

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

**Vliv chronického působení propiconazolu
na biometrické ukazatele u kapra obecného**

Bakalářská práce

Autor práce:

Jindřich Čuda

Vedoucí práce:

Doc. MVDr. Helena Modrá Ph. D.

Brno, 2012

Prohlášení studenta

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou práci vypracoval zcela samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházel, uvádím v Seznamu použité literatury.

V Brně 31. 3. 2012

.....
Jindřich Čuda

Poděkování

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Doc. MVDr. Heleně Modré Ph.D. z Ústavu veřejného veterinárního lékařství a toxikologie za trpělivost a pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji pracovníkům Ústavu veřejného veterinárního lékařství za pomoc s odběrem a vyhodnocením vzorků.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract.....	6
1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1 Pesticidy	9
3.2 Historie používání pesticidů.....	10
3.3 Pesticidy a životní prostředí	11
3.4 Fungicidy.....	13
3.5 Azoly	14
3.6 Propikonazol.....	15
3.7 Kapr obecný.....	16
3.8 Biometrické ukazatele u ryb	16
4. MATERIÁL A METODIKA	18
4.1 Metodika chronického testu	18
4.2 Stanovení propikonazolu ve vodě	18
4.3 Výpočet kondičních ukazatelů	19
4.4 Statistické zpracování výsledků	19
5. VÝSLEDKY.....	20
6. DISKUZE	23
7. ZÁVĚR.....	26
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27
9. PŘÍLOHA.....	32

Abstrakt

Vliv chronického působení propikonazolu na biometrické ukazatele u kapra obecného

Čuda, J.

Cílem práce bylo zjistit vliv chronického působení propikonazolu na biometrické ukazatele u kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) a jejich následné porovnání s jinými studii zabývajícími se stejnou problematikou. Jako biometrické ukazatele byly vybrány hepatosomatický index (HSI) a kondiční faktor (KF).

Testované skupiny byly po dobu 56 dní vystaveny působení fungicidního přípravku Bumper 25 EC, který obsahuje účinnou látku propikonazol v koncentraci 250 g.l⁻¹. 1. skupina byla vystavena dávce propikonazolu o koncentraci 1/100 96h-LC50, 2. o koncentraci 1/30 96h-LC50 a 3. o koncentraci 1/10 96h-LC50. Pro účely naší studie byly zvoleny 4 termíny odběru. 1. odběr proběhl 30. den od začátku pokusu, 2. odběr proběhl 43. den pokusu a 3. odběr proběhl 56. den pokusu. Část testovaných ryb byla 43. den pokusu přelovena na 20 dní do čisté vody. Odběr těchto ryb proběhl 63. den od zahájení pokusu.

Změny u HSI byly pozorovány již při 1. odběru, kdy u testované skupiny s nejvyšší koncentrací propikonazolu (1/10 96h-LC50) došlo k signifikantnímu nárůstu HSI. Stejně tomu bylo i při 2. odběru. Naopak při 3. odběru jsme již změny nepozorovali. Po přelovení ryb do čisté vody došlo k signifikantnímu poklesu HSI u skupiny, která byla vystavena nejvyšší koncentraci propikonazolu. Změny KF se projevily až při 2. a 3. odběru, kdy došlo shodně ke statisticky signifikantnímu poklesu KF u skupin, které byly vystaveny menší dávce propikonazolu. U skupiny, která byla vystavena nejvyšší koncentraci propikonazolu, jsme nezjistili statisticky signifikantní změnu. Při 4. odběru (po přelovení ryb do čisté vody) nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny mezi kontrolní skupinou a skupinami vystavenými propikonazolu.

Z naší studie vyplývá, že HSI je citlivějším biometrickým ukazatelem než KF, neboť na přítomnost propikonazolu reagoval rychleji a dlouhodoběji.

Klíčová slova: azoly, ryby, hepatosomatický index (HSI), kondiční faktor (KF), rekonvalescence

Abstract

Effect of chronic exposure of propiconazole on biometric parameters in common carp

Čuda, J.

The aim of this study was to determine the effect of chronic exposure of propiconazole on biometric parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) and their comparison with other studies occupied with the same issue. Hepatosomatic Index (HSI) and Condition Factor (CF) were chosen as biometric parameters.

Tested groups were for 56 days exposed to the fungicide preparation Bumper 25 EC, which contains the active substance propiconazole in amount of 250 g.l⁻¹. The first group was exposed to propiconazole of the concentration 1/100 96h-LC50, the second of the concentration 1/30 96h-LC50 and the third of the concentration 1/10 96h-LC50. For the purpose of our work 4 taking terms were chosen. The first was executed on the day 30 of the research, second on the day 43 of the research and third on the day 56 of the research. Part of tested fish was moved on the day 43 for 20 days to clean water. Taking of this fish was executed 63 days after the start of the research.

Changes in the HSI were found immediately in the first taking, when we observed the significant increase of HSI in the group with the biggest concentration of propiconazole (1/10 96h-LC50). Same results were observed in the second taking. On the other hand in the third taking no changes were found. After we moved some fish to clean water, we discovered the significant decrease of HSI in the group exposed to the biggest concentration of propiconazole. Changes of CF were found in the second and third taking, when we observed the significant decrease of CF in both groups exposed to the smaller concentration of propiconazole. We did not observe any significant change in the group exposed to the biggest concentration of propiconazole. In the fourth taking (after we moved fish to clean water) no significant changes between control group and groups exposed to the propiconazole were found.

Our study demonstrates that HSI is more sensitive biometric parameter than CF, because of faster and longer reaction on propiconazole.

Keywords: azoles, fish, Hepatosomatic Index (HSI), Condition Factor (CF), recovery

1. ÚVOD

V dnešní době, kdy svět ovládá stále více se prohlubující industrializace a hlavní roli ve světové ekonomice přebírá průmysl, začíná tento vliv i naplno pronikat do moderního zemědělství. Stále vyšší nároky na výtěžnost půdy a pěstování co možná nejvyššího množství plodin s vysokým výnosem vede k čím dál větší chemizaci zemědělství.

Mezi nejčastější chemické přípravky užívané v zemědělství patří průmyslová hnojiva a široký sortiment pesticidů. K nejvíce využívaným pesticidům patří skupina herbicidů, desikantů a defoliantů, dále skupina fungicidů, která se využívá k hubení mikroskopických hub a skupina insekticidů, která se používá k hubení celé řady hmyzích škůdců a představuje největší riziko pro necílové obratlovce.

Problém všech těchto chemických látek tedy i pesticidů je, že většina z nich přetrvává dlouho v životním prostředí a navíc může docházet k jejich degradaci na toxické metabolity, které mohou poškodit zdraví volně žijících živočichů i člověka.

K šíření pesticidů do volné přírody, potažmo spodních a povrchových vod, dochází jednak díky špatné aplikaci pesticidů v zemědělství a nevhodné likvidaci obalů a zbytků pesticidních přípravků. Na druhou stranu ale k šíření pesticidů do volné přírody dochází i při správné aplikaci splachem pesticidů z rostlin a průsakem do půdy.

Z hlediska výživy člověka je závažným problémem kontaminace potravin pesticidy. Mezi tyto potraviny patří i ryby, které jsou vystaveny bezprostřednímu vlivu reziduí pesticidů obsažených ve vodě a dochází tak k ukládání těchto látek v jejich těle.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo určit vliv chronického působení propikonazolu na biometrické ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*). K naší studii jsme vybrali fungicidní přípravek Bumper 25 EC, který obsahuje propikonazol v koncentraci 250g/l. Jako modelový organismus byl zvolen kapr obecný, neboť je to produkčně nejvýznamnější ryba v České republice. Jako sledované parametry byly vybrány hepatosomatický index (HSI) a kondiční faktor (KF).

Dalším cílem bylo následné porovnání našich zjištění s dalšími údaji popsány ve studiích zabývajících se stejnou problematikou.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Pesticidy

Za pesticid považujeme každou látku nebo směs látek, přírodního nebo syntetického původu, používanou k likvidaci nebo odpuzování škůdců, kteří způsobují člověku ekonomické ztráty a přenášejí nemoci. Termín škůdci zahrnuje mimo jiné hmyz, plevely, hlodavce a mikroorganismy.

