomarkery oxidativního stresu je řazeno přímé vyhodnocení zvýšené produkce ROS po expozici testované látky. Tento postup je ovšem díky vysoké reaktivitě a krátké životnosti ROS poněkud složitý a lze jej použít pouze pro *in vitro* studie (Li a kol., 2003).

Dále lze sledovat změny biomolekul, jako například měření produkce malondialdehydu (MDA) vznikajícího během peroxidace lipidů. Studovat lze také změny v antioxidantních a detoxikačních systémech, aktivitu jednotlivých enzymů a hladiny kritických antioxidantů. Sledování biomarkerů může sloužit jako včasné varování před nepříznivými vlivy xenobiotik a případnými škodami vyplývajícími ze znečištění životního prostředí (van der Oost a kol., 2003).

2.3.2. Antioxidační systémy

Většina živých organismů je závislá na produkci adenosintrifosfátu (ATP, z angl. *adenosine triphosphate*) na bázi kyslíkového metabolismu. Důsledkem této činnosti je ovšem produkce reaktivních forem kyslíku jako vedlejšího produktu. Jako ochrana před ROS a jejich toxicitou slouží antioxidační systémy organismu (Lushchak, 2011).

Antioxidanty jsou látky, které brání vzniku nadměrného množství volných radikálů, regulují jejich aktivitu, transformují je do nereaktivních forem nebo jejich reaktivitu snižují a tím brání oxidaci. Antioxidační ochrana organismu je velice propojeným systémem, ve kterém na sebe jednotlivé antioxidanty navazují a vzájemně se ovlivňují (Lushchak, 2011).

Rozeznáváme tři základní úrovně působení antioxidantních systémů (Šípek a kol., 2000):

- Na úrovni tvorby ROS, kdy je snižována aktivita enzymů podílejících se na jejich tvorbě.
- Na úrovni zachycení a odstranění již vzniklých ROS.
- Na úrovni regenerace již poškozených biomolekul (proteinů, DNA, lipidů).

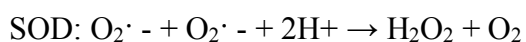
Dalším dělením antioxidantních mechanismů je dělení na mechanismy enzymatické a neenzymatické (Lushchak, 2011).

2.3.2.1. Enzymatické antioxidantní systémy

Mezi enzymatické antioxidantní systémy patří superoxiddismutázy (SOD), katalázy (CAT), glutathionperoxidázy (Gpx), glutathion-S-transferázy (GST). Tyto enzymy tvoří první linii antioxidantní ochrany, reagují přímo s volnými radikály a zmírňují jejich škodlivé vlivy na buňku. Zatímco glutathionreduktázy (GR) a glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy (G6PDH) se podílejí na znovuoobnovení buněčných funkcí (Fiers a kol., 1999; Lushchak, 2011).

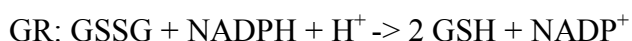
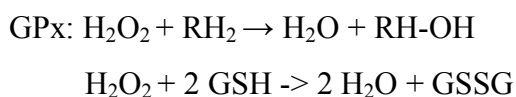
Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza je obsažena téměř ve všech aerobních organismech. Jedná se o velmi stabilní enzym ze skupiny metaloenzymů. SOD je zodpovědná za dismutaci superoxidu za vzniku peroxidu vodíku, který je dále štěpen glutathionperoxidázou a katalázou. Působením superoxiddismutázy je výrazně sníženo riziko vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu. Rozlišujeme různé typy superoxiddismutázy, které se liší kofaktorem, atomem kovu (Fe^{2+} SOD, Mn^{2+} SOD, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD), který určuje katalytický účinek s určitým typem ROS (Šípek a kol., 2000). Proces probíhá zjednodušeně podle rovnice (Šípek a kol., 2000):



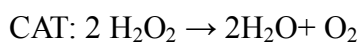
Glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza

Peroxidáz rozeznáváme několik druhů. U živočichů a člověka je nejčastější peroxidázou glutathionperoxidáza, která slouží k oxidaci glutathionu. U rostlin je nejčastěji se vyskytující peroxidázou askorbátperoxidáza, která využívá kyselinu askorbovou (vitamin C). Enzym glutathionperoxidáza společně s katalázou navazují na činnost superoxiddismutázy a dále katalyzují vzniklý peroxid vodíku. Aby glutathionperoxidáza mohla nepřetržitě zajišťovat štěpení peroxidu vodíku, musí docházet k regeneraci glutathionu v redukované formě. Zde se uplatňuje další z výše zmíněných enzymů, glutathionreduktáza. Jedná se o sekundární antioxidant (Šípek a kol., 2000). Proces probíhá zjednodušeně podle rovnice (Šípek a kol., 2000):

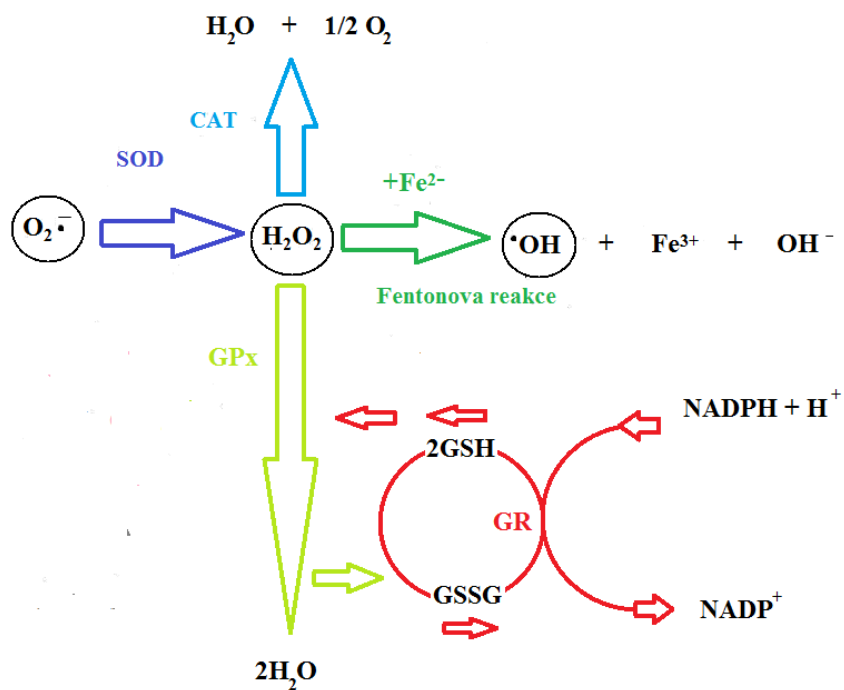


Kataláza

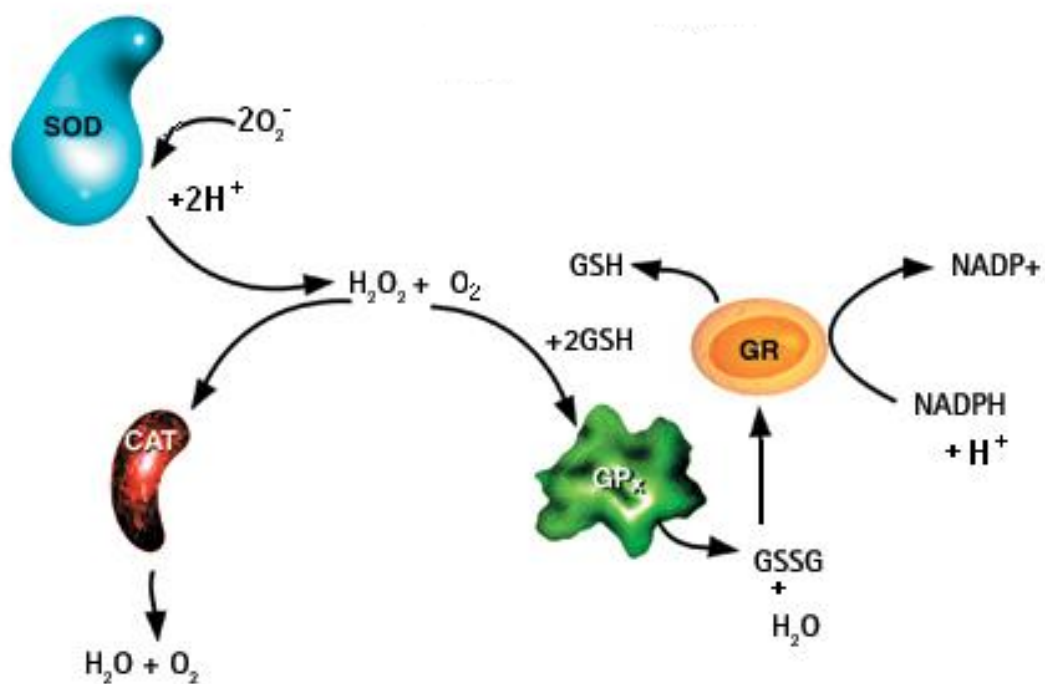
Enzym kataláza je zodpovědný za štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tímto kataláza navazuje na činnost superoxiddismutázy. Kataláza je enzym s nejvyšší rychlostí přeměny substrátu, štěpí ovšem pouze zvýšené koncentrace peroxidu vodíku. Zatímco glutathionperoxidáza štěpí i nízké koncentrace H_2O_2 (Šípek a kol., 2000; Leopold a Loscalzo, 2000). Proces probíhá zjednodušeně podle rovnice (Šípek a kol., 2000):



Vzájemné působení antioxidantních enzymů je uvedeno na obrázku č. 6 a 7.



Obr. č. 6. Souvislost mezi hlavními antioxidačními enzymy (upraveno podle Šípek a kol., 2010).



Obr. č. 7. Vzájemné působení antioxidačních enzymů (upraveno podle Amira a Adly, 2010).

2.3.2.2. Neenzymatické antioxidační systémy

Neenzymatické antioxidační systémy dělíme na přímé a nepřímé. Přímě působící antioxidanty jsou velice důležité při primární obraně proti oxidativnímu stresu. Do této skupiny je zahrnuta kyselina askorbová (vitamin C), působící jako jakýsi zachytávač volných radikálů a glutathion, velice významný antioxidant podílející se společně s enzymatickými antioxidanty na odstraňování peroxidu vodíku. Funkční skupinou glutathionu je thiolová skupina. Proto je glutathion důležitý pro ochranu thiolových skupin buňky a je schopný vytvářet i jejich určité rezervy. Rovněž detoxikuje volné radikály (Lushchak, 2011). Zvýšení hladiny glutathionu zaznamenal Bláha a kol., (2004) po expozici sinicovým toxinům (cyanotoxinům).

