

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybnářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Vliv chronické expozice chloridazonu a jeho metabolitu
chloridazon desphenylu na raka signálního**

Autor: Bc. Jan Materna

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

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

Studijní program a obor: N4106 Zemědělská specializace, Rybnářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych vyjádřil svůj ohromný dík především vedoucímu mé diplomové práce dr hab. Josefu Velíškovi, Ph.D., dále konzultantce Ing. Alžbětě Staré, Ph.D., Ing. Janu Kubcovi, Ph.D., a dalším pracovníkům Laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie ve Vodňanech za cenné rady, metodické vedení, odbornou pomoc a trpělivost během tvorby této kvalifikační práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jan MATERNA
Osobní číslo: V19N005P
Studijní program: N4106 Zemědělská specializace
Studijní obor: Rybářství a ochrana vod
Téma práce: Vliv chronické expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na raka signálního
Zadávací katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Zásady pro vypracování

Ekosystémy povrchových i podzemních vod jsou nejvíce zatěžovanou environmentální složkou. Vodní prostředí lze považovat za reservoár řady cizorodých látek včetně pesticidů. 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. V zemědělství jsou nejvíce využívány pesticidní přípravky pro kontrolu plevelů. Mezi nejčastěji monitorované herbicidy ve vodním prostředí patří např. chloridazon, s-metolachlor a metazachlor. Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě pro nečlověcí organismy a předpokládaná koncentrace v ekosystému. Do skupiny nečlověčích vodních organismů, kteří jsou důležitou součástí ekosystémů, patří rovněž vodní bezobratlí.

Cílem diplomové práce je posoudit chronické účinky chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). V rámci diplomové práce bude proveden chronický test toxicity na raku signálním s chloridazonem a jeho majoritním metabolitem chloridazon desphenylem. Během testu bude sledován vliv testovaných látek na biochemický profil hemolymfy, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy v tkáních raka signálního. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů a metod.

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

Seznam doporučené literatury:

- Bisewska, J., Sarnowska, E.I., Tukaj, Z.H., 2012. Phytotoxicity and antioxidative enzymes of green microalga and duckweed exposed to herbicides MCPA, chloridazon and their mixtures. *Journal of Environmental Science and Health B* 47: 814-822.
- D'Souza, U.J.A., 2017. Pesticide toxicity and oxidative stress: A review. *Borneo Journal of Medical Sciences* 11: 9-19.
- Neukum, C., Meyer, K., 2019. Chloridazon-metabolites in groundwater Coupled modelling for long-term estimation of transport behavior and concentration development in groundwater of a drinking water abstraction. *Grundwasser* 24: 73-81.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 135, 58 s.
- Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Burič, M., Faggio, C., Kouba, A., Velisek, J., 2019. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere* 224: 616-625.
- Stara, A., Kouba, A., Velisek, J., 2018. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. *Chemico-Biological Interactions* 291: 95-102.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., Kouba, A., 2019. Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 153: 87-94.

Velisek, J., Stara, A., Zuskova E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere* 175: 440-445.

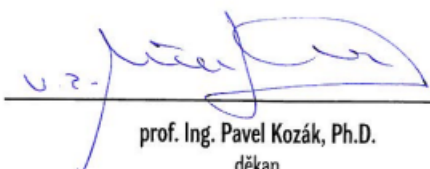
Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. 2. upravené vydání, FROV JU,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

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

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

Datum zadání diplomové práce: **7. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2021**



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.



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

OBSAH:

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. Pesticidy	10
2.1.1. Herbicidy	16
2.1.2. Chloridazon	20
2.1.3. Chloridazon desphenyl	23
2.2. Raci.....	26
2.2.1. Obecná morfologie a anatomie raků.....	27
2.2.2. Rak signální	29
2.3. Testy toxicity.....	32
2.3.1. Využití raků v testech toxicity.....	34
3. MATERIÁL A METODIKA	36
3.1. Chronický test toxicity	36
3.1.1. Princip a podmínky testu	36
3.1.2. Experimentální materiál	37
3.2. Průběh testu.....	38
3.3. Odběr vzorků.....	40
3.4. Chování raků	42
3.5. Metody stanovení biomarkerů	42
3.5.1. Biochemický profil hemolymfy	42
3.5.2. Oxidativní stres a antioxidační biomarkery.....	43
3.6. Statistické vyhodnocení testu	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1. Chování raků	45
4.2. Biochemický profil hemolymfy	47

4.2.1. Glukóza (GLU).....	47
4.2.2. Laktát (LACT).....	48
4.2.3. Alanin aminotransferáza (ALT)	48
4.2.4. Aspartát aminotransferáza (AST).....	49
4.2.5. Laktát dehydrogenáza (LDH).....	50
4.2.6. Celkové bílkoviny (TP)	50
4.2.7. Triglyceridy (TAG)	50
4.2.8. Amoniak (NH ₃)	51
4.2.9. Kreatinin (CREA).....	51
4.2.10. Alkalická fosfatáza (ALP).....	51
4.2.11. Vápník (Ca)	52
4.2.12. Anorganický fosfát (PHOS)	52
4.3. Biomarker oxidativního stresu a antioxidační biomarkery	54
4.3.1. Lipidní peroxidace (LPO).....	54
4.3.2. Enzymatická aktivita katalázy (CAT)	55
4.3.3. Enzymatická aktivita superoxid dismutázy (SOD)	56
4.3.4. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH).....	57
4.3.5. Enzymatická aktivita glutathion S-transferázy (GST)	58
5. DISKUZE	59
6. ZÁVĚR	63
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	64
8. ABSTRAKT	76
9. ABSTRACT.....	77

1. ÚVOD

Charakteristické pro dnešní dobu je kladení vysokých nároků na kvalitu životního prostředí, ale současně se také zvyšují nároky na výživu lidské populace. Tato situace postupně směřovala k extrémní intenzifikaci zemědělské výroby. Pro dosažení maximálních výnosů zemědělských plodin se látky na jejich ochranu postupně staly běžnou součástí zemědělské výroby v naší krajině a jejich často neuvážené, nadměrné a nešetrné používání představuje obrovský problém pro naši faunu i flóru. Tyto látky, nazývané pesticidy, jsou spojovány primárně se zemědělstvím, kde také dochází k nejvyššímu uplatnění (Velíšek a kol., 2014). Především se využívá řada pesticidních přípravků pro kontrolu plevelů (herbicidy) a škůdců (insekticidy). Vychází zde tedy otázka, zda jsme se jako lidstvo ještě vůbec schopni obejít bez přípravků na ochranu rostlin. Přestože bylo popsáno mnoho příkladů negativního působení pesticidů na životní prostředí, je prospěšnost a nutnost použití těchto látek pro lidstvo zcela zásadní. Z toho vyplývá, že i v nejbližší budoucnosti bude použití pesticidů nevyhnutelné (Prousek, 2001).

Je velice pravděpodobné, že mnoho používaných pesticidů představuje potenciální riziko pro vodní organismy. Chemické znečištění vody je jedním z hlavních problémů životního prostředí v dnešním světě, protože znečištěná voda představuje hrozbu pro lidské zdraví a dobré životní podmínky a brání udržitelnému rozvoji společnosti i hospodářství. V posledních desetiletích je stoupající trend v množství xenobiotik v životním prostředí a jejich rychlé a přesné vyhodnocení kontaminace vody je jedním z klíčových úkolů monitorování životního prostředí (Wang a Yu, 2013). V současnosti je ve světě registrováno více než 1 150 účinných látek pesticidů a 25 tisíc komerčních přípravků. V České republice bylo v roce 1975 registrováno 362 přípravků, v roce 2011 to bylo již 626 přípravků a je velice pravděpodobný stálý růst. Každý rok se tyto látky ve světě prodají za několik desítek miliard dolarů. Pro rok 2019 bylo předpokládáno zvýšení celosvětového prodeje pesticidů až na hodnotu 52 miliard dolarů (Ceresena Research, 2013).

U pesticidů často dochází k jejich kumulaci v různých složkách životního prostředí a přímo i nepřímo způsobují nejrůznější zdravotní problémy u necílových organismů, včetně člověka (Abrantes a kol., 2010). V ekosystému se účinné látky pesticidů rozkládají na mnohdy rizikovější sloučeniny nazývané metabolity (Ceyhun a kol., 2010).

V současné době je v literatuře jen velice málo údajů o toxicitě chloridazonu na vodní organismy, z dostupných prací se jedná hlavně o data akutní toxicity a stanovení letálních hodnot. O vlivu chloridazonu, a hlavně jeho metabolitu chloridazonu desphenylu na fyziologii vodních organismů údaje schází. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na tuto látku a její metabolit, abychom získali první ucelené informace o jejím působení na bezobratlé organismy – raky. Proto je tato diplomová práce originální a jedinečná a přispěje svými výsledky k hodnocení environmentálních rizik chloridazonu a jeho metabolitu pro vodní ekosystémy.

Cílem diplomové práce bylo posouzení chronických účinků herbicidu chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na raku signálním (*Pacifastacus leniusculus*). Během testu byl sledován vliv testovaných látek na chování, biochemický profil hemolymfy, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy v tkáních raka signálního.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

V současné době je použití pesticidů jeden z hlavních způsobů ochrany rostlin, především tedy zemědělských plodin při pěstování na poli i při následném uchovávání ve formě zásob a rezerv (Zadoks a Waibel, 2000).

Už ve velmi vzdálené minulosti byla pro lidstvo životně důležitá snaha ochraňovat svůj zdroj obživy, tedy především zemědělské plodiny a následné zásoby potravin, před chorobami a škůdci. Historie těchto praktik sahá až 1000 let př. n. l., kdy byla ve starověké Číně používána síra ve formě plynné dezinfekce k odpuzování hmyzu a ochraně plodin. Kolem roku 1400 se začaly dále používat sloučeniny rtuti, olova a arsenu. Jejich účel byl především ochrana skladovaných zásob. Historie rozvoje insekticidních přípravků sahá do 15. století, kdy došlo k izolaci sloučeniny nikotinu (sulfát nikotin) z tabákových listů. Použití přírodních výtažků je datováno od 18. století. Od tohoto období je známo použití výtažků z kopretiny starčkolisté (*Chrysanthemum cinerariifolium*) zvané **pyrethrum** (Cremlyn, 1978). Jde o neperzistentní insekticid s nízkou toxicitou pro savce. Jak říká Casida (1980), tyto prostředky na hubení hmyzu vycházejí z přírodních sloučenin a jsou pozoruhodně účinné a jeví se jako vhodná biologická náhrada za relativně levné organochlorové a organofosforové sloučeniny a methylkarbamáty, které mají často negativní dopad na životní prostředí (perzistence) a vykazují také mnohdy toxické účinky na vyšší organismy, včetně člověka.

Velký pokrok ve výrobě pesticidů nastal ve 30. letech 20. století spolu s rozvojem moderní syntetické chemie. Když byly v tomto období poprvé představeny syntetické pesticidy, existovalo velké nadšení z jejich schopnosti trvale udržitelně řešit problémy s produkcí potravin ve světě. Postupem let se ale začaly objevovat první otázky a obavy z jejich negativních vedlejších účinků na člověka a životní prostředí (Zadoks a Waibel, 2000).

Zlomový pro užívání pesticidních látek byl rok 1939, kdy doktor Paul Müller objevil insekticidní účinky DDT (dichlordifenyltrichlorethanu). Za tento objev byl později oceněn Nobelovou cenou. Během velmi krátké doby se DDT stalo jedním z nejpoužívanějších a nejrozšířenějších pesticidních přípravků. S velkou oblibou bylo DDT používáno především během druhé světové války k potlačení vši, komárů a v boji

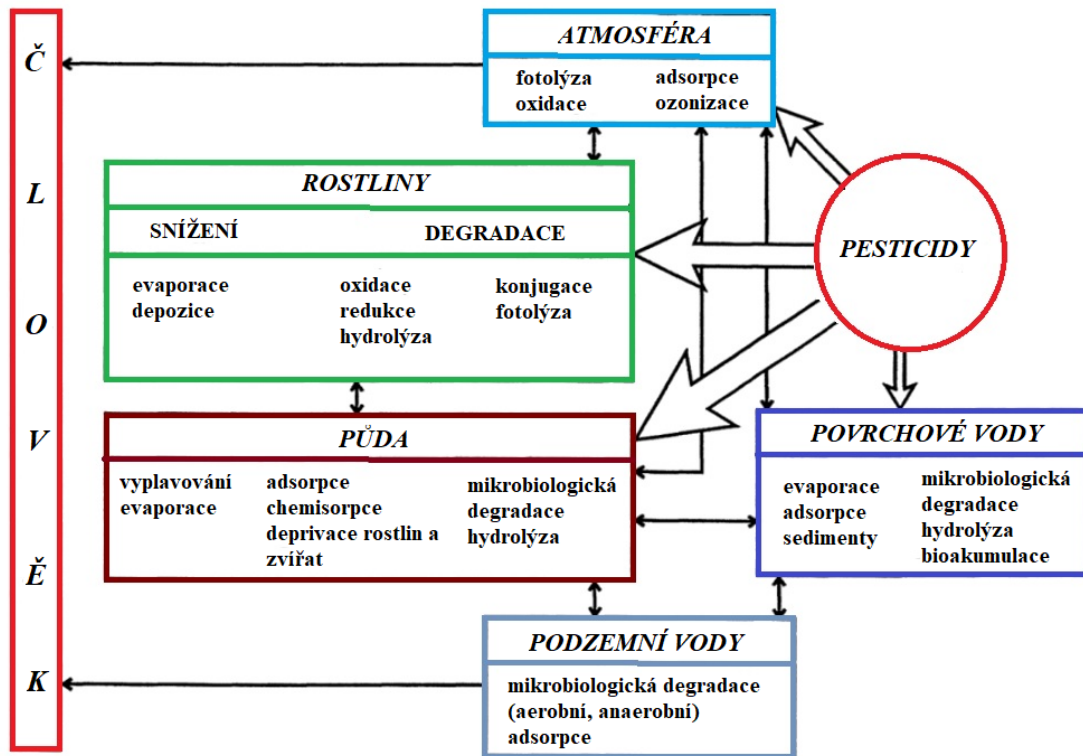
proti tyfu a malárii (Hayes, 1991). Mimo to bylo DDT hojně používáno ve Spojených státech pro hubení hmyzu v lesnictví a zemědělství. Výroba DDT dosáhla svého vrcholu v časných šedesátých letech při produkci 81 milionů kilogramů za rok (Woodwell a kol., 1971). Do roku 1966, i když se výroba snížila, připadalo přibližně 38 % DDT používaných ve Spojených státech na zemědělské aplikace. Začátkem 70. let 20. století se používání DDT ve Spojených státech dramaticky snížilo na 4,5 - 6,4 milionu kilogramů za rok a jeho primární použití bylo pro kontrolu škůdců na bavlněných plodinách. Celosvětová produkce se od roku 1944 do počátku 70. let odhaduje na 2 miliony tun (IARC, 1974).

Velmi důležitý milník v dějinách pesticidních přípravků nastal v roce 1962, kdy Rachel Carson ve své knize *Silent Spring* popsala negativní vliv DDT na ekosystém (Carson, 1962). Na základě zveřejnění této knihy došlo k monitoringu obsahu reziduí v potravinách a zkoumání jejich vlivu na živé organismy. Zjištěné velmi znepokojující výsledky vedly k postupnému zákazu použití DDT a jemu podobných látek vytvořením Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech. V roce 1972 bylo použití DDT zakázáno Agenturou pro ochranu životního prostředí USA (U.S. EPA, 1990). V ČR bylo používání DDT zakázáno v r. 1974.

Pojem „pesticid“ není v celosvětovém pohledu jednotný a v některých oblastech mohou existovat drobné překryvy a nesrovnalosti (například v humánní medicíně může dojít k překryvu s pojmem terapeutické přípravky) (Velíšek a kol., 2014). Jak uvádí Hajšlová a Kocourek (2004), pesticidní přípravky lze identifikovat podle definice Organizace pro výživu a zemědělství (z angl. *Food and Agricultural Organization* - FAO) jako **látky určené k prevenci, ničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých činitelů, tedy nežádoucích mikroorganismů, rostlin a živočichů během výroby, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv.**

V rámci legislativních odkazů používaných Evropskou unií je zažitý širší název pro pesticidy jako „prostředky na ochranu rostlin a biocidy“. Pro **prostředky na ochranu rostlin** je typická složitější registrace a širší testování negativních účinků na ekosystém z důvodu jejich plošného užívání v zemědělství. Oproti tomu registrace **biocidů** je jednodušší bez širšího testování pro jejich využívání v malých dávkách především v domácnostech, veterinární a humánní medicíně. Nutno ale dodat, že i biocidy tvoří

významný zdroj kontaminace v ekosystému pro jejich časté a mnohdy i nadbytečné využívání (Velíšek a kol., 2014). Osud pesticidů v jednotlivých složkách životního prostředí můžeme vhodně demonstrovat na obrázku č.1.



Obr. č. 1: Interakce mezi pesticidy a ekosystémem (upraveno podle Beitz a kol., 1994).

Pesticidy je dále možné dělit podle několika hledisek. Na základě cílového organismu, který má být eliminován, rozdělujeme pesticidy na (Zapletal a kol., 2001):

- Akaricidy – přípravky určené k hubení roztočů,
- Arboricidy – pesticidy určené k hubení stromů a keřů,
- Avicidy – přípravky určené k hubení ptáků,
- Fungicidy – prostředky určené k ochraně před houbovými chorobami,
- Herbicidy – pesticidy určené k hubení rostlin,
- Insekticidy – přípravky určené k hubení hmyzu (dezinfekce),
- Moluskocidy – prostředky určené k hubení měkkýšů,
- Piscicidy – přípravky určené k hubení ryb,

- Rodenticidy – přípravky určené k hubení hlodavců (deratizace).

Jiná možnost dělení pesticidů je podle způsobu jejich aplikace (Zapletal a kol., 2001):

- Aerosoly,
- Fumiganty (páry nebo plyny),
- Mořidla,
- Nátěry a impregnace,
- Pevné a tekuté nástrahy,
- Popraše,
- Postřiky.

Mimo výše uvedené způsoby dělení je v praxi často používáno rozdělování pesticidů podle původu, a to na látky syntetické (např. pyretroidy), přírodní (např. pyretriny) a biopreparáty (Zapletal a kol., 2001). Z praktického hlediska lze pesticidy dle spektra účinku dané látky rozdělovat na selektivní, širokospektré a totální (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Aplikace pesticidů pro ochranu zemědělských plodin je nejčastěji prováděna vnějším postřikem. **Systémové pesticidy** následně pronikají dovnitř těla rostlin, naproti tomu **kontaktní pesticidy** vytvářejí po aplikaci na zasažených plochách povrchový depozit a působí tudíž pouze v místě ošetření (Zadoks a Waibel, 2000). Pleasant (2010) ve své práci uvádí, že hlavní výhodou systémových pesticidů je jejich přítomnost přímo v rostlinách, nikoliv pouze na nich. Systémové pesticidy jsou chemikálie absorbované rostlinou při aplikaci na semena, listy nebo půdu, odkud jsou přijímány kořenovým systémem. Chemikálie poté cirkulují rostlinnými tkáněmi a ničí hmyz, který se na nich živí. Na rozdíl od tradičních insekticidů nemohou být rezidua těchto pesticidů z rostlinných produktů omyta ani odloupena. Počátek použití těchto pesticidů je datován do roku 1998 a během následujících 10 let jeho používání neustále vzrůstalo. V produkčním zemědělství jsou z této skupiny pesticidů používány především látky na bázi neonikotinoidů: imidacloprid, thiamethoxan, clothianidin a dinotefuran. Postupem času bylo během testování zjištěno velké množství reziduí těchto pesticidů v pěstovaných potravinách a jejich negativní vliv na necílové organismy, především včely. Další osud masivního používání těchto pesticidů je tedy stále nejasný, i v závislosti na nejasném vlivu na člověka při konzumaci takto

ošetřených produktů zemědělské činnosti (Pleasant, 2010). Studium účinků směsí pesticidů obsahující neonicotinoidy na člověka a jiné necílové organismy se zabýval například Zhao a kol. (2020).

Člověk je v současné době vystaven působení pesticidů takřka dennodenně. Pesticidní přípravky lze nalézt ve většině našich každodenních prostředí jako jsou pracoviště, domov, školy, dále i v potravinách, pitných a rekreačních vodách, ve vzduchu i v půdě. Jejich použití je velice variabilní, zahrnující mimo jiné různé postřikovače trávníků a všemožné spreje pro hubení škůdců využívané v domácnosti. Lze je také nalézt v rozdílných množstvích v potravinách jako jsou jahody, borůvky a jablka. K expozici pesticidů může dojít inhalací, požitím, dermálním kontaktem nebo napříč placentou. Zejména u dětí je vystavení pesticidům velice nebezpečné (Gilden a kol., 2010). Jak ale doplňuje Daniels a kol. (1997), přestože byl vztah mezi expozicí pesticidů a rizikem dětské rakoviny zkoumán v řadě epidemiologických studií, možné souvislosti zůstávají spekulativní. Ačkoliv řada pesticidů může být potenciálně karcinogenní, většinou jsou považovány za negenotoxické. Výsledky biomonitoringu provedeného Střediskem pro kontrolu nemocí a prevence v roce 2005 ukázaly, že v reprezentativním vzorku americké populace byly zjištěny detekovatelné hladiny asi 50 pesticidů (Gilden a kol., 2010).