Existuje mnoho skupin pesticidů, které se dělí na základě účinků proti cílovým organismům. Největší skupinou pesticidů jsou herbicidy, které se používají na hubení plevelů a rostlin, které rostou na nevhodných místech. Dalšími skupinami jsou insekticidy, které se používají na hubení hmyzu a fungicidy, které se používají k hubení mikroskopických hub. Mezi další druhy pesticidů patří rodenticidy (prostředky určené k hubení hlodavců), akaricidy (prostředky k hubení roztočů), feromony, repelenty a regulátory růstu (Tadeo, 2008).

Pesticidy našly uplatnění i ve vodním hospodářství, slouží například k likvidaci některých vodních rostlin, k redukci zooplanktonu v případě ohrožení ryb kyslíkovým deficitem, k likvidaci dravých bucharek před vysazením váčkového plůdku kapra a k antiparazitárnímu ošetření kaprovitých ryb (Pitter, 2009).

Pesticidy se dále dělí podle působení na ošetřovaný organismus. Kontaktní (dotykové) jsou ty, které působí proti škůdcům na povrchu rostliny a nevstřebávají se a systémové jsou ty, které pronikají do organismu rostlin, včetně kořenového systému a chrání tak rostlinu jako celek.

Pesticidy mohou být anorganické, nebo organické povahy. Aktivní anorganickou složkou může být měď, fosfor, polysulfidy a elementární síra. V současném zemědělství však převládají pesticidy organické (Pitter, 2009).

Každý pesticidní přípravek je označen obecným názvem účinné látky (common name), obchodním názvem (trade name), chemickým názvem a strukturním vzorcem účinné látky. Nejdůležitější je obecný název (common name), který má mezinárodní platnost, protože názvosloví komerčních přípravků je nepřehledné (obchodní název se může měnit podle výrobce) a chemický název je často velmi složitý. Obecným názvem bývá často zkratka chemického názvu (např. DDT, HCH) (Pitter, 2009). V České republice je termín pesticidy používán pro přípravky na ochranu rostlin. Stejně látky však mohou být obsaženy i v přípravcích používaných v domácnostech, které jsou označeny termínem biocidy nebo v přípravcích, které se používají jako léčiva (např. antiparazitika nebo antimykotika).

Seznam povolených přípravků na ochranu rostlin v České republice vydává každoročně Státní rostlinolékařská správa, kterou spravuje Ministerstvo zemědělství.

3.2 Historie používání pesticidů

Mezi první pesticidy patřila síra a nikotin, který se získával jako výluh z listů tabáku. Následovaly měďnaté fungicidy, které představovaly ochranu před plísněmi a jsou používány dodnes. Mezi další anorganické látky, které byly, nebo jsou stále používány jako pesticidy, patří vápník, arseničnan olovnatý, síra, chlorid sodný a chlorečnan sodný (Marrs and Ballantyne, 2004).

Průlom ve vývoji a používání pesticidů nastal ve 30. letech 20. století, kdy program na zkoumání vlivu organofosforečných látek na hmyz převzala německá společnost IG Farbenindustrie. V laboratořích této společnosti se vědci pod vedením Gerharda Schradera zaměřili na přípravu nových druhů insekticidů a syntetizovali do té doby neznámé organofosforové sloučeniny, jež se později staly postrachem celého lidstva: tabun (dimethylamin-kyanofosfonát) a sarin (O-isopropyl-methylfosfonát) (Patočka, 2010). Další výzkum organofosfátů odhalil také méně toxické účinné látky patřící do této skupiny, které jsou toxické pro hmyz a naopak ne-toxické pro člověka.

V průběhu 2. světové války také spojenecké země na opačné straně fronty hledaly účinnou insekticidní látku, která by působila proti přenašečům malárie, která způsobovala značné ztráty vojáků v Africe. Toto úsilí vedlo k odhalení dvou nejznámějších pesticidů: hexachlorcyklohexanu (HCH) a dichlordifenyiltrichlorethanu (DDT), které patří do skupiny organochlorovaných pesticidů (Marrs and Ballantyne, 2004).

V průběhu používání organochlorovaných pesticidů se zjistilo, že ačkoli tyto látky mají nízkou akutní toxicitu, přetrvávají v prostředí a mají řadu skrytých účinků na volně žijící živočichy a člověka.

Dne 23. května 2001 došlo ve švédském Stockholmu k podepsání Stockholmské úmluvy, ve které se signatářské země zavazují, že u vybraných látek (např. aldrin, DDT, dieldrin, endrin, heptachlor, chlordan, mirex, toxafen, hexachlorbenzen, polychlorované bifenyly) omezí výrobu, používání a vypouštění do životního prostředí. Česká republika tuto smlouvu podepsala, ratifikovala a 5. února 2002 byla přijata českým parlamentem. Úmluva vstoupila v platnost 17. května 2004.

3.3 Pesticidy a životní prostředí

Pesticidy v zemědělství se používají nejčastěji ve formě postřiků, poprašků nebo aerosolů. Nejvýznamnější cestou přestupu pesticidů do životního prostředí je splach pesticidů z polí a z plodin a transport větrem při leteckém postřiku. Dalším zdrojem jsou průmyslové odpadní vody z jejich výroby, vody z mytí a vyplachování použitého strojního rozstřikovacího zařízení a přímá aplikace ve vodním hospodářství (např. při chovu ryb). Většina pesticidů je aplikována sezónně. I když se většina organochlorovaných pesticidů již nepoužívá, jsou stále prokazovány v prostředí. V těchto případech jde většinou o původ ze starých zátěží. Je to způsobeno jejich značnou chemickou a biologickou stabilitou (Pitter, 2009).

Mnohé pesticidy jsou ve vodě jen málo rozpustné a musí se upravovat přidávkou rozpouštědel, emulgátorů nebo dispergátorů. Hotové přípravky jsou pak často směsí vlastní účinné látky a dalších přísad, které rovněž kontaminují prostředí společně s vlastní aktivní látkou (Pitter, 2009).

Jedním z největších zdrojů pesticidů v životním prostředí je přímá kontaminace z aplikace pesticidů v zemědělství. Jedná se o rozprašování pomocí traktorů nebo práškování pomocí letadel. Velice často se stává, že kapky vody obsahující pesticidy mohou být větrem zaneseny přímo na otevřené hladiny a tím kontaminují vodní zdroje. Jedná se o jeden z největších a nejvýznamnějších způsobů kontaminace s jakým se můžeme setkat. Avšak zmiňujeme-li se o šíření pesticidů z důvodu špatné aplikace v zemědělství, nesmíme zapomenout, že ani správná aplikace nezajistí, že nedojde ke kontaminaci. Tento problém nastává v případě, kdy dochází k častým deštům a průtržím, které mohou zapříčinit splavování vrchních vrstev půdy, které obsahují pesticidy omyté z rostlin. Tato splavená vrstva půdy se dostává spolu s pesticidy do vodních toků a dochází ke kontaminaci. Další variantou spojenou s půdou je prosakování kontaminované dešťové vody obsahující pesticidy do spodních vod (Groenendijk et al., 1994).

Pesticidy mohou být přítomny ve vodách buď rozpuštěné nebo nerozpuštěné. Ze značné míry mohou být sorbovány na nerozpuštěné látky minerální i organické povahy. Proto jejich stanovení jenom v kapalně fázi není pro odpovědné hodnocení celkového znečištění vodního systému postačující a je nezbytná i analýza sedimentů, kalů a půdy. Vzhledem ke své nebezpečnosti vyžadují pesticidy cílené sledování, i když je jejich stanovení ve vodách náročné. Do podzemních vod pronikají pesticidy jen v omezené míře, protože se silně sorbují v půdě. Prokazatelné jsou v podzemní vodě tehdy, když je sorpční kapacita půdy nedostatečná. V podzemních vodách lze prokázat především biochemicky stabilní

organochlorové a triazinové pesticidy. Málo stálé organofosforové pesticidy se zjišťují jen v ojedinělých případech (Pitter, 2009).