Do této skupiny neenzymatických antioxidačních systémů patří i karotenoidy (vitamin A), které se podílejí na zachytávání singletového kyslíku, hydroxylových a peroxylových radikálů. Do skupiny přímě působících antioxidantů patří též polyfenoly, kyselina lipoová a isomer vitamínu E α -tokoferol, lipofilní antioxidant, důležitý při ochraně membrán před lipidní peroxidací, který ovšem při vysokých koncentracích může působit prooxidačně. Velká většina těchto látek je přijímána s potravou, minimum jsou buňky schopny syntetizovat. Mezi nepřímé antioxidanty jsou řazeny látky schopné vázat kovy (tzv. chelatační činidla) (Halliwell a Gutteridge, 2000; Lushchak, 2011).

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního byl hodnocen pomocí dlouhodobého testu toxicity. Pokus probíhal v akvaristické místnosti laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie na Fakultě rybářství a ochrany vod, Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém JU ve Vodňanech.

Testy toxicity na organismech vodního prostředí hrají důležitou roli při hodnocení rizik nejenom pesticidů, ale i ostatních látek vyskytujících se ve vodním prostředí, které mohou být potenciálně nebezpečné pro vodní prostředí jako celek.

3.1. Princip a podmínky testu

Dlouhodobé testy toxicity jsou určeny k posouzení vlivu nízkých koncentrací chemických látek. Experimentální organismy jsou vystaveny určité koncentraci testované látky rozpuštěné ve vodě nebo rozpouštědle (např. dimethylsulfoxid - DMSO). Během testu je nutné pravidelně zaznamenávat teplotu vody, množství rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH a koncentraci testované látky, aby byla splněna validita testu.

3.2. Experimentální materiál

Původní druhy raků vyskytující se na území České republiky patří mezi ohrožené druhy a jsou chráněni jak vnitrostátními, tak i evropskými předpisy. Proto by bylo jejich použití pro účely testů toxicity nejenom neetické, ale i nezákonné. Z tohoto důvodu byl vybrán invazivní druh, rak signální, který je velice vhodným druhem pro toxikologické studie (Kozák a kol., 2011).

Pro tuto studii byli použiti dospělí jedinci raka signálního (obr. č. 8), kteří byli získáni z chovu Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Raci o hmotnosti 20,36 g až 73,0 g (\varnothing 38,49 g), délce hlavohrudi 33,18 až 58,97 mm (\varnothing 46,36 mm) (měří se od začátku rostra až po

konec hlavohrudi) a postorbitální délky hlavohrudi 26,63 mm – 51,45 mm (ϕ 38.77 mm) (měří se od zadní části oční jamky až po konec hlavohrudi), byli homogenní a v dobrém zdravotním stavu.



Obr. č. 8. Rak signální použitý k testu toxicity.

3.3. Průběh testu

Raci byli 10 dní před začátkem testu náhodně rozděleni do akvárií (obr. č. 9 a 10) o objemu 300 litrů, s objemem testované vody 100 l. Tento postup přispěl k jejich dobré aklimatizaci v novém prostředí. Každé z akvárií bylo vybaveno dostatkem úkrytů (obr. č. 11). Toto opatření snižuje pravděpodobnost kanibalismu mezi raky (Kouba a kol., 2012).



Obr. č. 9. Rak signální v akváriu.

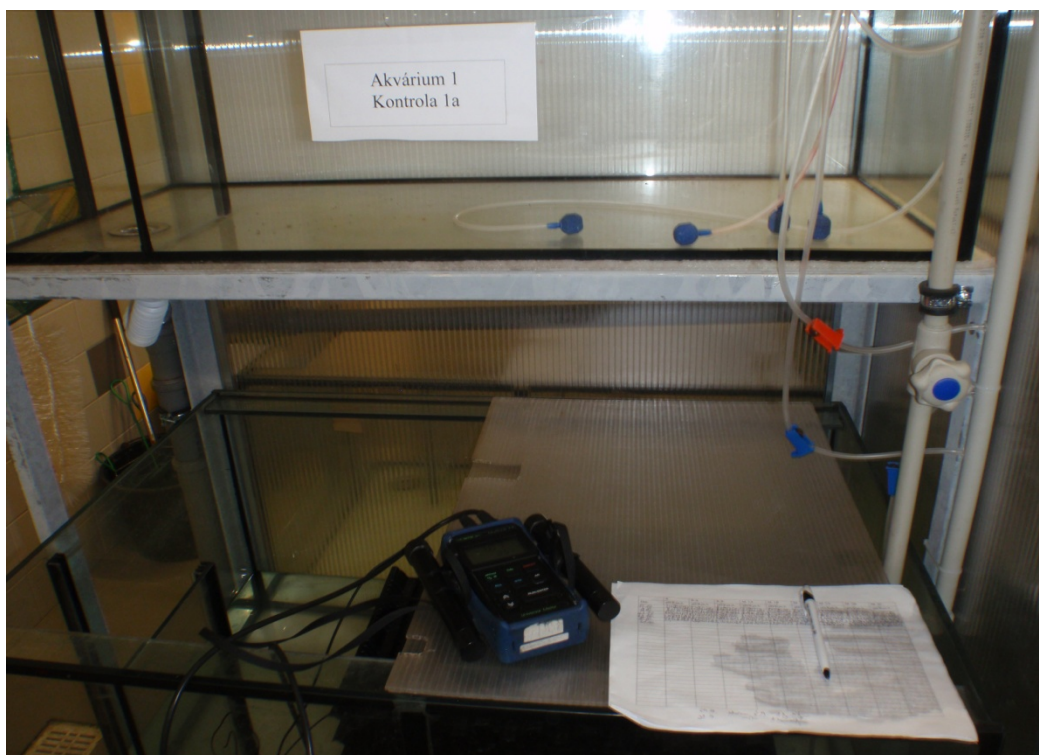


Obr. č. 10. Testovací akvária s raky.



Obr. č. 12. Úkryt jako prevence kanibalismu.

Fyzikálně chemické parametry vody v akváriích byly zaznamenávány jednou za 24 hodin v průběhu celého testu. Tyto parametry vody byly následující: teplota se pohybovala v rozmezí 18,5 až 20,8 °C, pH vody bylo v rozmezí 7,40 - 8,03. Dalším sledovaným parametrem bylo nasycení vody kyslíkem, které dosahovalo 72 - 99 %. Všechny tyto hodnoty byly pravidelně kontrolovány a zaznamenávány (obr. č. 12). V průběhu testu byl nastaven stabilní světelný režim, a to 12 hodin světla a 12 hodin tmy.



Obr. č. 12. Kontrola parametrů vody.

Test byl proveden semistaticky s dobou expozice šedesát dní. Raci byli vystaveni metribuzinu po dobu prvních třiceti dnů. Po 30 denní expozici následovala 30 denní fáze depurace (sloužící k pročištění a regeneraci organismu testovaných raků). Během fáze depurace byli již raci umístěni pouze do čisté vody, bez testované látky.

Metribuzin použitý pro experiment byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich Corporation (USA) a jeho chemická čistota byla 99,3%.

Celkem 108 raků bylo náhodně rozděleno do devíti skupin po dvanácti jedincích. Dvě skupiny raků byly vystaveny testovaným koncentracím metribuzinu. Třetí skupina sloužila jako neošetřená kontrola. Test byl proveden ve třech replikacích včetně kontroly. Zvolené koncentrace metribuzinu byly následující:

- 1) environmentální koncentrace zjištěná v českých řekách $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2014),
- 2) $3,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, což odpovídá 10 % 96hLC50 metribuzinu pro raka signálního (Velíšek a kol., 2013).

Koncentrace metribuzinu v testovacích roztocích během pokusu byla stanovena analyticky, pomocí metody tandemové hmotnostní spektrometrie (LC/MS/MS).

Průměrná koncentrace metribuzinu se nelišila od nominální koncentrace o více než 8 procent. Stanovení koncentrace nebylo součástí diplomové práce a toto stanovení bylo provedeno formou služby.

Krmení raků probíhalo jednou denně v množství 1% hmotnosti. Raci byli krmeni komerčním krmivem pro ryby STECO Pre Grower-14 2,0 mm od nizozemské firmy Coppens.

Roztoky v jednotlivých akváriích byly vyměňovány každý den a to 2 hodiny po krmení. Tento postup zajišťoval optimální kvalitu vody a optimální koncentraci metribuzinu.

3.3.1. Odběr vzorků

Vzorky byly odbírány vždy po ukončení jednotlivých expozičních období a to po 10 dnech expozice, po 30 dnech expozice a po 60 dnech (30 dní depurace v čisté vodě bez testované látky). Z každého akvária byli náhodně odebráni tři jedinci. Tito vybraní raci byli změřeni (obr. č. 13), zváženi (obr. č. 14) a bylo určeno jejich pohlaví. Veškeré zjištěné hodnoty byly ihned zaznamenány.



Obr. č. 13. Měření raků.



Obr. č. 14. Vážení raků.

Poté byli raci umístěni do misky se šupinkovým ledem, což způsobilo jejich anestezii. Dále následoval odběr vzorků hepatopankreatu, svalů a žaber od každého jedince (obr. č. 15, 16 a 17).



Obr. č. 15. Odběr vzorků tkání.



Obrázek č. 16. Vzorek hepatopankreatu (vlevo), vzorek svalů (uprostřed) a vzorek žaber (vpravo).