Aplikace pesticidních přípravků by měla být prováděna vždy dle zásad tzv. **Správné zemědělské praxe** (z angl. *Good Agricultural Practices – GAP*). Hlavní myšlenkou je aplikace takového množství přípravku, aby došlo ke spolehlivé eliminaci cílového činitele, ale zároveň aby se pouze minimální množství reziduí objevilo v zemědělském produktu. Přítomnost reziduí pesticidů v zemědělských produktech a jejich následný přenos do lidského organismu je totiž pro člověka významným rizikovým faktorem. Z tohoto důvodu jsou pro obsah pesticidů v jednotlivých komoditách stanoveny **maximální limity reziduí** (z angl. *Maximum Residue Levels – MRL*) představující maximální koncentrace rezidua pesticidu (mg/kg), které je možné očekávat v dané komoditě (plodině) při použití pesticidních přípravků (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Po aplikaci pesticidů do prostředí následuje jejich rozklad (**degradace**). Ta probíhá v jednotlivých složkách životního prostředí (půda, voda) působením fyzikálních, chemických a biologických vlivů. Mezi významné fyzikální procesy patří například **fotolýza**, kdy účinkem slunečního záření dochází k termickému rozkladu. Tento proces může probíhat kromě standardních procesů v abiotických složkách životního prostředí již

po aplikaci pesticidu na povrchu ošetřených rostlin. Jako zástupce chemických reakcí můžeme jmenovat proces **hydrolýzy** a **oxidačně – redukční procesy**, uplatňující se například při degradaci triazinů. Biologické vlivy zajišťující biotransformační procesy jsou dílem **působení mikroorganismů**, které v konečné fázi dokážou eliminovat pesticidy ze životního prostředí (Hajšlová a Kocourek, 2004). Zejména bakterie rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium* nebo *Serratia* se řadí mezi významné mikroorganismy podílející se na odbourávání chlorovaných organických látek kontaminující životní prostředí. Pro účinnou degradaci cizorodých látek bakteriemi je důležité zajištění optimálních podmínek pro jejich činnost (především vhodná teplota a pH). Příkladem mohou být bakterie *Pseudomonas putida*, pro které je optimální prostředí pH 6-8 a teplota 20-35 °C. Již při poklesu pH prostředí na hodnotu 5 aktivita tohoto kmene významně klesá (Mercadier a kol., 1997; Karpouzias a Walker, 2000). Feidieker a kol. (1995) vhodně doplňuje, že způsob biologické degradace je využíván mimo eliminace cizorodých látek z prostředí také jako součást procesu čištění odpadních vod.

Jakmile dojde k průniku cizorodé látky do organismu, jsou aktivovány biologické obranné mechanismy a dochází k **biotransformaci** pesticidů v průběhu detoxikačních pochodů v různých orgánech a tkáních (hlavně v játrech). Obecným principem metabolizace látek je vytvoření ve vodě rozpustného produktu, který může být z organismu efektivně vyloučen. Schopnost účinně metabolizovat pesticidy mají především teplokrevní obratlovci (savci a ptáci). Samotný proces biotransformace (jinak též metabolizace) probíhá ve dvou fázích. V první fázi (asymetrické) dochází působením enzymů (oxidázy, hydrolázy) k přeměně nepolárních, lipofilních látek na polárnější, hydrofilnější metabolity (X-OH). Takto vzniklý metabolit může vykazovat menší, ale i větší toxicitu než původní sloučenina. V druhé fázi (symetrické) je následně metabolizován konjugačními reakcemi za vzniku neaktivních derivátů, které lze snadno z organismu vyloučit nebo deponovat. U savců a ptáků se primární metabolity konjugují s kyselinou D-glukuronovou a redukovaným glutathionem, u rostlin dochází ke konjugaci s D-glukozou. U rostlin se metabolity mohou ukládat do pletiv, např. do ligninu, u vyšších organismů jsou metabolity transportovány v krevním řečišti a posléze vylučovány, případně se mohou kumulovat v tkáních (Hudson a kol., 1984; Plumlee, 2003).

Kontaminace vodního prostředí pesticidy je dvojího typu. V prvním případě dochází k *přímému vstupu* po nesprávné aplikaci (nedodržení technologických postupů, únik preparátu do recipientu při čerpání zředovací vody aj.) nebo neodborné likvidaci

nepoužitých zbytků. Druhá možnost jsou *nepřímé vstupy* formou splachů pesticidů do vod z okolních ošetřených zemědělských kultur. Také odpadní vody z průmyslu a domácností jsou velmi významné zdroje znečištění (Prousek, 2001; Svobodová a kol., 2008). Jak konstatuje Svobodová a kol. (1987), v ČR poměrně časté otravy ryb pesticidy byly spjaté s 60. až 80. lety 20. století. K výraznému zlepšení došlo v 90. letech 20. století (přechod na šetrnější zemědělství – eko- a biozemědělství) a v současnosti se havarijní úhyny ryb způsobené pesticidy takřka nevyskytují, nebo jen ojediněle.

Při aplikaci pesticidů nesmíme zapomínat na fakt, že při každém jejich použití dochází k vnášení těchto cizorodých látek do životního prostředí, kde může docházet k jejich kumulaci a ovlivňování vodních organismů. Proto je v současné společnosti kladen veliký důraz na používání pesticidů šetrných k životnímu prostředí. Pro tento moderní druh pesticidů je typický rychlý rozklad, nevytváření reziduí a nemají negativní účinky na necílové organismy. Právě z potencionální nebezpečnosti těchto látek je jejich aplikace podmíněna vlastnictvím výjimky z ustanovení §39 odst.1 zákona č.254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro použití závadných látek k úpravě povrchových vod na nádržích určených pro chov ryb podle §39 odst.7 písm. d) vodního zákona (Velíšek a kol., 2014).

V posledních letech jsou v povrchových vodách ČR nejčastěji nalézána rezidua pesticidů na bázi chloracetanilidů (metolachlor,alachlor), triazinů (atrazin a jeho metabolity, simazin, aj.), derivátů kyseliny fenoxycetové, karbamátů (karbofuran), organofosfátů (diazinon) a derivátů močoviny (diuron) (Sehonová a kol., 2012).

2.1.1. Herbicidy

Herbicidy jsou chemické sloučeniny původně určené k potlačení růstu a k hubení plevelných rostlin v zemědělství, lesním hospodářství, zahradnictví a případně i k úplnému potlačení růstu všech rostlin na plochách sloužících technickým účelům (Fusek a Měrka, 2003). Obdobně definuje herbicidy i Belanger a kol. (2015) jako syntetické chemikálie hojně používané po celém světě k zvýšení výnosů hospodářských plodin potlačením nežádoucích rostlin (plevelů). Pro příklad ve své práci uvádí atrazin (ATR; 1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazin) jako jeden z nejběžněji používaných herbicidů ve Spojených státech. Jeho první použití je datováno do 50. let 20. století pro zvýšení produkce kukuřice, cukrové třtiny a čiroku. Přestože v mnoha

státech byly zjištěny nepříznivé účinky na zvířecích modelech a postupně bylo použití atrazinu zakázáno (Německo a Itálie od r. 1991 a Evropská unie od r. 2003), ve Spojených státech je stále běžně používán pro likvidaci plevelů. Dle Kiely a kol. (2004) je ve Spojených státech ročně použito jen v zemědělském průmyslu asi 34-36 milionů kilogramů ATR, což z něj činí druhý nejvíce používaný herbicid za glyfosátem.

Herbicidy lze rozdělit podle několika kritérií:

1. Dle rozsahu a záběru účinků na (Zapletal a kol., 2001):
 - Totální (neselektivní herbicidy), které ničí veškeré rostliny, se kterými se dostanou do kontaktu,
 - Selektivní herbicidy, které jsou účinné jen na některé druhy rostlin.

2. Dle období aplikace (Zapletal a kol., 2001):
 - Preemergentní aplikace – před vzejitím rostliny,
 - Postemergentní aplikace – po vzejití rostliny.

3. Dle způsobu aplikace (Zapletal a kol., 2001):
 - Aplikované na povrch rostliny, tzv. na list,
 - Aplikované na půdu.

4. Dle fyziologického působení (Zapletal a kol., 2001):
 - Kontaktní – působí dotykem, srážejí bílkoviny a působí jako plazmatické jedy,
 - Systémové.

5. Dle chemického složení (Zapletal a kol., 2001):
 - Anorganické,
 - Organické.

Přehled běžně používaných herbicidů rozdělených dle mobility a chemické struktury je uveden v tabulce č.1.

Tabulka č. 1. Rozdělení vybraných běžně používaných herbicidů dle mobility a chemické struktury (upraveno podle Hajšlová a Kocourek, 2004):

<u>HERBICIDY</u>		
Aplikované na list, systémové či translokované	Fosfonoaminokyseliny	glufosinát, glyfosát
	Deriváty benzoové kyseliny	dicamba, chlorfenpropmethyl, 2,3,6,- TBA (2,3,6- trichlorbenzoová kyselina)
	Chlorované alifatické kyseliny	dalapon
	Estery oxyfenoxykyselin	cykloxidim, diclofop-methyl, haloxyfop-methyl
	Fenoxyalkanové kyseliny	2,4-D [(2,4- dichlorfenoxy)octová kyselina], dichlorprop, mecoprop, MCPA [(4-chlor2- methylfenoxy)octová kyselina], MCPB [(4-chlor-otolyloxy)máselná kyselina], silvex
	Kvarterní amoniové sloučeniny	diquat, paraquat
Aplikované na list, kontaktní	Benzonitrily	bromoxynil, dichlobenil, ionoxynil
	Benzothiadiazoly	bentazon
	Karbaniláty	fenmedifam
	Cyklohexenony	cykloxydim, kletodim, sethoxydim
	Dinitrofenoly	dinoseb
	Difenyletery	acifluorfen, laktofen, nitrofen, oxyfluorfen
Aplikované do půdy	Acetanilidy	alachlor, butachlor, metolachlor, propachlor
	Amidy a anilidy	difenamid, naptalam, propanid, propanil
	Karbaniláty a karbamáty	asulam, barban, bendiocarb, chlorpropham, propham
	Dinitroaniliny	benefin, trifluralin
	Pyridazinony a pyridinony	amitrol, dimethazon, fluridon, oxadiazon

Aplikované do půdy	Pyridinoxykyseliny a pikolinové kyseliny	fluroxypyr, clopyralid, picloram, triclopyr
	Fenylmočoviny nebo jiné substituované močoviny	diuron, fenuron, chlorbromuron, isoproturon, linuron, metoxuron, monolinuron, siduron
	Sulfonylmočoviny	amidosulfuron, chlorsulfuron, nikosulfuron, primisulfuronmethyl, prosulfuron, rimsulfuron, sulfosulfuron, triasulfuron, tribenuron,
	Thiokarbamáty	butylát, cykloát, molinát, trifencarb
	Triaziny	ametryn, atrazin, desmetryn, cyanazin, prometon, prometryn, propazin, simazin, terbuthylazin, terbutryn
	Uracily	bromacil, lenacil, terbacil

Podle Hajšlové a Kocourka (2004) jsou mechanismy působení na cílové činitele u herbicidů různého typu. Jedna z možností je katalýza tvorby hydroperoxidů mastných kyselin v buněčných membránách. Následkem toho dojde k přerušení fotosyntézy (např. diquat, paraquat). Naproti tomu u látek ze skupiny fenylmočovín (např. diuron, metoxuron) a triazinů (např. atrazin, prometryn) dochází k blokaci transportu elektronů, inhibují tzv. Hillovu reakci. Mimo výše uvedené může herbicidní účinek látek spočívat v narušení metabolismu nukleových kyselin, což vede k zastavení růstu cílových plevelů (např. dichlorprop, dicamba) nebo v zamezení klíčení semen plevelných rostlin (např. nitroaniliny). Problémem při nadměrně intenzivním používání herbicidů je často masivní kontaminace nejen půdy, vody a ovzduší, ale i samotných zemědělských plodin (Fusek a Měrka, 2003).

Člověk je také řazen mezi necílové organismy ohrožené škodlivými účinky herbicidů. Působení herbicidů v lidském těle může způsobovat např. kancerogenní poškození, porušení imunitního a nervového systému, dermatologické změny a negativně působí na endokrinní systém a krevetvorbu (Fusek a Měrka, 2003).

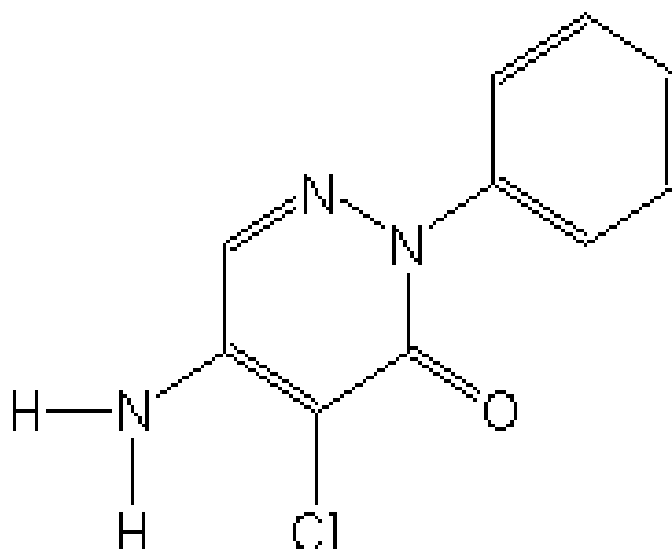
Rozklad zejména fenoxherbicidů probíhá ve vnějším prostředí velmi pomalu, možný však je. Určité přírodní mechanismy jako činnost půdní mikroflóry i fyzikálně-chemické faktory mohou přispět k degradaci těchto látek. Jak prokázali Crespín a kol. (2001), díky působení půdní mikroflóry spolu s účinky slunečního světla (fotodekompozice) může docházet k určitému rozkladu herbicidu 2,4-D v povrchových vrstvách zemědělské půdy. V současné době je intenzivně studována schopnost a mechanismus biodegradačních účinků u bakterií *Burkholderia cepacia* a jsou zjišťovány i první pozitivní výsledky v praxi při odstraňování některých negativních účinků fenoxherbicidů v zemědělské sféře (Gangadhara a Kunhi, 2000).

2.1.2. Chloridazon

Chloridazon se systematickým názvem 5-amino-4-chloro-2-phenylpyridazin-3(2H)-one je účinná látka (samostatně nebo ve směsích) mnoha selektivních systémových herbicidních produktů široce používaných k ničení plevelů v plodinách řepy (Dexter a Zollinger, 2001; Cuevas a kol., 2008). Jeho chemický vzorec je $C_{10}H_8ClN_3O$ (obr. č. 2).

Aplikace tohoto herbicidu je prováděna preemergentně i postemergentně zejména k ničení plevelů jako je laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus*), rmen rolní (*Anthemis arvensis*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*), merlík bílý (*Chenopodium album*), zemědělský lékařský (*Fumaria officinalis*), svízel přítula (*Galium aparine*), hluchavky (*Lamium* sp.), lilek černý (*Solanum nigrum*), ptačinec prostřední (*Stellaria media*) nebo peníze rolní (*Thlaspi arvense*). Po aplikaci je chloridazon rychle absorbován kořeny a transportován do všech částí rostlin (Tomlin, 2006).

Chloridazon jakožto pyridazinonová sloučenina patří do skupiny herbicidů inhibující fotosyntézu. Působí jako systémový herbicid v půdě a listech. Jako příklad zde můžeme uvést „Pyramin WG“, registrovaný pod různými obchodními názvy v Evropě. Tento přípravek obsahuje 650 g čistého chloridazonu v jednom kilogramu. Maximální aplikační dávka je stanovena na 2,6 kg chloridazonu na hektar. Aplikace se provádí pomocí běžných typů postřikovacích zařízení používaných v zemědělské výrobě (EFSA, 2007).



Obr. č. 2: Strukturální vzorec látky chloridazon (ČHMÚ, 2020a).

Vybrané vlastnosti a chování této látky (ČHMÚ, 2020a; PubChem, 2020a):

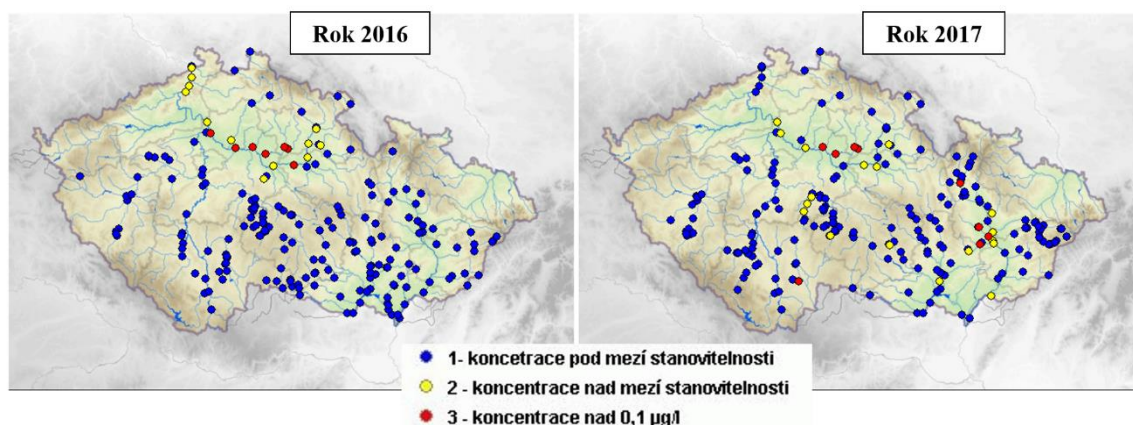
- Molekulová hmotnost: 221,6457 g/mol,
- Rozpustnost ve vodě: min. 340, max. 422 mg/l,
- Bioakumulační potenciál: nízký,
- Biokoncentrační faktor: nízký potenciál (12),
- Poločas rozpadu v půdě: min. 10, max. 133,7 dnů,
- Log K_{ow}: min. 1,14, max. 1,19,
- K_{oc}: min. 33, max. 346,
- Bod tání: 205 °C.

Toxicita chloridazonu pro některé organismy (ČHMÚ, 2020a; PED, 2000):

- LD50 potkan (*Ratus ratus*) – 2800 mg/l,
- 96hLC50 pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) – 39 mg/l,
- 48hLC50 hrotnatka velká (*Daphnia magna*) – 132 mg/l,
- 72hEC50 zelená řasa *Pseudokirchneriella subcapitata* – 0,6 mg/l,
- 7dEC50 okřehek hrbatý (*Lemna gibba*) – 3,03 mg/l.

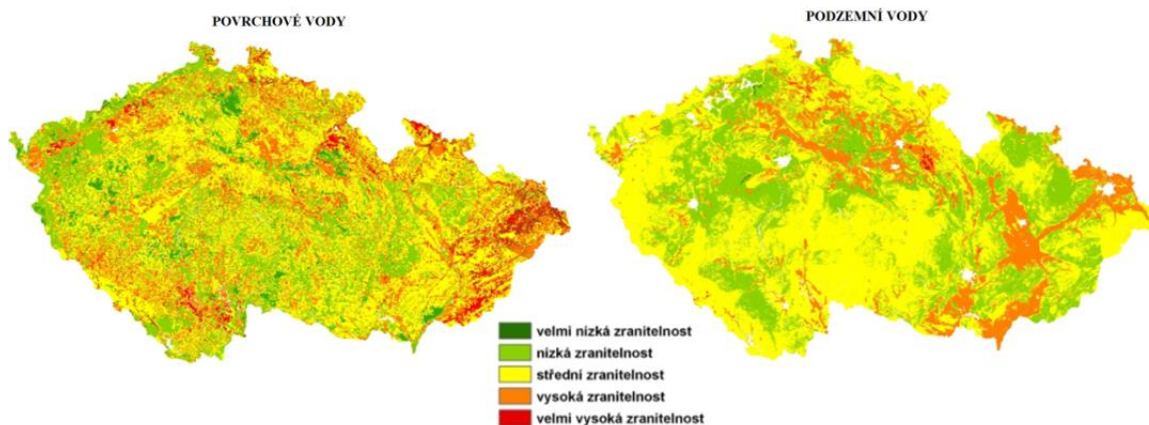
Nebezpečnost herbicidu chloridazonu je udávána tzv. H-větami (do roku 2015 tzv. R-větami). Pro herbicid platí věty **H317**: Může vyvolat alergickou kožní reakci (ve starém systému R43), **H400**: Vysoce toxický pro vodní organismy (R50) a **H410**: Vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky (R53) (ČHMÚ, 2020a, PubChem, 2020a).

Pro herbicid chloridazon je dle Vyhlášky MŽP a MZE 5/2011 stanovena maximální přípustná koncentrace v podzemních vodách 0,1 µg/l. Pro povrchové vody žádný limit stanoven není. Nicméně je každoročně monitorován výskyt této látky v povrchových vodách ČR (obr. č. 3). Tato sloučenina je detekována v povrchových vodách České republiky v rozmezí 0,01 až 4,34 µg/l a ve vodách podzemních o maximální koncentraci 0,67 µg/l. (ČHMÚ, 2020a).



Obr. č. 3: Výskyt chloridazonu v povrchových vodách v ČR v roce 2016 a 2017 (ČHMÚ, 2020a).

Na obrázku č. 4 je znázorněna zranitelnost povrchových a podzemních vod chloridazonem, tedy míra ohrožení těchto vod v důsledku zemědělské činnosti (ČHMÚ, 2020a).



Obr. č. 4: Zranitelnost povrchových a podzemních vod látkou chloridazon (ČHMÚ, 2020a).

Chloridazon je používán především pro ošetření řepy cukrové technické a řepy krmné, a to ve vegetačním období od konce března do půlky listopadu. Obsažen je v přípravcích jako Betoxon 65 WDG (obsah látky 650 g/kg), Burex Eko (320 g/kg), Burex 430 DKV (430 g/kg), Expander (300 g/kg), Flirt (418 g/kg), Largo (300 g/kg), Pyradex FL (430 g/kg) nebo Pyramin Turbo (520 g/kg) (ČHMÚ, 2020a). Spotřeba této látky byla v roce 2016 na území ČR 26,7 tuny. Z dat uvedených na stránkách ČHMÚ je patrné, že používání tohoto herbicidního přípravku má dlouhodobě klesající tendenci. Pro srovnání v roce 2006 byla roční spotřeba 38,9 tuny a v roce 1994 to bylo dokonce 69,5 tun.