Vzhledem k velmi rozdílné chemické struktuře pesticidů a nejednotnému složení se údaje o jejich rozpustnosti značně různí. Nejméně rozpustné jsou organochlorové látky. Naproti tomu značně rozpustné jsou organofosforové pesticidy. Pesticidy mohou ve vodách podléhat chemickému, fotochemickému nebo biologickému rozkladu. Z chemických procesů probíhá zejména hydrolyza, a to u organofosforových sloučenin. V případě fotochemického rozkladu jde hlavně o izomeraci, epoxidaci, aromatickou substituci a dehalogenaci. Biologická rozložitelnost, a tím jejich odstranitelnost z vody a půdy, závisí na jejich struktuře. Biologicky těžko rozložitelné jsou především organochlorové pesticidy, relativně i triaziny a některé deriváty močoviny. Snadněji se biologicky rozkládají např. deriváty fenoxycetové kyseliny, karbamáty a organofosforové sloučeniny. Zmenšení koncentrace pesticidů ve vodě může být kromě jejich rozkladu způsobeno i pouhou sorpcí na nerozpuštěných látkách, sedimentech a kumulací v biomase (zejména v tukových tkáních). Především málo polární organochlorové pesticidy mají velké hodnoty kumulačních koeficientů, což se projevuje především bioakumulací u ryb. Proto stanovení těchto pesticidů jen v kapalné fázi neposkytuje dostatečný obraz o skutečné kontaminaci daného prostředí (Pitter, 2009).

Z ekotoxikologického hlediska mohou pesticidy ve vyšších koncentracích porušit biologickou rovnováhu v tocích tím, že toxicky působí na některé složky vodní biocenózy (zejména ryby a zooplankton); mimo to mohou nepříznivě ovlivňovat samočisticí schopnost vody, její pach a chuť a v případě proniknutí do pitné vody ohrožují i zdraví obyvatelstva. Některé pesticidy jsou i pro člověka značně toxické, popř. karcinogenní (Pitter, 2009).

Pro jednoznačné určení mezních hodnot pesticidů v přírodních vodách a v pitné vodě není dosud k dispozici dostatek hodnověrných údajů. Zcela chybí údaje o eventuelním synergismu u směsí pesticidů. Stanovením reziduí pesticidů v povrchových i podzemních vodách se v České republice zabývá Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ). Při řešení projektu Výskyt a pohyb pesticidů v hydrosféře ČR řešeného v ČHMÚ v roce 2009 bylo zjištěno, že v povrchových vodách se nejčastěji nacházejí rezidua pesticidů na bázi triazinů (atrazin, terbuthylazin) a jejich metabolity. Vzhledem k tomu, že je používání atrazinu od roku 2007 zakázáno, jsou tyto nálezy alarmující a ukazují na velkou perzistenci tohoto pesticidu. Rezidua terbuthylazinu, který nahradil atrazin, byla v roce 2009 prokázána ve více než polovině ze 400 odebraných vzorků povrchových vod. Ve vodárenských nádržích byla ve stejném roce nejčastěji zjišťována rezidua terbuthylazinu, glyphosátu a jeho metabolitu AMPA (aminomethylphosphonic acid), trifluralinu a metolachloru. V sedimentech se

nejčastěji vyskytovalo DDT, jeho metabolity p,p-DDE a p,p-DDD a glyfosát a jeho metabolit AMPA. Nejvyšší hodnoty v sedimentech byly naměřeny u HCB (hexachlórbenzen) a AMPA. V podzemních vodách se nejčastěji vyskytovaly atrazin a jeho metabolity a chloracetanilidové herbicidy alachlor a metolachlor (Kodeš et al., 2010).

Pro pitnou vodu platí v ČR požadavky vycházející z evropské směrnice pro pitnou vodu. Nejvyšší mezní hodnota $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ platí pro součet jednotlivých pesticidů s tím, že nejvyšší mezní hodnota pro jednotlivé pesticidy je $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ včetně metabolitů, s výjimkou organochlorovaných pesticidů aldrinu, dieldrinu, heptachloru a heptachlorepoxydu, kde platí limitní hodnota $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Vyhláška MZd 252/2004 Sb.).

Výskyt moderních pesticidů, které se používají v současnosti v povrchových vodách, může být sezónní. Dlouhodobým problémem jsou však organochlorované pesticidy, které se nepoužívají desítky let. Stále je ještě aktuální výskyt DDT a jeho a metabolitů v prostředí. Mezi poměrně stabilní látky patří i triazinové herbicidy. Naproti tomu organofosforové pesticidy jsou chemicky i biochemicky labilní. Vzhledem k tomu, že běžnou vodárenskou úpravou nedochází k zásadnímu poklesu koncentrace většiny pesticidů, jsou prokazatelné v pitné vodě (Pitter, 2009).

3.4 Fungicidy

Fungicidy jsou přípravky k ničení nebo potlačování původců houbových chorob. Působí kontaktně (dotykově) v místě aplikace nebo systémově, kdy jsou po proniknutí do rostliny následně rozváděny (translokovány) vodivými cestami uvnitř rostliny směrem k vegetačnímu vrcholu (akropetalně) nebo společně s asimiláty směrem dolů (bazipetalně). Ke skupině kontaktních fungicidů patří zejména měďnaté přípravky (oxychlorid mědi atd.), fungicidy na bázi síry, organicky vázaného cínu (fentit – acetát), fungicidy vázané síry (thiram) a příbuzné účinné látky maneb, zineb, mancozeb, dále ftalimidy (captan). K systémovým fungicidům patří zejména aniliny (carboxin), fenyramidy (metalaxyl), benzimidazoly (carbendazim, benomyl, thiabendazol), triazoly (propiconazol, tebuconazol, flutriafol), morfoliny (tridemorph) a strobiluriny (Peterka, 2001).

Fungicidy spíše než k samotnému léčení slouží k ochraně, a proto by měly být aplikovány předtím, než dojde k samotné nákaze. Stejně tak jako u jiných pesticidů může docházet k transportu fungicidů ze zemědělských ploch a následné kontaminaci podzemní vody, volných vodních ploch a souvisejících sedimentů. Kvůli konstantnímu náporu plísňových onemocnění, jako byla například v Asii epidemie sněti na soji, se užívání fungicidů v poslední

době signifikantně zvětšuje. Zvýšené užívání může vést ke zvýšení koncentrací těchto látek v prostředí (Battaglin et al., 2011)

Ať už jsou fungicidy systémové nebo působí prostřednictvím kontaktu s rostlinou, u všech existuje riziko, že si po určité době plísně vypěstují vůči jejich působení odolnost (Brent and Hollomon, 1998). Výrobci fungicidů proto při vývoji a doporučeních o nakládání s pesticidními přípravky zohledňují několik hlavní hledisek: mechanismus účinku pesticidní látky (jedná-li se o fungicidy systémové nebo kontaktní), potenciální možnost vzniku rezistence a chování látky v životním prostředí.

Ve volné přírodě mohou být fungicidy, v závislosti na jejich koncentraci, toxické pro ryby, bezobratlé a další necílové organismy (Battaglin et al., 2011).

3.5 Azoly

Azoly představují významnou skupinu systémových fungicidů. Jsou vhodné jak pro prevenci, tak i léčení širokého spektra plísněmi způsobených nemocí. Výhoda systémových fungicidů spočívá v tom, že dokáží proniknout do semen rostlin a následně se z místa aplikace samovolně rozšířit. Odtud se azoly šíří do částí rostliny, které nejsou ošetřeny nebo do částí nově narostlých, díky čemuž jsou rostliny chráněny proti invazi plísnových nemocí nebo dochází k ničení plísní, které jsou již přítomny. Azoly používané v zemědělství mají různou strukturu, avšak většina z nich obsahuje triazolový nebo imidazolový kruh. V závislosti na jejich užití v zemědělství bylo vytvořeno i několik skupin, které se používají jako antimykotika v lékařství. Azoly jsou termostabilní a odolné proti hydrolyze. Ionizovatelné azoly jsou lehce rozpustné ve vodě, mnohem lépe se rozpouští v organických rozpouštědlech. U většiny azolů nedochází k uvolňování výparů (Roberts and Hutson, 1999).

Mechanismus působení azolových fungicidů spočívá v jejich schopnosti zasáhnout do biosyntézy houbových biosteroidů a inhibici biosyntézy ergosterolu. Ergosterol je esenciální pro jednu z membrán buněčné stěny mnoha hub. Pokud se zabrání v syntéze ergosterolu, tak to vede ke smrti buňky nebo inhibici jejího růstu. Můžeme pozorovat i několik vedlejších efektů jako je například abnormální morfologie a poruchy růstu mikroskopických hub (Roberts and Hutson, 1999).