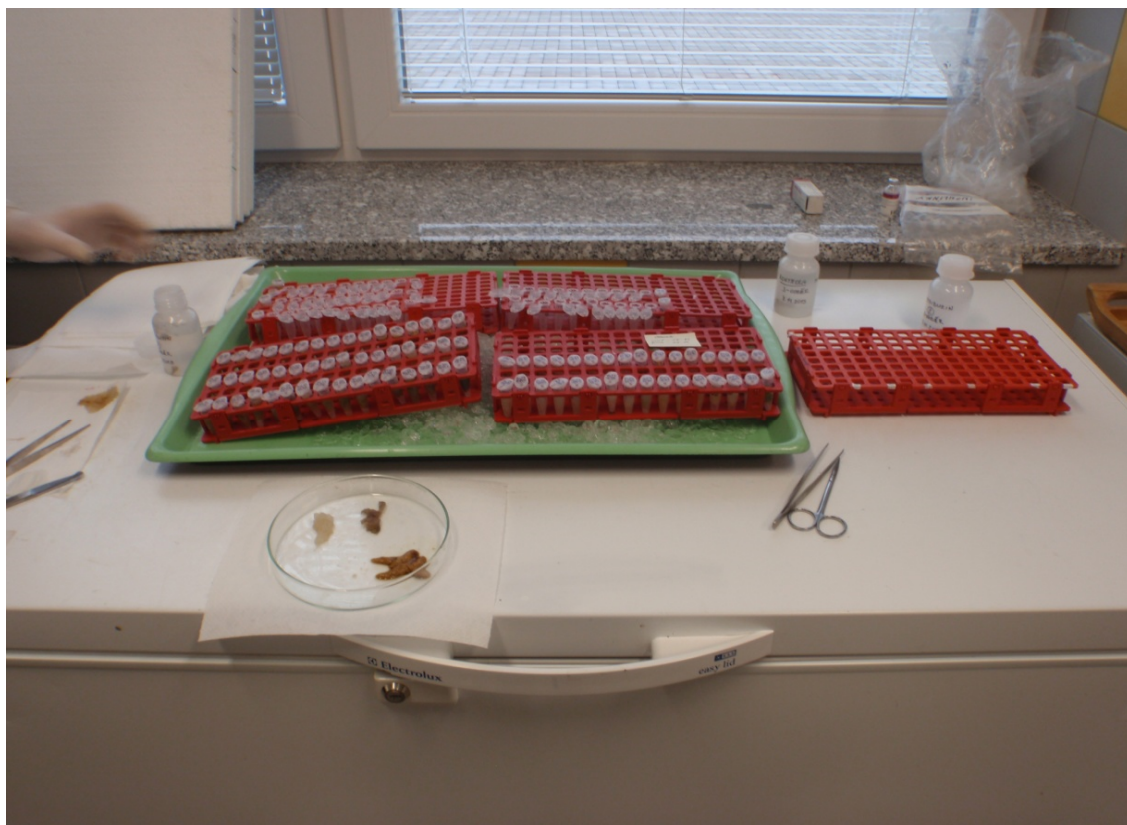


Obr. č. 17. Vzorky tkání na petriho misce.

Odebrané vzorky (obr. č. 18) byly umístěny do hlubokomrazicího boxu s teplotou - 80 °C, kde byly uchovávány až do doby jejich analyzování.

Tyto zmražené vzorky byly zváženy a následně homogenizovány (1: 10, w/v) v Ultra Turrax homogenizéru (od firmy Ika, Německo) za použití 50 mM pufru fosforečnanu draselného o pH 7,0 s obsahem 0,5 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Homogenát byl rozdělen na dvě části, jedna byla použita pro

měření kyseliny thiobarbiturové, reaktivní látky (TBARS) a druhá část homogenátu byla centrifugována při 12 000 g po dobu 30 minut, při teplotě 4 °C. Takto vzniklý supernatant byl připraven pro další analýzy antioxidantních parametrů, superoxidismutázy (SOD), katalázy (CAT), glutathionreduktázy (GR).



Obr. č. 19. Vzorčky tkání připravené k zamrazení a následným analýzám.

3.4. Metody stanovení biomarkerů

3.4.1. Metoda stanovení lipidní peroxidace

Princip metody

Lipidní peroxidace je měřena pomocí stanovení TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*). Principem metody je stanovení barevných aduktů, vznikajících při reakcích produktů lipidní peroxidace s kyselinou barbiturovou - TBA. Produktem lipidní peroxidace je malondialdehyd - MDA - (sekundární lipidický oxidační produkt vznikající při reakcích reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS) s nenasycenými mastnými kyselinami). Při reakci MDA s TBA vzniká barevný komplex, který je spektrofotometricky měřen.

Aktivita TBARS byla stanovena spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru s fluorescenčním a luminiscenčním modulem Infinite M200PRO (TECAN) při 532 nm podle metodiky Luschak (2005).

Materiál a reagensie

TCA - BHT (20% kyselina trichloroctová (w/v), 2% butylovaný hydrotoluen (w/v), v poměru 200 : 1 TCA : BHT)

0,6 M HCl

TRIS - TBA (25 mM TRIS, 100 mM TBA v destilované vodě, pH 7,4)

Standard MDA (0,22% 1,1,3,3 - tetraethoxypropan (w/v) v 1% H₂SO₄)

2 mM FeSO₄ v PBS

Postup metody

Při stanovení byl použit necentrifugovaný homogenát vzorku. Vzorek (250 µl) byl 30 minut preinkubován s 12,5 µl 2 mM FeSO₄ při 37 °C. K homogenátu byl v poměru 250 µl : 75 µl přidán roztok TCA - BHT, následovalo promíchání na vortexu

a dvacetiminutová centrifugace při 4000 rpm a 4 °C. Do mikrozkušavek bylo pipetováno 250 µl centrifugovaného vzorku, dále bylo přidáno 50 µl HCl a 200 µl TRIS - TBA. Vzorek byl ponechán po dobu 45 minut při teplotě 90 °C na termobloku. Ochlazený objem (250 µl) byl přepipetován do mikrotitrační desky. Vzniklé zbarvení bylo měřeno spektrofotometricky.

Kalibrace

Kalibrační křivka byla stanovena v rozsahu 0,5 - 8 nmol MDA. Standard MDA: 10 mM zásobní roztok MDA - 11,02 mg tetraethoxypropanu rozpuštěného v 5 ml 1 % H₂SO₄. Roztok byl ponechán stát po dobu dvou hodin, poté byl naředěn na 100 µM roztok MDA v 1% H₂SO₄ (100x ředění). Následně byla připravena koncentrační řada. Koncentrační řada je uvedena v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Koncentrační řada pro stanovení TBARS.

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

Vyhodnocení

Vzniklé produkty byly vypočítány podle vytvořené kalibrační křivky se standardem MA připraveným kyselou hydrolyzou MDA. Hodnoty byly poté vyjádřeny jako nmol TBARS.mg⁻¹ proteinů.

3.4.2. Stanovení enzymatické aktivity superoxiddismutázy (SOD)

Princip metody

Superoxiddismutázy jsou skupinou metaloenzymů s iontem kovu (mědi, zinku, manganu a niklu) ve své struktuře. SOD jsou přítomny ve všech buňkách, ale nejvíce se nacházejí v játrech. Jejich hlavní role je kontrola hladiny superoxidů v buňce, a to tím, že katalyzují reaktivní superoxidové radikály na molekulový kyslík a peroxid vodíku (Ozturk Urek a Tarhan, 2001).

Princip metody stanovení je založen na inhibici řízené superoxydy SOD. K produkci superoxidů je použit systém NADH a phenazin methosulfonát (PMS). Tyto superoxydy jsou stanoveny pomocí NBT, které se po reakci mění na barevný stabilní formazanový produkt, který je spektrofotometricky měřen (Ewing a Janero, 1995).

Aktivita SOD byla stanovena spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru s fluorescenčním a luminiscenčním modulem Infinite M200PRO (TECAN) při 560 nm podle metodiky Marklund a Marklund (1974).

Materiál a reagentie

Homogenizační pufr: 50 mM PP pufr (KH₂PO₄) s 1 mM EDTA

PP pufr: 50 mM PP pufr s 0,1 mM EDTA

60 μM NBT (nitrobluetetrazolium) a 100 μM NADH v PP pufru

35 μM PMS (phenazine methosulfonate)

Postup metody

Do mikrodestičky bylo pipetováno 10 μl homogenátu vzorku a 15 μl 50 mM homogenizačního pufru (pro blank 25 μl pufru). Poté bylo přidáno 200 μl homogenizačního pufru s NADH a NBT a celý objem byl promíchán. Vzorek byl měřen při 560 nm v dvaceti sekundových intervalech po dobu dvou minut. Reakce započala přidáním 25 μl 35 μM PMS a byla měřena při 560 nm ve dvaceti sekundových intervalech po dobu pěti minut. Každý vzorek byl měřen třikrát.

Vyhodnocení

Molární extinkční koeficient NBT byl při 560 nm 15 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Během stanovení byla sledována inhibice tetrazoliové soli na formazan. Naměřená hodnota aktivity SOD byla vypočtena podle vzorce a vyjádřena v $\text{nmol NBT}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$\text{SOD aktivita} = \frac{(\text{Směrnice křivky blanku} + \text{směrnice křivky se vzorkem/min}) - \text{směrnice křivky s PMS se vzorkem/min}}{0,6791 * 15000 * (\text{mg/m protein}) * 10^6}$$

3.4.3. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)

Princip metody

Katalázy jsou enzymy obsahující ve své struktuře porfyrinové hem skupiny nebo atomy manganu, mající vliv na jejich reaktivitu. Katalázy se nacházejí především v peroxizomech, a to hlavně jaterních buňkách (Zamocky a kol., 2008). Hlavní funkcí kataláz je katalýza, rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Šípek a kol., 2000).

Principem metody stanovení katalázy je její schopnost přeměnit peroxid vodíku na vodu a kyslík. Měřením se sleduje pokles absorbance směsi vzorku s H₂O₂ v kyvetách při 240 nm (Aebi, 1984).

Materiál a reagensie

Homogenizační pufr: 50 mM PP pufr (KH₂PO₄) s 1 mM EDTA

TRIS - EDTA pufr: 50 mM TRIS pufr s 0,1 mM EDTA (pH 7,6)

0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS - EDTA pufru s 0,1 mM EDTA (pH 7,6)

Postup metody

Do mikrokyvet bylo pipetováno 5 µl homogenátu vzorku a 50 µl 50 mM homogenizačního PP pufru. Dále bylo přidáno 250 µl 0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS - EDTA pufru s 0,1 mM EDTA a promícháno. Absorbance reakční směsi byla měřena v pěti sekundových intervalech po dobu 30 sekund při 240 nm. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních.

Vyhodnocení

Naměřená hodnota CAT aktivity byla vyjádřena jako směrnice křivky, od které je odečtena směrnice blanku a vypočtena dle rovnice na µmol H₂O₂ min⁻¹.mg⁻¹ proteinů:

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{39,4 * 1 * (\text{mg/ml})} * 10^3$$

3.4.4. Stanovení enzymatické aktivity glutathion reduktázy (GR)

Princip metody

Glutathion reduktáza katalyzuje oxidovaný glutathion (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH). Princip stanovení aktivity GR je na základě snížení množství NADPH během reakce.