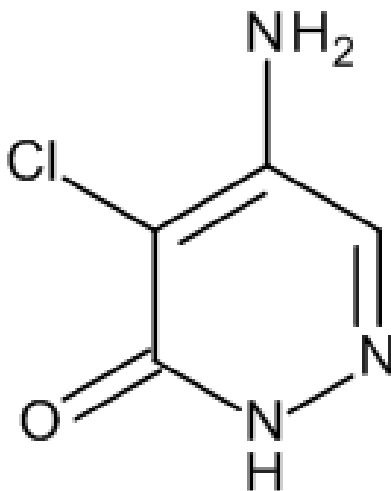
Rychlost degradace (rozkladu) chloridazonu v povrchové půdě zkoumal Kucharski a kol. (2012). Ten ve svém experimentu použil výchozí koncentraci chloridazonu v půdě $1,034 \pm 0,031$ mg/kg. Během 64 dnů klesla koncentrace testovaného herbicidu přibližně na 35 % koncentrace původní a na konci testu byla výsledná koncentrace 0,074 mg/kg, tedy 7,2% počáteční dávky. Průběh testu ukázal optimální linearitu mezi logaritmičnou koncentrací chloridazonových reziduí a časem působení v půdě.

Metabolity chloridazonu jsou chloridazon desphenyl a chloridazon methyl-desphenyl (ČHMÚ, 2020a).

2.1.3. Chloridazon desphenyl

Chloridazon desphenyl je s chemickým názvem $C_4H_4ClN_3O$ (obr. č. 5) a systematickým názvem 5-amino-4-chloro-3(2H)-pyridazinone metabolit herbicidu

chloridazonu. Chloridazon desphenyl můžeme také nacházet pod synonymy chloridazon-metabolit B nebo pouze metabolit B (ČHMÚ, 2020b).



Obr. č. 5: Strukturální vzorec látky chloridazon desphenyl (ČHMÚ, 2020b).

Vybrané vlastnosti a chování této látky (ČHMÚ, 2020b):

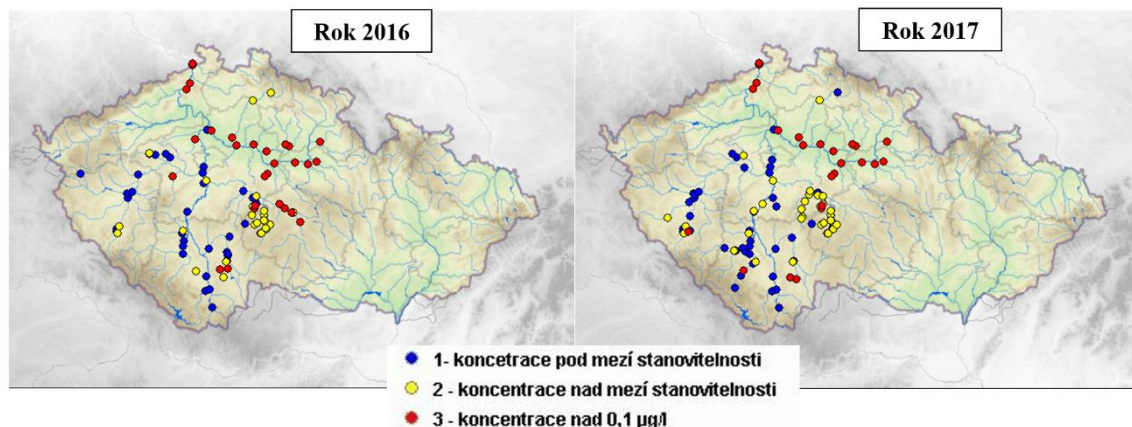
- Molekulová hmotnost: 145,55 g/mol,
- Poločas rozpadu v půdě: 235,5 dnů,
- K_{OC}: 50.

Toxicita chloridazon desphenylu pro některé organismy (ČHMÚ, 2020b):

- LD₅₀ potkan (*Ratus ratus*) – 5000 mg/l,

Chloridazon desphenyl je charakterizován H-větami. Konkrétně jde o věty **H302**: Zdraví škodlivý při požití, **H315**: Může způsobit podráždění kůže, **H319**: Může způsobit vážné podráždění očí a **H335**: Může způsobit podráždění dýchacích cest. Nutno podotknout, že tyto informace se mohou lišit v závislosti na nečistotách, přísadách a dalších faktorech (PubChem, 2020b).

Pro herbicid chloridazon desphenyl je dle Vyhlášky MŽP a MZE 5/2011 stanovena maximální přípustná koncentrace v podzemních vodách 0,1 µg/l, tedy stejná jako pro mateřskou látku chloridazon. Také u metabolitu chloridazon desphenyl probíhá každoroční monitoring výskytu této látky v povrchových vodách ČR (obr. č. 6). Tato sloučenina je detekována v povrchových vodách České republiky v rozmezí 0,01 až 14 µg/l a ve vodách podzemních o maximální koncentraci 36,1 µg/l. (ČHMÚ, 2020b).



Obr. č. 6: Výskyt metabolitu chloridazonu desphenylu v povrchových vodách v ČR v roce 2016 a 2017 (ČHMÚ, 2020b).

Rovněž ostatní státy hlásí problémy s výskytem chloridazonu a jeho metabolitů v povrchových vodách. Buttiglieri a kol. (2009) prováděl v průběhu roku 2007 vzorkovací kampaň pro chloridazon a jeho metabolit chloridazon desphenyl v regionu Hesensko (Německo). Celkem bylo analyzováno 548 environmentálních vzorků podzemních, povrchových i odpadních vod z čistíren odpadních vod. Chloridazon byl detekován při nízkých koncentracích (průměr 0,01-0,06 µg/l, maximum 0,89 µg/l) se sezonním vrcholem brzy po aplikaci na jaře. Oproti tomu chloridazon desphenyl byl přítomen po celý rok při mnohem vyšších koncentracích (průměr 0,72-0,81 µg/l, maximum 7,4 µg/l) především v zemědělských oblastech. Také Carafa a kol. (2007) detekoval chloridazon ve vzorcích vody z laguny Sacca di Goro Jaderského moře s maximálními koncentracemi 0,102 µg/l a 0,05 µg/l.

2.2. Raci

Sladkovodní raci jsou korýši řádu Decapoda a infrařádu Astacida (Astacoidea). Infrařád je tvořen nadčeledmi Enoplometopoidea, Nephropoidea, Astacoidea a Parastacoidea. První dvě nadčeledi zahrnují mořské humry, vlastní sladkovodní raci jsou obsaženi ve zbývajících dvou nadčeledích (De Grave a kol., 2009). Taxonomicky jsou sladkovodní raci uspořádáni do dvou „superrodin“, **Astacoidea** na severní polokouli a **Parastacoidea** na jižní polokouli. Astacoidea obsahují dvě hlavní čeledi, Cambaridae (420 druhů obsažených v 12 rodech) a Astacidae (39 druhů v 6 rodech). Parastacoidea se skládá pouze z čeledi Parastacidae, která obsahuje více než 170 druhů obsažených v 15 rodech (Hobbs, 1989). Tradiční systematické rozdělení korýšů je znázorněno na obrázku č. 7. Dle Kozák a kol. (2013) byl ale pomocí novodobých genetických metod provedených světově uznávanými odborníky nezvratně potvrzen monofyletický původ sladkovodních raků. V závislosti na tomto zjištění mohou tedy sladkovodní raci představovat pouze jedinou samostatnou nadčeleď, která se skládá ze tří čeledí. Dvou ze severní polokoule – Astacidae (zahrnující převážně evropské raky) a Cambaridae (převážně severoameričtí raci) a jedné z jižní polokoule – Parastacidae.

Řád: Decapoda (desetinožci)

Podřád: Dendrobranchiata (větvožábří)

Podřád: Pleocyemata (vejconosní)

Infrařád: STENOPODIDEA (stenogarnáti)

Infrařád: CARIDEA (krevety, syn. = garnáti)

Infrařád: ASTACIDEA (rakotvární)

Nadčeleď: ENOPLOMETOPOIDEA (humřici)

Čeleď: Enoplometopidae

Nadčeleď: NEPHROPOIDEA (humři)

Čeleď: Nephropidae

Nadčeleď: ASTACOIDEA (severní raci)

Čeleď: Astacidae

Čeleď: Cambaridae

Čeleď: Cambaroididae

Nadčeleď: PARASTACOIDEA (jižní raci)

Čeleď: Parastacidae

Obr. č. 7: Systém korýšů a jejich pozice v řádu Decapoda (upraveno z Patoka a kol., 2017).

V současné době je popsáno 592 druhů raků rozdělených do 28 rodů. Tento počet ale není zdaleka konečný, každoročně je popsáno několik nových druhů (De Grave a kol., 2009). Crandall a Buhay (2008) uvádějí dokonce 638 druhů v 33 rodech s tím, že je každoročně popisováno 5-10 nových druhů. Řadu dosud vědě neznámých a nepopsaných

druhů zahrnují zejména početné velké americké (*Cambarus*, *Orconectes*, *Procambarus*) nebo australské druhy raků (*Euastacus*, *Cherax*, *Engaeus*) (Kozák a kol., 2013).

Raci zabírají čtyři hlavní typy stanovišť. První jsou primární norovači. Tito raci vytvářejí nory až k hladině podzemních vod a celý svůj životní cyklus v těchto norách tráví bez nutnosti návaznosti na sladkou vodu. Dalo by se říct, že jsou v zásadě suchozemští. Mezi další skupinu patří zástupci raků obývajících primárně potoky. Velká skupina raků jsou obyvatelé jezer, rybníků a větších řek. Zde se často vyskytují tzv. sekundární norovači, kteří vyžadují konektivitu nory se sladkou vodou. Poslední skupinou jsou raci patřící mezi tzv. stygobionty, tedy obligátní obyvatelé jeskyní. Jedinci žijící v jednotlivých stanovištích jsou často morfologicky odlišní v závislosti na přizpůsobení danému ekosystému (Crandall a Buhay, 2008).

Sladkovodní raci (Crustacea, Decapoda, Astacida) jsou často považováni za klíčové druhy ve sladkovodních ekosystémech díky svému prominentnímu vlivu na fyzickou strukturu prostředí i na biologické interakce. Ztráta populací raků stejně tak jako kolonizace přírodních stanovišť raků nebo nahrazení ekologicky kontrastních druhů raků může podstatně narušit místní biodiverzitu a rozložení ekosystému (Momot, 1995; Dorn a Wojdak, 2004). Také Patoka a kol. (2017) zdůrazňuje, že řada původních druhů raků je ohrožována působením člověka, a to zejména fyzickou destrukcí či znečištěním jejich životního prostředí, nadměrným lovem, zavlékáním nepůvodních druhů či nemocemi.

2.2.1. Obecná morfologie a anatomie raků

Celé tělo raka je kryto vnějším krunýřem (exoskeletem), který je tvořen ze 4 destiček spojených tenkou membránou. Toto uspořádání umožňuje volný pohyb jedince. Samotný krunýř je vylučován pokožkou často označovanou jako „hypodermis“, protože zalézá pod silnou vrstvu kutikuly. Neleží tedy na povrchu těla. Kutikula je nebuněčná hmota formována hlavně chitinem. Mimo chitin obsahuje i jiné látky jako proteiny, glykoproteiny, volné aminokyseliny, fenoly, minerální soli (zejména uhličitan a fosforečnan vápenatý) a jiné. Také voda a pigmenty (karotenoidy a melanin) jsou součástí kutikuly (Zarenkov, 1983; Kozák a kol., 2013).

Typické zbarvení těla jednotlivých druhů raků je dáno kombinací celé škály pigmentů obsažených v račím krunýři. Většina z přítomných pigmentů je termolabilních a při vysokých teplotách dochází k jejich rozkladu. Výjimka je červený pigment

crustaceorubin. Právě díky tomuto pigmentu jsou vaření raci vždy červeně zbarvení. Naopak nedostatečná syntéza nebo úplná absence crustaceorubinu způsobuje u některých jedinců, např. u raka říčního, nápadně namodralý až kobaltově modře zbarvený krunýř (Kozák a kol., 2013).

Pro raky jakožto zástupce řádu Decapoda (desetinohých koryšů) je typická přítomnost 5 párů nápadných kráčivých končetin. První pár nese velká klepeta. Ve skutečnosti má ale rak celkem 19 párů končetin, včetně tykadel, ústních a zadečkových končetin, kdy každý pár končetin vychází z jednoho tělního článku. Celé tělo raka je rozděleno na hlavohruď (cephalothorax) a zadeček (abdomen) (Kozák a kol., 2013).

Hlavohruď byla vytvořena srústem celkem 13 tělních článků (5 hlavových a 8 hrudních). Z boků a svrchní strany je kryta tzv. karapaxem, jinak též hlavohrudním krunýřem. Ten v přední části mezi očima tvoří čelní trn (rostrum). Rostrum je používáno jako jeden z identifikačních znaků při rozeznávání jednotlivých račích druhů. Další determinační znak jsou tzv. postorbitální lišty, nacházející se v jednom nebo dvou párech na hřbetní straně karapaxu. Povrch karapaxu může být jemně granulovaný (rak říční), pokrytý drobnými a ostrými, dopředu směřujícími trny (rak bahenní) nebo téměř hladký (rak signální). Zadeček (abdomen, pleon) je tvořen z 6 krátkých, širokých článků spojených měkkou membránou mezi články a pohyblivými klouby po stranách. Na rozdíl od hlavohruďi je článkování na první pohled zřetelné. Spodní část abdomenu slouží u samic jako inkubační prostor pro vajíčka. Na konci těla se nalézá tzv. telson (Kozák a kol., 2013).

Svalová soustava u raků je tvořena svalstvem žíhaného (příčně pruhovaného) typu, a to jak u kosterních svalů (vnější skelet), tak i u srdečních a útrobních svalů (Fomičev, 1986). **Dýchání u raků** je zajištěno pomocí žaber uložených v žaberních dutinách na bocích hlavohruďi. Počet žaber je druhově variabilní. U raka říčního se nachází v jedné žaberní dutině 18 plně funkčních žaber a 4 rudimentální, u raků jižní polokoule najdeme od 12 do 21 žaber a u amerických raků z čeledi Cambaridae běžně nacházíme 17 funkčních žaber v jedné žaberní dutině (Vogt, 2002). **Oběhová soustava** raků je otevřená. To znamená, že tepny vedou hemolymfu od srdce přímo do otevřené tělní dutiny mezi orgány a do rozsáhlejších tělních lakun. **Centrální nervová soustava** raků je v základu žebříčkovitého typu tvořená sblíženým párem nervových provazců uložených na spodině vnitřní dutiny těla s párem ganglií v každém tělním článku. **Trávicí**

soustava u raků začíná ústy a dále pokračuje jako jícen, přední žvýkací žaludek, slinivko-jaterní žláza (hepatopankreas), zadní pylorický žaludek, krátké střevo a dlouhý konečník, prostupující celým zadečkem až ke konci telsonu, kde trávicí trubice ústí ven řitním otvorem (anusem) (Zarenkov, 1983; Holdich a Reeve, 1988; Vogt, 2002).

Raci jsou v zásadě gonochoristé (existují výjimky, např. rak mramorovaný). Samčí (varlata) i samičí (vaječníky) pohlavní orgány se nalézají dorzálně v hlavohrudí mezi spodinou srdeční dutiny a žaludkem. Během období páření se gonády značně zvětšují (Kozák a kol., 2013).

2.2.2. Rak signální

Rak signální, latinsky *Pacifastacus leniusculus* (obr. č. 8), patří mezi sladkovodní raky. Taxonomicky je řazen do říše Animalia, kmenu Arthropoda, třídy Malacostraca, řádu Decapoda, čeledi Astacidae a rodu *Pacifastacus* (BioLib, 2020).



Obr. č. 8: Samec raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*).

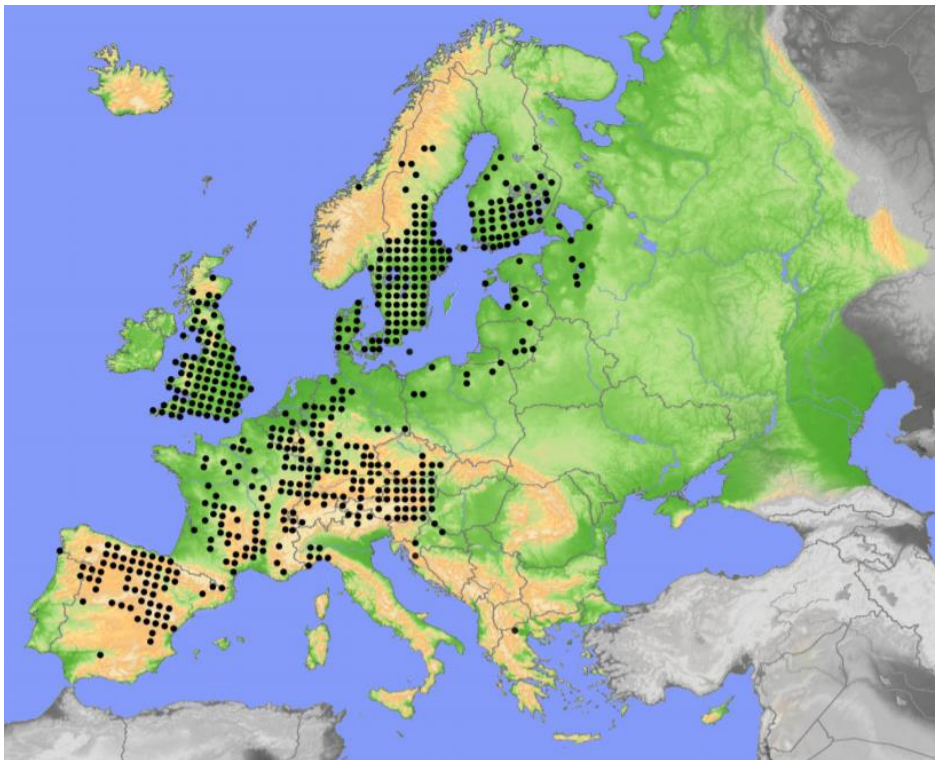
Rak signální patří mezi větší druhy raků. Samice dorůstají celkové délky těla zpravidla do 12 cm, samci bývají větší (až 16 cm). Hmotnost dospělého raka signálního obvykle nepřesahuje 200 až 250 g. Délka života může být u raka signálního i více než 20 let. Tělo je z horní strany zbarveno od světle hnědé přes červenohnědou až k tmavě hnědé. Výjimečně se může vyskytovat i modré zbarvení, podobně jako u raka říčního popsaného

výše. Hlavohrud' je mohutná, na bocích bez trnů a na povrchu hladká s dvěma páry postorbitálních lišt. Rostrum je také hladké, se skoro rovnoběžnými hladkými okraji. Klepeta jsou na povrchu hladká, především u samců značně mohutná. Barva spodní strany klepety je vždy sytě červená (obdobně jako u raka říčního). U spojení pevného a pohyblivého prstu klepety bývá na vrchní straně nápadná výrazně bílá či namodralá (až tyrkysová) skvrna – tzv. „signální skvrna“ (odtud i druhový název) (Holdich a kol., 2006; Pöckl a kol., 2006; Štambergová a kol., 2009). Spitzzy (1973) popisuje tyto skvrny jako příklad mimikry, protože pokud je jedinec zalezlý v noře, tyto skvrny připomínají svým zbarvením oči většího zvířete. Čím dál jsou klepeta od sebe, tím se poté zvíře jeví větší.

Pohlavní dospělosti rak signální dosahuje ve 2. až 3. roce života při velikosti 60-90 mm, samci obvykle o rok dříve než samice (Abrahamsson, 1971). K páření dochází na podzim, většinou v průběhu října. Průměrná pleopodální plodnost u samic se pohybuje v rozmezí 100 až 400 vajíček o velikosti 2,3 do 3 mm v závislosti na stupni embryonálního vývoje (Kirjavainen a Westman, 1995). Doba inkubace se pohybuje v rozmezí 1500–2200 denních stupňů, resp. od 166 do 280 dní. V závislosti na teplotě vody dochází k líhnutí od konce března do konce července (Lewis a Horton, 1996; McGriff, 1983). Jak doplňuje Johnsson (1995), pokud jsou zachovány stejné podmínky, dochází k líhnutí ráčat raka signálního o 3-4 týdny dříve než u raka říčního, což jim dává konkurenční výhodu. Přibližně po prvním týdnu od líhnutí dochází u ráčat ke svlékání do druhého vývojového stádia, které se již osamostatňuje a začíná přijímat potravu (Kanta, 2007). V průběhu prvního roku života se mohou ráčata svléknout až 11x (v závislosti na životních podmínkách), v dalších letech se počet svlékání za rok snižuje až na 1x ročně (Mason, 1963; Flint, 1975).

Primární domovinou raka signálního je Severní Amerika s původním areálem výskytu mezi Tichým oceánem a Skalístými horami (státy Idaho, Oregon, Washington a Britská Kolumbie) (Taylor a kol., 2007). Velice rychle se ale rozšířil pomocí introdukcí i do ostatních částí světa. Ani Evropa není výjimkou, i zde byl následně potvrzen jako přenašeč račího moru. Poprvé byl rak signální do Evropy dovezen v roce 1959, konkrétně do Švédska (Svärdson, 1995), kde začal být vysazován do volné vody jako náhrada za raka říčního decimovaného v té době račím morem, jakožto ekologicky i gastronomicky homogenní druh. Bohužel v této době nebylo zatím známo, že i samotný rak signální je přenašečem račího moru a jak nešťastný krok to pro budoucnost raka říčního ve Švédsku bude. V dalších letech byla provedena další rozsáhlá vysazování na území Švédska,

Finska a proběhly ilegální dovozy do Rakouska a Francie. V současnosti je rak signální nejrozšířenějším nepůvodním račím druhem v Evropě vyskytující se ve 29 teritoriích a stále dochází k rozšiřování areálu jeho výskytu (Kozák a kol., 2013; obr. č. 9). Nejvíce je zastoupen ve střední Evropě, Skandinávii, Španělsku a Velké Británii (Souty-Grosset a kol., 2006). V roce 2006 byl nově jeho výskyt potvrzen i na Slovensku v řece Moravě (Petrusek a Petrusková, 2007).