Azolové fungicidy se nejčastěji používají jako postřiky rostlin nebo k ošetření semen. Ve většině případů nejsou vůči savecům toxické. Jejich rozklad v půdě je poměrně pomalý, protože mají dlouhý poločas rozpadu. Avšak azoly nejsou příliš mobilní. Zůstávají v půdě a

nedostanou se přes propustnou vrstvu. To znamená, že není příliš reálné, aby pronikly do spodních vod (Roberts and Hutson, 1999).

3.6 Propikonazol

Propikonazol je širokospektrální azolový fungicid, který je využíván ke kontrole mnoha houbových onemocnění na obilovinách, banánech, trávnicích, rýži, ořechách, peckovicích a kukuřici (Roberts and Hutson, 1999).

Propikonazol je systémový listový fungicid, který se šíří pomocí xylému. Působí stejně jako ostatní azoly tak, že zasahuje do biosyntézy ergosterolu a inhibuje demethylaci steroidů.

Propikonazol se vyskytuje ve čtyřech formách: (2R,4R), (2R,4S), (2S,4R) a (2S,4S). Asymetrická centra se nachází v pozicích 2- a 4-. Rozlišujeme tedy 2 typy propikonazolů: trans-propikonazol, do kterého patří izomery (2R,4R) a (2S,4S) a cis-propikonazol, kam patří (2R,4S) a (2S,4R). Metabolismus propikonazolu v rostlinách probíhá oxidací postranního řetězce připojeného k dioxolanovému prstenci a následnou dekatalyzací se ztrátou dioxolanové molekuly. Podobné reakce probíhají i v půdě a u savců. Triazoly a jejich konjugáty jsou obsaženy v rostlinách důsledkem degradace propiconazolu působením půdních mikroorganismů a jejich následné absorpci kořenovým systémem do rostlin (Roberts and Hutson, 1999).

Degradace propiconazolu v půdě záleží na přístupu vzduchu. Pohybuje se mezi 40-70 dny při 25°C. Hlavními druhy degradace jsou: hydroxylace n-propylové části řetězce, dioxolanového kruhu a formace 1,2,4-triazolu (Roberts and Hutson, 1999).

Při orálním podání propiconazolu potkanům došlo k jeho téměř úplnému vyloučení močí a trusem. K největším změnám došlo u propylové části řetězce a dioxolanového kruhu. N-propylová část řetězce se zkrátila, ketony byly zredukovány na alkoholy a došlo k vytvoření methylthio derivátů. Předpokládá se, že methylthio deriváty vznikají reakcí přechodných arenových oxidů s nukleofily obsahujícími síru, nejčastěji s glutationem. Glutationové deriváty jsou degradovány na deriváty cysteinu. U těch dochází ke štěpení vazby C-S a tím ke vzniku thiolů, které jsou nakonec methylovány (Roberts and Hutson, 1999).

Levine et al. (1999) zjistili, že propikonazol zvyšuje u pstruha duhového úroveň CYP1A a mRNA, zatímco úroveň EROD se snížila. Tato změna v metabolismu může vést k vyšší bioakumulaci a toxicitě jiných kontaminantů. Například ryby *Dorosoma cepedianum*, které byly nejprve vystaveny účinku clotrimazolu měly větší bioakumulaci benzo[a]pyrenu než ty,

kteřé byly vystaveny pouze samotnému benzo[a]pyrenu (Levine et al., 1997). Stejněho výsledku bylo dosaženo i u střevle *Pimphales promelas*, která byla nejprve vystavena propikonazolu a následně pesticidu parathion (Levine and Oris, 1999). To je velice důležité při hodnocení toxicity fungicidů pro ryby, neboť tyto studie ukazují, že některé fungicidy mají schopnost zvyšovat akumulaci jiných toxických kontaminantů (Konwick et al., 2006).

3.7 Kapr obecný

Kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) je hospodářsky nejdůležitější sladkovodní ryba Evropy. Původní divoká forma kapra, která pochází z oblasti Černého, Azovského a Kaspického moře a Aralského jezera, má protáhlé, vřetenovité, na průřezu téměř kruhové tělo, celé vždy pokryté šupinami. U úst má kapr čtyři masité vousky. Hřbetní ploutev je velmi dlouhá, cykloidní šupiny na těle jsou poměrně velké a zarostlé v kůži. Postranní čára je vyvinutá po celé délce trupu. Divoký kapr má hnědozelený či šedozeleňý, často velmi tmavý hřbet, světlejší, špinavě olivové boky se zlatavým leskem a žlutobílé břicho. Nepárové ploutve jsou šedomodré, párové červenavé; někdy je červenavá i ploutev řitní a ocasní. Divoký kapr je statná ryba, dorůstající délky přes 100 cm a váží až 30 kg. Jeho růst je v prvních letech velmi rychlý, později jsou jeho přírůstky nižší než u vyšlechtěných rybnických forem. Kapr pohlavně dospívá ve stáří 3-4 roků, mlíčáci obvykle o rok dříve než jikrnačky. Tře se v květnu a v červnu při teplotě vody okolo 15°C v mělkých, vegetacích zarostlých místech při břehu.

Kapři žijí v hlubších, pomalu tekoucích a stojatých vodách v říčním korytě, v zátokách, ve slepých ramenech řek a v blízkých tůních. I v hlubších vodách se zdržují při dně, kde si v bahně vyhledávají potravu, například vodní larvy hmyzu, vodní měkkýše, korýše a červy; důležitá je v jejich potravě i rostlinná složka. V přírodě přijímají potravu zvláště večer a v noci (Čihař, 1993).

Plůdek kapra je vhodným druhem pro testování toxických účinků cizorodých látek a je doporučován v metodikách testů toxicity podle směrnice OECD (OECD Guidelines for Testing of Chemicals 203, 210, 212, TG 305).

3.8 Biometrické ukazatele u ryb

Vliv znečištění prostředí se u živých organismů projeví buď jejich přímým usmrcením, nedostatečným přísunem potravy, snížením růstu nebo sníženou schopností reprodukce. Špatný růst vypovídá o špatné zásobě energie v organismu, což vede k potížím

při rozmnožování. To vede ke snížení kondice živočišného druhu a následně k poklesu populace. Růst a rozmnožování mohou tedy obecně sloužit jako dlouhodobý ukazatel zdravotního stavu organismu.

Kondiční faktor (KF) se vypočítá jako podíl hmotnosti a délky ryby a slouží jako ukazatel o růstových schopnostech ryb. Vysoký kondiční faktor značí dobré životní prostředí, zatímco nízký kondiční faktor špatné životní prostředí. Rozdíly v kondičním faktoru nejčastěji vypovídají o stavu pohlavní vyspělosti a míře výživy. Kondiční faktor může být ovlivněn i stářím ryby a u některých druhů i pohlavím. Kondiční koeficient (faktor) se označuje písmenem *K* a vypočítá se podle vzorce:

$$K = 100 W / L^3$$

kde: *W* = hmotnost ryby [g]

L = standardní délka ryby [cm]

Kondiční faktor se hojně využívá v rybolovu a obecně i v biologických studiích zabývajících se rybami (Nash et al., 2006). Nejlepší je porovnávat kondiční faktory ryb z různých vod, avšak ryb stejného druhu, délky, stáří a pohlaví. Také by měly být odchyceny ve stejný den, případně ve stejném ročním období. Pokud je srovnání prováděno na rybách ze stejné lokality, musí se ryby odchytit ve stejný den (Williams, 2000).

Dalším kondičním ukazatelem ryb je hepatosomatický index (HSI). HSI je definován jako poměr hmotnosti jater k celkové hmotnosti ryby. Podává nám zprávu o tom, jaké má ryba zásoby energie. Pokud se ryba nachází ve špatném životním prostředí, tak má velice často malá játra (tedy malou zásobu energie). Snížování HSI bylo také pozorováno u ryb, které byly vystaveny cizorodým látkám, např. vysokým dávkám kadmia (Pereira et al., 1993).

Ke kondičním ukazatelům patří také gonadosomatický index (GSI). GSI je definován jako poměr hmotnosti gonád k celkové hmotnosti a užívá se k vyjádření schopnosti rozmnožování. Rozmnožování je nejdůležitější částí životního cyklu všech druhů živočichů, protože rozhoduje o jejich přežití. GSI v zásadě informuje o tom, jaká je šance na úspěšné rozmnožení (a také o kvalitě vody).