Aktivita GR byla stanovena spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru s fluorescenčním a luminiscenčním modulem Infinite M200PRO (TECAN) měřením oxidace NADPH při 340 nm podle metodiky Carlberg a Mannervik (1975).

Materiál a reagensie

GR pufr (0,1M KH₂PO₄, 2 mM EDTA, pH 7)

GSSG (10 mM ve vodě) (MW = 656,5)

NADPH (1 mM v GR pufru) (MW = 833,4)

Postup metody

Do mikrodestiček bylo napipetováno 80 μ l GR pufru, 20 μ l NADPH, 20 μ l GSSG a 30 μ l destilované vody. Roztok byl při pokojové teplotě dvacet sekund promícháván a následně byla měřena spotřeba NADPH - pokles absorbance při 340 nm bez vzorku po dobu 2 min. Začátek reakce nastal po přidání 50 μ l vzorku. Dále bylo provedeno měření při 340 nm v patnácti sekundových intervalech po dobu 5 minut.

Vyhodnocení

Molární extinkční koeficient NADPH byl při 340 nm 6220 M⁻¹.cm⁻¹.

Aktivita GR byla vyjádřena jako počet jednotek na ml: mU/ml = nmol NADPH min⁻¹-ml⁻¹.

$$\text{Pozadová přeměna NADPH = - bez vzorku} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,4075 * 6220 * (\text{mg/ml protein})} * 10^6$$

$$\text{GR aktivita = - se vzorkem} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,5433 * 6220 * (\text{mg/ml protein})} * 10^6$$

3.4.5. Metoda stanovení hladiny koncentrace proteinů

Princip metody

Podle metody Lowryho a kol. (1951) je podstatou stanovení koncentrace proteinů využití Folin-Ciocalteu fenolové reagensie, při vzniku modře zabarveného komplexu. Reakcemi jsou komplexace Cu^{2+} iontů z CuSO_4 a redukce fosfomolybdátu. Detekce metody je v rozsahu od 0,005 do 2 mg proteinů na ml.

Stanovení koncentrace bílkovin bylo provedeno spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru s fluorescenčním a luminiscenčním modulem Infinite M200PRO (TECAN) při 680 nm.

Materiál a reagensie

NaOH (4,5% NaOH (w/v), 8,5% NaHCO_3 (w/v))

CuSO_4 (0,1% CuSO_4 (w/v), 0,392% citronan sodný (w/v))

Folin reagent (1 díl Folin-Ciocalteu reagentu: 4 díly destilované vody)

BSA - bovinní albumin (1 mg.ml⁻¹ PBS)

Postup metody

Do mikrodestiček bylo pipetováno 40 µl BSA standardu nebo desetkrát naředěného vzorku. Poté bylo napipetováno 35 µl NaOH + 105 µl CuSO₄ a 70 µl Folin reagentu. Postup je uveden v tabulce č. 4. Vše bylo promícháno na třepačce.

Mikrodestičky byly inkubovány po dobu třiceti minut ve tmě při teplotě 37 °C. Absorbance byla měřena při 680 nm proti blanku.

Tabulka č. 4. Postup stanovení koncentrace proteinů.

µl	Mikrodestička				
	PBS	Vzorek	NaOH	CuSO ₄	Folin reagent
Blank	40	-	35	105	70
Vzorek	-	40	35	105	70

Kalibrace metody

Nejprve byl připraven roztok BSA: 1 mg.ml⁻¹ PBS, který byl naředěn dle koncentrační řady. Koncentrační řada je uvedena v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5. Koncentrační řada pro stanovení koncentrace proteinů.

mg.ml ⁻¹	1 mg.ml ⁻¹ BSA (μl)	PBS (μl)
1	200	0
0,8	160	40
0,6	120	80
0,4	80	120
0,2	40	160
0,1	20	180
0,05	10	190
0,02500	5	195
blank	0	200

Vyhodnocení

Koncentrace proteinů ve vzorku byla vypočtena podle kalibrační křivky pro BSA - v rozsahu 0,1 - 1 mg.ml⁻¹.

3.5. Statistické vyhodnocení testu

Za účelem stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami a pro stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami a skupinou kontrolní byla použita jednosměrná analýza variance (ANOVA). Toto statistické vyhodnocení bylo provedeno za pomoci programu Statistica, verze 12.0 pro Windows (StatSoft).

4. VÝSLEDKY

4.1. Chování raků

V průběhu experimentu bylo sledováno chování (příjem krmiva, dýchání, pohybová aktivita) raků signálních v jednotlivých experimentálních skupinách a kontrole. Raci kontrolní skupiny ani raci vystavení experimentálním koncentracím 0,52 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 3,06 mg.l^{-1} metribuzinu nejevili změny chování a příjmu krmiva. Během testu nebyla zjištěna žádná mortalita.

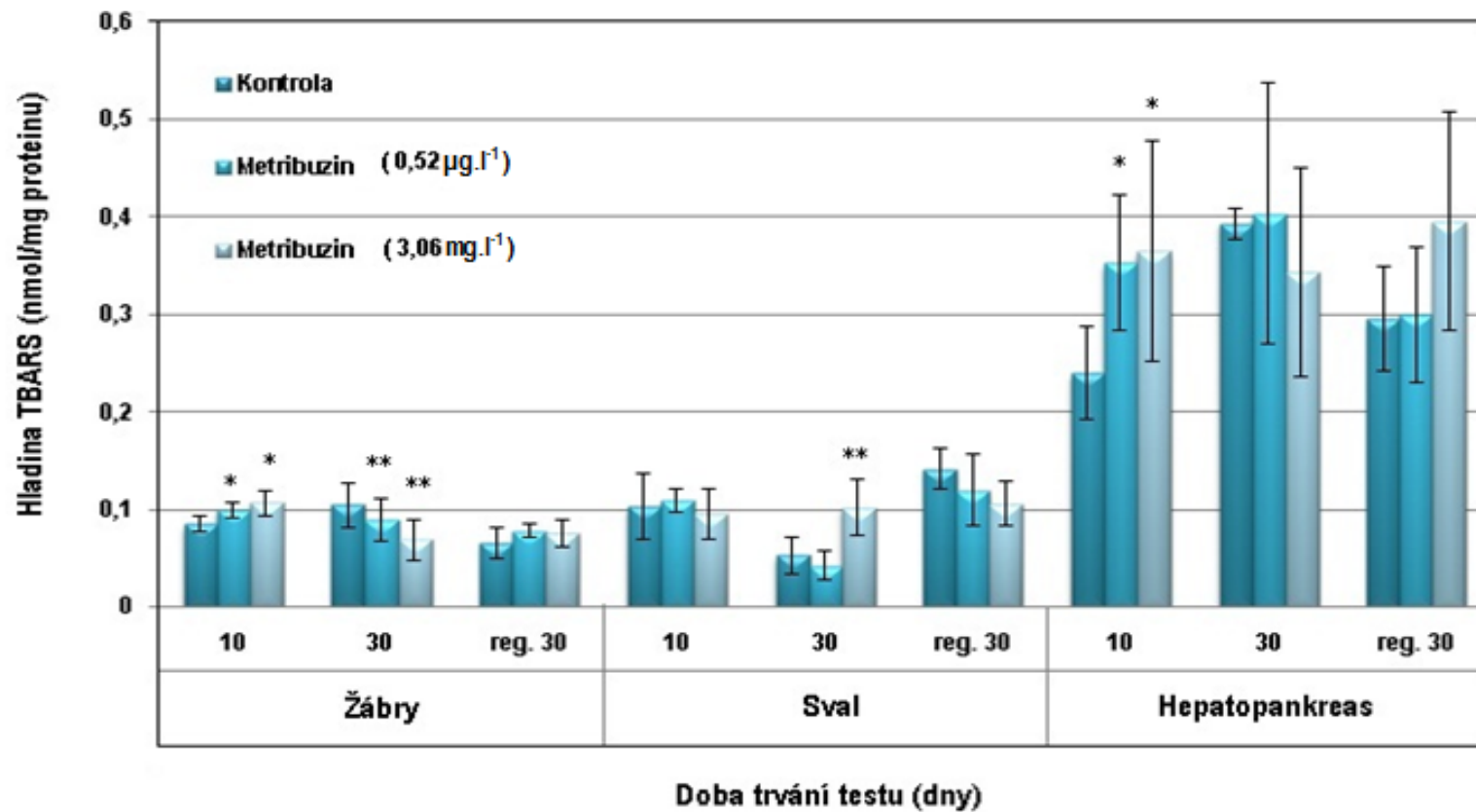
4.2. Biomarker oxidačního stresu

4.2.1. Lipidní peroxidace

Účinky chronické expozice metribuzinu na hladinu TBARS v tkáních raka signálního jsou uvedeny v grafu č. 1.

Statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení hladiny TBARS v žábřách a hepatopankreatu raků bylo zjištěno po 10 denní expozici v obou experimentálních skupinách vystavených metribuzinu (0,52 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 3,06 mg.l^{-1}). Po 30 denní expozici metribuzinu v koncentracích (0,52 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 3,06 mg.l^{-1}) došlo ke statisticky významnému ($p < 0,01$) snížení hladiny TBARS v žábřách ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve svalovině raků vystavených koncentraci 3,06 mg.l^{-1} metribuzinu po dobu 30 dní bylo zjištěno statisticky významné zvýšení hladiny TBARS ve srovnání s kontrolou.