Obr. č. 9: Distribuční mapa výskytu raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) v Evropě (Kouba a kol., 2014).

První introdukce raka signálního na území tehdejšího Československa proběhla v roce 1980 jedinci pocházejícími ze Švédska. Dovezeno bylo 1000 ráčat tohoto druhu za účelem produkce tržních raků. Jejich vysazení proběhlo na čtyřech lokalitách: rybník Spustík u Velkého Meziříčí, rybník u obce Čáslavice, rybník Skříňka u Velké Bíteše a blíže neurčená lokalita u Ivančic (Polícar a Kozák, 2000). Na první zmiňované lokalitě byla po několika letech zjištěna silná populace raků signálních i přes to, že se introdukce zprvu zdály být neúspěšné. Odtud se raci signální rozšířili za pomoci člověka či přirozenou migrací i na další místa. Později byli raci signální nalezeni i na zmíněné lokalitě u Čáslavic. V současné době je rak signální potvrzen na mnoha lokalitách na jihu a jihovýchodě země, na jižní Moravě i v západních Čechách a lze očekávat jeho další

masivnější šíření na základě informací o jeho výskytu i v tekoucích vodách, kde tvoří početné populace (Policar a Kozák, 2000; Štambergová a kol., 2009). Pokud dojde k infiltraci rakem signálním v lokalitě s výskytem původních evropských druhů raků, většinou je svou větší schopností konkurence vytlačí. Na některých lokalitách se ale může vyskytovat i společně s původnímu druhy raků (např. koexistence raka signálního a raka říčního na rybnících Rybářství Litomyšl u obce Jedlová nebo rybník Nový u obce Čáslavice) (Souty-Grosset a kol., 2006; Štambergová a kol., 2009).

Ve svém původním areálu rozšíření v Severní Americe obývá rak signální nejrozličnější typy biotopů od malých potoků po velké řeky a jezera. V Evropě ho můžeme nalézt ve stejných biotopech jako vyhledávají původní evropské druhy, zejména rak říční. Na některých lokalitách si evropští raci signální mohou hloubit nory, což pro původní severoamerické populace není typické. Rak signální má také velice dobré migrační schopnosti po i proti proudu. Dokonce je schopen překonávat překážky v toku i pohybem po souši (Souty-Grosset a kol., 2006). Jak dodává Bubb a kol. (2004), i přes jeho zdařilé migrační schopnosti je rychlost kolonizace toků poměrně nízká. Na rozdíl od raka říčního vykazuje vyšší toleranci k vysokým teplotám vody (až 30 °C) a je značně odolný vůči širokému rozmezí salinit (Hager, 1996). Nevyhovují mu ale lokality s nižšími hodnotami pH. Svobodová a kol. (1987) uvádí, že rak signální je citlivý na prostředí s hodnotami pH nižšími než 6,5.

2.3. Testy toxicity

Znalost účinků chemických látek a přípravků, stejně tak jako jejich chování v ekosystému, je důležitým preventivním opatřením ke snížení rizik negativních dopadů těchto látek. Z tohoto důvodu jsou prováděny u přípravků před vlastním použitím testy toxicity. V Evropě podléhá testování většina užívaných chemikálií dle specifických podmínek, daných metod a právních předpisů (Velíšek a kol., 2014).

Testy toxicity můžeme definovat jako experimenty s organismy, pomocí kterých sledujeme potenciální negativní vliv testované látky na testovaný organismus a při jakých dávkách či koncentracích se bude tento účinek projevovat. Výsledkem je stanovení míry vlivu testované látky na experimentální organismus za daných expozičních podmínek (Kočí a Mocová, 2009; Svobodová a kol., 2010). Metody schopné definovat toxické účinky uměle vytvořených látek člověkem na životní prostředí a konkrétní živé

organismy začaly být vyvíjeny v 60. letech 20. století. Jedny z prvních testů toxicity byly prováděny na rybách (Kočí a Mocová, 2009). V současnosti existuje velké množství testů toxicity, které mohou být prováděny na molekulové úrovni, na úrovni buněk a tkání, na úrovni organismů nebo na úrovni celých biocenóz (Besch, 1977). Velíšek a kol. (2014) doplňuje, že před výběrem vhodného testu toxicity je také důležité zvážit různé faktory, které mohou toxicitu ovlivňovat. Tyto faktory mohou být chemicko-fyzikální vlastnosti testované látky, abiotické i biotické faktory prostředí a v neposlední řadě také samotná citlivost organismu k látce. Ta může být dána druhem, pohlavím, věkem, zdravotním stavem aj. (Hayes, 2007).

Ve Velké Británii vznikl na konci 50. let 20. století koncept tzv. 3R (**R**eplace, **R**educe, **R**efine). Autory této myšlenky jsou biologové William Russell a Rex Burch, kteří tento koncept představili světu v roce 1959 ve své knize „Principy humánních experimentálních technik“ (z angl. *Principles of Humane Experimental Technique*) (Russell a Burch, 1959). V dnešní době je koncept 3R zařazován mezi hlavní zásady pro užití zvířat v pokusech s primárním cílem omezení počtu pokusných zvířat v souladu s jejich ochranou. Ve své publikaci Russel a Burch (1959) definují **nahrazování** (*replacement*), jakožto první princip tohoto konceptu, jako přednostní využití nižších organismů v testech toxicity nebo jejich úplné nahrazení alternativními metodami za předpokladu dosažení stejných nebo lepších výsledků ve srovnání s pokusem na laboratorním zvířeti. Myšlenka druhého principu je **snížování** (*reduction*) počtu zvířat využívaných během pokusu inovací používaných metod. Třetí princip je **zjemnění** (*refinement*), jehož cílem je maximálním možným způsobem zmírnit utrpení a minimalizovat bolest u zvířat použitých v experimentu.

Provedení samotného testu závisí na použité metodice a dodržování postupů v ní předepsaných, standardizovaných na mezinárodní úrovni podle Mezinárodní organizace pro normalizaci (z angl. *International Organization for Standardization – ISO*) a Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. *Organization for Economic Cooperation and Development – OECD*). Česká republika je členem této organizace od roku 1995 (Svobodová a kol., 2010).

Obecně lze testy toxicity dělit podle délky trvání testu na akutní (krátkodobé) a subchronické až chronické (dlouhodobé). Williams a kol. (2003) definuje akutní expozici jako dobu zasahující pouze jedno vývojové stádium a obvykle je sledováno přežívání

organismu při působení testované látky. Chronické testy jsou prováděny po dobu zasahující více životních cyklů či vývojových stádií. Zde se kromě přežívání sleduje také nepříznivý účinek na růst, fyziologii, rozmnožování, genetické změny, aj. Metodika OECD (2000) uvádí další dělení testů toxicity podle způsobu výměny testovacího roztoku na statické (bez výměny testovacího roztoku po celou dobu experimentu), semistatické (výměna roztoku v určitých předem stanovených intervalech, např. každých 24 hodin) a průtočné (stálá obměna testovací lázně).

Získaná data z prováděného testu je následně nutné výpočtem převést na stanovené a definované parametry, které je možné vzájemně porovnávat a hodnotit. Mezi hojně používané hodnoty patří letální koncentrace (z angl. *Lethal Concentration* – **LC**), efektivní koncentrace (z angl. *Effective Concentration* – **EC**), a inhibiční koncentrace (z angl. *Inhibitive Concentration* – **IC**). Nejčastěji jsou tyto hodnoty uváděné ve formě LC50, EC50 nebo IC50, což lze vysvětlit jako statisticky vypočtenou hodnotu efektivní koncentrace toxikantu, při které je zaznamenána odpověď u 50 % testovaných organismů. Uvedené hodnoty jsou vyjadřovány při použití toxikantu v roztoku. Pokud je místo toho testovaná látka podávána testovaným organismům v určitých dávkách, vyjadřujeme výsledek jako letální dávka (z angl. *Lethal Dose* – **LD**) či efektivní dávka (z angl. *Effective Dose* – **ED**) (McNaught a Wilkinson, 1997; Landis a Yu, 2003; Velíšek a kol., 2014).

U dlouhodobých testů toxicity se můžeme setkat s tzv. určenými indexy, nejčastěji s hodnotami **NOEC** (z angl. *No Observed Effect Concentration*) a **LOEC** (z angl. *Lowest Observed Effect Concentration*). NOEC je definována jako nejvyšší testovaná koncentrace toxické látky nezpůsobující statisticky významné změny. Naopak LOEC je nejnižší testovaná koncentrace toxické látky, u které byly pozorovány statisticky významné změny ve srovnání s kontrolou (McNaught a Wilkinson, 1997; Landis a Yu, 2003). Velíšek a kol. (2014) upřesňuje, že parametry NOEC a LOEC nejsou hodnoty vypočítané, ale určené, tedy koncentrace přímo použité v testu a vztažené k určitému hodnocenému parametru.

2.3.1. Využití raků v testech toxicity

Raci nejsou pouze populární potravina, ale také důležitý indikační druh z hlediska monitorování životního prostředí (Vioque-Fernández a kol., 2007). Také Momot (1995)

a Buřič a kol. (2013) považují raky za důležité bentické bezobratlé v prostředí sloužící jako vhodný modelový organismus. Raci se používají jako indikátorový druh pro kvalitu životního prostředí, populační indikátorový druh nebo jako ukazatel druhové rozmanitosti (biodiverzity) (Füreder a Reynolds, 2003).

Metodika a průběh testování toxikantu na racích je založena na stejném principu jako testy s ostatními organismy žijícími v sedimentech nebo jako testy prováděné na rybách. Při testování je pro raky důležité z důvodu snížení kanibalismu umístit do testovacích nádrží inertní úkryty, nejlépe v nadbytku (min 1:1) (Velíšek a kol., 2014). Také s použitím raků v testech toxicity je spjat tzv. koncept **3R**, popsáný v předchozí kapitole.

Rak signální spolu s rakem červeným (*Procambarus clarkii*) jsou velice oblíbenými druhy raků využívaných při testech toxicity. Svědčí o tom mnoho publikovaných vědeckých článků o toxickém působení zkoumaných látek právě na raku signálním. Například akutní toxicitu triazinových pesticidů na juvenilních stádiích raka signálního zkoumal Velíšek a kol. (2013a). Kouba a kol. (2012) zjišťoval toleranci raků signálních vůči Persterilu 36 pro použití kyseliny peroctové v chovu raků. Vliv insekticidů na bázi pyrethroidů na nepůvodních druzích raků v Evropě, včetně raka signálního, zjišťovala Lidová a kol. (2019). Ve všech jmenovaných pokusech bylo dosaženo zajímavých výsledků, stejně tak jako v mnoho dalších zde neuvedených.

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv herbicidu chloridazonu a jeho metabolitu chloridazonu desphenylu na adultní jedince raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) byl zkoumán za pomoci chronického testu toxicity. Tento experiment byl prováděn v akvarijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie, která se nachází v budově Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, jakožto součást Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.1. Chronický test toxicity

Hlavní výhoda chronických testů toxicity spočívá v lepším popsání chování a vlivu sledované látky v ekosystému z důvodu delšího testování v nižších koncentracích, často i environmentálně relevantních. To je hlavní rozdíl oproti akutním testům, kde se testují zpravidla vysoké koncentrace pro krátký čas. Nutno ale dodat, že nevýhodou chronických testů je vyšší časová a finanční náročnost oproti akutním testům.

3.1.1. Princip a podmínky testu

Při provádění chronických testů toxicity je sledováno působení toxických látek, polutantů, environmentálních vzorků, výluhů odpadů nebo směsí v delším časovém období. Důraz je kladen na sledování vlivu dlouhodobě menších dávek na organismus. Patologické změny v průběhu a po ukončení testu jsou sledovány pomocí vhodných definovaných bioindikátorů, které indikují škodlivý účinek testované chemikálie. Součástí testu je také kontrolní skupina, která je stejně početná jako skupina exponovaná testovanou látkou a je testována za stejných validačních podmínek, s výjimkou podávání testované chemikálie. Cílem testu je zpravidla najít hodnoty NOEC a LOEC (význam těchto hodnot je popsán v předcházející kapitole) (Horák a kol., 2004; Prokeš, 2005). Během testu jsou testovaní jedinci pravidelně krmeni vhodným krmivem a je prováděna v předem stanovených časových intervalech výměna vody spolu s testovanou látkou (semistatické a průtočné systémy). Důležité je dodržet odpovídající koncentraci testované látky a udržovat v předepsaných validačních hodnotách chemické parametry vody (teplota, nasycení vody kyslíkem, hodnota pH, aj.).

3.1.2. Experimentální materiál

Původní druhy raků vyskytující se na území České republiky patří mezi ohrožené druhy a jsou chráněni jak vnitrostátními (Červený seznam ohrožených druhů České republiky, Štambergová a kol., 2005; Zákon o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb, a vyhláška MŽP ČR č. 395/1992 Sb.), tak i evropskými předpisy (Směrnice Rady č. 92/43/EEC a Bernská úmluva z roku 1979). 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 adeptem pro toxikologické studie (Kozák a kol., 2011).

Pro účely tohoto testu byli použiti adultní jedinci raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*, obr. č. 10) získáni z vlastního chovu Výzkumného ústavu rybářství a hydrobiologie ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Raci použité v testu měli průměrnou hmotnost $15,87 \pm 5,98$ g a průměrnou délku karapaxu $35,56 \pm 4,24$ mm (měřeno od začátku rostra po konec hlavohruďi).



Obr. č. 10: Jedinec raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) použitý pro vlastní chronický test toxicity.

V testu byl použit chloridazon o čistotě 99,8 % zakoupený od firmy Sigma-Aldrich Corporation (USA). Chloridazon desphenyl byl použit od firmy Neochema GmbH (Německo) o čistotě 95 %. Pro zajištění shody mezi nominální a skutečnou koncentrací chloridazonu ve vodě byly vzorky vody analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií s kapalinovou chromatografií podle Reemtsma a kol. (2013). Naměřené hodnoty se nelišily od hodnoty uvedené pro účely zkoušky o více než 9 %.

3.2. Průběh testu

Expozice raků testovaným látkám byla 30 dní, po skončení expozice proběhla fáze depurace, během které byly exponovaní raci drženi 15 dní v čisté vodě bez testovaných látek. Celkem náš provedený test včetně fáze depurace tedy trval 45 dní. Během testu byly provedeny tři odběry vzorků a to 15. den expozice, 30. den expozice (konec expozice testovaným látkám) a na konci 15denní depurace (45. den). Nasazení testu proběhlo 23.9.2019 po 10denním aklimatizačním období.

V našem testu byl sledován vliv chloridazonu a chloridazon desphenylu ve dvou koncentracích pro každou látku. Zvolené koncentrace látek byly následující:

- **Chloridazon – 0,45 µg/l (Ch1),**
- **Chloridazon – 2,7 µg/l (Ch2)** – maximální environmentální koncentrace v českých řekách v roce 2012 (ČHMÚ, 2020a),
- **Chloridazon desphenyl – 0,45 µg/l (Ch-D1)** – maximální environmentální koncentrace v českých řekách v roce 2014 (ČHMÚ, 2020b),
- **Chloridazon desphenyl – 2,7 µg/l (Ch-D2).**

Test byl proveden pro každou látku a koncentraci ve třech opakováních v oddělených akváriích o objemu 50 litrů (obr. č. 11). V dalších třech akváriích o totožném objemu byla nasazena kontrola s čistou vodou bez přidané látky. Do každého akvária bylo umístěno 14 testovaných jedinců. Celkem tedy bylo pro test použito 15 akvárií a nasazeno 210 dospělých jedinců raka signálního. Do každé nádrže byly umístěny plastové úkryty z důvodu snížení kanibalismu (obr. č. 12).



Obr. č. 11: Nasazení testovaných jedinců raka signálního v exponované skupině Ch-D2 ve třech opakováních.



Obr. č. 12: Plastový inertní úkryt umístěný v experimentálním akváriu spolu s testovanými jedinci raka signálního.

Úkony jako výměna vody a čištění akvária od nárostů a zbytků krmiv byly prováděny v průběhu testu každých 48 hodin, koncept experimentu byl tedy semistatický. Spolu s výměnou vody vždy proběhlo i doplnění nových testovaných látek v příslušných koncentracích. Nezbytné bylo dodržení stanovených parametrů testu pro úspěšnou validaci:

- Světelný režim: **12 hod. světlo/12 hod. tma**
- Teplota: **21,7 ± 0.8 °C**,
- Rozpuštěný kyslík > **5,87 mg/l**,
- pH: **7,67-8,01**,
- $\text{KNK}_{4,5}$: **0,70 mmol/l**,
- CHSK_{Mn} : **0,91 mg/l**,
- Celkový amoniak: **0,015 mg/l**,
- Suma $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$: **6,55 mg/l**.

Sledování teploty vody probíhalo v hodinových intervalech za použití Minikin loggerů (Systémy měření prostředí, Brno). Nasycení vody kyslíkem, pH a ostatní parametry byly sledovány denně. Krmení raků probíhalo jednou denně *ad libitum* granulovaným krmivem původně určeným pro býložravé cichlidy od firmy Sera.

3.3. Odběr vzorků

Během testu byly provedeny tři odběry vzorků a to 15. den expozice, 30. den expozice (konec expozice testovaným látkám) a na konci 15denní depurace (45. den). Pro každý odběr bylo použito 9 raků z každé skupiny, včetně kontroly (3 raci z opakování). Celkem tedy 45 raků za jeden odběr.

Před odběrem vzorků hemolymfy a tkání bylo provedeno sledování chování raků (viz kap. 3.4.). Po ukončení behaviorálního sledování byl každý jedinec nejprve zvážen na analytické váze a byla u něj zjištěna délka karapaxu. Po vážení a měření byli raci umístěni na šupinkový led, což způsobilo anestezii. Po dostatečném zchlazení byla za pomoci injekční stříkačky odebrána hemolymfa na vyhodnocení biochemického profilu (obr. č. 13). V dalším kroku byla odstraněna vrchní část hlavohrudí a pomocí chirurgických nástrojů odebrán vzorek žaber a hepatopankreatu pro stanovení oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů. Na stanovení oxidativního stresu a antioxidačních

biomarkerů byl také v posledním kroku vyjmut vzorek svaloviny z abdomenu (obr. č. 14). Každý vzorek byl zapsán do odběrové tabulky, umístěn do označené mikroskopické Eppendorff, hluboce zamrazen v tekutém dusíku a přemístěn do hlubokomrazáčního boxu (-80 °C) pro uchování do realizace biochemických analýz.



Obr. č. 13: Odběr hemolymfy raka signálního.



Obr. č. 14: Jedinec raka signálního s odebranými vzorky žaber, svaloviny a hepatopankreatu.

3.4. Chování raků

Při jednotlivých odběrech byl každý jedinec před odběrem hemolymfy a tkání podroben analýze chování (obr. č. 15). Principem tohoto testu bylo sledování chování jedinců v reálném čase. Každá skupina raků byla individuálně umístěna v označených miskách s 2 litry roztoku testované látky (u kontrolní skupiny byla použita ředící voda) a jemným pískem na dně. Monitoring chování byl proveden videokameru Sony HDR-CX240E (Sony, Japan) po dobu jedné hodiny. Naměřené hodnoty byly následně analyzovány softwarem EthoVision[®] XT 13 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemsko). V případě našeho testu byla hodnocena aktivita raků (%), rychlost chůze (cm/s) a celková pohybová vzdálenost (cm).



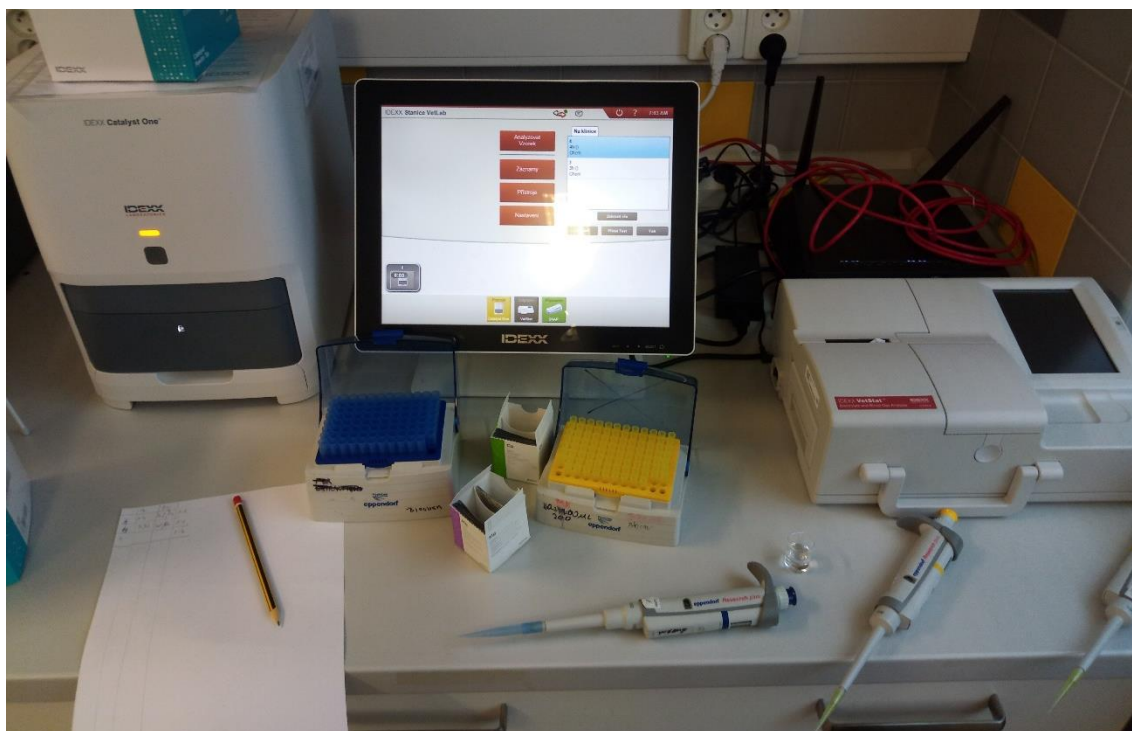
Obr. č. 15: Příprava raků signálních před analýzou chování.