KF, HSI a GSI nejsou ovlivněny pouze znečištěním, ale mohou je ovlivnit i jiné faktory, jako jsou například teplota a nedostatek potravy.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Metodika chronického testu

Pro testování byl použit fungicidní přípravek Bumper 25 EC s obsahem 250 g propikonazolu v 1 l přípravku. Před zahájením chronického testu byl proveden test akutní toxicity, při kterém byla stanovena hodnota 96h LC50 pro propikonazol 5,68 mg/l. Pro chronický test toxicity byly zvoleny testované koncentrace propikonazolu 1/100; 1/30 a 1/10 96h-LC50, to znamená 0,06; 0,2 a 0,6 mg /l. Každá koncentrace byla testována duplicitně. Souběžně s testovanými koncentracemi byly v čisté vodě a ve stejných podmínkách testovány dvě kontrolní skupiny ryb. V každé testované nádrži bylo na začátku testu 24 ryb.

K testování byli použiti kapři kategorie K2 o průměrné hmotnosti $123,5 \pm 18,72$ g získaní z Rybníkářství Pohořelice. Před zahájením pokusu probíhala tři týdny aklimatizace ryb na podmínky testu. V průběhu testu byly ryby krmeny 2 krát denně komerčně vyráběným krmivem. Dávka krmiva byla vypočítána jako 1,5 % hmotnosti obsádky denně. Ryby byly umístěny v průtočných nádržích s obměnou testovaných roztoků dvakrát denně.

Podmínky v průběhu testu splňovaly požadavky uvedené v metodikách testů toxicity – kyslík v průběhu testu neklesl pod 60 % nasycení, teplota se pohybovala v rozmezí $20 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,47 – 8,26 a koncentrace testované látky neklesla pod 80 %.

Celková délka trvání testu byla 63 dní. Po 30-ti, 43 a 56-ti dnech od zahájení testu byla vždy osmi rybám z každé nádrže odebrána krev. Část ryb byla po 43 dnech trvání testu přelovena do čisté vody na dobu 20 dní a tyto ryby byly usmrceny 63. den po zahájení testu. Před odběrem byly ryby omráčeny úderem na lebeční kryt, krev jim byla odebrána kardiální punkcí pomocí heparinizované jehly. Bezprostředně po odběru byly ryby usmrceny vykvrvením a přetětím míchy za hlavou.

Ryby byly změřeny a byla stanovena jejich tělesná hmotnost. Při pitvě byla stanovena hmotnost hepatopankreatu.

4.2 Stanovení propikonazolu ve vodě

Pro stanovení propikonazolu byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií na principu iontové pasti (GC/IT-MS). Příprava vzorku byla založena na jednoduché extrakci kapalina-kapalina do cyklohexanu.

Separace, identifikace a kvantifikace propikonazolu byly založeny na GC/IT-MS. Pro separaci propikonazolu byl použit plynový chromatograf Varian 450-GC (Varian Inc., USA) a kolona VF-5ms (30m x 0.25mm). Pro identifikaci a kvantifikaci byl použit hmotnostní spektrometr na principu iontové pasti Varian 220-MS (Varian Inc., USA). Chromatografické a MS podmínky jsou založeny na metodě, kterou popsal Sannino et al. (1999). Všechna rozpouštědla byla o GC/MS čistotě (Chromservis, s.r.o., CZ). Certifikovaný standard propikonazolu byl zakoupen od firmy Dr. Ehrenstorfer GmbH (SRN). Detekční limit (3σ) propikonazolu byl $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozšířená nejistota měření byla 8.0 % za předpokladu, že koeficient rozšíření $k = 2$.

4.3 Výpočet kondičních ukazatelů

Kondiční faktor (KF) byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{KF} = (\text{tělesná hmotnost [g]} / \text{standardní tělesná délka [cm]}^3) \times 100$$

Hepatosomatický index (HSI) byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{HSI} = (\text{hmotnost hepatopankreatu [g]} / \text{tělesná hmotnost [g]}) \times 100$$

4.4 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s koncentrací testované látky jako hlavním faktorem. Pokud byl zjištěn významný vliv sledovaného faktoru, byla následně zjišťována statistická významnost rozdílů průměrů mezi jednotlivými dvojicemi sledovaných skupin pomocí Tukey HSD testu. Pro každou skupinu dat byly vypočteny základní statistické parametry u každého sledovaného ukazatele (průměr a směrodatná odchylka).

5. VÝSLEDKY

Při stanovení hepatosomatického indexu jsme nejprve porovnávali jednotlivé testované skupiny v rámci každého odběru. Zjistili jsme, že u prvních dvou odběrů (tedy 30. a 43. den) došlo ke statisticky signifikantnímu nárůstu HSI u skupiny s nejvyšší koncentrací propikonazolu (1/10 96h-LC50). Při 3. odběru (56. den) bylo zjištěno, že se HSI u všech testovaných skupin vyrovnaly. U 4. odběru (63. den) – po 20 dnech pobytu ryb v čisté vodě došlo ke značnému poklesu HSI u všech testovaných skupin, které byly vystaveny dlouhodobému účinku propikonazolu. Největší pokles byl zaznamenán u skupiny s největší koncentrací propikonazolu (1/10 96h-LC50). Popsaná zjištění jsou uvedena v tabulce 1a.

Tab.1a: Srovnání průměrných hodnot HSI ($\bar{x} \pm \text{SD}$) jednotlivých testovaných skupin ve stejných dnech odběru

HSI	30. den	43. den	56. den	63. den
Kontrola	2,99 ± 0,481 ^a	3,18 ± 0,474 ^a	3,06 ± 0,334 ^a	3,03 ± 0,356 ^a
sk1/100	3,19 ± 0,423 ^{ab}	3,17 ± 0,419 ^a	3,15 ± 0,545 ^a	2,65 ± 0,277 ^{ab}
sk1/30	3,07 ± 0,414 ^{ab}	3,44 ± 0,434 ^a	3,27 ± 0,417 ^a	2,78 ± 0,203 ^{ab}
sk1/10	3,50 ± 0,378 ^b	3,90 ± 0,437 ^b	3,48 ± 0,342 ^a	2,51 ± 0,403 ^b

^{a,b} průměry v jednom sloupci neobsahující stejný index, se statisticky významně liší ($p < 0,05$)

Při porovnání změn HSI v průběhu celkového trvání testu (tab.1b) jsme zjistili, že kontrolní skupina nevykazovala žádné změny v hodnotách HSI, což je v souladu s našimi očekáváními. Testované skupiny, které byly vystaveny účinkům propikonazolu, dosáhly maximální hodnoty HSI 43. den od začátku pokusu (2. odběr). Ve všech případech jsme zjistili statisticky významný pokles HSI mezi 43. dnem odběru (2. odběr) a 63. dnem (4. odběr), to znamená po přelovení ryb do čisté vody.

Tab.1b: Srovnání průměrných hodnot HSI ($x \pm SD$) v rámci každé skupiny v průběhu pokusu

HSI	30. den	43. den	56. den	63. den
Kontrola	2,99 ± 0,481 ^a	3,18 ± 0,474 ^a	3,06 ± 0,334 ^a	3,03 ± 0,356 ^a
sk1/100	3,19 ± 0,423 ^a	3,17 ± 0,419 ^a	3,15 ± 0,545 ^{ab}	2,65 ± 0,277 ^b
sk1/30	3,07 ± 0,414 ^{ab}	3,44 ± 0,434 ^a	3,27 ± 0,417 ^{ab}	2,78 ± 0,203 ^b
sk1/10	3,50 ± 0,378 ^a	3,90 ± 0,437 ^c	3,48 ± 0,342 ^{ac}	2,51 ± 0,403 ^b

^{a,b,c} průměry v jednom řádku neobsahující stejný index, se statisticky významně liší ($p < 0,05$)

Při sledování kondičního faktoru jsme zjistili, že při prvním odběru (30. den) nebyl v hodnotách KF testovaných skupin rozdíl. Ke změně došlo až při 2. odběru, kdy 2 skupiny s nižší koncentrací propikonazolu vykazovaly signifikantní pokles hodnot KF, zatímco skupina s nejvyšší koncentrací žádnou signifikantní změnu nevykazovala. Stejný výsledek jsme zjistili i při 3. odběru (56. den). Obecně však můžeme konstatovat, že u všech skupin, kterým byl podán propikonazol, došlo během 2. a 3. odběru k poklesu KF a tedy zpomalení růstu. V nejvyšší testované koncentraci však tento pokles nebyl statisticky signifikantní, což je zřejmě způsobeno velkou variabilitou vypočítaných hodnot. Skupina, která byla 43. den přelovena do čisté vody a odebrána až 63. den (4. odběr) už nevykazovala žádné odchylky ve srovnání s kontrolou (tab. 2a).