Po 30 denní regeneraci (reg. 30), kdy byli raci drženi ve vodě bez testované látky, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladině TBARS v tkáních (žábry, sval a hepatopankreas) experimentálních raků v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 1. Hladina TBARS v tkáních raka signálního. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S.D., N=9. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.3. Antioxidační biomarkery

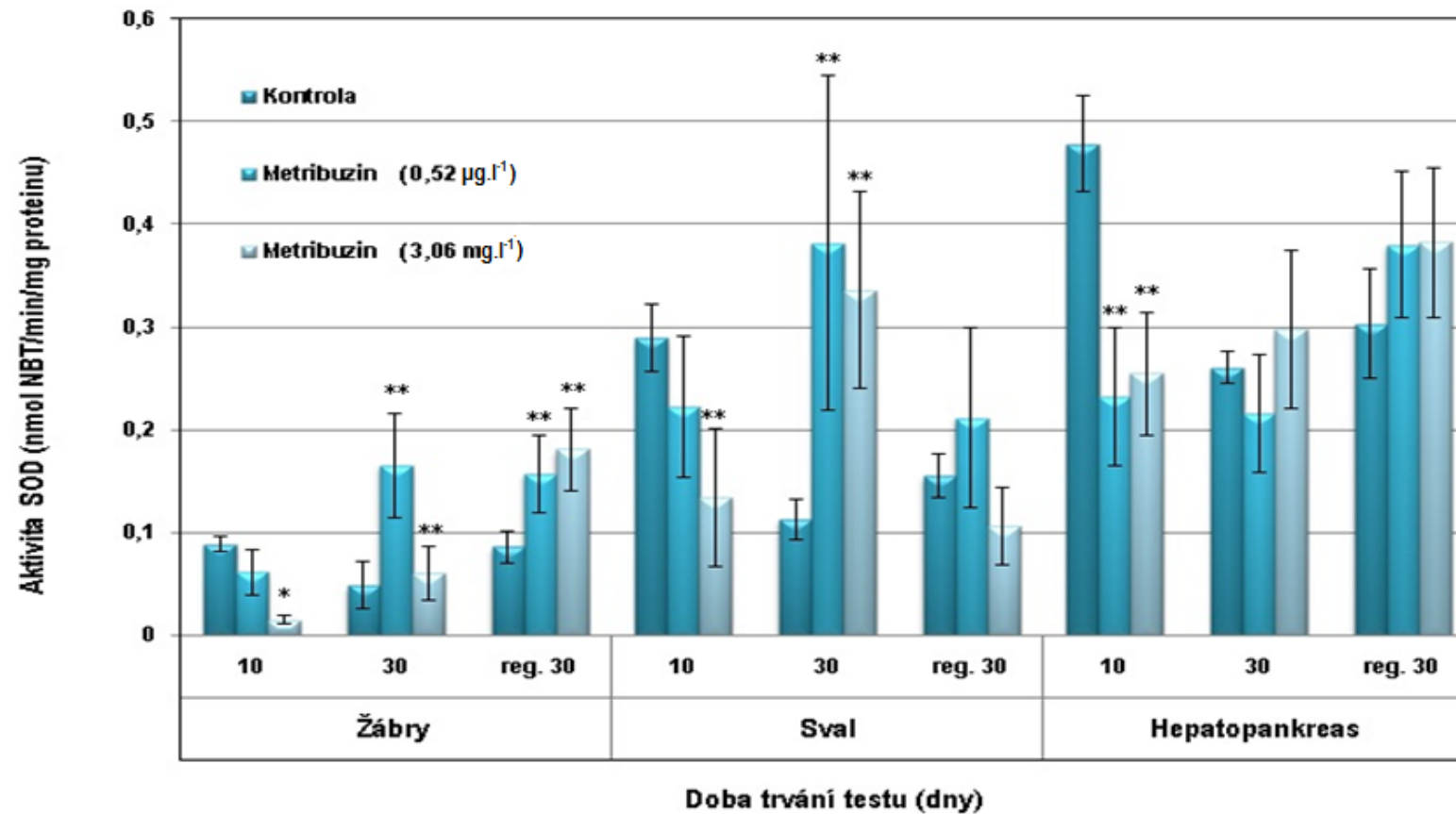
4.3.1. Superoxiddismutáza

Účinky chronické expozice metribuzinu na aktivitu SOD v tkáních raka signálního jsou uvedeny v grafu č. 2.

Statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení aktivity SOD v žábřách bylo zjištěno po 10 denní expozici ve druhé experimentální skupině raků vystavených koncentraci $3,06 \text{ mg.l}^{-1}$ ve srovnání s kontrolou. Po 30 denní expozici došlo ke statisticky významnému ($p < 0,01$) zvýšení aktivity SOD v obou experimentálních koncentracích ($0,52 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ a $3,06 \text{ mg.l}^{-1}$) metribuzinu v žábřách ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvýšení aktivity SOD bylo také zjištěno v obou experimentálních skupinách po 30 denní depuraci.

Ve svalovině raků vystavených koncentraci $3,06 \text{ mg.l}^{-1}$ metribuzinu po dobu 10 dní bylo zjištěno statisticky významné ($p < 0,01$) snížení aktivity ve srovnání s kontrolou. Zvýšení aktivity SOD u druhé skupiny bylo zjištěno také po 30 denní expozici a navíc po této expozici bylo zjištěno i zvýšení aktivity SOD u první experimentální skupiny vystavené koncentraci $0,52 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ metribuzinu. Po 30 denní depuraci, kdy byli raci po 30 denní expozici drženi bez testované látky, došlo k návratu snížených hodnot aktivity SOD ve svalu do fyziologického rozmezí.

Statisticky významné ($p < 0,01$) snížení aktivity SOD v hepatopankreatu bylo zjištěno po 10 denní expozici v první a ve druhé experimentální skupině raků ve srovnání s kontrolou. Po 30 denní expozici snížení aktivity SOD nebylo již zaznamenáno. Hodnoty aktivity SOD v experimentálních skupinách byly na úrovni kontroly.



Graf č. 2. Aktivita superoxididismutázy v tkáních raka signálního. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S.D., N=9. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

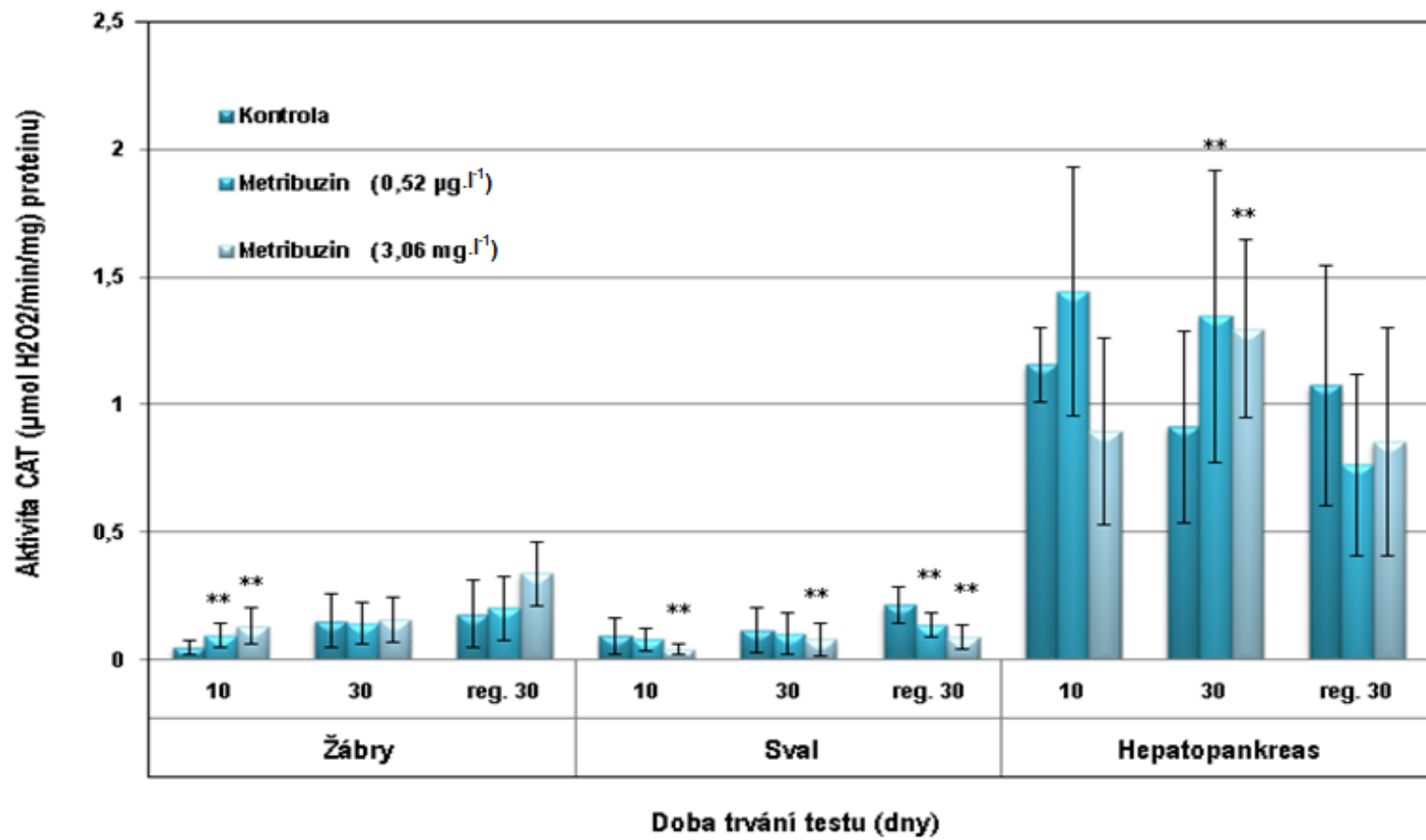
4.3.2. Kataláza

Účinky chronické expozice metribuzinu na aktivitu CAT v tkáních raka signálního jsou uvedeny v grafu č. 3.

10 denní expozice metribuzinu v koncentracích $0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $3,06 \text{mg.l}^{-1}$ způsobila statisticky významné ($p < 0,01$) zvýšení aktivity CAT v žábách. Po 30 denní expozici zvýšení aktivity CAT nebylo zjištěno.

Statisticky významné ($p < 0,01$) zvýšení aktivity CAT v hepatopankreatu bylo zjištěno po 30 denní expozici v první a ve druhé experimentální skupině raků vystavených metribuzinu ve srovnání s kontrolou. Po 30 denním zotavení, došlo k návratu zvýšených hodnot aktivity CAT v tkáni hepatopankreatu raka signálního do fyziologických hodnot.

Po 10 a 30 denní expozici raků vystavených koncentraci $3,06 \text{mg.l}^{-1}$ metribuzinu došlo ke statisticky významnému ($p < 0,01$) snížení hodnoty CAT ve svalovině. Toto snížení bylo zjištěno i po 30 denní depuraci, kdy navíc došlo ke snížení ($p < 0,01$) aktivity CAT ve svalu u raků vystavených reálné koncentraci metribuzinu detekovatelné v českých řekách ($0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$).



Graf. č. 3. Aktivita katalázy v tkáních raka signálního. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm S.D., $N=9$. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0.05$; ** $p < 0$.