3.5. Metody stanovení biomarkerů

3.5.1. Biochemický profil hemolymfy

Po ukončení analýzy chování byly vybraní jedinci připraveni pro odběr hemolymfy. Vlastní odběr hemolymfy byl proveden z ventrální části abdomenu pomocí injekční stříkačky propláchnuté heparinem sodným (Heparin inj., Léčiva Praha, Česká republika). Pro stabilizaci 1ml hemolymfy raků byly použito 0,01 ml (1 kapka) heparinu sodného. Odebraná hemolymfa byla následně po dobu 10 minut odstředována při otáčkách 10 000 g. Mezi sledované biochemické parametry hemolymfy patřila glukóza (GLU), laktát (LACT), alanin aminotransferáza (ALT), aspartát aminotransferáza (AST), laktát dehydrogenáza (LDH), celkové bílkoviny (TP), triglyceridy (TAG), amoniak (NH₃), kreatin (CREA), alkalická fosfatáza (ALP), vápník (Ca) a anorganický fosfát (PHOS).

Zmíněné parametry byly stanoveny pomocí analyzátoru Catalys One (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) (Obr. č. 16). Při stanovování jednotlivých parametrů bylo vycházeno z metodiky Kolářová a Velišek (2012), s modifikacemi pro raky.



Obr. č. 16: Analýza vzorků hemolymfy pro stanovení jednotlivých parametrů biochemického profilu, prováděna na analyzátoru Catalys One.

3.5.2. Oxidativní stres a antioxidační biomarkery

Bezprostředně po odběru vzorků hemolymfy byli raci usmrceni. Pro stanovení lipidní peroxidace a antioxidačních biomarkerů byly odebrány tkáně (hepatopankreas, sval a žábry) od devíti raků z každé skupiny. Odebrané tkáně byly okamžitě zmrazeny při -80°C až do provedení vlastních biochemických analýz. Vzorky raků z experimentálních skupin byly homogenizovány a připraveny pro hodnocení parametrů oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů podle metodiky Stará a kol. (2016).

Hladina lipidní peroxidace byla stanovena pomocí tzv. TBARS testu (látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou) (Uchiama a Mihara, 1978). Tato metoda vychází ze stanovení barevných aduktů, které vznikají při reakci produktů lipidní peroxidace a kyseliny barbiturové (TBA). Test byl upraven pro měření na mikrotitrační destičce, kdy absorbance byla měřena spektrofotometricky při 550 nm (Infinite M200, TECAN).

Pro získání postmitochondriálního supernatantu na měření antioxidantních biomarkerů byl homogenát centrifugován při 30 000 rpm (4 °C) po dobu 30 minut pro analýzu celkové superoxid dismutázy (SOD) a katalázy (CAT). Pro zbylé antioxidantní parametry byl vzorek odstředěn při 10 000 rpm (4 °C) po dobu 15 minut. Celková aktivita SOD byla stanovena metodou podle Ewinga a Janera (1995). Test aktivity CAT byl stanoven pomocí spektrofotometrického měření při 240 nm, kdy se měří rychlost rozkladu peroxidu vodíku (H₂O₂) katalázou dle metodiky Aebi (1984). Aktivita glutathion S-transferázy (GST) byla měřena podle Habig a kol. (1974). Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazonu desphenylu na pokles hladiny glutathionu (GSH) byl zjišťován pomocí metody dle Ellmanna (1959). Zmíněné metody pro stanovení antioxidantních biomarkerů byly provedeny s malými modifikacemi pro testování na racích podle Staré a kol. (2016, 2018).

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno podle Bradforda (1976) s použitím bovinního albuminu jako standardu pro kalibraci proteinu. Vlastní koncentrace byly měřeny spektrofotometricky při 562 nm.

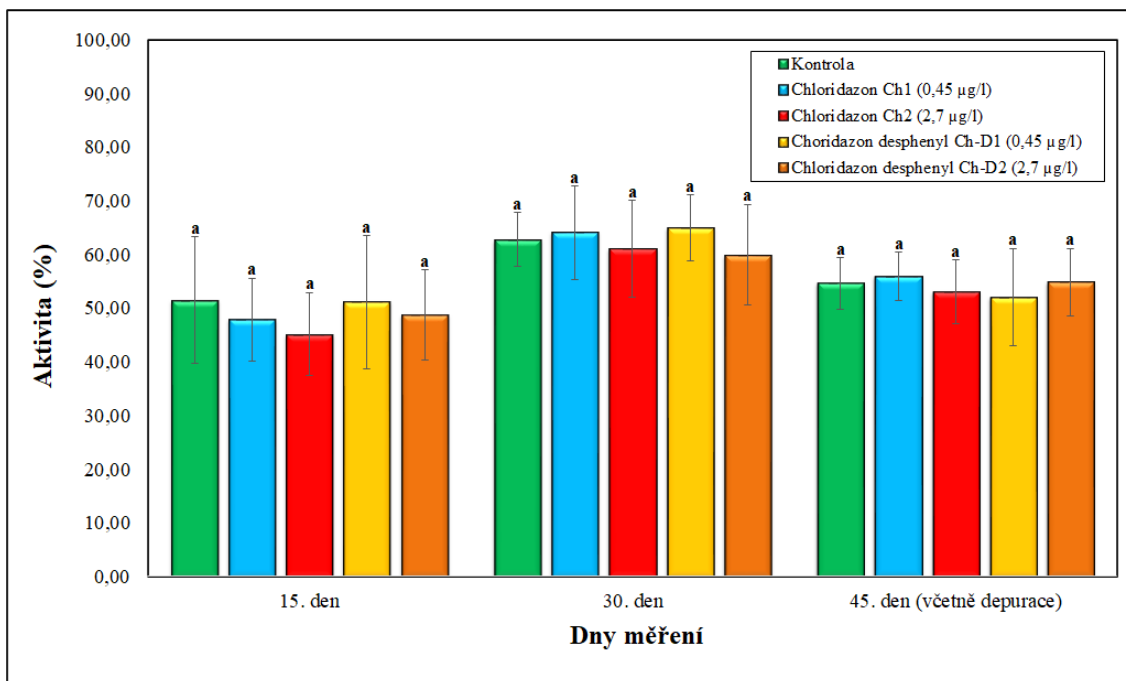
3.6. Statistické vyhodnocení testu

Pro porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit software STATISTICA v.12.0. pro Windows (StatSoft). Před vlastní analýzou byly všechny měřené proměnné podrobeny kontrole normality (Kolmogorův-Smirnovův test) a homoskedasticitě rozptylu (Bartlettův test). Když byly tyto podmínky splněny, byly použity nepárové t-testy ke stanovení rozdílů mezi kontrolou a exponovanou skupinou. V některých případech byly použity pro tyto stanovení také Mann-Whitneyovy U testy.

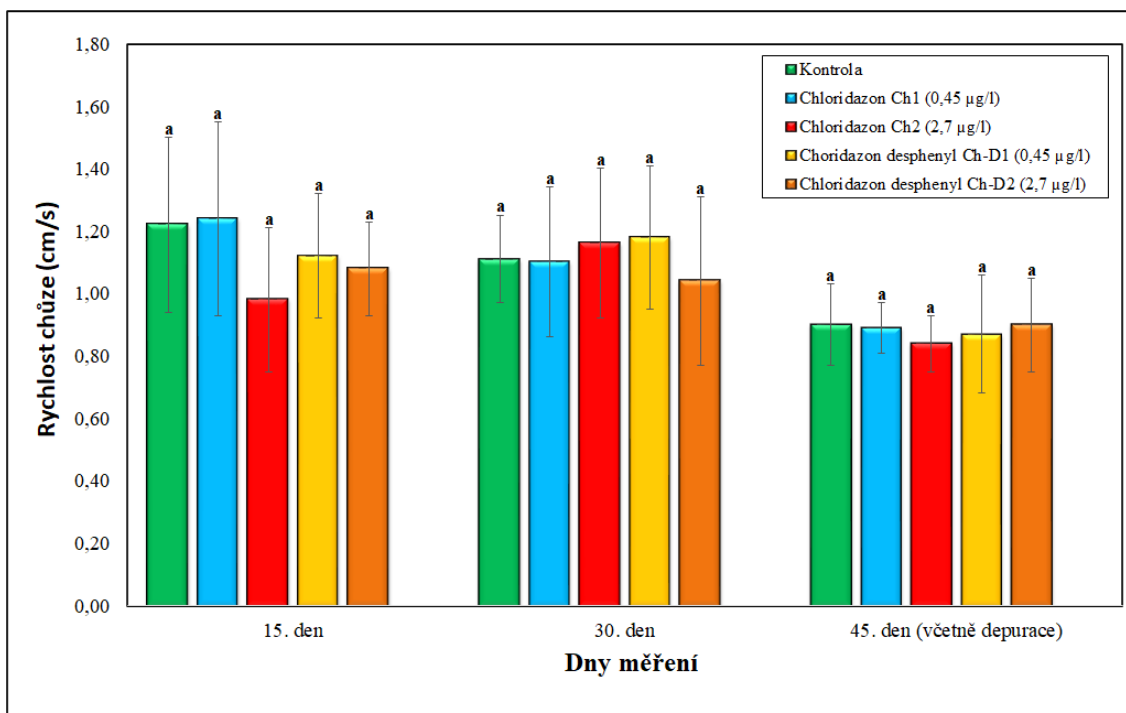
4. VÝSLEDKY

4.1. Chování raků

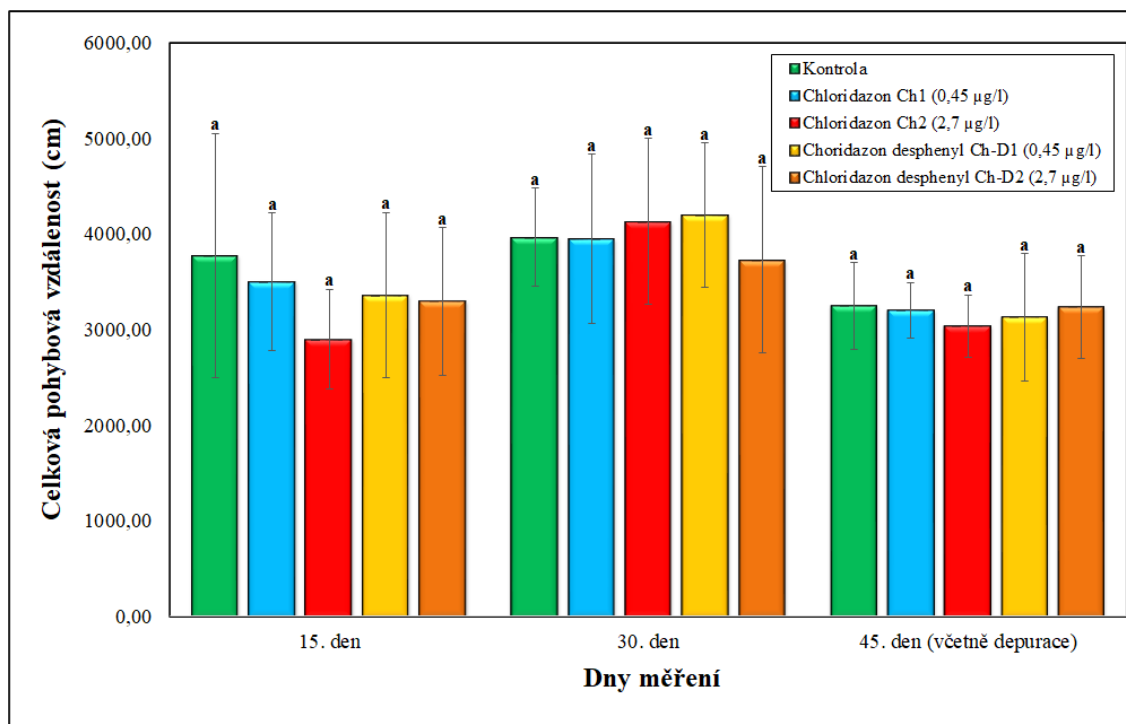
Chloridazon v koncentracích 0,45 µg/l (Ch1) a 2,7 µg/l (Ch2), stejně tak jako jeho metabolit chloridazon desphenyl v koncentracích 0,45 µg/l (Ch-D1) a 2,7 µg/l (Ch-D2), neprokázal v celém průběhu experimentu žádné signifikantní ($P < 0,05$) změny v aktivitě raků (graf č. 1), rychlosti chůze (graf č. 2), ani v celkové pohybové vzdálenosti (graf č. 3), v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 1: Změny v aktivitě (%) raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) v průběhu experimentu po expozici pesticidem chloridazonem a jeho metabolitem chloridazon desphenylem. Indexy *a* charakterizují shodu hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).



Graf č. 2: Změny v rychlosti chůze (cm/s) raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) v průběhu experimentu po expozici pesticidem chloridazonem a jeho metabolitem chloridazon desphenylem. Indexy a charakterizují shodu hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

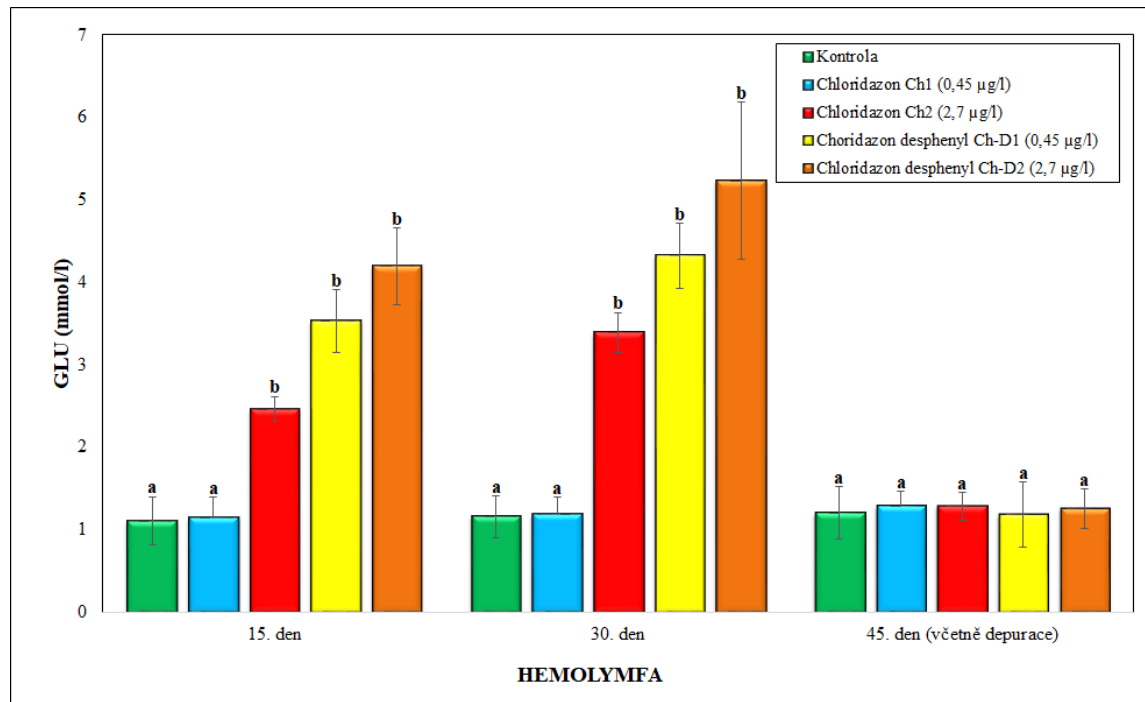


Graf č. 3: Změny v celkové pohybové vzdálenosti (cm) raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) v průběhu experimentu po expozici pesticidem chloridazonem a jeho metabolitem chloridazon desphenylem. Indexy a charakterizují shodu hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.2. Biochemický profil hemolymfy

4.2.1. Glukóza (GLU)

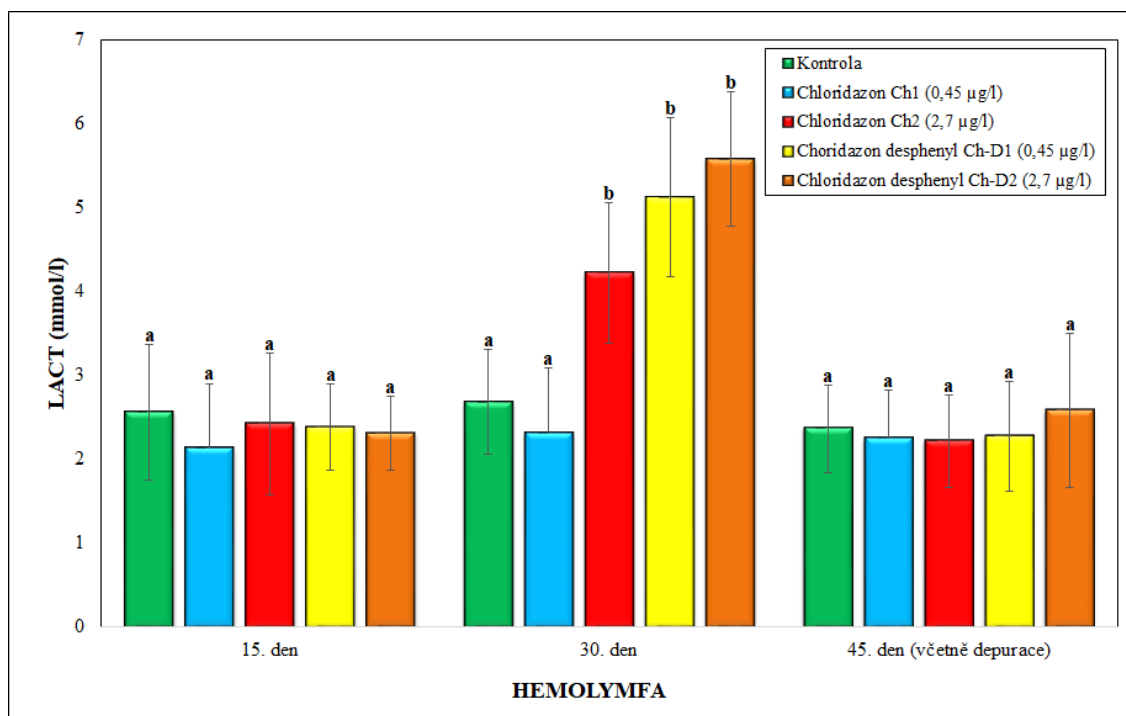
Vliv testovaných látek na hladinu glukózy vyjadřuje graf č. 4. Chloridazon v koncentraci 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch2) a jeho metabolit chloridazon desphenyl v koncentracích 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D1) a 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D2) prokázal signifikantně ($P < 0,01$) vyšší hladinu glukózy po 15ti- a 30ti denní expozici, ve srovnání s kontrolou.



Graf č. 4: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu glukózy (GLU) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy *a*, *b* charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.2.2. Laktát (LACT)

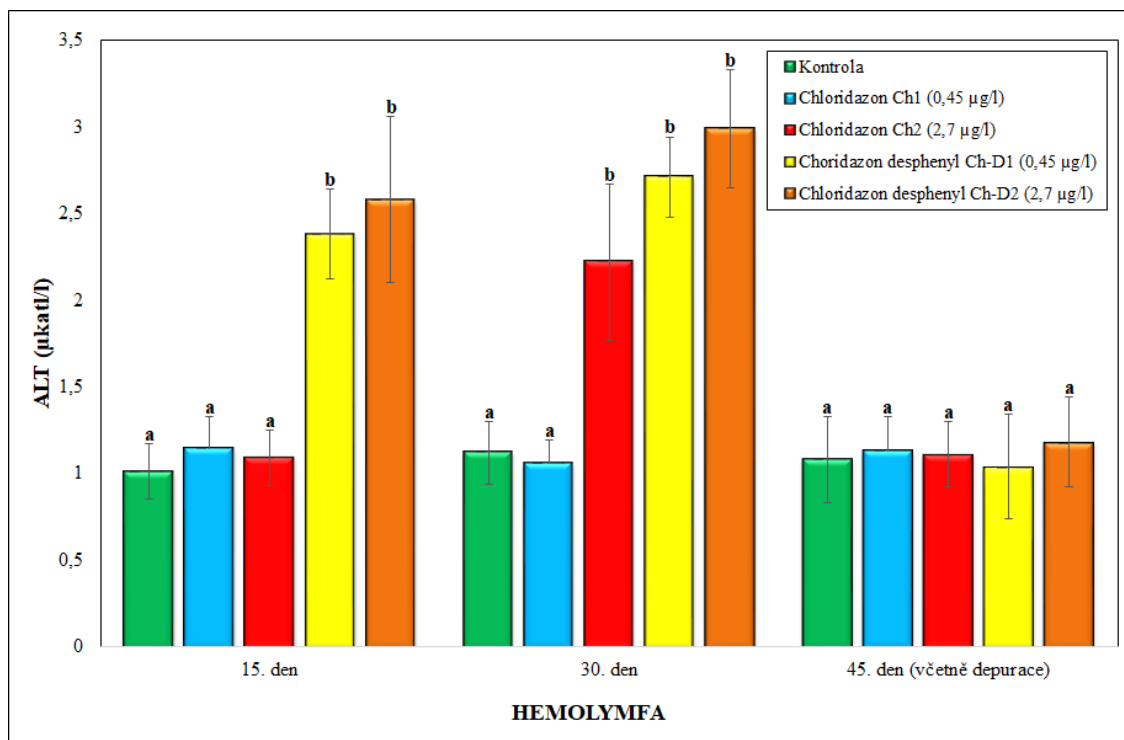
U laktátu došlo k signifikantnímu ($P<0,01$) zvýšení jeho hladiny po 30ti denní expozici herbicidem chloridazonem v koncentraci 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch2) a jeho metabolitem chloridazon desphenylem v koncentracích 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D1) a 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D2), ve srovnání s kontrolou (graf č. 5).