Při porovnání vývoje KF v průběhu testu pro každou skupinu jsme zjistili, že u všech skupin, které byly vystaveny působení propikonazolu nedošlo k žádným statisticky signifikantním změnám. Statisticky signifikantní zvýšení KF bylo zjištěno u kontrolní skupiny při 2. a 3. odběru oproti 1. a 4. odběru (tab. 2b).

Tab.2a: Srovnání průměrných hodnot KF ($x \pm SD$) jednotlivých testovaných skupin ve stejných dnech odběru

KF	30. den	43. den	56. den	63. den
Kontrola	2,90 \pm 0,181 ^a	3,26 \pm 0,367 ^a	3,24 \pm 0,283 ^a	2,83 \pm 0,167 ^a
sk1/100	3,04 \pm 0,278 ^a	2,87 \pm 0,171 ^b	2,91 \pm 0,228 ^b	2,86 \pm 0,162 ^a
sk1/30	3,00 \pm 0,276 ^a	2,96 \pm 0,247 ^b	2,93 \pm 0,130 ^b	2,92 \pm 0,192 ^a
sk1/10	2,92 \pm 0,317 ^a	3,08 \pm 0,363 ^{ab}	3,11 \pm 0,140 ^{ab}	3,02 \pm 0,181 ^a

^{a,b} průměry v jednom sloupci neobsahující stejný index, se statisticky významně liší ($p < 0,05$)

Tab.2b: Srovnání průměrných hodnot KF ($x \pm SD$) v rámci každé skupiny v průběhu pokusu

KF	30. den	43. den	56. den	63. den
Kontrola	2,90 \pm 0,181 ^a	3,26 \pm 0,367 ^b	3,24 \pm 0,283 ^b	2,83 \pm 0,167 ^a
sk1/100	3,04 \pm 0,278 ^a	2,87 \pm 0,171 ^a	2,91 \pm 0,228 ^a	2,86 \pm 0,162 ^a
sk1/30	3,00 \pm 0,276 ^a	2,96 \pm 0,247 ^a	2,93 \pm 0,130 ^a	2,92 \pm 0,192 ^a
sk1/10	2,92 \pm 0,317 ^a	3,08 \pm 0,363 ^a	3,11 \pm 0,140 ^a	3,02 \pm 0,181 ^a

^{a,b} průměry v jednom řádku neobsahující stejný index, se statisticky významně liší ($p < 0,05$)

6. DISKUZE

Masivní využití a biocidní aktivita pesticidů zvyšuje pravděpodobnost negativního vlivu pesticidů na necílové organismy vodního prostředí (Tremolada et al., 2004). Ryby žijící v kontaminovaných zemědělských oblastech jsou v bezprostředním kontaktu s pesticidy a akumulují subletální dávky pesticidů z povrchových vod přestupem přes žábra a povrchem těla. Dalším zdrojem pesticidů přecházejících do ryb je kontaminované krmivo (Di Giulio and Hinton, 2008).

Mezi hlavní funkce jater v organismu ryb patří vstřebávání, metabolismus, ukládání a redistribuce nutričních a dalších endogenních molekul; biotransformační reakce katalyzující konverzi endogenních a exogenních látek málo rozpustných ve vodě a tvorba a exkrece žluči (Di Giulio and Hinton, 2008).

Játra jsou tedy ovlivněny, také pokud jsou ryby vystaveny působení pesticidů (Sancho et al., 1997; Velmurugan et al., 2007). Vliv pesticidů na morfologické a biochemické ukazatele jater ryb byl prokázán v mnoha studiích (Falfushynska et al., 2012; Gill et al., 1991; Gimeno et al., 1994; Sancho et al., 1997; Rao 2006).

Při hodnocení dlouhodobého vlivu propikonazolu na hepatosomatický index kaprů jsme zjistili, že u všech skupin, které byly vystaveny přípravku Bumper 25 EC došlo po 30-ti (1. odběr) a 43 dnech (2. odběr) k signifikantnímu nárůstu HSI. Po 56-ti dnech (3. odběr) působení propikonazolu došlo k jeho opětovnému poklesu na normální hodnoty srovnatelné s kontrolou, po přelovení ryb do čisté vody však došlo ke snížení hodnot HSI ve srovnání s kontrolou.

Zvětšení hmotnosti jater, které se projeví zvýšením hepatosomatického indexu, se může u ryb projevit již bezprostředně od zahájení působení pesticidů. Huynh a Nugegoda (2012) zjistili, že krátkodobé působení (22 a 2 hodiny) chlorpyrifosu, pesticidu ze skupiny organofosfátů, zvyšuje statisticky signifikantně se zvyšující se koncentrací hepatosomatický index (HSI) u australského sumečka *Tandanus tandanus*. Tento nárůst byl patrný 6 týdnů po ukončení působení chlorpyrifosu. Sancho et al. (1997) popsali signifikantní nárůst HSI u úhoře říčního během prvních 12-ti hodin působení organofosfátu fenitrothionu v koncentracích 0,02 mg/l. Po 24 hodinách působení fenitrothionu klesl HSI k normálním hodnotám, které přetrvávaly i po ukončení působení fenitrothionu ve fázi rekonvalescence ryb v čisté vodě v průběhu dalších 12 dní.

Ovlivnění HSI bylo zjištěno také při dlouhodobém působení pesticidů. Gill et al. (1991) zjistili zvýšení HSI po prolongovaném 4 týdenním působení endosulfanu u sladkovodní parmičky *Barbus conchoni*. Holmberg et al. (1972) popsali signifikantní nárůst HSI u úhoře *Anguilla anguilla* po působení organochlorovaného pesticidu pentachlorofenolu (PCP). Při subchronickém 28-denním působení přípravku Spartakus, který obsahoval prochloraz na kapra obecného, byl zjištěn signifikantní nárůst HSI v koncentracích 0,15 a 0,38 mgL⁻¹ (Haluzová et al., 2010). Při 28-denním vystavení kapra obecného přípravku Click 500 SC, který obsahoval terbuthylazin, nebyl při porovnání HSI kontrolní skupiny se skupinami, které byly vystaveny koncentracím 60 µg/l a 550 µg/l, zjištěn žádný rozdíl. Při testování environmentálně relevantní koncentrace terbuthylazinu 380 ng/l byl paradoxně na hladině významnosti ($p < 0,05$) zjištěn signifikantní nárůst HSI (Haluzová et al., 2011).

Při vystavení kapra obecného přípravku Successor[®] 600, který obsahoval pethoxamid v koncentraci 600 gL⁻¹, došlo u všech ryb ke zvýšení HSI, avšak pouze u skupiny s nejvyšší koncentrací došlo ke zvýšení na hladině významnosti ($p < 0,05$) (Haluzová et al., 2009).

HSI je obecně brán jako základní ukazatel popisující zdravotní stav ryb spolu s kvalitou prostředí, ve kterém se nachází. U ryb odchycených ve znečištěných oblastech dochází ke změnám hmotnosti jater z důvodu hypertrofie (Slooff et al., 1983) a hyperplazie (Poels et al., 1980). Existuje také souvislost mezi nárůstem hodnot HSI a zvýšenou aktivitou xenobiologických biotransformačních enzymů (Stephensen et al., 2000; Huuskonen and Lindstrom – Seppa, 1995; Figueiredo – Fernandes et al., 2006).