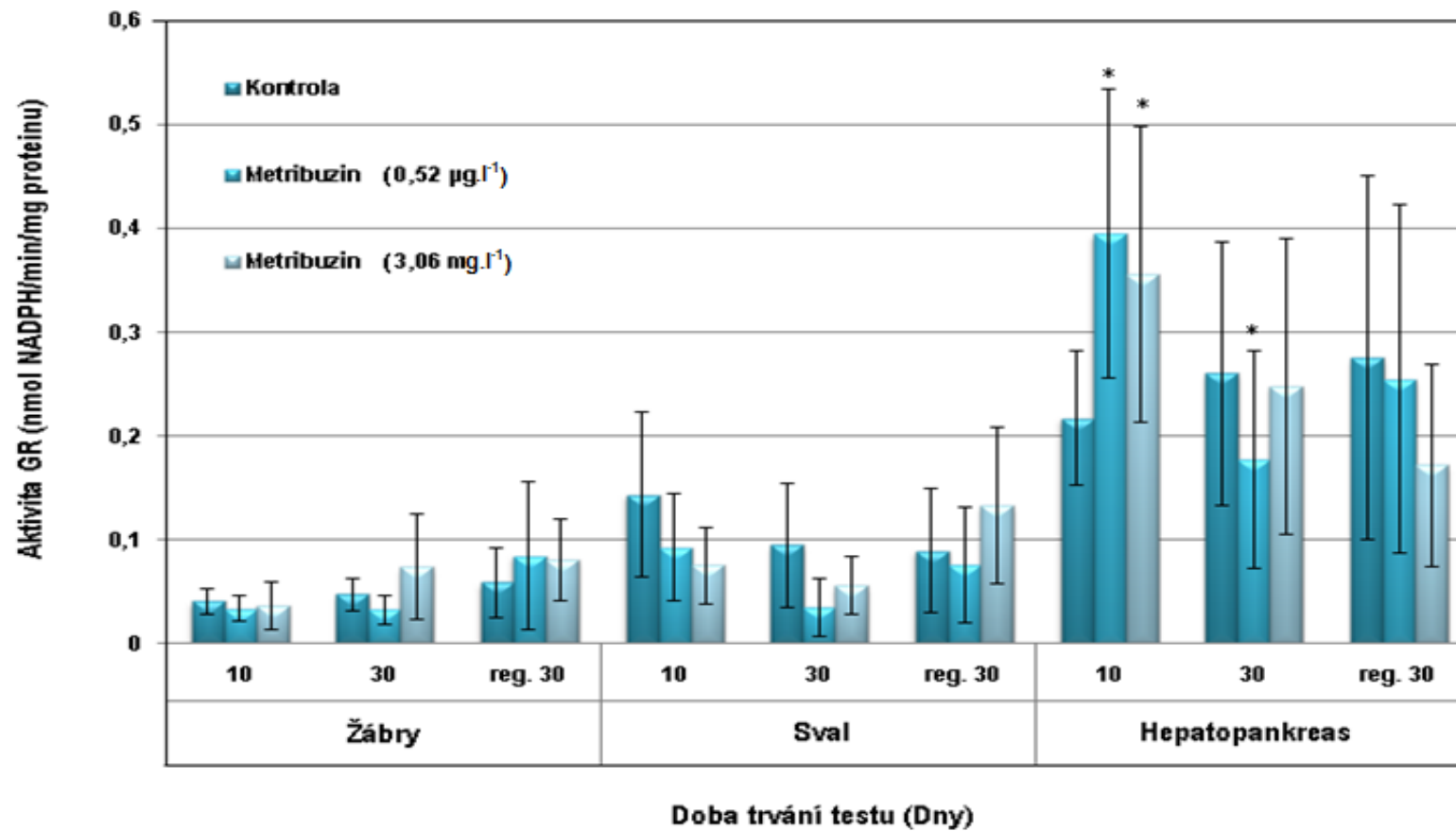
4.3.3. Glutathionreduktáza

Účinky chronické expozice metribuzinu na aktivitu GR v tkáních raka signálního jsou uvedeny v grafu č. 4.

Dlouhodobá expozice metribuzinu v koncentraci $0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $3,06 \text{mg.l}^{-1}$ nezpůsobila statisticky významné změny aktivity GR v žábřách a svalovině raka signálního.

Statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení aktivity GR v hepatopankreatu bylo zjištěno po 10 denní expozici u obou experimentálních skupin raků ve srovnání s kontrolou. Po 30 denní expozici došlo pouze u první skupiny ($0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$) ke snížení ($p < 0,05$) aktivity GR v tkáni hepatopankreatu ve srovnání s kontrolou.

Po 30 denní depuraci, kdy byli raci po 30 denní expozici drženi bez testované látky, došlo k návratu hodnot aktivity GR v tkáni hepatopankreatu raka signálního do fyziologických hodnot.



Graf č. 4. Aktivita glutathionreduktázy v tkáních raka signálního. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S.D., N=9. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5. DISKUSE

Cílem této studie bylo posouzení vlivu metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního a zároveň rozšíření podkladů a informací o možném vlivu této látky na vodní organismy a životní prostředí. Pro posouzení vlivu metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního byl použit dlouhodobý test toxicity na racích.

Dlouhodobé testy toxicity mají daleko lepší vypovídací hodnotu než testy akutní toxicity, které probíhají v krátkém čase za použití vysokých koncentrací testované látky. Při dlouhodobých testech toxicity jsou naopak testovány nízké koncentrace testovaných látek, reálně se vyskytující ve vodách. Tyto testy daleko lépe simulují podmínky životního prostředí (Lahr a kol., 2000).

Rak signální je velice vhodným testovacím organismem díky své velikosti a robustní stavbě těla. Jedná se navíc o invazivní druh, který na rozdíl od původních druhů raků na našem území není ohroženým druhem, a proto je jeho použití k testování legální (Kozák a kol., 2011).

Oxidativní stres, jako projev toxicity mnohých xenobiotik vyskytujících se v životním prostředí, může způsobit oxidativní poškození vodních organismů. Proto jsou vodní organismy velice významnými bioindikátory znečištění. Vliv znečištění životního prostředí na oxidativní stres a antioxidační systémy organismů vedl ke zvýšenému zájmu vodní toxikologie o tuto problematiku (Livingstone, 2001).

Antioxidační ochrana organismu je velice účinným vzájemně propojeným nástrojem, který brání nepříznivému působení volných radikálů na daný organismus v několika krocích. Zabraňuje vzniku nadměrného množství volných radikálů, reguluje jejich aktivitu, transformuje volné radikály do nereaktivních forem nebo jejich reaktivitu snižuje a tím brání oxidaci. Antioxidační ochrana organismu se skládá z enzymatické a neenzymatické části (Lushchak, 2011).

5.1. Chování raků

Chování testovaných organismů je jednou z oblastí pozorování v průběhu toxikologických studií. Změny chování organismů mohou být indikátorem znečištění okolního prostředí. Charakteristickým chováním ryb po akutní expozici triazinu je nekoordinované plavání, apatie, ztráta schopnosti reagovat na jakékoliv podněty, letargie. Ryby leží na spodní straně nádrže, výjimečně krátkou dobu plavou. Po tomto nevyrovnaném chování následuje obvykle smrt (Velíšek a kol., 2008).

V průběhu testu nebylo pozorováno žádné abnormální chování testovaných organismů. Raci vystaveni experimentálními koncentracemi 0,52 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 3,06 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ metribuzinu nevykazovali žádné změny příjmu krmiva, dýchání, či pohybové aktivity.

Tyto výsledky jsou v souladu se studií Stará a kol. (2014), která také nepozorovala žádné změny chování raků červených (*Procambarus clarkii*) po chronické expozici triazinovému herbicidu prometrynu.

Změny chování raků signálních vystavených akutní expozici insekticidu diazinonu popsal ve své práci Buřič a kol. (2013). Exponovaní raci se snažili uniknout z akvárií, chaoticky se pohybovali po akváriu mimo úkryty na rozdíl od raků vystavených chronické expozici, kteří byli klidní, převážně zalezlí v úkrytech. Tento rozdíl v chování oproti studii Buřič a kol. (2013) je dán skutečností, že raci v naší studii byli vystaveni nižšími koncentracemi testované látky (subletální koncentrace). Při nižších koncentracích se ve většině případů neprojevují změny chování, tak jak prokazují studie na rybách (Stará a kol., 2012a, b; 2013), kde nebyly při testování triazinů v nízkých koncentracích pozorovány změny chování během dlouhodobých testů.

5.2. Oxidativní stres

Lipidní peroxidace byla stanovena pomocí TBARS testu. TBARS test kvantifikuje hladinu oxidativního stresu pomocí měření peroxidce lipidů. Lipidní peroxidace je jednou z nejběžnějších reakcí vznikající v důsledku oxidativního stresu. Při lipidní peroxidaci dochází k oxidaci polynenasycených mastných kyselin za vzniku toxických hydroperoxidů a aldehydů (Lushchak, 2011).

Výsledky této studie prokázaly zvýšení hladiny TBARS v žábrech a hepatopankreatu raků po 10 denní expozici v obou experimentálních skupinách v porovnání s kontrolou. Po 30 denní expozici došlo ke snížení hladiny TBARS v žábřech v obou testovaných koncentracích ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve svalovině raků vystavených koncentraci 3,06 mg.l⁻¹ metribuzinu po dobu 30 dní bylo zjištěno statisticky významné zvýšení hladiny TBARS ve srovnání s kontrolou.

Výsledky této studie prokázaly zvýšené hladiny volných radikálů způsobujících oxidativní stres raka signálního. Tato studie prokazuje, že metribuzin způsobuje změny v metabolismu raků a to i v nejnižší, reálně se vyskytující koncentraci v podmínkách životního prostředí.

Oxidativní stres po expozici triaziny u ryb je popsán ve studii Stará a kol. (2012b). V této studii bylo pozorováno zvýšené množství ROS u kaprů vystavených simazinu v koncentraci 4 mg.l⁻¹ v tkáni hepatopankreatu. Toto zvýšené množství ROS bylo pozorováno po expozici 28 a 60 dnů. Oxidativní poškození bylo pozorováno i u raných vývojových stádií kapra obecného po dlouhodobé expozici prometrynu (Stará a kol., 2012a).

Naproti tomu Stará a kol. (2014) nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou v hladině TBARS v tkáních raků červených. V této studii byl použit jiný herbicid (prometryn), i když také řazený mezi triaziny, a jiný druh raka (rak červený). Tyto ukazatele mohly způsobit naprosto odlišné výsledky v hladině TBARS mezi touto studií a studií Stará a kol. (2014).

5.3. Antioxidační enzymy

Změny v antioxidačním systému po dlouhodobé expozici triazinům byly pozorovány daleko více u ryb než u raků. V této studii chronická expozice metribuzinu ovlivnila aktivitu SOD a CAT v tkáních raka signálního. Celkově výsledky ukazují, narušení běžného oxidačního procesu, což svědčí o selhání v antioxidačních obranných systémech, jak ukazuje aktivita SOD a CAT.