Graf č. 5: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu laktátu (LACT) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy *a*, *b* charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P<0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.2.3. Alanin aminotransferáza (ALT)

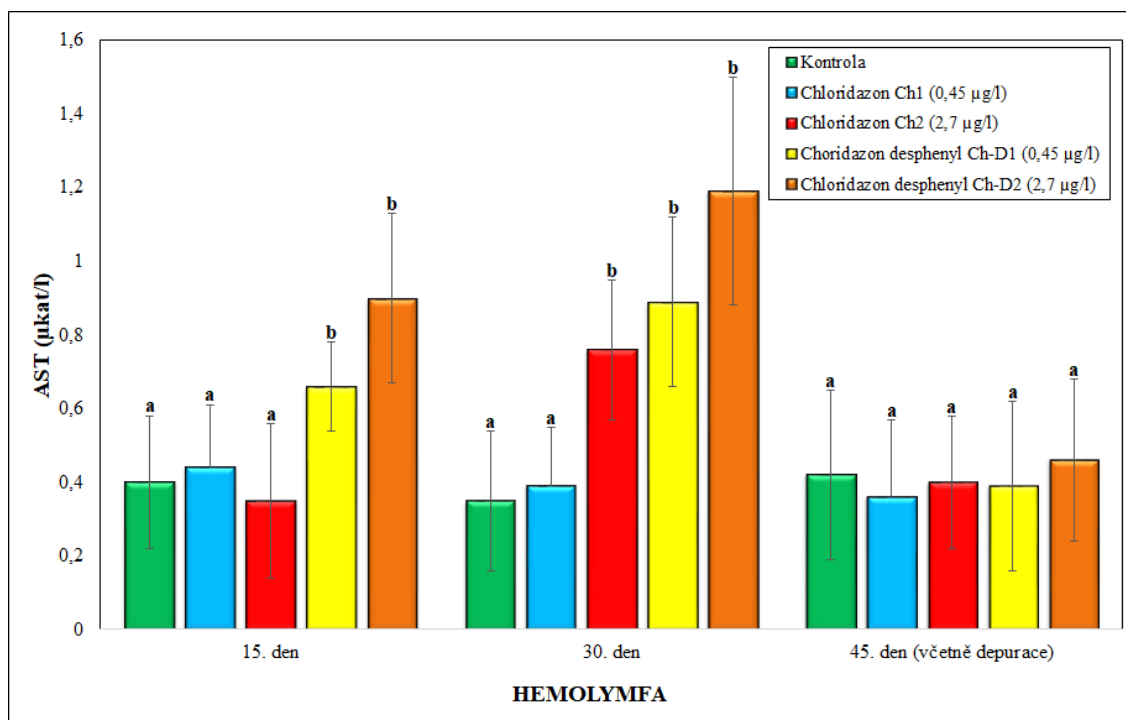
Chloridazon v koncentraci 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch2) způsobil signifikantní ($P<0,01$) zvýšení aktivity ALT ve srovnání s kontrolou po 30ti denní expozici. Také chloridazon desphenyl v obou testovaných koncentracích (0,45 $\mu\text{g/l}$ – Ch-D1 a 2,7 $\mu\text{g/l}$ – Ch-D2) vyvolal signifikantní ($P<0,01$) zvýšení aktivity ALT po 15 a 30 dnech expozice, ve srovnání s kontrolou (graf č. 6).



Graf č .6: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na aktivitu alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.2.4. Aspartát aminotransferáza (AST)

Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na aktivitu AST byl obdobný jako v případě ALT. I v tomto případě chloridazon v koncentraci 2,7 µg/l (Ch2) způsobil signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení aktivity AST ve srovnání s kontrolou po 30ti denní expozici. Chloridazon desphenyl v obou testovaných koncentracích (0,45 µg/l – Ch-D1 a 2,7 µg/l – Ch-D2) vyvolal signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení aktivity AST po 15 a 30 dnech expozice, ve srovnání s kontrolou (graf č. 7).



Graf č. 7: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na aktivitu aspartát aminotransferázy (AST) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.2.5. Laktát dehydrogenáza (LDH)

Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na aktivitu LDH v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

4.2.6. Celkové bílkoviny (TP)

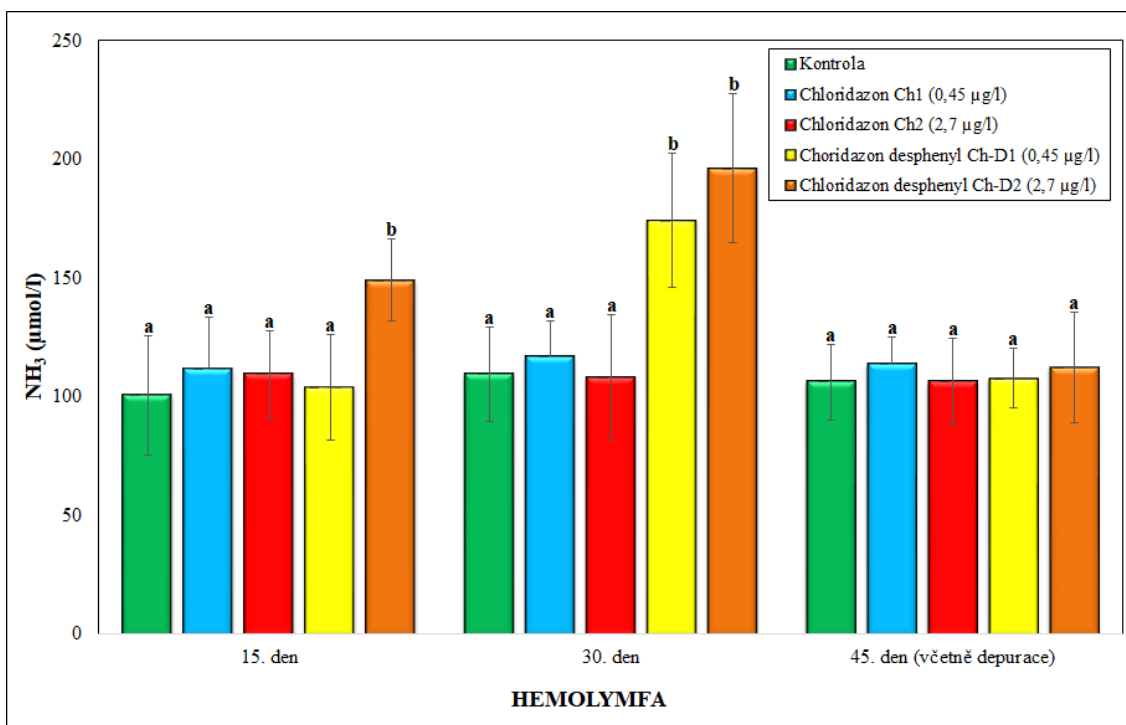
Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na hodnotu TP v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

4.2.7. Triglyceridy (TAG)

Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na hodnotu TAG v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

4.2.8. Amoniak (NH₃)

V případě NH₃ došlo k signifikantnímu ($P < 0,01$) zvýšení hladiny u chloridazon desphenylu v koncentraci 0,45 µg/l (Ch-D1) po 30 dnech expozice a v koncentraci 2,7 µg/l (Ch-D2) po 15 a 30 dnech expozice, ve srovnání s kontrolou (graf č. 8).



Graf č. 8: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu amoniaku (NH₃) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± SD, N=9.

4.2.9. Kreatinin (CREA)

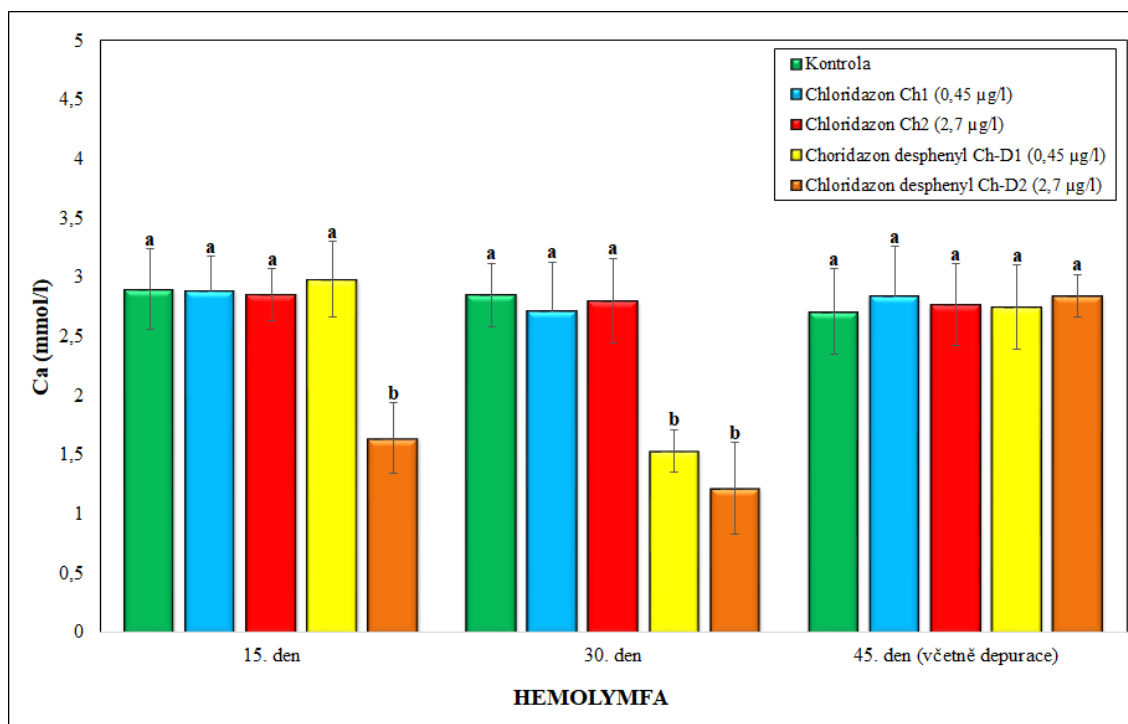
Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na aktivitu CREA v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

4.2.10. Alkalická fosfatáza (ALP)

Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na aktivitu ALP v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

4.2.11. Vápník (Ca)

Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu Ca byl obdobný jako v případě amoniaku. Zde došlo k signifikantnímu ($P < 0,01$) snížení hladiny Ca u chloridazon desphenylu v koncentraci 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D1) po 30 dnech expozice a v koncentraci 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D2) po 15 a 30 dnech expozice, ve srovnání s kontrolou (graf č. 9).



Graf č. 9: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu vápníku (Ca) v hemolymfě raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.2.12. Anorganický fosfát (PHOS)

Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla v žádné z testovaných skupin signifikantní vliv na hladinu PHOS v hemolymfě raka signálního (tab. č. 2).

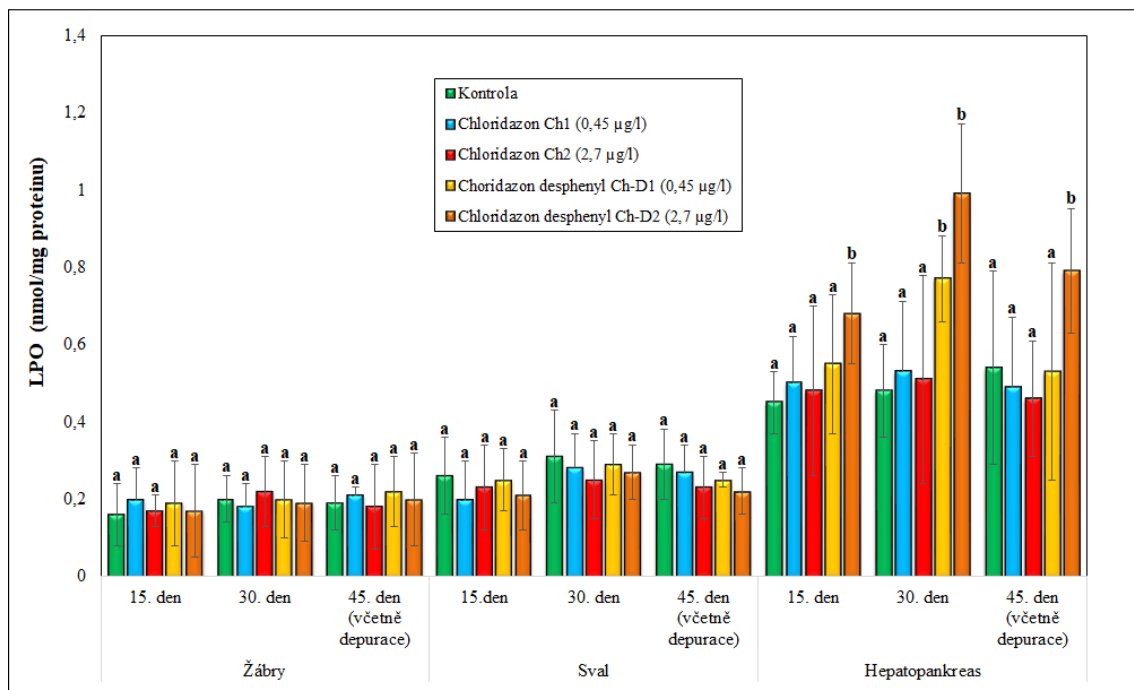
Tabulka č. 2 Biochemické parametry hemolymfy raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) bez signifikantní změny po chronické expozici chloridazonem (Ch) a jeho metabolitem chloridazon desphenylem (Ch-D). Hodnoty v tabulce uvádějí průměr ± SD, N = 9. Horní indexy a indikují statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami skupin během stejné doby experimentu (15, 30 a 45 dní):

Parametr	Doba expozice (dny)	Testované skupiny				
		Kontrola	Ch1 (0,45 µg/l)	Ch2 (2,7 µg/l)	Ch-D1 (0,45 µg/l)	Ch-D2 (2,7 µg/l)
LDH (µkat/l)	15	4,22 ± 1,75 ^a	4,55 ± 1,83 ^a	4,35 ± 1,69 ^a	4,42 ± 1,79 ^a	4,60 ± 1,65 ^a
	30	4,56 ± 1,87 ^a	4,61 ± 1,56 ^a	4,65 ± 1,46 ^a	4,66 ± 1,86 ^a	4,55 ± 1,44 ^a
	45 (čistá voda)	3,99 ± 1,65 ^a	3,88 ± 1,33 ^a	4,01 ± 1,53 ^a	3,91 ± 1,93 ^a	3,77 ± 1,49 ^a
TP (g/l)	15	20,11 ± 8,18 ^a	22,33 ± 12,21 ^a	21,05 ± 11,25 ^a	20,55 ± 12,05 ^a	22,55 ± 9,34 ^a
	30	22,60 ± 9,87 ^a	20,33 ± 7,25 ^a	23,17 ± 12,08 ^a	21,18 ± 13,08 ^a	20,98 ± 8,35 ^a
	45 (čistá voda)	21,55 ± 8,55 ^a	24,21 ± 6,38 ^a	22,80 ± 9,55 ^a	23,21 ± 12,03 ^a	20,55 ± 6,06 ^a
TAG (mmol/l)	15	0,18 ± 0,11 ^a	0,16 ± 0,13 ^a	0,20 ± 0,13 ^a	0,19 ± 0,15 ^a	0,20 ± 0,16 ^a
	30	0,20 ± 0,09 ^a	0,18 ± 0,09 ^a	0,20 ± 0,10 ^a	0,21 ± 0,14 ^a	0,21 ± 0,14 ^a
	45 (čistá voda)	0,22 ± 0,13 ^a	0,23 ± 0,15 ^a	0,20 ± 0,11 ^a	0,20 ± 0,17 ^a	0,22 ± 0,16 ^a
CREA (µmol/l)	15	5,61 ± 1,84 ^a	5,69 ± 1,38 ^a	5,80 ± 1,64 ^a	5,78 ± 1,63 ^a	5,62 ± 1,77 ^a
	30	5,92 ± 1,70 ^a	5,86 ± 1,68 ^a	5,79 ± 1,81 ^a	5,89 ± 1,65 ^a	5,84 ± 1,67 ^a
	45 (čistá voda)	5,72 ± 1,78 ^a	5,64 ± 1,81 ^a	5,80 ± 1,50 ^a	5,67 ± 1,26 ^a	5,79 ± 1,54 ^a
ALP (µkat/l)	15	0,25 ± 0,15 ^a	0,20 ± 0,17 ^a	0,22 ± 0,15 ^a	0,21 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,15 ^a
	30	0,29 ± 0,12 ^a	0,28 ± 0,16 ^a	0,25 ± 0,13 ^a	0,26 ± 0,14 ^a	0,20 ± 0,13 ^a
	45 (čistá voda)	0,23 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,12 ^a	0,22 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,10 ^a	0,20 ± 0,10 ^a
PHOS (mmol/l)	15	0,36 ± 0,15 ^a	0,33 ± 0,17 ^a	0,35 ± 0,16 ^a	0,34 ± 0,14 ^a	0,34 ± 0,18 ^a
	30	0,30 ± 0,09 ^a	0,27 ± 0,18 ^a	0,33 ± 0,13 ^a	0,38 ± 0,23 ^a	0,33 ± 0,13 ^a
	45 (čistá voda)	0,26 ± 0,12 ^a	0,25 ± 0,18 ^a	0,27 ± 0,17 ^a	0,23 ± 0,16 ^a	0,28 ± 0,17 ^a

4.3. Biomarker oxidativního stresu a antioxidační biomarkery

4.3.1. Lipidní peroxidace (LPO)

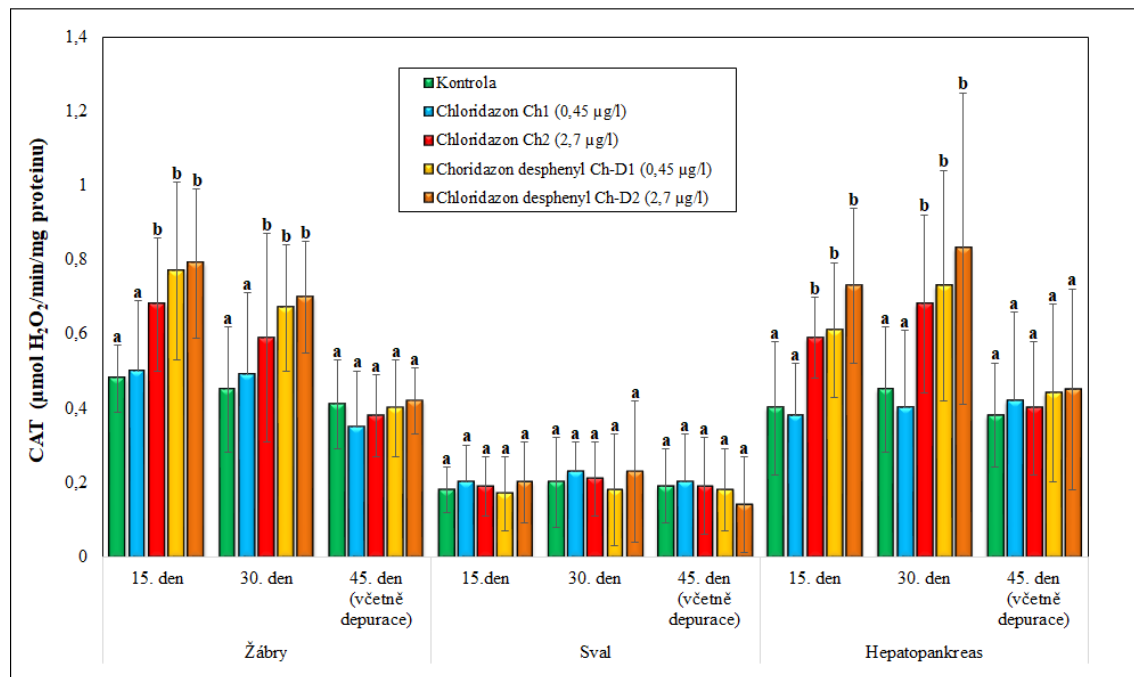
Vliv herbicidu chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu LPO je uveden v grafu č. 10. U chloridazon desphenylu v koncentraci 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D1) bylo prokázáno signifikantní ($P<0,01$) zvýšení hladiny LPO po 30denní expozici v hepatopankreatu ve srovnání s kontrolou. Také u koncentrace chloridazonu desphenylu 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D2) došlo k signifikantnímu ($P<0,01$) zvýšení hladiny LPO v hepatopankreatu po 15, 30 dnech expozice a i 15 dnech depurace, ve srovnání s kontrolou.