Při našem sledování jsme prokázali, že v souladu s očekáváním reagoval HSI citlivě na všechny testované koncentrace propikonazolu. V nejvyšší testované skupině byl 30 a 43 dní po působení propikonazolu HSI zvýšen, což mohlo být způsobeno zvýšením biotransformačních enzymů. Po určité době (56. den) se ale organismus testovaných ryb adaptoval na působení toxické látky a HSI byl srovnatelný s kontrolní skupinou. Po přelovení ryb do čisté vody po 43 dnech působení propikonazolu v naší studii jsme došli k překvapivému zjištění, že skupina, která byla dalších 20 dní v čisté vodě (63 dní od zahájení pokusu), vykazovala značný pokles HSI jak ve srovnání s původními hodnotami, tak i ve srovnání s kontrolní skupinou. V této souvislosti je potřeba zmínit vztah mezi hmotností jater a ukládáním glykogenu (Svobodová, 1977). Při zotavování organismu po působení toxické noxy se spotřebovává energie ve formě glukózy, která je uvolněna z glykogenu uloženého v játrech. To je zřejmě důvod, proč po dlouhodobém působení propikonazolu došlo po přelovení ryb do čisté vody ke snížení hmotnosti jater a HSI.

Při vyhodnocení našich výsledků stanovení kondičního faktoru jsme dospěli k zjištění, že při 1. odběru (30. den) nebyla zjištěna žádná signifikantní změna. Se stejným výsledkem se setkal i Velíšek et al. (2009; 2010), který nezjistil žádný rozdíl v KF u kapra obecného po 28 denním působení triazinů simazinu a terbutrynu.

Ve 2. a 3. odběru (43. a 56. den působení propikonazolu) už jsme pozorovali signifikantní pokles KF, což značí zpomalení růstu a zhoršení konverze krmiva. K této změně došlo u 2 skupin s menší koncentrací propikonazolu, zatímco u skupiny s nejvyšší koncentrací tento pokles nebyl statisticky signifikantní. Snížení KF po působení pesticidů pozoroval i Meador et al. (2011). Zjistil, že u juvenilních lososů vystavených po dobu 55 dní tributylcín, došlo ke snížení KF. Hoang et al. (2011) naopak zjistil, že při vystavení ryby *Gambusia affinis* endosulfanu ze skupiny organochlorovaných pesticidů došlo u skupiny, která byla vystavená subletální dávce, k nárůstu KF. To bylo způsobeno tím, že testovaná skupina nahromadila více tuku než skupina kontrolní. Lundebye et al. (2010) naopak zjistil, že po 95 denním působení endosulfanu u lososa nedošlo u žádné z testovaných skupin k signifikantní změně KF. Stejných výsledků dosáhl i Greco et al. (2010), který při studii vlivu ukládání organochlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenyly v těle ryb *Dicentrarchus labrax*, nezjistil žádné změny v hodnotách KF.

Evrard et al. (2010) při sledování vlivu směsi herbicidů na ryby *Platichthys flesus* zjistil nejprve v prvních 15 dnech pokles KF, ale následně v průběhu pokračování pokusu došlo k jeho opětovnému nárůstu. Toto zjištění odůvodňuje tím, že došlo k přizpůsobení ryb pokusným podmínkám.

Ve srovnání s výsledky předchozích studií můžeme konstatovat, že propikonazol v námi testovaných koncentracích nepůsobí na organismus ryb toxicky do té míry, aby se po 30 dnech působení projevilo snížení příjmu krmiva a ke snížení kondičního faktoru dochází až po delší době (43 dní). Ani po 56 dnech však nedochází k přizpůsobení ryb testovaným podmínkám a KF byl stále nižší ve srovnání s kontrolou.

7. ZÁVĚR

Při sledování chronického působení propikonazolu na biometrické parametry kapra obecného *Cyprinus carpio*, jsme zjistili, že hepatosomatický index je citlivějším ukazatelem vlivu cizorodých látek na organismus ryb než kondiční faktor.

Ke změně hepatosomatického indexu došlo hned při 1. odběru (30. den), kdy jsme zjistili statisticky významný nárůst u skupiny s nejvyšší dávkou propikonazolu (1/10 96h-LC50). Stejný výsledek jsme zjistili i při 2. odběru (43. den). Změna nastala při 3. odběru (56. den), kdy byl HSI u všech testovaných skupin stejný ve srovnání s kontrolou. Zajímavý je rovněž výsledek 4. odběru (63. den). Část ryb ze všech testovaných skupin byla 43. den pokusu přelovena do čisté vody a během 20 následujících dní došlo u všech skupin k poklesu HSI. U skupiny s předchozí nejvyšší koncentrací propikonazolu byl tento pokles statisticky signifikantní.

Změny kondičního faktoru jsme nezaznamenali při 1. odběru (30. den). Změna nastala až při 2. a 3. odběru (43. a 56. den), kdy došlo k signifikantnímu poklesu KF u dvou testovaných skupin vystavených působení propikonazolu. Překvapivé bylo zjištění, že se jednalo o skupiny s nižšími koncentracemi propikonazolu (1/100 a 1/30 96h-LC50), zatímco skupina s nejvyšší koncentrací propikonazolu (1/10 96h-LC50) se od kontrolní skupiny nelišila statisticky významně. Při 4. odběru (63. den) po přelovení ryb do čisté vody byly hodnoty kondičního faktoru srovnatelné s kontrolou.

Z naší studie vyplývá, že propikonazol ovlivňuje činnost jater a může i negativně ovlivnit kondici testovaných ryb. Ovlivnění růstu se však projeví až po delší době působení propikonazolu a stačí krátkodobá rekonvalescence (20 dní) na upravení kondičního faktoru. Ovlivnění hepatopankreatu kaprů bylo dlouhodobější a přetrvávalo i po přelovení ryb do čisté vody.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Battaglin, W.A., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., Kolpin, D.W., Meyer, M.T. (2011): Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazol, and Selected Other Fungicides in US Streams, 2005 – 2006. *Water Air and Soil Pollution* 218: 307–322

Brent, K.J., Hollomon, D.W. (1998): Fungicide resistance: The assessment of risk. FRAC Monograph No. 2, Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium, 49 p.

Čihař, J. (1993): Ryby sladkých vod. AVENTINUM s.r.o., Praha, 1993, 184 p.

Di Giulio, R. T., Hinton, D. E. (Eds.) *The Toxicology of Fishes*, 2008, CRC Press, Boca Raton, 1071 p.

Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J. (2010): Impact of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152: 321-331

Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Stoliar, O.B. (2012): Population-related molecular responses on the effect of pesticides in *Carassius aureus gibelio*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 155: 396-406

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., Reis-Henriques, M.A. (2006): The effect of paraquat on hepatic EROD activity, liver, and gonadal histology in males and females of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed at different temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 626-632

Gill, T.S., Pande, J., Tewari, H. (1991): Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish, *Barbus conchoni* Hamilton. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21: 80-91

Gimeno, L., Ferrando, M.D., Sanchez, S., Andreu, E. (1994): Endosulfan effects on liver and blood of the eel, *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and C-Toxicology & Pharmacology* 108: 343-348

Greco, L., Serrano, R., Blanes, M. A., Serrano, E., Capri, E. (2010): Bioaccumulation markers and biochemical responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) raised under different environmental conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 38-45

Groenendijk, P., van der Kolk, J.W.H., Travis K.Z. (1994): Prediction of Exposure Concentrations in Surface Waters. In: Hill I.R., Heinback F., Leeuwangh P., Matthiessen P.

(Eds.) Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals, 1994, CRC Press, Boca Raton, p.105-125

Haluzová, I., Blahova, J., Smejkalova, L., Kruzikova, K., Havelkova, M., Groch, L., Modra, H., Slais, M., Svobodova, Z. (2009): Effects of subchronic exposure to Successor[®] 600 (pethoxamid 600 gL⁻¹) on common carp *Cyprinus carpio*. Neuroendocrinology Letters 30: 230-235

Haluzová, I., Modrá, H., Blahova, J., Marsalek, P., Siroka, Z., Groch, L., Svobodova, Z. (2010): Effects of subchronic exposure to Spartakus (prochloraz) on common carp *Cyprinus carpio*. Neuroendocrinology Letters 31: 105-113

Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Maršálek, P., Groch, L., Šíroká, Z., Kružiková, K., Jarkovský, J., Littnerová, S., Svobodová, Z. (2011): The effects of Click 500 SC (terbuthylazin) on common carp *Cyprinus carpio* under (sub)chronic conditions, Neuroendocrinology Letters 32: 101-110

Hoang, T. C., Rand, G. M., Gardinali, P. R., Castro, J. (2011): Bioconcentration and depuration of endosulfan sulfate in mosquito fish (*Gambusia affinis*). Chemosphere 84: 538-543