Superoxiddismutáza je antioxidační enzym stojící v první linii obrany buňky proti poškození oxidativním stresem a slouží k dismutaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku (Šípek a kol., 2000). Výsledky této studie jsou ve shodě se studií Stará a kol. (2014), kde byly zaznamenány významné rozdíly v aktivitě SOD v hepatopankreatu ve všech experimentálních skupinách po 11 denní expozici raků červených prometrynu v porovnání s kontrolou. Další pokles aktivity SOD v hepatopankreatu byl pozorován v koncentracích 0,144 mg.l⁻¹ prometrynu a 1,44 mg.l⁻¹ prometrynu po 25 denní expozici. Stejně tak i Velíšek a kol. (2011) pozoroval ve své studii na rybách významné zvýšení aktivity SOD v tkáních hepatopankreatu a mozku kaprů vystavených terbutrynu po dobu 90 dní.

Dalším významným antioxidačním enzymem je kataláza. Kataláza navazuje na činnost superoxiddismutázy. Kataláza přeměňuje peroxid vodíku na oxid uhličitý a vodu (Šípek a kol., 2000). V této studii chronická expozice metribuzinu v koncentracích (0,52 µg.l⁻¹ a 3,06 mg.l⁻¹) ovlivnila aktivitu CAT v tkáních raka signálního. Stará a kol. (2014) pozorovala významné snížení aktivity CAT ve tkáních raka červeného po 11 denní expozici v koncentracích 0,144 mg.l⁻¹ a 1,44 mg.l⁻¹ prometrynu. Naopak po 25 denní expozici prometrynu ve všech testovaných skupinách bylo zjištěno statisticky významné snížení aktivity CAT v tkáních.

Glutathionreduktáza je enzym, který se sice přímo neúčastní eliminace volných radikálů, nicméně její působení je zásadní pro regeneraci GSSH na GSH a současně oxiduje NADPH. Glutathionreduktáza je důležitá pro zachování funkčnosti glutathionu a je nejdůležitějším enzymem v sekundární ochraně buňky proti působení oxidativního stresu (Šípek a kol., 2000).

V této studii nebyly pozorovány žádné významné změny v aktivitě GR v žábřách a svalovině raka signálního. Statisticky významné zvýšení aktivity GR bylo pozorováno pouze v tkáni hepatopankreatu. Po 30 denním zotavení došlo k návratu hodnot aktivity GR v tkáni hepatopankreatu raka signálního do fyziologických hodnot. Významné snížení aktivity GR v tkáni hepatopankreatu raka červeného bylo zaznamenáno ve studii Stará a kol. (2014). Toto významné snížení aktivity GR v porovnání s kontrolou se týkalo všech experimentálních skupin po 25 denní expozici prometrynu. Současně bylo zjištěno významné zvýšení aktivity GR ve svalovině raka červeného ve všech skupinách po 25 denní expozici prometrynu. Výsledky této studie se shodují s výsledky studie

Stará a kol. (2014) popisující vliv prometrynu na oxidativní stres a odpověď antioxidantních enzymů u raka červeného. V obou případech došlo k narušení antioxidantního mechanismu superoxidodismutázy a katalázy jak u raků signálních, tak u raků červených.

6. ZÁVĚR

V této práci byl posuzován vliv triazinového herbicidu metribuzinu na oxidativní stres a aktivitu antioxidantních enzymů raka signálního. K posouzení vlivu této látky byl použit dlouhodobý test toxicity na raci. Celková doba testu byla 60 dní. Z celkového trvání testu byli raci vystaveni působení dvěma různými koncentracemi metribuzinu po dobu prvních třiceti dnů. Po 30 denní expozici následovala 30 denní fáze depurace v čisté vodě bez metribuzinu.

Experimentální skupina číslo 1 byla vystavena koncentraci $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ metribuzinu. Tato koncentrace odpovídala reálné maximální koncentraci naměřené v českých řekách. Skupina číslo 2 byla vystavena koncentraci $3,06 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, což odpovídá 10 % 96hLC50 metribuzinu pro raka signálního (Velíšek a kol., 2013).

Výsledky této studie prokázaly zvýšené hladiny volných radikálů způsobujících oxidativní stres a zároveň narušení antioxidantních systémů raka signálního. Tato studie prokazuje, že metribuzin způsobuje změny v metabolismu raků a to i v nejnižší, reálně se vyskytující koncentraci v podmínkách životního prostředí.

Tato studie rozšiřuje informace o vlivu metribuzinu na vodní organismy a tím i na vodní ekosystém jako celek. Dále poukazuje na velkou citlivost raků vůči triazinům a předurčuje je k jejich hojnějšímu využívání při toxikologických testech a biomonitoringu vodního prostředí.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of Pesticides in Water, Sediments, and Fish Tissues in a Lake Surrounded by Agricultural Lands: Concerning Risks to Humans and Ecological Receptors. *Water. Air. Pollut.* 212, 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase *In vitro*. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Amira, A., Adly, M., 2010. Oxidative stress and Disease: An Updated Review. *Res. J. Immunol.* 3, 129-145.
- Arvik, J.H., Hyzak, D.L., Zimdahl, R.L., 1973. Effect of metribuzin and two analogs of five species of algae. *Weed Sci.* 21, 173-175.
- Ballantyne, B., Marrs, T.C., Syversen, T., (Eds.). 1999. *General and Applied Toxicology*. Vol. 2, part 2, second edition, MacMillan, London, 1842-1897.
- Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z., Halásy, K., Nemcsok, J., 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.* 33, 279-295.
- Barbee, G.C., Stout, M.J., 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Manag. Sci.* 65, 1250-1256.
- Barbee, G.C., McClain, W., Lanka, S.K., Stout, M.J., 2010. Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish cropping systems. *Pest. Manag. Sci.* 66, 996-1001.
- Battaglin, W.G., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., 2001. Concentration of selected sulfonylurea, sulfonamide, and imidazolinone herbicides, other pesticides, and nutrients in 71 streams, 5 reservoir outflows, and 25 wells in the Midwestern United States, (1998). US Geological Survey Water Resources Investigations Report. 00-4225, Denver, CO.
- Belden, J.B., Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2266-2274.
- Bláha, L., Kopp, R., Šimková, K., Mareš, J., 2004. Oxidative stress biomarkers are modulate in Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin - producing cyanobacterial water bloom. *Acta Vet. Brno*, 73, 477-482.
- Boelsterli, U.A., 2003. *Mechanistic toxicology*. Taylor and Francis, London, 314 p.
- Breckenridge, C.B., Eldringe, J.C., Stevens, J.T., Simpkins, J.W., 2010. Symmetrical triazine herbicides. A Review of regulatory toxicity endpoints. In: Kriger, R. (Ed.), *Handbook of pesticides toxicology*. Elsevier, Amsterdam, 1711-1723.

- Brown, E.C., Claassen, A., Hathaway, C.R., Holmstead, J., Powell, T., Wehrum, W., Weinstein, K., 2001. Pesticide Regulation Deskbook. Latham & Watkins, 174 p.
- Buřič, M., Kouba, A., Máchová, J., Machovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of different age. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 10, 607-610.
- Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O., Ramade, F., 1992. Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquatic Toxicology*. 23, 261-278.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from Rat-Liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Ceresena Research, 2013. Market Study: Crop Protection. Ceresana, Konstanz, Germany, 800 pp.
- Ceyhun, S.B., Senturk, M., Erdogan, O., Kufrevioglu, O.I., 2010. *In vitro* and *in vivo* effect of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pest. Biochem. Physiol.* 97, 177-181.
- Clemens, H.P., Sneed, K.E., 1959. Lethal doses of several commercial chemicals for fingerling Channel catfish. U.S. Fish Wildlife Services, Washington, 18 pp.
- Corbett, J.R., 1974. The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press. London, New York, 236 pp.
- Cremlyn, R.J.W., 1978. Pesticides: Preparation and mode of action. Wiley, Chichester, 240 pp.
- Cremlyn, R.J.W., 1985. Pesticidy. Nakladatelství technické literatury, Praha, 244 s.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický institut), 2014. On-line database kvality vody. Dostupné z: < <http://hydro.chmi.cz/oj/> >, Navštíveno dne 22/10/2014.
- Drápal, J., Ettlerová, K., Hajšlová, J., Hlúbik, P., Jechová, M., Kozáková, M., Malíř, F., Ostrý, V., Ruprich, J., Sosnovcová, J., Špelina, V., Winklerová, D., 2005. Rezidua pesticidů v potravinách. VŠCHT, Praha, 29 s.
- Ecobichon, D.J., 1991. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D. (Eds.), Casarett and Doull's. Toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill, New York, pp. 193-213.
- European Commission, 1999. Study on the prioritisation of substances dangerous to the aquatic environment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 120 pp.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 8, 232-243.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 18, 7719-7730.

- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408, 239-247.
- Giesy, J.P., Heneweer, M., Letcher, R.J., Sanderson, J.T., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1027-1031.
- Glotfelty, D.E., Taylor, A.W., Turner, B.J., Zoller, W.H., 1984. Volatilisation of surface-applied pesticides from fallow soil. *J. Agric. Food Chem.* 32, 638-683.
- Goktepe, I., Plhak, L., 1998. Toxicity of azadirachtin pesticides on aquatic species. *Water Res. Engin.* 1, 1248-1253.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 888 pp.
- Henriksen, T., Svensmark, B., Juhler, R.K., 2002. Analysis of metribuzin and transformation products in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *J. Chromatograph. A.* 957, 79-87.
- Hildebrandt, A., Guillamon, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barcelo, D., 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.* 42, 3315-3326.
- Hofmanová, J., Machala, M., Kozubík, A., 2000. Epigenetic mechanisms of the carcinogenic effects of xenobiotics and in vitro methods of their detection. *Folia Biol.* 46, 165-173.
- Chapman, G.A., 1978. Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of Chinook salmon and Steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc.* 107, 841-847.
- Christin, M.S., Menard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., Fournier, M., 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol.* 67, 33-43.
- Kearney, P.C., Kaufman, D.D., 1975. *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*. Marcel Dekker, New York, 345 pp.
- Kidd, H., James, D.R., (Eds.), 1991. *The Agrochemicals Handbook*. 76 Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, 243 pp.
- Kouba, A., Kuklina, I., Niksirat, H., Máchová, J., Kozák, P., 2012. Tolerance of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to Persteril 36 supports use of peracetic acid in astaciculture. *Aquacult.* 350-353, 71-74.
- Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, R., O'Brien, P.J., 2005. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 5, 2601-2623.