Graf č. 10: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu lipidní peroxidace (LPO) v jednotlivých tkáních raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P<0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.3.2. Enzymatická aktivita katalázy (CAT)

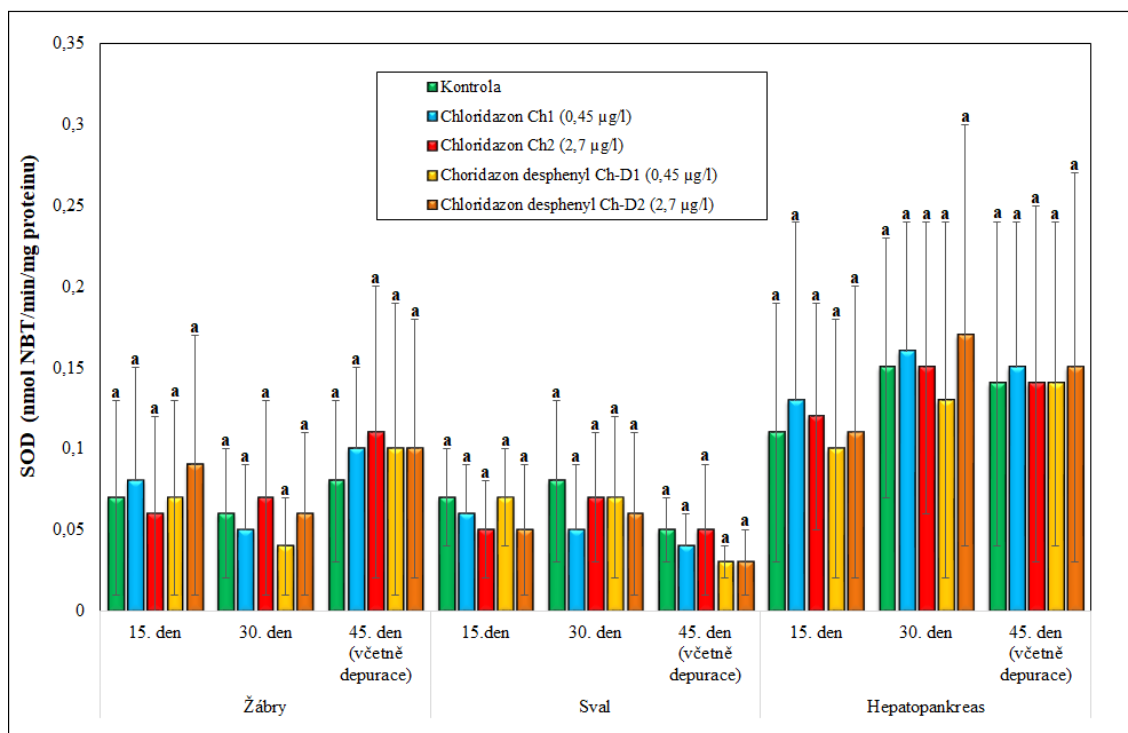
Expozice chloridazonu v koncentraci 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch2) a jeho metabolitu chloridazon desphenylu v koncentracích 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D1) a 2,7 $\mu\text{g/l}$ (Ch-D2) způsobila signifikantně ($P < 0,01$) vyšší aktivitu CAT v hepatopankreatu a žábrech po 15ti- a 30tidenní expozici ve srovnání s kontrolou (graf č. 11). Chloridazon v koncentraci 0,45 $\mu\text{g/l}$ (Ch1) neměl vliv na aktivitu CAT v tkáních raka signálního.



Graf č. 11: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na enzymatickou aktivitu katalázy (CAT) v jednotlivých tkáních raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.3.3. Enzymatická aktivita superoxid dismutázy (SOD)

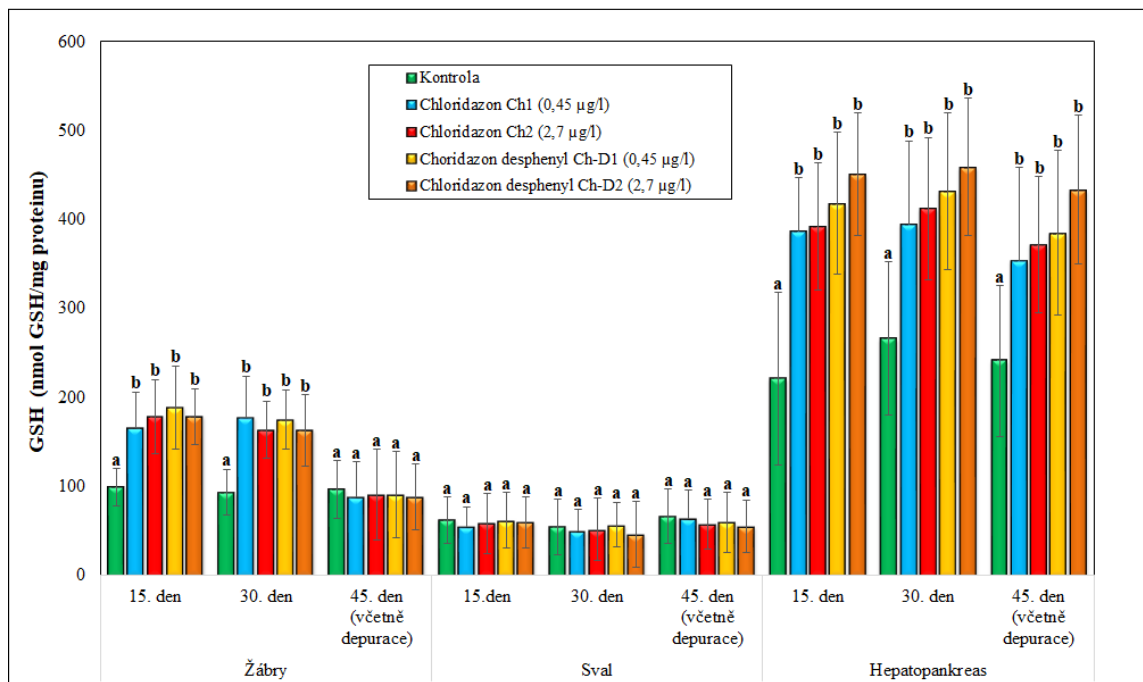
Expozice chloridazonu a chloridazon desphenylu ve všech testovaných koncentracích neměla vliv na aktivitu SOD v tkáních raka signálního. Výsledky vlivu chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na enzymatickou aktivitu SOD jsou znázorněny na grafu č. 12.



Graf č. 12: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na enzymatickou aktivitu superoxid dismutázy (SOD) v jednotlivých tkáních raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a charakterizují shodu hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.3.4. Stanovení redukováného glutathionu (GSH)

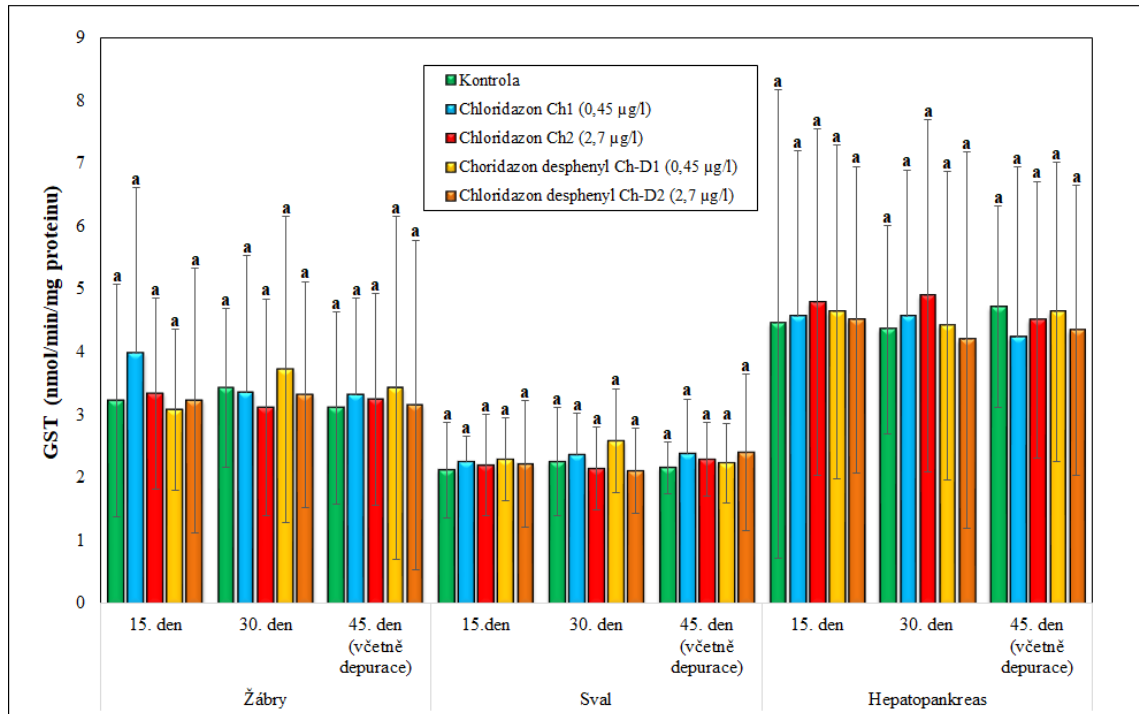
Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu GSH v tkáních raka signálního je znázorněn na grafu č. 13. Všechny experimentální skupiny (Ch1, Ch2, Ch-D1, Ch-D2) způsobily signifikantně ($P < 0,01$) vyšší hladiny redukováného glutathionu v hepatopankreatu po 15 a 30 dnech expozice, včetně zvýšení hladiny GSH i po 15ti denní depuraci ve srovnání s kontrolou. Také v žaberní tkáni došlo ve srovnání s kontrolou k signifikantnímu ($P < 0,01$) zvýšení hladiny GSH napříč všemi testovanými skupinami po 15 a 30 dnech expozice.



Graf č. 13: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na hladinu redukováného glutathionu (GSH) v jednotlivých tkáních raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a, b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

4.3.5. Enzymatická aktivita glutathion S-transferázy (GST)

Expozice chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu neměla signifikantní vliv na aktivitu GST v tkáních raka signálního ve srovnání s kontrolou (graf č. 14).



Graf č. 14: Vliv chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na enzymatickou aktivitu glutathion S-transferázy (GST) v jednotlivých tkáních raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) během experimentu. Indexy a charakterizují shodu hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=9$.

5. DISKUZE

Raci, jakožto zástupci řádu Decapoda, patří mezi tzv. klíčové druhy hrající významnou roli ve vodním ekosystému a představují vynikající model pro ekotoxikologické studie prováděné s cílem objasnit vliv xenobiotik na necílové vodní organismy (Vogt, 2008; Stará a kol., 2018; Velíšek a kol., 2018). Obecně jsou raci považováni za velice citlivé indikátory znečištění vody (Kuklina a kol., 2013; Císař a kol., 2018). Vzhledem ke své velikosti, dobré pozorovatelnosti a snadné odlišitelnosti od ostatních živočichů jsou vhodnou alternativou k testům na rybách při posuzování toxicity (Kozák a kol., 2013; Rodriques a Pardal, 2014). Předmětem této diplomové práce bylo posouzení vlivu herbicidu chloridazonu a jeho metabolitu chloridazon desphenylu na dospělé jedince raka signálního.

Chloridazon je herbicid v půdě s nízkou až vysokou persistencí (v závislosti na podmínkách), s degradací charakterizovanou rychlou mineralizací fenylové skupiny na CO₂ a pomalou až střední mineralizací pyridazonové skupiny. K environmentální degradaci chloridazonu v půdě a ve vodě může přispět také fotolýza (Tomlin, 2006). Fotolytický poločas rozpadu chloridazonu v půdě je 69 dní, zatímco běžný poločas rozpadu této látky v aerobní půdě je v rozmezí 90-152 dnů (EPA, 2005). Za anaerobních podmínek je poté poločas rozpadu až 607 dní (EPA, 2005). V půdě může dojít u chloridazonu k mikrobiální degradaci na dva hlavní metabolity, chloridazon desphenyl a chloridazon methyl-desphenyl (Dechene a kol., 2014). Vlastnostmi chloridazonu se zabýval například Suwalsky a kol. (1998), Buttiglieri a kol. (2009) nebo Kucharski a kol. (2012).

Studie chronické expozice herbicidů nebo jiných znečišťujících látek často využívají sofistikovaná pozorování, jako například právě zde použité pozorovatelné změny ve vzorcích chování (Wolf a Moore, 2002). U chloridazonu ani u jeho metabolitu chloridazon desphenylu nebyly v žádné testované koncentraci pozorovány změny chování. I přes toto zjištění ale nelze plně vyloučit vliv těchto látek na změny v chování po delší expozici, a to z důvodu poločasu rozpadu těchto látek ve vodním prostředí v řádu stovek dní (Schuhmann a kol., 2016; Chiaia-Hernandez a kol., 2017). Jak uvádí Roberts a Croucher (2007), chloridazon a jeho metabolit chloridazon desphenyl dlouhodobě přetrvávají ve vodním prostředí a je možné zachytit je ve vodním prostředí v průběhu celého roku i přes skutečnost, že jejich vlastní aplikace probíhá jednou až třikrát ročně.

Toto tvrzení podporuje i fakt, že biochemický profil i antioxidantní enzymy raků byly ovlivněny.

Biochemický profil hemolymfy vodních organismů, včetně raků, poskytuje důležité informace o fyziologickém stavu organismu (Velíšek a kol., 2013b; Stará a kol., 2019a,b). Chloridazon v testované koncentraci Ch1 (0,45 µg/l) nevykazoval žádný účinek na sledované parametry biochemického profilu hemolymfy. Naproti tomu chloridazon v testované koncentraci 2,7 µg/l (Ch2) způsobil signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení hladiny glukózy, laktátu, alanin aminotransferázy a aspartát aminotransferázy. Metabolit chloridazon desphenyl způsobil v obou testovaných koncentracích 0,45 µg/l (Ch-D1) a 2,7 µg/l (Ch-D2) signifikantní ($P < 0,01$) změny v hladinách glukózy, laktátu, alanin aminotransferázy, aspartát aminotransferázy, amoniaku a vápníku.

Glukóza patří mezi významné zdroje energie pro organismus a její zvýšení je vnímáno jako stresový indikátor (Faggio a kol., 2016). Zvýšení hladiny laktátu způsobuje tkáňovou hypoxii a laktátovou acidózu (Philp a kol., 2005). Změny hladiny glukózy a laktátu po expozici různých pesticidů uvádějí i ostatní autoři. Například Benli (2015) a Chang a kol. (2006) popisují zvýšení laktátu po expozici etofenproxu u raka bahenního (*Astacus leptodactylus*) a trichlorfonu u krevety *Macrobrachium rosenbergii*. Také Stará a kol. (2019b) uvádí zvýšení hladiny LACT po expozici herbicidem s-metolachlorem a jeho metabolitem metolachlorem OA u raků mramorovaných (*Procambarus virginalis*). Zvýšení hladiny GLU a LACT zjistila Stará a kol. (2018) u raka ničivého (*Cherax destructor*) po expozici atrazinu.

Aktivita ALT a AST v hemolymfě reflektuje uvolňování enzymů důležitých pro buněčný metabolismus dusíku a jaterní glukoneogenezi (Banaee a kol., 2014). Změny aktivity aminotransferáz po expozici různých pesticidů uvádějí i ostatní autoři. Také Stará a kol. (2019b) zjistila změny aktivity AST a ALT po expozici herbicidem s-metolachlorem a jeho metabolitem metolachlorem OA u raků mramorovaných.

Amoniak je indikátorem metabolického poškození Krebsova cyklu nebo selhání jater ve vodních organismech (Ip a Chew, 2010). Zvýšení koncentrace amoniaku u raka ničivého po expozici atrazinu popisuje také ve své studii Stará a kol. (2018). Snížení aktivity jaterních enzymů ALT, AST a LDH popisuje Banaee a kol. (2019) u raků bahenních po expozici chlorpyrifosu a glyfosátu.

Vápník je obsažen v tkáních a plazmě a je nezbytný pro správnou tvorbu kostí u obratlovců. Je nezbytný pro reprodukční proces, mitochondriální funkci a hraje důležitou roli v osmoregulaci (Faggio a kol., 2014; Niksirat a kol., 2015; Niksirat a Kouba, 2016). Obsah vápníku je do značné míry ovlivněn u raků cyklem svlékání (Kozák a kol., 2013). Nicméně na začátku pokusu byli testovaní jedinci raka signálního přidělení do jednotlivých skupin náhodně a nebyl v průběhu testu pozorován vrchol svlékání. Proto předpokládáme, že změny v hladinách vápníku skutečně souvisely s expozicí testovaných látek. Oporou tomuto tvrzení může být práce Staré a kol. (2016), ve které byly pozorovány signifikantní změny v hladině vápníku v hemolymfě u raků červených (*Procambarus clarkii*) po expozici triazinového herbicidu terbuthylazin-desethylu.

Změny v hladinách biomarkerů oxidačního stresu mohou indikovat ovlivnění homeostázy buněk a nadprodukcí ROS (reaktivní formy kyslíku), jako jsou H₂O₂, anorganický superoxid (O²⁻) a hydroxylové radikály (OH) (Valavanidis a kol., 2006). Za běžných okolností existuje u zdravých aerobních organismů určitá rovnováha mezi produkcí ROS a antioxidačními mechanismy, které chrání buňky právě před výše zmíněnou nadprodukcí ROS (Slaninová a kol., 2009). U lipidní peroxidace (LPO) bylo pozorováno zvýšení hladiny v hepatopankreatu po expozici chloridazon desphenylem v koncentraci 0,45 µg/l (Ch-D1) 30. den expozice a v koncentraci 2,7 µg/l (Ch-D2) po dobu celého experimentu. Toto zjištění může naznačovat zvýšenou produkci ROS v hepatopankreatu.

Aktivita CAT i hladina GSH jsou důležité antioxidační biomarkery po expozici pesticidy, kdy jejich zvýšení je adaptivním mechanismem během probíhajícího oxidačního stresu (Al-Ghanim a kol., 2020). Jak uvádí Van der Oost a kol. (2003), CAT usnadňuje odstranění H₂O₂, který je metabolizován na kyslík a vodu. V naší studii expozice chloridazonu v koncentraci 2,7 µg/l (Ch2) a chloridazon desphenylu v obou koncentracích (Ch-D1, Ch-D2) vedla k zvýšení aktivity CAT v hepatopankreatu i žábrech 15. a 30. den expozice. Také u GSH došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny v žábrech (15. a 30. den expozice) i hepatopankreatu (15., 30. i 45. den experimentu) ve všech testovaných skupinách (Ch1, Ch2, Ch-D1, Ch-D2). Antioxidační enzymové (SOD, CAT, GST) a neenzymové (GSH) obranné systémy odstraňují přebytečné ROS (Slaninová a kol., 2009).

Právě zvýšení aktivity CAT během našeho experimentu v žábrech a hepatopankreatu během expozice Ch2 a obou koncentrací Ch-D naznačuje zvýšenou hladinu antioxidantů, které působí proti dopadu ROS. Schopnost hepatopankreatu rychle se zotavit z expozice chloridazonu i chloridazon desphenylu naznačuje nízký rozsah poškození tkáně a reverzibilitu.

Glutathion je přítomen v buňkách jako GSH a GSSG (gluthion disulfid), které jsou v rovnováze. Hladina GSH může sloužit jako marker oxidativního stresu (Di Giulio a Meyer, 2008). Slaninová a kol. (2009) popisuje zvýšené hladiny GSH v tkáních jako výsledek dlouhodobé expozice oxidantů, naopak nízké hladiny GSH mohou být výsledkem krátkodobých expozic. V našem případě u SOD a GST nebyla pozorována žádná významná změna v jejich hladinách v průběhu testování. Změny v hladinách antioxidačních biomarkerů jako hlavní důsledky expozice raků pesticidy, což reflektuje akumulaci ROS vedoucí k oxidačnímu stresu a poškození buněk, popisují Banaee a kol. (2020), Uckun a Oz (2020) nebo Stará a kol. (2016, 2019b).

6. ZÁVĚR

Předmětem této diplomové práce bylo posouzení vlivu herbicidu chloridazonu a jeho hlavního metabolitu chloridazon desphenylu na dospělé jedince raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Vlastní experiment probíhal formou dlouhodobého chronického testu toxicity a vliv testovaných látek byl posuzován na základě vybraných parametrů (analýza chování, biochemický profil hemolymfy, oxidativní stres a antioxidační biomarkery). Sledován byl vliv dvou koncentrací chloridazonu (Ch1 - 0,45 µg/l; Ch2 - 2,7 µg/l) a dvou koncentrací chloridazon desphenylu (Ch-D1 – 0,45 µg/l; Ch-D2 – 2,7 µg/l), v porovnání s kontrolní skupinou. Doba experimentu byla 45 dní, kdy prvních 30 dní byli raci vystaveni testovaným látkám a zbylých 15 dnů byla fáze depurace (v čisté vodě bez testovaných látek). Během testu byly provedeny tři odběry vzorků a to 15. den expozice, 30. den expozice (konec expozice testovaným látkám) a na konci 15denní depurace (45. den). Celkem bylo v testu použito 210 adultních jedinců raka signálního.

Výsledky studie neprokázaly vliv herbicidu chloridazonu ani jeho metabolitu chloridazon desphenylu na sledované parametry chování raků. Naproti tomu u biochemického profilu hemolymfy byl signifikantně ($P < 0,01$) prokázán vliv testovaných látek u GLU, LACT, ALT, AST, NH₃ a Ca. Také část testovaných ukazatelů oxidativního stresu (LPO) a antioxidačních biomarkerů (CAT a GSH) prokázala signifikantní změny v žábrech a hepatopankreatu po expozici chloridazonem, stejně tak jako jeho metabolitem. Některé změny bylo možné sledovat i po depuračním období. Rovněž bylo pozorováno, že metabolit chloridazon desphenyl vykazuje výraznější účinky na fyziologii dospělých signálních raků než jeho mateřská látka chloridazon.

Nastavení koncentrací v testovaných skupinách vycházelo z environmentálně relativních hodnot. Zjištění, že i tyto koncentrace vykazují negativní vliv na necílové vodní organismy, naznačuje velikou opatrnost při jejich používání.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abrahamsson, S.A.A., 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos* 22, 373-380.
- 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 and Air Pollution* 212, 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase invitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Al-Ghanim, K.A., Mahboob, S., Vijayaraghavan, P., Al-Misned, F.A., Kim, Y.O., Kim, H.J., 2020. Sub-lethal effect of synthetic pyrethroid pesticide on metabolic enzymes and protein profile of non-target Zebra fish, *Danio rerio*. *Saudi Journal of Biological Science* 27, 441-447.
- Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N., Garanzini, D.S., 2014. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenpropathrin. *International Journal of Aquatic Biology* 2, 58-68.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H., Fereidouni, M.S., 2019. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology* 222, 145-155.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M., 2020. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 29, 1500-1515.
- Beitz, H., Schmidt, H., Herzel, F., 1994. Occurrence, toxicological and ecotoxicological significance of pesticides in groundwater and surface water. In: Börner H. (Eds) *Pesticides in ground and surface water. Chemistry of Plant Protection*, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-56.
- Belanger, R.M., Peters, T.J., Sabhapathy, G.S., Khan, S., Katta, J., Abraham, N.K., 2015. Atrazine exposure affects the ability of crayfish (*Orconectes rusticus*) to localize a food odor source. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 68, 636-645.
- Benli, A.C.K., 2015. The influence of etofenprox on narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823): Acute toxicity and sublethal effects on histology, hemolymph parameters, and total hemocyte counts. *Environmental Toxicology* 30, 887-894.