Holmberg B., Jensen, S., Larsson, A., Lewander, K., Olsson, M. (1972): Metabolic effects of technical pentachlorophenol (PCP) on the eel *Anguilla anguilla*. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology 43B: 171-183

Huuskonen, S., Lindstrom-Seppa (1995): Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp-mill effluents. Aquatic Toxicology 31: 27-41

Huynh, H.P.V., Nugegoda, D. (2012): Effects of chlorpyrifos exposure on growth and food utilization in Australian Catfish, *Tandanus tandanus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 88: 25-29

Kodeš, V., Vejvodová, J., Kollerová, M. (2010) Screening pesticidů v hydrosféře ČR. In: Hydrologické dny 2010, Voda v měnícím se prostředí. Český hydrometeorologický ústav, Hradec Králové, p. 193-198

Konwick, B. J., Garrison, A. W., Avants, J. K., Fisk, A. T. (2006): Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 80: 372–381

Levine, S.L., Oris, J.T. (1999): Enhancement of acute parathion toxicity to fathead minnows pre-exposure to propiconazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65: 102-109

Levine, S.L., Czosnyka, H., Oris, J.T. (1997): Effect of the fungicide clotrimazole on the bioconcentration of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*): in vivo and in vitro inhibition of cytochrome P4501 activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 306-311

Levine, S.L., Oris, J.T., Denison, M.S. (1999): Modulation of CYP1A expression in rainbow trout by a technical grade formulation of propiconazole. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2565-2573

Lundebye, A. K., Lock, E. J., Boyle, D., Ruohonen, K., Berntssen, M. H. (2010): Tolerance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietborne endosulfan assessed by haematology, biochemistry, histology and growth. *Aquaculture Nutrition* 16: 549-558

Marrs T.C., Ballantyne B.(Eds): *Pesticide Toxicology and International Regulation*. Wiley a Sons Std., West Sussex, 2004, 554p.

Meador, J.P., Sommers, F.C., Cooper, K.A., Yanagida, G. (2011): Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid. *Environmental Research* 111: 50-56

Nash, R.D.M., Valencia, A.H., Geffen, A.J. (2006): The Origin of Fulton's Condition Factor – Setting the Record Straight. *Fisheries* 31: 236-238

OECD 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1992, p. 9

OECD 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test, 1992, p. 18

OECD 212. Fish, Short-Term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry stages, 1998, p. 18

OECD 305. Bioconcentration: Flow-through Fish Test, 1996, p. 23

Patočka, J. (2010): Kdo syntetizoval první organofosforový inhibitor acetylcholinesterázy? *Vojenské zdravotnické listy*. 74: 126-128

Pereira, J.J., Mercaldoallen, R., Kuropat, C., Leudke, D., Sennefelder, G. (1993): Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indexes of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 427-431

Peterka V. (2001): Praktická příručka pro zacházení s přípravky na ochranu rostlin, Státní rostlinolékařská správa, Praha, 2001, 265 p.

Pitter P. (2009): Hydrochemie, VŠCHT Praha, 4. Vydání, 579 p.

Poels, C.L.M., van der Gaag, M.A., van der Kerkhoff, J.F.J. (1980): An investigation into long-term effects of Rhine water on rainbow trout. *Water Resources* 14: 1029-1035

Rao, J.V. (2006): Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, (*Oreochromis mossambicus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 78-84

Roberts, T.R., Hutson, D.H. (1999): *Metabolic Pathways of Agrochemicals Part 2: Insecticides and Fungicides*, The Royal Society of Chemistry, Bodmin, 1999, 1475 p.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E. (1997): Sublethal effects an organophosphate insecticide on the European Eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36: 57-65

Sannino, A., Bandini, M., Bolzoni, L. (1999): Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegetables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography. *Journal of AOAC International* 82: 1229-1238

Slooff, W., van Kreijl, C.F., Baars, A.J. (1983): Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* 4: 1-14

Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Forlin, L. (2000): Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology* 48: 431-442

Svobodová, Z. (1977): Hepatopankreas kapra: vztah hmotnosti k obsahu glykogenu. *Bulletin VÚRH Vodňany* 13: 22-24

Tadeo, J. L., Sanchez – Brunete, C., Gonzáles, S. (2008): *Pesticides: Classification and Properties*. In: Tadeo J. L. (Ed.): *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. CRC Press, Boca Raton, p. 1-34

Tremolada, P., Finizio, A., Villa, S., Gaggi, C., Vighi, M. (2004): Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquatic Toxicology* 67: 87-103

Velíšek, J., Stastna, K., Sudova, E., Turek, J., Svobodova, Z. (2009): Effects of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Neuroendocrinology Letters* 30: 236-241

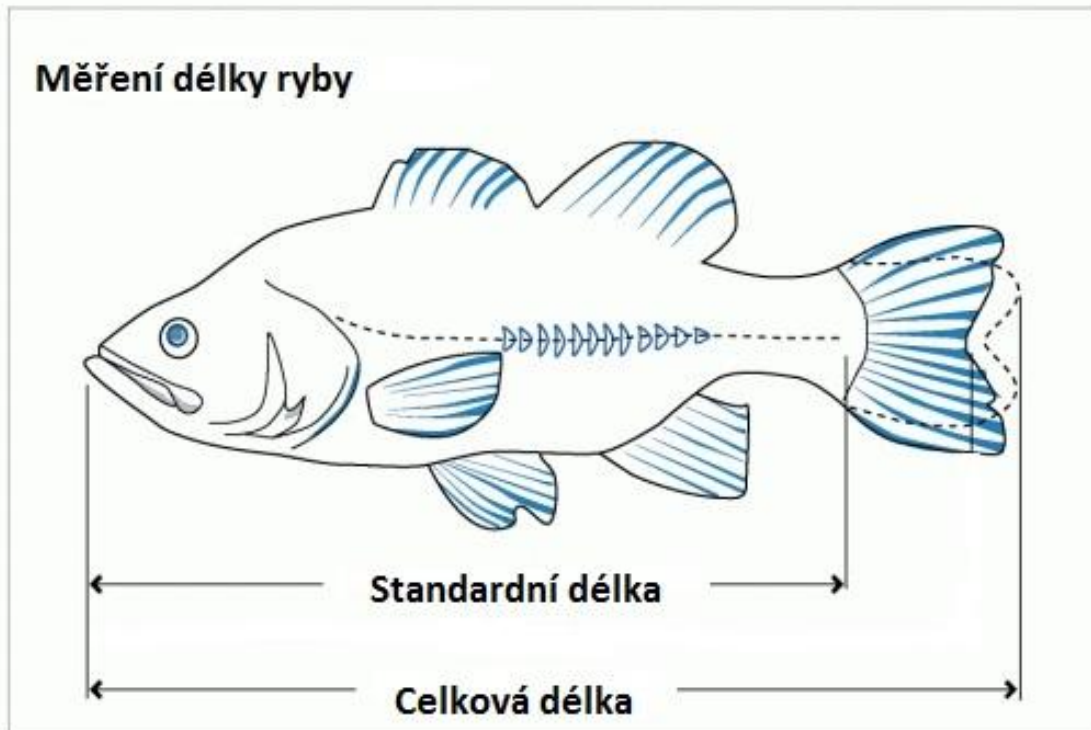
Velíšek, J., Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. (2010): Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 384-390

Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E. (2007): Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24: 286-291

Vyhláška MZd. č. 252/2004 Sb. Kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.

William, J. E. (2000): The Coefficient of Condition of Fish. Chapter 13 in Schneider, James C. (ed.) 2000. *Manual of fisheries survey methods II: with periodic updates*, Michigan Department of Natural Resources, Fisheries Special Report 25, Ann Arbor

9. PŘÍLOHA



PROHLÁŠENÍ AUTORA

Jsem si vědom, že

- odevzdáním závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby
- moje závěrečná práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí
- na moji závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jméno a příjmení autora

.....

Název práce

.....

V Brně dne

Podpis autora

1) zákon č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a záznamu o průběhu a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní vnitřní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 60:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez závažného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

POTVRZENÍ AUTORA

Svým podpisem potvrzují, že písemná verze mé bakalářské práce je shodná se souborem v pdf formě uloženým pod stejným názvem v Informačním systému STAG, příp. na předaném nosiči (CD, DVD).

Jméno a příjmení autora

.....

Název práce

.....

V Brně dne

Podpis autora