- Kozák, P., Fureder, L., Kouba, A., Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. Current conservation strategies for European crayfish. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 401, 01.
- Kozák, P., Polícar, T., Kouba, A., Buřič, M., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Horká, I., Kozubíková, E., 2013. *Biologie a chov raků*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 418 s.
- Kreuger, J., Peterson, M., Lungren, E., 1999. Agricultural inputs of pesticide residues to stream and pond sediments in a small catchment in southern Sweden. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 55-62.
- Lahr, J., Diallo, A.O., Gadji, B., Diouf, P.S., Bedaux, J.J.M., Badji, A., 2000. Ecological effects of experimental insecticide applications on invertebrates in sahelian temporary ponds. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1278-1289.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, 2477-2485.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J.S.H., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.* 42, 85-89.
- Livingstone, D., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husák, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670-1680.
- Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 153, 175-190.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
- Martin, H., Worthing, C.R., 1974. *Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Droitwich, 565 pp.
- Mayer, F.L., Ellersieck, M.R., 1986. *Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of fresh-water animals*. US Fish and Wildlife Service Res. Publ. 160, Washington DC, 15 pp.
- Mikulka, J., Kneifelová, M., Martinková, Z., Soukup, J., Uhlík, J., 2005. *Plevelné rostliny*. Profí Press s.r.o., Praha, 148 s.

- Modrá, H., Haluzová, I., Blahová, J., Havelková, M., Kružiková, K., Mikula, P., Svobodová, Z., 2008. Effects of subchronic metribuzin exposure on common carp (*Cyprinus carpio*). *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 669-674.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Rev. Fish. Sci.* 3, 33-63.
- Muir, D.C.G., 1991. Dissipation and Transformations in Water and Sediment. In: Grover, R. (Ed.), *Environmental chemistry of herbicides. 2.*, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-88.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 299/2008. ze dne 11. března 2008, kterým se mění nařízení (ES) č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu, pokud jde o prováděcí pravomoci svěřené Komisi.
- Neuman, J., Lopuchovský, J., Zapletal, O., 1989. *Chemizace zemědělství, farmakologie a toxikologie.* Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 303 s.
- Nottingham, S., 2002. *Genescapes: the ecology of genetic engineering.* Zed Books, New York, 212 pp.
- Ozturk-Urek, R., Tarhan, L., 2001. The purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comp. Biochem. Phys.* 128, 205-212.
- Pauli, B.D., Kent, R.A., Wong, M.P., 1990. Canadian water quality guidelines for metribuzin. *Environ. Can. Sci. Ser.* 179, 135-145.
- Pesticide Ecotoxicity Database, 2000. Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division. US EPA, Washington.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie.* Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- Plhalová, L., Štěpánová, S., Prášková, E., Chromcová, L., Zelničková, L., Divišová, L., Škorič, M., Pištěková, V., Bedánová, I., Svobodová, Z., 2012. The effects of subchronic exposure to metribuzin on *Danio rerio*. *Sci. World J.* 2012, Article ID 728189.
- Racek, J., Holeček, V., 1999. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy.* 93, 774-780.
- Sehonová, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Svobodová, Z., 2012. Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. *Bull. VÚRH Vodňany.* 48, 5-19.
- Směrnice Evropského parlamentu Rady 2009/128/ES. ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů.
- Směrnice Rady 98/83/ES. ze dne 3. listopadu 1998, o jakosti vody určené k lidské spotřebě.
- Sotherton, N., Holland, J., 2003. Indirect effects of pesticides on farmland wildlife. In: Hoffman, D.J. (Ed.), *Handbook of ecotoxicology.* CRC Press, Boca Raton, 1173-1195.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb.* Informatorium, Praha, 264 s.

- Svobodová, Z., Sehonová, P., Kaut, J., Pauzorová, M., 2011. Analýza příčin havarijního znečištění povrchových vod a následných úhynů ryb v České republice v období 1989 - 2010. Bull. VÚRH Vodňany. 47, 47-56.
- Stará, A., Máchová, J., Velíšek, J., 2012a. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Neuroendocrinol. Lett. 33, 130-135.
- Stará, A., Máchová, J., Velíšek, J., 2012b. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Environ. Toxicol. Pharmacol. 33, 334-343.
- Stará, A., Steinbach, Ch., Wlasow, T., Gomulka, P., Ziemok, E., Machova, J., Velisek, J., 2013. Effect of zeta-cypermethrin on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Neuroendocrinol. Lett. 34 (Suppl. 2), 37-42.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Bio. Med. Res. Int. 2014, Article ID 680131.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. Raci v České republice. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 256 s.
- Štěpánová, S., Doleželová, P., Plhalová, L., Prokeš, M., Maršálek, P., Škorič, M., Svobodová, Z., 2012. The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). Pest. Biochem. Physiol. 103, 152-158.
- Šípek, S., a kol., 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Praha, 320 s.
- Tomlin, C., 1994. The Pesticide manual, a world compendium, incorporating the agrochemicals handbook. Farnham, Surrey, Cambridge. British Crop Protection Council. Royal Society of Chemistry, Information Sciences.
- Tooby, T.E., Hursey, P.A., Alabaster, J.S., 1975. Acute toxicity of 102 pesticides and miscellaneous substances to fish. Chem. Indust. 21, 523-526.
- US EPA (U.S. Environmental protection agency), 1994. Atrazine, simazine and cyanazine: notice of initiation of special review. U.S. EPA, Washington DC. 59, 30-60.
- US EPA. (U.S. Environmental protection agency), 1998. Registration Eligibility Decision (RED): Metribuzin. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/SAFEWATER/ccl/cclregdetermine.html>>. Navštíveno dne 20/01/2015.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermuelen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Novotný, L., Blahová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Med.* 53, 324-332.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Sudová, E., 2009. Effects of acute exposure of metribuzin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 492-495.
- Velíšek, J., Stará, A., Svobodová, Z., 2011. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. In: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the modern world - pests control and pesticides exposure and toxicity assessment*. InTech Open Access Publisher, Rijeka, 377-402.
- Velíšek, J., Kouba, A., Stara, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 31-36.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014a. *Vodní toxikologie pro rybáře*. FROV JU, Vodňany, 600 s.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Zusková, E., Kouba, A., 2014b. Effect of prometryne on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginialis*). *Neuroendocrinol. Lett.* 35 (Suppl 2), 93-98.
- Vryzas, Z., Alexoudisa, C., Vassiloua, G., Galanisa, K., Papadopoulou-Moumourkidoub, E., 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74, 174-181.
- Vyhláška č. 32/2012 Sb. ze dne 19. ledna 2012, o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin.
- Worthing, C.R., Walker, S.B., 1987. *The Pesticide Manual: A World Compendium*. British Crop Protection Council, London, 845 pp.
- Woudneh, M.B., Ou, Z.Q., Sekela, M., Tuominen, T., Gledhill, M., 2009. Pesticide multiresidues in waters of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. Part II. Groundwater. *J. Environ. Qual.* 38, 948-954.
- Zákon č. 350/2011 Sb. ze dne 27. října 2011, o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon).
- Zákon č. 199/2012 Sb. ze dne 2. května 2012, kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů.
- Zamocky, M., Furtmuller, P. G., Obinger, C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1527-1547.

- Zapletal, O., Nepejchalová, L., 2001. Speciální veterinární toxikologie. Editační středisko VFU, Brno, 148 s.
- Zhang, X., Shan, P., Sasidhar, M., Chupp G.L., Flavell, R.A., Choi, A.M.K., Lee, P.J., 2003. Reactive oxygen species and extracellular signalregulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia induced cell death in lung epithelium. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28, 305-315.

ABSTRAKT

Vliv metribuzinu na oxidativní stres a antioxidační enzymy raka signálního.

Cílem této studie bylo posouzení vlivu triazinového herbicidu metribuzinu na hladinu oxidativního stresu a aktivitu antioxidačních enzymů v žábách, svalu a hepatopankreatu raka signálního (*Pacifastacus leniusculus* Dana) a zároveň rozšíření podkladů pro posouzení vlivu této látky na životní prostředí.

Celková doba trvání testu byla 60 dní. Raci byli vystaveni koncentracím $0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$ (reálná koncentrace vyskytující se životním prostředím) a $3,06 \text{ mg.l}^{-1}$ (10% 96hLC50) metribuzinu po dobu prvních třiceti dnů. Poté následovala 30 denní fáze depurace, bez testované látky.

Změny v hladině oxidativního stresu (TBARS), aktivitě superoxiddismutázy (SOD) a katalázy (CAT), byly pozorovány ve všech zkoumaných tkáních v porovnání s kontrolou. Změna aktivity glutathionreduktázy (GR) byla pozorována pouze v hepatopankreatu. Chronická expozice metribuzinu způsobila oxidativní poškození buněčných lipidů a proteinů a také změny v antioxidační aktivitě ve zkoumaných tkáních exponovaných raků.

Výsledky této studie poukazují na raky jako vhodné organismy pro testy toxicity a zároveň rozšiřují informace o vlivu metribuzinu na životní prostředí.

Klíčová slova: triaziny, metribuzin, raci, oxidativní stres, antioxidační enzymy

ABSTRACT

The effect of metribuzine on oxidative stress and antioxidant enzymes of signal crayfish.

The aim of this study was to investigate effects of the triazine herbicide metribuzine on oxidative stress level and antioxidant enzymes activity in gills, muscle and hepatopancreas of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) and also extension of knowledge about effect of metribuzine on the environment.

The experiment underwent took up 60 days. Crayfish were exposed to metribuzine concentrations of 0.52 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (real environmental concentration) and 3.06 mg.l^{-1} (10% 96hLC50) for the first 30 days. Then a second phase followed depuration without metribuzine (30 days).

Changes in the oxidative stress level (TBARS), superoxiddismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity were observed in all examined tissues. Changes in glutathionreductase (GR) activity were observed only in hepatopancreas. Chronic exposure of metribuzine demonstrated an oxidative damage of cell lipids, proteins and also changes in antioxidant activity in examined crayfish tissues.

The results of this study suggest that crayfish are a very suitable organisms for toxicological tests and simultaneously extend knowledge about effect of metribuzine on the environment.

Keywords: triazine, metribuzine, crayfish, oxidative stress, antioxidant enzymes