- Bernská úmluva, Úmluva o ochraně evropské fauny a flóry a přírodních stanovišť (Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats), 2012. Dostupné z: <https://www.coe.int/en/web/bern-convention>, (navštívené online 26. 2. 2020).
- Besch, W., 1977. Bioteste in der limnischen toxikologie. Studien zum Gewässerschutz 2, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Institut für Wasser und Abfallwirtschaft, Karlsruhe, Germany, 217 pp.
- BioLib.cz (Biological Library). Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*). Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id32917/> (navštíveno online 12.02.2020).
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bubb, D.H., Lucas, M.C., Thom, T.J., 2004. Movement and dispersal of the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in upland rivers. *Freshwater Biology* 49, 357-368.
- Buřič, M., Kouba, A., Máchová, J., Mahovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *International Journal of Environmental Science and Technology* 10, 607-610.
- Buttiglieri, G., Peschka, M., Frömel, T., Müller, J., Malpei, F., Seel, P., Knepper, T.P., 2009. Environmental occurrence and degradation of the herbicide n-chloridazon. *Water Research* 43, 2865-2873.
- Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., Eisenreich, S.J., Viaroli, P., Zaldívar, J.M., 2007. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69, 1625-1637.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 16 pp.
- Casida, J.E., 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives* 34, 189-202.
- 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. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97, 177-181.
- Císař, P., Saberioon, M., Kozák, P., Pautsina, A., 2018. Fully contactless system for crayfish heartbeat monitoring: undisturbed crayfish as bio-indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical* 255, 29-34.

- Crandall, K.A., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae* – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295-301.
- Cremlyn, R.J.W., 1978. Pesticides: Preparation and mode of action. Wiley, Chichester, UK, 240 pp.
- Crespín, M.A., Gallego, M., Valcárcel, M., González, J.L., 2001. Study of the degradation of the herbicides 2, 4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil. *Environmental Science and Technology* 35, 4265-4270.
- Cuevas, M.V., Cox, L., Calderon, M.J., Hermosin, M.C., Fernandez, J.E., 2008. Chloridazon and lenacil dissipation in a clayey soil of the Guadalquivir river marshes (southwest Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 124, 245-251.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2020a. Pasport látky chloridazon. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=3287545&mf=0>, (navštívené online 06. 02. 2020).
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2020b. Pasport látky chloridazon desphenyl. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=4635828&mf=0>, (navštívené online 08. 02. 2020).
- Daniels, J.L., Olshan, A.F., Savitz, D.A., 1997. Pesticides and childhood cancers. *Environmental Health Perspectives* 105, 1068-1077.
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 21, 1-109.
- Dechene, A., Rosendahl, I., Laabs, V., Amelung, W., 2014. Sorption of polar herbicides and herbicide metabolites by biochar-amended soil. *Chemosphere* 109, 180-186.
- Dexter, A.G., Zollinger, R.K., 2001. Weed control guide for sugarbeet. *Sugarbeet Research And Extension Reports* 32, 3-22.
- Di Giulio, R.T., Meyer, J.N., 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., (Eds), *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 273-324.
- Dorn, N.J., Wojdak, J.M., 2004. The role of omnivorous crayfish in littoral communities. *Oecologia* 140, 150-159.

- EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Conclusion on the peer review of chloridazon. Scientific Report 108, 1-82.
- Ellmann, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl group. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70-79.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2005. Reregistration Eligibility Decision (RED) Document for Pyrazon. U.S. EPA Archive Document, Washington, D.C.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Analytical Biochemistry 232, 243-248.
- Faggio, C., Piccione, G., Marafioti, S., Arfuso, F., Fortino, G., Fazio, F., 2014. Metabolic response to monthly variations of *Sparus aurata* reared in Mediterranean on-shore tanks. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 14, 567-574.
- Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., Felice, M.R., 2016. Cytotoxicity, haemolympathic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 180, 258-265.
- Feidieker, D., Kämpfer, P., Dott, W., 1995. Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic compounds and HCH in the subsurface environment. Journal of Contaminant Hydrology 19, 145-169.
- Flint, R.W., 1975. Growth in a population of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* from subalpine lacustrine environment. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 32, 2433-2440.
- Fomičev, N.I., 1986. Rečnoj rak. Metody issledovania. Izd. Nauka, Leningrad.
- Füreder, L., Reynolds, J.D., 2003. Is *Austropotamobius pallipes* a good bioindicator? Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 370/371, 157-163.
- Fusek, J., Měrka, V., 2003. Nebezpečné herbicidy. Vojenské zdravotnické listy 6, 262-272.
- Gangadhara, K.P., Kunhi, A.A.M., 2000. Protection of tomato seed germination from the inhibitory effect of 2, 4, 5-Trichlorophenoxyacetic acid by inoculation of soil with *Burkholderia cepacia* AC1100. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 4314-4319.
- Gilden, R.C., Huffling, K., Sattler, B., 2010. Pesticides and health risks. Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing 39, 103-110.
- Habig, W.M., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biology and Chemistry 249, 7130-7139.

- Hager, J., 1996. Edelkrebse. Leopold Stocker Verlag, Graz, 128 pp.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Hayes, A.W., 2007. Principles and methods of toxicology. CRC Press, Boca Raton, USA, 2296 pp.
- Hayes, W.Jr., 1991. Benefits from disease control. In: Hayes, W.Jr., Laws, E.R.Jr., (Eds), Handbook of Pesticide Toxicology, vol. 1. San Diego, Academic Press, Inc., pp. 10-13.
- Hobbs, H.H.Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: *Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae*). Smithsonian Contributions to Zoology 480, 1-236.
- Holdich, D.M., Reeve, I.D., 1988. Functional morphology and anatomy. In: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds), Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation. Croom Helm Ltd., London, pp. 11-51.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds), Atlas of Crayfish in Europe. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Horák, J., Linhart, I., Klusoň, P., 2004. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. VŠCHT v Praze, 1. vyd. Praha, 187 s. ISBN 80-7080-548-X.
- Hudson, R.H., Tucker, R.K., Haegle, M.A., 1984. Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. USDI Fish and Wildlife Service Resource, Washington, USA, 136 pp.
- Chang, C.C., Lee, P.P., Hsu, J.P., Yeh, S.P., Cheng, W., 2006. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. Aquaculture 253, 653-666.
- Chiaia-Hernandez, A.C., Keller, A., Wächter, D., Steinlin, C., Camenzuli, L., Hollender, J., Krauss, M., 2017. Long-term persistence of pesticides and TPs in archived agricultural soil samples and comparison with pesticide application. Environmental Science and Technology 51, 10642-10651.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1974. Some organochlorine pesticides; DDT and associated substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 5, 83-124.
- Ip, Y.K., Chew, S.F., 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. Frontiers in Physiology – Aquatic Physiology 1, 134.

- Johnsson, A., 1995. Life history differences between crayfish *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in embryonic and juvenile development, laboratory experiences. *Freshwater Crayfish* 8, 170-178.
- Kanta, J., 2007. Porovnání postembryonálního vývoje původních a nepůvodních druhů raků. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 104 s.
- Karpouzas, D.G., Walker, A., 2000. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil biology and Biochemistry* 32, 1753-1762.
- Kiely, T., Donaldson, D., Grube, A., 2004. Pesticide industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Kirjavainen, J., Westman, K., 1995. Development of an introduced signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) population in the small Lake Karisjarvi in central Finland. *Freshwater Crayfish* 10, 140-150.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. Ekotoxikologie pro chemiky. VŠCHT, Praha, 199 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. FROV JU Vodňany, metodika č. 135, 54 s.
- 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. *Aquaculture* 350, 71-74.
- Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413, 05.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Policar, T., 2013. *Biologie a chov raků*, 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 418 s.
- Kozák, P., Füreder, L., Kouba, A., Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. Current conservation strategies for European crayfish. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 01.
- Kucharski, M., Sadowski, J., Domaradzki, K., 2012. Degradation rate of chloridazon in soil as influenced by adjuvants. *Journal of Plant Protection Research* 52, 114-117.
- Kuklina, I., Kouba, A., Kozák, P., 2013. Real-time monitoring of water quality using fish and crayfish as bio-indicators: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 5043-5053.

- Landis, W.G., Yu, M.H., 2003. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA, 512 pp.
- Lewis, S.D., Horton, H.F., 1996. Life history and population dynamics of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in Lake Billy Chinook, Oregon. *Freshwater Crayfish* 11, 34-53.
- Lidová, J., Buřič, M., Kouba, A., Velíšek, J., 2019. Acute toxicity of two pyrethroid insecticides for five non-indigenous crayfish species in Europe. *Veterinární Medicína* 64, 125-133.
- Mason, J.C., 1963. Life history and production of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus trowbridgii* (Stimson), in a small woodland stream. MSc. work. Oregon State University, Corvallis, USA, 204 pp.
- McGriff, D., 1983. Growth, maturity, and fecundity of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, from the Sacramento-San Joaquin Delta. *California Fish and Game* 69, 227-242.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A., 1997. Compendium of chemical terminology. Blackwell Science Inc., Oxford, UK, 464 pp.
- Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., 1997. Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 23, 207-215.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3, 33-63.
- Niksirat, H., James, P., Andersson, L., Kouba, A., Kozák, P., 2015. Label-free protein quantification in freshly ejaculated versus post-mating spermatophores of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Proteomics* 123, 70-77.
- Niksirat, H., Kouba, A., 2016. Subcellular localization of calcium deposits in the noble crayfish *Astacus astacus* spermatophore: implications for post-mating spermatophore hardening and spermatozoon maturation. *Journal of Morphology* 277, 445-452.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2000. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, France, 81 s.
- Patoka, J., Buřič, M., Bláha, M., Kouba, A., Ďuriš, Z., 2017. České názvy živočichů VIII.: Desetinožci (Decapoda), infrařád rakotvární (Astacidea). Národní muzeum (zoologické oddělení), Praha, 86 s.
- PED (Pesticide Ecotoxicity Database), 2000. Office of pesticide programs, environmental fate and effects division. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.

- Petrusek, A., Petrusková, T., 2007. Invasive American crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Decapoda: *Astacidae*) in the Morava River (Slovakia). *Biologia*, Bratislava 62, 356-359.
- Philp, A., Macdonald, A.L., Watt, P.W., 2005. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. *Journal of Experimental Biology* 208, 4561-4575.
- Pleasant, B., 2010. Systemic pesticides: Chemicals you can't wash off. *Mother Earth News*. Dostupné z: <https://www.motherearthnews.com/nature-and-environment/environmental-policy/systemic-pesticides-zmaz10onzraw>, (navštívené online 16. 2. 2020).
- Plumlee, K.H., 2003. *Clinical veterinary toxicology*. Mosby, Inc., St. Louis, USA, 477 pp.
- Polícar, T., Kozák, P., 2000. Výskyt raků v ČR. *Bulletin VÚRH Vodňany*, 36, 18-22.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. *European Project CRAYNET*, 47 pp.
- Prokeš, J., 2005. *Základy toxikologie – Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Galén, 1. vyd. Praha, 248 s. ISBN 80-7262- 301-X
- Prousek, J., 2001. *Rizikové vlastnosti látok*. Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, Slovensko, pp. 60-93.
- PubChem, 2020a. Chloridazon, safety and hazards. Dostupné Z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15546#section=Safety-and-Hazards>, (navštíveno online 06.02.2020).
- PubChem, 2020b. Chloridazon desphenyl, safety and hazards. Dostupné Z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/95827#section=Safety-and-Hazards>, (navštíveno online 08.02.2020).
- Reemtsma, T., Alder, L., Banasiak, U., 2013. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1271, 95-104.
- Roberts, M.C., Croucher, L., 2007. *Metabolic pathways of agrochemicals: Part 1: Herbicides and plant growth regulators*. Royal Society of Chemistry, 847 pp.
- Rodrigues, E.T., Pardal, M.A., 2014. Review: the crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environmental International* 70, 158-182.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, UK, 238 pp.

- Sehonová, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Svobodová, Z., 2012. Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. Bulletin VÚRH Vodňany 48, 5-19.
- Schuhmann, A., Gans, O., Weiss, S., Fank, J., Klammler, G., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2016. A long-term lysimeter experiment to investigate the environmental dispersion of the herbicide chloridazon and its metabolites— comparison of lysimeter types. Journal of Soils and Sediments 16, 1032-1045.
- Slaninová, A., Smutná, M., Modrá, H., Svobodová, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. Neuroendocrinology Letters 30, 153-163.
- Směrnice Rady č. 92/43/EEC, o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin. Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the Conservation of Natural Habitats and of Wild Flora and Fauna. OJ L 206, 22.7.1992, P.7. Directive as last amended by Directive 97/62/EC (O.J. L 305, 8.11.1997, p. 42). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195925504001246#bib12>, (navštívené online 26. 2. 2020).
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Patrimoines Naturels, Paris, 64, 187 pp.
- Spitz, R., 1973. Crayfish in Austria, history and actual situation. Freshwater Crayfish 1, 10-14.
- Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2016. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Science of the Total Environment 566/567, 733-740.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2018. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. Chemo-Biological Interactions 291, 95-102.
- Stará, A., Bellinva, R., Velíšek, J., Strouhová, A., Kouba, A., Faggio, C., 2019a. Acute exposure of common yabby (*Cherax destructor*) to the neonicotinoid pesticide. Science of the Total Environment 665, 718-723.
- Stará, A., Kubec, J., Zusková, E., Buřič, M., Faggio, C., Kouba, A., Velíšek, J., 2019b. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). Chemosphere 224, 616-625.
- Suwalsky, M., Benites, M., Villena, F., Norris, B., Quevedo, L., 1998. The organochlorine herbicide chloridazon interacts with cell membranes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 120, 29-35.

- Svärdson, G., 1995. The early history of signal crayfish introduction into Europe. *Freshwater Crayfish* 8, 68-77.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 231 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.), *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2010. *Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb*. Informatorium, Praha, 264 s.
- Štambergová, M., Bádr, V., Ďuriš, Z., 2005. Decapoda (desetinožci). In: Farkač, J., Král, D., Škorpík, M. (Eds), *Červený seznam ohrožených druhů České republiky*. Bezobratlí. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 100-101.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. *Raci v České republice*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 255 s.
- Taylor, C.A., Schuster, G.A., Cooper, J.E., DiStefano, R.J., Eversole, A.G., Hamr, P., Hobbs, H.H., Robison, H.W., Skelton, C.E., Thoma, R.F., 2007. A reassessment of the conservation status of crayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. *Fisheries* 32, 372-389.
- Tomlin, C.D.S., 2006. Chloridazon. In: "The Pesticide Manual". 14th ed. BCPC Publication: Alton-Hampshire, UK, pp. 169-170.
- Uckun, A.A., Oz, O.B., 2020. Evaluation of the acute toxic effect of azoxystrobin on non-target crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) by using oxidative stress enzymes, ATPases and cholinesterase as biomarkers. *Drug and Chemical Toxicology* 5, 1-8.
- Uchima, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonyldialdehyd precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86, 271-278.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency), 1990. *Suspended, Canceled, and Restricted Pesticides*. EPA 20T-1002. Washington, DC.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178-189.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.F., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Velíšek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013a. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters* 34, 31-36.
- Velíšek, J., Zusková, E., Stará, A., Svobodová, Z., 2013b. Use of biometric, hematological, and plasma biochemical variables and histopathology to assess the chronic effects of the herbicide prometryn on common carp. *Veterinary Clinical Pathology* 42, 508-515.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.*
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kubec, J., Buřič, M., Kouba, A., 2018. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Science of the Total Environment* 643, 1456-1463.
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2007. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicology Letters* 168, 260-268.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Backwell Science Ltd., Oxford, pp. 53-151.
- Vogt, G., 2008. The marbled crayfish: a new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *Journal of Zoology* 276, 1-13.
- Vyhláška č. 395/1992 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 14/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny.
- Wang, C., Yu, C.X., 2013. Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensors: a Review. *Reviews in Analytical Chemistry* 32, 1-14.
- Williams, P.L., James, R.C., Roberts, S.M., 2003. *Principles of toxicology: Environmental and industrial applications*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, USA, 603 pp.
- Wolf, M.C., Moore, P.A., 2002. The effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *Journal of the North American Benthological Society*. 21, 457-467.

- Woodwell, G.M., Craig, P.P., Johnson, H.A., 1971. DDT in the biosphere: Where does it go? *Science* 174, 1101-1107.
- Zadoks, J.C., Waibel, H., 2000. From pesticides to genetically modified plants: history, economics and politics. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 48, 125-149.
- Zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů.
- Zapletal, O., Ruprich, J., Dvořáková, D., Nepejchalová, L., Vranová, E., 2001. Speciální veterinární toxikologie., 1.vyd., Editační středisko VFU Brno, Brno, 132 s.
- Zarenkov, N.A., 1983. Členistonogie. Rakoobraznyje, Čast' 2., Izd. MGU, Moskva.
- Zhao, G.P, Yang, F.W., Li, J.W., Xing, H.Z., Ren, F.Z., Pang, G.F., Li, Y.X., 2020. Toxicities of neonicotinoid containing pesticide mixtures on nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39; 1884-1893.

8. ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu chloridazonu (Ch) a jeho metabolitu chloridazon desphenylu (Ch-D) v environmentálně relevantních koncentracích 0,45 µg/l (Ch1; Ch-D1) a 2,7 µg/l (Ch2; Ch-D2) na adultní jedince raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Vlastní experiment probíhal formou chronického testu toxicity s 30ti denní expozicí následovanou 15ti denní depurační fází. Vliv testovaných látek byl hodnocen na základě chování, biochemického profilu hemolymfy, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů.

Testované látky neměly vliv na chování raků. Chloridazon v koncentraci 2,7 µg/l (Ch2) způsobil u testovaných raků signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení hladiny glukózy (GLU), laktátu (LACT) a aktivity alanin aminotransferázy (ALT) a aspartát aminotransferázy (AST) v hemolymfě, včetně změny v hladině katalázy (CAT) v žábrech i hepatopankreatu, ve srovnání s kontrolami. Raci vystaveni působení chloridazonu v obou koncentracích (0,45 µg/l; 2,7 µg/l) vykazovali signifikantně ($P < 0,01$) vyšší hladinu redukovaného glutathionu (GSH) v žábrech a hepatopankreatu ve srovnání s kontrolou.

Expozice chloridazon desphenylu v koncentraci 0,45 µg/l i 2,7 µg/l způsobila významně ($P < 0,01$) vyšší hladinu glukózy, laktátu, amoniaku (NH_3), vápníku (Ca) a aktivitu alanin aminotransferázy a aspartát aminotransferázy v hemolymfě ve srovnání s kontrolou. Také u hladiny lipidní peroxidace (LPO) v hepatopankreatu, aktivity katalázy (CAT) a hladiny GSH v žábrech a hepatopankreatu došlo k signifikantním ($P < 0,01$) změnám v obou sledovaných koncentracích chloridazon desphenylu ve srovnání s kontrolní skupinou. U exponovaných skupin nedošlo ani po depuračním období k návratu do fyziologických hodnot parametrů.

Výsledky prokázaly, že metabolit chloridazon desphenyl vykazuje výraznější účinky na fyziologii dospělých signálních raků než jeho mateřská látka chloridazon. Lze tedy konstatovat, že chloridazon i jeho metabolit chloridazon desphenyl mají prokazatelně negativní a škodlivé účinky na raky jakožto zástupce necílových vodních organismů.

Klíčová slova: herbicidy, metabolity, korýši, biochemický profil, antioxidační biomarkery

9. ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of chloridazon (Ch) and its major metabolite chloridazon desphenyl (Ch-D) at environmentally relevant concentrations 0.45 µg/l (Ch1; Ch-D1) and 2.7 µg/l (Ch2; Ch-D2) on adult signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). The exposure was 30-day and followed by a 15-day depuration period. The effect of the tested substances was evaluated on the basis of behavior, biochemical profile of hemolymph, biomarker of oxidative stress and antioxidants parameters.

The tested substances did not effect on the behavior of crayfish. Chloridazone at concentration 2.7 µg/l (Ch2) caused a significant ($P<0.01$) increase of glucose (GLU), lactate (LACT), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity in haemolymph of crayfish and changes in catalase (CAT) levels in the gills and the hepatopancreas, compared to controls. Crayfish exposed to chloridazon in both tested concentrations (0.45 µg/l and 2.7 µg/l) showed significantly ($P<0.01$) higher level of reduced glutathione (GSH) in hepatopancreas and gills compared to control.

Exposure of chloridazon desphenyl at concentration 0.45 µg/l and 2.7 µg/l caused significantly ($P<0.01$) higher levels of glucose, lactate, ammonia (NH₃), calcium (Ca), alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activity in haemolymph of exposed crayfish compared to control. Chloridazon desphenyl in both tested concentrations caused significant ($P<0.01$) changes in the levels of lipid peroxidation (LPO) in the hepatopancreas and catalase (CAT) and GSH level in the gills and hepatopancreas compared to the control group. Some effects persist after a depuration period.

The results showed that the metabolite chloridazon desphenyl has more pronounced effects on the physiology of adult signal crayfish than its parent compound chloridazon. It can be stated, that chloridazon and its metabolite chloridazon desphenyl has the strongly negative and harmful effects of on crayfish as representatives of non-target aquatic organisms.

Keywords: Herbicide, Metabolite, Crustacean, Biochemical profile, Antioxidant Biomarkers